



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών σπουδών
“ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ”

Μεταπτυχιακή Μελέτη

Εκτίμηση αντιοξειδωτικής &
αντιμεταλλαξιγόνου δράσης εκχυλισμάτων
ανθών ελιάς και αγριελιάς

Τέκος Φώτιος

Λάρισα 2019

Εκτίμηση αντιοξειδωτικής & αντιμεταλλαξιγόνου δράσης εκχυλισμάτων
ανθών ελιάς και αγριελιάς

Antioxidant and antimutagenic potential of olive tree flower extract

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

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

Μαθιόπουλος Κωσταντίνος: Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

«Αν αποσυνθέσεις την Ελλάδα, στο τέλος θα δεις να σου απομένουν μια ελιά, ένα
αμπέλι κι ένα καράβι. Που σημαίνει: με άλλα τόσα την ξαναφτιάχνεις.»
Ο. Ελύτης

Ευχαριστίες



Η πτυχιακή αυτή εργασία πραγματοποιήθηκε στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο εργαστήριο φυσιολογίας ζωικών οργανισμών, από τον Μάρτιο του 2018 έως τον Δεκέμβριο του ίδιου έτους. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή κ. Κουρέτα Δημήτριο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όσον αφορά την ανάθεση αυτής της πτυχιακής εργασίας, καθώς και για τη συνεχή καθοδήγηση και ενθάρρυνση του κατά τη διάρκεια εκπόνησής της.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή Ματθιόπουλο Κωσταντίνο και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Στάγκο Δημήτριο, που δέχτηκαν να συμμετέχουν στην τριμελή επιτροπή.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα και από καρδιάς την διδάκτορα Κούκα Παρασκευή για την πολύτιμη γνώση, βοήθεια, κατανόηση, ενθάρρυνση και συμπαράστασή που μου προσέφερε στο εργαστήριο καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας, καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου -Άρη, Θάλεια, Αλέξανδρο, Άκη, Σωτηρίνα, Αναστασία, Πορφύριο, Έφη, Αποστόλη, Χριστιάννα - για τη βοήθεια τους αλλά και για τη φιλική τους διάθεση.

Θα ήταν μεγάλη παράληψη να μην ευχαριστήσω την οικογένεια μου, που με στηρίζει σε κάθε μου προσπάθεια.

Περίληψη

Τα ελαιόδεντρα για αιώνες αποτελούν πηγή τροφής (ελιές και ελαιόλαδο) και χαρακτηρίζουν την μεσογειακή διατροφή. Προσφέρουν ένα πολύ μεγάλο αριθμό πλεονεκτημάτων για την ανθρώπινη υγεία και ευεξία και χρησιμοποιούνται εκτός από διατροφή και σε φαρμακευτικά σκευάσματα. Τα άνθη ελιάς βρίσκονται σε τεράστιες ποσότητες στα δέντρα και από αυτές, ένα πολύ μικρό ποσό μετατρέπονται σε καρπό. Σκοπός της μελέτης αυτής είναι η αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής και αντιγυνοτοξικής επίδρασης εκχυλισμάτων ανθών ελιάς, ενώ η πρωτοπορία της έγκειται στο γεγονός ότι τα εκχυλίσματα αυτά δεν έχουν μελετηθεί ξανά. Πλήθος μελετών αξιολογούν το ελαιόλαδο αλλά πολύ λίγα είναι γνωστά για τα άνθη. Ο απώτερος στόχος της μελέτης αυτής είναι να εντοπιστούν τα εκχυλίσματα που παρουσιάζουν βιολειτουργικές ιδιότητες και στην συνέχεια να αξιοποιηθούν για την πιθανή δημιουργία φαρμακευτικών, διατροφικών και καλλυντικών σκευασμάτων.

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε αρχικά *in vitro* η αντιοξειδωτική δράση (μέσω της μεθόδου DPPH) τεσσάρων πολυφαινολικών εκχυλισμάτων ανθών ελαιόδεντρων Ελληνικής προέλευσης. Τα 3 εκχυλίσματα προέρχονται από 2 ποικιλίες ελιάς Κορωνέικη (EKPA) Λιανολία Κέρκυρας (KTKT, ANKT) ενώ το τέταρτο δείγμα είναι από άνθος αγριελιάς (AGRI). Παράλληλα πραγματοποιήθηκε εκτίμηση της αντιμεταλλαξιγόνου δράσεις των εκχυλισμάτων μέσω της δοκιμασίας Ames. Τέλος τα πολυφαινολικά εκχυλίσματα μελετήθηκαν και σε κυτταρικό επίπεδο και συγκεκριμένα σε τρεις ανθρώπινες κυτταρικές σειρές, τα καρκινικά κύτταρα τραχήλου μήτρας (HeLa), τα καρκινικά ηπατοκύτταρα (HepG2) και τα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα όλα τα εκχυλίσματα παρουσίασαν αντιοξειδωτική και αντιμεταλλαξιγόνου δράση ενώ κάποια εμφάνισαν ικανότητα προστατευτική για τα κύτταρα έναντι οξειδωτικής βλάβης, βελτιώνοντας τους δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης. Συγκεκριμένα αυξάνοντας την γλουταθειόνη (GSH) στα κύτταρα και μειώνοντας μερικώς τα επίπεδα δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS). Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το πιο δραστικό εκχύλισμα είναι το AGRI και ακολουθούν με σειρά δραστηριότητας τα EKPA, ANKT, KTKT.

Abstract

For centuries olive trees have been used as food (olives and olive oil) and they characterize the Mediterranean diet. They offer a great number of advantages for human health and well-being and are used for nutritional and pharmaceutical applications. Olive blossoms are in huge quantities in olive trees. Although, a minor part of blossoms is transformed into fruit. Too many studies evaluate olive oil but very little is known about the flowers. For this reason our purpose is to shed light in the potent blossoms' biological role. We try to make an holistic *in vitro* approach in order to obtain evidence that will be useful in relevant *in vivo* experimental designs, with ultimate goal to contribute to the production of potential biofunctional foods rich in blossom polyphenols.

In the present study, four polyphenolic olive oil flower extracts have been assessed *in vitro*. Specifically, one extract from the endemic olive variety Koroneiki, one from a variety of wild olives and finally, two samples from Lianolias of Corfu. The antioxidant potency of the extracts was assessed with the DPPH assay. Additionally, the antimutagenic potential of the extracts was assessed using the AMES test. Finally, the redox status of three human cell lines (HeLa, HepG2, EA.hy926), in terms of GSH and ROS, was evaluated using flow cytometry. According to the results, all extracts depicted antioxidant and antimutagenic activity. Also, some extracts were more effective to increase the endogenous GSH levels measured by flow cytometry.

Πίνακας περιεχομένων

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	12
1.1 Ιστορική Αναδρομή.....	12
1.2 Περιοχές που ευδοκμεί η ελιά	16
1.3 Παραγωγή ελιάς και ελαιολάδου και οικονομικά στοιχεία.....	18
1.4 Η ελιά	19
1.5 Άνθος ελιάς.....	21
1.6 Θερμοκρασία και ελαιόδεντρα	21
1.7 Ελεύθερες ρίζες	23
1.8 Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS).....	24
1.8.1 Δημιουργία δραστικών μορφών οξυγόνου.....	24
1.9 Οξειδωτικό στρες.....	25
1.10 Επιπτώσεις οξειδωτικού στρες στα βιομόρια	26
1.11 Αντιοξειδωτικοί παράγοντες	27
1.12 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί.....	27
1.13 Πολυφαινόλες	28
2. ΣΚΟΠΟΣ	30
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	31
3.1 Εκχυλίσματα	31
3.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της ικανότητας αναγωγής της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH•.....	33
3.3 Τεστ του AMES.....	34
3.3.1 Αρχή της μεθόδου.....	34
3.3.2 Μηχανισμός δράσης του t-BOOH.....	35
3.3.3 Μέθοδος εκτίμησης της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης των ανθέων ελιάς.....	35
3.3.4 Ποσοτικός προσδιορισμός της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης	36
3.4 Κυτταρομετρία ροής	37
3.4.1 Κυτταρική σειρά HeLa	37
3.4.2 Κυτταρική σειρά EA.hy926	38
3.4.3 Κυτταρική σειρά HepG2	38
3.4.4 Καλλιέργεια κυττάρων	39
3.4.5 Προσδιορισμός της κυτταροτοξικής δράσης του εκχυλίσματος με τη μέθοδο ΧΤΤ ..	39
3.4.6 Πειραματική διαδικασία	40
3.4.7 Προσδιορισμός των επιπέδων της GSH με κυτταρομετρία ροής.....	40
3.4.8 Προσδιορισμός των επιπέδων των ROS με κυτταρομετρία ροής	41
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	42
4.1 Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω δέσμευσης της ρίζας DPPH	42
4.2 Μέτρηση αντιμεταλλαξιγόνου δράσης με τη δοκιμή Ames.	43
4.3 Κυτταροκαλλιέργειες	43
4.3.1 Μέτρηση Κυτταροτοξικότητας με το kit ΧΤΤ.	44
4.3.2 Αποτίμηση της επίδρασης των εκχυλισμάτων ανθών ελιάς και αγριελιάς στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό των κυττάρων μέσω κυτταρομετρία ροής.....	48
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	84
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	91

Πίνακας εικόνων:

Εικόνα 1: Αγγείο 8.000 ετών που περιείχε λάδι.	12
Εικόνα 2: Αγγείο με αναπαράσταση ανθρώπων να μαζεύουν ελιές.....	13
Εικόνα 3: Ολυμπιονίκες στέφονται με στεφάνι ελιάς.....	14
Εικόνα 4: Ο Ηρακλής, η Αθηνά και η ελιά. (470 π.Χ.)	15
Εικόνα 5: Ελιές ανά τον κόσμο.....	16
Εικόνα 6: Ελιές στην Μεσόγειο.....	16
Εικόνα 7: Ελιές στον Ελλαδικό χώρο.....	17
Εικόνα 8: Ελαιώνας στις Μηλιές Πηλίου Θεσσαλίας.....	17
Εικόνα 9: Σύγκριση παραγωγής ελαιόλαδου 2017/18.....	18
Εικόνα 10: Σύγκριση τιμής στην πώληση ελαιολάδων.	19
Εικόνα 11: Συστηματική ταξινόμηση ελιάς.	19
Εικόνα 12: Τα είδη της ελιάς.....	20
Εικόνα 13: <i>Olea europaea</i> (Ευρωπαϊκή ελιά).	20
Εικόνα 14: <i>Olea sylvestris</i> , αγριελιά.....	20
Εικόνα 15: Το άνθος της ελιάς.	21
Εικόνα 16: Δημιουργία ελεύθερης ρίζας.....	23
Εικόνα 17: Δραστικές μορφές οξυγόνου.	24
Εικόνα 18: Παραγωγή ROS στα μιτοχόνδρια.....	24
Εικόνα 19: Παράγοντες που επιδρούν στον σχηματισμό ROS.	25
Εικόνα 20: Οξειδωτικό στρες.	26
Εικόνα 21: Επιπτώσεις οξειδωτικού στρες στα βιομόρια.	26
Εικόνα 22: Δράση αντιοξειδωτικών μορίων.....	27
Εικόνα 23: Κατηγορίες πολυφαινολών.	28
Εικόνα 24: Ευρωπαϊκή επιτροπή ασφάλειας τροφίμων.	29
Εικόνα 25: Χημική δομή της ένωσης DPPH• και της ένωσης.....	33
Εικόνα 26: Αλλαγή χρωμάτων του DPPH.....	33
Εικόνα 27: Μηχανισμός δράσης του t-BOOH.....	35
Εικόνα 28: Αναμενόμενα αποτελέσματα.	36
Εικόνα 29: Υδροδυναμική εστίαση του δείγματος μέσα από θάλαμο ροής.	37
Εικόνα 30: Κύτταρα HeLa όπως φαίνονται στο μικροσκόπιο.....	37
Εικόνα 31: Κύτταρα EA.hy926.....	38
Εικόνα 32: Κύτταρα HepG2.....	38
Εικόνα 33: Μετατροπή του ΧΤΤ στην αντίστοιχη φορμαζίνη.....	39
Εικόνα 34: : Το κυτταρόμετρο ροής FACScalibur του εργαστηρίου φυσιολογίας ζωικών οργανισμών όπου έγιναν οι μετρήσεις καθώς και ο υπολογιστής με το λογισμικό BD Cell Quest.	41
Εικόνα 35: Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων ανθών ελιάς μέσω δέσμευσης της ρίζας DPPH.....	42
Εικόνα 36: Αντιμεταλλαξιγόνος δράση εκχυλισμάτων ανθών ελιάς και αγριελιάς, όπως προσδιορίστηκε με τη δοκιμασία Ames.....	43
Εικόνα 37: Επίδραση AGRI στα επίπεδα GSH στην κυτταρική σειρά HepG2.....	49
Εικόνα 38: Επίδραση AGRI στα επίπεδα ROS στην κυτταρική σειρά HepG2.....	50
Εικόνα 39: Επίδραση ΕΚΡΑ στα επίπεδα GSH στην κυτταρική σειρά HepG2.....	52
Εικόνα 40: Επίδραση ΕΚΡΑ στα επίπεδα ROS στην κυτταρική σειρά HepG2.....	53

Εικόνα 41: Επίδραση ΚΤΚΤ στα επίπεδα GSH στην κυτταρική σειρά HepG2.....	55
Εικόνα 42: Επίδραση ΚΤΚΤ στα επίπεδα ROS στην κυτταρική σειρά HepG2.....	56
Εικόνα 43: Επίδραση ANKT στα επίπεδα GSH στην κυτταρική σειρά HepG2.....	58
Εικόνα 44: Επίδραση ANKT στα επίπεδα ROS στην κυτταρική σειρά HepG2.....	59
Εικόνα 45: Επίδραση AGRI στα επίπεδα GSH στην κυτταρική σειρά HeLa.....	61
Εικόνα 46: Επίδραση AGRI στα επίπεδα ROS στην κυτταρική σειρά HeLa.....	62
Εικόνα 47: Επίδραση ΕΚΡΑ στα επίπεδα GSH στην κυτταρική σειρά HeLa.....	64
Εικόνα 48: Επίδραση ΕΚΡΑ στα επίπεδα ROS στην κυτταρική σειρά HeLa.....	65
Εικόνα 49: Επίδραση ΚΤΚΤ στα επίπεδα GSH στην κυτταρική σειρά HeLa.....	67
Εικόνα 50: Επίδραση ΚΤΚΤ στα επίπεδα ROS στην κυτταρική σειρά HeLa.....	68
Εικόνα 51: Επίδραση ANKT στα επίπεδα GSH στην κυτταρική σειρά HeLa.....	70
Εικόνα 52: Επίδραση ANKT στα επίπεδα ROS στην κυτταρική σειρά HeLa.....	71
Εικόνα 53: Επίδραση AGRI στα επίπεδα GSH στην κυτταρική σειρά EA.hy926.....	73
Εικόνα 54: Επίδραση AGRI στα επίπεδα ROS στην κυτταρική σειρά EA.hy926.....	74
Εικόνα 55: Επίδραση ΕΚΡΑ στα επίπεδα GSH στην κυτταρική σειρά EA.hy926.....	76
Εικόνα 56: Επίδραση ΕΚΡΑ στα επίπεδα ROS στην κυτταρική σειρά EA.hy926.....	77
Εικόνα 57: Επίδραση ΚΤΚΤ στα επίπεδα GSH στην κυτταρική σειρά EA.hy926.....	79
Εικόνα 58: Επίδραση ΚΤΚΤ στα επίπεδα ROS στην κυτταρική σειρά EA.hy926.....	80
Εικόνα 59: Επίδραση ANKT στα επίπεδα GSH στην κυτταρική σειρά EA.hy926.....	82
Εικόνα 60: Επίδραση ANKT στα επίπεδα ROS στην κυτταρική σειρά EA.hy926.....	83

Πίνακες:

Πίνακας 1: Παγκόσμια παραγωγή ελαιολάδου.....	- 18 -
Πίνακας 2: Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί.....	- 27 -
Πίνακας 3: Καλλιέργεια κυττάρων.....	- 39 -
Πίνακας 4: Στον πίνακα παρουσιάζονται συνολικά όλες οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για να γίνει έλεγχος στη βιωσιμότητα των κυττάρων (στήλη 3).....	44

Κωστής Παλαμάς

Η ελιά

Είμαι του ήλιου η θυγατέρα
Η πιο απ' όλες χαϊδευτή
Χρόνια η αγάπη του πατέρα
Σ' αυτό τον κόσμο με κρατεί
Όσο να πέσω νεκρωμένη
Αυτόν το μάτι μου ζητεί.
Είμ' η ελιά η τιμημένη

Όπου και αν λάχει κατοικία
Δε μ' απολείπουν οι καρποί.
Ως τα βαθιά μου γηρατειά,
Δεν βρίσκω στην δουλειά ντροπή.
Μ' έχει ο θεός ευλογημένη,
Και είμαι γεμάτη προκοπή.
Είμ' η ελιά η τιμημένη.

Εδώ στον ίσκιο μου μ' αποκάτω
Έρθ' ο Χριστός να αναπαυθεί
Κι ακούστηκ' η γλυκιά λαλιά του
Λίγο προτού να σταυρωθεί.
Το δάκρυ του, δροσιά αγιασμένη,
Έχει 'ς τη ρίζα μου χυθεί.
Είμ' η ελιά η τιμημένη.

Και φως πράστατο χαρίζω
Εγώ στην άγρια τη νύχτα.
Τον πλούτο πα δεν τον φωτίζω,
Συ μ' ευλογείς φτωχολογιά.
Κι αν απ' τον άνθρωπο διωγμένη,
Με φέγγω μπρος στην Παναγιά.
Είμ' η ελιά η τιμημένη.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ιστορική Αναδρομή



Εικόνα 1: Αγγείο 8.000 ετών που περιείχε λάδι.

Ανασκαφές που πραγματοποιήθηκαν κοντά στην αρχαιολογική περιοχή Ein Zirroni, που βρίσκεται 2 χλμ. μακριά από την αρχαία πόλη της Σεπφώρις, βόρεια της πόλης Ναζαρέτ, εντοπίστηκε τυχαία οικισμός της Χαλκολιθικής περιόδου, όπου ανακαλύφθηκαν ίχνη από ελαιόλαδο μέσα σε πιθάρια εκείνης της εποχής. Τα ευρήματα αυτά αποδεικνύουν πως το ελαιόλαδο ήδη χρησιμοποιούταν την 6 χιλιετία π.Χ. Τα στοιχεία αυτά αποτελούν την παλαιότερη απόδειξη χρήσης του ελαιολάδου στο Ισραήλ, στην Μέση Ανατολή και πιθανώς σε ολόκληρο τον πλανήτη. Η αρχαιολογική υπηρεσία διενέργησε ανασκαφές από το 2011 έως και 2013 με τα αποτελέσματα της έρευνας να καταλήγουν στο ασφαλές συμπέρασμα πως γινόταν παραγωγή ελαιόλαδου από το 4.000 π.Χ., ωστόσο τα είδη της ελιάς δεν έχουν προσδιοριστεί ακόμη. Φαίνεται λοιπόν πως πριν 8.000 χρόνια ο πολιτισμός της Ανατολής βρισκόταν στο 2^ο στάδιο αξιοποίησης της χλωρίδας. Το 1^ο στάδιο αφορά την καλλιέργεια φακής και σιτηρών, η οποία είχε αρχίσει πριν από 10.000 χρόνια. Το δέντρο της ελιάς ανήκει στο δεύτερο στάδιο. Τέλος αξίζει να αναφερθεί πως υπάρχουν πολλά στοιχεία που πιστοποιούν την ύπαρξη ελιάς στο 1^ο στάδιο, αλλά ακόμα δεν έχουν βρεθεί ίχνη παραγωγής ελαιόλαδου εκείνης της εποχής (1^α,85).

Η ιστορία της ελιάς ανά τους λαούς και την Ελλάδα

Η ελιά έχει τόσο μεγάλη ιστορία που αγγίζει την αρχή των οργανωμένων ανθρώπινων κοινωνιών. Αμέτρητα χειρόγραφα, παραδόσεις και μύθοι στους διάφορους λαούς, στοιχεία ανασκαφών και άλλα πολλά που επιβεβαιώνουν τη σχέση της ελιάς και του ανθρώπου πάνω στον πλανήτη μας. Τμήματα από κλαδιά ελιάς έχουν ανακαλυφθεί σε τάφους Φαραώ στην Αίγυπτο ενώ παράλληλα η καλλιέργειά της αναλύεται σε παπύρους της περιόδου που έχουν χρονολογηθεί με σύγχρονες μεθόδους στο 1550 π.Χ περίπου. Οι Εβραίοι είχαν την ελιά ως σύμβολο ειρήνης και το λάδι ελιάς ιερό καθώς με αυτό έχριζαν του βασιλιάδες τους (κεχρισμένοι). Οι καρποί της Ελιάς ήταν βρίσκονται στα αγαθά που ο Θεός υποσχέθηκε πως θα έχει ο λαός του Ισραήλ όταν φτάσουν στη “Γη Χαναάν, τη Γη της Επαγγελίας”, πολλά χρόνια πριν από το 1550 π.Χ.

Στον ελλαδικό χώρο όπως μηνύει ο μύθος, η ελιά αποτέλεσε το δώρο της θεάς Αθηνάς στους Αθηναίους, οι οποίοι αποφάσισαν να δώσουν το όνομα της πόλης τους

στην θεά η οποία τους δίδαξε και την καλλιέργειά της. Ο αιώνιος μύθος εξιστορεί την διαμάχη του Θεού Ποσειδώνα και της Θεάς Αθηνάς για το όνομα της πόλης. Στον Παρθενώνα υπήρχε η “ιερή ελιά” της Αθηνάς, η 1^η ελιά που η Θεά χάρισε στους κατοίκους, στην Ακαδημία οι 12 “ιερές ελιές”, καθώς και ο “ιερός ελαιώνας” από τον οποίο προερχόταν το λάδι που έπερναν ως έπαθλο οι νικητές των Παναθηναίων. Απόδειξη της μεγάλης σημασίας για τους Αθηναίους της ελιάς αποτελεί η ανακάλυψη νομισμάτων τους όπου απεικονίζεται η Θεά με στεφάνι ελιάς και έναν αμφορέα με λάδι ή κλαδί από ελιά. Άλλος μύθος που περιπλέκει τον Ηρακλή (του οποίου το ρόπαλο ήταν από αγριελιά) να φέρει βλαστάρι ελιάς από τις χώρες των Υπερβορείων (μυθικός λαός όπου οι Έλληνες πίστευαν ότι κατοικούσε πέρα από τον Βορρά ή στον ουρανό) και το φύτεψε στην Ολυμπία. Με τα κλαδιά της αγριελιάς αυτής, στεφανώνονταν οι ολυμπιονίκες. Με κλαδιά ελιάς ήταν στεφανωμένο και το χρυσελεφάντινο άγαλμα του Διός στην Ολυμπία, έργο του Φειδία, ένα από τα επτά θαύματα του αρχαίου κόσμου(2,3,86).

Πληθώρα ελληνικών χειρόγραφων αναφέρουν την ελιά και τον ευεργετικό της ρόλο. Η καλλιέργεια της ελιάς υπολογίζεται ότι ξεκίνησε πριν από 8.000 χρόνια όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Την περίοδο εκείνη τα δέντρα της ελιάς υπήρχαν αλλά ως μία πρωτόγονη μορφή της ελιάς που γνωρίζουμε σήμερα. 5.000 χρόνια πριν η καλλιέργεια των ελαιόδεντρων στην Κρήτη έγινε καθημερινότητα και ξεκίνησε να έχει σημαντικό μερίδιο στην οικονομία του νησιού. Ο λαός της Κρήτης έγινε ο πρώτος εξαγωγέας λαδιού στην ιστορία της ανθρωπότητας, τόσο στην ενδοχώρα της Ελλάδας όσο και στην Αφρική και τη Μέση Ανατολή δηλαδή όλων τον γνωστό μέχρι τότε κόσμο. Οι Αθηναίοι θεωρούνταν απ’ όλο τον αρχαίο πολιτισμό ως η «Μητρόπολις των καρπών». Οι ελιές για την Δημοκρατία της Αθήνας ήταν ιερά δέντρα τα οποία προέρχονταν από την ελιά που φύτεψε η Θεά Αθηνά στον Παρθενώνα. Προστάτης των ιερών δέντρων ήταν ο Δίας, “ο πατέρας των θεών και των ανθρώπων”. Η παράδοση αυτή αποτέλεσε αρχή για τον άρρηκτο δεσμό των κατοίκων της πόλης με το θεοδοσμένο αυτό δέντρο αλλά και τον μύθο της εποχής που έλεγε ότι πουθενά αλλού στον τότε γνωστό πλανήτη δε φυτρώνει η ελιά. Αυτό φαίνεται και στα λόγια του Σοφοκλή:



Εικόνα 2: Αγγείο με αναπαράσταση ανθρώπων να μαζεύουν ελιές.

« Κι είν’ ακόμα εδώ τέτοιο, που εγώ πουθενά αλλού παρόμοιο δέντρο δεν ακούω να βλάστησε ποτέ ουδέ στις χώρες της Ασίας, ουδέ στο μεγάλο του Πέλοπα δώριο νησί, ανέγγιχτο αυτοφύτρωτο δέντρο τρόμος και φόβος στα κοντάρια του εχθρού που ανθίζει πιο παρ’ όπου αλλού σ’ αυτή τη χώρα: η σταχτόχλωρη ελιά η παιδοτρόφα, που ποτέ κανείς ή νέος ή γηραιός με χέρι εχθρικό θα μπορέσει ν’ αφανίσει, γιατί απάνω της πάντ’ ανοιχτά ο Μόριος Δίας κι η γλαυκόφθαλμη Αθηνά έχουν τα μάτια.»

Μεγάλος αριθμός Έλλληνων φιλόσοφων της κλασσικής εποχής, όπως ο Διοκλής, ο Διοσκουρίδης, ο Εμπεδοκλής και ο Αναξαγόρας μελέτησαν τις θεραπευτικές ιδιότητες του ελαιόλαδου. Ο Αριστοτέλης μίλησε για την επιστήμη της ελαιοπαραγωγής, ενώ ο μεγάλος νομοθέτης Σόλων, εισήγαγε νομοθεσία που αφορά την προστασία των ελαιοπαραγωγών απαγορεύοντας το κόψιμο πάνω από δύο ελαιόδεντρων το χρόνο από τους αθηναϊκούς ελαιώνες. Είναι πολύ πιθανό να συνέβη με την ελιά εκείνο που γινόταν με τα διάσημα άτομα ή πράγματα της αρχαιότητας: Πολλές πόλεις προσπαθούσαν να διεκδικήσουν την καταγωγή τους. Επειδή πολλές περιοχές διεκδικούσαν τη καταγωγή της Θεάς Αθηνάς, βέβαιο ήταν να διεκδικούν και το ιερό της δέντρο. Η ελιά της Θεάς είναι καλλιεργήσιμη, γεγονός που σηματοδοτεί την εξέλιξη του πολιτισμού. Το προηγούμενο ιερό δέντρο, ήταν άγριο. Πρόκειται για την αγριελιά της Ολυμπίας που αναφέρθηκε παραπάνω, όπου σύμφωνα με το μύθο αποτελεί την εγκατάλειψη της νομαδικής ζωής. Και στα 2 στάδια του πολιτισμού η ελιά παίζει καθοριστικό ρόλο ως το δέντρο που συμβάλλει στη εξέλιξη του ανθρώπου από τροφосуλλέκτη σε γεωργό, δηλαδή στη μόνιμη εγκατάσταση και την ενασχόληση με την καλλιέργεια της γης. Η Αθήνα είχε μετατραπεί σε ένα από τα μεγαλύτερα και σπουδαιότερα κέντρα ελαιοπαραγωγής σε ολόκληρη τη Μεσόγειο και τον γνωστό κόσμο(2^α,3^α,4^α,2,3).



Εικόνα 3: Ολυμπιονίκες στέφονται με στεφάνι ελιάς.

Ελιά, σύμβολο της αρχαίας Ελλάδας. Ελαιόλαδο, αγαθό προερχόμενο από τους Θεούς. Χρησιμοποιούνταν τόσο για τις θρεπτικές του ικανότητες όσο και για θεραπευτικούς σκοπούς. Από τον 7^ο έως και τον

3^ο αιώνα π.Χ. φυσικοί, φιλόσοφοι καθώς και ιστορικοί υπογράμμισαν τις βοτανικές ιδιότητες του ελαιόλαδου. Η σημασία της ελιάς σε κοινωνικό και οικονομικό επίπεδο εισχώρησε σε όλους τους τομείς της ζωής του αρχαίου κόσμου. Το κλαδί της ελιάς ήταν βραβείο στους Ολυμπιακούς αγώνες, με αρχή το 776 π.Χ. όπου ξεκίνησε να συμβολίζει την ειρήνη και την υποχρεωτική ανακωχή από εχθροπραξίες στην αρχαιότητα, σε όλο τον κόσμο, κατά τη διάρκεια των Αγώνων.

Στην Κρήτη οι ελιές καλλιεργούνται από την Μινωική κιόλας εποχή. Ζωγραφισμένες εικόνες δέντρων ελιάς που υπάρχουν στο παλάτι της Κνωσού καταδεικνύουν ότι άνθρωποι εκείνης της εποχής τρέφονταν με ελιές και χρησιμοποιούσαν το λάδι στο φαγητό καθώς και ως καύσιμο για τις λυχνίες τους. Οι αρχαιολόγοι είναι σε θέση να γνωρίζουν ότι η μεγάλη οικονομική ανάπτυξη του Μινωικού πολιτισμού οφείλεται στο εμπόριο του κρητικού ελαίου το οποίο εκείνη τη περίοδο είχε πολύ μεγάλη απήχηση. Χωρίς καμία αμφιβολία, πριν αρχίσει η

καλλιέργεια των συγκεκριμένων δέντρων στην Κρήτη αλλά και ολόκληρη την Ελλάδα, οι άνθρωποι ήταν πολύ φτωχοί.

Είναι αξιοσημείωτο ότι τα μεγάλα πήλινα αγγεία, γνωστά ως δοχεία, στα οποία συντηρούσαν το Μινωικό λάδι, διατηρούνται έως σήμερα στην αρχαία Κνωσό και τη Φαιστό. Πολλά από αυτά τα αγγεία υπάρχουν και στο μουσείο του Ηρακλείου. Στο παλάτι της αρχαίας Φαιστού, διατηρούνται τμήματα από ελαιοτριβείο το οποίο χρησιμοποιούνταν για την εξαγωγή ελαιολάδου (86,87).



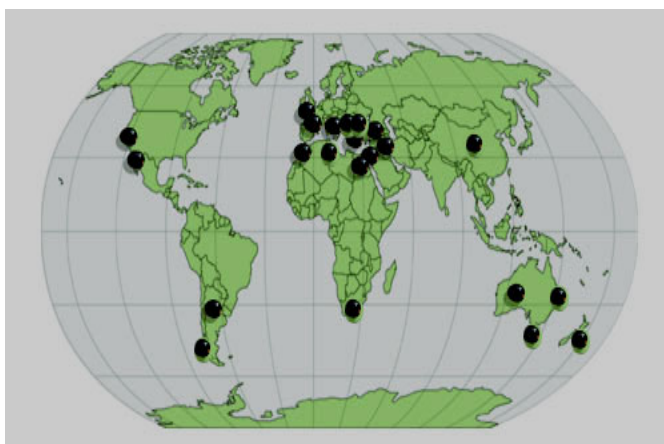
Εικόνα 4: Ο Ηρακλής, η Αθηνά και η ελιά. (470 π.Χ.)

Η σύνδεση των ελιών με τη διατροφική κουλτούρα και τη θρησκευτική λατρεία κάνει ακόμα πιο ξεκάθαρο το φαινόμενο που συναντούμε, για πολλούς αιώνες, στους Μινωικούς τάφους, όπου δίπλα στις θαμμένες σωρούς των Κρητών εντοπίζονται βρώσιμες ελιές. Ένα προϊόν τόσο απαραίτητο για τις ανάγκες της ζωής που δεν μπορούσε παρά να είναι χρήσιμο για αυτούς που ξεκινούσαν το μεγάλο ταξίδι. Το ελαιόδενδρο και ο ρόλος του στην οικονομία, διατροφή και θρησκευτική λατρεία αποτυπώνεται παραστατικά στη Μινωική και Μυκηναϊκή τέχνη. Οι άνθρωποι έφτιαχναν χρυσά κοσμήματα σε σχήμα φύλλων ελιάς, τα οποία εντοπίζονται

στους τάφους. Επίσης το κλαδί ελιάς που βλέπουμε στο στέμμα των Κροκοσυλλέκτριων στην τοιχογραφία της Ακρόπολης της Σαντορίνης είναι εντυπωσιακό. Επιπροσθέτως, το ελαιόδενδρο αποτυπώνεται στην υπέροχη σαρκοφάγο της Αγίας Τριάδας και βρίσκεται μέσα στον ιερό ναό, τα ελαιόδενδρα ακόμα είναι ορατά σε ένα πλήθος αναπαραστάσεων της Μυκηναϊκής περιόδου. Η Κρήτη συνεχίζει να προσελκύει το ενδιαφέρον όλων εκείνων που ασχολούνται με την προέλευση και εξέλιξη του ελαιόδένδρου στην περιοχή της Ελλάδας και της Μεσογείου(2^α,3^α,4^α,3,4).

1.2 Περιοχές που ευδοκimei η ελιά

Η ελιά όπως φαίνεται στην εικόνα 5 ευδοκimei σε διάφορες περιοχές του πλανήτη, σε 6 από τις 7 ηπείρους και συνολικά σε περίπου 20 χώρες (με την μεγαλύτερη παραγωγή) και συνολικά σε 57 χώρες του κόσμου. Στην Αφρική βρίσκουμε ελιές στην Αλγερία, την Αίγυπτο, την Λιβύη, το Μαρόκο και την Τυνησία. Στην Ασία εντοπίζονται στην Κίνα, την Κύπρο, το Ισραήλ, την Ιορδανία, το Λίβανο, την Συρία και την Τουρκία.



Εικόνα 5: Ελιές ανά τον κόσμο.

Στην Ωκεανία ελιές υπάρχουν στην Αυστραλία και την Νέα Ζηλανδία. Στην Ευρωπαϊκή ήπειρο ελιές συναντάμε στην Ελλάδα, την Ισπανία, την Ιταλία, Πορτογαλία, Γαλλία, Κροατία, Σλοβενία, Βουλγαρία, Αλβανία και στο Μαυροβούνιο. Στην Αμερική έχουμε ελιές στην Καλιφόρνια και το Μεξικό για την Βόρεια Αμερική και στην αργεντινή και την Χιλή για την Νότιο Αμερική(4,5^α).

Στην Περιοχή της Μεσογείου συγκεντρώνετε η μεγαλύτερη ποσότητα ελαιόδεντρων σε σχέση με τον υπόλοιπο κόσμο. Το μεσογειακό κλίμα χαρακτηρίζεται από υγρούς, ήπιους χειμώνες και μεγάλα, θερμά, ξηρά καλοκαίρια. Το μεγαλύτερο μέρος των ετήσιων βροχοπτώσεων σημειώνεται το χειμώνα και οι μήνες ξηρασίας μπορεί να είναι πολλοί, με την εξαίρεση θερινών καταιγίδων. Λόγω της παρατεταμένης καλοκαιρινής ξηρασίας οι πυρκαγιές είναι, επίσης, χαρακτηριστικό φαινόμενο του μεσογειακού κλίματος. Αυτός ο τύπος κλίματος εμφανίζεται στη λεκάνη της Μεσογείου, από όπου πήρε και το όνομά του, αλλά και σε 4 ακόμα περιοχές του πλανήτη. Σε μεγάλο μέρος της Καλιφόρνια, στην κεντρική Χιλή, σε μέρος της δυτικής και νότιοδυτικής Αυστραλίας και στη νοτιοδυτική Νότιο Αφρική (όπου παρατηρούμε ότι ευδοκimei η ελιά). Συμπερασματικά η ελιά και το μεσογειακό κλίμα είναι άρικτα συνδεδεμένα.



Εικόνα 6: Ελιές στην Μεσόγειο.



Εικόνα 7: Ελιές στον Ελλαδικό χώρο.

Μόνο στην Ελλάδα έχουν καταγραφεί 6.000 διαφορετικά είδη φυτών, πολλά από τα οποία δεν υπάρχουν πουθενά αλλού στον κόσμο. Στον Ελλαδικό χώρο οι ελιές βρίσκονται σχεδόν σε όλη την επικράτεια (με εξαίρεση κάποιες περιοχές όπως η ήπειρος) όπως μπορούμε να δούμε στην εικόνα 7. Τα σημαντικότερα μέρη όπου απαντάτε η ελιά είναι η Αργολίδα, Αρκαδία (Κυνουρία), Λακωνία, Μεσσηνία, Ηλεία, Αχαΐα, Κορινθία, Αττική, Εύβοια, Βοιωτία, Φθιώτιδα, Μαγνησία – Σποράδες, Λάρισα, Τρίκαλα, Καρδίτσα, Φωκίδα, Αιτωλοακαρνανία, Άρτα, Πρέβεζα, Θεσπρωτία, Κέρκυρα, Κεφαλονιά, Λευκάδα, Ζάκυνθος, Χανιά, Ρέθυμνο, Ηράκλειο, Λασιθί, Ρόδος, Κυκλάδες, Σάμος, Χίος, Λέσβος, Έβρος, Χαλκιδική και Θάσος(5^α).



Εικόνα 8: Ελαιώνας στις Μηλιές Πηλίου Θεσσαλίας.

1.3 Παραγωγή ελιάς και ελαιολάδου και οικονομικά στοιχεία



Εικόνα 9: Σύγκριση παραγωγής ελαιόλαδου 2017/18.

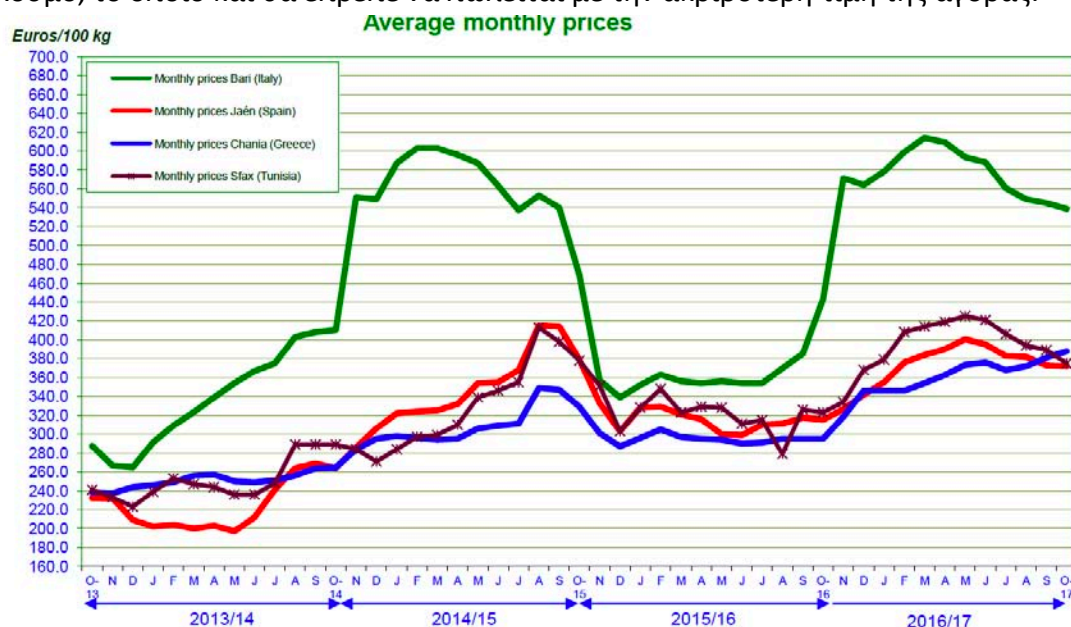
Ηπειροί/Χώρες		16/17	%/Σύνολο	17/18	5/Σύνολο	Μεταβολή
Αφρική	Αλγερία	72.000	2,68%	50000	1,77%	-44,00%
	Αγκόλα	200	0,01%	200	0,01%	0,00%
	Αιθιοπία	90		85	0,00%	-5,88%
	Μποτσουάνα	250	0,01%	250	0,01%	0,00%
	Αίγυπτος	28.000	1,04%	25000	0,88%	-12,00%
	Ν. αφρική	5.000	0,19%	900	0,03%	-455,56%
	Μοζαμβίκη	250		25	0,00%	-900,00%
	Ναμίμπια	100	0,00%	100	0,00%	0,00%
	Λιβύη	22.000	0,82%	17000	0,60%	-29,41%
	Μάρκο	100.000	3,72%	115000	4,07%	13,04%
	Τυνησία	100.000	3,72%	290000	10,26%	65,52%
	Σύνολο	327.890	12,20%	498.560	12,20%	34,23%
	Αι.μερική	Αργεντινή	26.500	0,99%	21000	0,99%
Βραζιλία		600	0,02%	700	0,02%	14,29%
Χιλή		18.600	0,69%	17000	0,69%	-9,41%
Κολομβία		90	0,00%	100	0,00%	10,00%
ΗΠΑ		18.600	0,69%	8000	0,69%	-132,50%
Περού		18.000	0,67%	3300	0,67%	-445,45%
Ελ Σαλβαδόρ		2.500		90	0,00%	-2677,78%
Ουρουγουάη		700	0,03%	1300	0,03%	46,15%
Παραγουάη		150		100		-50,00%
Μεξικό		4.000	0,15%	2500	0,15%	-60,00%
Σύνολο		89.740	3,34%	54.090	3,34%	-65,91%
Ασία	Κίνα	9.000	0,33%	2500	0,33%	-260,00%
	Αφγανιστάν	5.000	0,19%	1200	0,19%	-316,67%
	Σαουδική Αραβία	5.500	0,20%	2800	0,20%	-96,43%
	Ινδία	5.000	0,19%	700	0,19%	-614,29%
	Ιράν	11.000	0,41%	1500	0,41%	-633,33%
	Ιράκ	800	0,03%	950	0,03%	15,79%
	Κουβέιτ	300		250		-20,00%
	Ισραήλ	16.500	0,61%	16000	0,61%	-3,13%
	Ιαπωνία	450	0,02%	25	0,02%	-1700,00%
	Γεωργία	1.200	0,04%	1200	0,04%	0,00%
	Ιορδανία	24.000	0,89%	27000	0,89%	11,11%
	Λίβανος	21.000	0,78%	17000	0,78%	-23,53%
	Παλαιστίνη	20.000	0,74%	20000	0,74%	0,00%
	Αρμενία	100	0,00%	90	0,00%	-11,11%
	Ουζμπεκιστάν	60		60		0,00%
	Υεμένη	150		90		-66,67%
	Πακιστάν	3.500	0,13%	1500	0,13%	-133,33%
Συρία	150.000	5,58%	80000	5,58%	-87,50%	
Σύνολο	273.560	10,17%	172.865	10,17%	-58,25%	
Ευρώπη	Αλβανία	9.000	0,33%	600	0,33%	-1400,00%
	Κύπρος	6.000	0,22%	4.500	0,22%	-33,33%
	Κροατία	3.580	0,13%	5.000	0,13%	28,40%
	Σλοβακία	350	0,01%	700	0,01%	50,00%
	Ισπανία	1.285.000	47,79%	1200000	42,45%	-7,08%
	Γαλλία	4.872	0,18%	7000	0,18%	30,40%
	Ελλάδα	180.000	6,69%	265000	9,37%	32,08%
	Βοσνία Ερζεγοβίνη	450		450		0,00%
	Αζερμπαϊτζάν	300		300		0,00%
	Βουλγαρία	200		200		0,00%
	ΠΓΔΜ	55		55		0,00%
	Ιταλία	183.000	6,81%	280000	9,90%	34,64%
	Μάλτα	40	0,00%	70	0,00%	42,86%
	Πορτογαλία	76.385	2,84%	115000	2,84%	33,58%
	Τουρκία	220.000	8,18%	200000	7,07%	-10,00%
	Μαυροβούνιο	500	0,02%	500	0,02%	0,00%
	Σύνολο	1.969.732	73,26%	2.079.375	73,26%	5,27%
Οκεανία	Αυστραλία	26.000	0,97%	20000	0,97%	-30,00%
	Νέα Ζηλανδία	1.800	0,07%	2000	0,07%	10,00%
	Σύνολο	27.800	1,03%	22.000	1,03%	-26,36%
Σύνολο	2.688.722	100,00%	2.826.890	100,00%	4,89%	

Στον πλανήτη η παραγωγή ελαιόλαδου για το 2018 υπολογίζεται στους 2,800,000 τόνους περίπου. Η Ισπανία έρχεται πρώτη (1,2 εκατομύρια τόνοι), η Τυνησία 2η (290 χιλιάδες τόνοι) και έπονται: Ιταλία (280 χιλιάδες), Ελλάδα (265 χιλιάδες) και Τουρκία (200 χιλιάδες). Οι χώρες αυτές παράγουν ένα 80% της προβλεπόμενης παραγωγής. Επίσης, αναμένεται παραγωγή 20 εκατομμυρίων τόνων ελιάς, από τους οποίους κάτι περισσότερο από το 12% θα κατευθυνθεί για την παραγωγή επιτραπέζιας ελιάς και το υπόλοιπο (σχεδόν 88%) για την παραγωγή λαδιού(6^α).



Πίνακας 1: Παγκόσμια παραγωγή ελαιόλαδου.

Στην παρακάτω εικόνα μπορούμε να δούμε την διαφορά στην τιμή μεταξύ της ελληνικής παραγωγής και διάφορων άλλων χωρών. Είναι ξεκάθαρο ότι η Ελλάδα έχει την χαμηλότερη τιμή πωλήσεις χωρίς ωστόσο το προϊόν της να υστερεί σε κάτι σε σχέση με των άλλων χωρών(6^α) ενώ σύμφωνα με το διεθνές συμβούλιο ελαιόλαδου η χώρα μας είναι πρώτη στην παραγωγή εξαιρετικά παρθένου ελαιόλαδου στον κόσμο, το οποίο και θα έπρεπε να πωλείται με την ακριβότερη τιμή της αγοράς.



Source: International Olive Council - November 2017

Εικόνα 10: Σύγκριση τιμής στην πώληση ελαιολάδων.

1.4 Η ελιά

Βασίλειο:	Φυτά (Plantae)
Συνομοταξία:	Αγγειόσπερμα (Magnoliophyta)
Ομοταξία:	Δικοτυλήδονα (Magnoliopsida)
Τάξη:	Χοιραδιώδη (Scrophulariales)
Οικογένεια:	Ελαιοειδή (Oleaceae)
Γένος:	Ελαία (Olea)

Εικόνα 11: Συστηματική ταξινόμηση ελιάς.

Η ελιά ή ελαιόδενδρο ή λιόδεντρο (επιστ. Ελαία, *Olea*) είναι γένος καρποφόρων δέντρων της οικογένειας των Ελαιοειδών (*Oleaceae*). Είναι δέντρο αειθαλές, έχει φύλλα αντίθετα, λογχοειδή, δερματώδη, σκουροπράσινα στην άνω επιφάνεια και αργυρόχρωμα στην κάτω. Τα άνθη της εμφανίζονται προς το τέλος Μαΐου, ενώ ο καρπός ωριμάζει και συλλέγεται κατά τα τέλη του φθινοπώρου και αρχές του χειμώνα. Ο κορμός της ελιάς είναι οζώδης και καλύπτεται από τεφρόφαιο φλοιό(36).

Το γένος *Olea* περιλαμβάνει τα εξής είδη και ποικιλίες(36):

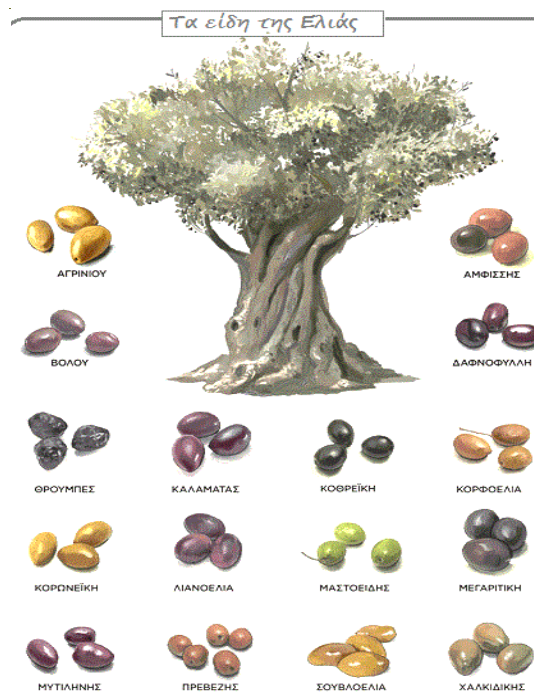
- ❖ Ελαία η αγρία (*Olea sylvestris*), κοινώς αγρελιά ή αγρελίδι.
- ❖ Ελαία η ευρωπαϊκή (*Olea europaea*) ή κοινή, το συνηθέστερα καλλιεργούμενο είδος ανά τον Κόσμο.
- ❖ Ελαία η αιολόκαρπος (*Olea aeolocarpos*).
- ❖ Ελαία η ηδύκαρπος (*Olea nigra dulcis*).
- ❖ Ελαία η ισπανική (*Olea hispanica*).
- ❖ Ελαία η κраниόμορφος (*Olea craniomorpha*), κοινώς σουβλολιά.
- ❖ Ελαία η εκκρεμής (*Olea pendula*), κοινώς κρεβατοελιά.
- ❖ Ελαία η κωνική (*Olea conica*) κοινώς ελιά σαλωνίτικη.
- ❖ Ελαία η λευκόκαρπος (*Olea leucocarpa*).
- ❖ Ελαία η μακρόκαρπος (*Olea macrocarpa*), κοινώς αετονυχολιά.
- ❖ Ελαία η μικρόκαρπος (*Olea microcarpa*), κοινώς λιανολιά ή λαδοελιά.
- ❖ Ελαία η μαστοειδής (*Olea tamillarlis*), κοινώς λιάστρος.
- ❖ Ελαία η πρώιμος (*Olea precox*), κοινώς καλοκαιρίδα.
- ❖ Ελαία η σαλέρνιος (*Olea salerniensis*), κοινώς γαϊδουρολιά.
- ❖ Ελαία η στρεπτή (*Olea contorta*), κοινώς στριφτολιά.
- ❖ Ελαία η στρόγγυλος (*Olea rotunda virida*).
- ❖ Ελαία η υποστρόγγυλος (*Olea subrotunda*).
- ❖ Ελαία η σφαιρική (*Olea sphaerica*).
- ❖ Ελαία η υπόχλωρος (*Olea virida*).



Εικόνα 14: *Olea sylvestris*, αγρελιά.



Εικόνα 13: *Olea europaea* (Ευρωπαϊκή ελιά).

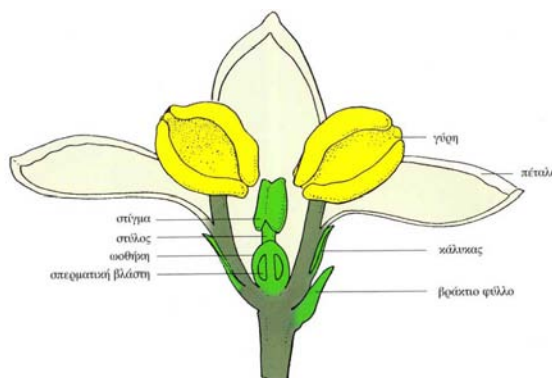


Εικόνα 12: Τα είδη της ελιάς.

1.5 Άνθος ελιάς

Τα άνθη της ελιάς εμφανίζονται σε ταξιανθία βότρου. Πρόκειται για άνθη μικρά, κίτρινα με τέσσερα πέταλα, τέσσερα σέπαλα, δύο ανθήρες και ένα κανονικό ή πυρωμένο ύπερο. Η ελιά ανθίζει γύρο στα τέλη Μαΐου ως της αρχές Ιουνίου. Οι ταξιανθίες δημιουργούνται στις μασχάλες των φύλλων ή στην κορυφή των βλαστών. Τα άνθη που είναι ατελή είτε στερούνται είτε φέρουν πυρωμένο και υποπλαστικό τον ύπερο (34, 36).

Η ελιά διακρίνεται για τα μικρά, υπόγυνα και ερμαφρόδιτα άνθη της. Όσον αφορά τον κάλυκα τους, αυτός είναι τετραμερής ενώ η στεφάνη είναι συμπέταλος με τέσσερα πέταλα. Περνώντας στο ανδρείο, αυτό αποτελείται από δύο στήμονες ενώ η ωθήκη περιλαμβάνει δύο καρπόφυλλα, τα οποία έχουν βραχύ, στύλο και δίλοβο στίγμα. Το άνθος περιλαμβάνει δύο σπερμοβλάστες οι οποίες είναι ανάτροπες. Το άνθος της ελιάς ομαδοποιείται σε βότρυ ταξιανθίες. Η κάθε ταξιανθία αποτελείται από δέκα έως εξήντα άνθη και ο αριθμός αυτός καθορίζεται από την ποικιλία της ελιάς. Μπορούμε να κατατάξουμε τα άνθη σε δύο μορφές (35):



Εικόνα 15: Το άνθος της ελιάς.

- ❖ Ερμαφρόδιτο ή τέλειο άνθος που αποτελείται από δύο στήμονες και έναν κανονικό ύπερο.
- ❖ Ατελές άνθος το οποίο μπορεί να είναι μορφολογικά ερμαφρόδιτο με δύο στήμονες αλλά με έναν ύπερο ο οποίος είναι υποπλαστικός.

Αξίζει να σημειωθεί ότι πολύ παραγωγοί αναφέρονται σε δέντρα τα οποία έχουν έλλειψη υπέρου ή έχουν υποπλαστικό ύπερο και χαρακτηρίζουν τα δέντρα αυτά ως αρσενικά ελαιόδεντρα. Η παρατήρηση αυτή δεν είναι πρόσφατη καθώς είδη από το 350 π.Χ. ο Θεόφραστος μιλά για το φαινόμενο αυτό στις ελιές στην Ιταλία και συγκεκριμένα στον Τάραντα(7, 36).

1.6 Θερμοκρασία και ελαιόδεντρα

Πολύ σημαντικός σταθμός για την καλλιέργεια του ελαιόδεντρου και την οικονομική αξιοποίηση του είναι οι θερμοκρασίες στις οποίες έχει πολλές απαιτήσεις. Το ελαιόδεντρο δεν μπορεί να ζήσει σε θερμοκρασία κάτω των -12°C . Είναι απαραίτητη ωστόσο μια περίοδος όπου χαμηλές θερμοκρασίες βοηθούν να γίνει η διαφοροποίηση των οφθαλμών της σε καρπούς.

Αυτός είναι και ο λόγος που αδυνατεί να καρποφορήσει σε τροπικά κλίματα καθώς δεν υπάρχει επαρκές ψύχος ώστε να διαφοροποιηθούν οι οφθαλμοί και να σχηματιστούν τα άνθη. Σε τροπικές περιοχές συνήθως καρποφορεί εάν υπάρχουν περίοδοι με ψύχος και κυρίως σε μεγάλα υψόμετρα.

Τα ελαιόδεντρα καλύπτουν ένα πολύ μεγάλο μέρος της Ελλάδας. Οι ευαισθησίες που έχει στο ψύχος δυσχεραίνει την εξάπλωση της προς βορρά. Ο χειμώνας στη Β. Ελλάδα είναι δριμύς και μπορεί να παγώσει το δένδρο, έτσι η καλλιέργεια της ελιάς περιορίζεται στη Β. Ελλάδα μόνο στις παραλιακές περιοχές. Σε τόπους που είναι βορινοί, ψυχροί και ανεμόπληκτοι, τα ελαιόδεντρα δεν μπορούν να επιβιώσουν σε υψόμετρο που ξεπερνά τα 300 μέτρα. Ωστόσο, σε ανατολικούς, μεσημβρινούς, ζεστούς και προφυλαγμένους από τους ψυχρούς ανέμους, οι καλλιέργειες μπορεί να φτάσουν έως και τα 1.000 μέτρα. Θερμοκρασία χαμηλότερη από τους -7°C , προκαλεί προβλήματα στα δένδρα. Τα όρια αυτά αποτελούν μια μόνο προσέγγιση, καθώς οι αντοχές των δένδρων εξαρτώνται και από άλλους παράγοντες όπως την ατμοσφαιρική υγρασία, τη διάρκεια των έντονα χαμηλών θερμοκρασιών, την παρουσία ή την έλλειψη ισχυρών ανέμων, την ποικιλία της ελιάς, την εδαφική υγρασία ανά περίοδο, τις καιρικές συνθήκες πριν την περίοδο του παγετού, καθώς επίσης και την βλαστική και υγιεινή κατάσταση των δένδρων.

Οι ζημιές που μπορούν να προκληθούν από το έντονο κρύο και τον παγετό ποικίλλουν από ελαιόδεντρο σε ελαιόδεντρο ακόμα και του ίδιου ελαιώνα ανάλογα με την θρεπτική κατάσταση στην οποία βρίσκονται. Αν η μείωση της θερμοκρασίας είναι σταδιακή, το ελαιόδεντρο μπορεί να επιβιώσει έως και τους -12°C χωρίς να προκληθεί βλάβη. Το δέντρο της ελιάς δύναται να μην καλλιεργείται σε τόπους, όπου η θερμοκρασία βρίσκεται τακτικά κάτω από -4°C . Ο παγετός κατά την περίοδο της άνοιξης, λόγω της όψιμης άνθησης της ελιάς, δεν μπορεί συνήθως να προκαλέσει σοβαρές ζημιές. Πρώιμοι παγετοί κατά την περίοδο της άνοιξης ενδεχομένως μπορούν να καταστρέψουν τους νέους εκπτυσσόμενους οφθαλμούς. Η κατάσταση αυτή μπορεί να έχει ως συνέπεια την μείωση ή ακόμα και την ολική καταστροφή της προβλεπόμενης παραγωγής με συχνότερη συνέπεια την πτώση των εκπτυσσόμενων οφθαλμών.

Η περιοχή που θα καλλιεργηθεί για εμπορικούς λόγους το ελαιόδεντρο είναι απαραίτητο να έχουν μια μέση ετήσια θερμοκρασία $15-20^{\circ}\text{C}$. Οι μεγαλύτερες θερμοκρασίες που μπορεί να αντέξει χωρίς να προκληθεί ζημιά στο δέντρο είναι κοντά στους 40°C . Ωστόσο, η χαμηλότερη θερμοκρασία δεν πρέπει να βρίσκεται κάτω από τους -5°C , γιατί χαμηλότερη από αυτή τη θερμοκρασία είναι πιθανό να προκαλέσει σοβαρές ζημιές στα ελαιόδενδρα. Η φωτοσύνθεση για το δέντρο της ελιάς αναστέλλεται όταν υπάρχουν θερμοκρασίες μεγαλύτερες από 35°C . Ωστόσο, διάφορες ποικιλίες που έχουν προσαρμοστεί σε υψηλότερες θερμοκρασίες μπορούν και διατηρούν το 70-80% της φωτοσυνθετικής τους δυνατότητας ακόμα και στους 40°C .

Με το πέρας του χειμώνα πάνω στους βλαστούς, που φυσιολογικά αναπτύχθηκαν κατά την περασμένη άνοιξη, δημιουργούνται ανθοφόροι οφθαλμοί οι οποίοι προήλθαν από βλαστοφόρους οφθαλμούς μέσω μιας διαδικασίας που

ονομάζεται «Διαφοροποίηση». Ο βλαστοφόρος οφθαλμός εξελίσσεται σε ανθοφόρο ο οποίος δίνει ανθοταξία και τελικά καρπό και αυτό με την βοήθεια ορισμένων παραγόντων με τον βασικότερο από τους αυτούς να είναι η θερμοκρασία. Ο κύκλος καρποφορίας στο ελαιόδεντρο ολοκληρώνεται σε τέσσερα στάδια. Αρχικά έχουμε τη βλάστηση, στη συνέχεια την διαφοροποίηση, ακολουθεί η ανάπτυξη των ανθικών μερών και τέλος έχουμε τη καρπόδεση και την ωρίμανση αυτών. Όλος ο κύκλος διαρκεί ένα χρόνο, σε αντίθεση με τα φυλλοβόλα οπωροφόρα, των οποίων ο κύκλος αυτός διαρκεί περίπου δύο χρόνια. Η επιτυχής ολοκλήρωση κάθε σταδίου του κύκλου καρποφορίας αποτελεί βασική προϋπόθεση για την ομαλή μετάβαση στο επόμενο στάδιο, ενώ και τα τέσσερα στάδια εξαρτώνται από ποικίλους παράγοντες, ικανούς να επηρεάσουν θετικά και αρνητικά κάθε ένα από αυτά (θερμοκρασία, λίπανση, εδαφική υγρασία, κλπ).

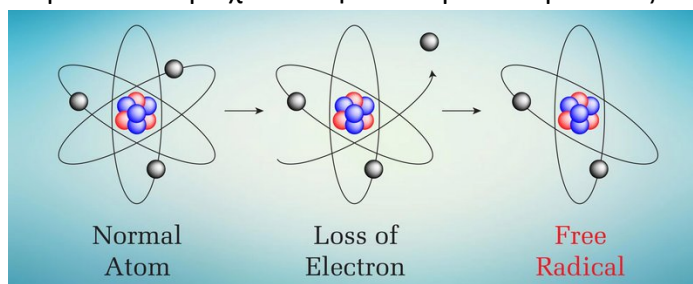
Η καλύτερη θερμοκρασία για την περίοδο της άνθησης είναι μεταξύ 18 και 20°C ενώ κατά την καρπόδεση 20 με 22°C. Οι βέλτιστες θερμοκρασίες από την καρπόδεση μέχρι την έναρξη της ωρίμανσης του καρπού είναι μεταξύ των 22 και 25°C, ενώ η καλύτερη θερμοκρασία μετά κατά την ωρίμανση του καρπού μέχρι και την συγκομιδή είναι 18°C και η ελάχιστη όχι κάτω από 15°C. Ένα ηλιόλουστο και ζεστό Φθινόπωρο μπορεί να ευνοήσει τη συγκέντρωση περισσότερου λαδιού στους καρπούς, ενώ ένας βροχερός και ταυτόχρονα ψυχρός καιρός κατά την περίοδο αυτή έχει σίγουρα αρνητική επίδραση.

Η διαδικασία ωρίμανσης του καρπού μειώνεται όταν η θερμοκρασία πέσει κάτω από τους 10°C και διακόπτεται κάτω από 5°C. Οι ανοιξιάτικοι παγετοί, δεν είναι περιοριστικός παράγοντας στη καλλιέργεια της ελιάς λόγω της όψιμης άνθησης της, ενώ οι πολύ υψηλές θερμοκρασίες αναστέλλουν τη νέα βλάστηση, επηρεάζουν το σχηματισμό των ανθέων και την ανάπτυξη και ωρίμανση του καρπού.

Θερμοκρασία μέχρι 0°C, δεν μπορεί να προκαλέσει σοβαρή ζημιά στον καρπό ο οποίος συρρικνώνεται, αλλά η κατάσταση αυτή δεν είναι μόνιμη και επανακτάται η φυσιολογική σπαργή του εφόσον δεν μεσολαβήσουν αργότερα παγετοί. Σε θερμοκρασία, από -2°C έως και -4°C διάρκειας μιας ώρας, ο καρπός πλέον συρρικνώνεται μόνιμα. Ο πράσινος καρπός είναι αρκετά πιο ευαίσθητος από το μαύρο και παίρνει καφέ χρώμα μετά από έντονο παγετό(41,43,44)

1.7 Ελεύθερες ρίζες

Οι ελεύθερες ρίζες ορίζονται όπως φαίνεται και στην εικόνα 16 ως μόρια ή άτομα που περιέχουν 1 ή και περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική



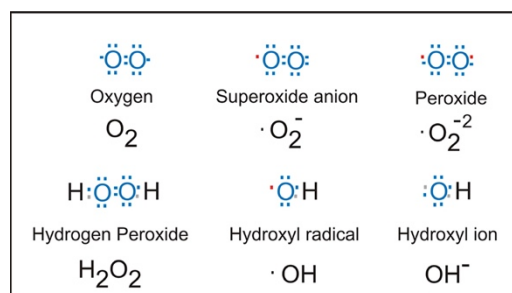
Εικόνα 16: Δημιουργία ελεύθερης ρίζας.

τους στιβάδα σθένους (8) και μπορεί να δημιουργηθούν είτε με την προσθήκη είτε με την απώλεια ενός ηλεκτρονίου από την εξωτερική ηλεκτρονιακή τους στιβάδα (9).

Οι ελεύθερες ρίζες είναι ιδιαίτερα δραστικά μόρια και μπορούν να προκαλέσουν βλάβες σε διάφορα βιολογικά μακρομόρια πράγμα που έχει ως συνέπεια να επηρεάσουν διάφορες φυσιολογικές λειτουργίες του κυττάρου και κατ' επέκταση του οργανισμού. (10). Οι σημαντικότερες ελεύθερες ρίζες είναι μόρια με κέντρο το οξυγόνο και μερικές φορές το άζωτο (11, 12, 13), το θείο (12, 14) ή τον άνθρακα.

1.8 Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS)

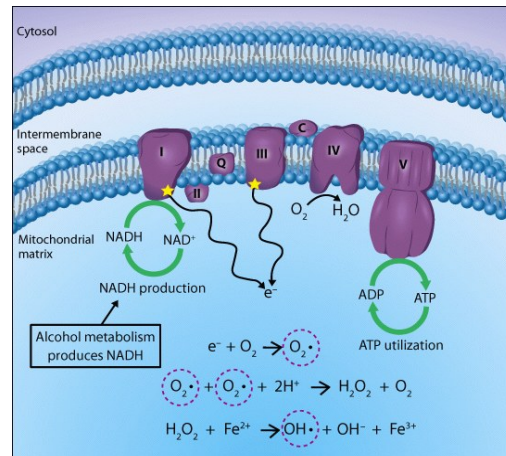
Οι ROS (εικόνα 15) είναι ενεργές χημικές ουσίες που διαθέτουν ένα τουλάχιστον οξυγόνο. Στις ROS ανήκουν ουσίες που είναι ρίζες όπως το περοξειδίο καθώς και ουσίες που δεν είναι ρίζες όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου(15).



Εικόνα 17: Δραστικές μορφές οξυγόνου.

1.8.1 Δημιουργία δραστικών μορφών οξυγόνου

Ελεύθερες ρίζες είναι δυνατόν να σχηματιστούν στον οργανισμό μας τόσο ενδογενώς όσο και εξωγενώς. Σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία (16) η κύρια πηγή ελεύθερων ριζών είναι μέσω του μηχανισμού της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (εικόνα 18).

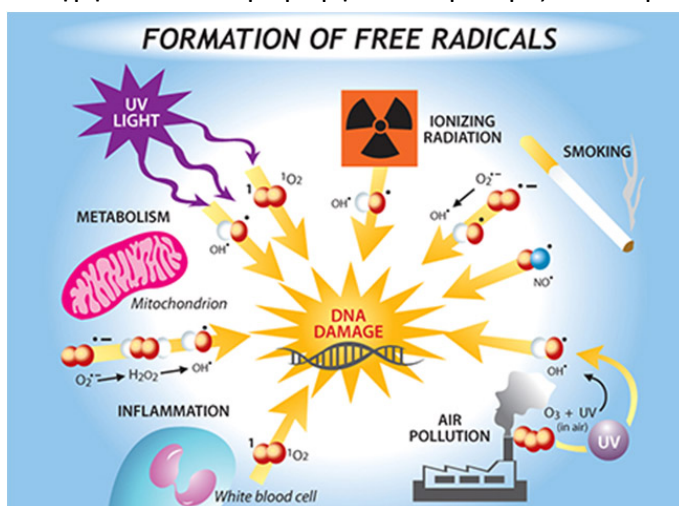


Εικόνα 18: Παραγωγή ROS στα μιτοχόνδρια.

Οξυγόνο που εισέρχεται στην κυκλοφορία στον οργανισμό αλλά δε καταλήγει στα μιτοχόνδρια, λειτουργεί σαν υπόστρωμα για ενζυμικά συστήματα τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στο ενδοπλασματικό δίκτυο. NADH-οξειδάση, οξειδάση του CYT-P450, κυκλοξυγενάση, λιποξυγενάση και ξανθινοξειδάση αποτελούν ένζυμα που σταδιακά μεταφέρουν ένα ηλεκτρόνιο στο μοριακό οξυγόνο, με τα ενδιάμεσα προϊόντα να είναι κατά σειρά παραγωγής τους, το $O_2\cdot^-$, το H_2O_2 και το $HO\cdot$ (17). Συμπληρωματικά κάποια ιόντα μετάλλων όπως Fe, Cu, Cr, Co, As, το

Cd και το Ni, είναι ενζυμικοί συμπαράγοντες και όταν βρεθούν στην ελεύθερη μορφή τους μέσα σε βιολογικά συστήματα είναι σε θέση να προκαλέσουν καταστροφή σε ευπαθή μακρομόρια, όπως οι πρωτεΐνες, τα λίπιδια και το DNA (18). Τέλος, το ανοσοποιητικό σύστημα μπορεί να προκαλέσει την δημιουργία ROS. Πιο αναλυτικά, κάποια κύτταρα του ανοσοποιητικού δημιουργούν ρίζες για να καταπολεμήσουν εξωγενείς παράγοντες όπως βακτήρια αλλά και όργανα που έχουν μεταμοσχευτεί. Κυρίαρχο ρόλο παίζουν τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα καθώς φαίνεται να έχουν αυξημένο μεταβολισμό που συνοδεύεται από μεγαλύτερη παραγωγή ελευθέρων ριζών (19).

Αξίζει να σημειωθεί ότι εκτός από τους ενδογενείς αυτούς παράγοντες, υπάρχουν και εξωγενείς όπως είναι το άγχος από την καθημερινότητα και από καταστάσεις, η διατροφή μας και φυσικά ο τρόπος ζωής που επιλέγουμε είναι ικανοί να οδηγήσουν σε παραγωγή ελευθέρων ριζών. Με μεγαλύτερη ακρίβεια η έκθεση σε



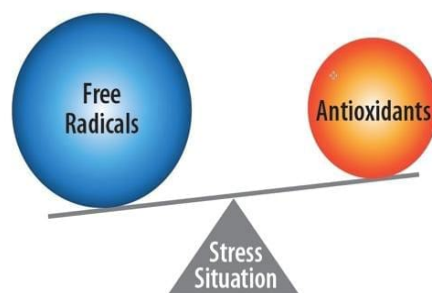
Εικόνα 19: Παράγοντες που επιδρούν στον σχηματισμό ROS.

ιονίζουσα ακτινοβολία καθώς επίσης και το υπεριώδες φως, η περιβαλλοντική ρύπανση καθώς και η χρήση ειδών καπνού, τα φάρμακα, το αλκοόλ και διάφορα συντηρητικά τροφών προκαλούν βλάβη στο DNA, στα λιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών και στις πρωτεΐνες (20).

1.9 Οξειδωτικό στρες

Με τον όρο οξειδωτικό στρες εννοούμε την διαταραχή που δημιουργείτε ανάμεσα στην προοξειδωτική και αντιοξειδωτική ισορροπία υπέρ της πρώτης, οδηγώντας σε πιθανή βλάβη (21). Αφορά την διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ τόσο της παραγωγής ελευθέρων ριζών όσο και της δράσης των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του οργανισμού, με αποτέλεσμα είτε να υπάρχει πλεόνασμα ελευθέρων ριζών είτε να υπάρχει μειωμένη δράση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του οργανισμού, πχ

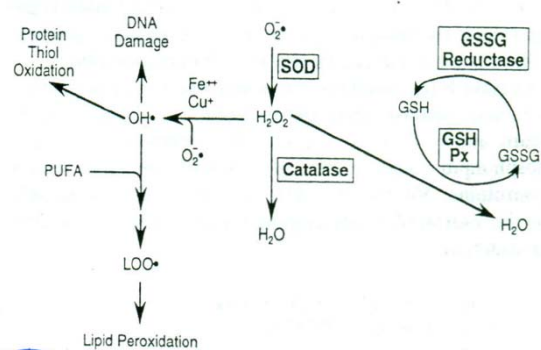
του μηχανισμού της γλουταθειόνης (GSH/GSSG). Οι σοβαρότητα των προβλημάτων από το οξειδωτικό στρες εξαρτώνται από την έκταση των μεταβολών που προκαλούνται. Τα κύτταρα είναι ικανά να ανακτήσουν την αρχική τους κατάσταση μετά από μικρή οξειδωτική βλάβη. Μια πιο εκτενής βλάβη μπορεί να οδηγήσει στον κυτταρικό θάνατο, είτε με τη διαδικασία του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, είτε με κυτταρική νέκρωση (22).



Εικόνα 20: Οξειδωτικό στρες.

1.10 Επιπτώσεις οξειδωτικού στρες στα βιομόρια

Το οξειδωτικό στρες επηρεάζει άμεσα όπως φαίνεται στην εικόνα 18 τόσο το DNA, όσο και τα λιπίδια και τις πρωτεΐνες. Αυτή η κατάσταση είναι πολύ επικίνδυνη για τον οργανισμό και μπορεί να οδηγήσει σε πολλές διαταραχές της ομαλής του λειτουργίας.



Εικόνα 21: Επιπτώσεις οξειδωτικού στρες στα βιομόρια.

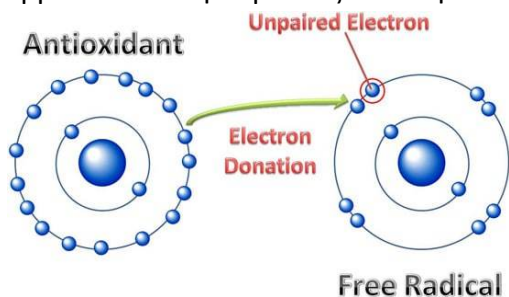
Το οξειδωτικό στρες είναι γνωστό ότι συμβάλλει σε όλες τις φλεγμονώδεις ασθένειες (23).

- ❖ Επίδραση στον εγκέφαλο (ασθένεια Alzheimer, νόσο του Πάρκινσον, μυϊκή δυστροφία)
- ❖ Επίδραση στην όραση (καταρράκτης)
- ❖ Επίδραση στο καρδιαγγειακό (Καρδιακή προσβολή, αγγειίτιδα)
- ❖ Επίδραση στα νεφρά (σπειραματονεφρίτιδα)
- ❖ Επίδραση στο ανοσοποιητικό σύστημα (ερυθηματώδη λύκο, σύνδρομο επίκτητης ανοσοανεπάρκειας)
- ❖ Καρκίνο
- ❖ Γαστρικά έλκη
- ❖ Προβλήματα με τις αρθρώσεις



1.11 Αντιοξειδωτικοί παράγοντες

Τα αντιοξειδωτικά ορίζονται ως ουσίες οι οποίες όταν βρίσκονται σε μικρότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με εκείνες των προς οξείδωση υποστρωμάτων, επιβραδύνουν ή εμποδίζουν την οξείδωση αυτού του υποστρώματος. Τα



Εικόνα 22: Δράση αντιοξειδωτικών μορίων.

αντιοξειδωτικά έχουν την ικανότητα να προσφέρουν στις ελεύθερες ρίζες το ηλεκτρόνιο ή το μόριο υδρογόνου, που τους λείπει και με αυτόν τον τρόπο είτε εμποδίζουν τη δράση τους, είτε ενεργοποιούν τα ενδογενή αμυντικά συστήματα του οργανισμού (24).

1.12 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς έχουμε ενδογενής οι οποίοι διακρίνονται σε ενζυμικούς και μη ενζυμικούς μηχανισμούς ενώ σημαντική είναι και η συμμετοχή της διατροφής με διάφορα αντιοξειδωτικά μόρια (εξωγενής παρέμβαση) (25).

Πίνακας 2: Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί.

<u>Ενζυμικοί μηχανισμοί</u>	<u>Μη ενζυμικοί μηχανισμοί</u>	<u>Διατροφή</u>
υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)	γλουταθειόνη	βιταμίνη E (α-τοκοφερόλη)
καταλάση (CAT)	ουβικινόλη (ανηγμένη μορφή συνένζυμου Q10)	βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ)
υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX)	ουρικό οξύ	B-καροτένιο
αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR)		σελήνιο
		φλαβονοειδή
		ανθοκυανίνες
		φαινόλες

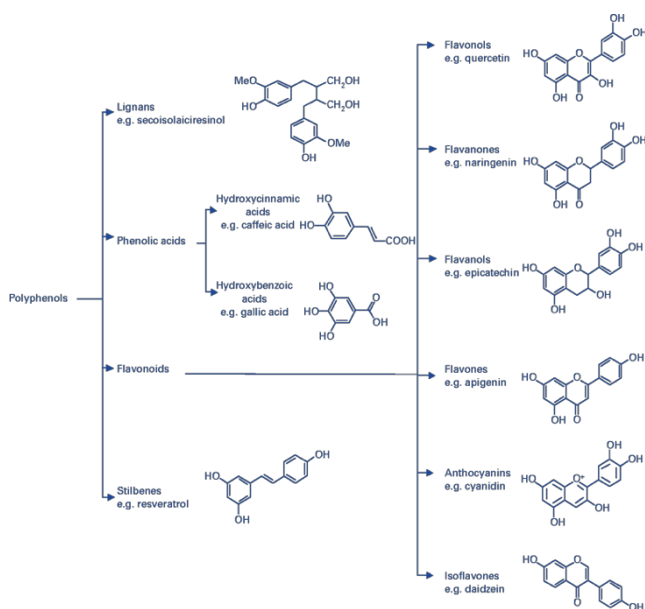
Γλουταθειόνη (glutathione, GSH):

Πρόκειται για μία οργανική χημική ένωση που παρουσιάζει μεγάλη αντιοξειδωτική δράση στους οργανισμούς. Βιοχημικά είναι ένα τριπεπτίδιο, το οποίο αποτελείται από τα αμινοξέα γλουταμινικό οξύ, κυστεΐνη και γλυκίνη. Η περιεκτικότητα του ανθρώπινου αίματος σε γλουταθειόνη είναι 0,35 ως 0,45 gr ανά λίτρο σε φυσιολογικές συνθήκες. Μέσα στους οργανισμούς η ουσία υπάρχει σε δύο

μορφές: την ανηγμένη και την οξειδωμένη. Με τις μορφές αυτές έχει τον ρόλο μεταφορέα του υδρογόνου και αποτελεί έναν από τους κύριους παράγοντες σταθερότητας του οξειδοαναγωγικού δυναμικού του κυττάρου. Η μεταβολή του ποσοστού της ανηγμένης γλουταθειόνης στο αίμα σε σχέση με το ποσοστό της οξειδωμένης αποτελεί ένδειξη μυϊκής κοπώσεως ή διάφορων άλλων νοσηρών καταστάσεων, όπως ο διαβήτης και η αβιταμίνωση (25).

1.13 Πολυφαινόλες

Η μεγαλύτερη ομάδα φυτοχημικών ενώσεων που απαντώνται στα φυτά, είναι οι πολυφαινόλες. Συναντώνται κυρίως στα φρούτα, τους σπόρους και τα φύλλα (26). Αποτελούν δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών, οι οποίοι συμβάλουν στην άμυνα από την υπεριώδη ακτινοβολία καθώς και από επιθέσεις προερχόμενες από παθογόνους παράγοντες. Οι πολυφαινόλες μέσα στις τροφές επιδρούν στη συντόνηση, την οσμή, τη γεύση, το χρώμα και την οξειδωτική σταθερότητα (27). Οι ιδιαίτερες χημικές τους δομές προέρχονται από σύμπλοκα περισσότερων του ενός πολυφαινολικών μορίων τα οποία προέρχονται από διμερισμό ή πολυμερισμό απλούστερων μορίων (28) και βοηθούν σε ένα ευρύ φάσμα φυσικών και βιολογικών δράσεων (29).



Εικόνα 23: Κατηγορίες πολυφαινολών.

Οι φαινολικές ενώσεις του ελαιολάδου, έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες μέσω των ο-διφαινολών όπου σχετίζονται με τη μεταφορά υδρογόνου μέσω της οποίας βελτιώνουν τη σταθερότητα των ριζών, δημιουργώντας ενδομοριακό δεσμό υδρογόνου μεταξύ των ελεύθερων υδρογόνων της υδροξυλομάδας τους και των ριζών φαινοξυλίου τους. (30). Το περιεχόμενο σε πολυφαινόλες του ελαιολάδου εμφανίζει ισχυρή αντικαρκινική, αντιοξειδωτική, νευροπροστατευτική, αντιφλεγμονώδη, αντιυπερτασική, καρδιοπροστατευτική καθώς και αντιγηραντική δράση. Πειράματα δείχνουν βελτίωση της ενδοθηλιακής λειτουργίας σε υπερχοληστερολαιμικούς ασθενείς με πρόωρη αθηροσκλήρωση, έπειτα από 4 μήνες ημερήσιας χορήγησης ελαιολάδου, περιεκτικότητας 340mg πολυφαινολών ανά kg ελαιολάδου (31). Διάφορες εργασίες διαπιστώνουν ότι οι πολυφαινόλες έξτρα παρθένου ελαιολάδου είχαν ωφέλιμες επιδράσεις έναντι δυσκολιών που αφορούν

στη μάθηση αλλά και τη μνήμη, οι οποίες έχουν σχέση με την υπερπαραγωγή του πεπτιδίου του β αμυλοειδούς (32). Η Ευρωπαϊκή επιτροπή ασφάλειας τροφίμων (EFSA), ισχυρίζεται ότι υπάρχει σχέση αιτίου και αποτελέσματος από την πρόσληψη φαινολικών ενώσεων ελαιολάδου (γνωστών σε περιεκτικότητα) και της προστασίας των λιπιδίων στο αίμα από το οξειδωτικό στρες. Για να επιτευχθούν αυτά τα



ευεργετικά αποτελέσματα, η EFSA καθόρισε ελάχιστη απαίτηση ημερήσιας πρόσληψης 5 mg υδροξυτοροσόλης (μιας εκ' των κυρίων φαινολικών ενώσεων του ελαιολάδου) και των παραγώγων της (33).

Εικόνα 24: Ευρωπαϊκή επιτροπή ασφάλειας τροφίμων.

2. ΣΚΟΠΟΣ

Τα ποσοστά των ανθών που παραμένουν αχρησιμοποίητα και καταλήγουν στο έδαφος αποτελούν το 80% των συνολικών ανθών ενός δέντρου. Το ποσοστό είναι πάρα πολύ μεγάλο και η ανάγκη αξιοποίησης όσο το δυνατόν περισσότερων πόρων απευθείας από την φύση χωρίς την διατάραξη του οικοσυστήματος είναι ύψιστης προτεραιότητας. Συνεπώς η παρούσα μελέτη έγινε με σκοπό να διαπιστωθεί η αξία της πολυφαινολικής σύστασης των ανθών της ελιάς και να αναδειχθούν οι αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες, ώστε να συλλέγονται και να χρησιμοποιούνται όλα τα άνθη της ελιάς τα οποία δεν δίνουν καρπό και πέφτουν στο έδαφος. Σε βάθος χρόνου ο απώτερος σκοπός είναι η δημιουργία βιολειτουργικών σκευασμάτων που θα συμβάλλουν ευεργετικά στην υγεία του ανθρώπου μέσω συμπληρωμάτων διατροφής, φαρμακευτικών ή καλλυντικών σκευασμάτων.

Για τον σκοπό αυτό επιλέχθηκαν 4 εκχυλίσματα ανθών ελιάς, το ένα από αυτά προερχόμενο από αγριελιά. Αρχικά έγινε μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων με την μέθοδο DPPH. Στην συνέχεια έγινε έλεγχος της αντιγενετοξικής δράσης των εκχυλισμάτων αυτών με το τεστ του Ames. Ενώ τέλος τα εκχυλίσματα αυτά ελέγχθηκαν σε 3 ανθρώπινες κυτταρικές σειρές (HeLa, EAhy.926, HepG2) για τον έλεγχο της επίδρασης τους στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό του κυττάρου, μέσω της μέτρησης των επιπέδων GSH και ROS με κυτταρομετρία ροής.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Εκχυλίσματα

Τα εκχυλίσματα μας προέρχονται από το εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και χημείας φυσικών προϊόντων του καθηγητή Λέανδρου Σκαλτσούνη, του τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Πρόκειται για 3 πολυφαινολικά εκχυλίσματα ανθέων ελιάς και 1 πολυφαινολικό εκχύλισμα ανθέων αγριελιάς με τις κωδικές ονομασίες EKRA (Κορωνέικη), ANKT (Λιανολιά Κέρκυρας), KTKT (Λιανολιά Κέρκυρας) και AGRI (αγριελιά) αντίστοιχα. Τα δείγματα EKRA συλλέχθηκαν στις 13/5/17, τα δείγματα ANKT στις 14-15/5/17, τα δείγματα KTKT στις 5-7/5/17 και τα δείγματα ANKT στις 13-14/5/17. Όλα τα δείγματα συλλέχτηκαν κάτω από πού καλές συνθήκες (ζεστός και ξηρός καιρός). Η ξήρανση των δειγμάτων έγινε για 20 μέρες σε ξηρό, σκοτεινό, καλά αεριζόμενο δωμάτιο. Μετά το πέρας των 20 ημερών το φυτικό υλικό αποθηκεύτηκε στο ερμπάριο.

Οι εκχυλίσεις των ανθέων πραγματοποιήθηκαν σε λουτρό υπερήχων (Branson 2510) με μίγμα διαλυτών αιθανόλης/νερού σε αναλογία 50:50. Για κάθε ένα από τα δείγματά μας, ζυγίστηκαν 20 g ξηρής δρόγης σε υάλινη κωνική φιάλη στην οποία προστέθηκαν 150 ml μίγματος EtOH/H₂O (50:50 v/v), ώστε οι διαλύτες να υπερκαλύπτουν την δρόγη. Η κάθε εκχύλιση διήρκησε 30 min ενώ στη συνέχεια ακολούθησε διήθηση υπό κενό, συμπύκνωση σε θερμοκρασία 40 °C σε RotaVapor μέχρι απομάκρυνσης της EtOH.

Η παραπάνω διαδικασία επαναλήφθηκε ως έχει δύο φορές για κάθε δείγμα. Τα συλλεχθέντα εκχυλίσματα αποθηκεύτηκαν αρχικά στην κατάψυξη στους -80°C για 24h ενώ στη συνέχεια λυοφιλοποιήθηκαν σε συσκευή CHRIST ALPHA 1/5 έως ότου απομακρυνθεί όλη η ποσότητα του ύδατος με εξάχνωση.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ποιοτική ανάλυση με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) καθώς και συγκριτική μελέτη όλων των δειγμάτων ανθέων ελαιοδένδρων. Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε είναι της Thermo Finnigan και αποτελείται από αντλία SpectraSystem P4000, απαερωτής (degasser) SpectraSystem 1000, αυτόματος δειγματολήπτης SpectraSystem AS3000 και ανιχνευτή φωτοδιόδων (PDA) SpectraSystem UV6000LP. Ο διαχωρισμός των ουσιών πραγματοποιήθηκε σε χρωματογραφική στήλη Supelcosil RP-18 C18 διαστάσεων 25cm x 4.6 mm i.d., 5.0 μm (Discovery).

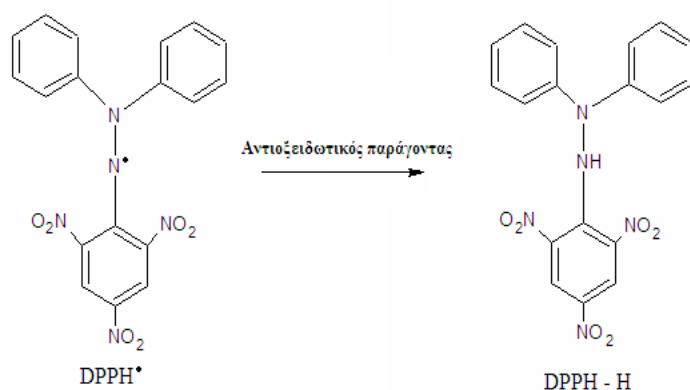
Η εύκολη και αποτελεσματική παραλαβή των φαινολικών ενώσεων από το εκχύλισμα είναι δυνατό να πραγματοποιηθεί μέσω διεργασιών προσρόφησης-εκρόφησης χρησιμοποιώντας προσροφητικά μέσα, όπως οι ρητίνες τύπου XAD. Η χημική δομή του υλικού κατασκευής της ρητίνης ευνοεί την προσρόφηση -μέσω ασθενών αλληλεπιδράσεων- των ενώσεων που φέρουν συστήματα υψηλής πυκνότητας ηλεκτρονίων, όπως οι αρωματικοί δακτύλιοι. Σε αντίθεση, τα σάκχαρα ή τα πολικά λιπίδια δεν μπορούν να δημιουργήσουν αυτό το είδος της αλληλεπίδρασης και εκλούνται με τη ροή του νερού κατά τη διάρκεια του «ξεπλύματος». Οι φαινολικές ενώσεις μπορούν στη συνέχεια να ανακτηθούν με έκλυση με αιθανόλη, δίνοντας ένα εμπλουτισμένο σε φαινόλες εκχύλισμα.

Η ρητίνη Amberlite XAD-7 που χρησιμοποιήθηκε είναι ένα πολυμερές προσροφητικό υλικό που απαντάται με τη μορφή λευκών αδιάλυτων κοκκίων. Είναι ενδιάμεσης πολικότητας και έχει την ικανότητα δέσμευσης συστατικών μεγάλου μοριακού βάρους (Benamor, Bouariche, Belaid, & Draa, 2008).

Σε κωνική φιάλη των 250 mL (A) φέρονται 7,5 gr ρητίνης και 6.5 gr υδροαλκοολικού εκχυλίσματος διαλυμένα σε 150 mL νερού. Ακολουθεί μαγνητική ανάδευση για 3 ώρες. Έπειτα, το μίγμα διηθείται υπό κενό και η ρητίνη συλλέγεται σε νέα κωνική φιάλη (B) ενώ το διήθημα απορρίπτεται. Στην κωνική φιάλη (B) προστίθενται 80 mL EtOH και φέρεται σε λουτρό υπερήχων για 20 min. Ακολουθεί εκ νέου διήθηση υπό κενό και το διήθημα συλλέγεται σε προ ζυγισμένη σφαιρική φιάλη, συμπυκνώνεται σε θερμοκρασία 40 °C μέχρι ξηρού υπό χαμηλό κενό σε συμπυκνωτή RotaVapor και ζυγίζεται. Το φαινολικό εκχύλισμα που παράχθηκε έχει ξηρό βάρος 1.02 g και απόδοση 15,7%.

3.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της ικανότητας αναγωγής της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH•

Ο υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας στηρίζεται στην αλληλεπίδραση των εξεταζόμενων μορίων ή δειγμάτων με τη σταθερή ρίζα 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH•). Η ρίζα DPPH• έχει την ικανότητα να αδρανοποιηθεί μέσω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου (Prior et al. 2005). Πρόκειται για μία σταθερή οργανική ρίζα αζώτου, η οποία είναι μωβ χρώματος και απορροφά στα 520 nm. Όταν στο διάλυμα της ρίζας προσθέσουμε ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε το 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH•) ανάγεται από την προσθήκη ενός ατόμου υδρογόνου (ή ηλεκτρονίου) και μετατρέπεται στην

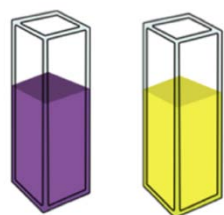


1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (DPPH-H), η οποία έχει χαρακτηριστικό κίτρινο χρώμα, μία κατάσταση η οποία ελαττώνει την οπτική απορρόφηση.

Εικόνα 25: Χημική δομή της ένωσης DPPH• και της ένωσης

DPPH-H.

Στην παρούσα μελέτη, για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων, η αντίδραση με τη ρίζα πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 1 ml, στον οποίο περιέχονταν μεθανόλη (ως διαλύτης), 100 μM της ρίζας DPPH• και το δείγμα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Μετά την προσθήκη των συστατικών της



αντίδρασης τα δείγματα ανακινήθηκαν και επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι για 20 min. Ακολούθησε μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 520 nm. Το control δεν περιέχει τα εκχυλίσματα. Σαν αρνητικό control, μετρήθηκε η απορρόφηση μόνο των εκχυλισμάτων χωρίς την προσθήκη της ρίζας.

Εικόνα 26: Αλλαγή χρωμάτων του DPPH.

Η %-αναγωγή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH• υπολογίζεται σύμφωνα με τον τύπο: %-αναστολή = (Απορρόφηση control - Απορρόφηση δείγματος) / Απορρόφηση control × 100.

3.3 Τεστ του AMES

3.3.1 Αρχή της μεθόδου

Το τεστ του Ames, αναπτύχθηκε από τον Ames και τους συνεργάτες του και είναι μία μέθοδος μικρής διάρκειας (short-term), ευαίσθητη και αξιόπιστη που μπορεί να ανιχνεύσει χημικές ουσίες που προκαλούν μεταλλάξεις στο γενετικό υλικό. Η μέθοδος βασίζεται στη χρήση διαφόρων στελεχών *Salmonella typhimurium* τα οποία είναι αυξότροφα ιστιδίνης, δηλαδή δεν έχουν την ικανότητα να αναπτυχθούν σε θρεπτικό υλικό που δεν περιέχει ιστιδίνη, γιατί καθένα από αυτά τα στελέχη φέρει μεταλλάξεις σε γονίδια του οπερονίου που κωδικοποιεί τη βιοσύνθεση της ιστιδίνης.

Εάν τα στελέχη αυτά καλλιεργηθούν σε θρεπτικό υλικό που περιέχει ίχνη ιστιδίνης, είναι πολύ πιθανό να συμβούν ανάστροφες ή οπισθόδρομες μεταλλάξεις, οι οποίες έχουν ως συνέπεια τα γονίδια να ανακτήσουν την αρχική τους λειτουργία. Μόνο τα κύτταρα στα οποία έχουν συμβεί ανάστροφες ή οπισθόδρομες μεταλλάξεις έχουν την ικανότητα να αναπτυχθούν και να σχηματίσουν αποικίες. Ο αριθμός των επαναμεταλλαγμένων αποικιών που σχηματίζονται λόγω αυτόματων μεταλλάξεων είναι σταθερός για κάθε στέλεχος *S. typhimurium*. Εάν μία μεταλλαξιγόνος ουσία προστεθεί στο θρεπτικό υλικό, τότε θα προκληθεί αύξηση του αριθμού των αποικιών σε σχέση με τα τρυβλία στα οποία δεν έχει προστεθεί η μεταλλαξιγόνος ουσία.

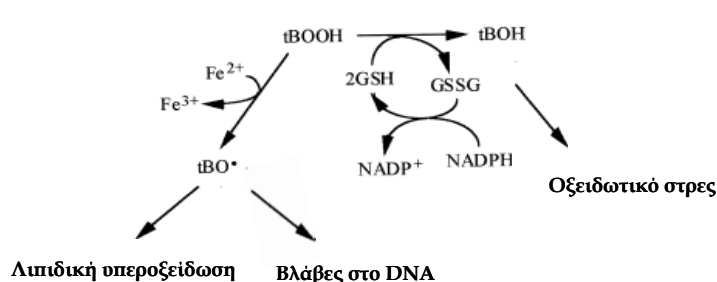
Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος TA102 το οποίο είναι ευαίσθητο σε μεταλλάξεις που προκαλούνται από δραστικές μορφές οξυγόνου. Η μετάλλαξη που υπάρχει στο στέλεχος αυτό είναι στο οπερόνιο της ιστιδίνης και συγκεκριμένα η *hisG428*, η οποία είναι μία μετάλλαξη τερμανισμού (TAA) και μπορεί να αναστραφεί από όλες τις πιθανές μεταλλάξεις αντικατάστασης βάσης (τόσο με μεταστροφές όσο και με μεταπτώσεις). Η *hisG428* βρίσκεται σε πλασμίδιο (*pAQ1*) που υπάρχει σε πολλά αντίγραφα στα κύτταρα TA102 έτσι ώστε να αυξηθούν οι πιθανές θέσεις ανάστροφων μεταλλάξεων. Ακόμα το πλασμίδιο *pAQ1* προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό τετρακυκλίνη, χαρακτηριστικό που χρησιμοποιείται ως δείκτης για την ανίχνευση του. Επιπλέον το TA102 φέρει τη μετάλλαξη *rfa* που έχει ως συνέπεια το σχηματισμό ελλειμματικού λιποπολυσακχαριτικού στρώματος στο βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα με αποτέλεσμα αυτό να είναι διαπερατό σε χημικές ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους. Τέλος, διαθέτει το πλασμίδιο *pKM101* το οποίο έχει την ικανότητα να αυξάνει τις προκαλούμενες από χημικές ενώσεις και υπεριώδη ακτινοβολία μεταλλάξεις καθώς ενισχύει τον επιδιορθωτικό μηχανισμό βλαβών στο DNA που είναι επιρρεπής σε λάθη (error-prone recombinational repair pathway) (37).

Το τεστ του Ames μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την ανίχνευση αντιμεταλλαξιγόνων ουσιών, δηλαδή ουσιών που προστατεύουν το DNA από βλάβες που προκρίνονται από χημικές ουσίες.

Στην παρούσα εργασία έγινε χρήση του μεταλλαξιγόνου παράγοντα (t-BOOH). Η συγκέντρωση που επιλέχθηκε ήταν αυτή που διπλασιάζει τις παρατηρούμενες αποικίες ενώ ταυτόχρονα χορηγήθηκαν εκχυλίσματα ανθέων ελιάς σε διάφορες συγκεντρώσεις για να φανεί αν και πόσο τα εκχυλίσματα αυτά εμφανίζουν αντιμεταλλαξιγόνο δράση.

3.3.2 Μηχανισμός δράσης του t-BOOH

Το οργανικό υδροπεροξειδίο t-BOOH είναι ένας οξειδωτικός παράγοντας. Ο παράγοντας αυτός εξαντλεί τα ενδογενή επίπεδα GSH μέσω του μηχανισμού της GPx ενώ ταυτόχρονα αλληλεπιδρά με ιόντα Fe^{2+} , δημιουργώντας ρίζες t-BO•. Οι δυο αυτοί



μηχανισμοί συνδέονται με την οξείδωση κυτταρικών μακρομορίων (38).

Εικόνα 27: Μηχανισμός δράσης του t-BOOH

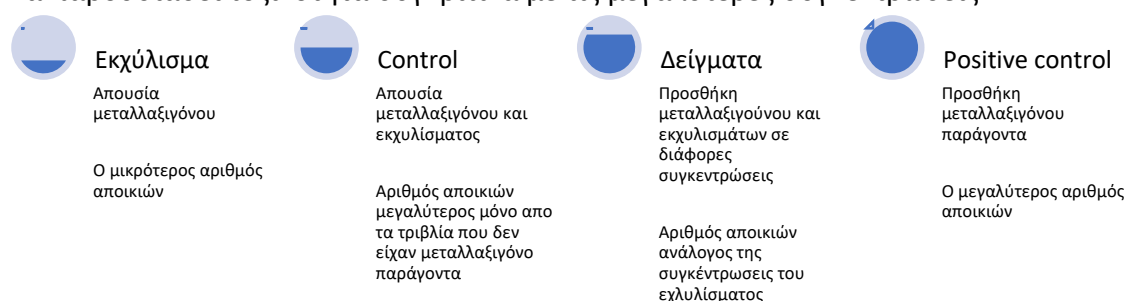
3.3.3 Μέθοδος εκτίμησης της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης των ανθέων ελιάς

Το πρώτο βήμα είναι η μόλυνση του θρεπτικού υλικού (Nutrient Broth) με το βακτηριακό στέλεχος *Salmonella typhimurium* TA102 και επωάστηκε στους 37°C μέχρι η οπτική απορρόφηση (540 nm) να φτάσει το 0.1-0.2 (αντιστοιχεί σε 1-2x10⁹ αποικίες ανά mL), οπότε γνωρίζουμε ότι η καλλιέργεια είναι στην εκθετική φάση αύξησης της.

Στη συνέχεια 100 μL από την καλλιέργεια προστέθηκαν σε 2 mL διαλύματος Top Agar (NaCl, Agar & ίχνη ιστιδίνης) καθώς και 50 μL t-BOOH (με 0.4 mM τελική συγκέντρωση) και 50 μL εκχυλίσματος ανθέων ελιάς σε διάφορες συγκεντρώσεις. Το διάλυμα διατηρήθηκε στους 45°C ώστε να μην πήξει το άγαρ αλλά και για να μην υποστούν ανεπανόρθωτη βλάβη τα βακτήρια από τη θερμοκρασία. Ακολούθως, το διάλυμα επιστρώθηκε σε τρυβλίο που είχε θρεπτικό υπόστρωμα Glucose Minimal άγαρ (περιέχει γλυκόζη, MgSO₄, κιτρικό οξύ, K₂HPO₄ και Na₂NH₂PO₄).

Έπειτα από την επίστρωση αλλά και τη στερεοποίηση του διαλύματος, τα τρυβλία τοποθετήθηκαν ανεστραμμένα σε κλίβανο στους 37°C για 48 ώρες και τέλος καταμετρήθηκαν οι αποικίες ανά τρυβλίο. Κάθε συγκέντρωση εξετάστηκε εις τριπλούν και έγιναν δύο επαναλήψεις του πειράματος. Ο αρνητικός μάρτυρας δεν περιείχε οξειδωτικό παράγοντα ούτε εκχύλισμα, ενώ ο θετικός μάρτυρας δεν περιείχε εκχύλισμα. Τέλος, εξετάστηκε και η επίδραση των εκχυλισμάτων ανθών στα βακτήρια απουσία του t-BOOH στις 2 μεγαλύτερες συγκεντρώσεις κάθε εκχυλίσματος.

Η συγκέντρωση του t-BOOH επιλέχθηκε μετά από εξέταση διαφόρων συγκεντρώσεων του (0.2, 0.4, 0.8 και 1.6 mM/τρυβλίο) ως προς την μεταλλαξιγόνο δράση στα βακτήρια. Η συγκέντρωση 0,4 mM/τρυβλίο διπλασίασε τις παρατηρούμενες επαναμεταλλάξεις σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα, χωρίς όμως να παρουσιάσει τοξικότητα συγκριτικά με τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις.



Εικόνα 28: Αναμενόμενα αποτελέσματα.

3.3.4 Ποσοτικός προσδιορισμός της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης

Η τιμή IC₅₀ υπολογίστηκε για κάθε εκχύλισμα ανθών ελιάς με βάση το διάγραμμα αναστολής/συγκέντρωσης. Η αναστολή της μεταλλαξιγόνου δράσης του t-BOOH από τα εκχυλίσματα υπολογίστηκε από τον αριθμό των αποικιών για κάθε τρυβλίο σύμφωνα με τον τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = \left(\frac{A_{\theta} - A_{\delta}}{A_{\theta} - A_0} \right) \times 100\%$$

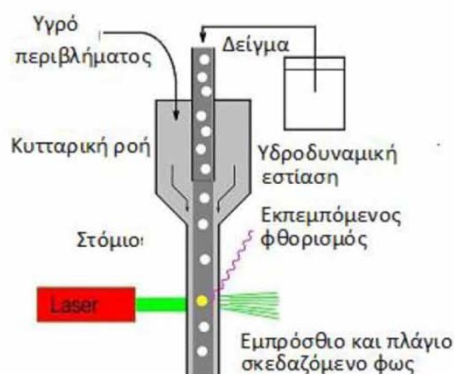
A_θ: Οι επαναμεταλλαγμένες αποικίες His⁺/τρυβλίο του θετικού μάρτυρα (TA102 και t-BOOH).

A_δ: Οι επαναμεταλλαγμένες αποικίες His⁺/τρυβλίο παρουσία του εκχυλίσματος ανθών ελιάς (TA102, εκχύλισμα ανθών και t-BOOH).

A₀: Οι επαναμεταλλαγμένες αποικίες His⁺/τρυβλίο στον αρνητικό μάρτυρα (TA102).

3.4 Κυτταρομετρία ροής

Η μέθοδος της κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry, FC) είναι μια αυτοματοποιημένη κυτταρική ανάλυση που δίνει την δυνατότητα μέτρησης μεμονωμένων σωματιδίων (κυττάρων, πυρήνων, χρωμοσωμάτων κλπ) όπως διέρχονται σε νηματική ροή από ένα σταθερό σημείο όπου προσπίπτει μία δέσμη φωτός. Η εμπρόσθια σκέδαση (Forward Scattering) "FSC" σχετίζεται με τον όγκο του

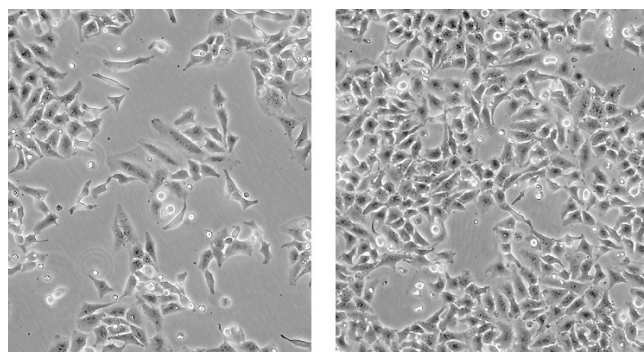


κυττάρου και η πλάγια σκέδαση (Side Scattering) "SSC" εξαρτάται από την εσωτερική πολυπλοκότητα των σωματιδίων (πχ, από το σχήμα του πυρήνα, από τον αριθμό των κυτταροπλασματικών σωματιδίων ή την αδρότητα της κυτταρικής μεμβράνης).

Εικόνα 29:Υδροδυναμική εστίαση του δείγματος μέσα από θάλαμο ροής.

3.4.1 Κυτταρική σειρά HeLa

Η κυτταρική σειρά HeLa αποτελεί μια καρκινική σειρά προερχόμενη από κύτταρα του τραχήλου της μήτρας. Τα κύτταρα HeLa πήραν το όνομά τους από τα αρχικά της πρώτης ασθενούς που απομονώθηκαν κύτταρα με τον συγκεκριμένο τύπο καρκίνου (Henrietta Lacks) το 1950. Η Henrietta Lacks, Αφροαμερικάνα του Αμερικάνικου Νότου που εργάζονταν ως καπνεργάτρια, πέθανε το 1951 σε ηλικία 31 ετών από καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Ο γιατρός της κράτησε δείγμα των καρκινικών κυττάρων, τα οποία καλλιέργησαν στο εργαστήριο. Πρόκειται για μία

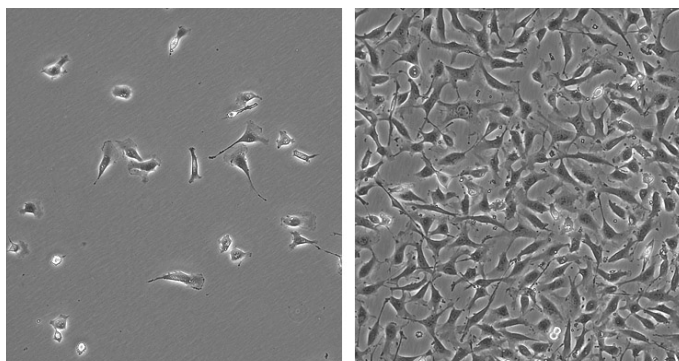


αθάνατη κυτταρική σειρά, που αποτελεί τη πρώτη ανθρώπινη κυτταρική σειρά, που αναπτύχθηκε σε κυτταρική καλλιέργεια και χρησιμοποιείται μέχρι και σήμερα από ερευνητές σε όλο τον κόσμο για διάφορα πειράματα.

Εικόνα 30: Κύτταρα HeLa όπως φαίνονται στο μικροσκόπιο.

3.4.2 Κυτταρική σειρά EA.hy926

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 δημιουργήθηκαν στο εργαστήριο έπειτα από σύντηξη 2 διαφορετικών κυτταρικών σειρών. Οι σειρές αυτές ήταν τα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα ομφάλιου φλέβας (HUVECs) και τα καρκινικά κύτταρα ανθρώπου της σειράς A549. Τα EA.hy926 χρησιμοποιούνται σε ένα μεγάλο φάσμα εργαστηριακών μελετών σήμερα ως ένα *ex vivo* μοντέλο για την μελέτη διάφορων φυσιολογικών καταστάσεων (βασική έρευνα) όσο και παθολογικών διεργασιών,

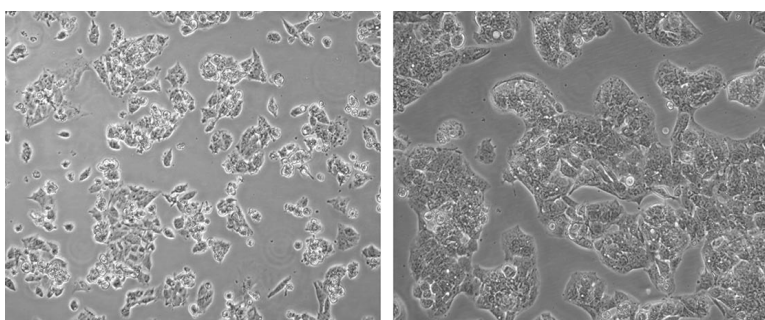


ειδικά στον τομέα της έρευνας της αγγειογένεσης και της αναζήτησης θεραπείας (εφαρμοσμένη έρευνα) (39).

Εικόνα 31:Κύτταρα EA.hy926.

3.4.3 Κυτταρική σειρά HepG2

Τα ηπατοκύτταρα HepG2 θυμίζουν πολύ επιθηλιακά κύτταρα και αναπτύσσονται με την μορφή μονοστιβάδας, σχηματίζοντας μικρότερα συσσωματώματα. Η σειρά κυττάρων HepG2 είναι αθάνατη καθώς προήλθε από ηπατικό ιστό ενός 15χρονου αγοριού (Καυκάσιου) ο οποίος είχε καλά διαφοροποιημένο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Τα κύτταρα αυτά είναι ένα χρήσιμο μοντέλο για την μελέτη τόσο του μεταβολισμού του ήπατος αλλά και της τοξικότητας



Εικόνα 32: Κύτταρα HepG2.

των ξеноβιοτικών παραγόντων. Τα κύτταρα HepG2 χρησιμοποιούνται επιπλέον και για την μελέτη στοχοθέτησης διάφορων φαρμάκων. (40)

3.4.4 Καλλιέργεια κυττάρων

Τα κύτταρα καλλιεργούνται σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα 4.

Πίνακας 3: Καλλιέργεια κυττάρων.

	HeLa	EA.hy926	HepG2
Φλάσκες	25cm ²	25cm ²	25cm ²
Θρεπτικό υλικό	DMEM*	DMEM* + HEPES	DMEM*
FBS	10%	10%	10%
L-γλουταμίνη	1%	1%	1 %
Διάλ. πενικιλίνης (100 units / ml) και στρεπτομυκίνης (100μg / ml)	1%	1%	1%
Θερμοκρασία	37°C	37°C	37°C
CO ₂	5%	5%	5%
Διαδικασία επανακαλλιέργειας			
Κάλυψη φλάσκας με κύτταρα για επανακαλλιέργεια	~80%	~80%	~80%
Θρυψίνη 0,25%	0,5mL	0,5mL	0,5mL
Επώαση για στον κλίβανο	5 λεπτά	3 λεπτά	5 λεπτά

*DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

Όλοι οι χειρισμοί στα κύτταρα έλαβαν χώρα σε συσκευή (Hood) καθέτου νηματικής ροής.

3.4.5 Προσδιορισμός της κυτταροτοξικής δράσης του εκχυλίσματος με τη μέθοδο ΧΤΤ

Βασικός σκοπός της εργασίας ήταν να διερευνηθεί η επίδραση των εκχυλισμάτων των ανθέων ελιάς στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των κυττάρων. Για τον σκοπό αυτό ήταν αδήριτη ανάγκη να προσδιοριστεί η συγκέντρωση κάθε εκχυλίσματος ανθέων που προκαλεί κυτταροτοξικότητα για κάθε μία από τις τρεις κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν. Ο υπολογισμός του κυτταρικού θανάτου έγινε με την μέθοδο ΧΤΤ.

Η μέθοδος ΧΤΤ αποτελεί μια χρωματομετρική δοκιμασία όπου ποσοτικοποιεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη βιωσιμότητα των κυττάρων και βασίζεται στον μεταβολισμό του τετραμωνιακού άλατος ΧΤΤ προς την αντίστοιχη φορμαζάνη από τις μιτοχονδριακές αφυδρογονάσες μόνο των ζωντανών κυττάρων. Η φορμαζάνη απαντάτε με πορτοκαλί χρώμα και μέγιστο απορρόφησης της στα 450 nm. Η τοξική

επίδραση κάποιου εκχυλίσματος φαίνεται με μείωση της παρατηρούμενης απορρόφησης.



Εικόνα 33: Μετατροπή του ΧΤΤ στην αντίστοιχη φορμαζάνη.

3.4.6 Πειραματική διαδικασία

Στην Πρώτη φάση τα κύτταρα απομακρύνονται από τη φλάσκα μέσω της διαδικασίας της θρυψινοποίησης. Ακολουθεί μέτρηση τους σε πλάκα Neubauer όπου 10^4 κύτταρα τοποθετούνται σε κάθε πηγαδάκι τρυβλίου 96-θέσεων, και συμπληρώνετε με DMEM (+ FBS) και επωάζονται στον κλίβανο για 24 ώρες στους 37°C . Μετά το πέρας των ωρών, το θρεπτικό υλικό αλλάζει με DMEM που περιέχει αντί για FBS τις διάφορες συγκεντρώσεις ανθέων ελιάς και επωάζονται για άλλες 24 ώρες στους 37°C . Το FBS δεν το χορηγούμε μαζί με το εκχύλισμα καθώς μπορεί να αλληλοεπιδράσουν και να χαθεί η δραστηριότητά τους. Στην τελευταία φάση προστίθεται το αντιδραστήριο ΧΤΤ, ακολουθεί επώαση για 4 ώρες στους 37°C σε κλίβανο και φωτομέτρηση τόσο στα 450 όσο και στα 630 nm σε ELISA plate reader και με την βοήθεια του λογισμικού επεξεργασίας Gen5. Η μέτρηση που πραγματοποιείται στα 630 nm γίνεται με σκοπό την κανονικοποίηση των τιμών μεταξύ των πηγαδιών του τρυβλίου, ενώ δεν απορροφά η φορμαζάνη σε αυτό το μήκος κύματος. Οι τιμές που εξήχθησαν στα 630 nm αφαιρέθηκαν από τις απορροφήσεις των τιμών στα 450 nm.

Σε κάθε πλάκα 96-θέσεων υπήρχαν και μάρτυρες όπου δεν προστέθηκε εκχύλισμα ανθέων ελιάς στα κύτταρα, ενώ σε κάθε συγκέντρωση ανθέων περιλαμβανόταν και το αντίστοιχο τυφλό, το οποίο δεν περιείχε κύτταρα αλλά μόνο θρεπτικό προκειμένου να αφαιρεθεί τυχόν απορρόφηση που οφείλεται στο εκχύλισμα και το θρεπτικό. Πραγματοποιήθηκαν 3 πειράματα για κάθε εκχύλισμα ανθέων και κάθε συγκέντρωση ελέγχθηκε σε κάθε πείραμα 3 φορές.

Η %-βιωσιμότητα των κυττάρων μετά από την επίδραση των ανθέων ελιάς προσδιορίστηκε ως εξής:

$$\% \text{ Βιωσιμότητα} = \frac{(\text{Abs μάρτυρα} - \text{Abs δείγματος})}{\text{Abs μάρτυρα}} \times 100\%$$

Abs μάρτυρα: Η οπτική απορρόφηση του μάρτυρα

Abs δείγματος: Η οπτική απορρόφηση του δείγματος

3.4.7 Προσδιορισμός των επιπέδων της GSH με κυτταρομετρία ροής

Η μέτρηση των επιπέδων της γλουταθειόνης στα κύτταρα έπειτα από την χορήγηση των εκχυλισμάτων ανθέων ελιάς έγινε με την βοήθεια της χρωστικής mercury orange, η οποία συνδέεται κατευθείαν στην GSH.

Τα κύτταρα απομακρύνονται από την φλάσκα και μετά από μία σειρά φυγοκεντρήσεων και πλύσεων επαναδιαλυτοποιούνται σε PBS και χορηγούνται 10μM mercury orange ενώ ακολουθεί επώαση στον κλίβανο στους 37°C για 30 min. Στην συνέχεια ακολουθεί νέα πλύση, φυγοκέντρηση (300 g, 5 min, 4°C) και επαναδιάλυτοποίηση του ιζήματος σε PBS. Τέλος έγινε μέτρηση με τη χρήση κυτταρομέτρου ροής FACScalibur με φάσμα διέγερσης στα 488 και εκπομπής 580 nm. Τα FSC, SSC προσδιορίστηκαν και καθόρισαν το μέγεθος και την πολυπλοκότητα των κυττάρων αντίστοιχα. Συνολικά μετρήθηκαν 10.000 κύτταρα για κάθε δείγμα, ενώ η ένταση του φθορισμού της χρωστικής υπολογίστηκε σε λογαριθμική κλίμακα με τη χρήση του λογισμικού BD Cell Quest. Το πείραμα επαναλήφθηκε 3 φορές.

3.4.8 Προσδιορισμός των επιπέδων των ROS με κυτταρομετρία ροής

Η μέτρηση των επιπέδων των δρασικών μορφών οξυγόνου στα κύτταρα έπειτα από την χορήγηση των εκχυλισμάτων ανθέων ελιάς έγινε με την βοήθεια της χρωστικής DCF-DA, η οποία αρχικά αποακετυλιώνεται μέσω ενδογενών εστερασών και μετέπειτα οξειδώνεται από τις ROS στην φθορίζουσα DCF.

Τα κύτταρα απομακρύνονται από την φλάσκα και μετά από μία σειρά φυγοκεντρήσεων και πλύσεων επαναδιαλυτοποιούνται σε PBS και χορηγούνται



Εικόνα 34: : Το κυτταρόμετρο ροής FACScalibur του εργαστηρίου φυσιολογίας ζωικών οργανισμών όπου έγιναν οι μετρήσεις καθώς και ο υπολογιστής με το λογισμικό BD Cell Quest.

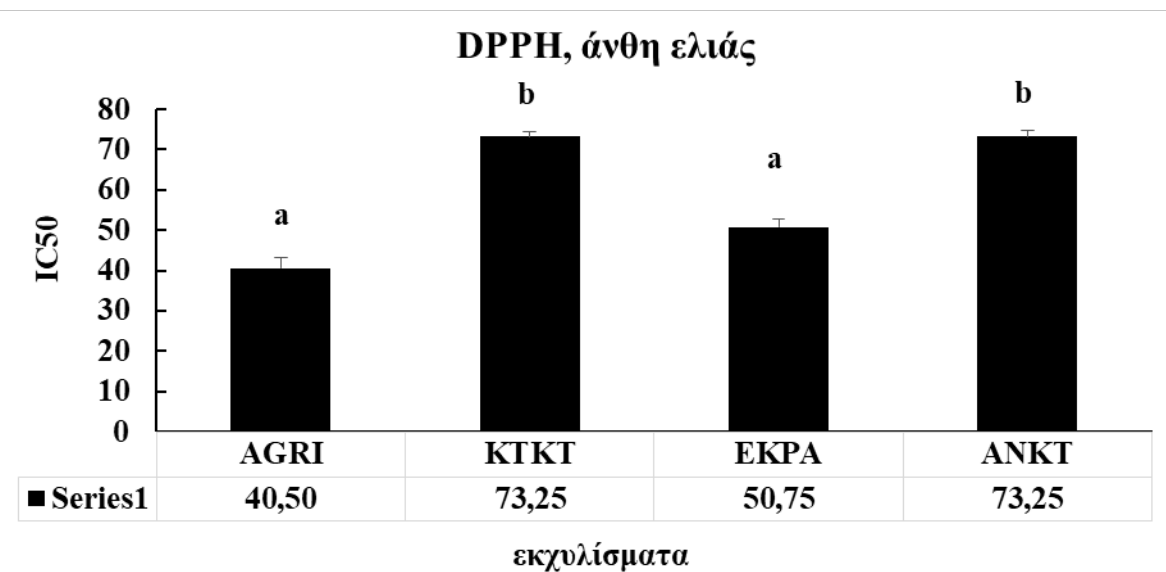
10μM DCF-DA ενώ ακολουθεί επώαση στον κλίβανο στους 37°C για 30 min. Στην συνέχεια ακολουθεί νέα πλύση, φυγοκέντρηση (300 g, 5 min, 4°C) και επαναδιάλυτοποίηση του ιζήματος σε PBS. Τέλος έγινε μέτρηση με τη χρήση κυτταρομέτρου ροής FACScalibur με φάσμα διέγερσης 488 και εκπομπής και 530 nm. Τα FSC, SSC προσδιορίστηκαν και καθόρισαν το μέγεθος και την πολυπλοκότητα των κυττάρων

αντίστοιχα. Συνολικά μετρήθηκαν 10.000 κύτταρα για κάθε δείγμα, ενώ η ένταση του φθορισμού της χρωστικής υπολογίστηκε σε λογαριθμική κλίμακα με τη χρήση του λογισμικού BD Cell Quest. Το πείραμα επαναλήφθηκε 3 φορές.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω δέσμησης της ρίζας DPPH

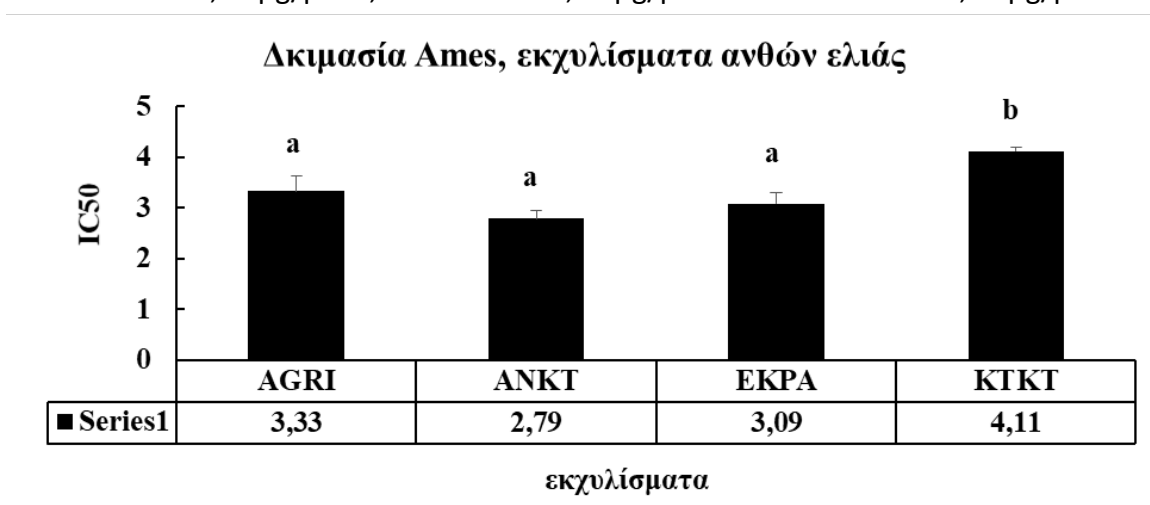
Με τη μέθοδο DPPH, μετρήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα τριών πολυφαινολικών εκχυλισμάτων ανθών ελιάς, με τις κωδικές ονομασίες ANKT, ΚΤΚΤ, ΕΚΡΑ, και ενός πολυφαινολικού εκχυλίσματος ανθών αγριελιάς με την κωδική ονομασία ΑΓΡΙ. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως IC₅₀, δηλαδή τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος που απαιτείται για την εξουδετέρωση της ρίζας στο 50%. Όσο μικρότερη η τιμή του IC₅₀, τόσο πιο ισχυρή η αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος. Τα αποτελέσματα, έδειξαν πως τα ΑΓΡΙ και ΕΚΡΑ είχαν στατιστικά σημαντική πιο ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα συγκριτικά με τα ΚΤΚΤ και ΑΝΚΤ, καθώς εμφάνισαν IC₅₀ στα 40,50 και 50,75 μg εκχυλίσματος αντίστοιχα. Τα ΚΤΚΤ και ΑΝΚΤ εμφάνισαν IC₅₀ στα 73,25 μg εκχυλίσματος. Οι διαφορές μεταξύ ΑΓΡΙ – ΕΚΡΑ και ΚΤΚΤ – ΑΝΚΤ, δεν είναι στατιστικά σημαντικές.



Εικόνα 35: Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων ανθών ελιάς μέσω δέσμησης της ρίζας DPPH. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως \pm SEM. Οι μετρήσεις έγιναν τρεις ανεξάρτητες φορές ($n=3$). Συγκρίσεις τιμών με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ($p < 0,05$).

4.2 Μέτρηση αντιμεταλλαξιγόνου δράσης με τη δοκιμή Ames.

Με την δοκιμή Ames, έγινε η μέτρηση της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης των εκχυλισμάτων ανθών ελιάς και αγριελιάς, έναντι του μεταλλαξιγόνου παράγοντα tert-BOOH σε στελέχη *Salmonella Typhimurium* TA102. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως IC50, δηλαδή τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος σε µg/plate, που απαιτείται για την εξουδετέρωση της μεταλλαξιγένεσης στο 50%. Όσο μικρότερη η τιμή του IC50, τόσο πιο ισχυρή η αντιμεταλλαξιγόνος ικανότητα του εκχυλίσματος. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως τα εκχυλίσματα AGRI, ANKT, EKPA είχαν ισότιμη αντιμεταλλαξιγόνο δράση μεταξύ τους, ενώ παράλληλα φαίνεται να είναι στατιστικά σημαντικά ($p < 0,05$) πιο ισχυρά από το ΚΤΚΤ. Συγκεκριμένα το AGRI εμφάνισε αντιμεταλλαξιγόνο δράση στα 3,33 µg/plate, το ANKT στα 2,79 µg/plate, το EKPA στα 3,09 µg/plate και το ΚΤΚΤ στα 4,11 µg/plate.



Εικόνα 36: Αντιμεταλλαξιγόνος δράση εκχυλισμάτων ανθών ελιάς και αγριελιάς, όπως προσδιορίστηκε με τη δοκιμασία Ames. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως \pm SEM. Οι μετρήσεις έγιναν τρεις ανεξάρτητες φορές ($n=3$). Συγκρίσεις τιμών με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ($p < 0,05$).

4.3 Κυτταροκαλλιέργειες

Η δράση των εκχυλισμάτων ανθών ελιάς και αγριελιάς εκτιμήθηκε και στην επίδραση τους στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό τριών διαφορετικών ανθρώπινων κυτταρικών σειρών. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν καρκινικά κύτταρα του ήπατος (HepG2), καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας (HeLa) και ενδοθηλιακά κύτταρα (Ea.hy926).

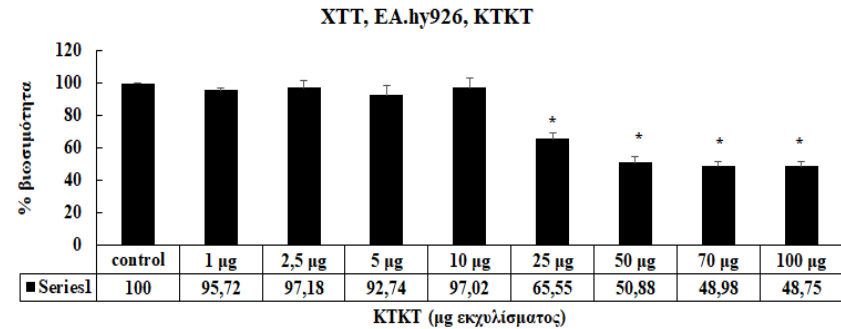
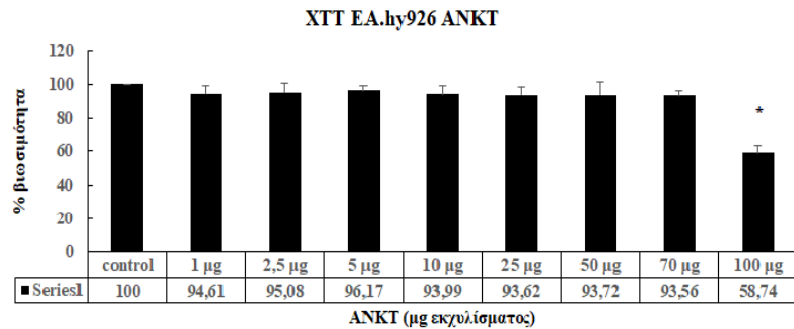
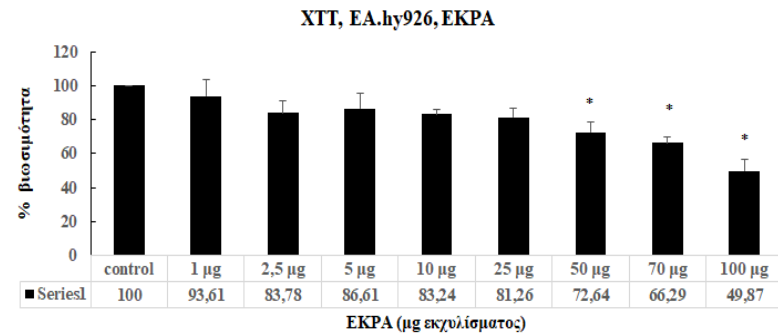
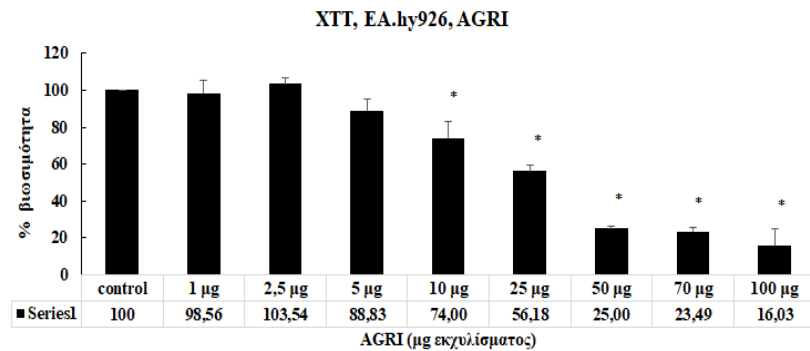
4.3.1 Μέτρηση Κυτταροτοξικότητας με το kit ΧΤΤ.

Προκειμένου να μην γίνει χορήγηση τοξικών συγκεντρώσεων των εκχυλισμάτων, έγινε εκτίμηση της βιωσιμότητας των κυττάρων με το kit ΧΤΤ. Συγκεκριμένα χορηγήθηκε εύρος συγκεντρώσεων των εκχυλισμάτων σε όλες τις κυτταρικές σειρές, για 24 ώρες και έπειτα μετρήθηκε η βιωσιμότητά τους (πίνακας 5).

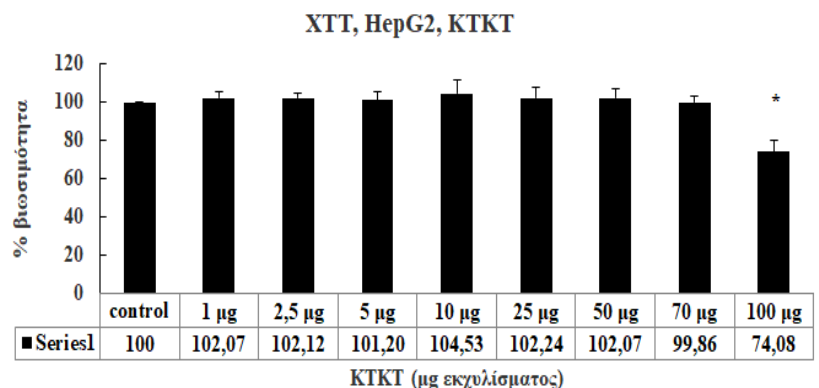
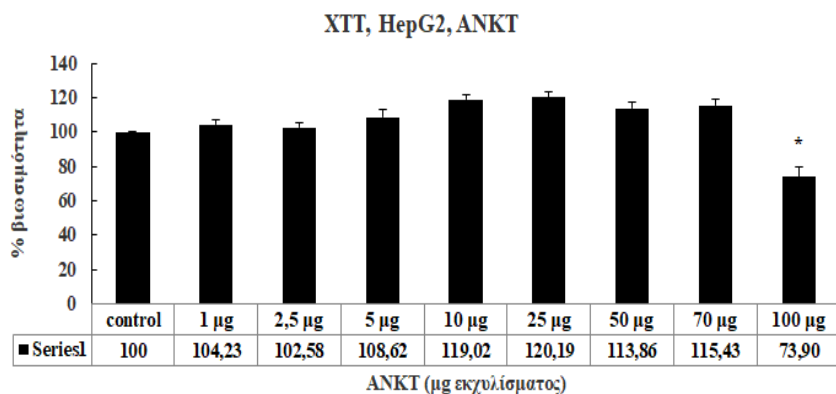
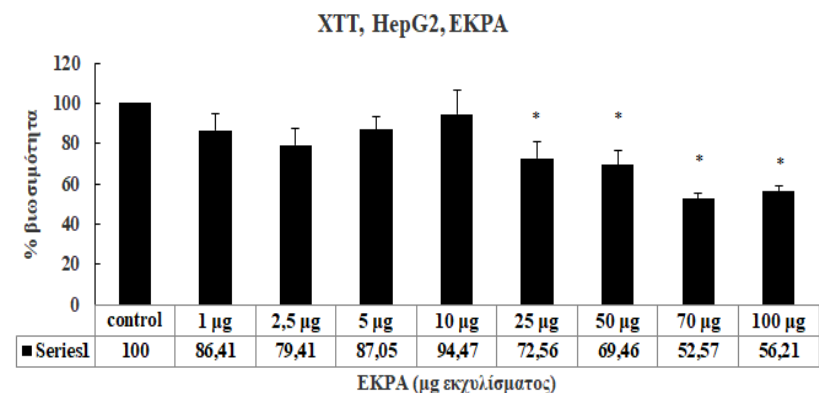
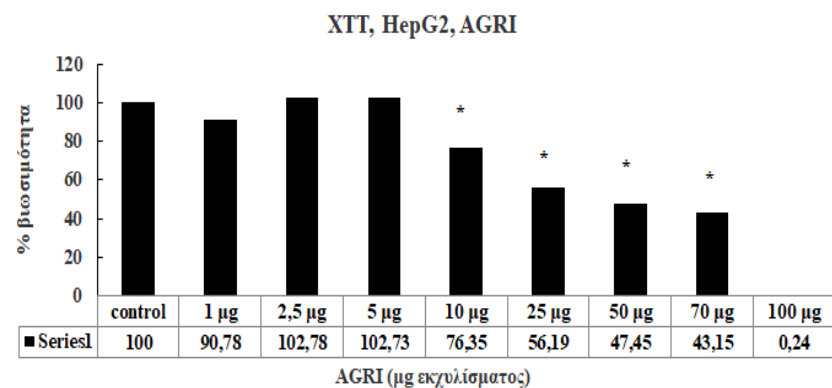
Πίνακας 4: Στον πίνακα παρουσιάζονται συνολικά όλες οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για να γίνει έλεγχος στη βιωσιμότητα των κυττάρων (στήλη 3). Η συγκέντρωση στην οποία εμφανίστηκε κυτταροτοξικότα (στήλη 4). Το εύρος των συγκεντρώσεων που χορηγήθηκαν στα κύτταρα προκειμένου να γίνει έλεγχος στην επίδρασή τους στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό των κυττάρων (στήλη 5). Τα εκχυλίματα επώαστηκαν με τα κύτταρα για 24 ώρες.

Κυτταρικές σειρές	Εκχυλίσματα	Εύρος συγκεντρώσεων για έλεγχο κυτταροτοξικότητας (μg εκχυλίσματος)	Κυτταροτοξικότητα (μg εκχυλίσματος)	Εύρος μη κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων (μg εκχυλίσματος)
EA.hy926	AGRI	1-100	10	0,5-5
	ANKT		100	25-90
	EKPA		50	5-40
	KTKT		25	2,5-20
HeLa	AGRI	1-100	50	5-45
	ANKT		100	25-90
	EKPA		25	2,5-20
	KTKT		100	25-90
HepG2	AGRI	1-100	10	0,5-5
	ANKT		100	20-80
	EKPA		25	1-10
	KTKT		100	20-80

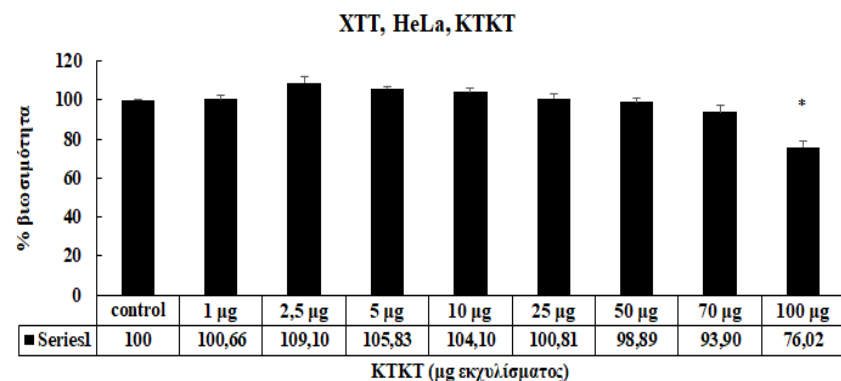
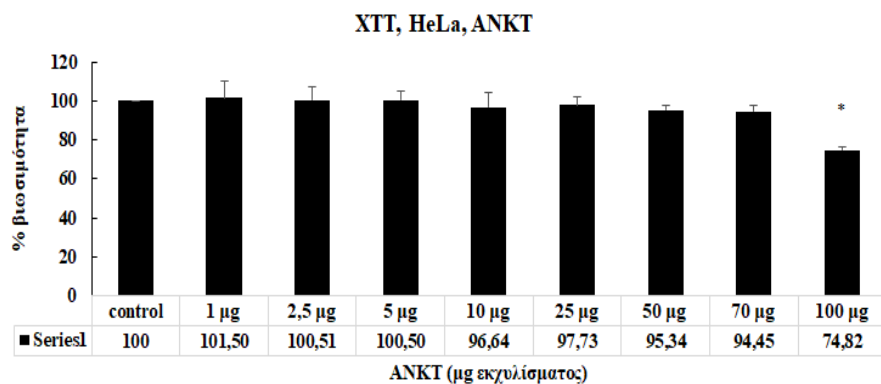
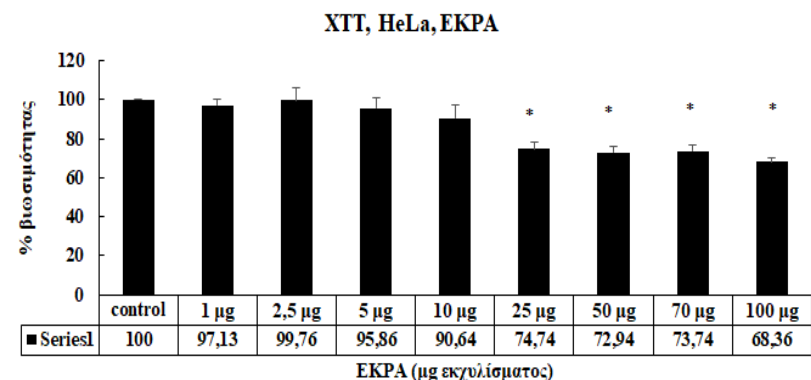
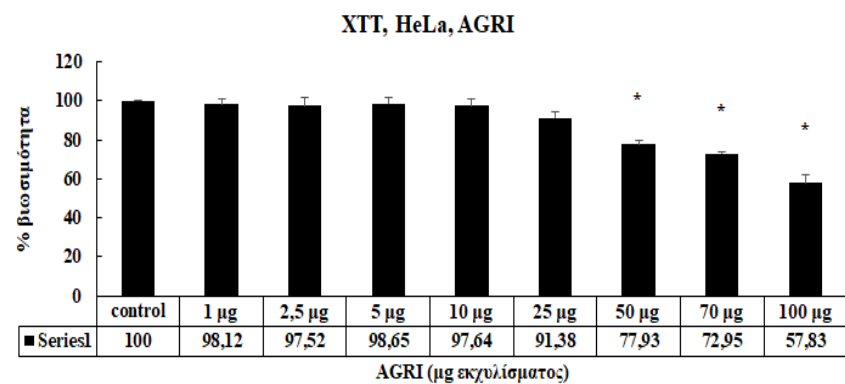
Στα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα από τον έλεγχο της κυτταροτοξικότητας με ΧΤΤ.



Διάγραμμα 1: Προσδιορισμός κυτταροτοξικότητας των εκχυλισμάτων AGRI, ANKT, EKPA, ΚΤΚΤ στην κυτταρική σειρά EA.hy926, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης των εκχυλισμάτων, με τη μέθοδο ΧΤΤ. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control και παρουσιάζονται ως mean ± SEM, (n=6). *p<0,05 στατιστική σημαντικότητα σε συγκριτικά με το control.



Διάγραμμα 2: Προσδιορισμός κυτταροτοξικότητας των εκχυλισμάτων AGRI, ANKT, EKPA, KTKT στην κυτταρική σειρά HepG2, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης των εκχυλισμάτων, με τη μέθοδο XTT. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control και παρουσιάζονται ως mean ± SEM, (n=6). *p<0,05 στατιστική σημαντικότητα σε συγκριτικά με το control.

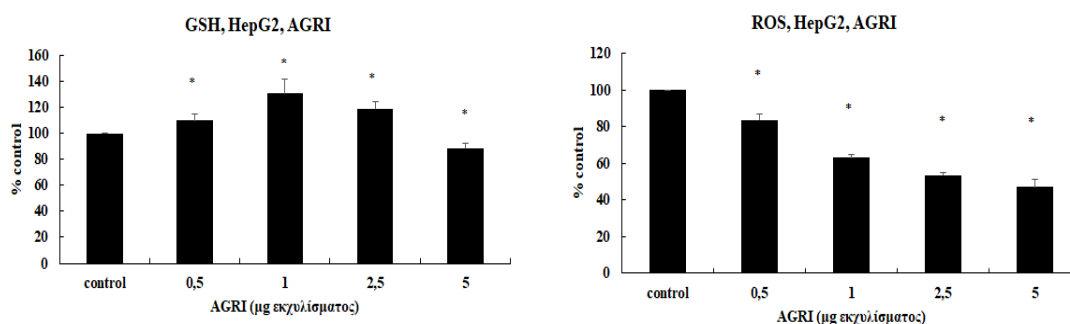


Διάγραμμα 3: Προσδιορισμός κυτταροτοξικότητας των εκχυλισμάτων AGRI, ANKT, EKPA, KTKT στην κυτταρική σειρά HeLa, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης των εκχυλισμάτων, με τη μέθοδο XTT. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control και παρουσιάζονται ως mean ± SEM, (n=6). *p<0,05 στατιστική σημαντικότητα σε συγκριτικά με το control.

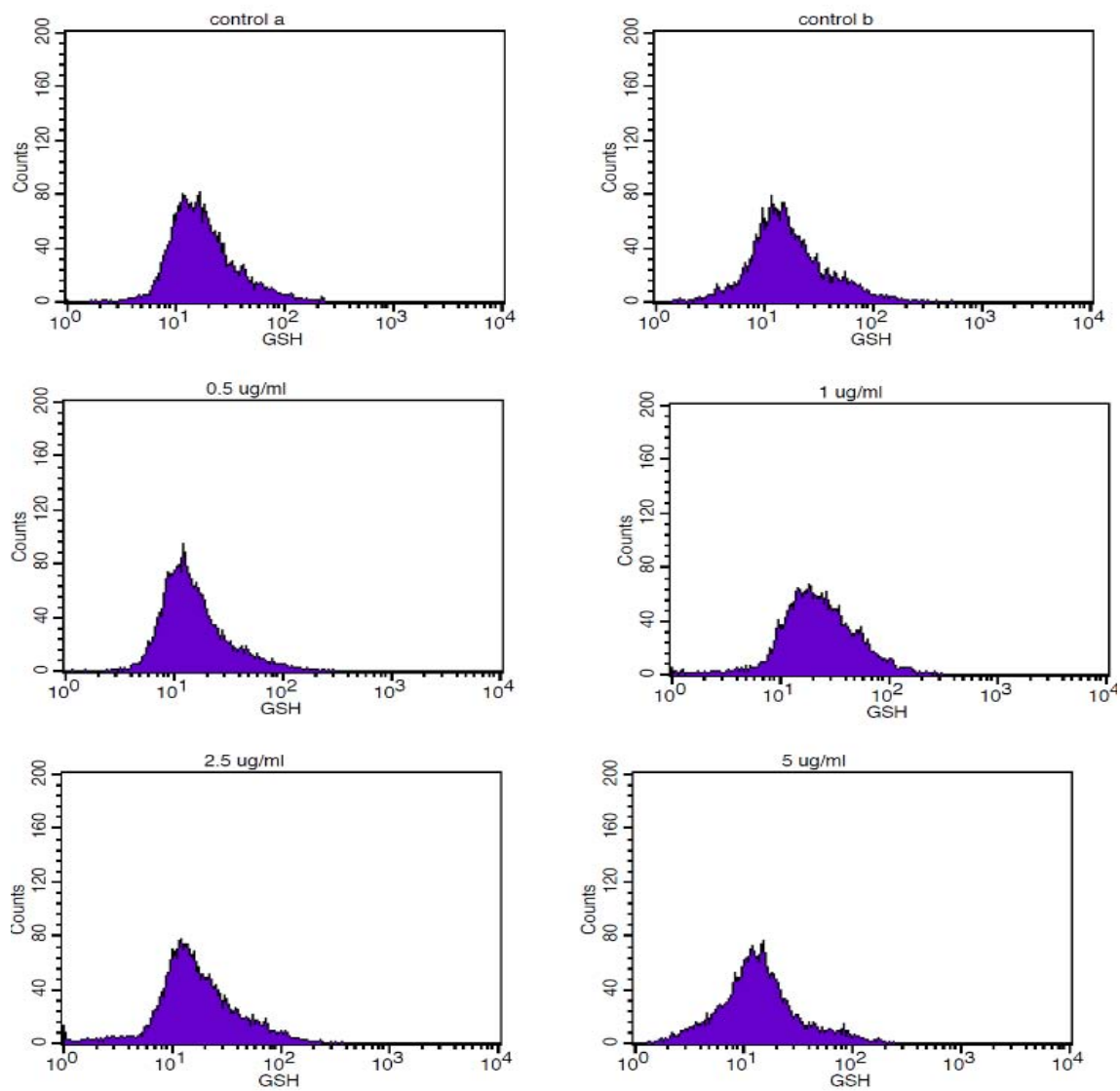
4.3.2 Αποτίμηση της επίδρασης των εκχυλισμάτων ανθών ελιάς και αγριελιάς στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό των κυττάρων μέσω κυτταρομετρίας ροής

Επίδραση των εκχυλισμάτων στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό των HepG2

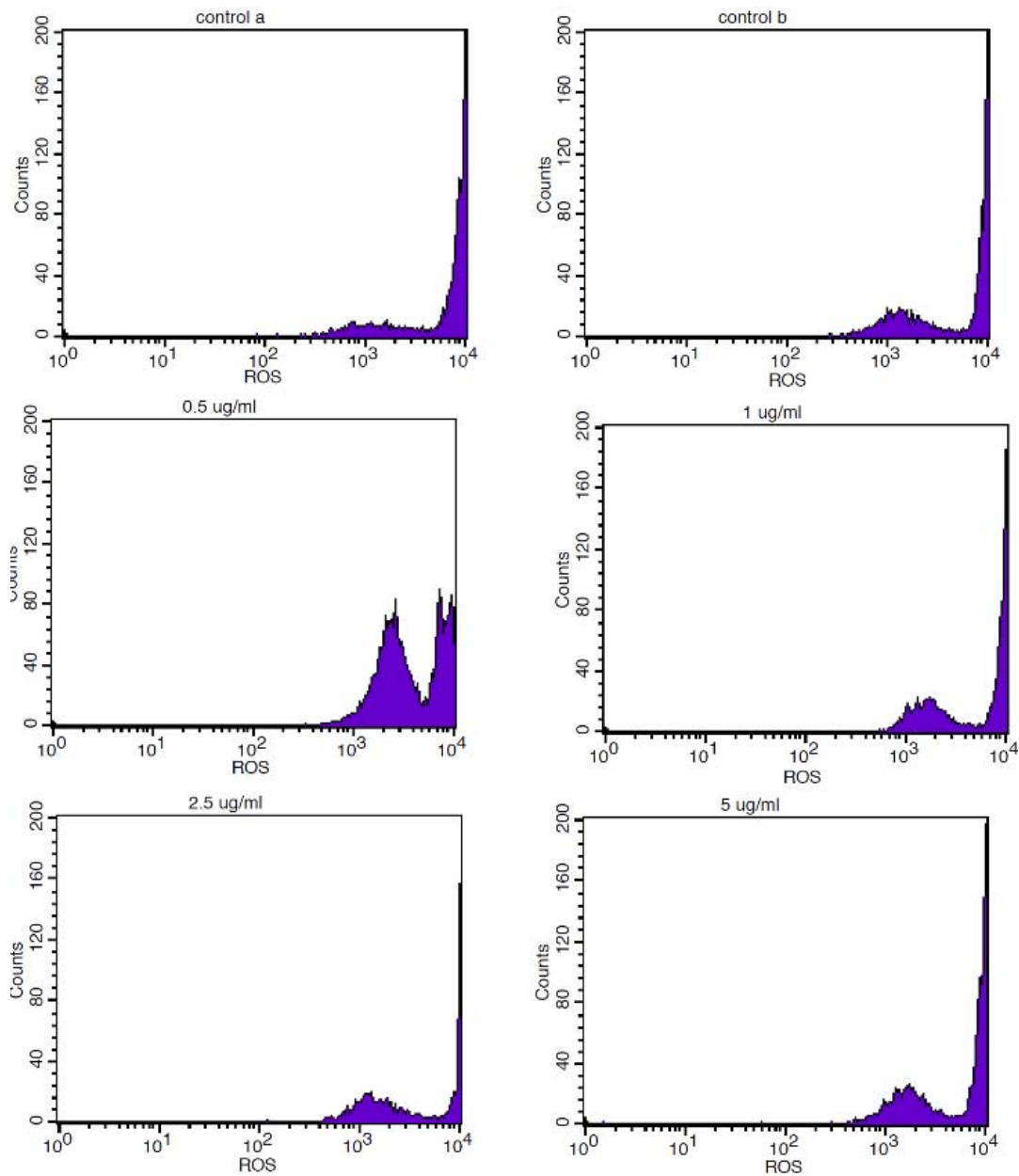
Το AGRI εμφάνισε κυτταροτοξικότητα στα 10 μg εκχυλίσματος, έπειτα από 24 ώρες επώασης με τα HepG2. Συνεπώς οι συγκεντρώσεις που χορηγήθηκαν ήταν 0.5, 1, 2.5 και 5 μg AGRI. Τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής έδειξαν πως το AGRI αύξησε στατιστικώς σημαντικά τα επίπεδα της GSH κατά 10%, 31% και 19% στα 0.5, 1 και 2.5 μg AGRI αντίστοιχα, συγκριτικά με το control. Ενώ στη μεγαλύτερη συγκέντρωση 5 μg εκχυλίσματος παρατηρήθηκε μείωση κατά 12% (διάγραμμα 4). Επιπλέον, τα επίπεδα ROS μειώθηκαν στατιστικά σημαντικά ($p < 0.05$) έπειτα από τη χορήγηση AGRI κατά 16%, 37%, 47% και 53% στα 0.5, 1, 2.5 και 5 μg , συγκριτικά με το control (διάγραμμα 4).



Διάγραμμα 4: Επίδραση εκχυλίσματος AGRI, στα επίπεδα GSH και ROS, στην κυτταρική σειρά HepG2, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control και παρουσιάζονται ως $mean \pm SEM$, ($n=3$). * $p < 0,05$ στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με το control.

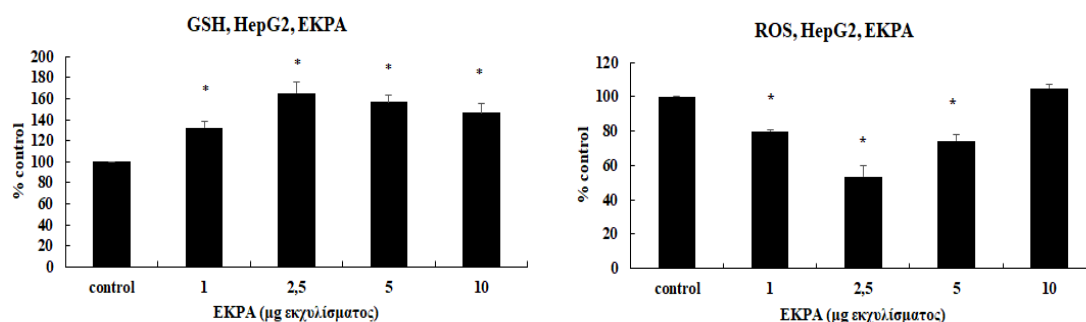


Εικόνα 37: Επίδραση AGRI στα επίπεδα GSH στην κυτταρική σειρά HepG2. Τα ιστογράμματα παρουσιάζουν τον φθορισμό που εκπέμπεται από 10,000 κύτταρα κατά την μέτρηση της GSH, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Ο FL2 αντιπροσωπεύει τον φθορισμό που ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας 488 και 580 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και ως μήκος κύματος εκπομπής.

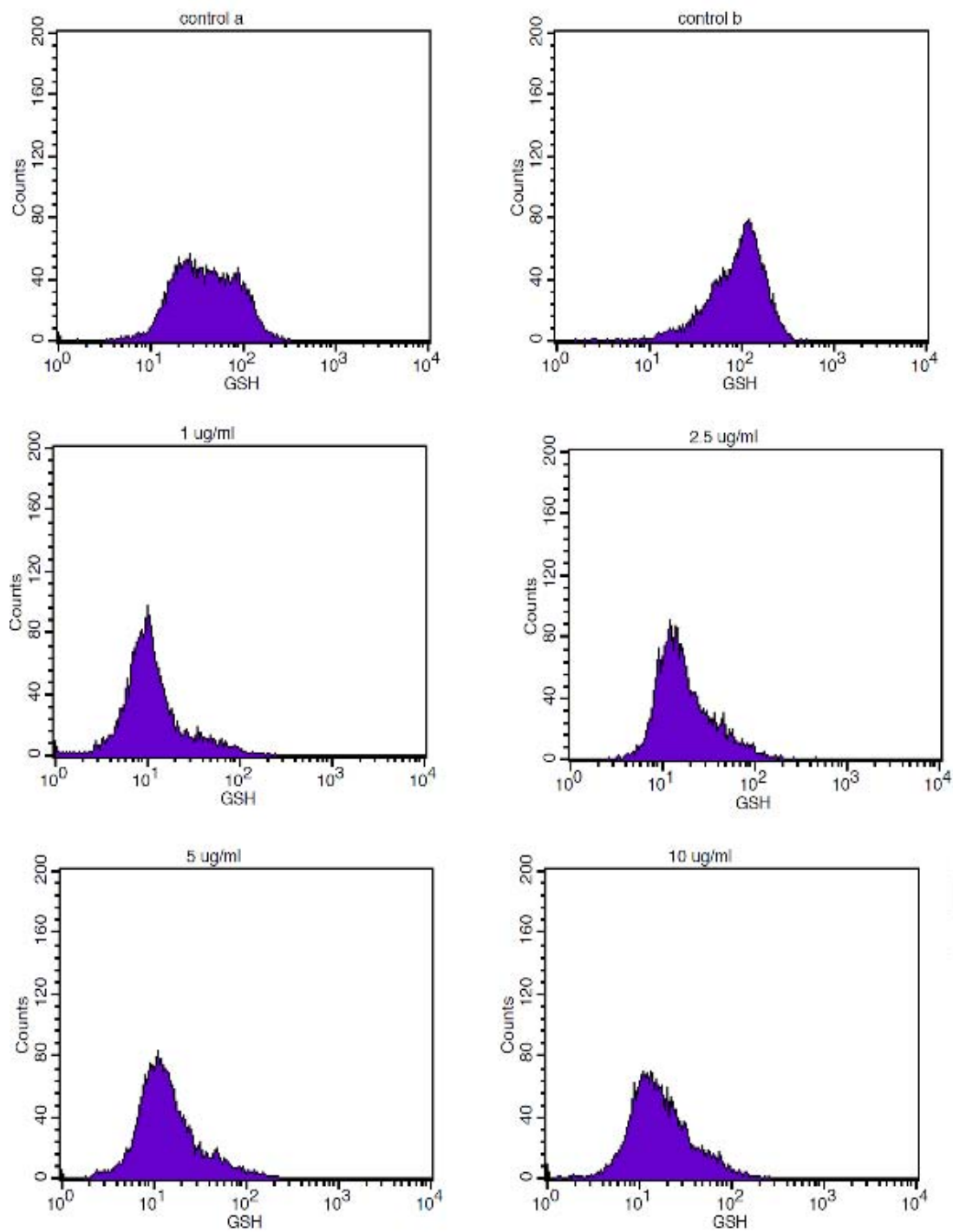


Εικόνα 38: Επίδραση AGRI στα επίπεδα ROS στην κυτταρική σειρά HepG2. Τα ιστογράμματα παρουσιάζουν τον φθορισμό που εκπέμπεται από 10,000 κύτταρα κατά την μέτρηση ROS, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Ο FL2 αντιπροσωπεύει τον φθορισμό που ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας 488 και 530 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και ως μήκος κύματος εκπομπής.

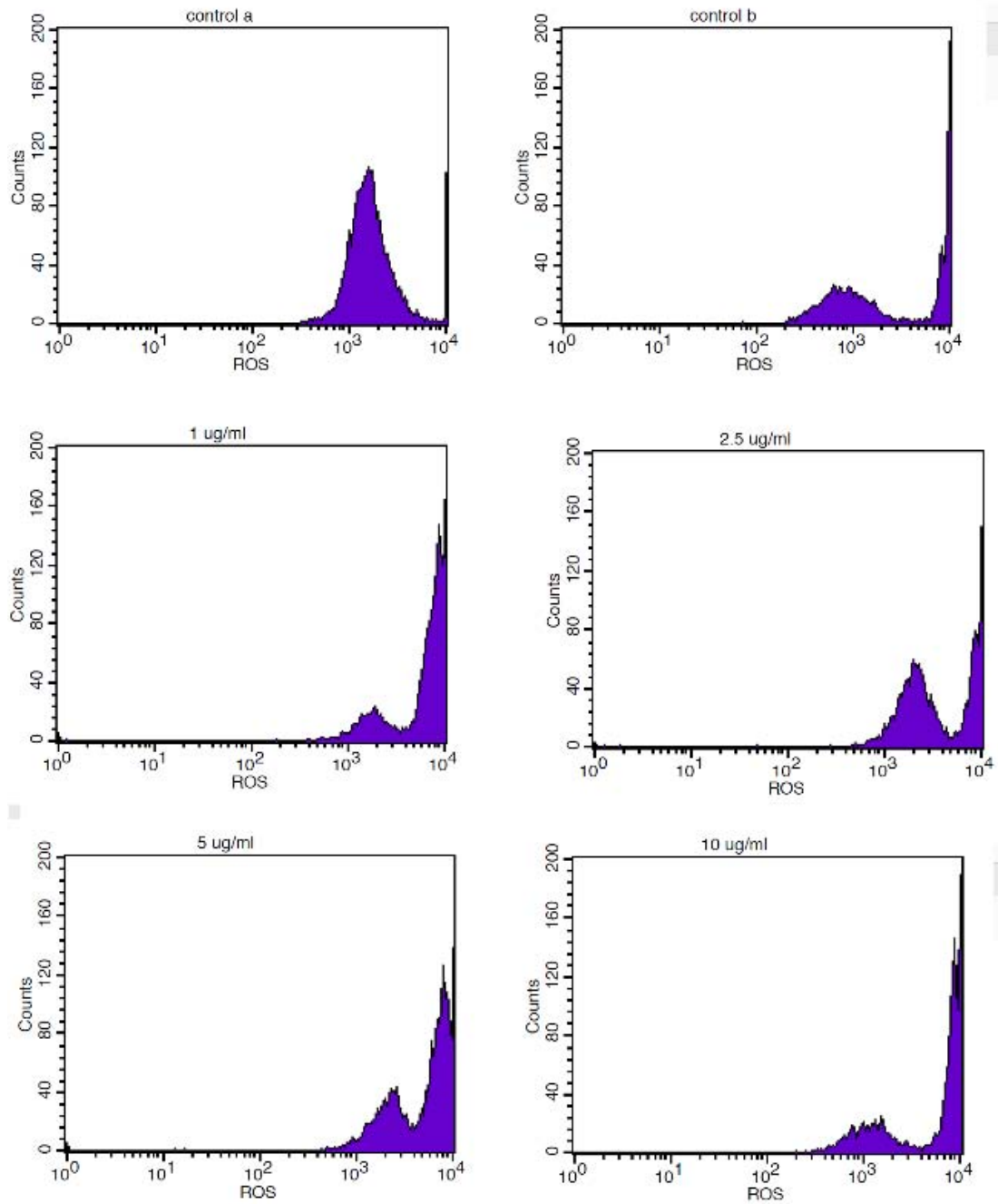
Το ΕΚΡΑ εμφάνισε κυτταροτοξικότητα στα 25 µg εκχυλίσματος, έπειτα από 24 ώρες επώασης με τα HepG2. Συνεπώς οι συγκεντρώσεις που χορηγήθηκαν ήταν 1, 2.5, 5 και 10 µg ΕΚΡΑ. Τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής έδειξαν πως το ΕΚΡΑ αύξησε στατιστικώς σημαντικά τα επίπεδα της GSH κατά 32%, 65%, 57% και 46% στα 1, 2.5, 5 και 10 µg ΕΚΡΑ αντίστοιχα, συγκριτικά με το control (διάγραμμα 5). Επιπλέον, τα επίπεδα ROS μειώθηκαν στατιστικά σημαντικά ($p < 0.05$) έπειτα από τη χορήγηση ΕΚΡΑ κατά 20%, 47% και 26% στα 1, 2.5 και 5 µg, συγκριτικά με το control (διάγραμμα 5).



Διάγραμμα 5: Επίδραση εκχυλίσματος ΕΚΡΑ, στα επίπεδα GSH και ROS, στην κυτταρική σειρά HepG2, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control και παρουσιάζονται ως $mean \pm SEM$, ($n=3$). * $p < 0,05$ στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με το control.

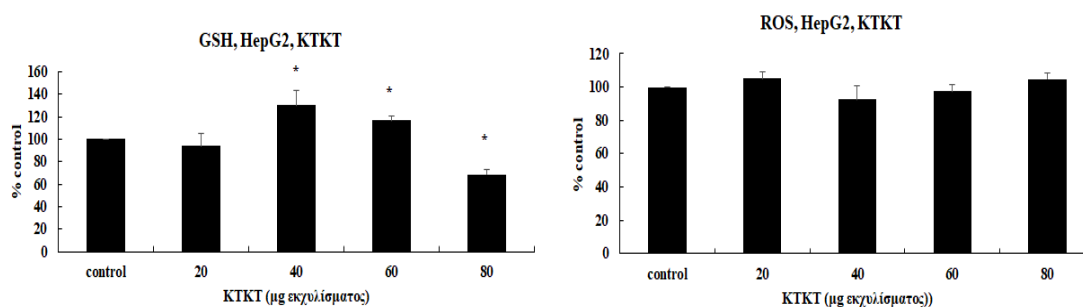


Εικόνα 39: Επίδραση ΕΚΡΑ στα επίπεδα GSH στην κυτταρική σειρά HepG2. Τα ιστογράμματα παρουσιάζουν τον φθορισμό που εκπέμπεται από 10,000 κύτταρα κατά την μέτρηση της GSH, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Ο FL2 αντιπροσωπεύει τον φθορισμό που ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας 488 και 580 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και ως μήκος κύματος εκπομπής.

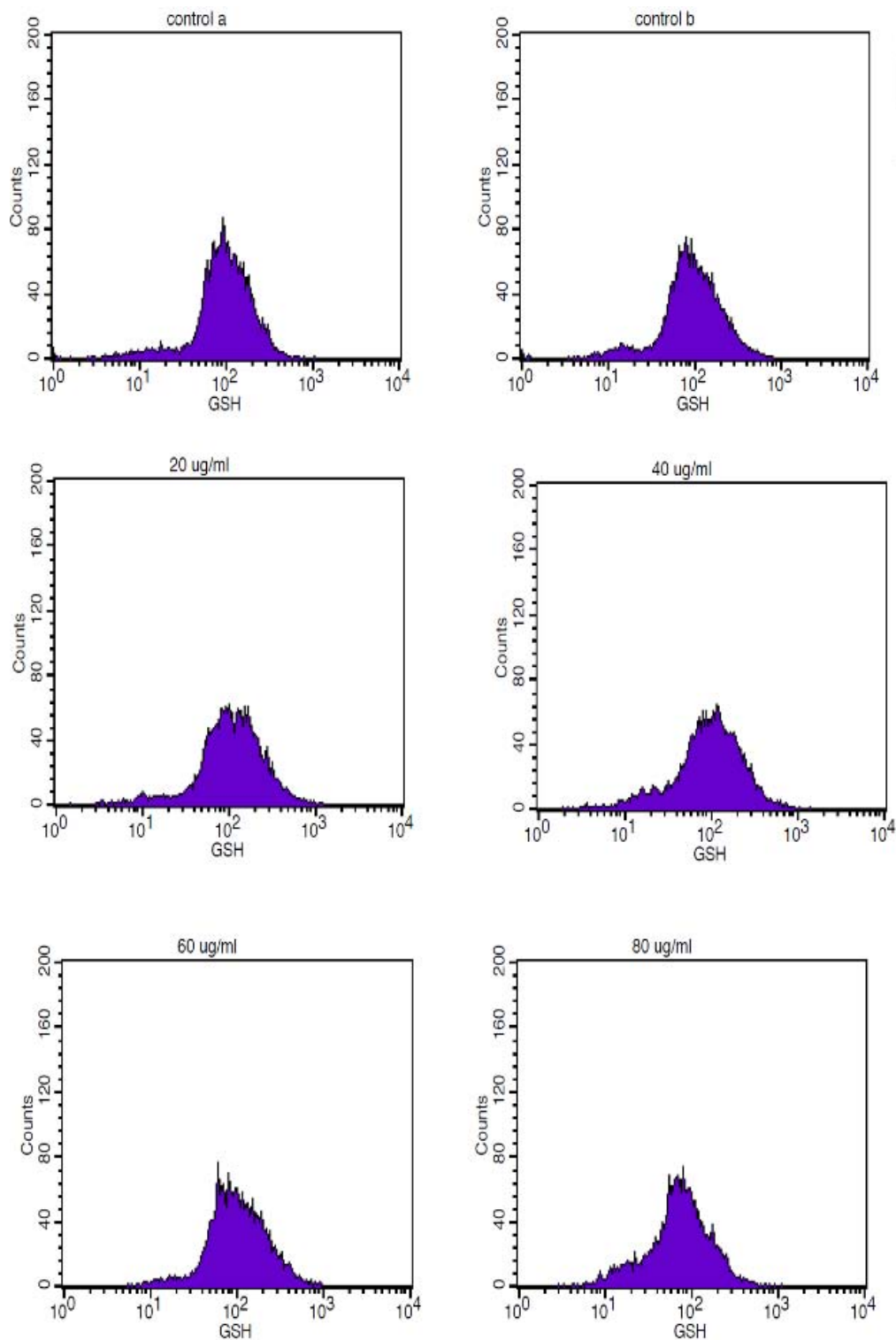


Εικόνα 40: Επίδραση ΕΚΡΑ στα επίπεδα ROS στην κυτταρική σειρά HepG2. Τα ιστογράμματα παρουσιάζουν τον φθορισμό που εκπέμπεται από 10,000 κύτταρα κατά την μέτρηση ROS, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Ο FL2 αντιπροσωπεύει τον φθορισμό που ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας 488 και 530 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και ως μήκος κύματος εκπομπής.

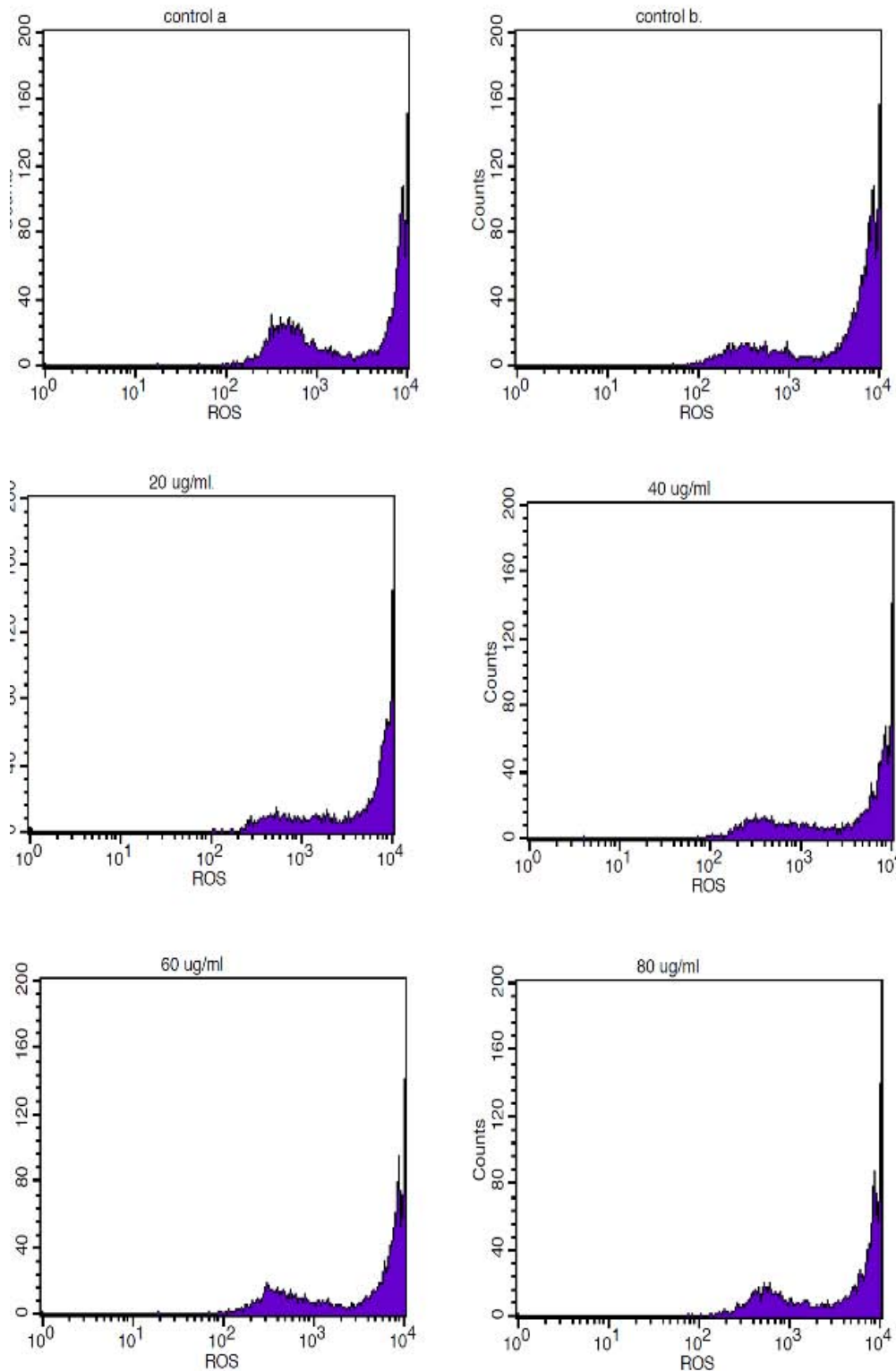
Το ΚΤΚΤ εμφάνισε κυτταροτοξικότητα στα 100 μg εκχυλίσματος, έπειτα από 24 ώρες επώασης με τα HepG2. Συνεπώς οι συγκεντρώσεις που χορηγήθηκαν ήταν 20, 40, 60 και 80 μg ΚΤΚΤ. Τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής έδειξαν πως το ΚΤΚΤ αύξησε στατιστικώς σημαντικά τα επίπεδα της GSH κατά 30.18% και 16.42% στα 40 και 60 μg ΚΤΚΤ αντίστοιχα, συγκριτικά με το control (διάγραμμα 6). Ενώ στη μεγαλύτερη συγκέντρωση 80 μg εκχυλίσματος παρατηρήθηκε μείωση κατά 31.54% (διάγραμμα 6). Αντίθετα, τα επίπεδα ROS δεν παρουσίασαν κάποια στατιστικά σημαντική μεταβολή (διάγραμμα 6).



Διάγραμμα 6: Επίδραση εκχυλίσματος ΚΤΚΤ, στα επίπεδα GSH και ROS, στην κυτταρική σειρά HepG2, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control και παρουσιάζονται ως mean ± SEM, (n=3). * $p < 0,05$ στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με το control.

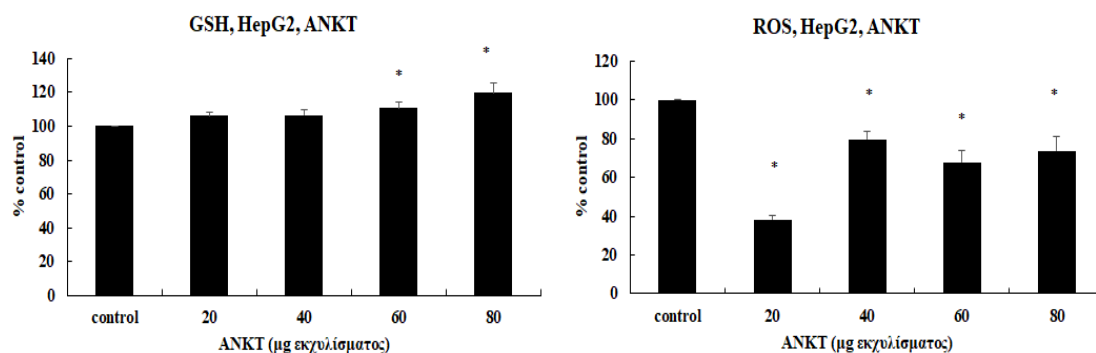


Εικόνα 41: Επίδραση ΚΤΚΤ στα επίπεδα GSH στην κυτταρική σειρά HepG2. Τα ιστογράμματα παρουσιάζουν τον φθορισμό που εκπέμπεται από 10,000 κύτταρα κατά την μέτρηση της GSH, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Ο FL2 αντιπροσωπεύει τον φθορισμό που ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας 488 και 580 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και ως μήκος κύματος εκπομπής.

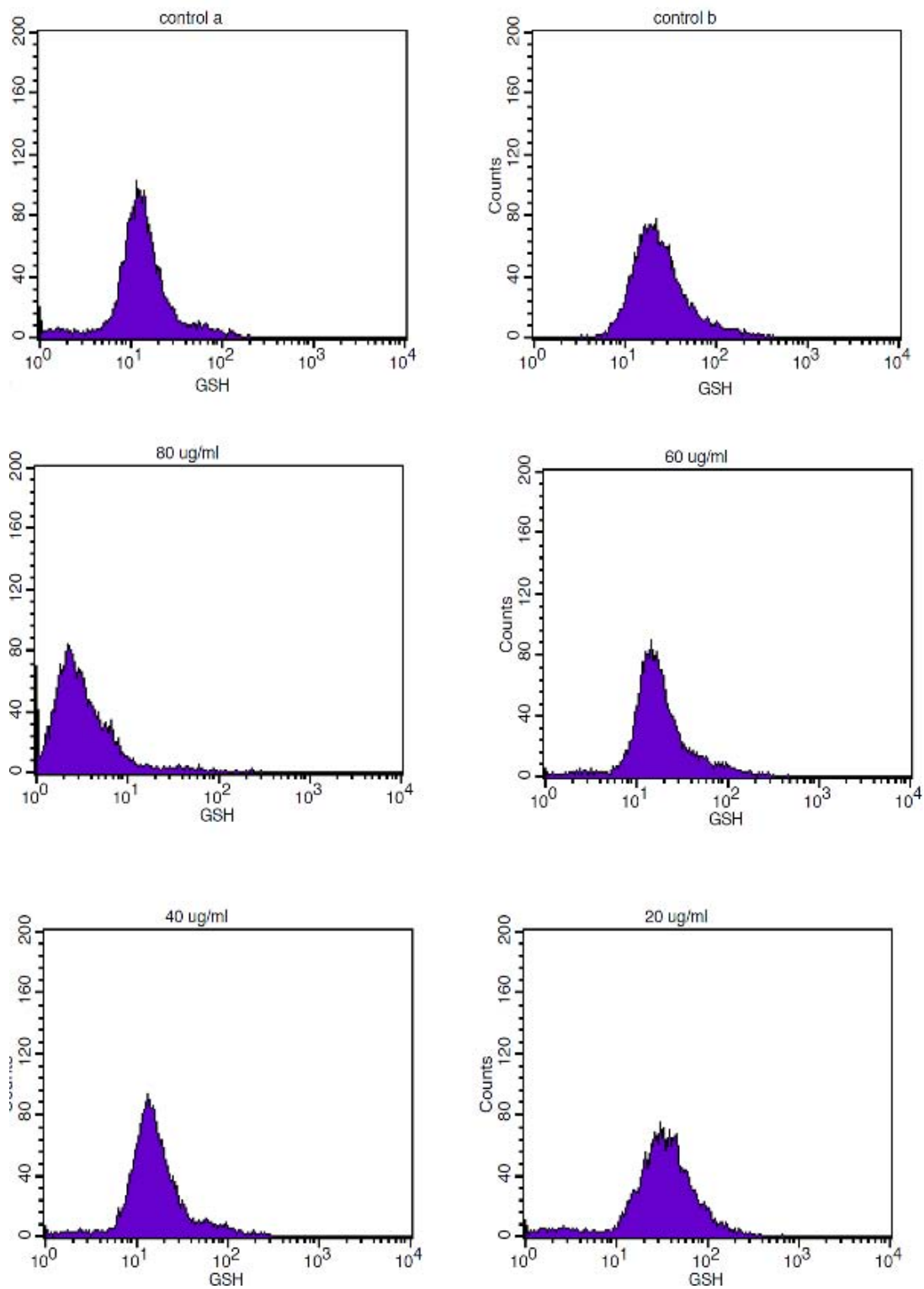


Εικόνα 42: Επίδραση ΚΤΚΤ στα επίπεδα ROS στην κυτταρική σειρά HepG2. Τα ιστογράμματα παρουσιάζουν τον φθορισμό που εκπέμπεται από 10,000 κύτταρα κατά την μέτρηση ROS, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Ο FL2 αντιπροσωπεύει τον φθορισμό που ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας 488 και 530 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και ως μήκος κύματος εκπομπής.

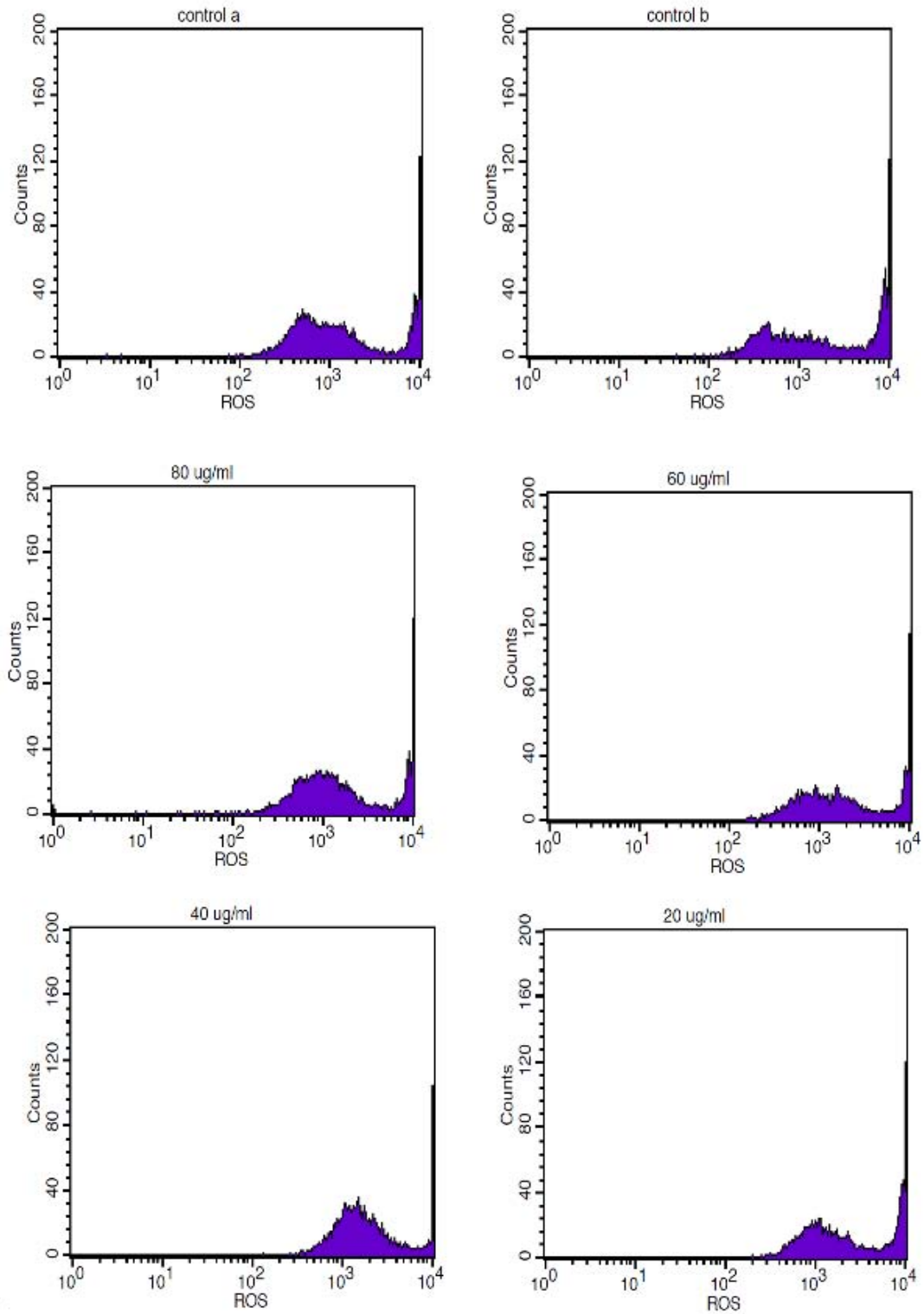
Το ANKT εμφάνισε κυτταροτοξικότητα στα 100 μg εκχυλίσματος, έπειτα από 24 ώρες επώασης με τα HepG2. Συνεπώς οι συγκεντρώσεις που χορηγήθηκαν ήταν 20, 40, 60 και 80 μg ANKT. Τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής έδειξαν πως το ANKT αύξησε στατιστικώς σημαντικά τα επίπεδα της GSH κατά 11% και 20% στα 60 και 80 μg ANKT αντίστοιχα, συγκριτικά με το control (διάγραμμα 7). Επιπλέον, τα επίπεδα ROS μειώθηκαν στατιστικά σημαντικά κατά 62%, 20%, 32% και 26% στα 20, 40, 60 και 80 μg, συγκριτικά με το control (διάγραμμα 7).



Διάγραμμα 7: Επίδραση εκχυλίσματος ANKT, στα επίπεδα GSH και ROS, στην κυτταρική σειρά HepG2, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control και παρουσιάζονται ως mean ± SEM, (n=3). * $p < 0,05$ στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με το control.



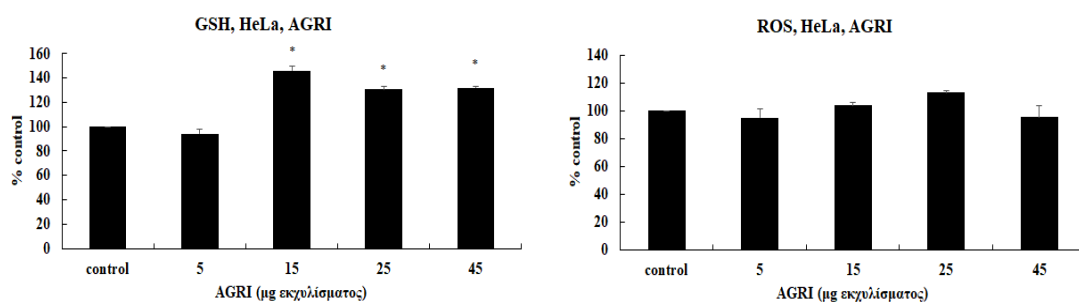
Εικόνα 43: Επίδραση ANKT στα επίπεδα GSH στην κυτταρική σειρά HepG2. Τα ιστογράμματα παρουσιάζουν τον φθορισμό που εκπέμπεται από 10,000 κύτταρα κατά την μέτρηση της GSH, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Ο FL2 αντιπροσωπεύει τον φθορισμό που ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας 488 και 580 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και ως μήκος κύματος εκπομπής.



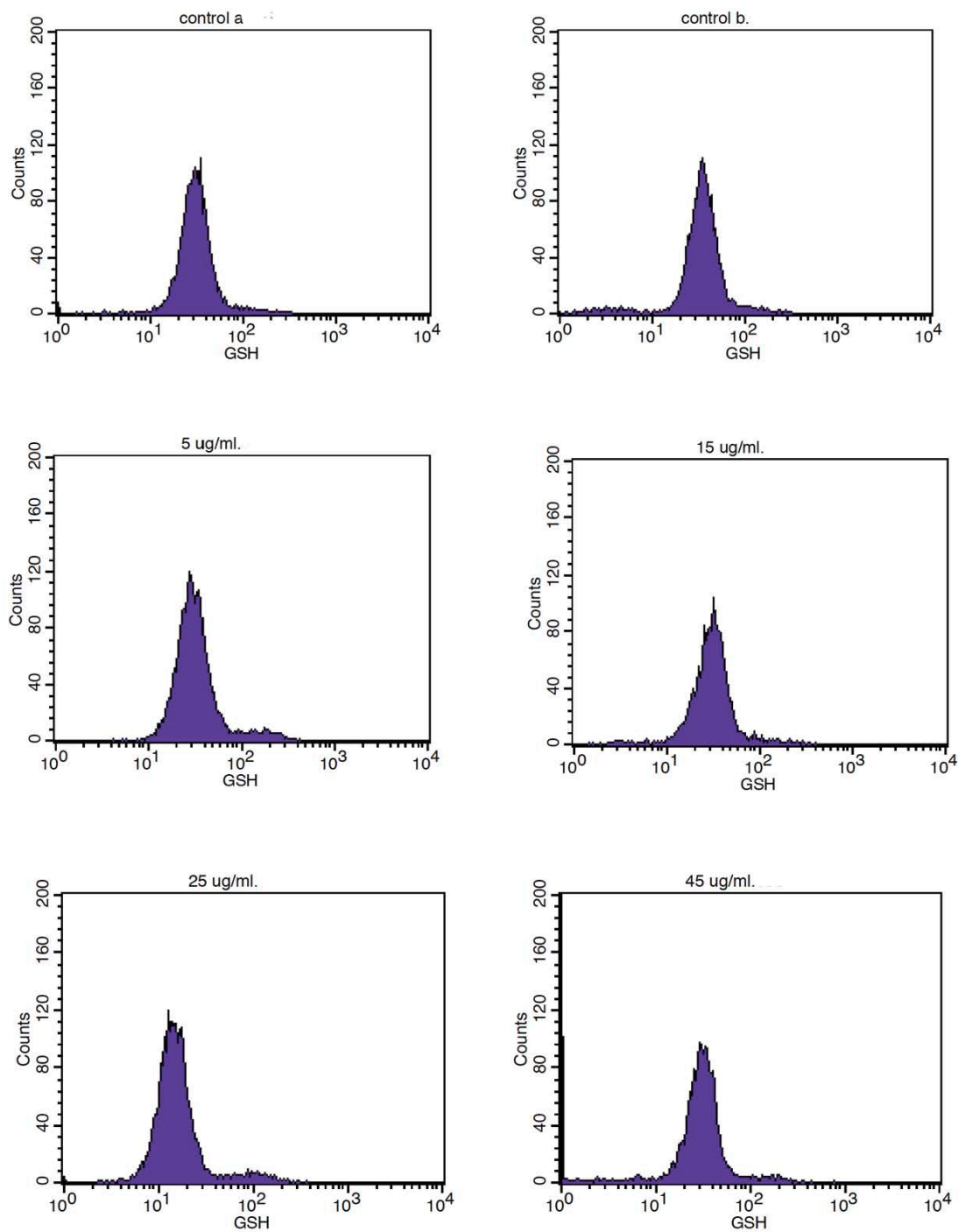
Εικόνα 44: Επίδραση ANKT στα επίπεδα ROS στην κυτταρική σειρά HepG2. Τα ιστογράμματα παρουσιάζουν τον φθορισμό που εκπέμπεται από 10,000 κύτταρα κατά την μέτρηση ROS, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Ο FL2 αντιπροσωπεύει τον φθορισμό που ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας 488 και 530 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και ως μήκος κύματος εκπομπής.

Επίδραση των εκχυλισμάτων στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό των HeLa

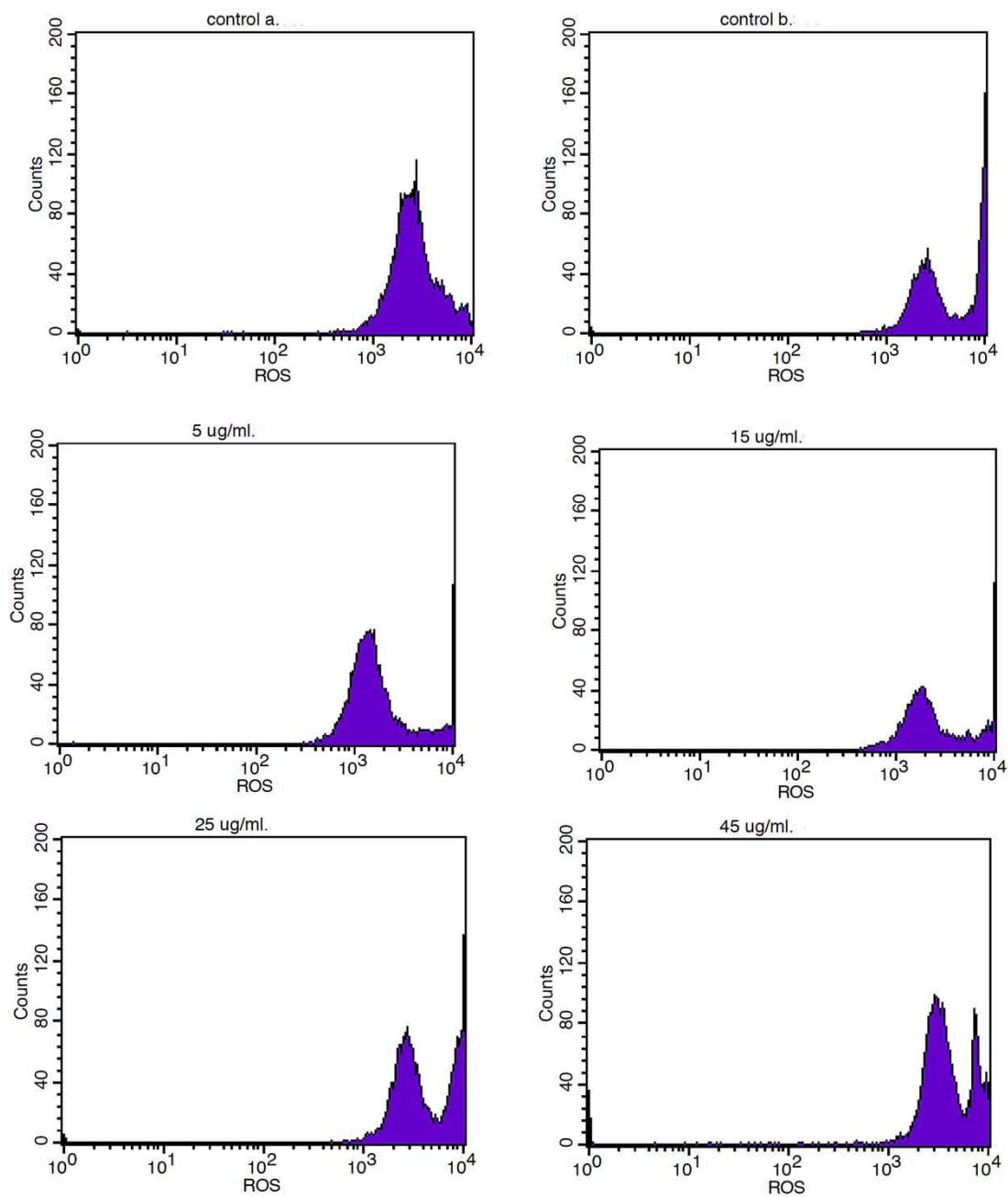
Το AGRI εμφάνισε κυτταροτοξικότητα στα 50 μg εκχυλίσματος, έπειτα από 24 ώρες επώασης με τα HeLa. Συνεπώς οι συγκεντρώσεις που χορηγήθηκαν ήταν 5, 15, 25 και 45 μg AGRI. Τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής έδειξαν πως το AGRI αύξησε στατιστικώς σημαντικά τα επίπεδα της GSH κατά 46.11%, 30.79% και 31.91% στα 15, 25 και 45 μg AGRI αντίστοιχα, συγκριτικά με το control (διάγραμμα 8). Αντίθετα, τα επίπεδα ROS δεν παρουσίασαν κάποια στατιστικά σημαντική μεταβολή (διάγραμμα 8).



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

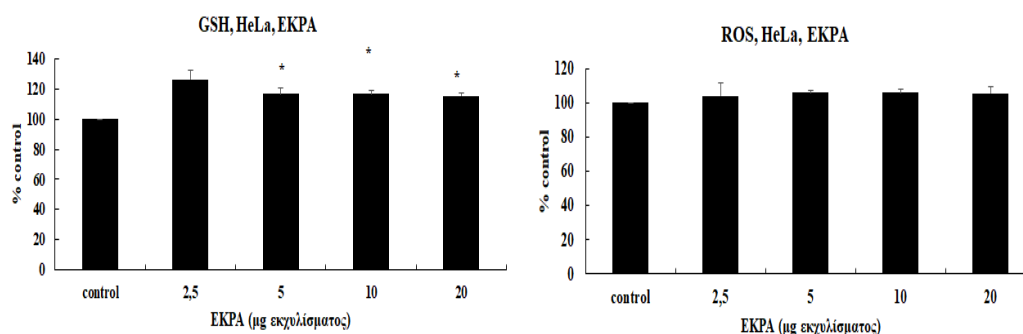


Εικόνα 45: Επίδραση AGRI στα επίπεδα GSH στην κυτταρική σειρά HeLa. Τα ιστογράμματα παρουσιάζουν τον φθορισμό που εκπέμπεται από 10,000 κύτταρα κατά την μέτρηση GSH, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Ο FL2 αντιπροσωπεύει τον φθορισμό που ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας 488 και 580 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και ως μήκος κύματος εκπομπής.

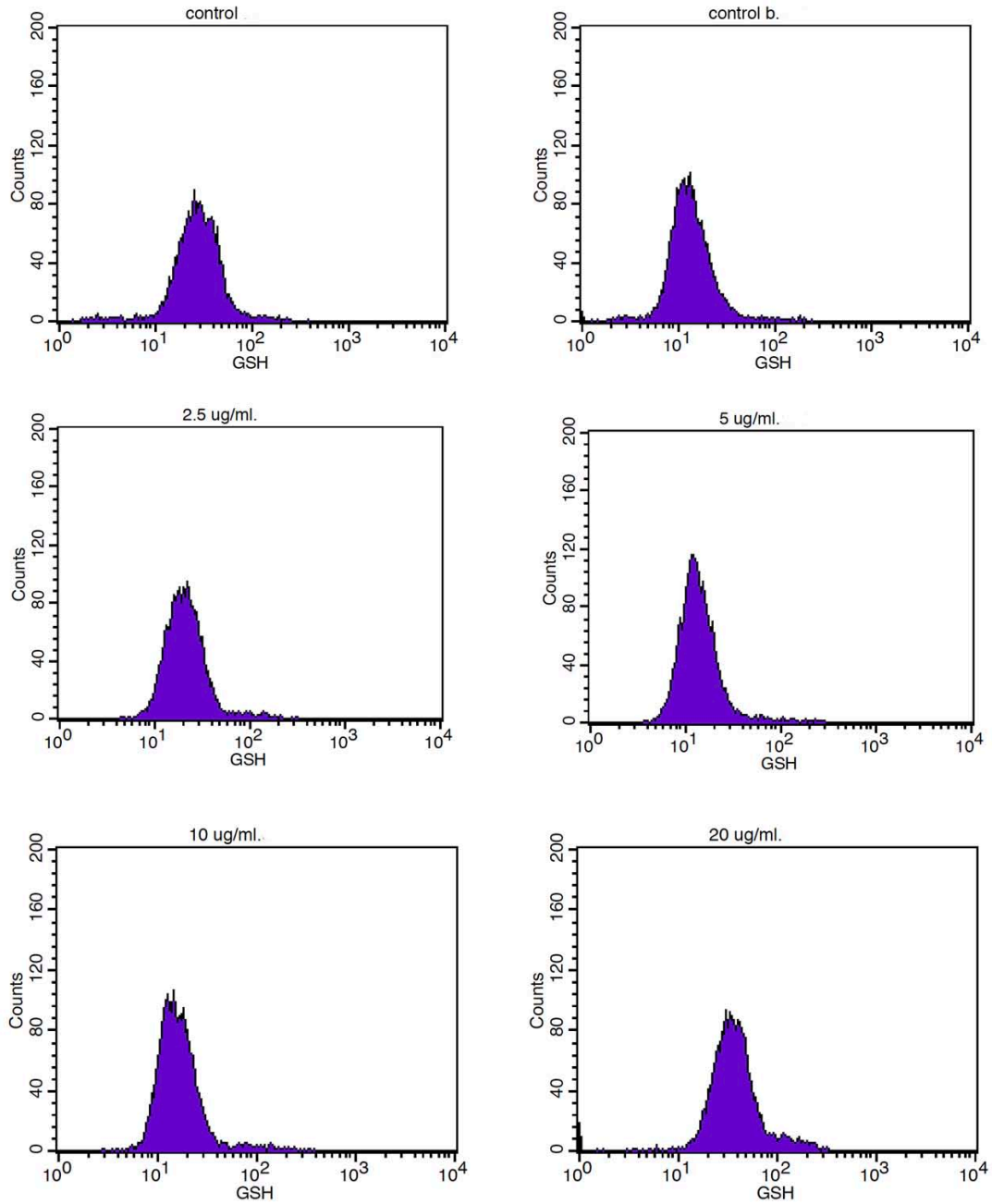


Εικόνα 46: Επίδραση AGRI στα επίπεδα ROS στην κυτταρική σειρά HeLa. Τα ιστογράμματα παρουσιάζουν τον φθορισμό που εκπέμπεται από 10,000 κύτταρα κατά την μέτρηση ROS, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Ο FL2 αντιπροσωπεύει τον φθορισμό που ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας 488 και 530 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και ως μήκος κύματος εκπομπής.

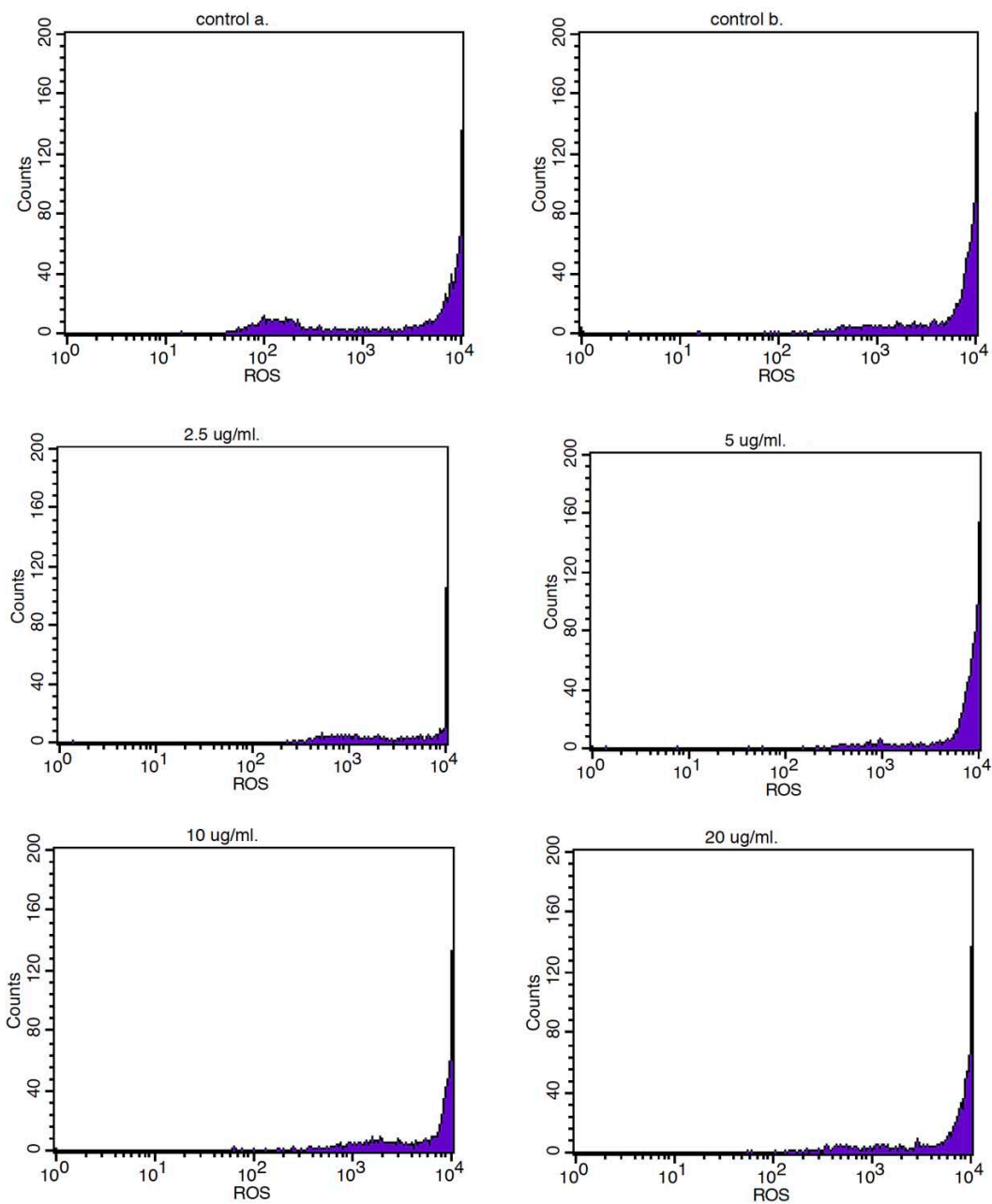
Το ΕΚΡΑ εμφάνισε κυτταροτοξικότητα στα 25 µg εκχυλίσματος, έπειτα από 24 ώρες επώασης με τα HeLa. Συνεπώς οι συγκεντρώσεις που χορηγήθηκαν ήταν 2.5, 5, 10 και 20 µg ΕΚΡΑ. Τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής έδειξαν πως το ΕΚΡΑ αύξησε στατιστικώς σημαντικά τα επίπεδα της GSH κατά 26.28%, 16.70%, 16.61% και 15.18% στα 2.5, 5, 10 και 20 µg ΕΚΡΑ αντίστοιχα, συγκριτικά με το control (διάγραμμα 9). Αντίθετα, τα επίπεδα ROS δεν παρουσίασαν κάποια στατιστικά σημαντική μεταβολή (διάγραμμα 9).



Διάγραμμα 9: Επίδραση εκχυλίσματος ΕΚΡΑ, στα επίπεδα GSH και ROS, στην κυτταρική σειρά HeLa, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control και παρουσιάζονται ως mean ± SEM, (n=3). * $p < 0,05$ στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με το control.

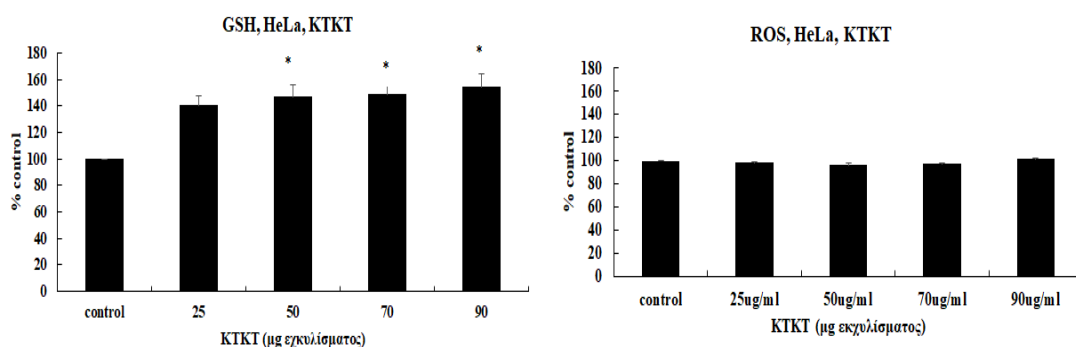


Εικόνα 47: Επίδραση ΕΚΡΑ στα επίπεδα GSH στην κυτταρική σειρά HeLa. Τα ιστογράμματα παρουσιάζουν τον φθορισμό που εκπέμπεται από 10,000 κύτταρα κατά την μέτρηση GSH, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Ο FL2 αντιπροσωπεύει τον φθορισμό που ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας 488 και 580 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και ως μήκος κύματος εκπομπής.

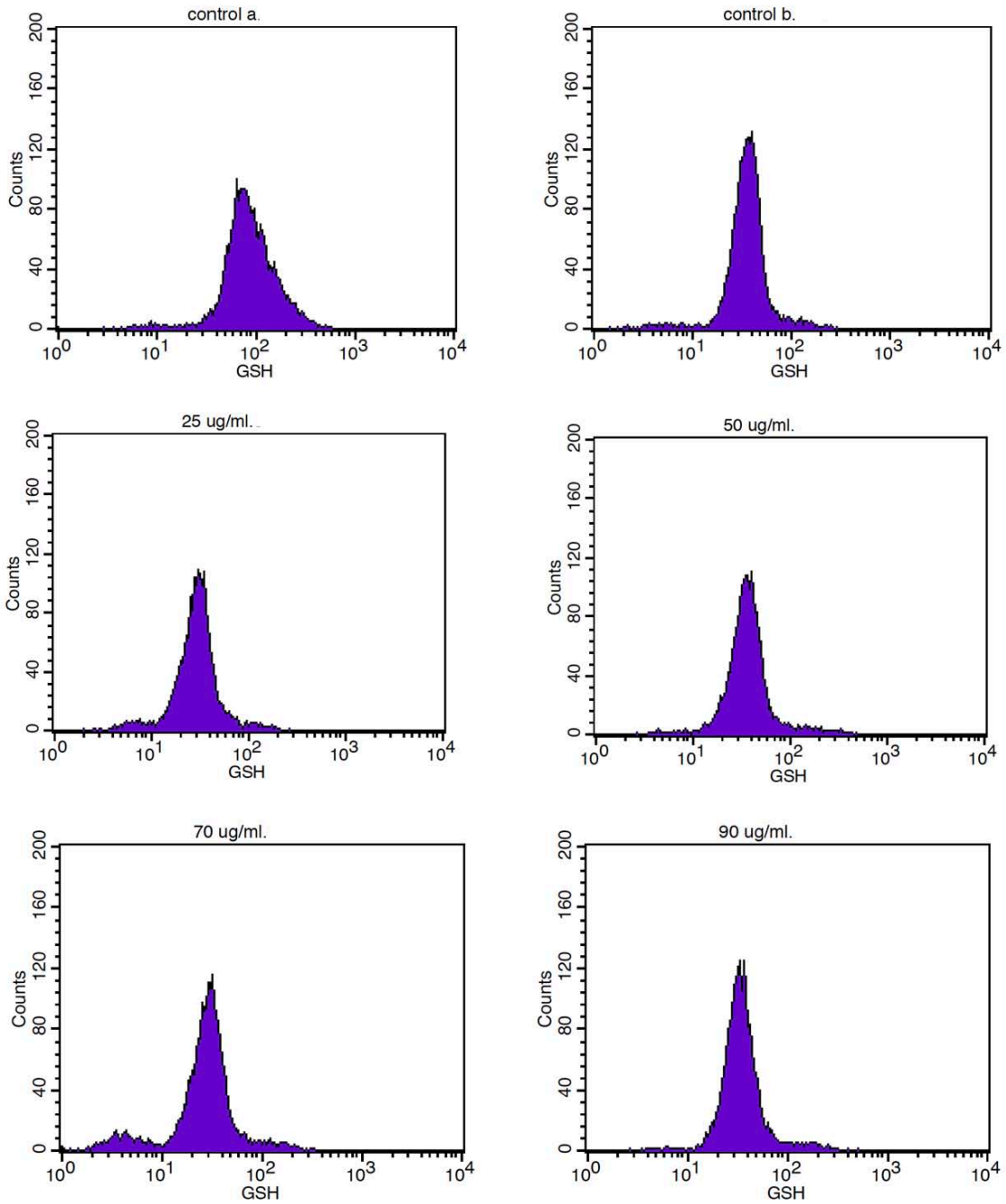


Εικόνα 48: Επίδραση ΕΚΡΑ στα επίπεδα ROS στην κυτταρική σειρά HeLa. Τα ιστογράμματα παρουσιάζουν τον φθορισμό που εκπέμπεται από 10,000 κύτταρα κατά την μέτρηση ROS, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Ο FL2 αντιπροσωπεύει τον φθορισμό που ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας 488 και 530 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και ως μήκος κύματος εκπομπής.

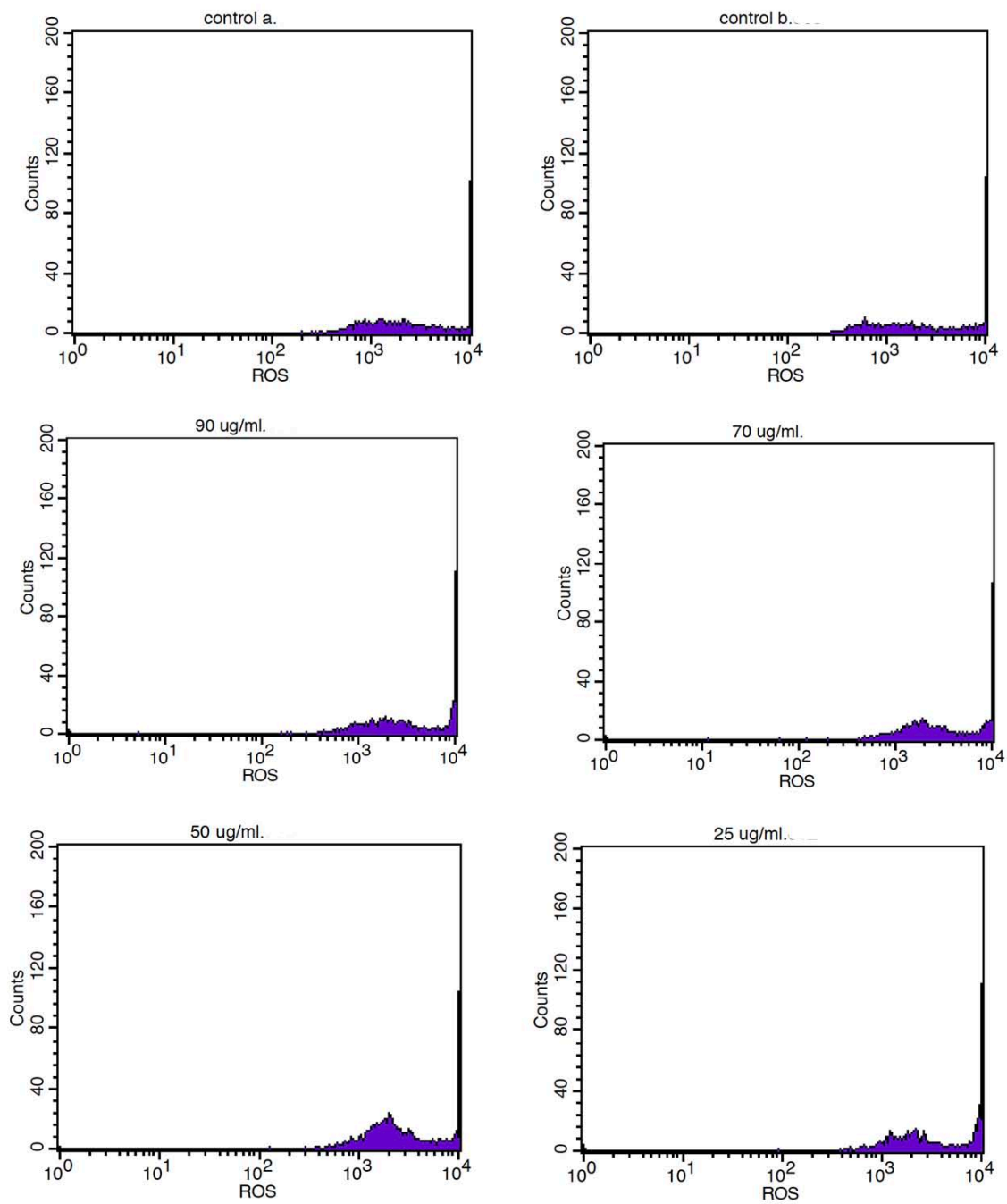
Το ΚΤΚΤ εμφάνισε κυτταροτοξικότητα στα 100 μg εκχυλίσματος, έπειτα από 24 ώρες επώασης με τα HeLa. Συνεπώς οι συγκεντρώσεις που χορηγήθηκαν ήταν 25, 50, 70 και 90 μg ΚΤΚΤ. Τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής έδειξαν πως το ΚΤΚΤ αύξησε στατιστικώς σημαντικά τα επίπεδα της GSH κατά 40.52%, 46.89%, 48.76% και 54.40% στα 25, 50, 70 και 90 μg ΚΤΚΤ αντίστοιχα, συγκριτικά με το control (διάγραμμα 10). Αντίθετα, τα επίπεδα ROS δεν παρουσίασαν κάποια στατιστικά σημαντική μεταβολή (διάγραμμα 10).



Διάγραμμα 10: Επίδραση εκχυλίσματος ΚΤΚΤ, στα επίπεδα GSH και ROS, στην κυτταρική σειρά HeLa, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control και παρουσιάζονται ως *mean* ± SEM, (n=3). * $p < 0,05$ στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με το control.

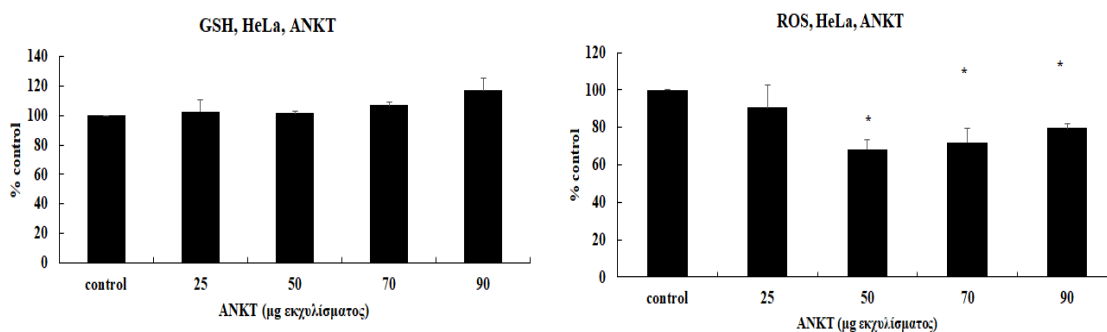


Εικόνα 49: Επίδραση ΚΤΚΤ στα επίπεδα GSH στην κυτταρική σειρά HeLa. Τα ιστογράμματα παρουσιάζουν τον φθορισμό που εκπέμπεται από 10,000 κύτταρα κατά την μέτρηση GSH, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Ο FL2 αντιπροσωπεύει τον φθορισμό που ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας 488 και 580 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και ως μήκος κύματος εκπομπής.

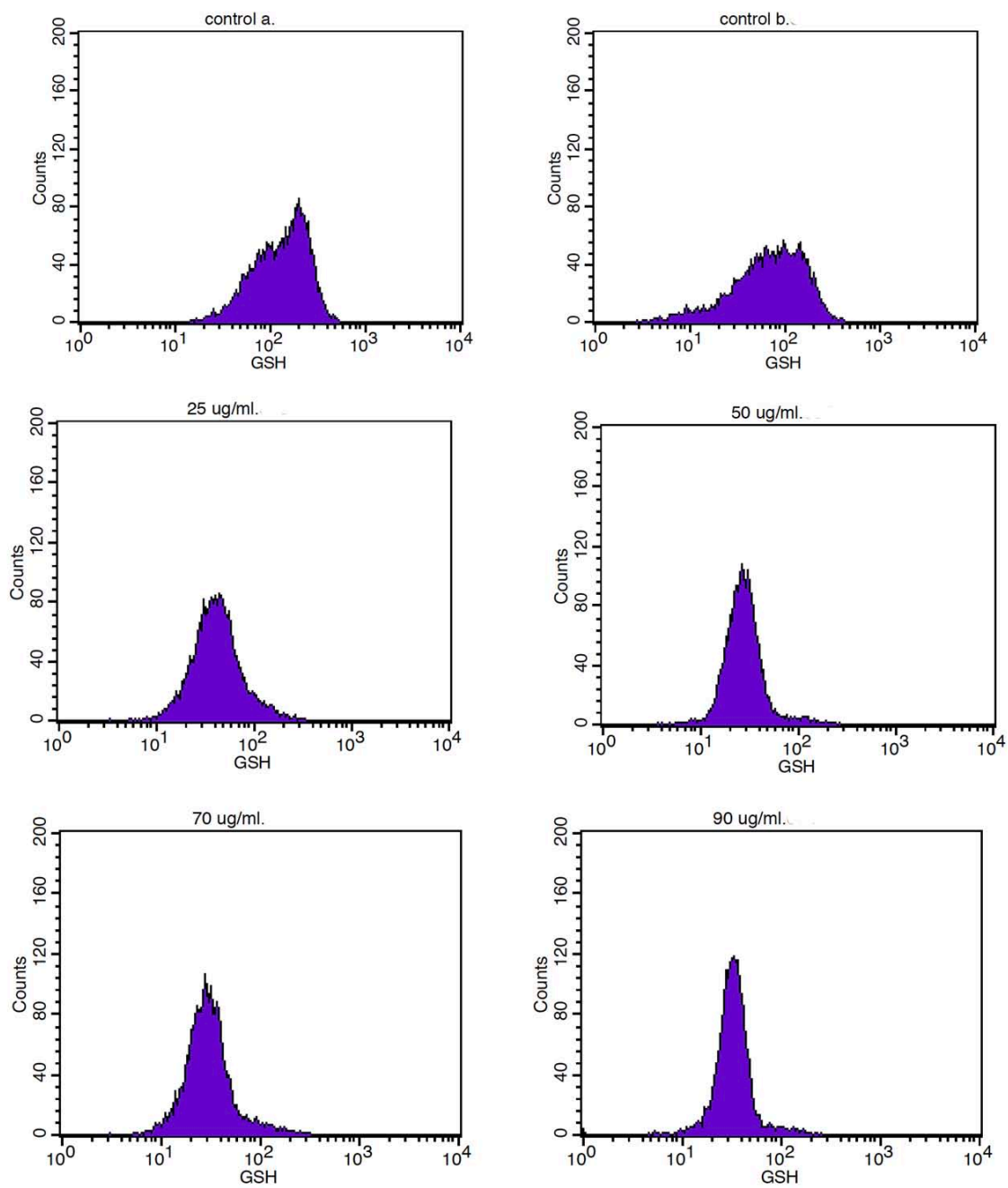


Εικόνα 50: Επίδραση ΚΤΚΤ στα επίπεδα ROS στην κυτταρική σειρά HeLa. Τα ιστογράμματα παρουσιάζουν τον φθορισμό που εκπέμπεται από 10,000 κύτταρα κατά την μέτρηση ROS, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Ο FL2 αντιπροσωπεύει τον φθορισμό που ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας 488 και 530 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και ως μήκος κύματος εκπομπής.

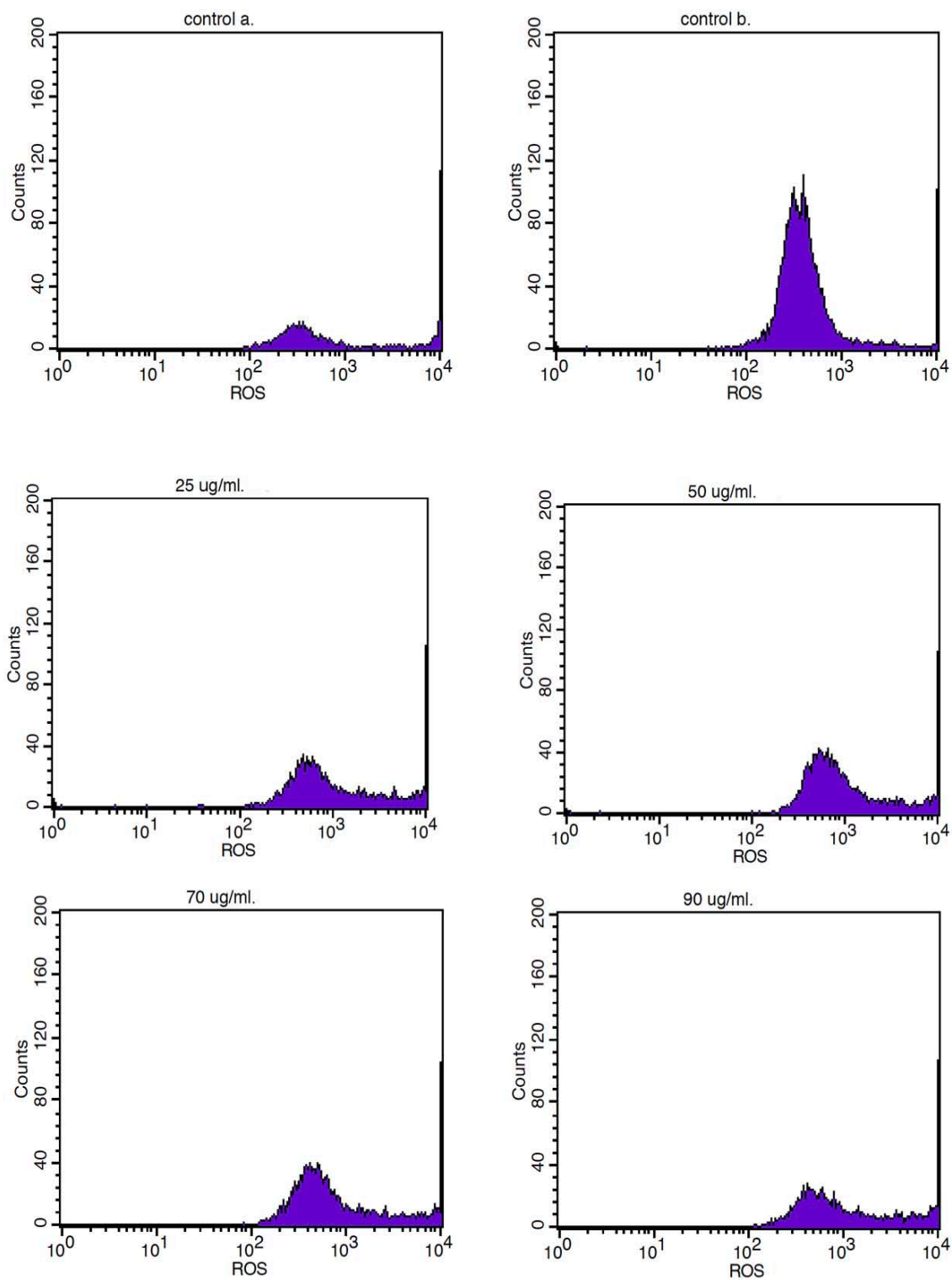
Το ANKT εμφάνισε κυτταροτοξικότητα στα 100 μg εκχυλίσματος, έπειτα από 24 ώρες επώασης με τα HeLa. Συνεπώς οι συγκεντρώσεις που χορηγήθηκαν ήταν 25, 50, 70 και 90 μg ANKT. Τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής έδειξαν πως το ANKT αύξησε στατιστικώς σημαντικά τα επίπεδα της GSH κατά 17% στα 90 μg ANKT αντίστοιχα, συγκριτικά με το control (διάγραμμα 11). Επιπλέον, τα επίπεδα ROS μειώθηκαν στατιστικά σημαντικά κατά 32%, 28% και 20% στα 50, 70 και 90 μg συγκριτικά με το control (διάγραμμα 11).



Διάγραμμα 11: Επίδραση εκχυλίσματος ANKT, στα επίπεδα GSH και ROS, στην κυτταρική σειρά HeLa, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control και παρουσιάζονται ως mean ± SEM, (n=3). *p<0,05 στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με το control.



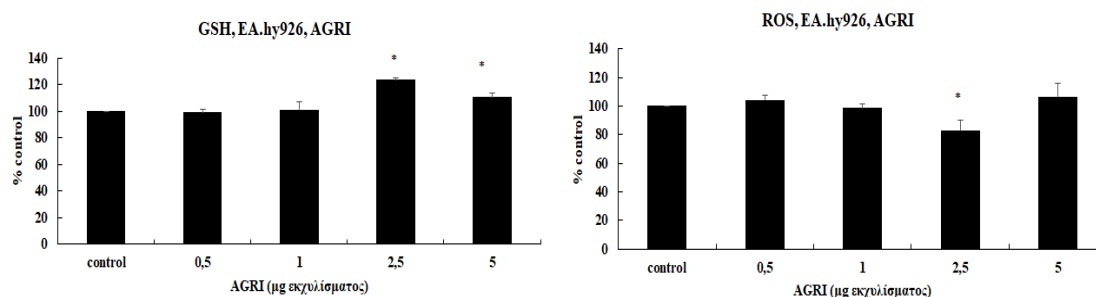
Εικόνα 51: Επίδραση ANKT στα επίπεδα GSH στην κυτταρική σειρά HeLa. Τα ιστογράμματα παρουσιάζουν τον φθορισμό που εκπέμπεται από 10,000 κύτταρα κατά την μέτρηση GSH, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Ο FL2 αντιπροσωπεύει τον φθορισμό που ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας 488 και 580 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και ως μήκος κύματος εκπομπής.



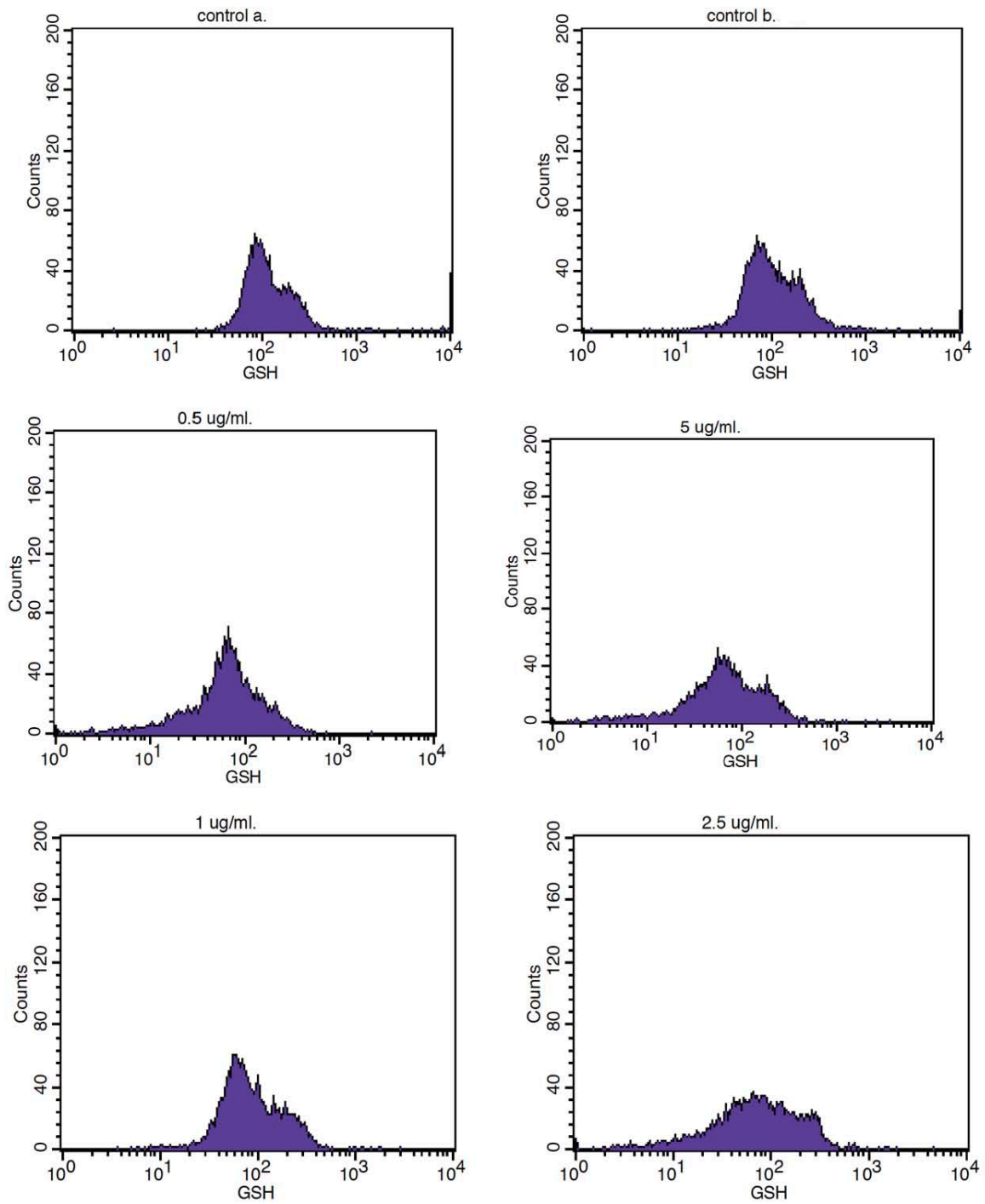
Εικόνα 52: Επίδραση ANKT στα επίπεδα ROS στην κυτταρική σειρά HeLa. Τα ιστογράμματα παρουσιάζουν τον φθορισμό που εκπέμπεται από 10,000 κύτταρα κατά την μέτρηση ROS, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Ο FL2 αντιπροσωπεύει τον φθορισμό που ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας 488 και 530 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και ως μήκος κύματος εκπομπής.

Επίδραση των εκχυλισμάτων στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό των EA.hy926

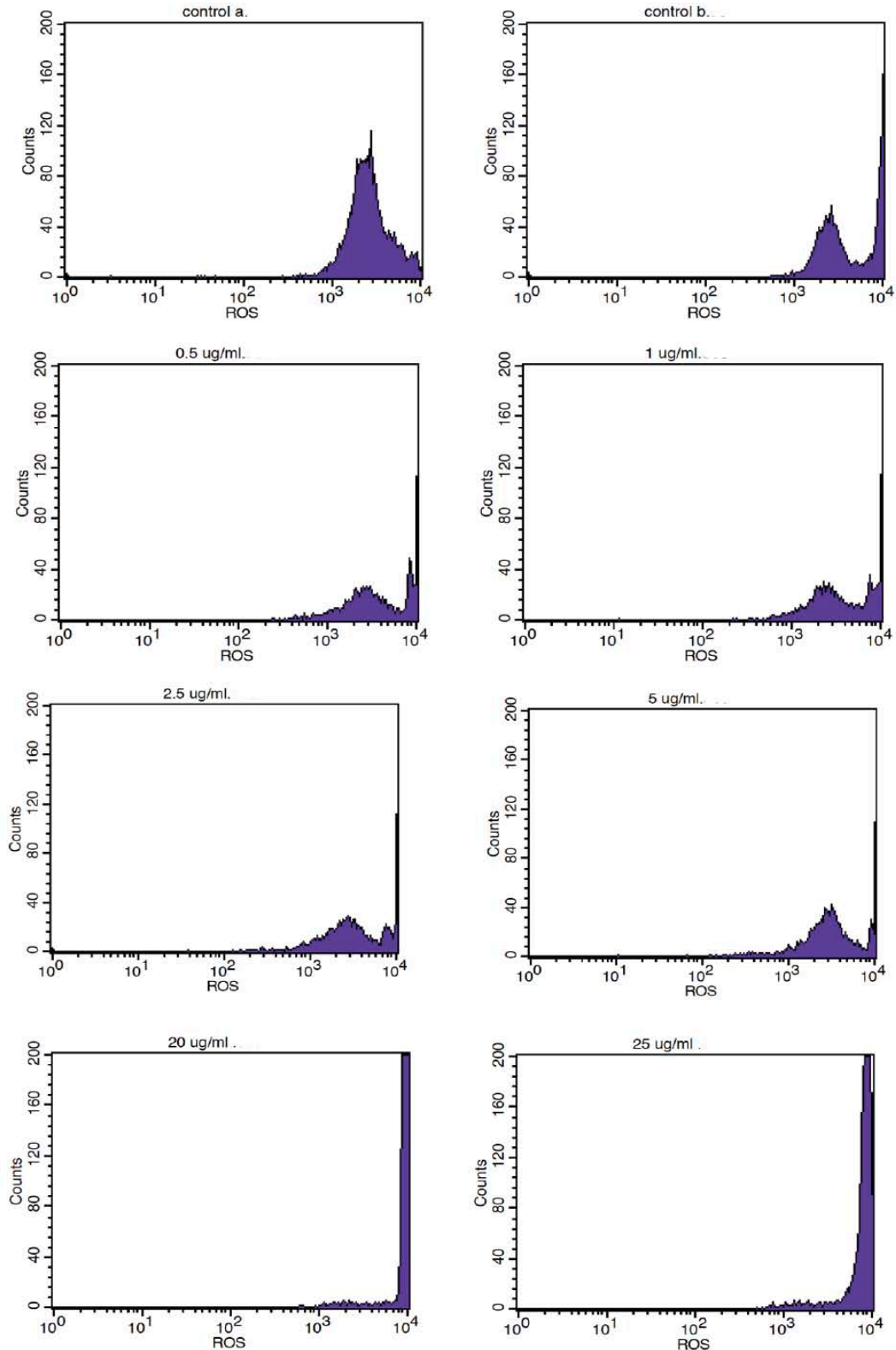
Το AGRI εμφάνισε κυτταροτοξικότητα στα 10 μg εκχυλίσματος, έπειτα από 24 ώρες επώασης με τα EA.hy926. Συνεπώς οι συγκεντρώσεις που χορηγήθηκαν ήταν 0.5, 1, 2.5 και 5 μg AGRI. Τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής έδειξαν πως το AGRI αύξησε στατιστικώς σημαντικά τα επίπεδα της GSH κατά 23.8% και 10.7% στα 2.5, και 5 μg AGRI αντίστοιχα, συγκριτικά με το control (διάγραμμα 12). Επιπλέον, τα επίπεδα ROS μειώθηκαν στατιστικά σημαντικά κατά 17% στα 2.5 μg , συγκριτικά με το control (διάγραμμα 12).



Διάγραμμα 12: Επίδραση εκχυλίσματος AGRI, στα επίπεδα GSH και ROS, στην κυτταρική σειρά EA.hy926, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control και παρουσιάζονται ως $mean \pm SEM$, ($n=3$). * $p<0,05$ στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με το control.

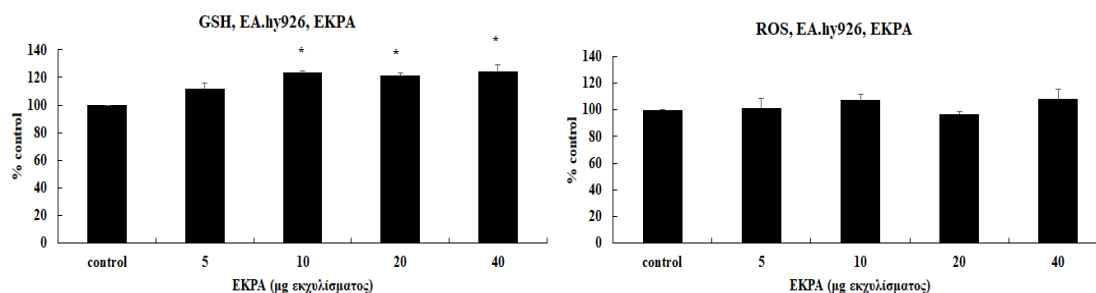


Εικόνα 53: Επίδραση AGRI στα επίπεδα GSH στην κυτταρική σειρά EA.hy926. Τα ιστογράμματα παρουσιάζουν τον φθορισμό που εκπέμπεται από 10,000 κύτταρα κατά την μέτρηση GSH, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Ο FL2 αντιπροσωπεύει τον φθορισμό που ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας 488 και 580 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και ως μήκος κύματος εκπομπής.

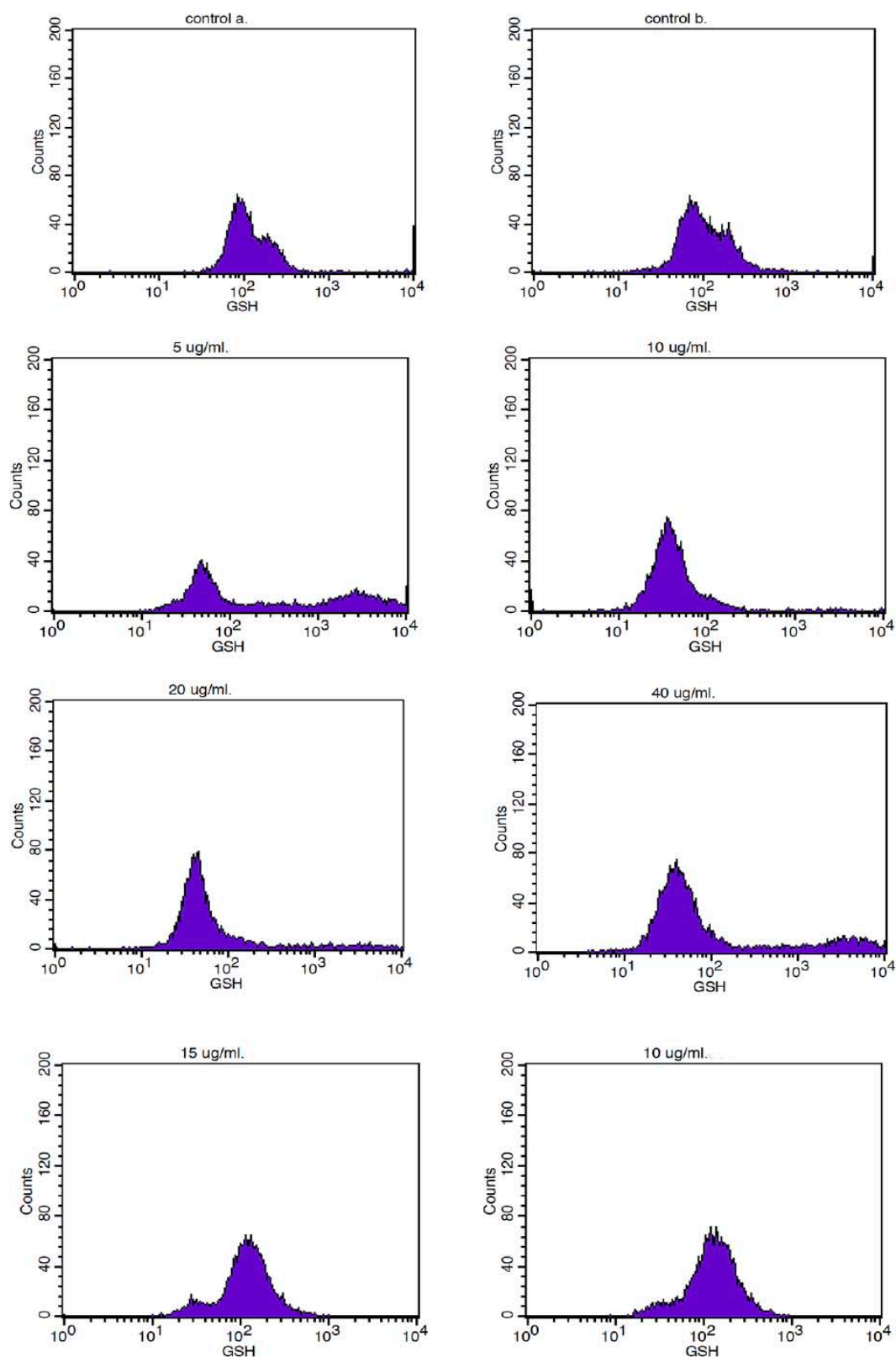


Εικόνα 54: Επίδραση AGRI στα επίπεδα ROS στην κυτταρική σειρά EA.hy926. Τα ιστογράμματα παρουσιάζουν τον φθορισμό που εκπέμπεται από 10,000 κύτταρα κατά την μέτρηση ROS, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Ο FL2 αντιπροσωπεύει τον φθορισμό που ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας 488 και 530 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και ως μήκος κύματος εκπομπής.

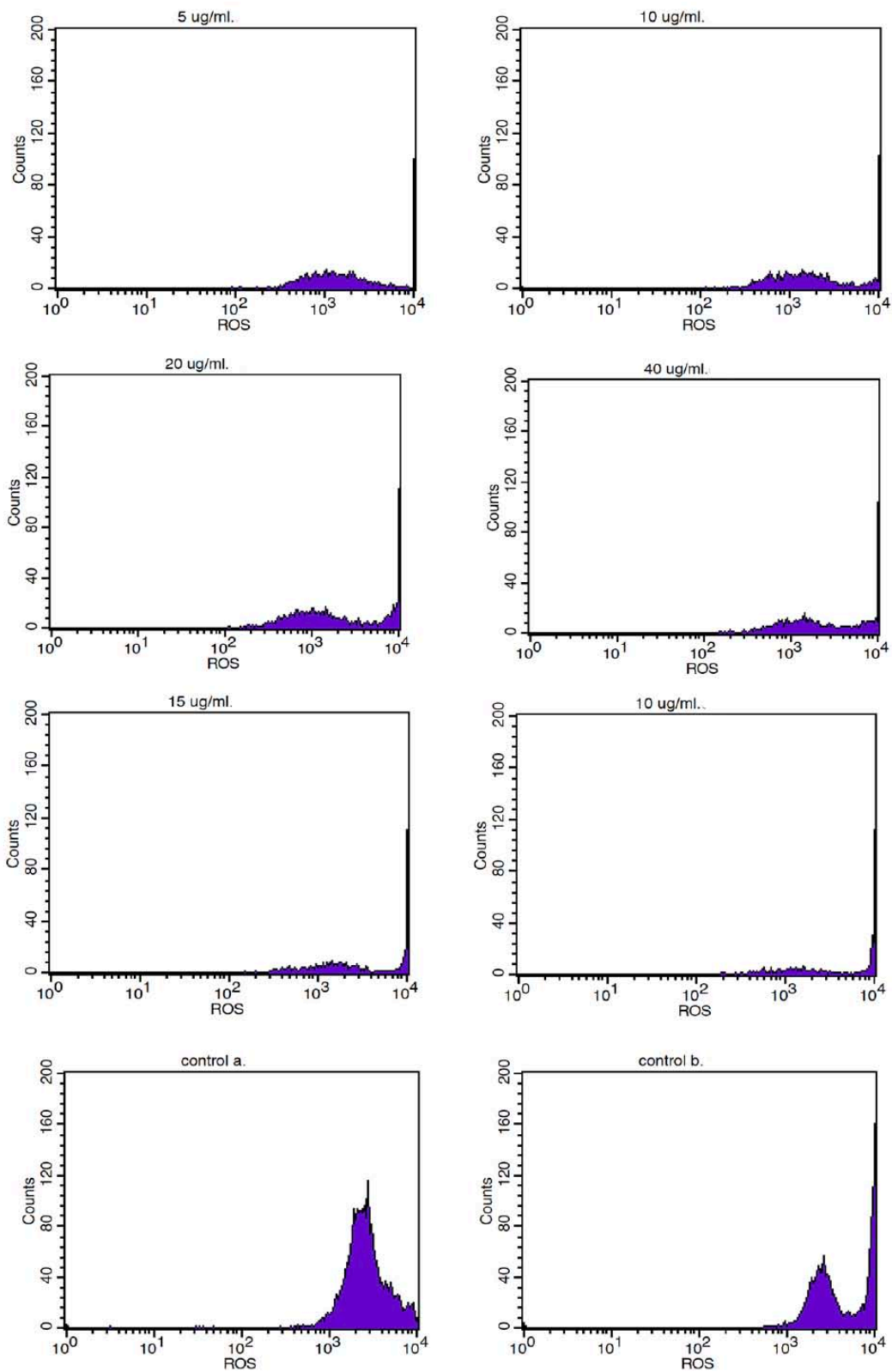
Το ΕΚΡΑ εμφάνισε κυτταροτοξικότητα στα 50 µg εκχυλίσματος, έπειτα από 24 ώρες επώασης με τα ΕΑ.ηγ926. Συνεπώς οι συγκεντρώσεις που χορηγήθηκαν ήταν 5, 10, 20 και 40 µg ΕΚΡΑ. Τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής έδειξαν πως το ΕΚΡΑ αύξησε στατιστικώς σημαντικά τα επίπεδα της GSH κατά 11.82%, 23.36%, 21.64% και 24.22% στα 5, 10, 20 και 40 µg ΕΚΡΑ αντίστοιχα, συγκριτικά με το control (διάγραμμα 13). Αντίθετα, τα επίπεδα ROS δεν παρουσίασαν κάποια στατιστικά σημαντική μεταβολή (διάγραμμα 13).



Διάγραμμα 13: Επίδραση εκχυλίσματος ΕΚΡΑ, στα επίπεδα GSH και ROS, στην κυτταρική σειρά ΕΑ.ηγ926, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control και παρουσιάζονται ως mean ± SEM, (n=3). *p<0,05 στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με το control.

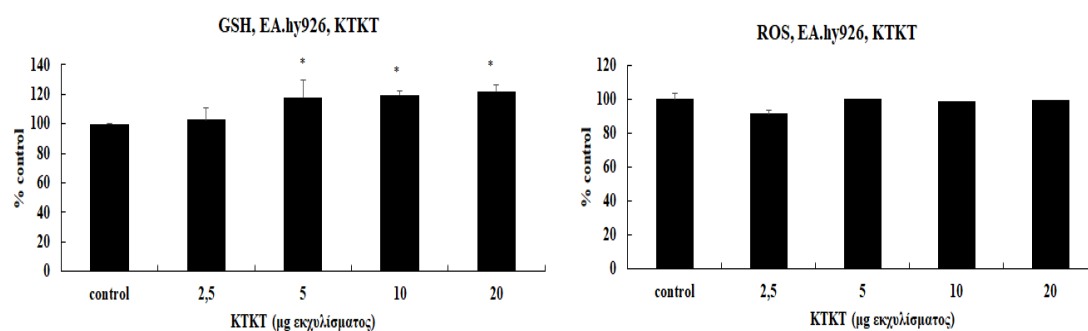


Εικόνα 55: Επίδραση ΕΚΡΑ στα επίπεδα GSH στην κυτταρική σειρά EA.hy926. Τα ιστογράμματα παρουσιάζουν τον φθορισμό που εκπέμπεται από 10,000 κύτταρα κατά την μέτρηση GSH, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Ο FL2 αντιπροσωπεύει τον φθορισμό που ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας 488 και 580 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και ως μήκος κύματος εκπομπής.

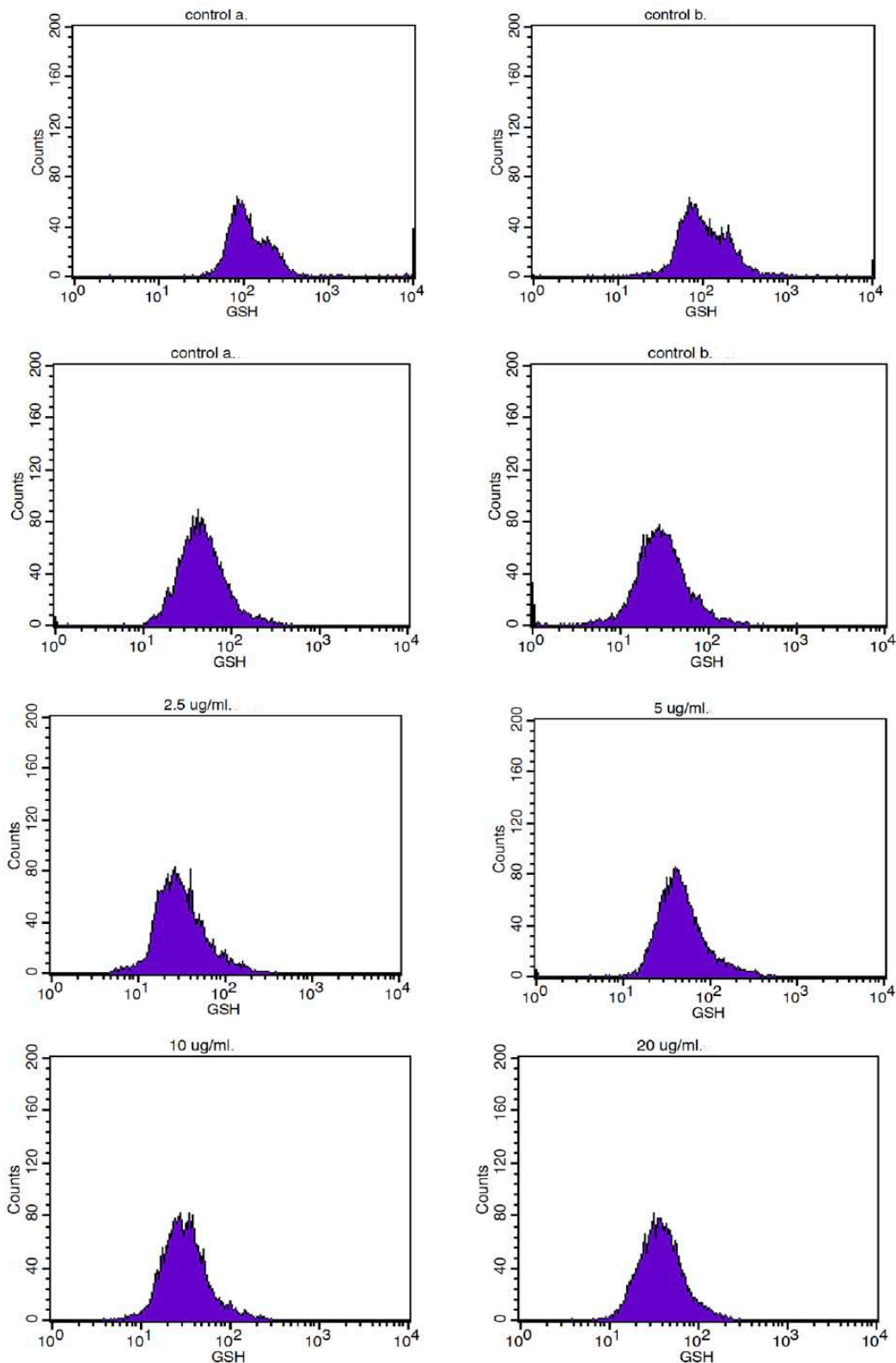


Εικόνα 56: Επίδραση EKPA στα επίπεδα ROS στην κυτταρική σειρά EA.hy926. Τα ιστογράμματα παρουσιάζουν τον φθορισμό που εκπέμπεται από 10,000 κύτταρα κατά την μέτρηση ROS, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Ο FL2 αντιπροσωπεύει τον φθορισμό που ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας 488 και 530 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και ως μήκος κύματος εκπομπής.

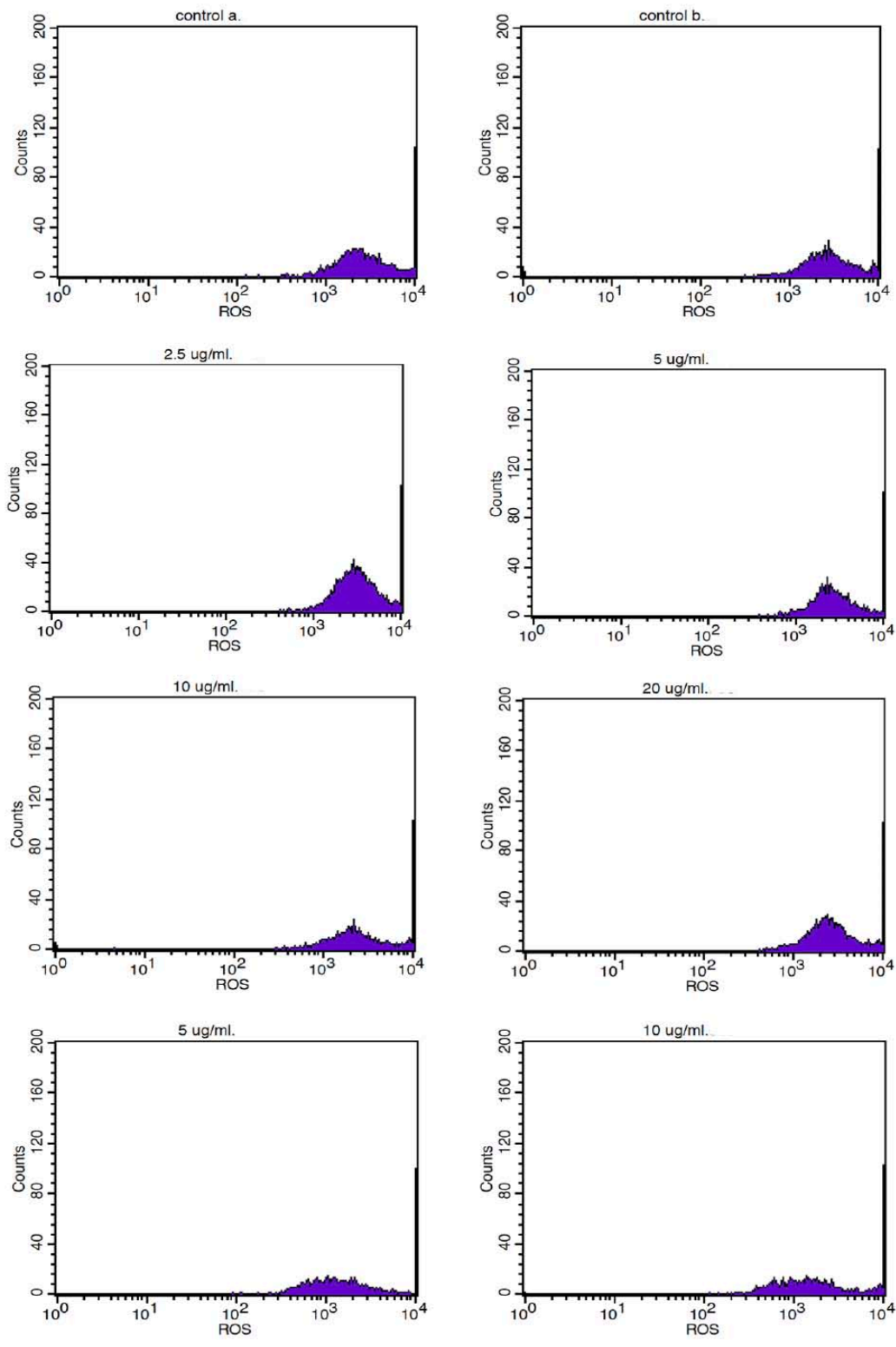
Το ΚΤΚΤ εμφάνισε κυτταροτοξικότητα στα 25 μg εκχυλίσματος, έπειτα από 24 ώρες επώασης με τα EA.hy926. Συνεπώς οι συγκεντρώσεις που χορηγήθηκαν ήταν 2.5, 5, 10 και 20 μg ΚΤΚΤ. Τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής έδειξαν πως το ΚΤΚΤ αύξησε στατιστικώς σημαντικά τα επίπεδα της GSH κατά 17.86%, 19.66%, και 22.25% στα 5, 10 και 20 μg ΚΤΚΤ αντίστοιχα, συγκριτικά με το control (διάγραμμα 14). Αντίθετα, τα επίπεδα ROS δεν παρουσίασαν κάποια στατιστικά σημαντική μεταβολή (διάγραμμα 14).



Διάγραμμα 14: Επίδραση εκχυλίσματος ΚΤΚΤ, στα επίπεδα GSH και ROS, στην κυτταρική σειρά EA.hy926, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control και παρουσιάζονται ως $mean \pm SEM$, ($n=3$). * $p<0,05$ στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με το control.

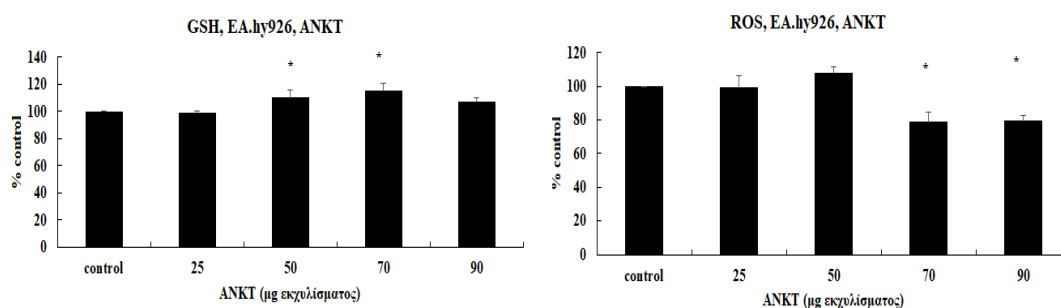


Εικόνα 57: Επίδραση KTKT στα επίπεδα GSH στην κυτταρική σειρά EA.hy926. Τα ιστογράμματα παρουσιάζουν τον φθορισμό που εκπέμπεται από 10,000 κύτταρα κατά την μέτρηση GSH, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Ο FL2 αντιπροσωπεύει τον φθορισμό που ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας 488 και 580 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και ως μήκος κύματος εκπομπής.

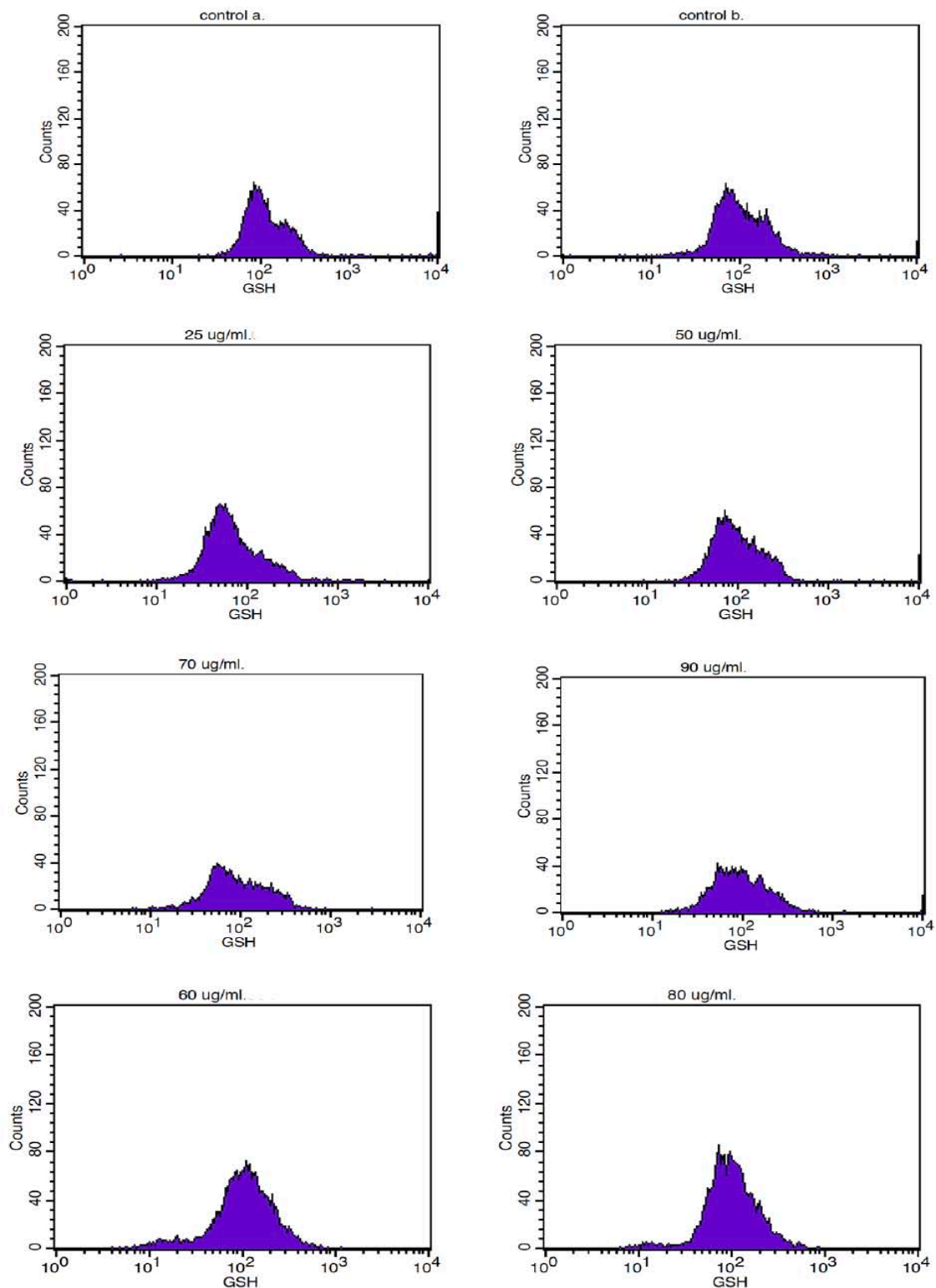


Εικόνα 58: Επίδραση ΚΤΚΤ στα επίπεδα ROS στην κυτταρική σειρά EA.hy926. Τα ιστογράμματα παρουσιάζουν τον φθορισμό που εκπέμπεται από 10,000 κύτταρα κατά την μέτρηση ROS, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Ο FL2 αντιπροσωπεύει τον φθορισμό που ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας 488 και 530 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και ως μήκος κύματος εκπομπής.

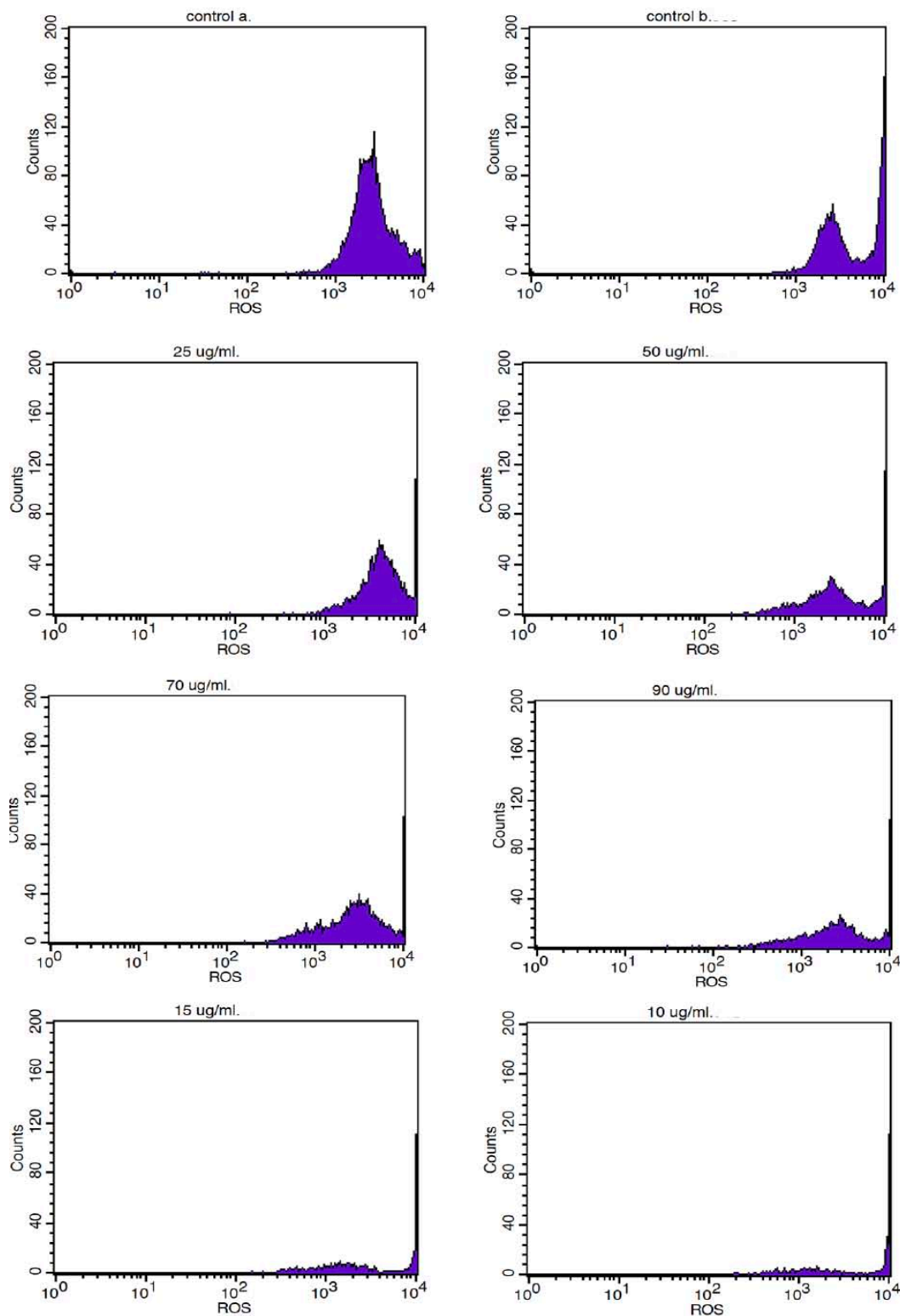
Το ANKT εμφάνισε κυτταροτοξικότητα στα 100 μg εκχυλίσματος, έπειτα από 24 ώρες επώασης με τα EA.ηγ926. Συνεπώς οι συγκεντρώσεις που χορηγήθηκαν ήταν 25, 50, 70 και 90 μg ANKT. Τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής έδειξαν πως το ANKT αύξησε στατιστικώς σημαντικά τα επίπεδα της GSH κατά 10.23% και 15.27% στα 50, και 70 μg ANKT αντίστοιχα, συγκριτικά με το control (διάγραμμα 15). Επιπλέον, τα επίπεδα ROS μειώθηκαν στατιστικά σημαντικά κατά 21% στα 70 και 90 μg, συγκριτικά με το control (διάγραμμα 15).



Διάγραμμα 15: Επίδραση εκχυλίσματος ANKT, στα επίπεδα GSH και ROS, στην κυτταρική σειρά EA.ηγ926, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control και παρουσιάζονται ως mean ± SEM, (n=3). *p<0,05 στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με το control.



Εικόνα 59: Επίδραση ANKT στα επίπεδα GSH στην κυτταρική σειρά EA.hy926. Τα ιστογράμματα παρουσιάζουν τον φθορισμό που εκπέμπεται από 10,000 κύτταρα κατά την μέτρηση 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.



Εικόνα 60: Επίδραση ANKT στα επίπεδα ROS στην κυτταρική σειρά EA.hy926. Τα ιστογράμματα παρουσιάζουν τον φθορισμό που εκπέμπεται από 10,000 κύτταρα κατά την μέτρηση ROS, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Ο FL2 αντιπροσωπεύει τον φθορισμό που ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας 488 και 530 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και ως μήκος κύματος εκπομπής.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία έγινε εκτίμηση αντιοξειδωτικής και αντιγενετοξικής δράσης τριών εκχυλισμάτων ανθών ελιάς και ενός εκχυλίσματος ανθών αγριελιάς.

Η αφορμή για την μελέτη των ανθών ελιάς προήλθε από το γεγονός ότι το δέντρο της ελιάς χρησιμοποιεί για την παραγωγή ελιάς μόνο το 20% των ανθών που σχηματίζονται σε κάθε δέντρο. Το υπόλοιπο 80% των ανθέων πέφτουν στο έδαφος και ανοικοδομούνται χωρίς καμία ωφέλεια. Είναι γνωστό από την βιβλιογραφία (41) ότι τα άνθη της ελιάς περιέχουν πλήθος ενώσεων τα οποία έχουν πολύ μεγάλο ενδιαφέρον για διάφορες χρήσεις από τον άνθρωπο καθώς διαθέτουν μεγάλο φορτίο βιολειτουργικών ενώσεων. Επομένως μία πιθανή εκμετάλλευση των ανθών ελιάς που φυσιολογικά πέφτουν στο έδαφος και χάνονται, μπορεί να δώσει μία πολύ μεγάλη οικονομική ενίσχυση για τους παραγωγούς καθώς και μια πηγή φυσικών ενώσεων για φαρμακευτικές και εταιρίες τροφίμων. Με τον τρόπο αυτό μειώνετε η ανάγκη για βιομηχανική παραγωγή φυσικών ενώσεων (42). Ο απώτερος σκοπός ωστόσο της παρούσας εργασίας ήταν να μελετηθούν τα εκχυλίσματα αυτά ώστε να αναδειχθούν οι ιδιότητες τους. Το κάθε ένα από αυτά θα αναλυθεί περεταίρω ώστε να βρεθούν εκχυλίσματα με ιδιαίτερη βιοδραστική ικανότητα.

Πιο αναλυτικά μέσω της μεθόδου DPPH, μετρήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων EKRA, ANKT, KTKT, AGRI. Στη συνέχεια τα εκχυλίσματα εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να δρουν ως αντιμεταλλαξιγόνα του DNA. Συμπληρωματικά η αντιοξειδωτική ικανότητα των υπό εξέταση δειγμάτων αξιολογήθηκε και σε κυτταρικό επίπεδο, με χρήση τριών κυτταρικών σειρών (72). Τα κύτταρα HeLa (κυτταρικής σειράς ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων τραχήλου της μήτρας), η οποία επιλέχθηκε λόγω της πληθώρας μελετών, που σχετίζονται με την αντιπολλαπλασιαστική, προαποπτωτική και DNA προστατευτική δράση των πολυφαινολών ελαιολάδου έναντι του καρκίνου (45,46,47). Τα κύτταρα Ea.hy926 (ενδοθηλιακά κύτταρα) επιλέχθηκαν καθώς συγκροτούν το ενδότερο τμήμα των αγγείων και οι ελεύθερες ρίζες παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων. Τα κύτταρα HepG2 (ηπατοκύτταρα) επιλέχθηκαν καθώς το ήπαρ συγκεντρώνει τα περισσότερα ένζυμα αποτοξικοποίησης στον οργανισμό. Με σκοπό να μη χρησιμοποιηθούν κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις των δειγμάτων στα πειράματα, η κυτταροτοξικότητά τους εκτιμήθηκε με την μέθοδο ΧΤΤ. Τέλος έγινε προσδιορισμός της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των κυττάρων μέσω κυτταρομετρίας ροής, όπου ελέγχθηκαν τα επίπεδα γλουταθειόνης (GSH) και τα επίπεδα δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS).

Τα αποτελέσματα από την μέθοδο DPPH έδειξαν ότι το ισχυρότερο εκχύλισμα είναι αυτό του AGRI με IC50 40,5 και ακολουθούν στην συνέχεια το EKRA με IC50 50,75 και τέλος τα ANKT και KTKT με IC50 73,25. Τα αποτελέσματα ακολουθούν τα επίπεδα των τιμών του ολικού φαινολικού φορτίου με το AGRI να έχει στο εκχύλισμα του μεγαλύτερη συγκέντρωση πολυφαινολών ακολούθως το EKRA και τέλος τα ANKT και KTKT (77,80). Παρόμοιες μελέτες σε πολυφαινολικά εκχυλίσματα ελαιολάδου (92) έδειξαν ότι οι πολυφαινόλες στα εκχυλίσματα αυτά παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση μέσω της μεθόδου DPPH καθώς και της μεθόδου ABTS•+. Πιθανόν τα μόρια στο ελαιόλαδο να είναι ίδια ή παρόμοια με αυτά στα εκχυλίσματα άνθεων.

Τα αποτελέσματα από το τεστ του Ames έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα AGRI, EKRA και ANKT έχουν παρόμοια ικανότητα να προστατεύουν το γενετικό υλικό από μεταλλάξεις με IC50 περίπου 3 μg/plate ενώ το KTKT έχει και εδώ την μικρότερη βιολειτουργική δύναμη για την προστασία του DNA και έχει IC50 περίπου 4 μg/plate. Τα αποτελέσματα αυτά πιθανός να έχουν σχέση με την χρονική στιγμή συγκομιδής των ανθών ελιάς, όπως θα αναλυθεί παρακάτω. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με την διεθνή βιβλιογραφία (82) όπου μελέτες έδειξαν ότι πολυφαινόλες από φυσικά φυτικά εκχυλίσματα καρπών όπως του καφέ έχουν ισχυρή αντιμεταλλαξιγόνο δράση σε πειράματα που έγιναν με ίδιο πρωτόκολλο με αυτό που έγινε και στην παρούσα εργασία (Ames test).

Στην επόμενη φάση της πτυχιακής εργασίας περάσαμε στις κυτταρικές σειρές. Με τα *in vitro* πειράματα μπορούμε να ελέγχουμε αντιοξειδωτική δράση ενός εκχυλίσματος (μέσω της μεθόδου DPPH) καθώς επίσης και αντιμεταλλαξιγόνο και δυνητικά αντικαρκινική δράση (μέσω του Ames test). Οι δοκιμές αυτές πραγματοποιήθηκαν και το επόμενο βήμα ήταν να περάσουμε σε κυτταρικές σειρές καθώς αυτές προσομοιάζουν καλύτερα τις συνθήκες που επικρατούν στον οργανισμό εφόσον πρόκειται για ευκαρυωτικά ανθρώπινα κύτταρα. Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατόν να ελέγχουμε τόσο την τοξικότητα που μπορεί να προκληθεί από μια ουσία στα κύτταρα (μέθοδος ΧΤΤ) όσο και να διαπιστώσουμε μέσω της κυτταρομετρίας ροής τα επίπεδα ενδογενών αντιοξειδωτικών μορίων όπως η γλουταθειόνη ενώ συγχρόνως μπορούν να προσδιοριστούν και τα επίπεδα δυνητικά επικίνδυνων μορίων όπως είναι οι δραστικές μορφές οξυγόνου.

Το πρώτο βήμα για να περάσουμε στον έλεγχο της δραστηριότητας των εκχυλισμάτων μας στις κυτταρικές σειρές ήταν να προσδιοριστούν οι τοξικές για τα κύτταρα συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων, δηλαδή οι συγκεντρώσεις οι οποίες προκαλούν από μόνες τους βλάβες στα κύτταρα, ώστε να αποκλειστούν και να εργαστούμε με συγκεντρώσεις που είναι ανεκτές από τα κύτταρα. Ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων έγινε με την βοήθεια της μεθόδου ΧΤΤ. Σε όλες τις κυτταρικές

σειρές HeLa, EA.hy926, HepG2 χορηγήθηκε ένα εύρος από συγκεντρώσεις με χαμηλότερη το 1μg εκχυλίσματος και υψηλότερη τα 100μg εκχυλίσματος.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα 4 εκχυλίσματα είναι πολύ διαφορετικά στην δραστικότητα τους τόσο μεταξύ τους όσο και το καθένα ξεχωριστά σε κάθε κυτταρική σειρά. Είναι αναμφισβήτητο ότι τα εκχυλίσματα ANKT και KTKT παρουσιάζουν την μικρότερη βιοδραστικότητα ενώ το AGRI παρουσιάζει την μεγαλύτερη, με το EKPA να έρχεται στην δεύτερη θέση. Ένα επιπλέον πολύ ενδιαφέρον στοιχείο που φάνηκε από την μελέτη αυτή είναι ότι οι διαφορετικές κυτταρικές σειρές δεν έχουν την ίδια ανοχή στα εκχυλίσματα. Η κυτταρική σειρά HeLa παρουσιάζει την μεγαλύτερη αντοχή σε όλα τα εκχυλίσματα σε σχέση με τις άλλες 2 κυτταρικές σειρές και αυτό πιθανότατα οφείλετε στη διαφορετική ικανότητα που έχουν οι διαφορετικές σειρές στην απορρόφηση και μεταβολισμό των ξενοβιοτικών μορίων όπως και στους διαφορετικούς τύπους των μεμβρανικών υποδοχέων που διαθέτουν τα εκάστοτε κύτταρα. (48, 49). Είναι σίφρον να υπολογιστεί και το γεγονός ότι η σειρά των κυττάρων HeLa και η κυτταρική σειρά HepG2 αφορούν καρκινικά κύτταρα που έχουν χάσει πάρα πολλές από τις φυσιολογικές ιδιότητες των κυττάρων μεταξύ των οποίων η απώλεια ελέγχου για βλάβες στο DNA, ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος κ.α. (93).

Το επόμενο βήμα εφόσον είναι γνωστή πλέον η συγκέντρωση όπου το κάθε εκχύλισμα από τα τέσσερα που ελέγχουμε εμφανίζει τοξικότητα σε κάθε μία από τις τρεις κυτταρικές σειρές, είναι να επιλεγούν οι συγκεντρώσεις που θα χρησιμοποιηθούν στις κυτταροκαλλιέργειες ώστε να διαπιστωθεί η επίδραση τους στα επίπεδα της GSH αλλά και των ROS με την βοήθεια κυτταρομέτρου. Μετά την ανάλυση των αποτελεσμάτων της κυτταρομετρίας φάνηκε πως και τα 4 εκχυλίσματα ανθών ελιάς αυξάνουν σε κάποιες συγκεντρώσεις στατιστικώς σημαντικά τα επίπεδα GSH σε όλους τους κυτταρικούς τύπους.

Αξίζει να σημειωθεί πως σε κάποιες περιπτώσεις (πχ. AGRI – HepG2) όταν η συγκέντρωση του εκχυλίσματος είναι πάνω από μία τιμή, έχουμε την εμφάνιση προοξειδωτικού φαινομένου, με συνέπεια την μείωση των ενδογενών επιπέδων της GSH (50, 51, 94) Είναι διεθνώς γνωστό ότι το ελαιόλαδο μπορεί να προκαλέσει τέτοια αποτελέσματα, καθώς διαθέτει ελαιοευρωπαϊνή και υδροξυτυροσόλη η οποίες λειτουργούν ως προοξειδωτικά όπως φαίνεται και στα αποτελέσματα μελέτων (81) ο καφές (πλούσιος σε πολυφαινόλες) και πολυφαινολικό εκχύλισμα ελαιόλαδου που εξετάστηκαν στις εργασίες αυτές, φαίνεται να έχει θετική επίδραση στα ενδογενή επίπεδα της GSH στις σειρές HepG2, Ea.Hy926, HeLa, C2C12 όπου και δοκιμάστηκαν. Σε άλλη μελέτη, η χορήγηση καφέ σε επίμυες φαίνεται να επιδρά θετικά σε όλους τους δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε πολλούς ιστούς (50, 81, 84, 92). Οι φαινόλες του ελαιολάδου παράλληλα έχει αποδειχθεί πως αυξάνουν τα επίπεδα της

γλουταθειόνης και στο πλάσμα του ανθρώπου (52). Καθώς το άνθος της ελιάς είναι πρόδρομο της ώριμης ελιάς, είναι λογικό τέτοια μόρια ή ανάλογα τους να βρίσκονται και στα άνθη της ελιάς. Η εμφάνιση προοξειδωτικής ικανότητας στις πολυφαινόλες εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως από τη χημική τους φύση, τη συγκέντρωσή τους όπως και από τις μικροπεριβαλλοντικές συνθήκες, για παράδειγμα ο κυτταρικός τύπος, η οξειδοαναγωγική κατάσταση και το pH των κυττάρων (53, 54).

Πιο αναλυτικά, τα εκχυλίσματα μας είναι πολυφαινολικά. Οι πολυφαινόλες έχουν την ικανότητα να δρουν ως αντιοξειδωτικά όταν αυτές βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις στα κύτταρα, ενώ όταν η συγκέντρωσή τους ξεπεράσει ένα κατώφλι (που διαφέρει από ένωση σε ένωση και σε κάθε κυτταρικό τύπο) τότε δρουν ως προοξειδωτικές ενώσεις (55, 56, 57, 58, 59). Με τον τρόπο αυτό γίνεται αντιληπτό ότι οι πολυφαινόλες δρουν μέσω του φαινομένου της όρμησης, το οποίο ισχύει για πληθώρα ερεθισμάτων που δέχεται ένας οργανισμός (60, 61). Το γεγονός ότι η πτώση της GSH (σε σχέση με τη μέγιστη τιμή της) εντοπίστηκε στις μέγιστες μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων (πάνω από τις οποίες τα εκχυλίσματα παρουσίαζαν κυτταροτοξική δράση) ενισχύει την προαναφερθείσα υπόθεση, καθώς μία πιθανότητα είναι η συγκέντρωση των πολυφαινολών (και των υπόλοιπων συστατικών των εκχυλισμάτων μας) να ήταν τόσο υψηλή που εμφάνισε το προοξειδωτικό φαινόμενο στις κυτταρικές σειρές. (68,69,70,71)

Παράλληλα από τα αποτελέσματα διαπιστώνεται πως σε κάποιους ιστούς η επίδραση που παρατηρείται από τα εκχυλίσματα στην αύξηση της GSH είναι ότι η αύξηση αυτή πραγματοποιείται σε κάποια εκχυλίσματα σε μικρές συγκεντρώσεις (AGRI στα 10μg, EKRA στα 20μg) ενώ στα άλλα (ANKT στα 50μg, KTKT στα 80μg) χρειάζονται πολύ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Με τον τρόπο αυτό μπορούμε να συμπεράνουμε πως το εκχύλισμα AGRI παρουσιάζει την μεγαλύτερης βιολειτουργική ικανότητα με δεύτερο και εξίσου ικανό το EKRA. Τα ANKT και KTKT δεν παρουσιάζουν μεγάλη ικανότητα στη αύξηση της GSH καθώς χρειάζονται πολύ μεγάλη ποσότητα εκχυλίσματος ώστε να επηρεάσουν τα επίπεδα της GSH (62). Σε συμφωνία με την διεθνή βιβλιογραφία ερχονται τα αποτελέσματα αυτά καθώς αν και δεν έχουν γίνει παρόμοιες μελέτες σε άνθη ελαιόδεντρων, τα δεδομένα από το ελαιόλαδο και τα φύλλα της ελιάς δείχνουν ότι τα μόρια που περιέχουν επιδρούν αυξάνοντας τα επίπεδα στο ενδογενές αντιοξειδωτικό μόριο, την GSH. (81,95)

Η αύξηση των επιπέδων της GSH μπορούν να εξηγηθούν με πολλούς πιθανούς μοριακούς μηχανισμούς όπως η αύξηση των ενζυμικών συστημάτων που είναι αρμόδια για την σύνθεση της γλουταθειόνης (για παράδειγμα η συνθετάση της γλουταθειόνης και η λιγάση γ-γλουτάμυλοκυστεϊνης). Άλλος πιθανός μηχανισμός είναι η μεγιστοποίηση της δραστηριότητας της ρεδοκτάσης της GSH (GR). Η GR έχει

την ικανότητα να μετατρέπει την οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης G-S-S-G σε ανηγμένη μορφή GSH που είναι και η ενεργή μορφή. (67). Άλλοι μηχανισμοί περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 ο οποίος με την σειρά του ενεργοποιεί το ARE όταν εντοπιστεί οξειδωτικό στρες (62,82) και τέλος η ύπαρξη περίσσειας γλουταθειόνης έπειτα από αντίδραση με ελεύθερες ρίζες η οποία και προκαλεί άμεσα την εξουδετέρωση των ριζών.

Στο δεύτερο μέρος της κυτταρομετρίας ροής έγινε η εκτίμηση των ενδογενών επιπέδων δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) στις κυτταρικές σειρές HeLa, HepG2 και EA.hy926 έπειτα από τη χορήγηση των εκχυλισμάτων ανθών ελιάς. Αξίζει να υπογραμμιστεί ότι επίπεδα των ROS είναι ενδογενή επίπεδα και δεν έχουμε κάποιο εξωτερικό οξειδωτικό παράγοντα να τα επηρεάζει. Σε αντίθεση με τα επίπεδα της γλουταθειόνης, τα εκχυλίσματα μας δεν είχαν όλα τόσο έντονη επίδραση στα επίπεδα των ROS. Πιο συγκεκριμένα το εκχύλισμα ΚΤΚΤ δεν παρουσίασε καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή σε καμία συγκέντρωση σε καμία κυτταρική σειρά. Αντίστοιχα το ANKT παρόλο που μειώνει τα επίπεδα των ROS, αυτή η μείωση πραγματοποιείται με χρήση μεγαλύτερης ποσότητας εκχυλίσματος σε σχέση με τα άλλα δείγματα. Αντίθετα το AGRI (λίγο περισσότερο) και το ΕΚΡΑ δημιουργούν μείωση των επιπέδων των ROS στα κύτταρα και με πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις εκχυλίσματος (63,64).

Αξίζει να σημειωθεί πως η κυτταρική σειρά που επηρεάζονται περισσότερο τα επίπεδα των ROS είναι η HepG2. Αυτό είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον εύρημα, καθώς το ήπαρ είναι το κύριο όργανο αποτοξικοποίησης του οργανισμού με αποτέλεσμα να συσσωρεύονται σε αυτό ROS και παρατηρούμε ότι με τα συγκεκριμένα εκχυλίσματα μειώνονται τα επίπεδα αυτά στατιστικά σημαντικά με πολύ μικρές ποσότητες εκχυλισμάτων. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με την διεθνή βιβλιογραφία σε πειράματα που έγιναν στις ίδιες κυτταρικές σειρές με αυτές που πραγματοποιήσαμε στην παρούσα μελέτη (81) με την κυτταρική σειρά HepG2 να επηρεάζεται περισσότερο. Πολλές μελέτες επίσης δείχνουν ότι τα επίπεδα των ROS δεν επηρεάζονται και παραμένουν ίδια με το control όπως φαίνεται και σε κάποια από τα δικά μας εκχυλίσματα, για παράδειγμα το ΚΤΚΤ που δεν επηρεάζει καθόλου τα ROS. (94, 96)

Συμπερασματικά φαίνεται ότι το πιο ισχυρό βιοδραστικό από τα εκχυλίσματα μας είναι το AGRI (το εκχύλισμα αγριελιάς), ακολουθεί το ΕΚΡΑ (Κορωνέικη ελιά) και τελευταία τα εκχυλίσματα Λιανολιάς Κέρκυρας με πιο ισχυρό το ANKT και τελευταίο το ΚΤΚΤ με πολύ μικρότερη βιοδραστικότητα σε σχέση με τα άλλα 3 εκχυλίσματα. Η τόσο μεγάλη διαφορά των τριών εκχυλισμάτων σε σχέση με το ΚΤΚΤ μπορεί να εξηγηθεί από την περίοδο συγκομιδής του συγκεκριμένου δείγματος σε σχέση με τα άλλα.

Η HPLC ανάλυση έδειξε την παρουσία κοινών δευτερογενών μεταβολιτών σε όλα τα δείγματα (78, 79). Τα εκχυλίσματα AGRI, EKRA και ANKT παρουσιάζουν παρόμοια ένταση απορροφήσεις και στα τρία μήκη κύματος που ελέγχθηκαν (254 nm, 280nm και 355nm) με μέγιστη απορρόφηση σε χρόνο ανάσχεσης 30 min, σε μήκος κύματος 254 nm που αντιστοιχεί στην ουσία ολεωρωπεΐνη. Σε αντίθεση με το εκχύλισμα ΚΤΚΤ όπου παρατηρούνται μικρότερης έντασης απορροφήσεις με την ολεωρωπεΐνη να μην αποτελεί την βασική ουσία του εκχυλίσματος στα 254 nm, γεγονός το οποίο επιβεβαιώνεται από την βιβλιογραφία και οφείλεται στην ημερομηνία συλλογής του δείγματος ΚΤΚΤ, το οποίο συλλέχτηκε στις 5-6-7/5/2017 (νωρίτερα από όλα τα υπόλοιπα δείγματα). Μία φυτοχημική μελέτη σε άνθη ελιάς της Τυνησιακής ποικιλίας 'Chemlali' διαπίστωσε αύξηση των επιπέδων ολεωρωπεΐνης με την πάροδο της ανθοφορίας (41). Η σύσταση των πολυφαινολών επηρεάζεται από τον χρόνο συγκομιδής, ωρίμανσης, τρόπο παραγωγής, μεθόδους καλλιέργειας, από την ποικιλία κ.α.

Η ανθοφορία στην ελιά έχει άμεση σχέση με την θερμοκρασία που με την σειρά του σχετίζεται με την εποχή του χρόνου. Ο σχηματισμός των ανθοταξιών στο δέντρο της ελιάς γίνεται από τον Γενάρη έως τέλος Μαΐου, αρχές Ιουνίου. Η καταλυτική ωστόσο περίοδος ανθογονίας φαίνεται να είναι οι δύο πρώτοι μήνες του έτους όπου γίνονται διάφορες μεταβολές που μετατρέπουν τα μεριστώματα από βλαστικά σε ανθικά(43,44).

Στις αρχές της άνοιξης, 2,5 μήνες περίπου πριν την ανθοφορία αρχίζουν να φαίνονται στους οφθαλμούς οι πρώτες μορφολογικές αλλαγές, που καταλήγουν στον σχηματισμό των ανθοταξιών. Το δένδρο της ελιάς είναι από τα αειθαλή καρποφόρα που η επίδραση του ψύχους παίζει καθοριστικό ρόλο στην άνθιση τους. Οι οφθαλμοί που δημιουργούνται κατά την περίοδο του καλοκαιριού έχουν ανάγκη από χαμηλές θερμοκρασίες την περίοδο του χειμώνα για να διαφοροποιηθούν σε ανθοταξίες(88,89).

Επίσης φαίνεται ότι το δέντρο της ελιάς ανθοφορεί και δίνει καρπούς όταν βρίσκεται σε περιβαλλοντική θερμοκρασία που είναι κατώτερη από 7°C για 1.200 ώρες. Είναι γνωστό ότι μετά την έλευση βαρύν χειμώνα και χιονιού, επέρχεται καλή ανθοφορία και επομένως καλή σοδιά (88).

Είναι αδήριτη ανάγκη η ικανοποίηση των αναγκών σε χαμηλές θερμοκρασίες ώστε να υπάρχει η διαφοροποίηση των ανθοφόρων οφθαλμών και επομένως καλή καρπόδεση. Εφόσον η καλλιέργεια των ελαιόδεντρων γίνεται σε πάρα πολλές περιοχές της χώρας, είναι επιτακτική ανάγκη, για την μεγιστοποίηση της απόδοσης, να επιλέγετε η κατάλληλη ποικιλία για την ανάλογη περιοχή και τις ανάλογες απαιτήσεις στις θερμοκρασίες (43,44).

Εν κατακλείδι, μπορούμε να συμπεράνουμε πως τα εκχυλίσματα ανθέων ελιάς AGRI, EKRA, ANKT, KTKT παρουσιάζουν αντιοξειδωτική και αντιμεταλλαξιγόνο δράση σε *in vitro* επίπεδο. Σε επίπεδο κυττάρων τα εκχυλίσματα μας φαίνεται να προστατεύει τα κύτταρα από το οξειδωτικό στρες, εξαιτίας της ισχυρής αντιοξειδωτικής δράσης των πολυφαινολών που υπάρχουν στο εκχύλισμα και βελτιώνουν την οξειδοαναγωγική κατάσταση τόσο των κυττάρων του τραχήλου της μήτρας όσο και των ηπατικών και ενδοθηλιακών κυττάρων. (72, 81) Τα αποτελέσματα αυτά είναι ιδιαίτερα σημαντικά καθώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν άνθη ελιάς που φυσιολογικά αφήνονταν στο περιβάλλον να ανοικοδομηθούν και εφόσον γίνετε εντατική καλλιέργεια της ελιάς υπάρχουν τεράστιες ποσότητες ανθών που χάνονται και τώρα υπάρχει η δυνατότητα να αξιοποιηθούν(65,66,73,74,75,76).

Σε επόμενη φάση θα ήταν σκόπιμο να γίνει συγκριτική μελέτη σε ποιοτικό αλλά και ποσοτικό επίπεδο μπουμπουκιών, μερικώς ανθισμένων και πλήρως ανθισμένων ανθέων Λιανολιάς Κερκύρας, Κορωνέικης και αγριελιάς, με στόχο την παρακολούθηση της διακύμανσης των δευτερογενών μεταβολιτών κατά την πάροδο της ανθοφορίας ώστε να διαπιστωθεί εάν το δείγμα KTKT που παρουσίασε την μικρότερη βιολειτουργική δράση οφείλετε στον χρόνο συλλογής ή σε κάτι άλλο. Παράλληλα θα ήταν ενδιαφέρον η εμπορική αξιοποίηση των παραπάνω βιολογικών ιδιοτήτων των εκχυλισμάτων και η διερεύνηση των πιθανών εφαρμογών τους σε διάφορους τομείς της βιομηχανίας (τροφίμων, καλλυντικών κ.α.) μετά από μικρή τροποποίηση των βιοδραστικών μορίων και έλεγχο τις δραστηριότητας αυτών ώστε να είναι πιο δραστικά από τα αρχικά μόρια, και αυτά στην συνέχεια να μπορούν να κατοχυρωθούν (83,84,90,91). Είδη υπάρχουν πολλά προϊόντα στην αγορά που προέρχονται από φυσικά εκχυλίσματα ελαιόλαδου. Ωστόσο το ελαιόλαδο είναι βρώσιμο και εφόσον αποδειχθεί και από άλλες μελέτες ότι τα άνθη της ελιάς έχουν παρόμοιες ιδιότητες, τότε μπορούν να χρησιμοποιηθούν αυτά στα καλλυντικά σκευάσματα αντί του ελαιόλαδου καθώς μέχρι στιγμής δεν χρησιμοποιούνται σε κάτι και αφήνονται στο περιβάλλον.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Γ. Κ. Γεωργαλάς, στο λήμμα "Ελαία", Μεγάλη Ελληνική Εγκυκλοπαίδεια Π. Δρανδάκη, Αθήνα
2. Jean-Frédéric Terral, Natalia Alonso, Ramon Buxó i Capdevila, Noureddine Chatti, Laurent Fabre, Girolamo Fiorentino, Philippe Marinval, Guillem Pérez Jordá, Bénédicte Pradat, Núria Rovira, Paul Alibert. (2004), Historical biogeography of olive domestication (*Olea europaea* L.) as revealed by geometrical morphometry applied to biological and archaeological material
3. Nili Liphshitz, Ram Gophna, Moshe Hartmana and Gideon Bigerh, (1991), The Beginning of Olive (*Olea europaea*) Cultivation in the Old World: A Reassessment
4. M.T. Ozkaya, E. Ergulen, S. Ulger, N. Ozilbey. (2008) Molecular, Morphological and Oil Composition Variability within Olive (*Olea europaea* L.) at Semi-Arid Conditions. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 22:2, pages 699-704.
5. Κώδικας Τροφίμων, Ποτών και Αντικειμένων Κοινής Χρήσης, Άρθρο 71, παράγραφος 1
6. M. Loukas & C. B. Krimbas (2015) History of olive cultivars based on their genetic distances
7. Theodora Psaltopoulou, Androniki Naska, Philippos Orfanos, Dimitrios Trichopoulos, Theodoros Mountokalakis, and Antonia Trichopoulou,(2004), Olive oil, the Mediterranean diet, and arterial blood pressure: the Greek European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study
8. Halliwell, B., Gutteridge, J.M., 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 186, 1–85.
9. Mylonas, C., Kouretas, D., 1999. Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo* 13, 295 – 66 Nguyen, T., Nioi, P., Pickett, C.B., 2009. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 284, 13291–13295. <https://doi.org/10.1074/jbc.R900010200>
10. Lobo, V., Patil, a, Phatak, a, Chandra, N., 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn. Rev.* 4, 118–26. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>
11. Sengupta, J., Nilsson, J., Gursky, R., Spahn, C. M. T., Nissen, P., & Frank, J. (2004). Identification of the versatile scaffold protein RACK1 on the eukaryotic ribosome by cryo-EM. *Nature Structural & Molecular Biology*, 11, 957. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/nsmb822>
12. Sengupta, J., Nilsson, J., Gursky, R., Spahn, C. M. T., Nissen, P., & Frank, J. (2004). Identification of the versatile scaffold protein RACK1 on the eukaryotic ribosome by cryo-EM. *Nature Structural & Molecular Biology*, 11, 957. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/nsmb822>
13. Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective. American Institute for Cancer Research
14. Battin, T. J., S. Luysaert, L. A. Kaplan, A. K. Aufdenkampe, A. Richter, and L. J. Tranvik (2009): The boundless carbon cycle. *Nature Geoscience* 2:598-600. DOI: [doi:10.1038/ngeo618](https://doi.org/10.1038/ngeo618)
15. Μελέτη της επίδρασης εκχυλισμάτων σταφυλιού σε μυικά και ενδοθηλιακά κύτταρα με συνδυασμό μοριακών τεχνικών. Διδακτορική διατριβή, Γκουτζουρέλα Νικόλαου, Λάρισα 2016.

16. Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006. Freeradicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions* 160, 1–40. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>
17. Παπαγαλάνης, Ν., 2014. Οξειδωτικό στρες και ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημα I . *Δραστικές ρίζες οξυγόνου* 26, 151–194.
18. Barrera, G., 2012. Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. *ISRN Oncol.* 2012, 137289. <https://doi.org/10.5402/2012/137289>
19. Knight, J.A., 2000. Review: Free radicals, antioxidants, and the immune system. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 30, 145–158
20. Phaniendra, A., Jestadi, D.B., Periyasamy, L., 2015. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian J. Clin. Biochem.* 30, 11–26. <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>
21. Sies, H., 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.* 82, 291–295.
22. Espinosa-Diez, C., Miguel, V., Mennerich, D., Kietzmann, T., Sánchez-Pérez, P., Cadenas, S., Lamas, S., 2015. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biol.* 6, 183–197. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.07.008>
23. Lobo, V., Patil, a, Phatak, a, Chandra, N., 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn. Rev.* 4, 118–26. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>
24. Halliwell, B., 2001. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* 18, 685–716.
25. Επίδραση της χορήγησης σκευάσματος υδατανθράκων-πρωτεϊνών σε δείκτες οξειδωτικού στρες, φλεγμονής και υποξίας μετά από άσκηση σε ανθρώπους. Διδακτορική διατριβή, Κερασιώτη Ευθαλία, Λάρισα 2014
26. Ding, Y., Yao, H., Yao, Y., Fai, L.Y., Zhang, Z., 2013. Protection of dietary polyphenols against oral cancer. *Nutrients* 5, 2173–2191. <https://doi.org/10.3390/nu5062173>
27. Pandey, K.B., Rizvi, S.I., 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2, 270–278. <https://doi.org/10.4161/oxim.2.5.9498>
28. Korkina, L.G., De Luca, C., Kostyuk, V.A., Pastore, S., 2009. Plant polyphenols and tumors: from mechanisms to therapies, prevention, and protection against toxicity of anti-cancer treatments. *Curr. Med. Chem.* 16, 3943–3965.
29. Giovinozzo, G., Grieco, F., 2015. Functional Properties of Grape and Wine Polyphenols. *Plant Foods Hum. Nutr.* 70, 454–462. <https://doi.org/10.1007/s11130-015-0518-1>
30. Visioli, F., Poli, A., Gall, C., 2002. Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Med. Res. Rev.* 22, 65–75.
31. Widmer, R.J., Freund, M.A., Flammer, A.J., Sexton, J., Lennon, R., Romani, A., Mulinacci, N., Vinceri, F.F., Lerman, L.O., Lerman, A., 2013. Beneficial effects of polyphenol-rich olive oil in patients with early atherosclerosis. *Eur. J. Nutr.* 52, 1223–1231.
32. Farr, S.A., Price, T.O., Dominguez, L.J., Motisi, A., Saiano, F., Niehoff, M.L., Morley, J.E., Banks, W.A., Ercal, N., Barbagallo, M., 2012. Extra virgin olive oil improves learning and memory in SAMP8 mice. *J. Alzheimers. Dis.* 28, 81–92. <https://doi.org/10.3233/JAD-2011-110662>

33. Martinez-Huelamo, M., Rodriguez-Morato, J., Boronat, A., de la Torre, R., 2017. Modulation of Nrf2 by Olive Oil and Wine Polyphenols and Neuroprotection. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 6. <https://doi.org/10.3390/antiox6040073>
34. Γενική Βοτανική, Η μορφολογία, η ανατομία και η φυσιολογία των ανώτερων φυτών. Γ. Αϊβαλάκης, Γ. Καραμπουρνιώτης, Κ. Φασσέας, Εκδόσεις Έμβρυο
35. Βιολογία των φυτών, Peter Raven, Ray F. Evert, Susan E. Eichhorn, Utopia
36. Ελαιοκομία, Ιωάννης Θέρσιος, εκδόσεις ΓΑΡΤΑΓΑΝΗ, 2005
37. Mortelmans K, Zeiger E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutat Res Mol Mech Mutagen* [Internet]. 2000 Nov 20;455(1–2):29–60. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0027510700000646>
38. Hix S, Kadiiska MB, Mason RP, Augusto O. In vivo metabolism of tert-butyl hydroperoxide to methyl radicals. EPR spin-trapping and DNA methylation studies. *Chem Res Toxicol*. 2000 Oct;13(10):1056–64.
39. By, J. J. (2015). From www.bloodjournal.org by guest on June 30, 2015. For personal use only. *Fibrinolytic Properties of a Human*, 71(6), 1669-1675.
40. Costantini, S., G. Di Bernardo, M. Cammarota, G. Castello, and G. Colonna. 2013. "Gene Expression Signature of Human HepG2 Cell Line." *Gene* 518 (2): 33545. doi:10.1016/j.gene.2012.12.106.
41. Abaza, L., Taamalli, A., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., Zarrouk, M., & Youssef, N. Ben. (2017). Changes in phenolic composition in olive tree parts according to development stage. *Food Research International*.
42. Al-Azzawie, H. F. and M. S. S. Alhamdani (2006). Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. *Life Sciences* 78(12): 1371-1377
43. Badr, S.A., Hartmann, H.T. 1971. Effect of diurnally fluctuating vs. constant temperatures on flower induction and sex expression in olive (*Olea europaea*). *Physiol. Plant.* 24, 40–45.
44. Barranco D., Ruiz N., Gómez-Del Campo M. (2005). Frost tolerance of eight olive cultivars. *HortScience*, 40(3), 558–560.
45. Pampaloni, B., Mavilia, C., Fabbri, S., Romani, A., Ieri, F., Tanini, A., Tonelli, F., Brandi, M.L., 2014. In vitro effects of extracts of extra virgin olive oil on human colon cancer cells. *Nutr. Cancer* 66, 1228–1236.
46. Cardeno, A., Sanchez-Hidalgo, M., Cortes-Delgado, A., Alarcon de la Lastra, C., 2013. Mechanisms involved in the antiproliferative and proapoptotic effects of unsaponifiable fraction of extra virgin olive oil on HT-29 cancer cells. *Nutr. Cancer* 65, 908–918.
47. Warleta, F., Quesada, C.S., Campos, M., Allouche, Y., Beltran, G., Gaforio, J.J., 2011. Hydroxytyrosol protects against oxidative DNA damage in human breast cells. *Nutrients* 3, 839–857. <https://doi.org/10.3390/nu3100839>
48. Garcia-Canton, C., Minet, E., Anadon, A., & Meredith, C. (2013). Metabolic characterization of cell systems used in in vitro toxicology testing: Lung cell system BEAS-2B as a working example. *Toxicology in Vitro*, 27(6), 1719–1727. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.05.001>
49. Garcia-Canton C, Minet E, Anadon A, Meredith C (2013). Metabolic characterization of cell systems used in in vitro toxicology testing: lung cell system BEAS-2B as a working example. *Toxicol In Vitro*. 2013 Sep;27(6):1719-27. doi: 10.1016/j.tiv.2013.05.001. Epub 2013 May 10.

50. Priftis, A., Stagos, D., Konstantinopoulos, K., Tsitsimpikou, C., Spandidos, D. A., Tsatsakis, A. M., Kouretas, D. (2015). Comparison of antioxidant activity between green and roasted coffee beans using molecular methods. *Molecular Medicine Reports*, 12(5), 7293–7302. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4377>
51. Prochazkova, D., Bousova, I., & Wilhelmova, N. (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.01.018>
52. Pliszka, B., Huszcza-Ciolkowska, G., & Wierzbicka, E. (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. <https://doi.org/10.17306ZJ.AFS.2016.1.6>
53. Leon-Gonzalez, A.J., Auger, C., Schini-Kerth, V.B., 2015. Pro-oxidant activity of polyphenols and its implication on cancer chemoprevention and chemotherapy. *Biochem. Pharmacol.* 98, 371–380. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.07.017>
54. Kouka, P., Priftis, A., Stagos, D., Angelis, A., Stathopoulos, P., Xinos, N., Skaltsounis, A.-L., Mamoulakis, C., Tsatsakis, A.M., Spandidos, D.A., Kouretas, D., 2017. Assessment of the antioxidant activity of an olive oil total polyphenolic fraction and hydroxytyrosol from a Greek *Olea europea* variety in endothelial cells and myoblasts. *Int. J. Mol. Med.* 40, 703–712. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3078>
55. Bouayed J, Bohn T. Exogenous Antioxidants—Double-Edged Swords in Cellular Redox State: Health Beneficial Effects at Physiologic Doses versus Deleterious Effects at High Doses. *Oxid Med Cell Longev.* 2010 Jul;3(4):228–37.
56. Sakihama Y, Cohen MF, Grace SC, Yamasaki H. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology [Internet]*. 2002 Aug 1;177(1):67–80. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300483X02001968>
57. Procházková D, Boušová I, Wilhelmová N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia [Internet]*. 2011 Jun;82(4):513–23. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X11000396>
58. Carocho M, Ferreira ICFR. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol [Internet]*. 2013 Jan;51(0):15–25. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691512006941>
59. Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S, et al. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *Biomed Res Int [Internet]*. 2014 Jan [cited 2015 Jan 12];2014:761264. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3920909&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
60. Radak Z, Chung HY, Koltai E, Taylor AW, Goto S. Exercise, oxidative stress and hormesis. *Ageing Research Reviews.* 2008.
61. Visioli F. Xenobiotics and human health: A new view of their pharma-nutritional role. *PharmaNutrition.* 2015;3(2):60–4.

62. Visioli, F., Wolfram, R., Richard, D., Abdullah, M.I.C.B., Crea, R., 2009. Olive Phenolics increase glutathione levels in healthy volunteers. *J. Agric. Food Chem.* 57, 1793–1796. <https://doi.org/10.1021/jf8034429>
63. Visioli, F., Galli, C., Bornet, F., Mattei, A., Patelli, R., Galli, G., Caruso, D., 2000. Olive oil phenolics are dose-dependently absorbed in humans. *FEBS Lett.* 468, 159–160.
64. Visioli, F., Poli, A., Gall, C., 2002. Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Med. Res. Rev.* 22, 65–75.
65. Warleta, F., Quesada, C.S., Campos, M., Allouche, Y., Beltran, G., Gaforio, J.J., 2011. Hydroxytyrosol protects against oxidative DNA damage in human breast cells. *Nutrients* 3, 839–857. <https://doi.org/10.3390/nu3100839>
66. Widmer, R.J., Freund, M.A., Flammer, A.J., Sexton, J., Lennon, R., Romani, A., Mulinacci, N., Vinceri, F.F., Lerman, L.O., Lerman, A., 2013. Beneficial effects of polyphenol-rich olive oil in patients with early atherosclerosis. *Eur. J. Nutr.* 52, 1223–1231.
67. Papadopoulou, A., Petrotos, K., Stagos, D., Gerasopoulos, K., Maimaris, A., Makris, H., Kafantaris, I., Makri, S., Kerasioti, E., Halabalaki, M., Briudes, V., Ntasi, G., Kokkas, S., Tzimas, P., Goulas, P., Zakharenko, A.M., Golokhvast, K.S., Tsatsakis, A., Kouretas, D., 2017. Enhancement of Antioxidant Mechanisms and Reduction of Oxidative Stress in Chickens after the Administration of Drinking Water Enriched with Polyphenolic Powder from Olive Mill Waste Waters. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017, 8273160. <https://doi.org/10.1155/2017/8273160>
68. Richard, N., Arnold, S., Hoeller, U., Kilpert, C., Wertz, K., Schwager, J., 2011. Hydroxytyrosol is the major anti-inflammatory compound in aqueous olive extracts and impairs cytokine and chemokine production in macrophages. *Planta Med.* 77, 1890–1897. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1280022>
69. Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., Jimenez, L., 2005. Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 45, 287–306.
70. Scalbert, A., Williamson, G., 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* 130, 2073S–85S.
71. Sies, H., 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.* 82, 291–295.
72. Aristidis Veskoukis, Efthalia Kerasioti, Alexandros Priftis, Paraskevi Kouka, Ypatios Spanidis, Sotiria Makri and Dimitrios Kouretas. (2018). A battery of translational biomarkers for the assessment of the in vitro and in vivo antioxidant action of plant polyphenolic compounds: The biomarker issue. *Current Opinion in Toxicology* 2018 <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2018.10.001>
73. Ghanbari, Rahele, Farooq Anwar, Khalid M. Alkharfy, Anwarul Hassan Gilani, and Nazamid Saari. 2012. “Valuable Nutrients and Functional Bioactives in Different Parts of Olive (*Olea Europaea* L.)-A Review.” *International Journal of Molecular Sciences*.
74. Ghisalberty, E. L. (1998). Biological and pharmacological activity of naturally occurring iridoids and secoiridoids. *Phytomedicine* 5(2): 147-163.
75. Ghrisi, N., Boulouha, B., Benichou, M., Hilali, S. 1999. Agro-physiological evaluation of the phenomenon of pollen compatibility in olive. Case of the Mediterranean Collection at the Menara Station, Marrakech. *Olivae* 79: 51-59.
76. Giourga Ch. & Loumou A. (2003), Olive groves: “The life and identity of the Mediterranean”, *Agriculture and Human Values*, vol. 20, pp. 87–95.

77. Blainski, A., G. C. Lopes & J. C. P. De Mello (2013) Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. *Molecules*, 18, 6852-6865.
78. Carda-Broch S. , A. Berthod. (2004). Countercurrent chromatography: a worthy technique for the direct measurement of liquid-liquid partition coefficients. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 45-52.
79. Michel, T., Khlif, I., Kanakis, P., Termentzi, A., Allouche, N., Halabalaki, M., & Skaltsounis, A. L. (2015). UHPLC-DAD-FLD and UHPLC-HRMS/MS based metabolic profiling and characterization of different *Olea europaea* organs of Koroneiki and Chetoui varieties. *Phytochemistry Letters*, 11, 424–439.
80. Mishra, K., H. Ojha & N. K. Chaudhury (2012) Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chemistry*, 130, 10361043.
81. Kouka P, Chatzieffraimidi G-A, Raftis G, et al.: Antioxidant effects of an olive oil total polyphenolic fraction from a Greek *Olea europaea* variety in different cell cultures. *Phytomedicine* 47: 135–142, 2018.
82. Priftis A, Angeli-Terzidou A-E, Veskoukis AS, Spandidos DA and Kouretas D: Cellspecific and roastingdependent regulation of the Keap1/Nrf2 pathway by coffee extracts. *Mol Med Rep* 17: 8325–8331, 2018.
83. Pinelopi Samara, Nikoleta Christoforidou, Christelle Lemus, Aikaterini Argyropoulou, Kyriaki Ioannou, Konstantina Vougianniopoulou Nektarios Aligiannis, Efthimios Paronis, Nicolas Gaboriaud-Kolar, Ourania Tsitsilonis, Alexios-Leandros Skaltsounis. (2017) New semi-synthetic analogs of oleuropein show improved anticancer activity in vitro and in vivo. *European Journal of Medicinal Chemistry* Volume 137, 8 September 2017, Pages 11-29
84. Márcio Caroch, Isabel C.F.R. Ferreira. (2013), A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives, *Food and Chemical Toxicology* 51 (2013) 15–25.
85. Jean-Frédéric Terral, Natalia Alonso, Ramon Buxó i Capdevila, Noureddine Chatti, Laurent Fabre, Girolamo Fiorentino, Philippe Marival, Guillem Pérez Jordá, Bénédicte Pradat, Núria Rovira, Paul Alibert. (2004), Historical biogeography of olive domestication (*Olea europaea* L.) as revealed by geometrical morphometry applied to biological and archaeological material
86. Nili Lipschitz, Ram Gophna, Moshe Hartmana and Gideon Bigerh, (1991), The Beginning of Olive (*Olea europaea*) Cultivation in the Old World: A Reassessment
87. Theodora Psaltopoulou, Androniki Naska, Philippos Orfanos, Dimitrios Trichopoulos, Theodoros Mountokalakis, and Antonia Trichopoulou,(2004), Olive oil, the Mediterranean diet, and arterial blood pressure: the Greek European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study
88. Cuevas J, Polito, VS. The role of staminate flowers in the breeding system of *Olea europaea* (Oleaceae): an andromonoecious, wind-pollinated taxon. *Ann. Bot.* 2004; 93:547-553.
89. Damialis A, Fotiou C, Halley JM., Vokou D. Effects of environmental factors on pollen production in anemophilous woody species *Trees* (2011) 25:253–264; 2011.
90. Aburjai T, Natsheh FM. 2003. Plants used in cosmetics. *Phytother Res* 17: 987–1000.

91. Asuka Kishikawa, Ahmed Ashour, Qinchang Zhu, Midori Yasuda, Hiroya Ishikawa and Kuniyoshi Shimizu (2015). Multiple Biological Effects of Olive Oil By-products such as Leaves, Stems, Flowers, Olive Milled Waste, Fruit Pulp, and Seeds of the Olive Plant on Skin. *PHYTOTHERAPY RESEARCH* *Phytother. Res.* 29: 877–886 (2015) Published online 16 March 2015 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com) DOI: 10.1002/ptr.5326
92. Kouka P, Priftis A, Stagos D, Angelis A, Stathopoulos P, Xinos N, Skaltsounis AL, Mamoulakis C, Tsatsakis AM, Spandidos DA, Kouretas D. Assessment of the antioxidant activity of an olive oil total polyphenolic fraction and hydroxytyrosol from a Greek *Olea europea* variety in endothelial cells and myoblasts. *Int J Mol Med.* 2017 Sep;40(3):703-712. doi: 10.3892/ijmm.2017.3078. Epub 2017 Jul 20.
93. Jonathan J. M. Landry, Paul Theodor Pyl, Tobias Rausch, Thomas Zichner, Manu M. Tekkedil, Adrian M. Stütz, Anna Jauch,† Raeka S. Aiyar, Gregoire Pau, Nicolas Delhomme, Julien Gagneur, Jan O. Korbel, Wolfgang Huber, and Lars M. Steinmetz. The Genomic and Transcriptomic Landscape of a HeLa Cell Line. *G3 (Bethesda).* 2013 Aug; 3(8): 1213–1224. Published online 2013 Mar 11. doi: 10.1534/g3.113.005777
94. Priftis A, Stagos D, Konstantinopoulos K, Tsitsimpikou C, Spandidos DA, Tsatsakis AM, Tzatzarakis MN, Kouretas D. Comparison of antioxidant activity between green and roasted coffee beans using molecular methods. *Mol Med Rep.* 2015 Nov;12(5):7293-302. doi: 10.3892/mmr.2015.4377. Epub 2015 Sep 28.
95. Alía M, Ramos S, Mateos R, Granado-Serrano AB, Bravo L, Goya L. Quercetin protects human hepatoma HepG2 against oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2006 Apr 15;212(2):110-8. Epub 2005 Aug 29.
96. Goutzourelas N, Stagos D, Spanidis Y, Liosi M, Apostolou A, Priftis A, Haroutounian S, Spandidos DA, Tsatsakis AM, Kouretas D. Polyphenolic composition of grape stem extracts affects antioxidant activity in endothelial and muscle cells. *Mol Med Rep.* 2015 Oct;12(4):5846-56. doi: 10.3892/mmr.2015.4216. Epub 2015 Aug 12.

Ιστοσελίδες

1α: www.juanvilar.com

2α: www.teatronaturale.it

3α: https://issuu.com/ypaithros/docs/elaiolado_entheto

4α: <http://olivenews.gr/el/>

5α: <http://www.mikpens.com/text/Olive%20Regions%20-%20The%20World.html>

6α: <http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/388-geographical-indications>