



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

**“ΑΠΟΤΙΜΗΣΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ
ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ ΕΝΔΗΜΙΚΗΣ ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ *OLEA EUROPAEA* ΤΟΥ «ΑΓΙΟΥ
ΟΡΟΥΣ» ΣΕ ΜΥΪΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΠΟΝΤΙΚΟΥ (C2C12) ΚΑΙ ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ
ΗΠΑΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ (HEPG2)”**



ΓΡΗΓΟΡΙΟΣ ΡΑΦΤΗΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2017

**“ΑΠΟΤΙΜΗΣΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ
ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ ΕΝΔΗΜΙΚΗΣ ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ *OLEA EUROPAEA* ΤΟΥ «ΑΓΙΟΥ
ΟΡΟΥΣ» ΣΕ ΜΥΪΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΠΟΝΤΙΚΟΥ (C2C12) ΚΑΙ ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ
ΗΠΑΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ (HEPG2)”**

**“ ASSESSMENT OF THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF AN OLIVE OIL TOTAL
POLYPHENOLIC FRACTION FROM A GREEK *OLEA EUROPAEA* VARIETY IN
HEPATIC CELLS AND MYOBLASTS. “**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δημήτριος Κουρέτας (επιβλέπων) : Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας, Διευθυντής Μεταπτυχιακού προγράμματος Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Δημήτριος Στάγκος : Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Δημήτριος Κομιώτης : Καθηγητής Οργανικής Χημείας με έμφαση στη σύνθεση Βιοδραστικών Μορίων του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτριο Κουρέτα, Καθηγητή Φυσιολογίας Ζωικών οργανισμών και Διευθυντή Μεταπτυχιακού Προγράμματος της Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας για την ανάθεση της διπλωματικής μου εργασίας, κατά την οποία ασχολήθηκα με ένα πολύ ενδιαφέρον θέμα που μου προσέφερε νέες και πολύτιμες γνώσεις και για όλη την βοήθεια που μου προσέφερε κατά την διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας.

Θα ήθελα επίσης, να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτριο Στάγκο, Επίκουρο Καθηγητή του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, που συνέβαλε με τις γνώσεις και την εμπειρία του, στην επίλυση των διαφόρων τεχνικών προβλημάτων.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλη την ομάδα του εργαστηρίου για το ιδιαίτερα φιλικό και συνεργατικό κλίμα που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο και ιδιαίτερα την υποψήφια διδάκτορα Κούκα Παρασκευή για τη πολύτιμη βοήθειά της τόσο στο πειραματικό μέρος όσο και στην συγγραφή της διπλωματικής μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το ελαιόλαδο από την αρχαιότητα θεωρείται πηγή ζωής και ευημερίας για τους λαούς της Μεσογείου και αποτελεί κύριο συστατικό της Μεσογειακής διατροφής. Επίσημα, χαρακτηρίζεται ως το έλαιο που λαμβάνεται από τους καρπούς της ελιάς *Olea europaea*. Σαν φυσικό προϊόν περιέχει πληθώρα βιοδραστικών συστατικών, όπως τυροσόλη, υδροξυτυροσόλη, ελαιοευρωπαϊνή και ελαιοκανθάλη. Πληθώρα ερευνητικών μελετών έχουν αποδώσει σε αυτές τις ουσίες πολλές ευεργετικές επιδράσεις σε παθολογικές καταστάσεις όπως ο καρκίνος, οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες, ο διαβήτης κ.α. Ένα από τα αίτια αυτών των ασθενειών, είναι και το οξειδωτικό στρες, η ανισορροπία μεταξύ ελευθέρων ριζών και αντιοξειδωτικών μηχανισμών του κυττάρου, προς όφελος των πρώτων. Ωστόσο οι περισσότερες μελέτες αναφέρονται σε ξεχωριστά συστατικά του ελαιολάδου και όχι σε ένα συνολικό εκχύλισμα. Συνεπώς, σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης ήταν να εξεταστούν οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες ενός συνολικού πολυφαινολικού κλάσματος ελαιολάδου (TPF), πλούσιο σε πολυφαινόλες, από μια Ελληνική ενδημική ποικιλία *Olea europaea*, που καλλιεργείται στο Άγιο Όρος, με απώτερο στόχο την χρήση του TPF ως αντιοξειδωτικού συμπληρώματος διατροφής. Ο στόχος αυτός υλοποιήθηκε, σε κυτταρικό επίπεδο, συγκεκριμένα σε ανθρώπινα ηπατικά κύτταρα (HepG2) και μυοβλάστες ποντικού (C2C12), όπου έγινε εκτίμηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των κυττάρων [επίπεδα GSH, ROS, TBARS, πρωτεϊνικά καρβονύλια, αλβουμίνη, γGCLc]. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν έδειξαν ότι το TPF βελτιώνει το οξειδοαναγωγικό προφίλ και των δύο κυτταρικών σειρών, κυρίως μέσω αύξησης της GSH και της καταλυτικής της υπομονάδας, ενώ σε χαμηλές, μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις TPF, παρατηρήθηκε μείωση TBARS και καρβονυλίων. Ενώ τα επίπεδα των ROS, φάνηκε να μειώνονται στατιστικά σημαντικά μόνο στην κυτταρική σειρά HepG2.

ABSTRACT

From antiquity, Olive oil is considered a source of life and prosperity for the Mediterranean people and is a key component of the Mediterranean diet. Officially, it is characterized as the oil obtained from the *Olea europaea* olives. As a natural product, it consists of bioactive components, such as tyrosol, hydroxytyrosol, oleuropein and oleocanthal. Numerous research studies have attributed to these substances many beneficial effects on pathological conditions such as cancer, neurodegenerative diseases, diabetes, etc. One of the major cause of these diseases, is the imbalance between free radicals and the antioxidant defense mechanisms, in the favor of the first, a condition named oxidative stress. However, most studies refer to separate components of olive oil and not to a total extract. Therefore, the purpose of this study was to examine the antioxidant properties of a total polyphenolic fraction of olive oil (TPF), from a Greek endemic *Olea europaea* cultivated on Mount Athos, with the ultimate goal of using the TPF as an antioxidant food supplement. This goal was accomplished at the cellular level, specifically in human hepatic cells (HepG2) and mouse myoblasts (C2C12), where the redox status of the cells was assessed [in terms of GSH, ROS, TBARS, protein carbonyl, albumin, γ GCLc levels]. The results showed that TPF improves the redox profile of both cell lines, mainly by increasing the GSH and its catalytic subunit, while at low, not cytotoxic TPF concentrations there was a decrease in TBARS and carbonyls. While ROS levels appeared to decrease significantly only in the HepG2 cell line.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ.....	3
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ABSTRACT.....	6
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	9
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ.....	10
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	11
1.1 Ελαιόλαδο	11
1.1.1 Χημική Σύσταση Ελαιολάδου	11
1.1.2 Διατροφική Αξία Ελαιολάδου	13
1.2 Ελεύθερες Ρίζες.....	15
1.3 Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS).....	16
1.3.1 Δημιουργία Ελευθέρων Ριζών	17
1.4 Οξειδωτικό Στρες- Αντιοξειδωτική Άμυνα	19
1.4.1 Σημαντικά αντιοξειδωτικά μόρια που μελετήθηκαν.....	21
1.5 Διαταραχές Οξειδωτικού Στρες	23
1.6 Ευεργετικές Επιδράσεις Ελευθέρων Ριζών.....	24
1.7 Πολυφαινόλες.....	25
1.7.1 Χημική Δομή Και Τάξεις Πολυφαινολών	26
1.7.2 Ευεργετικές Επιδράσεις Πολυφαινολών.....	27
1.8 Κυτταρικές Σειρές	29
1.8.1 Μυοβλάστες Ποντικού C2C12	29
1.8.2 Ανθρώπινα Καρκινικά Ηπατικά Κύτταρα (HepG2).....	29
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	29
3. ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ.....	30
3.1 Αντιδραστήρια.....	31
3.2 Καλλιέργεια κυτταρικών σειρών C2C12 και HepG2	31
3.3 Μέθοδος ΧΤΤ για προσδιορισμό κυτταροτοξικής δράσης εκχυλίσματος ελαιολάδου..	332
3.4 Προσδιορισμός επιπέδων ROS και GSH με κυτταρομετρία ροής.....	33
3.5 Προσδιορισμός επιπέδων TBARS	35
3.6 Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνικών καρβονυλίων	36

3.8 Western Blot Analysis	38
3.9 Προσδιορισμός αλβουμίνης μέσω του αντιδραστηρίου Bromocresol Green.....	40
3.10 Στατιστική Ανάλυση	40
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	41
4.1 Μέθοδος ΧΤΤ	41
4.1.1 Μυοβλάστες Ποντικού (C2C12).....	41
4.1.2 Ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα ήπατος (HepG2)	41
4.2 Προσδιορισμός της οξειδοαναγωγικής κατάστασης με κυτταρομετρία ροής	42
4.2.1 Επίπεδα Γλουταθειόνης (GSH).....	42
4.2.2 Επίπεδα δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS).....	46
4.3 Ουσίες που αντιδρούν με το Θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS).....	50
4.3.1 Επίπεδα Tbars σε C2C12.....	50
4.4 Πρωτεϊνικά καρβονύλια (protein carbonyls).....	51
4.4.1 Πρωτεϊνικά καρβονύλια σε μυοβλάστες ποντικού C2C12	51
4.5.1 Επίπεδα αλβουμίνης σε C2C12	52
4.5.2 Ποσοστό αλβουμίνης σε HepG2.....	53
4.6 Western Blot	54
4.6.4 Επίπεδα γ- GCLc σε HepG2	57
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	58
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	64

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1 : Χημική Δομή Τριγλυκεριδίου	12
Εικόνα 2: Χημικές δομές σημαντικότερων συστατικών ελαιολάδου	12
Εικόνα 3 : Χημική Δομή Βιταμίνης E (τοκοφερόλης)	14
Εικόνα 4 : Χημική Δομή Ελαιοκανθάλης	14
Εικόνα 5: Κύριες πολυφαινόλες ελαιολάδου	15
Εικόνα 6 : Δραστικές μορφές οξυγόνου και τα ηλεκτρόνια της εξωτερικής τους στιβάδας	17
Εικόνα 7: Παραγωγή ROS στα μιτοχόνδρια	18
Εικόνα 8: Δημιουργία οξειδωτικού στρες	19
Εικόνα 9: Τρόπος δράσης μιάς αντιοξειδωτικής ουσίας	21
Εικόνα 10: Αντιδράσεις παραγωγής GSH	22
Εικόνα 11: Διαταραχές που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες	24
Εικόνα 12: Δομή μιάς φαινόλης	25
Εικόνα 13: Δράσεις πολυφαινολών	28
Εικόνα 14: Μεταβολισμός του XTT σε φορμαζάνη από ζωντανά κύτταρα	32
Εικόνα 15: Υδροδυναμική εστίαση δείγματος μέσα από τον θάλαμο ροής	34
Εικόνα 16: Οι πιθανοί μηχανισμοί με τους οποίους το TPF ασκεί τα αποτελέσματά του στα επίπεδα GSH	60

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1: Προσδιορισμός κυτταροτοξικότητας TPF, στην κυτταρική σειρά C2C12, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης της ουσίας, με τη μέθοδο ΧΤΤ.	41
Διάγραμμα 2: Προσδιορισμός κυτταροτοξικότητας TPF, στην κυτταρική σειρά HepG2, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης της ουσίας, με τη μέθοδο ΧΤΤ.	42
Διάγραμμα 3: Επίδραση TPF στα επίπεδα GSH, στην κυτταρική σειρά C2C12, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης του εκχυλίσματος, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.	43
Διάγραμμα 4: Επίδραση TPF στα επίπεδα GSH στην κυτταρική σειρά C2C12.	43
Διάγραμμα 5: Επίδραση TPF στα επίπεδα GSH, στην κυτταρική σειρά HepG2, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης του εκχυλίσματος, μέσω κυτταρομετρίας ροής.	44
Διάγραμμα 6: Επίδραση TPF στα επίπεδα GSH στην κυτταρική σειρά HepG2.	45
Διάγραμμα 7: Επίδραση TPF στα επίπεδα ROS, στην κυτταρική σειρά C2C12, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης του εκχυλίσματος, μέσω κυτταρομετρίας ροής.	46
Διάγραμμα 8: Επίδραση TPF στα επίπεδα ROS στην κυτταρική σειρά C2C12.	47
Διάγραμμα 9: Επίδραση TPF στα επίπεδα ROS, στην κυτταρική σειρά HepG2, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης του εκχυλίσματος, μέσω κυτταρομετρίας ροής.	48
Διάγραμμα 10: Επίδραση TPF στα επίπεδα ROS στην κυτταρική σειρά HepG2.	49
Διάγραμμα 11: Επίπεδα Tbars, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης TPF στην κυτταρική σειρά C2C12.	50
Διάγραμμα 12: Επίπεδα Tbars, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης TPF στην κυτταρική σειρά HepG2.	51
Διάγραμμα 13: Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης TPF στην κυτταρική σειρά C2C12.	51
Διάγραμμα 14: Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης TPF στην κυτταρική σειρά HepG2.	52
Διάγραμμα 15: Ποσοστό αλβουμίνης σε σχέση με την συνολική πρωτεΐνη, σε C2C12, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης TPF.	53
Διάγραμμα 16: Ποσοστό αλβουμίνης σε σχέση με την συνολική πρωτεΐνη, σε HepG2, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης TPF.	53
Διάγραμμα 17: Επίδραση TPF στα πρωτεϊνικά επίπεδα της αλβουμίνης, στην κυτταρική σειρά C2C12.	54
Διάγραμμα 18: Επίδραση TPF στα πρωτεϊνικά επίπεδα της γ -GCLc, στην κυτταρική σειρά C2C12.	55
Διάγραμμα 19: Επίδραση TPF στα πρωτεϊνικά επίπεδα της αλβουμίνης, στην κυτταρική σειρά HepG2.	56
Διάγραμμα 20: Επίδραση TPF στα πρωτεϊνικά επίπεδα της γ -GCLc, στην κυτταρική σειρά HepG2.	57

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ελαιόλαδο

Ελαιόλαδο είναι το λάδι που προέρχεται από τους καρπούς της ελιάς (*Olea europaea*). Το παρθένο ελαιόλαδο παράγεται με μηχανική επεξεργασία του ελαιοκάρπου στα ελαιοτριβεία. Αποτελεί βασικό στοιχείο της μεσογειακής διατροφής και θεωρείται προϊόν υγιεινής διατροφής λόγω της περιεκτικότητάς του σε μονοακόρεστα λιπαρά και σε αντιοξειδωτικές ουσίες (Fitó et al. 2008).

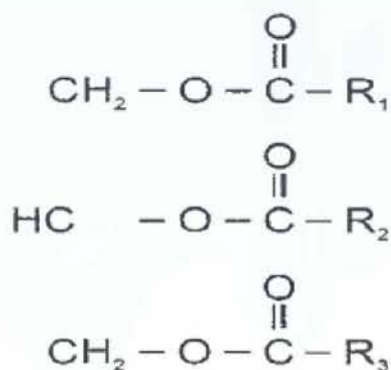
Η επέκταση των μεσογειακών πολιτισμών συνδέθηκε άμεσα με την παραγωγή και την χρήση του ελαιολάδου, καθώς αποτελούσε συστατικό πολλών αρχαίων φαρμακευτικών θεραπειών και προϊόν καθημερινής διατροφής. (El and Karakaya 2009).

Ακόμα και σήμερα, οι μεσογειακές χώρες παραμένουν από τους σημαντικότερους παραγωγούς ελαιολάδου στον κόσμο, με την Ισπανία, την Ιταλία και την Ελλάδα να παράγουν τις μεγαλύτερες ποσότητες. Η Ισπανία παράγει μεγαλύτερες ποσότητες ελαιολάδου από τις άλλες δύο, ενώ η Ελλάδα παράγει πιο ποιοτικό ελαιόλαδο από τις άλλες δύο μεσογειακές χώρες. (<http://www.prosodol.gr>)

Στην Ελλάδα υπάρχουν διάφορες ποικιλίες ελιών. Οι πιο γνωστές και πιο συνηθισμένες είναι η Κορωνεική, η Λιανολία, η Καλαμών, η Θρουμπολία και η Αθηνολία. (<http://www.karpea.gr/el/>)

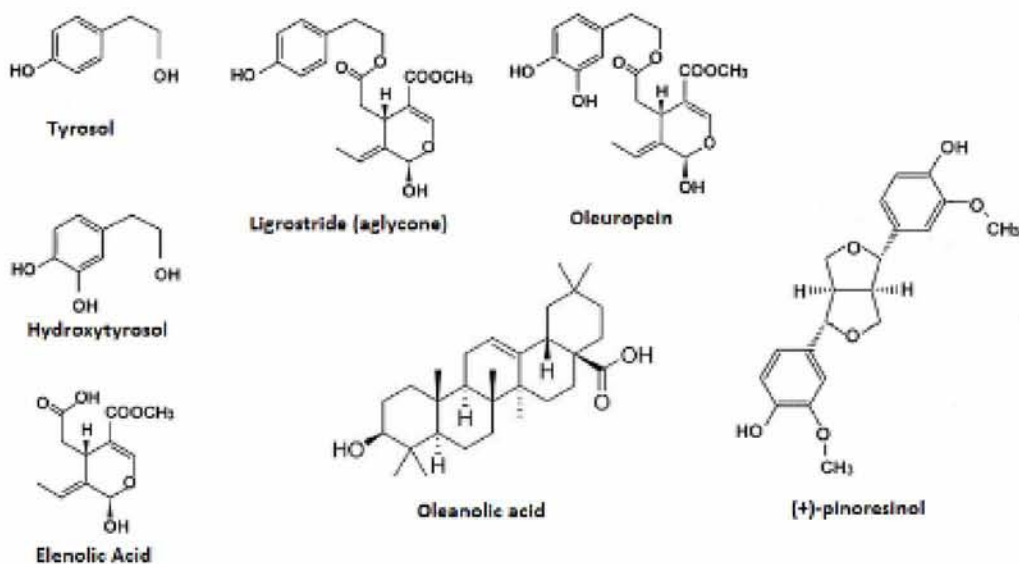
1.1.1 Χημική Σύσταση Ελαιολάδου

Το ελαιόλαδο είναι μείγμα εστέρων της γλυκερίνης (τριγλυκερίδια, Εικόνα 1) με τα ανώτερα λιπαρά οξέα, μερικά από τα οποία είναι ακόρεστα ενώ άλλα είναι κορεσμένα. Εκτός από τα τριγλυκερίδια, το ελαιόλαδο περιέχει μικρές ποσότητες και από άλλα συστατικά όπως: ελεύθερα λιπαρά οξέα, φωσφατίδια (λεκιθίνες), στερόλες, φαινόλες, τοκοφερόλες, χρωστικές και διάφορες ρητινοειδείς και ζελατινοειδείς ουσίες. (Kiritsakis, Kanavouras, and Kiritsakis 2002)



Εικόνα 1 : Χημική Δομή Τριγλυκεριδίου

Τα αποτελέσματα της χημικής ανάλυσης του ελαιολάδου έχουν δείξει ότι τα κυριότερα συστατικά του ελαιολάδου είναι οι τριακυλογλυκερόλες και διάφορα λιπαρά οξέα. Το κυριότερο λιπαρό οξύ του ελαιολάδου είναι το ελαϊκό οξύ σε ποσοστό 83% . Επίσης το 2-3% του βάρους του ελαιολάδου καταλαμβάνουν 230 χημικές ενώσεις (αλειφατικές και τριτερπενικές αλκοόλες, στερόλες, υδρογονάνθρακες, πτητικές και φαινολικές ενώσεις). (Gomes et al. 2012)



Εικόνα 2: Χημικές δομές σημαντικότερων συστατικών ελαιολάδου

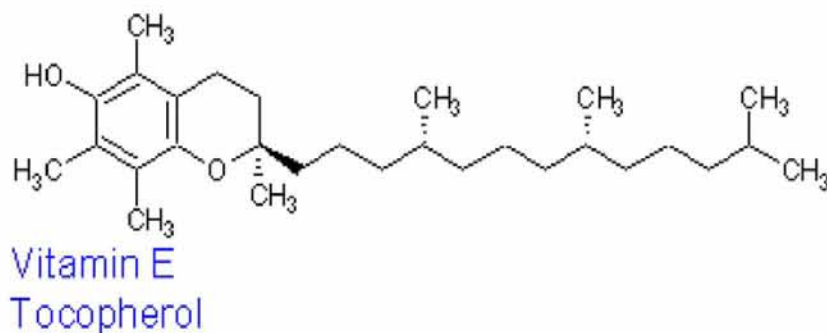
Η τυροσόλη, η υδροξυτυροσόλη (ΗΤ) και τα σεκοριδοειδή παράγωγά τους (λιγκστοσίδη, ελαιοευρωπαϊνή) συνεισφέρουν μεταξύ 60-80% της συνολικής περιεκτικότητας σε φαινολικές ενώσεις του παρθένου ελαιολάδου, ανάλογα με την ελαιοκαλλιέργεια και τη γεωγραφική προέλευση (Pastor et al. 2016).

1.1.2 Διατροφική Αξία Ελαιολάδου

Η διατροφική αξία του ελαιολάδου είναι γνωστή από τα αρχαία χρόνια. Ο Ιπποκράτης, ο πατέρας της Ιατρικής, το περιγράφει σαν το τέλειο θεραπευτικό. Ο Διοσκουρίδης ονομάζει το ελαιόλαδο «*προς την εν υγεία χρήσιν άριστον*». Αναφέρει ποικίλες θεραπευτικές ιδιότητες κατά του έρπητος, κατά της κεφαλαλγίας και των ρευματικών πόνων. (Γ. Κ. Γεωργαλάς, στο λήμμα "Ελαία", Μεγάλη Ελληνική Εγκυκλοπαίδεια Π. Δρανδάκη, Αθήνα)

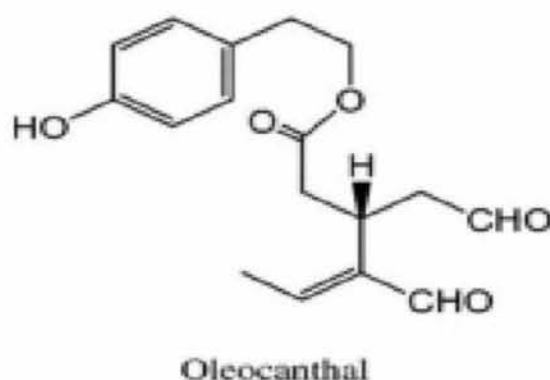
Η ευεργετική αξία του ελαιολάδου οφείλεται κυρίως στην περιεκτικότητά του σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα. Τα μονοακόρεστα λιπαρά στη διατροφή έχουν συνδεθεί με τη διατήρηση της υγείας του καρδιαγγειακού συστήματος. Μελέτες έχουν δείξει ότι όταν τα κορεσμένα λιπαρά της διατροφής αντικατασταθούν από πολυακόρεστα και μονοακόρεστα , τότε φαίνεται να βελτιώνεται το λιπιδαιμικό προφίλ. Πιο συγκεκριμένα , παρατηρήθηκε μείωση της συστολικής πίεσης ορισμένων υπερτασικών ασθενών, αμέσως μετά από την πρόσληψη παρθένου ελαιολάδου (Fitó et al. 2008).

Το ελαιόλαδο αποτελεί εξαιρετική πηγή βιταμίνης Ε (τοκοφερόλη, Εικόνα 3) , της λιποδιαλυτής βιταμίνης που εμφανίζει έντονη αντιοξειδωτική δράση. Η βιταμίνη Ε του ελαιολάδου είναι ένα ακόμη συστατικό του, το οποίο συνδέεται με τη διατήρηση της υγείας της καρδιάς σε συνδυασμό με τις πολυφαινόλες του και τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα που περιέχει. Η αντιοξειδωτική δράση της βιταμίνης Ε του ελαιολάδου έχει συσχετισθεί και με την πρόληψη της πρόωρης γήρανσης. (Raederstorff et al. 2015)



Εικόνα 3 : Χημική Δομή Βιταμίνης E (τοκοφερόλης)

Ένα ακόμη συστατικό του ελαιολάδου, η ελαιοκανθάλη (Εικόνα 4) συσχετίζεται με την προστασία έναντι του Alzheimer. Μελέτες έδειξαν ότι η ελαιοκανθάλη έχει την ικανότητα να αποτρέπει την συσσώρευση αμυλοειδούς-β (Aβ) *in vitro* και να ενισχύει την κάθαρση του Aβ από τους εγκεφάλους ποντικών άγριου τύπου *in vivo* (Qosa et al. 2015) Η ελαιοκανθάλη του ελαιόλαδου έχει βρεθεί ότι έχει παρόμοια δράση με το αντιφλεγμονώδες φάρμακο ibuprofene ((Beauchamp et al. 2005).



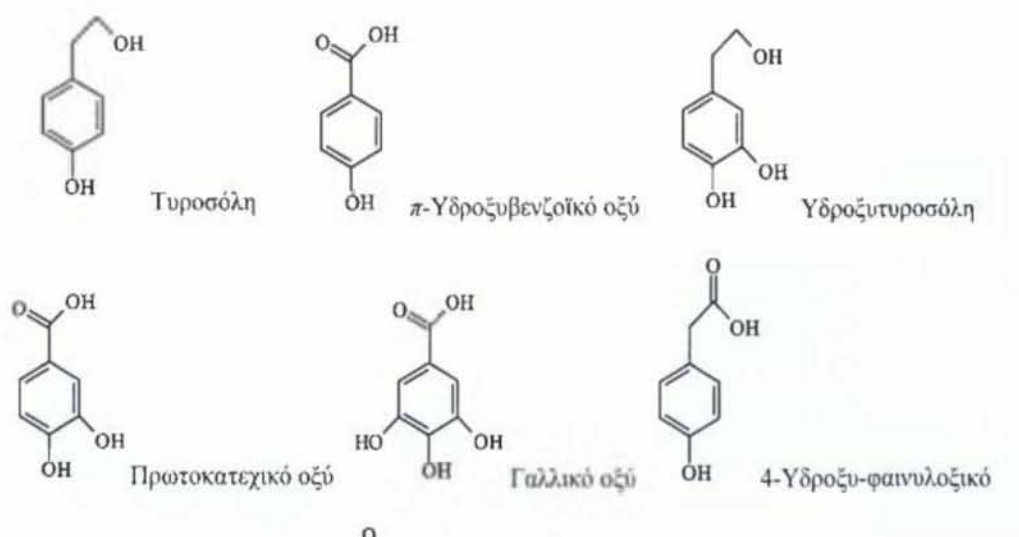
Εικόνα 4 : Χημική Δομή Ελαιοκανθάλης

Το ελαιόλαδο είναι πλούσιο σε πολυφαινόλες, οι οποίες αποτελούν το «πολικό κλάσμα» του και εμποδίζουν την αυτο-οξειδωσή του, αποδίδοντας σε αυτές την εξαιρετική θερμική σταθερότητά του και το χαρακτηριστικό του άρωμα και γεύση. (Panagiotoroulou and Tsimidou 2007) Οι φαινόλες υπάρχουν στο ελαιόλαδο από την φύση ώστε να λειτουργούν αντιοξειδωτικά και να προστατεύουν το ελαιόλαδο από το τάγγισμα, όταν αυτό δέχεται την καταστροφική επίθεση του οξυγόνου του ατμοσφαιρικού αέρα και της ηλιακής ακτινοβολίας. (Bulotta et al. 2014)

Μία σημαντική πολυφαινόλη του ελαιολάδου , η υδροξυτυροσόλη (HT) βοηθά στην κυτταρική λειτουργία των οργανισμών. Μελέτες έχουν δείξει ότι η υδροξυτυροσόλη, αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων όπως λευχαιμία και καρκίνο παχέος εντέρου. (Pampaloni et al. 2014)

Επίσης , έρευνες in vitro έχουν δείξει ότι οι φαινολικές ενώσεις στο λάδι, έχουν αντιμικροβιακές ιδιότητες. Ιδιαίτερα, οι φαινολικές ενώσεις ελαιοευρωπαΐνη, υδροξυτυροσόλη και τυροσόλη εμφανίζουν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση εναντίων πολλών στελεχών βακτηρίων τα οποία είναι υπεύθυνα για εντερικές και αναπνευστικές λοιμώξεις. (Medina et al. 2006)

Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζονται οι κύριες πολυφαινόλες του ελαιολάδου:



Εικόνα 5: Κύριες πολυφαινόλες ελαιολάδου

1.2 Ελεύθερες Ρίζες

Ένα άτομο ή μόριο με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια και ανεξάρτητη παρουσία, λέγεται **ελεύθερη ρίζα** και συμμετέχει πολύ εύκολα σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής με γειτονικά μόρια. (Halliwell and Gutteridge 1990)

Όταν ένα ή περισσότερα ηλεκτρόνια, ιδιαίτερα αυτά που βρίσκονται στα εξωτερικά τροχιακά του ατόμου, είναι ασύζευκτα, τότε το μόριο γίνεται ασταθές. 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 and Gutteridge 1990) Αξίζει να σημειωθεί πως υπάρχουν διάφοροι τύποι ελευθέρων ριζών που μπορούν να έχουν ως κεντρικό άτομο το οξυγόνο, το άζωτο, το θείο, τον άνθρακα αλλά και άλλα μόρια.

Οι πλέον σημαντικές ελεύθερες ρίζες είναι μοριακά είδη με κέντρο το οξυγόνο και μερικές φορές το άζωτο (Sengupta, Ghosh, and Bhattacharjee 2004) (Pani, Galeotti, and Chiarugi 2010) , το θείο (Pani, Galeotti, and Chiarugi 2010) ή τον άνθρακα.

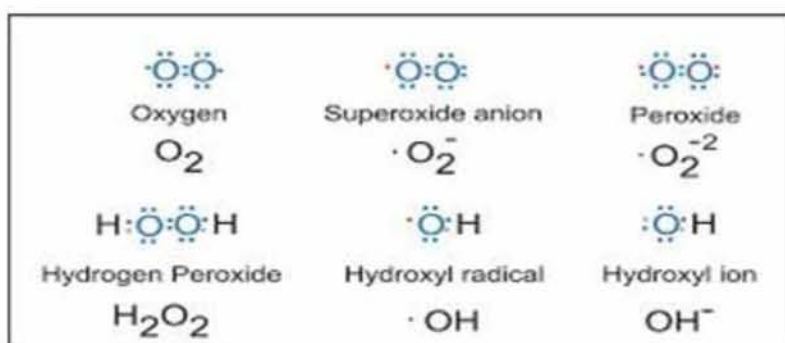
1.3 Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS)

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (Πίνακας 1) είναι χημικά δραστικές ουσίες που περιέχουν οξυγόνο και σε αυτές ανήκουν και ουσίες που αποτελούν ελεύθερες ρίζες όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 1 : Δραστικές Μορφές Οξυγόνου

ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ	
<u>Ρίζες</u>	<u>Μη- Ρίζες</u>
Ανιόν Σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$)	Υπεροξειδίο Υδρογόνου (H_2O_2)
Ρίζα Υδροξυλίου (OH^{\cdot})	Υποχλωριώδες Οξύ ($HOCl$)
Ρίζα Υπεροξειδίου (RO_2^{\cdot})	Υποβρωμιώδες Οξύ $HOBr$)
Ρίζα Αλκοξειδίου (RO^{\cdot})	Όζον (O_3)
Ρίζα Υδροϋπεροξειδίου (HO_2^{\cdot})	Μονήρες Οξυγόνο (1O_2)

Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 6) απεικονίζονται δραστικές μορφές οξυγόνου και τα ηλεκτρόνια της εξωτερικής τους στιβάδας. Επίσης, μπορούν να διακριθούν τα μονήρη ηλεκτρόνια που διαθέτει το ανιόν σουπεροξειδίου και η ρίζα υδροξυλίου.



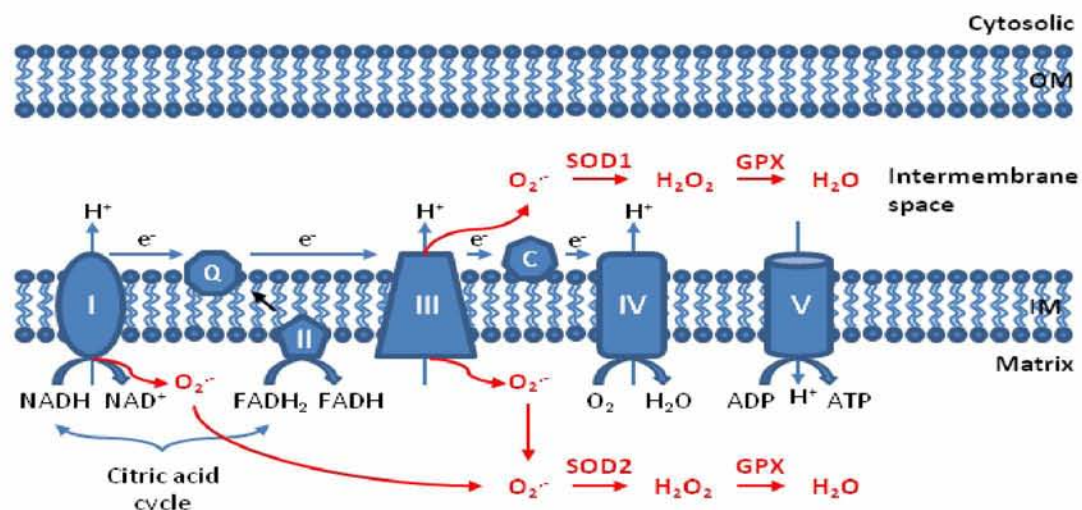
Εικόνα 6 : Δραστικές μορφές οξυγόνου και τα ηλεκτρόνια της εξωτερικής τους στιβάδας

1.3.1 Δημιουργία Ελευθέρων 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: (M. Valko et al. 2006)

A) Η πιο σημαντική πηγή ελεύθερων ριζών είναι μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, κατά την οποία τα ηλεκτρόνια του NADH και FADH₂ μεταφέρονται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, το οποίο αποτελείται από τρία συμπλέγματα πρωτεϊνών που βρίσκονται ενσωματωμένα στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων (σύμπλεγμα NADH δεϋδρογονάσης, σύμπλεγμα αναγωγάσης κυτοχρώματος c, σύμπλεγμα οξειδάσης κυτοχρώματος c) και από δύο ελεύθερα διαχεόμενα μόρια (ουβικινόνη, κυτόχρωμα c) που μεταφέρουν ηλεκτρόνια από το ένα σύμπλεγμα στο άλλο. Τελικός αποδέκτης των ηλεκτρονίων είναι το μοριακό οξυγόνο, το οποίο ανάγεται πλήρως προς νερό, ενώ ταυτόχρονα η ενέργεια που δημιουργείται κατά τη μετακίνηση των πρωτονίων αποθηκεύεται στην ATP μέσω της συνθετάσης του ATP. Αυτό αφορά το 95-99% του οξυγόνου. Το υπόλοιπο οξυγόνο διαφεύγει από

τα συμπλέγματα πρωτεϊνών με τη μορφή μονήρους οξυγόνου και σουπεροξειδίου (Παπαγαλάνης 2014).



Εικόνα 7: Παραγωγή ROS στα μιτοχόνδρια

Β) 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 $O_2^{\bullet-}$, το H_2O_2 και το HO^{\bullet} (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

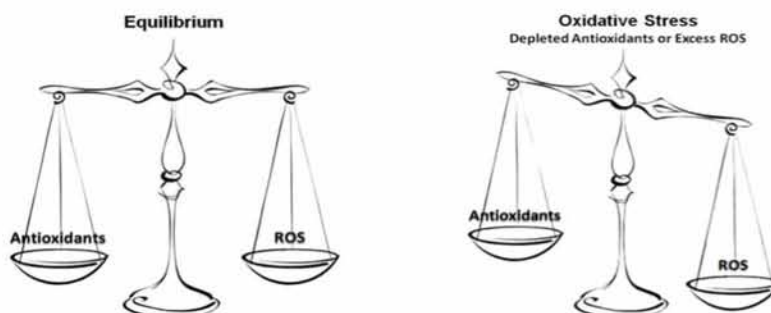
υλικά (μεταμοσχευθέντα όργανα ή ιστοί). Τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα παρουσιάζουν αυξημένη κατανάλωση οξυγόνου που συνοδεύεται από παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων ελευθέρων ριζών. (Παπαγαλάνης 2014)

1.4 Οξειδωτικό Στρες- Αντιοξειδωτική Άμυνα

Σε κάθε βιολογικό σύστημα πρέπει να διατηρείται η ισορροπία μεταξύ του σχηματισμού και της απομάκρυνσης δραστικών ειδών οξυγόνου και αζώτου. Σε περίπτωση, όμως, που προκύψει μια σοβαρή δυσαναλογία μεταξύ των δραστικών ειδών οξυγόνου και αζώτου και του αντιοξειδωτικού μηχανισμού του οργανισμού σε βάρους του τελευταίου, τότε παρατηρείται το φαινόμενο του οξειδωτικού στρες (Pisoschi and Pop 2015)

Το φαινόμενο αυτό, δημιουργεί μια άνιση σχέση προ-οξειδωτικής και αντιοξειδωτικής ισορροπίας, η οποία καταλήγει σε μια σειρά δομικών και λειτουργικών κυτταρικών αλλαγών, που μπορούν να οδηγήσουν το κύτταρο σε απόπτωση ή νέκρωση. (Rahal et al. 2014) Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκληθεί είτε από μείωση της δράσης των αντιοξειδωτικών μηχανισμών είτε από αυξημένη παραγωγή δραστικών ειδών αζώτου και οξυγόνου. Στην πρώτη περίπτωση, παρατηρούνται διάφορες μεταλλάξεις και τοξικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων, εξάντληση των ενδογενών αντιοξειδωτικών παραγόντων λόγω πιθανής παθολογικής κατάστασης, καθώς και μείωση των αντιοξειδωτικών ουσιών που προσλαμβάνονται μέσω της τροφής. Στη δεύτερη περίπτωση, έχουμε έκθεση των κυττάρων σε υψηλά επίπεδα ROS και RNS ή ύπαρξη παραγόντων που αυξάνουν την παραγωγή τους.

Εικόνα 8: Δημιουργία οξειδωτικού στρες

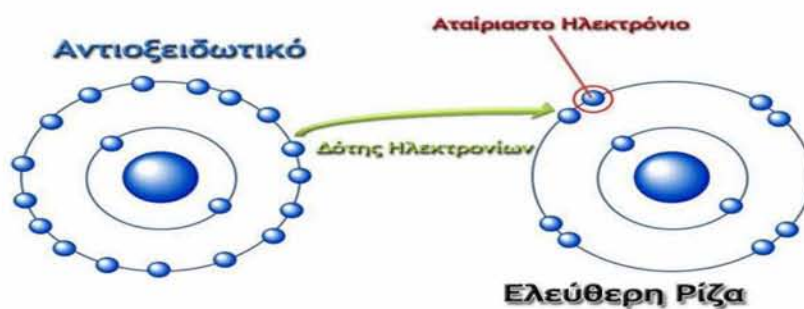


Ως αντιοξειδωτική ουσία ορίζουμε κάθε ουσία η οποία βρίσκεται σε μικρές συγκεντρώσεις σε σύγκριση με το υπόστρωμα που οξειδώνεται και η οποία καθυστερεί σημαντικά ή αποτρέπει την οξείδωση του υποστρώματος αυτού (Krisinsky 2002)

Η βασική διάκριση των αντιοξειδωτικών γίνεται με βάση την προέλευσή τους (εξωγενή ή ενδογενή), τη διαλυτότητά τους (υδρόφιλα ή λιπόφιλα) και τη χημική τους φύση (ενζυμική ή μη ενζυμική).

Ειδικότερα, τα ενδογενή αντιοξειδωτικά, δηλαδή αυτά που τα παράγει από μόνος του ο οργανισμός, ταξινομούνται κυρίως σε ενζυμικά και μη ενζυμικά. Ενζυμικές αντιοξειδωτικές ουσίες θεωρούνται η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση, η τρανσφεράση-S της γλουταθειόνης, η ρεδοκτάση της γλουταθειόνης, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης. Όσον αφορά τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά, αυτά κατανέμονται ισότιμα μέσα σε ένα ζωντανό οργανισμό. Στο εξωκυττάριο τμήμα, και συγκεκριμένα στο πλάσμα, όλα τα στοιχεία που είναι ικανά να δώσουν άτομα υδρογόνου ή ηλεκτρόνια για να ικανοποιήσουν την ανάγκη των ελεύθερων ριζών, αποτελούν κομμάτι του αντιοξειδωτικού μηχανισμού. Σε αυτό περιλαμβάνονται η λευκωματίνη, η χολερυθρίνη και το ουρικό οξύ. Ενδοκυττάρια, το αντιοξειδωτικό αμυντικό σύστημα κατανέμεται ισότιμα στις μεμβράνες και στο κυτταρόπλασμα. Επειδή η πλειοψηφία των ελεύθερων ριζών παράγεται σε τμήματα όπου υπάρχουν λιπίδια, τα λιπόφιλα αντιοξειδωτικά (βιταμίνη E, β-καροτένιο) εντοπίζονται στις μεμβράνες και αποτελούν την πρώτη γραμμή του αμυντικού συστήματος. Στις επόμενες γραμμές του αμυντικού συστήματος ανήκουν η υδατοδιαλυτή βιταμίνη C, μερικά μέλη του συμπλέγματος βιταμινών B και η γλουταθειόνη (Gerogianni & Gourgouliaanis 2006).

Επιπρόσθετα, τα πιο συνηθισμένα εξωγενή αντιοξειδωτικά είναι η βιταμίνη C, η βιταμίνη E (τοκοφερόλες), βιταμίνη A, τα φλαβονοειδή, τα φυτοχημικά και ολιγοστοιχεία (π.χ. σελήνιο, χαλκός, ψευδάργυρος, μαγνήσιο) τα οποία μπορούν να χορηγηθούν ως συμπληρώματα διατροφής.



Εικόνα 9: Τρόπος δράσης μίας αντιοξειδωτικής ουσίας

1.4.1 Σημαντικά αντιοξειδωτικά μόρια που μελετήθηκαν

Γλουταθειόνη (GSH)

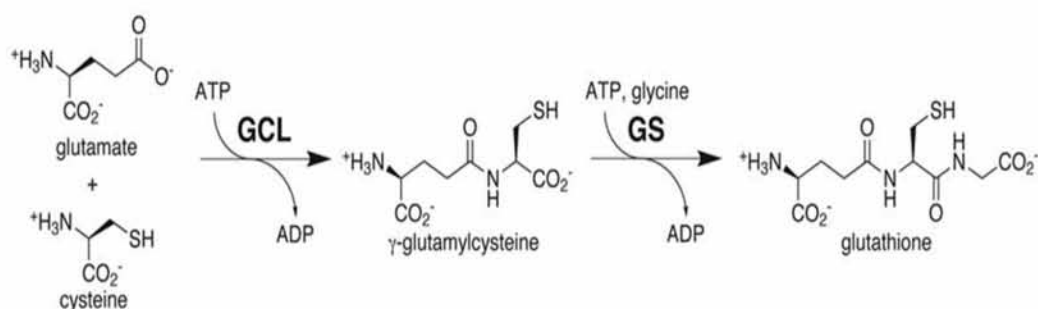
Είναι η πιο άφθονη μη πρωτεϊνική πηγή θειόλης στο κύτταρο και οι συγκεντρώσεις της στους περισσότερους ιστούς είναι στην κλίμακα των millimolar. Η GSH εξυπηρετεί πολλές λειτουργίες κατά την προστασία των ιστών από οξειδωτική βλάβη και τη διατήρηση του ενδοκυτταρικού περιβάλλοντος σε ανηγμένη κατάσταση. (Meister and Anderson 1983) Η GSH ανάγει το υδρογόνο και τα οργανικά υπεροξειδία μέσω μιας αντίδρασης που καταλύεται από την GPx, εξουδετερώνει την OH· και το $1O_2$ και ανάγει τις ρίζες τοκοφερόλης εμποδίζοντας επομένως τη λιπιδική υπεροξείδωση. (Ketterer and Meyer 1989)

Επαρκείς συγκεντρώσεις GSH είναι απαραίτητες για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, συμπεριλαμβανομένου των λεμφοκυττάρων και των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων (Aw, 2003). Επιπλέον, η GSH είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων και των πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων καθώς και την παραγωγή κυτοκινών.

Η GSH μπορεί να συντεθεί τόσο από ενδογενή όσο και από αμινοξέα της διατροφής, αλλά μόνο το ήπαρ συμβάλει σε σημαντική *de novo* σύνθεση της.

Λιγάση της γ-γλουτάμυλο κυστεΐνης (γ-gcl)

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



Εικόνα 10: Αντιδράσεις παραγωγής GSH

Το πρώτο και αργό βήμα (άρα και καθοριστικό βήμα) της σύνθεσης της γλουταθειόνης καταλύεται από τη γ-GCL. Η σύνθεση της GSH ολοκληρώνεται με την προσθήκη γλυκίνης στη γ-γλουτάμυλοκυστεΐνη από τη συνθετάση της γλουταθειόνης (GS). (Franklin et al. 2009)

Η καταλυτική υπομονάδα γ-GCLC (~ 73 kDa) διαθέτει όλες τις θέσεις δέσμησης του υποστρώματος και είναι υπεύθυνη για όλη την κατάλυση.

Αλβουμίνη (Albumin)

Η αλβουμίνη είναι μία άφθονη πολύ-λειτουργική, μη γλυκοσυλιωμένη, αρνητικά φορτισμένη πρωτεΐνη του πλάσματος. Διαθέτει ιδιότητες μεταφοράς, καθώς και αντιοξειδωτικές και ενζυματικές λειτουργίες.

Συντίθεται κυρίως στο ήπαρ. Η αλβουμίνη αντιπροσωπεύει κανονικά πάνω από το 50% του συνόλου των πρωτεϊνών του πλάσματος και είναι παρούσα σε συγκεντρώσεις 0.6 mmol/L.

Η αλβουμίνη είναι μια μικρή (65-70 kd) σφαιρική πρωτεΐνη, αποτελούμενη από 585 αμινοξέα, με λίγα κατάλοιπα τρυπτοφάνης ή μεθειονίνης, αλλά με αρκετά θετικά φορτισμένα κατάλοιπα λυσίνης και ασπαρτικού οξέος. Δεν περιέχει προσθετικές ομάδες ή υδατάνθρακες.

Η αλβουμίνη δεσμεύει πολλές ενδογενείς και εξωγενείς ενώσεις, συμπεριλαμβανομένων λιπαρών οξέων, μεταλλικών ιόντων, φαρμακευτικών προϊόντων και μεταβολιτών. Συνεπώς, έχει σημαντικό ρόλο στην απελευθέρωση φαρμάκων, στην αποτοξίνωση και στην αντιοξειδωτική προστασία. (Quinlan, Martin, and Evans 2005)

1.5 Διαταραχές Οξειδωτικού Στρες

Σε περίπτωση που δημιουργηθεί οξειδωτικό στρες στον οργανισμό, τότε είναι πιθανόν να παρατηρηθούν και σημαντικές αλλοιώσεις-τροποποιήσεις, κυρίως των νουκλεϊκών οξέων (πρόκληση μεταλλάξεων και διαφόρων γενετικών επιπτώσεων), των κυτταρικών μεμβρανών (διακοπή της διακυτταρικής επικοινωνίας), των μιτοχονδρίων (αποσύζευξη ενεργειακής παραγωγής), των λιπιδίων και των πρωτεϊνών. Ως αποτέλεσμα, μπορεί να προκληθεί αποσύνθεση και θάνατος των κυττάρων και κατ' επέκταση ανάπτυξη πολλών σοβαρών ασθενειών. (Pisoschi and Pop 2015)

Γενικότερα, σημαντικές ασθένειες που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες είναι ο καρκίνος, η καρδιαγγειακή νόσος, η αθηροσκλήρωση, η υπέρταση, η ισχαιμική βλάβη, ο σακχαρώδης διαβήτης, οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Alzheimer, Parkinson) και η ρευματοειδής αρθρίτιδα. (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 χρόνια σύνδρομο κόπωσης, καθώς και το AIDS ή άλλες παρεμφερείς ασθένειες. (Poljsak 2011)



Εικόνα 11: Διαταραχές που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες

1.6 Ευεργετικές Επιδράσεις Ελευθέρων Ριζών

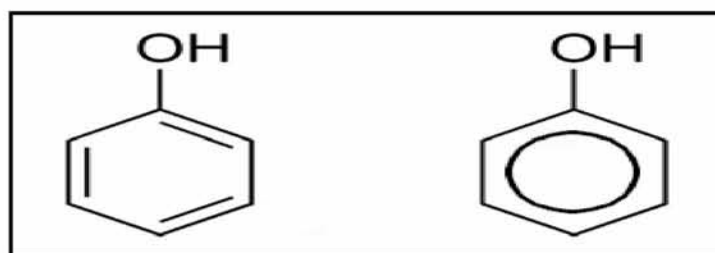
Πέρα από τις αρνητικές τους επιδράσεις, οι ROS και RNS θεωρούνται φυσιολογικά παραπροϊόντα του κυτταρικού μεταβολισμού και συμμετέχουν και σε διαδικασίες σημαντικές για τη λειτουργία του οργανισμού. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμεύουν στην άμυνα του οργανισμού, απομακρύνοντας αντιγόνα με τη διαδικασία της φαγοκυττάρωσης, ενώ έχουν συμμετοχή στη σηματοδότηση των κυττάρων, την ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων, τη φωσφορυλίωση πρωτεϊνών, την απόπτωση, τη διαφοροποίηση των κυττάρων, την ωρίμανση του ωοκυττάρου, αλλά και τη μυϊκή συστολή. Είναι λοιπόν σημαντικό να σημειωθεί ότι δεν είναι μόνο επιβλαβείς για τον οργανισμό, αλλά αντιθέτως αναγκαίες για φυσιολογικές του λειτουργίες και οι ευεργετικές τους δράσεις εξαρτώνται από την ισορροπία τους με τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς. Έτσι, πρέπει να είμαστε προσεκτικοί στην ημερήσια κατανάλωση αντιοξειδωτικών, ώστε αυτή να μην υπερβαίνει συγκεκριμένα όρια που θα οδηγούσαν στην πλήρη εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών (Schieber and Chandel 2014)

1.7 Πολυφαινόλες

Οι πολυφαινόλες είναι η μεγαλύτερη ομάδα φυτοχημικών (φυτικοί μεταβολίτες) και ένα αναπόσπαστο μέρος της δίαιτας των ανθρώπων και των ζώων. (Tsaο 2010)

Είναι χημικές ενώσεις που αποτελούνται κυρίως από φυσικές, καθώς και συνθετικές ή ημισυνθετικές χημικές ουσίες, οι οποίες χαρακτηρίζονται από την παρουσία μεγάλων πολλαπλάσιων δομικών μονάδων της φαινόλης. (Quideau et al. 2011) Στη διεθνή βιβλιογραφία έχει επικρατήσει με τον όρο πολυφαινόλες να εννοείται μια μεγάλη ομάδα ενώσεων με ένα ή περισσότερα υδροξύλια απευθείας συνδεδεμένα με ένα άτομο άνθρακα ενός ή περισσότερων αρωματικών δακτυλίων. Ο χημικός τύπος της φαινόλης είναι C_6H_5OH , το απλούστερο των φαινολών.

Εικόνα 12: Δομή μιάς φαινόλης



Γενικά τρόφιμα που περιέχουν σύνθετα μείγματα πολυφαινολών, σύμφωνα με μια ανασκόπηση του 2005, είναι προϊόντα που καταναλώνονται ευρέως σε μεγάλες ποσότητες, όπως τα φρούτα και τα λαχανικά, το πράσινο τσάι, το μαύρο τσάι, το κόκκινο κρασί, ο καφές, η σοκολάτα, οι ελιές, τα εσπεριδοειδή, η σόγια και **το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο**. Επίσης, τα βότανα και μπαχαρικά, οι ξηροί καρποί και τα φύκια είναι επίσης δυνητικά σημαντικά για την παροχή ορισμένων πολυφαινολών. (D'Archivio et al. 2010) Στην ανθρώπινη διατροφή, θεωρούνται η πιο άφθονη πηγή αντιοξειδωτικών.

Πιστεύεται ότι η συνολική περιεκτικότητα πολυφαινολών στα φυτά υποτιμάται, καθώς πολλές από τις φαινολικές ενώσεις που υπάρχουν στα φρούτα, τα λαχανικά και τα παράγωγά τους δεν έχουν ακόμη ταυτοποιηθεί, ξεφεύγοντας από τις μεθόδους και τεχνικές ανάλυσης που χρησιμοποιούνται, καθώς και η σύσταση σε πολυφαινόλες για

τα περισσότερα φρούτα και αρκετών ποικιλιών σιτηρών δεν είναι ακόμα γνωστή. (Pandey and Rizvi 2009)

1.7.1 Χημική Δομή Και Τάξεις Πολυφαινολών

Περισσότερες από 8.000 πολυφαινολικές ενώσεις έχουν εντοπιστεί σε διάφορα φυτικά είδη. Όλες οι φυτικές φαινολικές ενώσεις προκύπτουν από ένα κοινό ενδιάμεσο, την φαινυλαλανίνη, ή μια κοντινή πρόδρομη ένωση, το σικιμικό οξύ. Οι πολυφαινόλες είναι είτε απλά μόρια, όπως τα φαινολικά οξέα, είτε υψηλά πολυμερισμένες ενώσεις, όπως οι ταννίνες. Ανευρίσκονται κυρίως στη συζευγμένη τους μορφή, είτε μεθυλιωμένες είτε ως γλυκοζίτες. Το υδατανθρακικό τμήμα μπορεί να είναι είτε μονοσακχαρίτης, είτε δισακχαρίτης ή ακόμη και ολιγοσακχαρίτης. Η γλυκοζυλίωση αυξάνει τη διαλυτότητα των πολυφαινολών. Η γλυκόζη είναι ο πιο κοινός εκπρόσωπος των σακχάρων, αν και απαντώνται επίσης γαλακτόζη, ραμνόζη, ξυλόζη και αραβινόζη, καθώς και γλυκουρονικό και γαλακτουρονικό οξύ. Οι πολυφαινόλες μπορούν επίσης να είναι ενωμένες με καρβοξυλικά και οργανικά οξέα, αμίνες και λιπίδια. Παράλληλα, κατέχουν υψηλή συγγένεια δέσμευσης με τις πρωτεΐνες, σχηματίζοντας διαλυτά ή αδιάλυτα σύμπλοκα μαζί τους (Paradouroulou and Frazier 2004).

Οι πολυφαινόλες ταξινομούνται σε διαφορετικές κατηγορίες (Manach et al. 2005), ανάλογα με τον αριθμό των φαινολικών δακτυλίων στη δομή τους, καθώς και τα δομικά στοιχεία και τους υποκαταστάτες που προσδένονται στο δακτυλίους τους. Ως εκ τούτου, προσδιορίζονται δύο κύριες ομάδες: τα φλαβονοειδή και οι μη φλαβονοειδείς ομάδες.

A) Φλαβονοειδή: Έχουν μια κοινή δομή, που αποτελείται από δύο δακτύλιους, οποίοι ενώνονται μεταξύ τους με 3 άτομα άνθρακα σχηματίζοντας έναν οξυγονωμένο ετερόκυκλο. Έτσι, μπορούν να διαιρεθούν σε 6 υποκατηγορίες ανάλογα με τον τύπο του ετερόκυκλου που εμπλέκεται. Αυτές είναι οι: φλαβονόλες, φλαβόνες, ισοφλαβόνες, φλαβανόνες, ανθοκυανιδίνες και φλαβανόλες (κατεχίνες, προανθοκυανιδίνες) (Manach et al. 2004; Han et al. 2007). Αποτελούν τη μεγαλύτερη ομάδα πολυφαινολικών ενώσεων που συναντάμε στην ανθρώπινη διατροφή. Τρόφιμα με υψηλή σύσταση σε φλαβονοειδή θεωρούνται το κόκκινο και πράσινο τσάι, η μαύρη σοκολάτα, τα βατόμουρα, τα κρεμμύδια, ο μαϊντανός, τα εσπεριδοειδή, οι

μπανάνες και το κόκκινο κρασί (Harnly et al. 2006). Έρευνες έδειξαν ότι είναι ιδιαίτερα ευεργετικά ενάντια στον καρκίνο, τις φλεγμονές, το οξειδωτικό στρες και τις καρδιαγγειακές νόσους.

B) Μη φλαβονοειδή: Είναι κυρίως τα φαινολικά οξέα, οι λιγνάνες και τα στυλβένια. Τα φαινολικά οξέα χωρίζονται σε παράγωγα του βενζοϊκού οξέος (7 άτομα άνθρακα) και του κιναμικού οξέος (9 άτομα άνθρακα) (Manach et al. 2004) και βρίσκονται κυρίως στα μήλα, τις φράουλες, τα κεράσια, τα ακτινίδια, τα κρεμμύδια, τον καφέ, το τσάι, τα βατόμουρα, η βρώμη, το κόκκινο κρασί και άλλα. Χαρακτηρίζονται από αυξημένες αντικές, αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές και αντικαρκινικές ιδιότητες. Παραδείγματα φαινολικών οξέων είναι το καφεϊκό οξύ και το γαλλικό οξύ. Οι λιγνάνες περιέχονται σε διάφορα δημητριακά, τη σόγια, το βερίκοκο, το μπρόκολο, το λιναρόσπορο και το λάχανο. Μελέτες δείχνουν ότι παίζουν προστατευτικό ρόλο σε ασθένειες όπως ο καρκίνος, η οστεοπόρωση και η καρδιαγγειακή νόσος, αλλά ακόμα δεν έχουμε σαφή αποτελέσματα (Adlercreutz 2007). Τα στυλβένια, τέλος, έχουν βρεθεί σε μικρές ποσότητες στην διατροφή του ανθρώπου και το πιο γνωστό αυτών είναι μια φυτοαλεξίνη, η ρεσβερατρόλη.

1.7.2 Ευεργετικές Επιδράσεις Πολυφαινολών

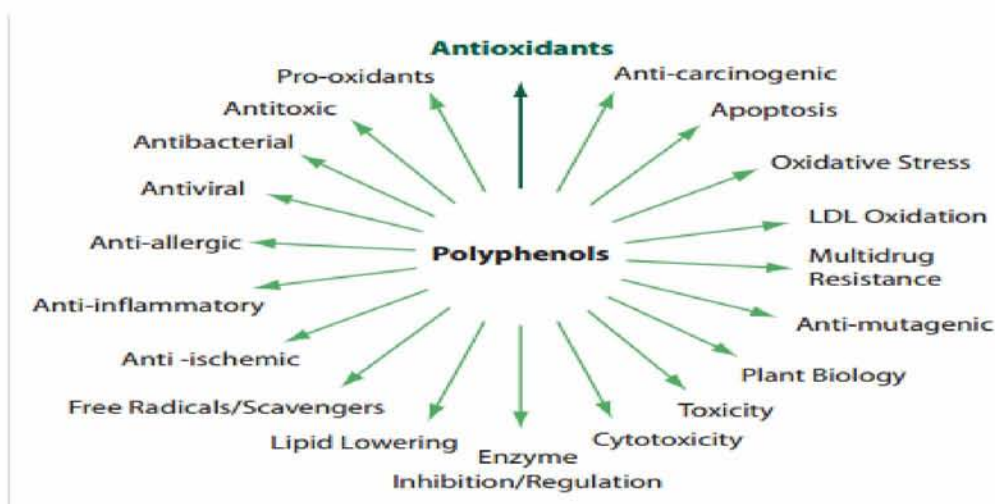
Οι πολυφαινόλες θεωρούνται μη θρεπτικά συστατικά, τα οποία όμως παρεμβαίνουν στην απορρόφηση απαραίτητων θρεπτικών συστατικών, όπως ο σίδηρος και άλλα μεταλλικά ιόντα, και στη δέσμευση πρωτεϊνών και πεπτικών ενζύμων. Οι επιπτώσεις τους στην υγεία εξαρτώνται από το ποσό της πρόσληψής τους και από τη βιοδιαθεσιμότητά τους. Γενικώς, έχουν γίνει πολλές έρευνες σχετικά με τις ενδεχόμενες ευεργετικές επιδράσεις τους. (Mennen et al. 2005)

Πιο συγκεκριμένα, μελέτες έδειξαν ότι οι πολυφαινόλες είναι ισχυρά αντιοξειδωτικά τα οποία σταθεροποιούν τις ελεύθερες ρίζες, δίνοντας σε αυτές ένα ηλεκτρόνιο ή ένα άτομο υδρογόνου. Μ' αυτόν τον τρόπο, καταστέλλουν την διάδοση των ελεύθερων ριζών (συμβαίνει μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης), μέσω της αναστολής ή απενεργοποίησης των ROS. Επίσης, δρουν ως άμεσοι δεσμευτές ριζών των αλυσιδωτών αντιδράσεων υπεροξειδωσις των λιπιδίων, με αποτέλεσμα να τις σταματούν, ενώ οι ίδιες οι πολυφαινόλες μετατρέπονται σε σταθερές ρίζες (είναι λιγότερο δραστικές). Επιπλέον, οι πολυφαινόλες δρουν και ως χηλικές ενώσεις,

καθώς δεσμεύουν μέταλλα μετάπτωσης, όπως ο σίδηρος Fe^{2+} , μειώνοντας το ποσοστό της αντίδρασης Fenton και εμποδίζοντας την οξειδωση που συμβαίνει από τις πολύ δραστικές OH^{\bullet} . Επιπρόσθετα, μπορούν να δράσουν ως συν-αντιοξειδωτικά, αναγεννώντας βασικές βιταμίνες, αναστέλλοντας την οξειδάση της ξανθίνης, αλλά και αυξάνοντας διάφορα ενδογενή αντιοξειδωτικά, όπως η υπεροξειδική δισμουτάση, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και η καταλάση. (Blokina, Virolainen, and Fagerstedt 2003) (Prochazkova et al., 2011)

Από την άλλη πλευρά, όμως, δεδομένου ότι οι ίδιες οι πολυφαινόλες μετατρέπονται σε ελεύθερες ρίζες, σε αυξημένες συγκεντρώσεις μπορεί να αποκτήσουν και προ-οξειδωτική ικανότητα, κάτι που φανερώνει ότι η δράση τους είναι δοσο-εξαρτώμενη. Κατά συνέπεια, πρέπει να γίνουν περαιτέρω έρευνες, ώστε να δειχθεί η απαιτούμενη δοσολογία πολυφαινολών που χρειάζεται ο οργανισμός και η οποία θα προκαλεί περισσότερο αντιοξειδωτική παρά προ-οξειδωτική δραστηριότητα και θα καθίσταται ευεργετική για τον οργανισμό. (Bouayed and Bohn 2010)

Πειραματικές μελέτες σε ζώα ή ανθρώπινα καλλιεργούμενα κύτταρα έδειξαν ότι οι πολυφαινόλες παίζουν προστατευτικό ρόλο ενάντια στον καρκίνο, τις καρδιαγγειακές νόσους, το διαβήτη, τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες και την οστεοπόρωση. Άλλες ευεργετικές επιδράσεις τους όσον αφορά την υγεία του ανθρώπου, είναι η μείωση της πιθανότητας πρόκλησης ασθενειών της καρδιάς, ηπατικών ασθενειών, παχυσαρκίας, αθηροσκλήρωσης, διαφόρων αλλεργιών και ασθενειών του γαστρεντερικού σωλήνα. (Rodrigo et al. 2014)



Εικόνα 13: Δράσεις πολυφαινολών

1.8 Κυτταρικές Σειρές

1.8.1 Μυοβλάστες Ποντικού C2C12

Στην παρούσα έρευνα χρησιμοποιήθηκαν μυϊκά κύτταρα της κυτταρικής σειράς μυοβλαστών ποντικού C2C12. Αυτά τα κύτταρα είναι ικανά να διαφοροποιούνται όταν καλλιεργούνται σε κατάλληλα θρεπτικά μέσα. Αποτελούν ένα χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη της διαφοροποίησης των μυοβλαστών και οστεοβλαστών, στην έκφραση διάφορων πρωτεϊνών, και στην διερεύνηση βιοχημικών μονοπατιών. Η κυτταρική σειρά C2C12 είναι μια αθάνατη σειρά σκελετικών μυοβλαστών ποντικού, που αρχικά προέρχεται από δορυφορικά κύτταρα από το μυ του μηρού του ζώου 70 ώρες μετά από σοβαρούς τραυματισμούς. (Yaffe and Saxel 1977) Αναπτύσσονται ως αδιαφοροποίητοι μυοβλάστες σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο.

1.8.2 Ανθρώπινα Καρκινικά Ηπατικά Κύτταρα (HepG2)

Τα HepG2 είναι προσκολλητικά κύτταρα με μορφή που θυμίζει επιθηλιακά κύτταρα και αναπτύσσονται ως μονοστιβάδες, σχηματίζοντας μικρά συσσωματώματα. Η HepG2 κυτταρική σειρά είναι μία αθάνατη κυτταρική σειρά που προέρχεται από τον ηπατικό ιστό 15χρονου Καυκάσιου αγοριού με καλά διαφοροποιημένο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Αποτελούν ένα χρήσιμο μοντέλο για την μελέτη του μεταβολισμού του ήπατος και της τοξικότητας ξενοβιοτικών παραγόντων. Τα HepG2 χρησιμοποιούνται και για την μελέτη στοχοθέτησης φαρμάκων. (Costantini et al. 2013)

2. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να εξεταστούν οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες ενός πολυφαινολικού κλάσματος ελαιολάδου (TPF), πλούσιο σε πολυφαινόλες, από μια Ελληνική ενδημική ποικιλία *Olea europaea*, που καλλιεργείται στο Άγιο Όρος. Αξίζει να σημειωθεί ότι μέχρι σήμερα, τουλάχιστον εξ όσων γνωρίζουμε, δεν υπάρχουν διαθέσιμες μελέτες που να διερευνούν τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες ενός συνολικού εκχυλίσματος ελαιολάδου σε κυτταροκαλλιέργειες. Τα αποτελέσματα των αντιοξειδωτικών αξιολογήθηκαν σε κυτταρικό επίπεδο, ιδιαίτερα σε ανθρώπινα ηπατικά κύτταρα (HepG2) και μυοβλάστες ποντικού (C2C12). Τα αποτελέσματα που

θα προκύψουν θα παρέχουν σημαντικές πληροφορίες σχετικά με την πιθανή χρήση του TPF ως αντιοξειδωτικού συμπληρώματος διατροφής.

3. ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ

Η εξεταζόμενη ένωση απομονώθηκε με τη χρήση μιας χρωματογραφικής μεθόδου (green gradient-eluting centrifugal partition) που επιτρέπει την απομόνωση μεγάλων όγκων TPF, σε μια διαδικασία συνεχούς εκχύλισης και με εξαιρετικά χαμηλή κατανάλωση διαλύτη. Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε στο τμήμα Φαρμακευτικής, στο εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών προϊόντων του Πανεπιστημίου Αθηνών, με υπεύθυνο τον κο. Λέανδρο Σκαλτσούνη. Η χημική του σύσταση φαίνεται παρακάτω (Πίνακας 1):

Πίνακας 1: Η χημική σύσταση (mg/kg) του υπό μελέτη ελαιολάδου

	ΑΦΙΛΤΡΟ	ΦΙΛΤΡΑΡΙΣΜΕΝΟ
Ελαιοκανθάλη	160	265
Ελαιοσίνη	92	62
Άγλυκο ελαιοευρωπαϊνης (μονοαλδευδική μορφή)	10	16
Άγλυκο λιγκστροσίδη (μονοαλδευδική μορφή)	10	8
Άγλυκο λιγκστροσίδη (διαλδευδική μορφή)	110	108
Σύνολο παραγώγων Τυροσόλης και Υδροξυτυροσόλης	382	459
D1 (ελαιοκανθάλη + ελαιοσίνη)	252	327
Ελεύθερη τυροσόλη και υδροξυτυροσόλη	< 10 mg/kg	

3.1 Αντιδραστήρια

Το θρεπτικό υλικό ανάπτυξης των κυττάρων το οποίο περιείχε άλατα Earle's (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM), το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (phosphate buffered saline, PBS), ο ορός εμβρύου μόσχου (FBS), τα διαλύματα των αντιβιοτικών/αντιμυκητιακών (100x), το διάλυμα της γλουταμίνης και η τρυψίνη (0.25%) αποκτήθηκαν από την εταιρία Gibco (Grand Island, NY). Οι χρωστικές mercury orange και 2,7-διχλωροφθορεσκεΐνη διοξικού (2,7-dichlorofluorescein diacetate ,DCF-DA) αποκτήθηκαν Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Το kit κυτταρικού πολλαπλασιασμού (XTT) αγοράστηκε από την εταιρία Roche Diagnostics (Mannheim, Germany).

Για τις μεθόδους προσδιορισμού επιπέδων πρωτεϊνών μέσω αντιδραστηρίου Bradford, TBARS, πρωτεϊνικά καρβονύλια, western blot και προσδιορισμός επιπέδων αλβουμίνης μέσω αντιδραστηρίου bromocresol green, έγινε λύση των κυττάρων σε ρυθμιστικό διάλυμα ράσιο-ανοσοκαταβύθισης (RIPA). Σύσταση RIPA, pH 8: 50mM TRIS-HCL, 150mM NaCl, 0,25% SDS, 0,25% δεοξυχολικό νάτριο, 1mM EDTA, 1% Triton, 1 χαπάκι αναστολείς πρωτεασών (protease inhibitor cocktail tablete, cOmplet tables, mini, Roche, Germany).

Τα κύτταρα μετά τη συλλογή τους και μία πλύση με PBS, φυγοκεντρήθηκαν (300g, 5min, 10 oC), και στο ίζημα προστέθηκε 1ml RIPA. Ακολούθησε έντονη ανάδευση, επώαση για 20 λεπτά στον πάγο (με έντονη ανάδευση ανά 5 λεπτά) και φυγοκέντρωση στα 16.250g για 20 λεπτά στο 4 oC. Το υπερκείμενο συλλέγεται και γίνεται υπολογισμός της ποσότητας πρωτεΐνης μέσω αντιδραστηρίου Bradford.

3.2 Καλλιέργεια κυτταρικών σειρών C2C12 και HepG2

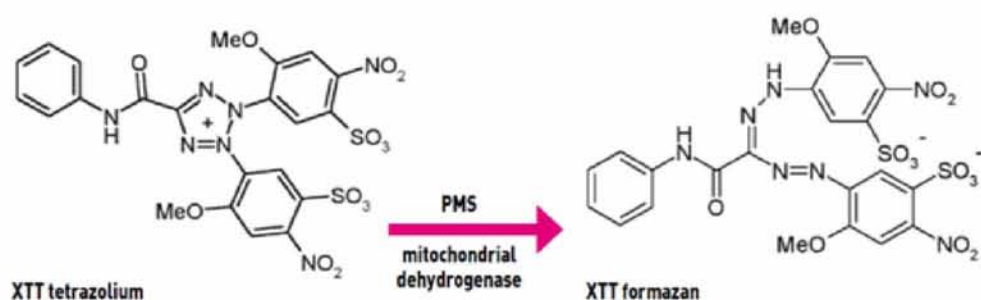
Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα C2C12 (μυοβλάστες ποντικού) και τα HepG2 (ανθρώπινα ηπατικά κύτταρα). Οι κυτταρικές σειρές καλλιεργούνταν σε 75cm² φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων σε θρεπτικό υλικό DMEM (10 mL) το οποίο ήταν εμπλουτισμένο με 10% FBS, 1% L-γλουταμίνη και 1% διάλυμα αντιβιοτικών σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C και σε 5% CO₂. Τα κύτταρα αναπτύσσονταν σε θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με 10% ορό FBS μέχρι να

καλύπτουν το 80% περίπου της επιφάνειας της φλάσκας. Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων γινόταν με αποκόλληση των κυττάρων με 1 mL θρυψίνης (0.25%). Η επώαση στην θρυψίνη διαρκούσε 5 min στους 37°C και ακολουθούσε επαναϊώρηση των αποκολλημένων κυττάρων σε θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με 10% FBS. Η καλλιέργεια των κυττάρων έγινε με όσον το δυνατόν ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο ρεύματος αέρα συνεχούς ροής (Laminar air flow).

3.3 Μέθοδος XTT για προσδιορισμό κυτταροτοξικής δράσης εκχυλίσματος ελαιολάδου

Για τον προσδιορισμό της κυτταροτοξικής δράσης του εκχυλίσματος ελαιολάδου, τόσο στα C2C12 όσο και στα HepG2 κύτταρα, στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις χρησιμοποιήθηκε το kit XTT assay της εταιρείας Roche.

Η μέθοδος XTT αποτελεί μια χρωματομετρική δοκιμή για την μη ραδιενεργή ποσοτικοποίηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της βιωσιμότητας. 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 450-500nm 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.



Εικόνα 14: Μεταβολισμός του XTT σε φορμαζάνη από ζωντανά κύτταρα

Μετά την αποκόλληση των κυττάρων με θρυψίνη 0,25% και την επαναϊώρησή τους σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS, γίνεται μέτρησή τους με τη βοήθεια αντικειμενοφόρου πλάκας Neubauer και υπολογίζεται ο αριθμός κυττάρων ανά ml.

Στη συνέχεια, γίνεται επίστρωση 10^4 κυττάρων/θέση σε ένα 96-well plate. Στα κύτταρα επίσης προστίθεται θρεπτικό υλικό με 10% FBS (150μl) και ακολουθεί επώαση για 24 h στους 37°C και σε 5% CO_2 προκειμένου να προσκολληθούν. Μετά το πέρας της επώασης το θρεπτικό υλικό αφαιρείται και ακολουθεί προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων του TPF σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS (ώστε να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των συστατικών του FBS με την πρωτεΐνη ή τον οξειδωτικό παράγοντα) συνολικού όγκου 100 μl. Στα πηγαδάκια που αποτελούν τα control γίνεται προσθήκη μόνο θρεπτικού, χωρίς εκχύλισμα. Για κάθε συγκέντρωση του εκχυλίσματος χρησιμοποιούνται τρία πηγαδάκια των οποίων τα κύτταρα σε καθένα από αυτά έχει προέλθει από διαφορετική φλάσκα. Επίσης, για κάθε συγκέντρωση αλλά και για το control χρησιμοποιείται τέταρτο πηγαδάκι που δε περιέχει κύτταρα για να εκτιμηθεί η απορρόφηση του θρεπτικού και του εκχυλίσματος. Το πείραμα πραγματοποιείται εις τριπλούν. Έπειτα, το plate επώάζεται για 24 h στους 37°C και σε 5% CO_2 .

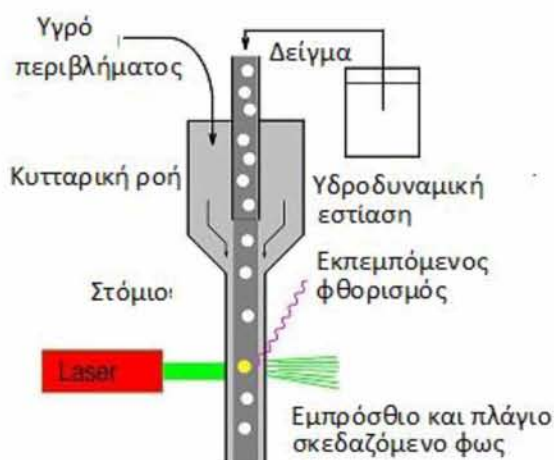
Μετά την επώαση προστίθενται 50 μl από το μίγμα XTT σε κάθε θέση και ακολουθεί επώαση για 4 h. Το μείγμα του XTT προκύπτει από την ανάμιξη XTT A και XTT B (PMS), πρέπει να έχει την αναλογία 50:1 και η προετοιμασία του μίγματος γίνεται αμέσως πριν την χρησιμοποίησή του. Μετά την τετράωρη επώαση προσδιορίζεται η απορρόφηση στα 450 nm καθώς και στα 630nm (για καλιμπράρισμα) με φασματοφωτόμετρο ELISA plate reader (Biotek) και τη χρήση του λογισμικού Gen5 (Biotek). Η % αναστολή των διαφόρων συγκεντρώσεων TPF στην κυτταρική αύξηση των κυτταρικών σειρών C2C12 και HepG2 υπολογίζεται από τον τύπο: % αναστολή = $[(\text{O.D. αρνητικού μάρτυρα} - \text{O.D. δείγματος}) / \text{O.D. αρνητικού μάρτυρα}] \times 100$.

Για να θεωρηθεί μία συγκέντρωση TPF κυτταροτοξική, η βιωσιμότητα των κυττάρων θα πρέπει να είναι κάτω από 80% και αυτές οι συγκεντρώσεις δε χρησιμοποιούνται για περαιτέρω πειραματικές μελέτες.

3.4 Προσδιορισμός επιπέδων ROS και GSH με κυτταρομετρία ροής

Η κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry, FC) είναι η διαδικασία μέτρησης φυσικών και χημικών χαρακτηριστικών των κυττάρων. Στην FC οι μετρήσεις γίνονται καθώς τα κύτταρα ρέουν ενώ βρίσκονται υπό τη μορφή εναιωρήματος σε

ένα διάλυμα. 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. 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 15: Υδροδυναμική εστίαση δείγματος μέσα από τον θάλαμο 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 προσδέεται απευθείας στην GSH (μια ένωση που προσδέεται 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. Παρασκευάστηκε ένα στοκ διάλυμα της χρωστικής mercury orange (400 μM) διαλυμένης σε ακετόνη και αποθηκεύτηκε στους 4 $^{\circ}\text{C}$, ενώ ένα φρέσκο διάλυμα της χρωστικής DCF-DA (100 μM) διαλυμένης σε μεθανόλη παρασκευαζόταν πριν από κάθε πείραμα. 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 σκοτάδι στους 37 $^{\circ}\text{C}$ για 30 min. Ακολουθεί πλύση και

επαναδιάλυση των κυττάρων σε 250 μl PBS και φυγοκέντρωση 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 FACSCalibur (BD Biosciences, Franklin, Lakes, 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 software (Becton Dickinson). Το κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκε τουλάχιστον τρεις ανεξάρτητες φορές.

3.5 Προσδιορισμός επιπέδων TBARS

Ο προσδιορισμός των επιπέδων των TBARS ενός δείκτη της λιπιδικής υπεροξειδωσης βασίστηκε στη μέθοδο των Keles et al. (2001).

Κυτταρικό εναιώρημα πρωτεϊνικής περιεκτικότητας 30μg αναμείχτηκε με 500 μl διαλύματος 35% TCA και 500 μl διαλύματος Tris-HCl (200 mM, pH 7,4). Τα δείγματα επωάζονται για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια προστίθενται 1 ml διαλύματος 2 M Na₂SO₄ και 55 mM TBA και τα δείγματα επωάζονται για 45 min στους 95°C (σε υδατόλουτρο). Μετά την επώαση τα δείγματα κρυώνουν για 5 min σε πάγο και ακολουθεί προσθήκη 1 ml διαλύματος 70% TCA. Μετά από ανάδευση, 1 ml του κάθε δείγματος φυγοκεντρείται στα 15000 g για 3 min 25oC. Ακολουθεί μέτρηση της οπτικής απορρόφησης του υπερκείμενου στα 530 nm. Τα δείγματα χωρίς το κυτταρικό αιώρημα (περιέχουν buffer RIPA) αποτελούσαν το τυφλό και ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου γίνεται με αέρα. Κάθε δείγμα εξετάζεται εις τριπλούν. Η φωτομέτρηση πραγματοποιήθηκε σε φασματοφωτόμετρο Hitachi U-1900 (σειριακός αριθμός. 2023-029; Hitachi, Ltd., Τόκιο, Ιαπωνία).

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως nmol ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ ανά mg πρωτεΐνης του κυτταρικού αιωρήματος. Η συγκέντρωση των TBARS υπολογίζεται με βάση τον συντελεστή μοριακή απόσβεσης

της MDA. Η μέτρηση απαιτεί >30μg απόλυτη ποσότητα πρωτεΐνης στο προς εξέταση δείγμα. Οι υπολογισμοί γίνονται με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$\text{TBARS (nmol / mg πρωτεΐνης)} = \frac{(A\delta - A0) / 0,156}{C\delta} \times 7,5$$

Aδ: Η μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος.

A0: Η μέση τιμή της απορρόφησης του τυφλού.

ϵ_{530} MDA ($\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$): 0,156 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης της μαλονδιαλδεύδης.

Τιμή 7,5: Ο συντελεστής αραίωσης του αιωρήματος (Vτελ.αντίδρασης/ μl αιωρήματος [3000 μl /X μl]). Όπου X, ο όγκος σε μl του κυτταρικού εναιωρήματος που αντιστοιχεί σε συγκέντρωση πρωτεΐνης 30μg.

Cδ: Η συγκέντρωση mg/ml της πρωτεΐνης που προσδιορίστηκε μέσω του αντιδραστήριου Bradford

3.6 Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνικών καρβονυλίων

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων βασίστηκε στη μέθοδο των Patsoukis et al. (2004).

Πιο αναλυτικά, σε κυτταρικό εναιώρημα πρωτεϊνικής συγκέντρωσης 30μg προστίθεται ίσος όγκος 20% TCA (κάθε δείγμα έχει το τυφλό του), τα δείγματα επωάζονται στον πάγο για 15 min και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 15000 g για 5 min στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και προστίθενται 500 μL DNPH 10 mM (διαλυμένο σε 2,5N HCL) για τα δείγματα ή 500 μL 2,5N HCL για τα τυφλά. Ακολουθεί επώαση των δειγμάτων για 1 h στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου με ενδιάμεση ανάδευση κάθε 15 min και στο τέλος φυγοκέντρηση στα 15000 g για 5 min στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και προστίθενται 1 ml 10% TCA. Ακολουθεί ανάδευση και φυγοκέντρηση στα 15000 g για 5 min στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και προστίθεται 1 ml μίγματος αιθανόλης-οξικού αιθυλεστέρα (1:1 v/v) ενώ γίνεται φυγοκέντρηση στα 15000 g για 5 min στους 4°C. Το συγκεκριμένο βήμα επαναλαμβάνεται δύο ακόμη φορές. Στο τέλος προστίθενται 1

ml 5M ουρίας (pH 2.3) και τα δείγματα επωάζονται στους 37°C για 15 min. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 15000 g για 3 min στους 4°C και μετρείται η απορρόφηση στα 375nm. Η φωτομέτρηση πραγματοποιήθηκε σε φασματοφωτόμετρο Hitachi U-1900 (σειριακός αριθμός. 2023-029; Hitachi, Ltd., Τόκιο, Ιαπωνία).

Η συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων υπολογίζεται με βάση τον συντελεστή μοριακή απόσβεσης του DNPH. Οι υπολογισμοί γίνονται με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Protein carbonyls (nmol/mg protein)} = \frac{(A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / 0.022}{C \delta} \times 5$$

A sample: Η μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος.

A blank: Η μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του τυφλού.

ϵ_{375} DNPH (nmol/ml): 0,022 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH

Τιμή 5: Ο συντελεστής αραιώσεως του αιωρήματος Ντελ. αντίδρασης/ κυτταρικού εναιωρήματος [1000 μl /X μl]). Όπου X, ο όγκος σε μl του κυτταρικού εναιωρήματος που αντιστοιχεί σε συγκέντρωση πρωτεΐνης 30μg

Cδ: Η συγκέντρωση mg/ml της πρωτεΐνης που προσδιορίστηκε μέσω του αντιδραστηρίου Bradford.

3.7 Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford

Ο προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης των δειγμάτων έγινε μέσω πρότυπης καμπύλης της πρωτεΐνης αλβουμίνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford. Το αντιδραστήριο Bradford χρησιμοποιείται συχνά για τον ποσοτικό προσδιορισμό της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης. Η μέθοδος βασίζεται στην αλληλεπίδραση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 του αντιδραστηρίου με τα αμινοξέα των πρωτεϊνών οδηγώντας στο σχηματισμό χρωμογόνου προϊόντος με μπλε χρώμα το οποίο έχει οπτική απορρόφηση στα 595 nm (Bradford, 1976).

Για την πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις διαλύματος αλβουμίνης 10 mg/ml ώστε να προκύψουν διαλύματα

συγκεντρώσεις 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 5 $\mu\text{g/ml}$. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης 20 μl διαλύματος αλβουμίνης με τις παραπάνω συγκεντρώσεις προστέθηκε σε 1 ml διαλύματος αντιδραστηρίου Bradford. Τα δείγματα ανακινούνται απαλά και επωάζονται για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να σταθεροποιηθεί το χρώμα. Ακολουθεί μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 595 nm. Ως τυφλό χρησιμοποιείται διάλυμα που περιέχει 20 μl buffer RIPA και 1 ml διαλύματος αντιδραστηρίου Bradford. Οι συγκεντρώσεις αλβουμίνης 0.125-1 $\mu\text{g/ml}$ αντιστοιχούν στο γραμμικό τμήμα της καμπύλης.

Με βάση τις τιμές της οπτικής απορρόφησης στα 595 nm που αντιστοιχούσαν στις συγκεντρώσεις της αλβουμίνης κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη. Για τον προσδιορισμό της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης των δειγμάτων 20 μl προστίθενται κάθε φορά σε 1 ml διαλύματος αντιδραστηρίου Bradford. Ακολουθεί αντιστοίχιση της τιμής οπτικής απορρόφησης με την συγκέντρωση αλβουμίνης από την πρότυπη καμπύλη. Η φωτομέτρηση πραγματοποιήθηκε σε φασματοφωτόμετρο Hitachi U-1900 (σειριακός αριθμός. 2023-029; Hitachi, Ltd., Τόκιο, Ιαπωνία).

3.8 Western Blot Analysis

Για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνικών επιπέδων της αλβουμίνης και της $\gamma\text{-GCLc}$ χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ανοσοαποτύπωσης. Στο πρωτεϊνικό κυτταρόλυμα προστίθεται $5\times$ Loading buffer και ακολουθεί θέρμανση κοντά στο σημείο βρασμού για 3 min. Στη συνέχεια τα προς ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνικά δείγματα (30 μg πρωτεϊνικής συγκέντρωσης) “φορτώνονται” και διαχωρίζονται σε 8% SDS-PAGE πηκτή ακρυλαμίδης για 45-60 min με τάση ρεύματος 150 V. Η πηκτή ακρυλαμίδιου διακρίνεται σε δύο επιμέρους μέρη: στο πρώτο τμήμα ή πηκτή πακεταρίσματος (stacking gel), όπου πακετάρονται τα δείγματα των πρωτεϊνών πριν διαχωριστούν. Η πηκτή πακεταρίσματος έχει σταθερό ποσοστό ακρυλαμίδης (5%) (3ml ddH₂O, 1,25 ml Tris 0.5 M pH 6.8, 650 μl 30% ακρυλαμίδη, 50 μl 10% SDS, 50 μl 10% APS, 5 μl TEMED), ανεξάρτητο από το μέγεθος των προς ανάλυση πρωτεϊνών. Στο δεύτερο τμήμα ή πηκτή διαχωρισμού (Resolving gel) (4,6ml ddH₂O, 2,5ml Tris 1.5 M pH 8.8, 2,7ml 30% ακρυλαμίδη, 100 μl 10% SDS, 100 μl 10% APS, 6 μl TEMED), της οποίας το ποσοστό ακρυλαμίδης εξαρτάται από το μοριακό μέγεθος των μορίων προς

διαχωρισμό. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης ακολουθεί μεταφορά και καθήλωση των ηλεκτροφορητικά διαχωρισμένων μορίων από την πηκτή ακρυλαμιδίου σε

μεμβράνη (PVDF). Συγκεκριμένα, το πήκτωμα τοποθετείται μέσα σε μία κασετίνα που περιέχει τα εξής υλικά με την ακόλουθη σειρά: σφουγγαράκι, διηθητικό χαρτί Whatman, το πήκτωμα και από πάνω τη μεμβράνη PVDF, διηθητικό χαρτί Whatman και σφουγγαράκι. Κλείνουμε την κασετίνα και τοποθετείται σε μια ειδική θήκη μέσα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και ηλεκτροφορείται για 2 h με τάση ρεύματος τα 110 V. Μετά την επιτυχή μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα στη μεμβράνη, η μεμβράνη τοποθετείται σε διάλυμα 1× TBST (50 ml) που περιέχει 5% αποβουτυρωμένο γάλα σε μορφή σκόνης στους 4 oC overnight. Την επόμενη ημέρα η μεμβράνη επωάζεται για 1 h με πρώτο αντίσωμα για την γ -GCLc, το γ -GCSc (rabbit polyclonal IgG, Lot. # H2905, Santa Cruz Biotechnology) και για την αλβουμίνη Pierce™ albumin (Lot. #QF2045581B, Thermo Fischer scientific, USA), αραιώση 1:600 και 1:5000 αντίστοιχα, διάλυμα 1× TBST (10 ml) που περιέχει 5% αποβουτυρωμένο γάλα (Regilait) σε μορφή σκόνης με ταυτόχρονη ανάδευση. Ακολουθούν 5 πλύσεις των 5 min η καθεμία με το διάλυμα 1× TBST. Στη συνέχεια η μεμβράνη επωάζεται με τα δευτερογενή αντισώματα συνδεδεμένα με HRP, για τη γ -GCSc, (goat anti-rabbit IgG, αραιώση 1:50000, Lot #OJ17714213, Thermo Fischer Scientific USA) για 30 min σε διάλυμα 1× TBST (10 ml) που περιέχει 5% αποβουτυρωμένο γάλα σε μορφή σκόνης με ταυτόχρονη ανάδευση. Ακολουθούν 3 πλύσεις των 15 min της μεμβράνης με το διάλυμα 1× TBST. Στη συνέχεια, η μεμβράνη εκτίθεται στο αντιδραστήριο χημειοφωταύγειας (Clarity western ECL substrate, cat # 170-5060, BIO-RAD, United States) για 1 min και η ανίχνευση επιτυγχάνεται με έκθεση σε φιλμ αυτοραδιογραφίας ευαίσθητο στο μπλε φως (Fuji Madical Film, X-ray Film, Jurus RX-N, Fuzifilm corporation, Minato-Ku, Tokyo, Japan). Ο χρόνος έκθεσης του φιλμ εξαρτάται από την ένταση και την ποιότητα του σήματος. Η πρωτεΐνη GAPDH (Anti-GAPDH peroxidase antibody, G9295200 UL, Sigma Aldrich), με αραιώση 1:50.000 χρησιμοποιήθηκε ως μόριο κανονικοποίησης. Το ποσό του 152 ανοσοδραστικού προϊόντος σε κάθε γραμμή προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Alpha Innotech. Κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκε τουλάχιστον τρεις ανεξάρτητες φορές.

3.9 Προσδιορισμός αλβουμίνης μέσω του αντιδραστηρίου Bromocresol Green

Για τον προσδιορισμό της αλβουμίνης μέσω του αντιδραστηρίου της βρωμοκρεσόλης (bromocresol green) χρησιμοποιήθηκε με μια μικρή τροποποίηση το πρωτόκολλο Doumas et al. Σε 25μl δείγματος κυτταρικού ελαιωρήματος προστίθεται 1ml βρωμοκρεσόλη. Το μίγμα επωάζεται για 20 λεπτά σε σκοτεινό μέρος σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα ακολουθεί η μέτρηση της απορρόφησης του στα 628 nm. Κάθε πείραμα πραγματοποιείται τρεις ανεξάρτητες φορές.

Για την πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις διαλύματος αλβουμίνης 10 mg/ml ώστε να προκύψουν διαλύματα συγκεντρώσεις 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 μg/ml. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης 25 μl διαλύματος αλβουμίνης με τις παραπάνω συγκεντρώσεις προστέθηκε σε 1 ml διαλύματος αντιδραστηρίου Bromocresol green. Τα δείγματα ανακινούνται απαλά και επωάζονται για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να σταθεροποιηθεί το χρώμα. Ακολουθεί μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 629 nm. Ως τυφλό χρησιμοποιείται διάλυμα που περιέχει 25 μl buffer RIPA και 1 ml διαλύματος αντιδραστηρίου bromocresol green. Οι συγκεντρώσεις αλβουμίνης 0.25-10 μg/ml αντιστοιχούν στο γραμμικό τμήμα της καμπύλης.

3.10 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, έγιναν οι συγκρίσεις κατά ζεύγη. Ως επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε το $p < 0,05$. Όλα τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα ως \pm standard error of the means (SEM).

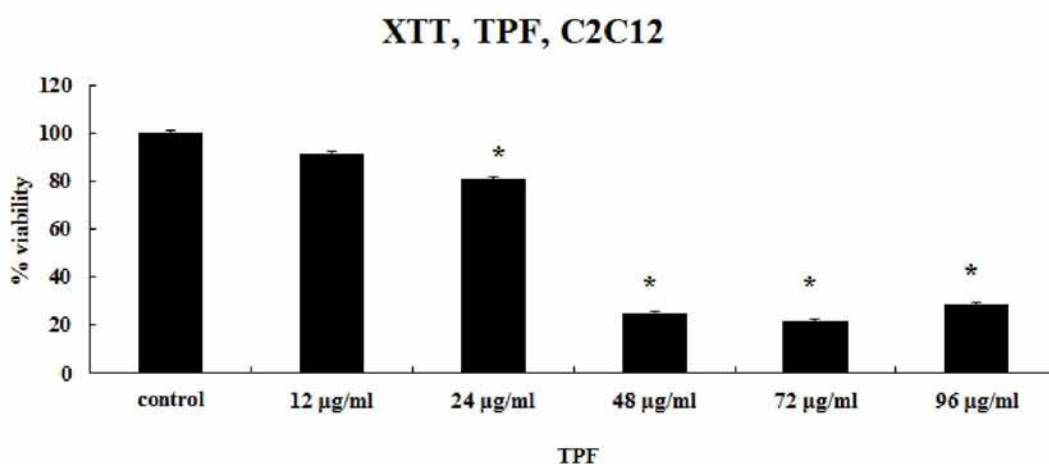
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Μέθοδος 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.

4.1.1 Μυοβλάστες Ποντικού (C2C12)

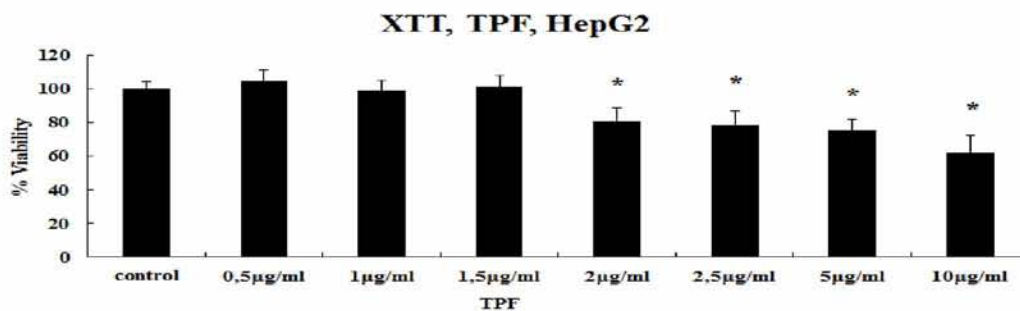
Στην κυτταρική σειρά C2C12, χορηγήθηκε εύρος συγκεντρώσεων από 12,0-96,0 $\mu\text{g/ml}$ TPF. Ωστόσο συγκεντρώσεις πάνω από 24,0 $\mu\text{g/ml}$ TPF ήταν κυτταροτοξικές. Συνεπώς, για τον έλεγχο τις αντιοξειδωτικής δράσης του εκχυλίσματος, χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις από 2,5-10,0 $\mu\text{g/ml}$.



Διάγραμμα 1: Προσδιορισμός κυτταροτοξικότητας TPF, στην κυτταρική σειρά C2C12, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης της ουσίας, με τη μέθοδο ΧΤΤ. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως \pm SEM, (n=6). * $p < 0,05$ στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με το control.

4.1.2 Ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα ήπατος (HepG2)

Στην κυτταρική σειρά HepG2, χορηγήθηκε εύρος συγκεντρώσεων από 0,5-10,0 $\mu\text{g/ml}$ TPF. Ωστόσο συγκεντρώσεις πάνω από 2,0 $\mu\text{g/ml}$ TPF ήταν κυτταροτοξικές. Συνεπώς, για τον έλεγχο τις αντιοξειδωτικής δράσης του εκχυλίσματος, χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις από 0,25-1,5 $\mu\text{g/ml}$.



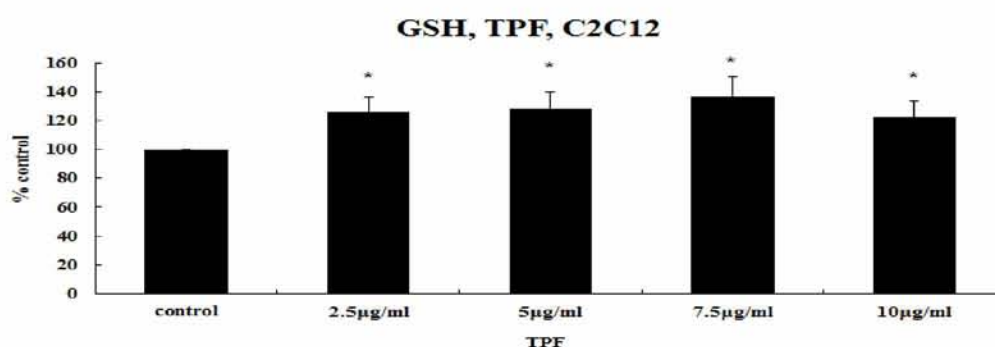
Διάγραμμα 2: Προσδιορισμός κυτταροτοξικότητας TPF, στην κυτταρική σειρά HepG2, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης της ουσίας, με τη μέθοδο XTT. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean ± SEM, (n=6). * $p < 0,05$ στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με το control.

4.2 Προσδιορισμός της οξειδοαναγωγικής κατάστασης με κυτταρομετρία ροής

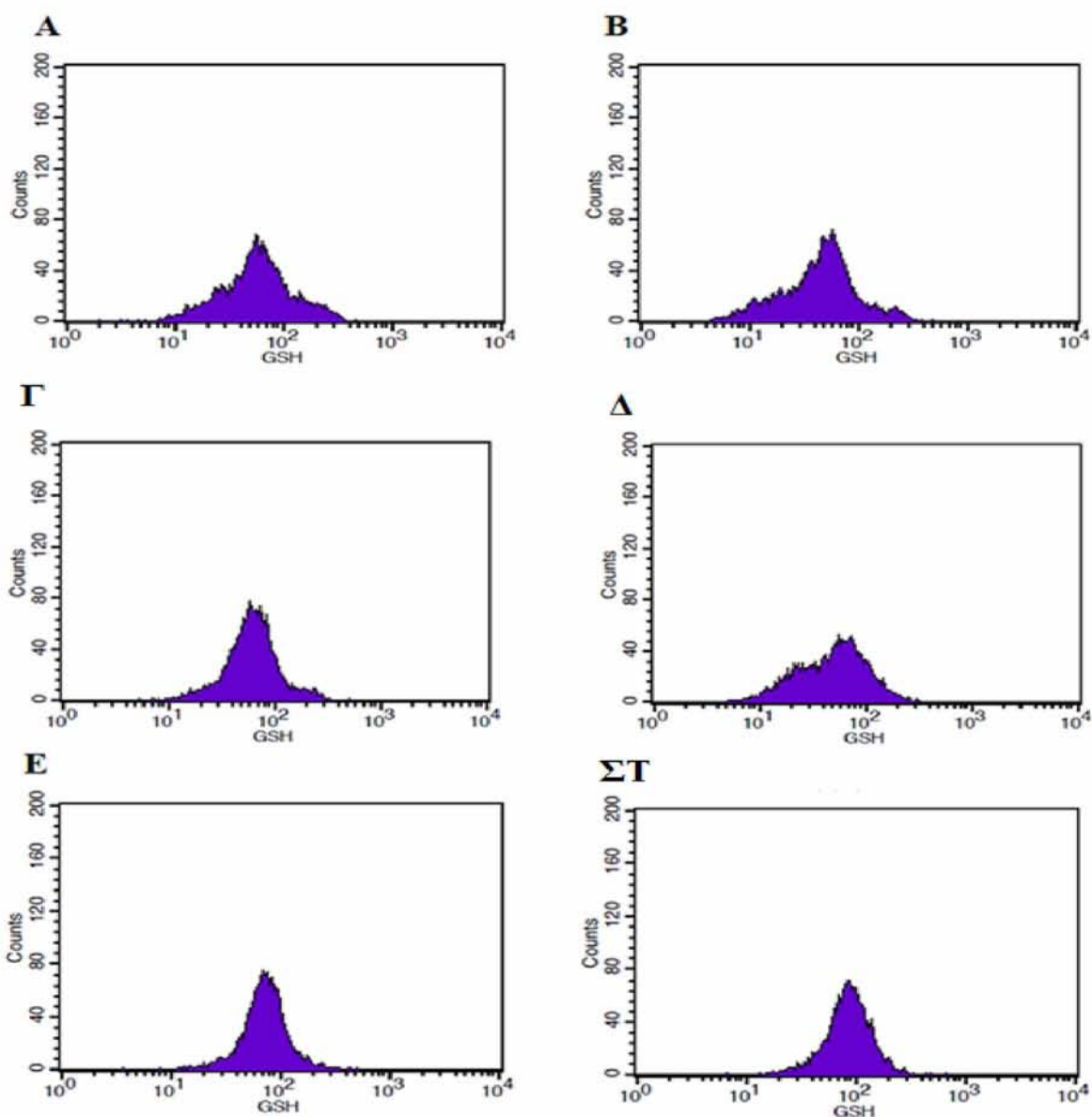
4.2.1 Επίπεδα Γλουταθειόνης (GSH)

4.2.1.1 Επίπεδα γλουταθειόνης (GSH) σε μυοβλάστες ποντικού C2C12

Τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής έδειξαν πως το εκχύλισμα αύξησε στατιστικώς σημαντικά ($p < 0,05$), τα επίπεδα της GSH στην κυτταρική σειρά C2C12 κατά 26, 28, 37 και 23% στις συγκεντρώσεις 2,5, 5,7,5 και 10 μg/ml TPF αντίστοιχα, σε σύγκριση με το control.



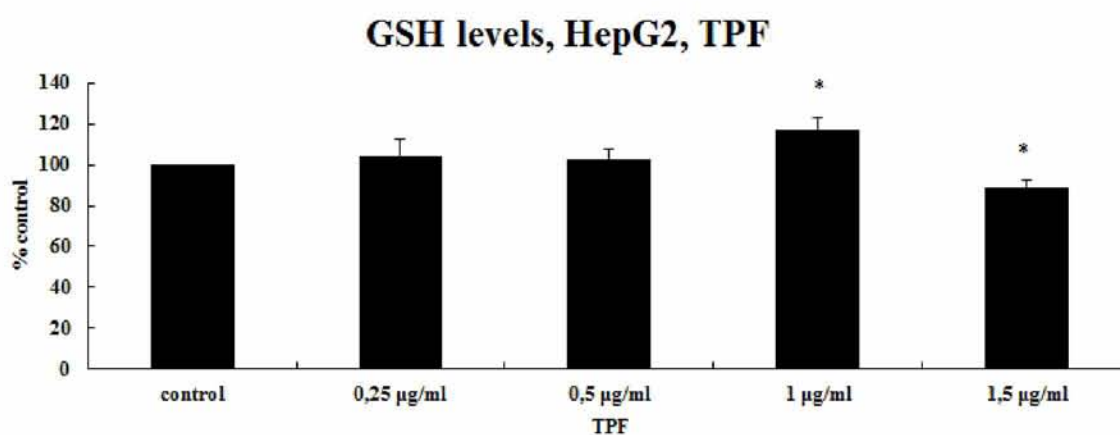
Διάγραμμα 3: Επίδραση TPF στα επίπεδα GSH, στην κυτταρική σειρά C2C12, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης του εκχυλίσματος, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean ± SEM (n=6). * $p < 0,05$, στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα σε σύγκριση με το control.



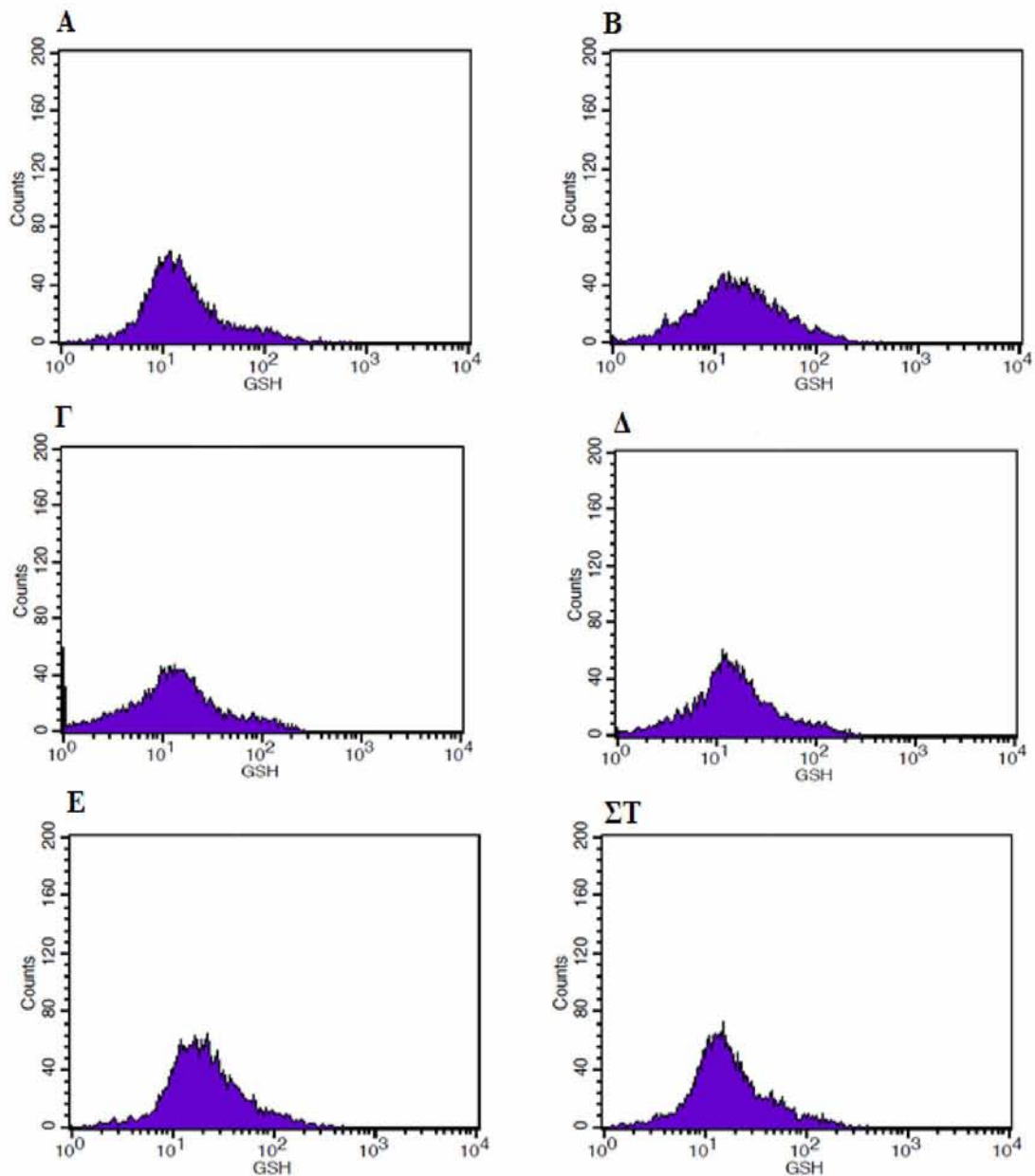
Διάγραμμα 3: Επίδραση TPF στα επίπεδα GSH στην κυτταρική σειρά C2C12. Τα ιστογράμματα παρουσιάζουν τον φθορισμό που εκπέμπεται από 10,000 κύτταρα κατά την μέτρηση της GSH, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Ο FL2 αντιπροσωπεύει τον φθορισμό που ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας 488 και 580 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και ως μήκος κύματος εκπομπής. Α και Β) Επίπεδα GSH στα controls (χωρίς TPF). Γ) Επίπεδα GSH στα 2,5 $\mu\text{g/ml}$ TPF. Δ) Επίπεδα GSH στα 5 $\mu\text{g/ml}$ TPF. Ε) Επίπεδα GSH στα 7,5 $\mu\text{g/ml}$ TPF. ΣΤ) Επίπεδα GSH στα 10 $\mu\text{g/ml}$ TPF.

4.2.1.2 Επίπεδα γλουταθειόνης (GSH) σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα ήπατος (HepG2).

Τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής έδειξαν πως το εκχύλισμα αύξησε στατιστικώς σημαντικά ($p < 0,05$), τα επίπεδα της GSH στην κυτταρική σειρά HepG2 κατά 17% στην συγκέντρωση του 1 $\mu\text{g/ml}$ TPF, σε σύγκριση με το control. Ωστόσο, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση ($p < 0,05$) της GSH, κατά 11% σε σύγκριση με το control, στη συγκέντρωση 1,5 $\mu\text{g/ml}$ TPF.



Διάγραμμα 4: Επίδραση TPF στα επίπεδα GSH, στην κυτταρική σειρά HepG2, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης του εκχυλίσματος, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean \pm SEM (n=6). * $p < 0,05$, στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα σε σύγκριση με το control.

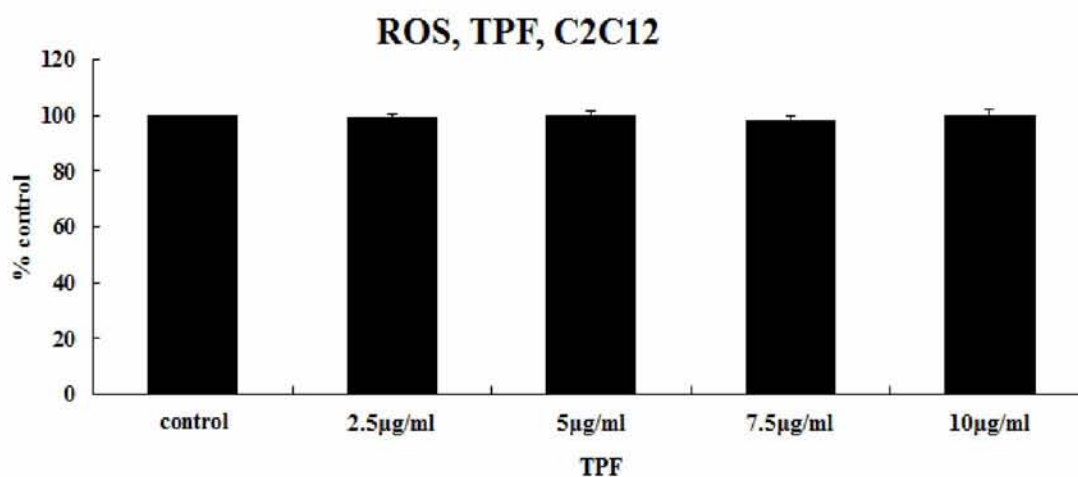


Διάγραμμα 5: Επίδραση TPF στα επίπεδα GSH στην κυτταρική σειρά HepG2. Τα ιστογράμματα παρουσιάζουν τον φθορισμό που εκπέμπεται από 10,000 κύτταρα κατά την μέτρηση της GSH, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Ο FL2 αντιπροσωπεύει τον φθορισμό που ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας 488 και 580 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και ως μήκος κύματος εκπομπής. Α και Β) Επίπεδα GSH στα controls (χωρίς TPF). Γ) Επίπεδα GSH στα 0,25 μg/ml TPF. Δ) Επίπεδα GSH στα 0,5 μg/ml TPF. Ε) Επίπεδα GSH στα 1 μg/ml TPF. ΣΤ) Επίπεδα GSH στα 1,5 μg/ml TPF.

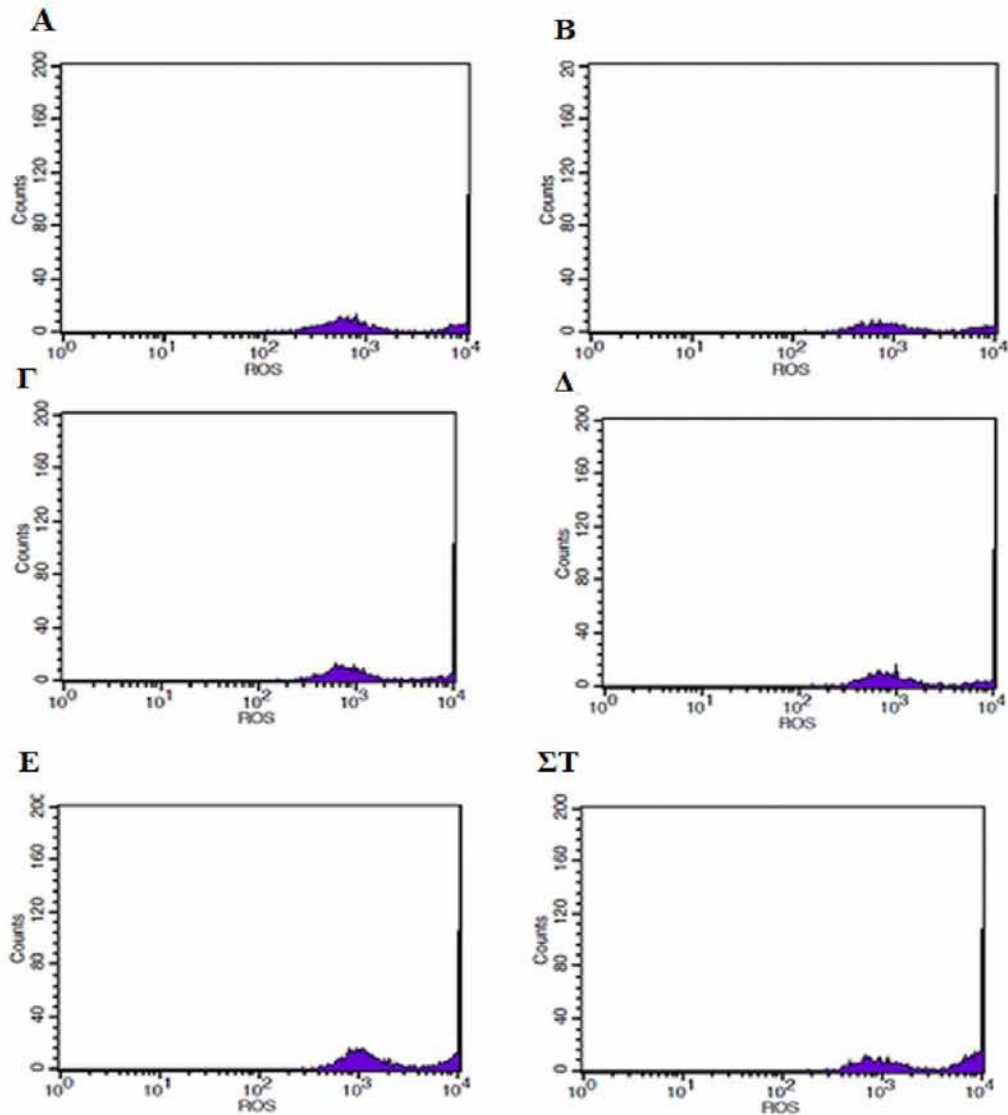
4.2.2 Επίπεδα δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS).

4.2.2.1 Επίπεδα ROS σε μυοβλάστες ποντικού C2C12.

Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στα επίπεδα ROS, σε σύγκριση με το control, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης του εκχυλίσματος.



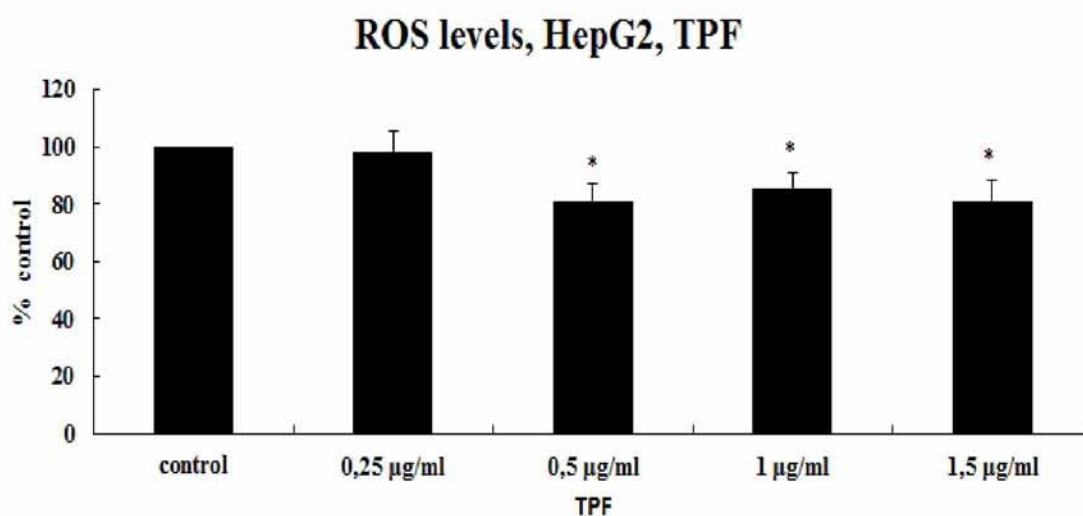
Διάγραμμα 6: Επίδραση TPF στα επίπεδα ROS, στην κυτταρική σειρά C2C12, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης του εκχυλίσματος, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean \pm SEM (n=6). * $p < 0,05$, στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα σε σύγκριση με το control.



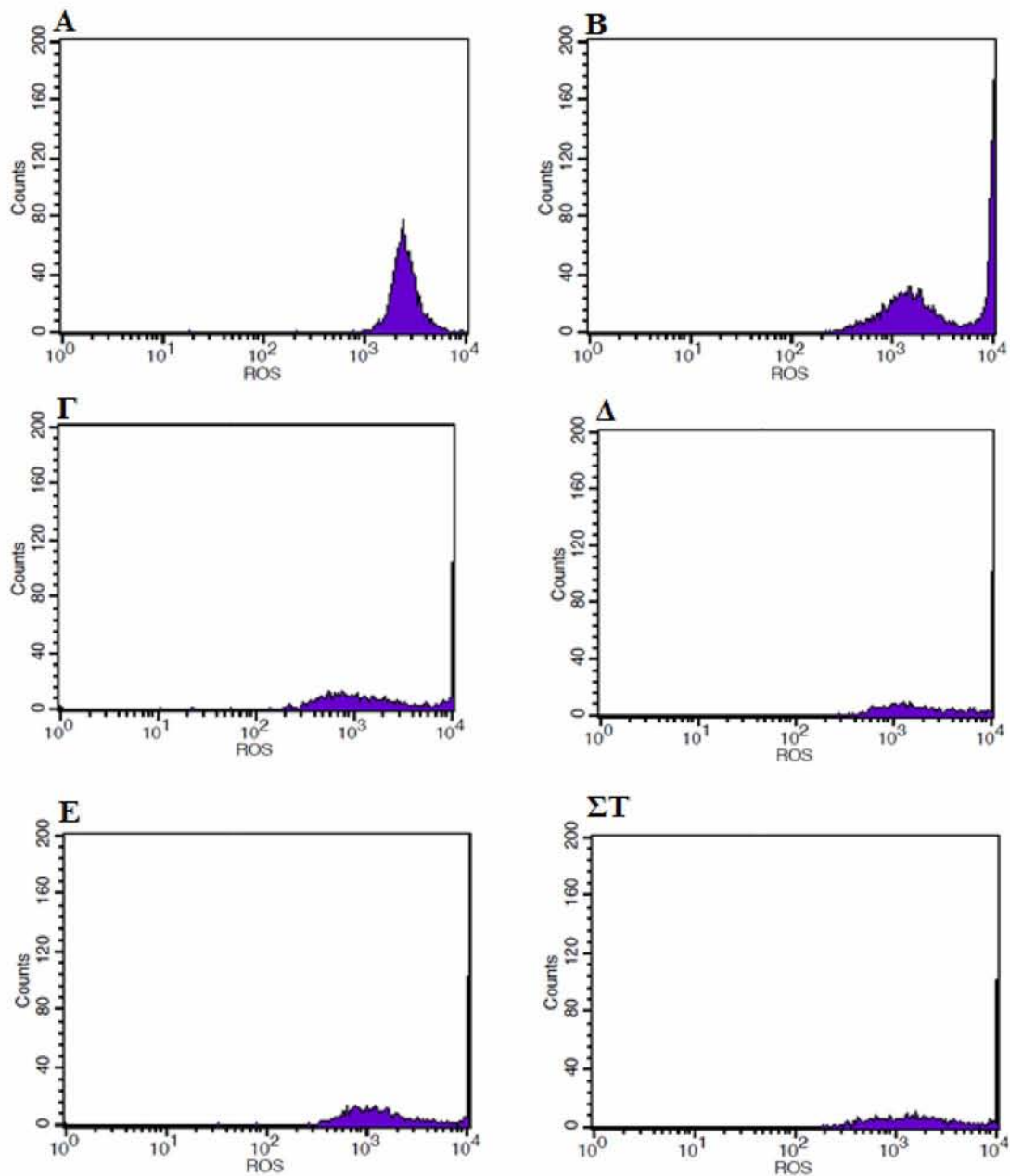
Διάγραμμα 7: Επίδραση TPF στα επίπεδα ROS στην κυτταρική σειρά C2C12. Τα ιστογράμματα παρουσιάζουν τον φθορισμό που εκπέμπεται από 10,000 κύτταρα κατά την μέτρηση της GSH, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Ο FL2 αντιπροσωπεύει τον φθορισμό που ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας 488 και 580 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και ως μήκος κύματος εκπομπής. Α και Β) Επίπεδα ROS στα controls (χωρίς TPF). Γ) Επίπεδα ROS στα 2,5 µg/ml TPF. Δ) Επίπεδα ROS στα 5 µg/ml TPF. Ε) Επίπεδα ROS στα 7,5 µg/ml TPF. ΣΤ) Επίπεδα ROS στα 10 µg/ml TPF.

4.2.2.2 Επίπεδα ROS σε καρκινικά ηπατικά κύτταρα ανθρώπου (HepG2)

Τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής έδειξαν πως το εκχύλισμα μείωσε στατιστικώς σημαντικά ($p < 0,05$), τα επίπεδα των ROS, στην κυτταρική σειρά HepG2 κατά 19, 14 και 19% στις συγκεντρώσεις 0,5, 1 και 1,5 $\mu\text{g/ml}$ TPF αντίστοιχα, σε σύγκριση με το control.



Διάγραμμα 8: Επίδραση TPF στα επίπεδα ROS, στην κυτταρική σειρά HepG2, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης του εκχυλίσματος, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean \pm SEM (n=6). * $p < 0,05$, στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα σε σύγκριση με το control.

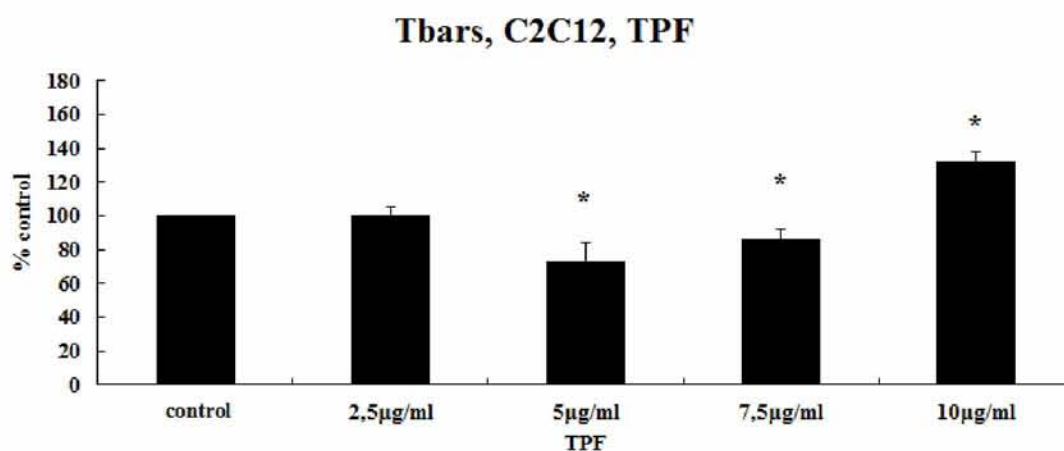


Διάγραμμα 9: Επίδραση TPF στα επίπεδα ROS στην κυτταρική σειρά HepG2. Τα ιστογράμματα παρουσιάζουν τον φθορισμό που εκπέμπεται από 10,000 κύτταρα κατά την μέτρηση της GSH, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Ο FL2 αντιπροσωπεύει τον φθορισμό που ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας 488 και 580 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και ως μήκος κύματος εκπομπής. Α και Β) Επίπεδα ROS στα controls (χωρίς TPF). Γ) Επίπεδα ROS στα 0,25 $\mu\text{g/ml}$ TPF. Δ) Επίπεδα ROS στα 0,5 $\mu\text{g/ml}$ TPF. Ε) Επίπεδα ROS στα 1 $\mu\text{g/ml}$ TPF. ΣΤ) Επίπεδα ROS στα 1,5 $\mu\text{g/ml}$ TPF.

4.3 Ουσίες που αντιδρούν με το Θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS).

4.3.1 Επίπεδα Tbars σε C2C12

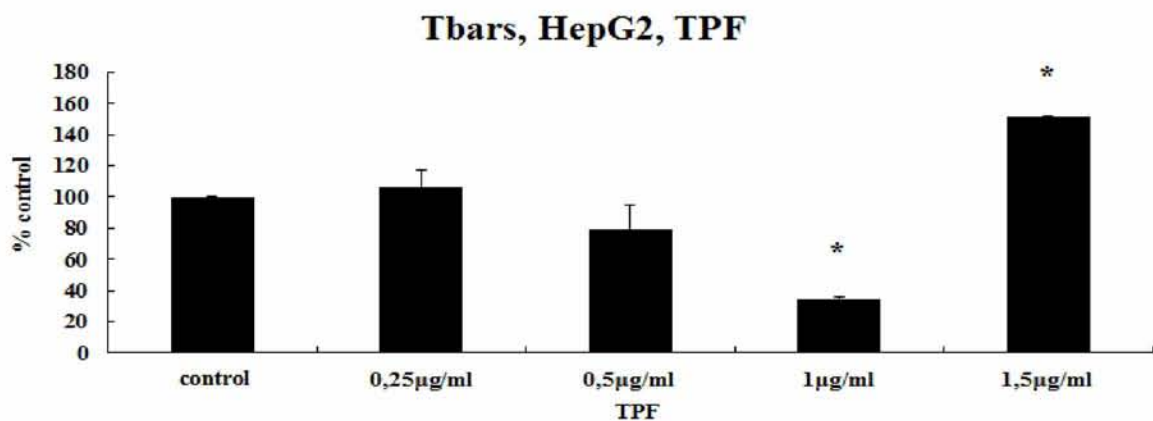
Η χορήγηση TPF μείωσε στατιστικά σημαντικά ($p < 0,05$) την οξείδωση των λιπιδίων κατά 26,73 και 13,75 % σε σύγκριση με το control στις συγκεντρώσεις 2 και 7,5 $\mu\text{g/ml}$ TPF αντίστοιχα. Ωστόσο στην συγκέντρωση των 10 $\mu\text{g/ml}$ TPF, τα Tbars, αυξήθηκαν στατιστικώς σημαντικά ($p < 0,05$), κατά 31,82% σε σύγκριση με το control.



Διάγραμμα 10: Επίπεδα Tbars, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης TPF στην κυτταρική σειρά C2C12. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean \pm SEM ($n=6$) * $p < 0,05$, στατιστικώς σημαντικά με βάση το control.

4.3.2 Επίπεδα Tbars σε HepG2

Η χορήγηση TPF μείωσε στατιστικά σημαντικά ($p < 0,05$) την οξείδωση των λιπιδίων κατά 65,22 % σε σύγκριση με το control στο 1 $\mu\text{g/ml}$ TPF. Ωστόσο στα 1,5 $\mu\text{g/ml}$ TPF, τα Tbars, αυξήθηκαν στατιστικώς σημαντικά ($p < 0,05$), κατά 51,49 % σε σύγκριση με το control.

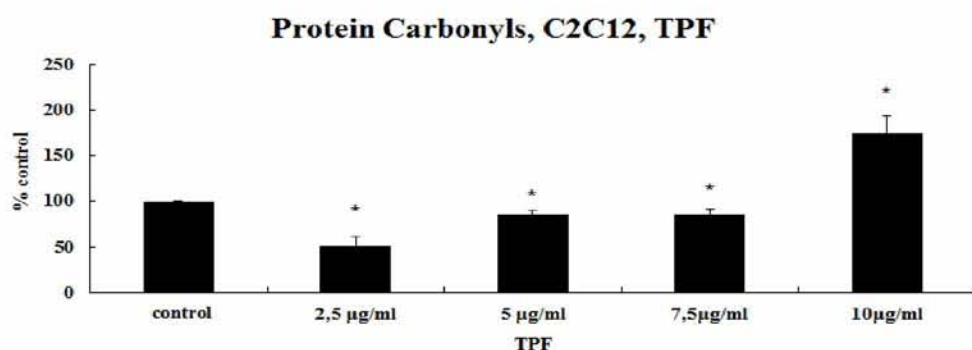


Διάγραμμα 11: Επίπεδα Tbars, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης TPF στην κυτταρική σειρά HepG2. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean ± SEM (n=6) * $p < 0,05$, στατιστικώς σημαντικά με βάση το control.

4.4 Πρωτεϊνικά καρβονύλια (protein carbonyls)

4.4.1 Πρωτεϊνικά καρβονύλια σε μυοβλάστες ποντικού C2C12

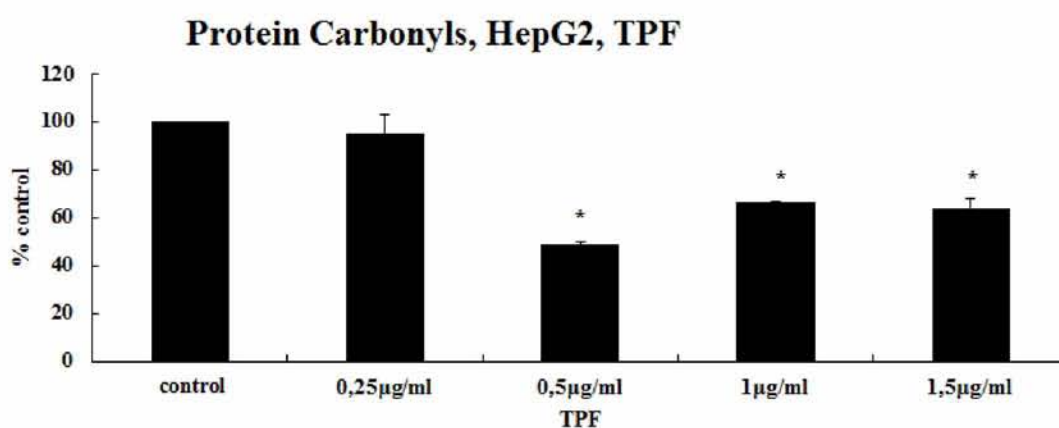
Η χορήγηση TPF μείωσε στατιστικά σημαντικά ($p < 0,05$) την οξείδωση των πρωτεϊνών στα C2C12 κύτταρα, κατά 48,58 , 14,77 και 13,87 % σε σύγκριση με το control στις συγκεντρώσεις 2,5 , 5 και 7,5 µg/ml TPF, αντίστοιχα. Ωστόσο στα 10 µg/ml TPF, τα πρωτεϊνικά καρβονύλια, αυξήθηκαν στατιστικώς σημαντικά ($p < 0,05$), κατά 74,41 % σε σύγκριση με το control



Διάγραμμα 12: Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης TPF στην κυτταρική σειρά C2C12. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean ± SEM (n=6) * $p < 0,05$, στατιστικώς σημαντικά σε σύγκριση με το control.

4.4.2 Πρωτεϊνικά καρβονύλια σε ηπατικά καρκινικά κύτταρα ανθρώπου (HepG2)

Η χορήγηση TPF μείωσε στατιστικά σημαντικά ($p < 0,05$) την οξειδωση των πρωτεϊνών στα HepG2 κύτταρα, κατά 51,22, 33,34 και 35,91 % σε σύγκριση με το control στις συγκεντρώσεις 0, 5, 1 και 1,5 $\mu\text{g/ml}$ TPF, αντίστοιχα.



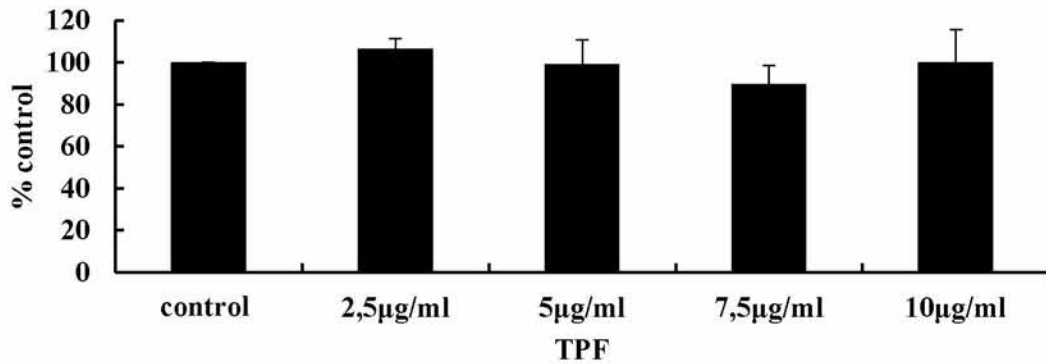
Διάγραμμα 13: Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης TPF στην κυτταρική σειρά HepG2. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean \pm SEM (n=6) * $p < 0,05$, στατιστικώς σημαντικά σε σύγκριση με το control.

4.5 Προσδιορισμός επιπέδων Αλβουμίνης μέσω αντιδραστηρίου Bromocresol green

4.5.1 Επίπεδα αλβουμίνης σε C2C12

Στην αντίδραση προσδιορισμού των επιπέδων αλβουμίνης μέσω του αντιδραστηρίου bromocresol green, χρησιμοποιήθηκαν ισοπρωτεϊνικά δείγματα (30 μg πρωτεΐνης). Δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές ($p < 0,05$) διαφορές σε σύγκριση με το control.

Albumin, C2C12, TPF

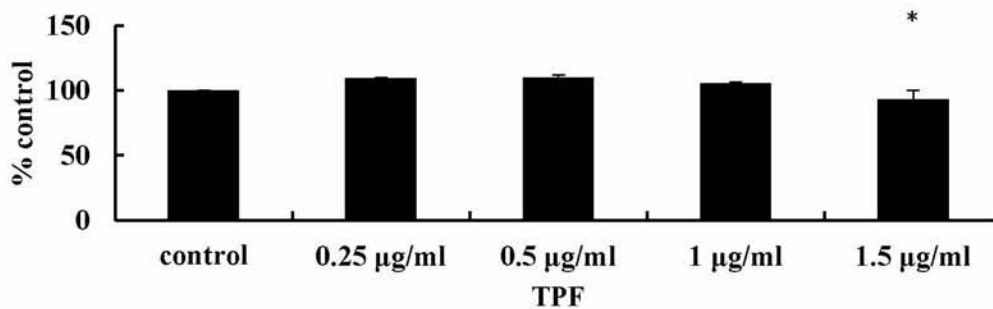


Διάγραμμα 14: Ποσοστό αλβουμίνης όπως προσδιορίστηκε με το αντιδραστήριο bromocresol green, σε C2C12, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης TPF. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control και παρουσιάζονται ως mean \pm SEM, (n=3).

4.5.2 Ποσοστό αλβουμίνης σε HepG2

Στην αντίδραση προσδιορισμού των επιπέδων αλβουμίνης μέσω του αντιδραστηρίου bromocresol green, χρησιμοποιήθηκαν ισοπρωτεϊνικά δείγματα (30µg πρωτεΐνης). Συγκεκριμένα, παρουσιάζεται στατιστικά σημαντική μείωση ($p < 0.05$) κατά 7% στα επίπεδα της αλβουμίνης σε συγκέντρωση 1,5 µg/ml TPF.

Albumin, TPF, HepG2

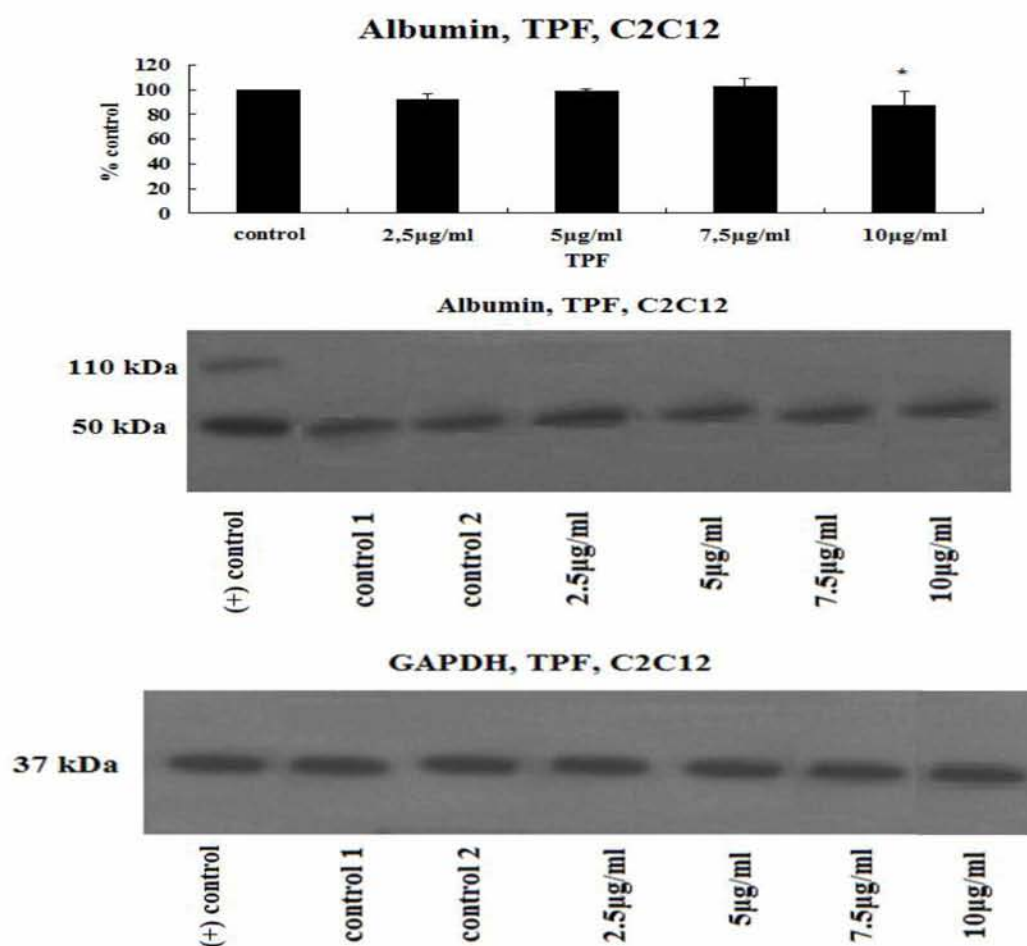


Διάγραμμα 15: Ποσοστό αλβουμίνης μέσω του αντιδραστηρίου bromocresol green, σε HepG2, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης TPF. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως το control και παρουσιάζονται ως mean \pm SEM, (n=3).

4.6 Western Blot

4.6.1 Προσδιορισμός επιπέδων αλβουμίνης με western blot σε C2C12

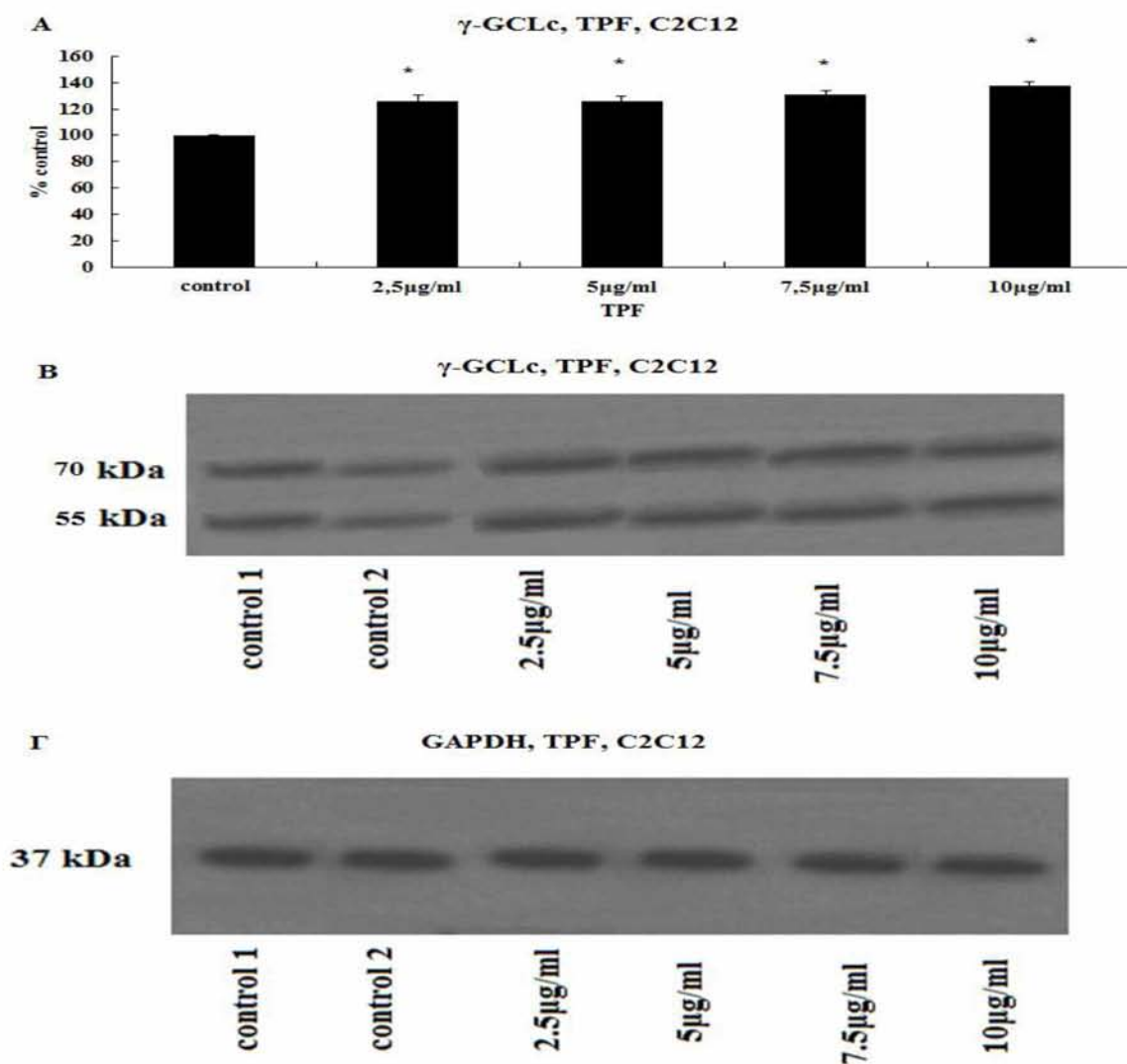
Έπειτα από 24 ώρες χορήγησης του εκχυλίσματος, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση ($p < 0,05$) στα επίπεδα της αλβουμίνης κατά 22,75% στην συγκέντρωση 10 $\mu\text{g/ml}$ TPF.



Διάγραμμα 16: Επίδραση TPF στα πρωτεϊνικά επίπεδα της αλβουμίνης, στην κυτταρική σειρά C2C12. Τα κύτταρα επωάστηκαν για 24 ώρες με τις συγκεντρώσεις 2.5, 5, 7.5 και 10 $\mu\text{g/ml}$ TPF. Η ανάλυση της πρωτεϊνικής έκφρασης της αλβουμίνης πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Western blot. Α) Αποτελέσματα της ανάλυσης Western blot εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control. Η έκφραση του GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως μόριο κανονικοποίησης. Β) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση της πρωτεΐνης της αλβουμίνης. Γ) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση της πρωτεΐνης του GAPDH. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean \pm SEM (n=3) * $p < 0,05$, στατιστικώς σημαντικά σε σύγκριση με το control.

4.6.2 Επίπεδα καταλυτικής υπομονάδας της γ -GCL (γ -GCLc) σε C2C12

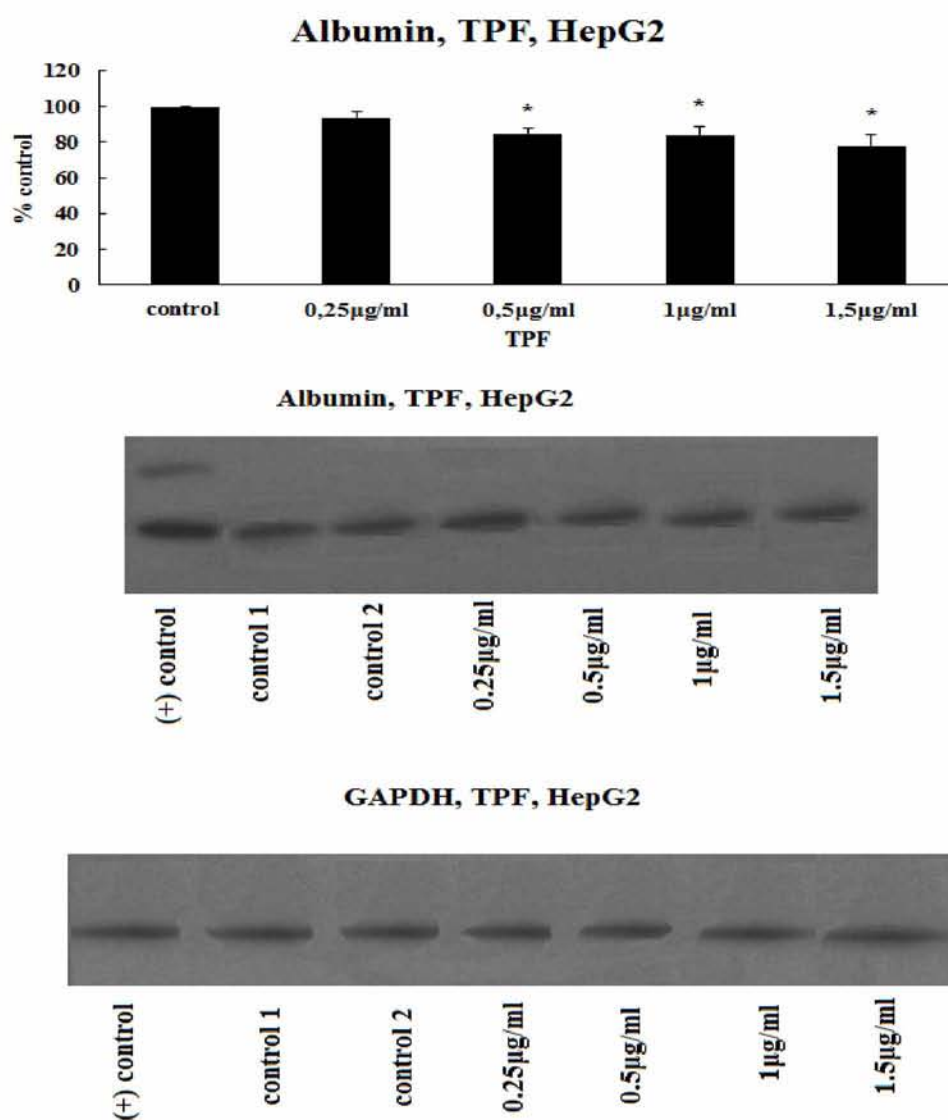
Έπειτα από 24 ώρες χορήγησης του εκχυλίσματος, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση ($p < 0,05$) στα επίπεδα πρωτεΐνης της γ -GCLc κατά 25.92, 25.56, 31.18, 37.88% σε σχέση με το control στις συγκεντρώσεις 2,5, 5, 7,5, 10 $\mu\text{g/ml}$ TPF, αντίστοιχα.



Διάγραμμα 17: Επίδραση TPF στα πρωτεϊνικά επίπεδα της γ -GCLc, στην κυτταρική σειρά C2C12. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες με τις συγκεντρώσεις 2,5, 5, 7,5 και 10 $\mu\text{g/ml}$ TPF. Η ανάλυση της πρωτεϊνικής έκφρασης της γ -GCLc πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Western blot. Α) Αποτελέσματα της ανάλυσης Western blot εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control. Η έκφραση του GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως μόριο κανονικοποίησης. Β) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση της πρωτεΐνης της γ -GCLc. Γ) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση της πρωτεΐνης του GAPDH. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean \pm SEM (n=3) * $p < 0,05$, στατιστικώς σημαντικά σε σύγκριση με το control

4.6.3 Επίπεδα αλβουμίνης σε HepG2, με western blot

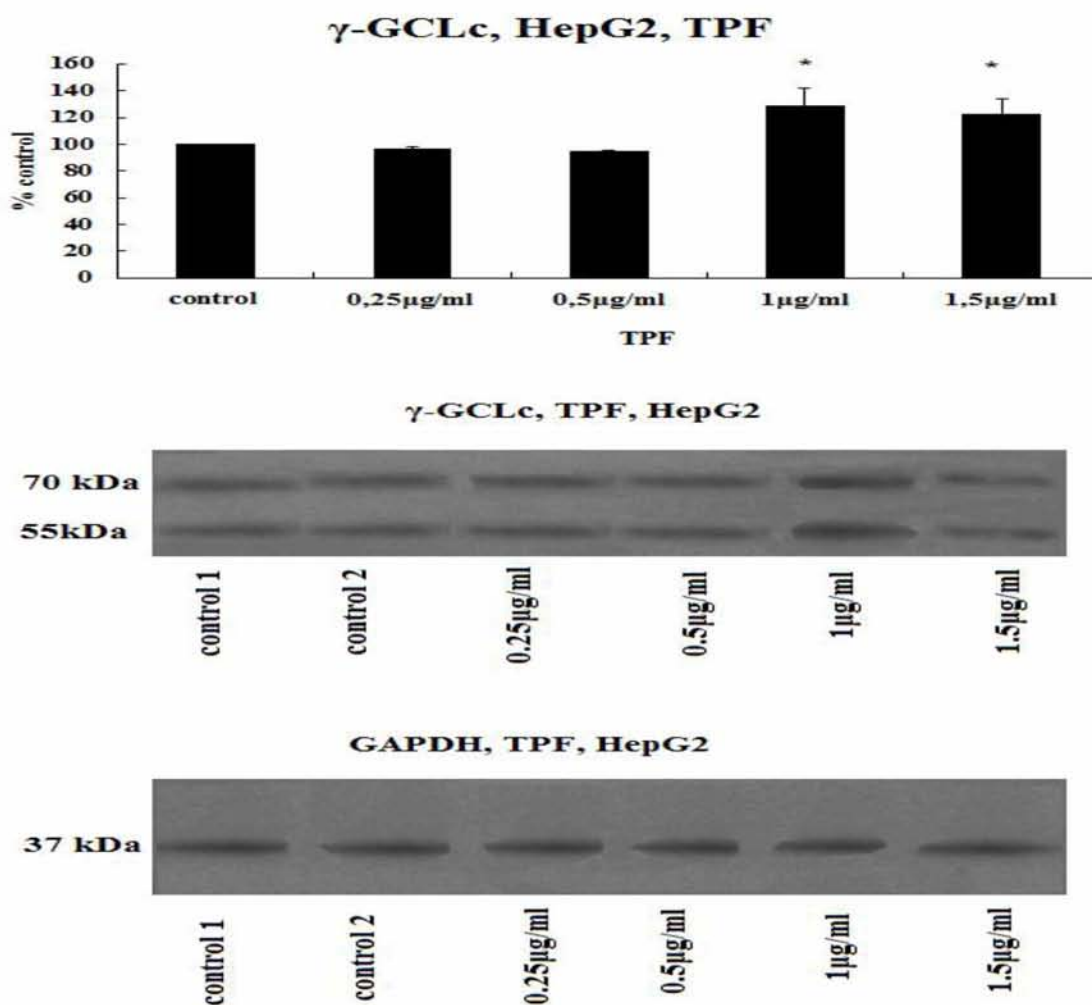
Έπειτα από 24 ώρες χορήγησης του εκχυλίσματος, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση ($p < 0,05$) στα επίπεδα της αλβουμίνης κατά 25,3%, 16% και 22,32% σε σχέση με το control στις συγκεντρώσεις 0,5 , 1.0 και 1.5 $\mu\text{g/ml}$ TPF, αντίστοιχα.



Διάγραμμα 18: Επίδραση TPF στα πρωτεϊνικά επίπεδα της αλβουμίνης, στην κυτταρική σειρά HepG2. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες με τις συγκεντρώσεις 0.25, 0.5, 1, και 1.5 $\mu\text{g/ml}$ TPF. Η ανάλυση της πρωτεϊνικής έκφρασης της αλβουμίνης πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Western blot. Α) Αποτελέσματα της ανάλυσης Western blot εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control. Η έκφραση του GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως μόριο κανονικοποίησης. Β) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση της πρωτεΐνης της αλβουμίνης. Γ) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση της πρωτεΐνης του GAPDH. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean \pm SEM (n=3) * $p < 0,05$, στατιστικώς σημαντικά σε σύγκριση με το control.

4.6.4 Επίπεδα γ -GCLc σε HepG2

Έπειτα από 24 ώρες χορήγησης του εκχυλίσματος, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση ($p < 0,05$) στα επίπεδα πρωτεΐνης της γ -GCLc κατά 28,99, και 7,91% σε σχέση με το control στις συγκεντρώσεις 1.0 και 1.5 $\mu\text{g/ml}$ TPF, αντίστοιχα.



Διάγραμμα 19: Επίδραση TPF στα πρωτεϊνικά επίπεδα της γ -GCLc, στην κυτταρική σειρά HepG2. Τα κύτταρα επωάστηκαν για 24 ώρες με τις συγκεντρώσεις 0.25, 0.5, 1.0 και 1.5 $\mu\text{g/ml}$ TPF. Η ανάλυση της πρωτεϊνικής έκφρασης της γ -GCLc πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Western blot. A) Αποτελέσματα της ανάλυσης Western blot εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control. Η έκφραση του GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως μόριο κανονικοποίησης. B) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση της πρωτεΐνης της γ -GCLc. Γ) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση της πρωτεΐνης του GAPDH. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean \pm SEM (n=3) * $p < 0,05$, στατιστικώς σημαντικά σε σύγκριση με το control.

4.7 Συνοπτικά

Κυτταρική σειρά	TPF (μg/ml)	GSH (mean ±SEM)	ROS (mean ±SEM)	TBARS (mean ±SEM)	Protein carbonyls (mean ±SEM)
HepG2	0,25	4 ± 9	-2 ± 7	6,76 ± 10,24	-5,10 ± 8,08
	0,5	3 ± 5	-19 ± 6 *	-20,37 ± 15,28	-51,22 ± 1,24 *
	1	17 ± 6 *	-14 ± 5 *	-65,22 ± 1,42 *	-33,34 ± 0,33 *
	1,5	-11 ± 4 *	-19 ± 7 *	51,49 ± 0,22 *	-35,91 ± 4,05 *
C2C12	2,5	26 ± 10 *	0 ± 1	0,76 ± 4,27	-48,58 ± 9,52 *
	5	28 ± 12 *	0 ± 1	-26,73 ± 10,61 *	-14,77 ± 5,22 *
	7,5	37 ± 14 *	-1 ± 1	-13,75 ± 5,67 *	-13,87 ± 5,80 *
	10	23 ± 11 *	0 ± 2	31,82 ± 6,01 *	74,41 ± 18,89 *

Πίνακας 2 : Συνοπτικά αποτελέσματα, ύστερα από 24 ώρες χορήγησης TPF, στα HepG2 και στα C2C12 κύτταρα. * $p < 0,05$, στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα σε σύγκριση με το control.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα ενός εκχυλίσματος ελαιολάδου του Αγίου Όρους σε μυοβλάστες ποντικού και σε ανθρώπινα ηπατικά κύτταρα. Το ελαιόλαδο είναι ένα αναπόσπαστο κομμάτι της μεσογειακής διατροφής και ένα προϊόν πλούσιο σε μονο-ακόρεστα λιπαρά και σε αντιοξειδωτικές ουσίες. Το ελαιόλαδο περιέχει ένα σύνολο διαφορετικών πολυφαινόλων, με κυριότερες την ελαιοευρωπαϊνή, την υδροξυτυροσόλη και την τυροσόλη.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δύο κυτταρικές σειρές, η C2C12 και η HepG2, όπου μέσω της μεθόδου XTT, έγινε έλεγχος διαφόρων συγκεντρώσεων TPF, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις για τον έλεγχο του οξειδοαναγωγικού δυναμικού των κυττάρων. Συγκεκριμένα, συγκεντρώσεις πάνω από 24,0 μg/ml TPF φάνηκαν να είναι κυτταροτοξικές για τα C2C12, ενώ για τα

HepG2 πάνω από 2,0 µg/ml TPF. Από την συγκεκριμένη μέθοδο παρατηρούμε ότι τα HepG2, είναι πιο ευαίσθητα σε σχέση με τα C2C12, καθώς σε πολύ μικρότερη συγκέντρωση TPF, εμφανίστηκε κυτταροτοξικότητα στα HepG2. Συνεπώς, μπορούμε να πούμε ότι το εκχύλισμα TPF, εμφανίζει ιστοεξειδικευμένη δράση.

Με βάση τα αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής φάνηκε πως το εκχύλισμα του ελαιολάδου αύξησε στατιστικά σημαντικά τα επίπεδα της GSH και στα C2C12 και στα HepG2. Συγκεκριμένα, στα C2C12 κατά 37% στην συγκέντρωση 7,5 µg/ml TPF και στα HepG2, 17% στην συγκέντρωση του 1 µg/ml TPF, σε σχέση με το control. Οι φαινόλες του ελαιολάδου έχει αποδειχθεί πως αυξάνουν τα επίπεδα της GSH και στο πλάσμα του ανθρώπου (Pliszka, Huszcza-Ciołkowska, and Wierzbicka 2016). Αυτή η αύξηση ίσως οφείλεται στην αύξηση της δράσης της GCL ή στην αύξηση της δράσης της συνθετάσης της γλουταθειόνης. (Visioli et al. 2009)

Στα HepG2 φάνηκε πως τα επίπεδα της GSH αυξάνονται σε σχέση με το control έως 17% σε συγκέντρωση 1µg/ml TPF. Η αύξηση αυτή της GSH είναι αρκετά σημαντική, καθώς η GSH έχει ένα σοβαρό αντιοξειδωτικό ρόλο. Είναι υπεύθυνη για την άμεση απομάκρυνση των ελευθέρων ριζών. (Kerksick and Willoughby 2005) Τα αποτελέσματα έδειξαν επίσης πως στην μεγαλύτερη συγκέντρωση (1,5 µg/ml TPF) , παρουσιάζεται μείωση της GSH σε σχέση με τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Αυτή η μείωση ίσως εξηγείται από μία πιθανή προ-οξειδωτική ικανότητα των πολυφαινολών, αφού ξεπεράσουν μία συγκέντρωση. (Priftis et al. 2015), (Procházková, Boušoná, and Wilhelmová 2011). Επίσης, εξηγείται από το γεγονός ότι η ελαιοευρωπαϊνή και η υδροξυτυροσόλη λειτουργούν προ-οξειδωτικά, εξαιτίας της ικανότητας τους να ανάγουν τα μέταλλα, με αποτέλεσμα η ανηγμένη μορφή αυτών των μετάλλων να καταλύει την παραγωγή OH· μέσω της αντίδρασης Fenton. Η ικανότητα των πολυφαινολών να δρουν αντιοξειδωτικά/προοξειδωτικά σε in vivo και σε in vitro συστήματα εξαρτάται από ένα σύνολο παραγόντων όπως η συγκέντρωσή τους και η δομή τους. (Maurya and Devasagayam 2010)

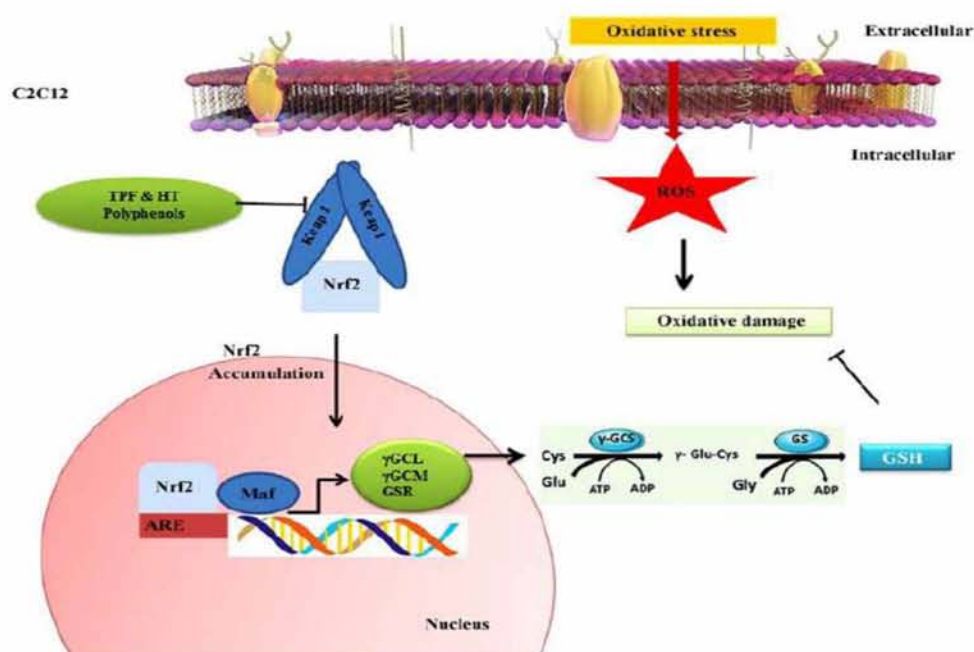
Στα C2C12 τα επίπεδα της GSH αυξήθηκαν σε σχέση με το control κατά 28% , 37% και 23% στις συγκεντρώσεις 1, 1,5 και 2µg/ml TPF. Ένας πιθανός μηχανισμός που εξηγεί την αύξηση της γλουταθειόνης στους μυοβλάστες ποντικού είναι το μονοπάτι μεταγωγής σήματος Keap1-Nrf2. Η πρωτεΐνη Keap1 (Kelch-like ECH associated protein 1) λειτουργεί ως «αισθητήρας στρες». Υπό φυσιολογικές συνθήκες, ο Nrf2 ουβικιτινιλιώνεται από το σύμπλοκο Keap1-Cullin3 ubiquitin E3 λιγάση στο κυτταρόπλασμα και οδηγείται στο πρωτεάσωμα προς αποικοδόμηση.

Όταν το κύτταρο εκτεθεί σε οξειδωτικό στρες ή τοξικά ξеноβιοτικά, η αποικοδόμηση του Nrf2 σταματά, ο Nrf2 σταθεροποιείται και οδηγείται στον πυρήνα. Μέσα στον πυρήνα, ο Nrf2 σχηματίζει διμερή με τις μικρές Maf πρωτεΐνες και επάγει την έκφραση γονιδίων-στόχων (Suzuki et al. 2016).

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

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

Εικόνα 16: Οι πιθανοί μηχανισμοί με τους οποίους το TPF ασκεί τα αποτελέσματά του στα επίπεδα GSH



Σε αντίθεση με την GSH, τα επίπεδα των ROS στα C2C12 δεν παρουσίασαν σημαντικές μεταβολές. Αξίζει να σημειωθεί πως πρόκειται για τα ενδοκυτταρικά επίπεδα των ROS, καθώς δεν χρησιμοποιήθηκε εξωτερικός οξειδωτικός παράγοντας. Προηγούμενες μελέτες επιβεβαιώνουν τα αποτελέσματα αυτά, καθώς αναφέρουν πως οι μεταβολές των αντιοξειδωτικών μηχανισμών δεν συνοδεύονται πάντα από αλλαγές στα επίπεδα των ROS. (Nikolaos Goutzourelas et al. 2015), (Priftis et al. 2015), (Kerasioti et al. 2014)

Στα HepG2 τα επίπεδα των ROS φάνηκε να μειώνονται κατά 14% , 19 % και 14% σε σχέση με το control στις συγκεντρώσεις 1, 1,5 και 2μg/ml TPF αντίστοιχα. Επιπλέον μελέτες επιβεβαιώνουν την μείωση που παρατηρήθηκε στα επίπεδα των ROS και αποδεικνύουν πως για το γεγονός αυτό ίσως οφείλεται η υδροξυτυροσόλη. (Sarría et al. 2012), (Serreli et al. 2017) Πρόσφατα αποδείχθηκε πλήρως πως τα συστατικά του ελαιολάδου προστατεύουν τα ηπατικά κύτταρα από το οξειδωτικό στρες. (Pereira-Caro et al. 2011). Τα μειωμένα επίπεδα των ROS ταυτίζονται και με την αύξηση που παρατηρήθηκε στα επίπεδα της GSH , καθώς η GSH εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες. Στα HepG2, η GSH αυξήθηκε 17% στην συγκέντρωση του 1 μg/ml TPF, κάτι που υποδηλώνει αύξηση της κυτταρικής άμυνας και συνεπώς μείωση των ROS.

Στην παρούσα μελέτη υπολογίστηκαν και τα επίπεδα των ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS), δείκτης λιπιδικής υπεροξειδωσης. Στα C2C12 παρατηρήθηκε αρχικά μείωση 26,73 % και 13,75 % σε σχέση με το control στις συγκεντρώσεις 5μg/ml και 7,5 μg/ml TPF αντίστοιχα. Ωστόσο, στην μεγαλύτερη συγκέντρωση πολυφαινολικού εκχυλίσματος (10 μg/ml) παρατηρήθηκε αύξηση κατά 31,82 % σε σχέση με το control. Η μείωση των επιπέδων των TBARS σημαίνει μείωση της λιπιδιακής υπεροξειδωσης και ίσως οφείλεται στην μεγάλη αύξηση της GSH και των αντιοξειδωτικών μηχανισμών της. (N. Goutzourelas et al. 2014) Από την άλλη, η αύξηση που φάνηκε στην μεγαλύτερη συγκέντρωση ίσως οφείλεται στο προ-οξειδωτικό φαινόμενο, καθώς μία από τις δράσεις του είναι και η αύξηση της λιπιδιακής υπεροξειδωσης. (Yen, Duh, and Tsai 2002) Στα HepG2 παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων των TBARS κατά 65,22% σε σχέση με το control στην συγκέντρωση 1 μg/ml TPF. Ωστόσο, στην συγκέντρωση 1,5 μg/ml TPF παρατηρήθηκε αύξηση κατά 51,49 % σε σχέση με το control. Φαίνεται πως αρχικά λειτούργησε ο αντιοξειδωτικός μηχανισμός και η λιπιδιακή υπεροξειδωση μειώθηκε , ενώ στην μεγαλύτερη συγκέντρωση TPF δρα το προ-οξειδωτικό φαινόμενο και

προκαλείται αύξηση των επιπέδων των TBARS. Επιπρόσθετα, τα αποτελέσματα επιβεβαιώνονται και από τα επίπεδα της GSH, καθώς στην συγκέντρωση 1,5 µg/ml TPF παρουσιάζεται μείωση της GSH κατά 11% . Έτσι, εμφανίζεται μείωση της κυτταρικής άμυνας και συνεπώς αύξηση των TBARS.

Ένας ακόμη δείκτης που χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του συγκεκριμένου εκχυλίσματος ελαιολάδου είναι τα πρωτεϊνικά καρβονύλια. Η χρήση πρωτεϊνικών καρβονυλίων (CARBs) σαν δείκτες οξείδωσης πρωτεϊνών εμφανίζει περισσότερα πλεονεκτήματα από την χρήση των TBARS , καθώς η οξείδωση των πρωτεϊνών είναι πιο σταθερή και ακριβής γιατί οι πρωτεϊνικές ομάδες κυκλοφορούν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στο αίμα των οργανισμών. (Dalle-Donne et al. 2003)

Στα C2C12 παρατηρήθηκε πτώση των CARB κατά 45,58% στα 2,5 µg/ml TPF , 14,77 % στα 5 µg/ml TPF και 13,87% στα 7 µg/ml TPF , ενώ στην συγκέντρωση 10 µg/ml TPF τα CARB αυξήθηκαν κατά 74,41 % . Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ένα μηχανισμό προ-οξειδωτικού φαινομένου, με αποτέλεσμα να οδηγούμαστε σε αύξηση της οξείδωσης των πρωτεϊνών. Τα αποτελέσματα αυτά ταυτίζονται με τα επίπεδα των TBARS που αναφέρθηκαν παραπάνω. Αν και τα επίπεδα της GSH είναι συνεχώς αυξημένα (σε σχέση με το control), στην μεγαλύτερη συγκέντρωση TPF, παρατηρείται μείωση της κυτταρικής άμυνας , που επιβεβαιώνεται από την αύξηση της λιπιδιακής υπεροξείδωσης και της πρωτεϊνικής οξείδωσης.

Στα HepG2, τα επίπεδα των CARB εμφάνισαν μείωση σε όλες τις συγκεντρώσεις. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μείωση 1,25 % , 33,34% , και 35,91% (σε σχέση με το control) στις συγκεντρώσεις 0,5 , 1 και 1,5 µg/ml TPF. Σύμφωνα με Kim et al. τα παραπροϊόντα της λιπιδιακής υπεροξείδωσης είναι ένας από τους παράγοντες που οδηγούν σε πρωτεϊνική οξείδωση. (Kim et al. 1997) Επομένως τα μειωμένα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων ίσως οφείλονται στα μειωμένα επίπεδα των TBARS. (Kerasioti 2014).

Έπειτα από 24 ώρες χορήγησης του εκχυλίσματος στα HepG2, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση στα επίπεδα πρωτεΐνης της γ-GCLc κατά 28.99, και 7,91% σε σχέση με το control στις συγκεντρώσεις 1.0 και 1.5 µg/ml TPF, αντίστοιχα. Στα C2C12 παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση στα επίπεδα πρωτεΐνης της γ-GCLc κατά 25.92, 25.56, 31.18, 37.88% σε σχέση με το control στις συγκεντρώσεις 2,5, 5, 7,5, 10 µg/ml TPF, αντίστοιχα. Σύμφωνα με την μελέτη της Zou et al. η υδροξυτυροσόλη προκαλεί την αύξηση της γ-GCLc με αποτέλεσμα να

αυξάνει την γλουταθειόνη και οδηγεί σε μείωση του οξειδωτικού στρες. (Zou et al. 2012) Η έκφραση της γ -GCL είναι πολύ σημαντική, καθώς είναι υπεύθυνη για την διατήρηση των επιπέδων της GSH. Επίσης υπάρχουν αναφορές ότι η έκφραση της γ -GCLc, σχετίζεται με την έκφραση του Nrf2 η οποία είναι κρίσιμη για τη μεταγραφική ενεργοποίηση των αντιοξειδωτικών γονιδίων σε απόκριση στο οξειδωτικό στρες. (MAKOTO and MASAYUKI 2005) (Kawata et al. 2010)

Στην παρούσα εργασία έγινε προσδιορισμός και της αλβουμίνης. Η αλβουμίνη είναι μία αντιοξειδωτική πρωτεΐνη στα κύτταρα και συμμετέχει στην αποτοξικοποίηση και στην αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες. (Quinlan, Martin, and Evans 2005) Σύμφωνα με την western blot analysis, παρατηρήθηκε μείωση της αλβουμίνης στα C2C12 κατά 25,75% σε σύγκριση με το control στην συγκέντρωση 10 $\mu\text{g/ml}$ TPF, ενώ με την μέθοδο bromocresol green δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές. Στα HepG2 με την western blot analysis παρατηρήθηκε μείωση της τάξης των 25,3% , 16% και 22,32% στις συγκεντρώσεις 0,5 , 1,0 και 1,5 $\mu\text{g/ml}$ TPF αντίστοιχα, ενώ με την μέθοδο bromocresol green παρατηρήθηκε μείωση 7% στην συγκέντρωση 1,5 $\mu\text{g/ml}$ TPF. Οι διαφορές αυτές ίσως οφείλονται στην ευαισθησία της εκάστοτε μεθόδου. (Chang and Lovett 2011) Σε γενικές γραμμές, τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η αλβουμίνη μπορεί να οξειδωθεί, αλλά να μην εμφανίσει διμερή, καθώς μπορεί να μετατράπηκε σε σουλφινικό οξύ. (Quinlan, Martin, and Evans 2005) Επίσης , η μείωση στα HepG2 ίσως οφείλεται στο γεγονός ότι στα καρκινικά κύτταρα, όπως και στον σακχαρώδη διαβήτη προκαλούνται λειτουργικές αλλοιώσεις της αλβουμίνης. (Roche et al. 2008)

Συνοπτικά, είδαμε αύξηση της γλουταθειόνης και της καταλυτικής της υπομονάδας, και μείωση οξείδωσης λιπιδίων και πρωτεϊνών, ενώ μείωση ROS παρατηρήθηκε μόνο στα HepG2.

Συμπερασματικά, το εκχύλισμα ελαιολάδου της παρούσας μελέτης φάνηκε να προστατεύει τα κύτταρα από το οξειδωτικό στρες, εξαιτίας της ισχυρής αντιοξειδωτικής δράσης των πολυφαινολών του. Αυτό θα μπορούσε να έχει ενδιαφέρουσες προεκτάσεις, για την ανάπτυξη νέων προϊόντων που να βασίζονται στο συγκεκριμένο ελαιόλαδο, ώστε να προσφέρουν προστασία και θεραπεία ενάντια των βλαβερών δράσεων των ελευθέρων ριζών.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Παπαγαλάνης, Ν. 2014. “Οξειδωτικό Στρες Και Ενδογενές Αντιοξειδωτικό Σύστημα I. Δραστικές Ρίζες Οξυγόνου” 26 (3): 151–94.
- Adlercreutz, Herman. 2007. “Lignans and Human Health.” *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 44 (5–6). United States: 483–525. doi:10.1080/10408360701612942.
- Beauchamp, Gary K., Russell S. J. Keast, Diane Morel, Jianming Lin, Jana Pika, Qiang Han, Chi-Ho Lee, Amos B. Smith, and Paul A. S. Breslin. 2005. “Phytochemistry: Ibuprofen-like Activity in Extra-Virgin Olive Oil.” *Nature* 437 (7055): 45–46. doi:10.1038/437045a.
- Blokhina, Olga, Eija Virolainen, and Kurt V. Fagerstedt. 2003. “Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: A Review.” *Annals of Botany*. doi:10.1093/aob/mcf118.
- Bouayed, Jaouad, and Torsten Bohn. 2010. “Exogenous Antioxidants—Double-Edged Swords in Cellular Redox State: Health Beneficial Effects at Physiologic Doses versus Deleterious Effects at High Doses.” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 3 (4): 228–37. doi:10.4161/oxim.3.4.12858.
- Chang, Ming-Mei, and Janice Lovett. 2011. “A Laboratory Exercise Illustrating the Sensitivity and Specificity of Western Blot Analysis.” *Biochemistry and Molecular Biology Education : A Bimonthly Publication of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* 39 (4): 291–97. doi:10.1002/bmb.20501.
- Costantini, S., G. Di Bernardo, M. Cammarota, G. Castello, and G. Colonna. 2013. “Gene Expression Signature of Human HepG2 Cell Line.” *Gene* 518 (2): 335–45. doi:10.1016/j.gene.2012.12.106.
- D’Archivio, Massimo, Carmelina Filesi, Rosaria Vari, Beatrice Scaccocchio, and Roberta Masella. 2010. “Bioavailability of the Polyphenols: Status and Controversies.” *International Journal of Molecular Sciences* 11 (4). Switzerland: 1321–42. doi:10.3390/ijms11041321.
- Dalle-Donne, Isabella, Ranieri Rossi, Daniela Giustarini, Aldo Milzani, and Roberto Colombo. 2003. “Protein Carbonyl Groups as Biomarkers of Oxidative Stress.” *Clinica Chimica Acta*. doi:10.1016/S0009-8981(03)00003-2.
- El, Sedef N., and Sibel Karakaya. 2009. “Olive Tree (*Olea Europaea*) Leaves: Potential Beneficial Effects on Human Health.” *Nutrition Reviews*. doi:10.1111/j.1753-4887.2009.00248.x.
- Fitó, M, M Cladellas, R de la Torre, J Martí, D Muñoz, H Schröder, M Alcántara, et al. 2008. “Anti-Inflammatory Effect of Virgin Olive Oil in Stable Coronary Disease Patients: A Randomized, Crossover, Controlled Trial.” *European Journal of Clinical Nutrition* 62 (4): 570–74. doi:10.1038/sj.ejcn.1602724.
- Franklin, Christopher C, Donald S Backos, Isaac Mohar, Collin C White, Henry J

- Forman, and Terrance J Kavanagh. 2009. "Structure, Function, and Post-Translational Regulation of the Catalytic and Modifier Subunits of Glutamate Cysteine Ligase." *Molecular Aspects of Medicine* 30 (1–2). England: 86–98. doi:10.1016/j.mam.2008.08.009.
- Gomes, Marco D R, Ana M Costa Freitas, Maria J B Cabrita, and Raquel Garcia. 2012. "Olive Oil Composition : Volatile Compounds." *Olive Oil - Constituents, Quality, Health Properties and Bioconversions*, 510. doi:10.5772/1378.
- Goutzourelas, N., D. Stagos, N. Demertzis, P. Mavridou, H. Karterolioti, S. Georgadakis, E. Kerasiote, et al. 2014. "Effects of Polyphenolic Grape Extract on the Oxidative Status of Muscle and Endothelial Cells." *Human & Experimental Toxicology* 33 (11): 1099–1112. doi:10.1177/0960327114533575.
- Goutzourelas, Nikolaos, Dimitrios Stagos, Ypatios Spanidis, Maria Liosi, Anna Apostolou, Alexandros Priftis, Serko Haroutounian, Demetrios A. Spandidos, Aristidis M. Tsatsakis, and Demetrios Kouretas. 2015. "Polyphenolic Composition of Grape Stem Extracts Affects Antioxidant Activity in Endothelial and Muscle Cells." *Molecular Medicine Reports* 12 (4): 5846–56. doi:10.3892/mmr.2015.4216.
- Halliwell, Barry, and John M.C. Gutteridge. 1990. "Role of Free Radicals and Catalytic Metal Ions in Human Disease: An Overview." *Methods in Enzymology* 186 (C): 1–85. doi:10.1016/0076-6879(90)86093-B.
- Han, Xiuzhen, Tao Shen, and Hongxiang Lou. 2007. "Dietary Polyphenols and Their Biological Significance" 2: 950–88.
- Harnly, James M, Robert F Doherty, Gary R Beecher, Joanne M Holden, David B Haytowitz, Seema Bhagwat, and Susan Gebhardt. 2006. "Flavonoid Content of U.S. Fruits, Vegetables, and Nuts." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (26). United States: 9966–77. doi:10.1021/jf061478a.
- Kawata, K, Y Kobayashi, K Souda, K Kawamura, S Sumiyoshi, Y Takahashi, H Noritake, S Watanabe, T Suehiro, and H Nakamura. 2010. "Enhanced Hepatic Nrf2 Activation after Ursodeoxycholic Acid Treatment in Patients with Primary Biliary Cirrhosis." *Antioxid Redox Signal* 13 (3): 259–68. doi:10.1089/ars.2009.2903.
- Kerasiote, Efthalia. 2014. "Επίδραση Της Χορήγησης Σκευάσματος Υδατανθράκων-Πρωτεϊνών Σε Δείκτες Οξειδωτικού Στρες, Φλεγμονής Και Υποξίας Μετά Από Άσκηση Σε Ανθρώπους." University of Thessaly.
- Kerasiote, Efthalia, Dimitrios Stagos, Alexandros Priftis, Stefanos Aivazidis, Aristidis M. Tsatsakis, A. Wallace Hayes, and Demetrios Kouretas. 2014. "Antioxidant Effects of Whey Protein on Muscle C2C12 Cells." *Food Chemistry* 155: 271–78. doi:10.1016/j.foodchem.2014.01.066.
- Kerksick, Chad, and Darryn Willoughby. 2005. "The Antioxidant Role of Glutathione and N-Acetyl-Cysteine Supplements and Exercise-Induced Oxidative Stress." *Journal of the International Society of Sports Nutrition* 2 (2): 38–44. doi:10.1186/1550-2783-2-2-38.

- Ketterer, B., and D. J. Meyer. 1989. "Glutathione Transferases: A Possible Role in the Detoxication and Repair of DNA and Lipid Hydroperoxides." *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 214 (1): 33–40. doi:10.1016/0027-5107(89)90195-4.
- Kim, Jong G., Fadi Sabbagh, Nalini Santanam, Josiah N. Wilcox, Russell M. Medford, and Sampath Parthasarathy. 1997. "Generation of a Polyclonal Antibody against Lipid Peroxide-Modified Proteins." *Free Radical Biology and Medicine* 23 (2): 251–59. doi:10.1016/S0891-5849(96)00615-6.
- Kiritsakis, A, A Kanavouras, and K Kiritsakis. 2002. "Chemical Analysis, Quality Control and Packaging Issues of Olive Oil." *European Journal of Lipid Science and Technology* 104 (9–10): 628–38.
- Krinsky, Norman I. 2002. "Possible Biologic Mechanisms for a Protective Role of Xanthophylls." *The Journal of Nutrition* 132 (3): 540S–542S. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11880589>.
- MAKOTO, KOBAYASHI, and YAMAMOTO MASAYUKI. 2005. "Molecular Mechanisms Activating the Nrf2-Keap1 Pathway of Antioxidant Gene Regulation." *ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING* 7 (68): 385–94. doi:10.1089/ars.2005.7.385.
- Manach, Claudine, Augustin Scalbert, Christine Morand, Christian Remesy, and Liliana Jimenez. 2004a. "Polyphenols: Food Sources and Bioavailability." *The American Journal of Clinical Nutrition* 79 (5). United States: 727–47.
- Manach, Claudine, Gary Williamson, Christine Morand, Augustin Scalbert, and Christian Remesy. 2005. "Bioavailability and Bioefficacy of Polyphenols in Humans. I. Review of 97 Bioavailability Studies." *The American Journal of Clinical Nutrition* 81 (1 Suppl). United States: 230S–242S.
- Maurya, Dharmendra Kumar, and Thomas Paul Asir Devasagayam. 2010. "Antioxidant and Prooxidant Nature of Hydroxycinnamic Acid Derivatives Ferulic and Caffeic Acids." *Food and Chemical Toxicology* 48 (12): 3369–73. doi:10.1016/j.fct.2010.09.006.
- Medina, Eduardo, Antonio De Castro, Concepcion Romero, and Manuel Brenes. 2006. "Comparison of the Concentrations of Phenolic Compounds in Olive Oils and Other Plant Oils: Correlation with Antimicrobial Activity." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (14): 4954–61. doi:10.1021/jf0602267.
- Meister, Alton, and Mary E Anderson. 1983. "Glutathione." *Annual Review of Biochemistry* 52: 711–60. doi:10.1146/annurev.bi.52.070183.003431.
- Mennen, Louise I., Ron Walker, Catherine Bennetau-Pelissero, and Augustin Scalbert. 2005. "Risks and Safety of Polyphenol Consumption." *The American Journal of Clinical Nutrition*. doi:81/1/326S [pii].
- Pampaloni, Barbara, Carmelo Mavilia, Sergio Fabbri, Annalisa Romani, Francesca Ieri, Annalisa Tanini, Francesco Tonelli, and Maria Luisa Brandi. 2014. "In

- Vitro Effects of Extracts of Extra Virgin Olive Oil on Human Colon Cancer Cells.” *Nutrition and Cancer* 667: 1228–36. doi:10.1080/01635581.2014.951727.
- Panagiotopoulou, P. M., and M. Tsimidou. 2007. “Solid Phase Extraction: Applications to the Chromatographic Analysis of Vegetable Oils and Fats.” *Grasas Y Aceites* 53 (1): 84–95. doi:10.3989/gya.2002.v53.i1.292.
- Pandey, Kanti Bhooshan, and Syed Ibrahim Rizvi. 2009. “Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and Disease.” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2 (5): 270–78. doi:10.4161/oxim.2.5.9498.
- Pani, Giovambattista, Tommaso Galeotti, and Paola Chiarugi. 2010. “Metastasis: Cancer Cell’s Escape from Oxidative Stress.” *Cancer and Metastasis Reviews*. doi:10.1007/s10555-010-9225-4.
- Pastor, Antoni, Jose Rodríguez-Morató, Eulàlia Olesti, Mitona Pujadas, Clara Pérez-Mañá, Olha Khymenets, Montserrat Fitó, et al. 2016. “Analysis of Free Hydroxytyrosol in Human Plasma Following the Administration of Olive Oil.” *Journal of Chromatography A* 1437: 183–90. doi:10.1016/j.chroma.2016.02.016.
- Pereira-Caro, Gema, Beatriz Sarriá, Andrés Madrona, José Luis Espartero, Luis Goya, Laura Bravo, and Raquel Mateos. 2011. “Alkyl Hydroxytyrosyl Ethers Show Protective Effects against Oxidative Stress in HepG2 Cells.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59 (11): 5964–76. doi:10.1021/jf2002415.
- Pisoschi, Aurelia Magdalena, and Aneta Pop. 2015. “The Role of Antioxidants in the Chemistry of Oxidative Stress: A Review.” *European Journal of Medicinal Chemistry* 97: 55–74. doi:10.1016/j.ejmech.2015.04.040.
- Pliszka, Barbara, Grazyna Huszcza-Ciołkowska, and Elwira Wierzbicka. 2016. “Effects of Solvents and Extraction Methods on the Content and Antiradical Activity of Polyphenols from Fruits *Actinidia Arguta*, *Crataegus Monogyna*, *Gaultheria Procumbens* and *Schisandra Chinensis*.” *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria* 15 (1): 57–63. doi:10.17306/J.AFS.2016.1.6.
- Poljsak, B. 2011. “Strategies for Reducing or Preventing the Generation of Oxidative Stress.” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. doi:10.1155/2011/194586.
- Priftis, Alexandros, Dimitrios Stagos, Konstantinos Konstantinopoulos, Christina Tsitsimpikou, Demetrios A. Spandidos, Aristides M. Tsatsakis, Manolis N. Tzatzarakis, and Demetrios Kouretas. 2015. “Comparison of Antioxidant Activity between Green and Roasted Coffee Beans Using Molecular Methods.” *Molecular Medicine Reports* 12 (5): 7293–7302. doi:10.3892/mmr.2015.4377.
- Procházková, D., I. Boušová, and N. Wilhelmová. 2011. “Antioxidant and Prooxidant Properties of Flavonoids.” *Fitoterapia*. doi:10.1016/j.fitote.2011.01.018.
- Qosa, Hisham, Yazan S. Batarseh, Mohamed M. Mohyeldin, Khalid A. El Sayed, Jeffrey N. Keller, and Amal Kaddoumi. 2015. “Oleocanthal Enhances Amyloid- β Clearance from the Brains of TgSwDI Mice and in Vitro across a Human Blood-Brain Barrier Model.” *ACS Chemical Neuroscience* 6 (11): 1849–59.

doi:10.1021/acscchemneuro.5b00190.

- Quideau, Stephane, Denis Deffieux, Celine Douat-Casassus, and Laurent Pouysegu. 2011. "Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis." *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* 50 (3). Germany: 586–621. doi:10.1002/anie.201000044.
- Quinlan, Gregory J, Greg S Martin, and Timothy W Evans. 2005. "Albumin: Biochemical Properties and Therapeutic Potential." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 41: 1211–19. doi:10.1002/hep.20720.
- Raederstorff, Daniel, Adrian Wyss, Philip C Calder, Peter Weber, and Manfred Eggersdorfer. 2015. "Vitamin E Function and Requirements in Relation to PUFA." *The British Journal of Nutrition* 114 (8): 1113–22. doi:10.1017/S000711451500272X.
- Rahal, Anu, Amit Kumar, Vivek Singh, Brijesh Yadav, Ruchi Tiwari, Sandip Chakraborty, and Kuldeep Dhama. 2014. "Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay." *BioMed Research International*. doi:10.1155/2014/761264.
- Roche, Marjolaine, Philippe Rondeau, Nihar Ranjan Singh, Evelyne Tarnus, and Emmanuel Bourdon. 2008. "The Antioxidant Properties of Serum Albumin." *FEBS Letters*. doi:10.1016/j.febslet.2008.04.057.
- Rodrigo, Ramon, Matias Libuy, Felipe Feliu, and Daniel Hasson. 2014. "Polyphenolsindisease: Fromdietsupplements." *Currentpharmaceuticalbiotechnology* 15 (4): 304–17.
- Sarria, Beatriz, Raquel Mateos, Elena Gallardo, Sonia Ramos, Maria Angeles Martin, Laura Bravo, and Luis Goya. 2012. "Nitroderivatives of Olive Oil Phenols Protect HepG2 Cells against Oxidative Stress." *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 50 (10). England: 3752–58. doi:10.1016/j.fct.2012.07.030.
- Schieber, Michael, and Navdeep S. Chandel. 2014. "ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress." *Current Biology* 24 (10). Elsevier: R453–62. doi:10.1016/j.cub.2014.03.034.
- Sengupta, Archana, Samit Ghosh, and Shamee Bhattacharjee. 2004. "Allium Vegetables in Cancer Prevention: An Overview." *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 5 (3): 237–45.
- Serrelli, Gabriele, Alessandra Incani, Angela Atzeri, Alberto Angioni, Marco Campus, Emanuele Cauli, Roberto Zurru, and Monica Deiana. 2017. "Antioxidant Effect of Natural Table Olives Phenolic Extract Against Oxidative Stress and Membrane Damage in Enterocyte-Like Cells." *Journal of Food Science* 82 (2): 380–85. doi:10.1111/1750-3841.13613.
- Suzuki, Mikiko, Akihito Otsuki, Nadine Keleku-Lukwete, and Masayuki Yamamoto. 2016. "Overview of Redox Regulation by Keap1–Nrf2 System in Toxicology and Cancer." *Current Opinion in Toxicology* 1. Elsevier Ltd: 29–36. doi:10.1016/j.cotox.2016.10.001.

- Tsao, Rong. 2010. "Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols." *Nutrients* 2 (12). Switzerland: 1231–46. doi:10.3390/nu2121231.
- Valko, M., C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, and M. Mazur. 2006. "Free Radicals, Metals and Antioxidants in Oxidative Stress-Induced Cancer." *Chemico-Biological Interactions*. doi:10.1016/j.cbi.2005.12.009.
- Valko, Marian, Dieter Leibfritz, Jan Moncol, Mark T D Cronin, Milan Mazur, and Joshua Telser. 2007. "Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39 (39): 44–84. doi:10.1016/j.biocel.2006.07.001.
- Visioli, Francesco, Roswitha Wolfram, Doriane Richard, Muhammad Imran Chong B Abdullah, and Roberto Crea. 2009. "Olive Phenolics Increase Glutathione Levels in Healthy Volunteers." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (5): 1793–96. doi:10.1021/jf8034429.
- Yaffe, D, and O Saxel. 1977. "Serial Passaging and Differentiation of Myogenic Cells Isolated from Dystrophic Mouse Muscle." *Nature* 270 (5639): 725–27. doi:10.1038/270725a0.
- Yen, Gow Chin, Pin Der Duh, and Hui Ling Tsai. 2002. "Antioxidant and pro-Oxidant Properties of Ascorbic Acid and Gallic Acid." *Food Chemistry* 79 (3): 307–13. doi:10.1016/S0308-8146(02)00145-0.
- Zou, Xuan, Zhihui Feng, Yuan Li, Ying Wang, Karin Wertz, Peter Weber, Yan Fu, and Jiankang Liu. 2012. "Stimulation of GSH Synthesis to Prevent Oxidative Stress-Induced Apoptosis by Hydroxytyrosol in Human Retinal Pigment Epithelial Cells: Activation of Nrf2 and JNK-p62/SQSTM1 Pathways." *Journal of Nutritional Biochemistry* 23 (8): 994–1006. doi:10.1016/j.jnutbio.2011.05.006.