



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΛΑΜΠΡΟΝΙΚΟΥ ΜΑΡΙΝΑ

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2016

ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΜΕΤΑΛΛΑΞΙΟΓΟΝΟΥ
ΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΦΥΛΛΩΝ ΕΛΙΑΣ

STUDY OF THE ANTIOXIDANT AND ANTIMUTAGENIC ACTIVITIES
OF POLYPHENOLIC EXTRACTS FROM OLIVE LEAVES

**ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΚΑΙ
ΑΝΤΙΜΕΤΑΛΛΑΞΙΟΓΟΝΟΥ ΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ
ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΦΥΛΛΩΝ ΕΛΙΑΣ**

ΛΑΜΠΡΟΝΙΚΟΥ ΜΑΡΙΝΑ
Τεχνολόγος Ιατρικών Εργαστηρίων
Ε.Τ.Ε.Π. ΤΕΙ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Δημήτριος Κουρέτας Καθηγητής

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ: Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών-Τοξικολογίας του Τμήματος
Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δημήτριος Κουρέτας (Επιβλέπων): Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών
Οργανισμών-Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

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

Κωνσταντίνος Πετρωτός: Αναπληρωτής Καθηγητής του Τμήματος Μηχανικής
Βιοσυστημάτων του ΤΕΙ Λάρισας.

*Στο Θανάση,
το Γιάννη,
τη Νίνα και
το Χρήστο*

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας καθώς και στο εργαστήριο Μηχανικής Βιοσυστημάτων του ΤΕΙ Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του καθηγητή κ Δημητρίου Κουρέτα. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω την πτυχιακή μου εργασία στο εργαστήριο του.

Ευχαριστώ επίσης θερμά, τον επίκουρο καθηγητή κ. Δημήτριο Στάγκο, για τη συνεχή παρουσία και υποστήριξή του, τόσο στα εργαστηριακά πειράματα όσο και στη συγγραφή αυτής της εργασίας.

Τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου θα ήθελα να εκφράσω στον αναπληρωτή καθηγητή ΤΕΙ Θεσσαλίας κ.Κωνσταντίνο Πετρωτό, για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο άτομό μου και για τη για την πλήρη υποστήριξη του σε όλα τα στάδια της εργασίας.

Ευχαριστώ ακόμη όλη την ομάδα του εργαστηρίου για το φιλικό και συνεργατικό κλίμα που υπήρχε και κυρίως την κ. Θάλεια Κερασιώτη για την υπομονή και το ενδιαφέρον της.

Το μεγαλύτερο ευχαριστώ θέλω να εκφράσω στον σύζυγό μου Θανάση ο οποίος ήταν ο υποκινητής και υποστηρικτής αυτής της προσπάθειάς μου. Επίσης ευχαριστώ τα παιδιά μου για την συμπαράστασή τους.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εδώ και αρκετά χρόνια έχει παρατηρηθεί έντονο ενδιαφέρον για τη μελέτη των φυτικών προϊόντων με πολυφαινολικό περιεχόμενο στο οποίο αποδίδεται μεγάλη σε έκταση βιοδραστικότητα. Για το λόγο αυτό υπάρχει έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον και για το πολυφαινολικό περιεχόμενο των φύλλων ελιάς στο οποίο αποδίδονται σημαντικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες που πιθανόν να σχετίζονται στην πρόσληψη ασθενειών.

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη των αντιοξειδωτικών και αντιμεταλλαξιγόνων ιδιοτήτων σε εκχυλίσματα δειγμάτων από φύλλα ελιάς τα οποία προήλθαν από επεξεργασία με τη χρήση της τεχνολογίας μικροκυμάτων εφαρμόζοντας διαφορετικές παραμέτρους. Επίσης χρησιμοποιήθηκε τεχνολογία της ενθυλάκωσης η οποία δίνει την δυνατότητα για προστασία και ελεγχόμενη απελευθέρωση των εκχυλισμάτων μέσω της παγίδευσης τους στο φορέα ενθυλάκωσης, όπως επίσης και στην αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας για την αξιοποίηση των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων των εκχυλισμάτων.

Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 4 μέθοδοι για την εξέταση της αντιοξειδωτικής δράσης. Οι δύο πρώτες μέθοδοι στηρίζονται στην εξουδετέρωση των χημικών ριζών DPPH και ABTS^{•+}. Από τις μετρήσεις που έγιναν προέκυψε ότι τα δείγματα παρουσίασαν ισχυρή ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH και ABTS^{•+}. Οι άλλες 2 μέθοδοι στηρίζονται στην ικανότητα των εκχυλισμάτων να προστατεύουν το DNA από την πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων, που οφείλονται στη δράση ελευθέρων ριζών και συγκεκριμένα των ριζών περοξυλίου (ROO[•]) και υδροξυλίου (OH[•]). Με βάση τις τιμές των IC₅₀ το σύνολο των εκχυλισμάτων που μελετήθηκαν παρουσίασαν ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας του DPPH[•] σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις. Το εύρος των τιμών IC₅₀ κυμαινόταν από πιο 22μg/ml έως 430μg/ml. Η εξέταση των εκχυλισμάτων με τη ρίζα ABTS^{•+}, έδειξε όπως και η μέθοδος με το DPPH ότι έχουν σημαντική ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας. Αντίστοιχα, το εύρος των τιμών IC₅₀ κυμαινόταν από 72μg/ml έως 740μg/ml. Στη μέθοδο της πρόκλησης θραύσεων στο πλασμιδιακό DNA, τα εκχυλίσματα μπορούσαν να αναστείλουν τις προκαλούμενες από ρίζες OH[•] βλάβες στο πλασμιδιακό DNA, με τιμές IC₅₀ από 1800-9000 μg/ml. Εκτός από τις ρίζες OH[•], τα εκχυλίσματα δοκιμάστηκαν απέναντι και στην πρόκληση βλαβών στο DNA από τις ρίζες ROO[•]. Σύμφωνα με τις τιμές IC₅₀, όλα τα εκχυλίσματα επέδειξαν

ισχυρή δοσοεξαρτώμενη προστατευτική δράση στην επαγόμενη από ρίζες ROO[•] βλάβη στο DNA. Το εύρος των τιμών IC₅₀ κυμαινόταν από 50μg/ml έως 580 μg/ml. Και στις 4 *in vitro* μεθόδους η σειρά δραστηριότητας των εκχυλισμάτων σύμφωνα με την αντιοξειδωτική δράση ήταν παραπλήσια, με ισχυρότερο το εκχύλισμα της καθαρής σκόνης φύλλων ελιάς ενώ ασθενέστερα παρουσιάστηκαν τα εκχυλίσματα 10% και 20% τα οποία ήταν ενθυλακωμένα σε μαλτοδεξτρίνη.

Στο τρίτο και τελευταίο στάδιο μελετήθηκε η αντιοξειδωτική δράση του πιο ισχυρού ενθυλακωμένου εκχυλίσματος (10%) σε ενδοθηλιακά κύτταρα (κυτταρική σειρά EA.hy926) σε μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις, όπου προσδιορίστηκαν τα επίπεδα της γλουταθειόνης (GSH) και των ελευθέρων ριζών (ROS) με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής καθώς και η λιπιδική υπεροξειδωση (TBARS) και η οξείδωση των πρωτεϊνών (πρωτεϊνικά καρβονύλια) φασματοφωτομετρικά. Τα επίπεδα της γλουταθειόνης αυξήθηκαν σημαντικά με την επίδραση του δείγματος σε συγκέντρωση 625μg/ml. Όσον αφορά τα επίπεδα των ελευθέρων ριζών, δεν επηρεάστηκαν σε σύγκριση με το control. Ωστόσο, σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα κύτταρα που επώαστηκαν με το ενθυλακωμένο εκχύλισμα 10% των φύλλων ελιάς παρουσίασαν σημαντική μείωση της λιπιδικής υπεροξειδωσης σε ποσοστό 19,3% και της οξείδωσης των πρωτεϊνών κατά 22,5% σε σχέση με το control.

Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, προτείνεται η ανάκτηση, με χρήση σύγχρονων και ασφαλών για την ανθρώπινη υγεία μεθόδων των φυτικών πολυφαινολών που περιέχονται στα φύλλα της ελιάς. Επίσης, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το εκχύλισμα της καθαρής σκόνης αλλά και αυτά που προέκυψαν μετά την ενθυλάκωση, διατήρησαν ισχυρή ικανότητα αντιοξειδωτικής δράσης και επομένως θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν τόσο στη φαρμακοβιομηχανία όσο και για τη δημιουργία συμπληρωμάτων διατροφής, βιολειτουργικών τροφίμων ή και ως συντηρητικών.

ABSTRACT

Since several years there has been a great interest for the study of plant products rich in polyphenolic content due to their important bioactivities. The leaves of *Olea europaea* are characterized by high polyphenolic content and present antioxidant properties. The aglycon and hydroxytyrosol compounds obtained by oleuropein hydrolysis are well known pharmacological active molecules that act as scavengers of free radicals such as superoxide anion and protect against oxidative stress-induced damage of valuable molecules such as proteins, lipids and DNA.

The aim of this study was to assess the possible antioxidant and antimutagenic activities of extracts from olive leaves which were isolated by using the microwave technology after the application of different parameters. The first stage of the study was the chemical analysis of olive leaf extracts using the method of IPLC for the assessment of the total phenolic content and chemical constituents like oleuropein. Encapsulation technology was also used, that allows the protection and controlled release of the extracts through their entrapment in the carrier, and increases the bioavailability in order to maximize the health benefit due to the antioxidant activity.

Four different methods were used for examining the antioxidant activity. The first two methods were based on the scavenging of free radicals DPPH and ABTS. The results showed that the extracts possessed strong free radical activity against both radicals. In the third method, it was examined the ability of the extracts to protect DNA from breakage induced by peroxy (ROO[•]) and hydroxyl (OH[•]) radicals. In all 4 *in vitro* methods, the potential order of the extracts were similar, the strongest was the powder extract followed by the extracts encapsulated in 10% and 20% of maltodextrin.

In the final stage, it was examined the antioxidant activity of the most potent encapsulated extract (10%) in endothelial cells EA.hy926 at non-cytotoxic concentrations. In particular, it was examined the extract's effects on the levels of glutathione (GSH), protein carbonyls (CARB), lipid peroxidation (TBARS) and free radicals (ROS) using flow cytometry. The levels of glutathione were increased compared to control after extract treatment at a concentration of 625 µg/ml, while the levels of free radicals, were not affected. Moreover, the extract reduced TBARS and CARB levels in EA.hy926 cells.

Based on the results of this study it is suggested the recovery of plant polyphenols from olive leaves using modern and safe to human health methods. Also,

the results showed that the encapsulated extracts retained strong antioxidant capacity and therefore can be used both in the pharmaceutical industry and for the development of food supplements and biofunctional foods.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	14
1.1	Ιστορική αναδρομή	14
1.1.2	Φυσικά χαρακτηριστικά	14
1.1.3	Οικονομικά οφέλη	15
1.1.4	Μεσογειακή διατροφή	17
1.1.5	Θεραπευτικές ιδιότητες	17
1.2	Φύλλα ελιάς	18
1.2.2	Χημική σύσταση	18
1.3	Συστατικά φύλλων ελιάς και η επίδρασή τους στις λειτουργίες του οργανισμού	21
1.3.1	Ελαιοευρωπαϊνή	21
1.4	Φυτικές πολυφαινόλες	22
1.4.1	Χημική δομή πολυφαινολών	22
1.4.2	Βιοσύνθεση πολυφαινολών	23
1.4.3	Μεταβολισμός και βιοδιαθεσιμότητα φυτικών πολυφαινολών	24
1.4.4	.Δραστικότητα πολυφαινολών	25
1.4.5	Επιβλαβείς ιδιότητες	27
1.5	Οξειδωτικό στρες	27
1.5.1	Ελεύθερες Ρίζες και Δραστικά Είδη O ₂ .	27
1.5.2	Πως Δημιουργούνται οι Ελεύθερες Ρίζες στον Οργανισμό μας	28
1.5.3	Πως Εξουδετερώνονται τα Δραστικά Είδη Οξυγόνου (ΔΕΟ), στον Οργανισμό	30
1.5.4	Επίδραση των Ελευθέρων Ριζών στην Υγεία.	31
1.6	Σκοπός της εργασίας	32
2	2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ (Εξοπλισμός και αντιδραστήρια)	34
2.1	Φυτικό υλικό	34
2.2	Εκχύλιση με μικροκύματα(MAE: microwave assisted extraction)	34
2.2.1	Τεχνολογία μικροκυμάτων	34
2.2.1.i	MICROWAVESYSTEMMAC-75	35
2.2.2	Διαδικασία εκχύλισης με μικροκύματα	36
2.2.3	Τεχνική ψυκτοξήρανσης (FreezeDrying)	38

2.3	ΜΙΚΡΟΕΝΘΥΛΑΚΩΣΗ	40
2.3.1	Ορισμός	40
2.3.1	Μέσα εγκλεισμού	41
2.3.3	2.3.3 Κύριες Τεχνικές για την ενθυλάκωση	42
2.3.3.1	Διαδικασία ενθυλάκωσης σε άμυλο	42
3	ΜΕΘΟΔΟΙ	43
3.1	Εκτίμηση της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη Ρίζα DPPH [•]	43
3.1.1	<i>Αρχή της Μεθόδου</i>	43
3.2	<i>.Πειραματική Διαδικασία</i>	44
3.3	<i>Υπολογισμός της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας-Στατιστική Ανάλυση.</i>	45
3.4	Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας ABTS ^{•+}	46
3.4.1	Αρχή μεθόδου ABTS ⁺	46
3.4.2		47
	<i>Πειραματική διαδικασία</i>	
3.4.3		49
	<i>Υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας-Στατιστική ανάλυση</i>	
3.5	Μέθοδοι εκτίμησης αντιμεταλλαξιγόνου δράσης.	50
		50
3.5.1	Γενικά	52
3.5.2	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA	54
3.5.3	Αρχή της μεθόδου	57
3.5.4	Πειραματική διαδικασία	62
3.5.5	Στατιστική ανάλυση	62
3.6	<i>Επαγωγή θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες υδροξυλίου (OH•)</i>	63
3.6.1	Αρχή της μεθόδου	63
3.6.2	Πειραματική διαδικασία	66

3.7	Προσδιορισμός της κυτταροτοξικής δράσης της πρωτεΐνης με τη μέθοδο XTT	69
3.7.1	Αρχή μεθόδου	69
3.7.1	Πειραματική διαδικασία	70
3.8	Μελέτη της επίδρασης του ενθυλακωμένου εκχυλίσματος 10% στα επίπεδα της γλουταθειόνης, των ελευθέρων ριζών και των TBARS	71
3.9	Μελέτη της επίδρασης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων	72
3.9.1	Αρχή μεθόδου	72
3.9.2	Πειραματική διαδικασία υπολογισμού των επιπέδων CARB με φασματοφωτομετρία	74
3.9.3	Στατιστική ανάλυση	74
4	Κυτταρομετρία Ροής	75
4.1	Αρχή Μεθόδου	75
4.2	Προσδιορισμός της γλουταθειόνης και των ελευθέρων ριζών με κυτταρομετρία ροής (flowcytometry)	77
4.2.1	Πειραματική διαδικασία	77
4.3	Προσδιορισμός επιπέδων ROS μέσω κυτταρομετρίας ροής	78
4.3.1	Αρχή μεθόδου	78
4.3.2	Πειραματική διαδικασία	78
4.4	Προσδιορισμός του δείκτη λιπιδικήςυπεροξειδωσης (TBARS)	78
4.4.1	Αρχή μεθόδου	78
4.4.2	Πειραματική διαδικασία	79
4.4.3	Υπολογισμοί	79
4.5	Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford	80
4.5.1	Στατιστική ανάλυση	81

5	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	82
5.1	Στοιχεία Χημικής Ανάλυσης της καθαρής σκόνης εκχυλίσματος φύλλων ελιάς	82
5.2	Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων από φύλλα ελιάς μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH .	82
5.3	Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων από φύλλα ελιάς μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS ⁺ .	86
5.4	<i>Αποτελέσματα της επίδρασης των εκχυλισμάτων στην αναστολή της επαγωγής θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες περοξυλίου (ROO[•]) και εκτίμηση της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης τους.</i>	89
5.5	<i>Αποτελέσματα της επίδρασης των εκχυλισμάτων στην αναστολή της επαγωγής θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες υδροξυλίου (OH[•]) και εκτίμηση της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης τους.</i>	94
5.6	Προσδιορισμός κυτταροτοξικής δράσης της πρωτεΐνης με τη μέθοδο του XTT.	97
5.7	Αποτελέσματα επιπέδων γλουταθειόνης (GSH) μέσω κυτταρομετρίας ροής	97
5.8	Προσδιορισμός επιπέδων ROS μέσω κυτταρομετρίας ροής	100
5.9	Προσδιορισμός των δραστικών ουσιών του θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBARS)	102
5.10	Αποτελέσματα των επιπέδων CARB με φασματοφωτομετρία	102
6	Συζήτηση	104
	BIBΙΟΓΡΑΦΙΑ	109

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1.Ιστορική αναδρομή

Η ελιά (*Olea europaea*) είναι ένα μικρό δέντρο, το οποίο ανήκει στην οικογένεια *Oleaceae* και προέρχεται από τροπικές και θερμές εύκρατες περιοχές του κόσμου. Ως αυτοφυές δέντρο - αγριελιά - πρωτοεμφανίστηκε στην ανατολική Μεσόγειο εκεί δηλαδή όπου αναπτύχθηκαν μερικοί από τους αρχαιότερους πολιτισμούς. Το δένδρο της ελιάς αποτελεί σύμβολο γαλήνης, γονιμότητας, ειρήνης. Τα κλαδιά της έγιναν στεφάνια για να στεφανώνουν τους νικητές των Ολυμπιακών αγώνων και ο πολύτιμος χυμός των καρπών της, το ελαιόλαδο, ήταν το βραβείο για τους νικητές των περίφημων Παναθηναϊκών Αγώνων που γίνονταν προς τιμή της θεάς Αθηνάς. Σύμφωνα με τις εκτιμήσεις, η καλλιέργεια της ελιάς χρονολογείται περισσότερα από 7000 χρόνια. Αρχαιολογικά στοιχεία δείχνουν ότι οι ελιές καλλιεργούνταν για εμπορικούς σκοπούς στην Κρήτη ήδη από το 3000 π.Χ., από τον Μινωικό πολιτισμό. Η αρχαία Ελληνική λογοτεχνία αποκαλύπτει χρήσεις του ελαιολάδου για την υγεία του σώματος (Gooch 2005). Στο πλαίσιο της θρησκευτικής σημασίας, η ελιά και τα φρούτα της (ελιές) αναφέρονται αρκετές φορές στην Αγία Γραφή τόσο στην Παλαιά όσο και στη Νέα Διαθήκη (Ryan, 1998), καθώς και στο Κοράνι.

Η ελιά έχει μια μακρά ιστορία όσον αφορά τα φάρμακα και τη διατροφική αξία. Κατά τη διάρκεια των αιώνων, εκχυλίσματα από φύλλα ελιάς έχουν χρησιμοποιηθεί για την ενίσχυση και προστασία της υγείας. Για παράδειγμα, έχει χρησιμοποιηθεί ως ένα διάσημο λαϊκό γιατρικό για να θεραπεύσει τον πυρετό και ορισμένες τροπικές ασθένειες, όπως η ελονοσία (Soler-Rivas 2000).

Η επί χιλιετίες η παρουσία της ελιάς στον ελληνικό αλλά και τον ευρύτερο μεσογειακό χώρο, εκτός από την καθημερινή ζωή και τις λατρευτικές συνήθειες, επηρέασε τα ήθη και τα έθιμα των λαών που έζησαν και ζουν κάτω από τη σκιά της δημιουργώντας με το πέρασμα των χρόνων έναν εντελώς ιδιαίτερο πολιτισμό, τον Πολιτισμό της Ελιάς.

1.1.2 Φυσικά χαρακτηριστικά

Σύμφωνα και με τον παρακάτω πίνακα το δέντρο συνήθως κατανέμεται στις παράκτιες περιοχές της ανατολικής λεκάνης της Μεσογείου, που γειτνιάζουν με τις παράκτιες περιοχές της νοτιοανατολικής Ευρώπης, τη δυτική Ασία και τη Βόρεια Αφρική, καθώς και το Βόρειο Ιράν στο νότιο άκρο της Κασπίας Θάλασσας. Αν και η

ελιά καλλιεργείται σε πολλά μέρη του κόσμου, η περιοχή της Μεσογείου χρησιμεύει ως η κύρια περιοχή παραγωγής που αντιπροσωπεύει περίπου το 98% της παγκόσμιας παραγωγής. Εκτός από την Μεσόγειο το δένδρο της ελιάς καλλιεργείται και σε άλλες περιοχές όπως στην Ινδία, Ασία και την Αραβική Χερσόνησο(Vogel2015).

Η συνολική παγκόσμια καλλιέργεια ελαιόδεντρων περιλαμβάνει $750 \cdot 10^6$ δέντρα που καλύπτουν 9.634.576 εκτάρια γης. Η ετήσια παραγωγή επιτραπέζιας ελιάς και ελαιολάδου εκτιμάται σε 1 και $2,5 \cdot 10^6$ τόνους αντίστοιχα (Brenes1999). Το κύριο προϊόν που εξάγεται από το δέντρο της ελιάς είναι το ελαιόλαδο που η παραγωγή του ανέρχεται σε 19.845.300 τόνους ανά έτος. Το ελαιόλαδο είναι μια από τις βάσεις της Μεσογειακής Διατροφής

Εικόνα 1: Καλλιέργεια ελιάς στη Μεσόγειο



1.1.3 Οικονομικά οφέλη











Από οικονομική άποψη, ο καρπός της ελιάς είναι ένα σημαντικό αγαθό που αποδίδει θρεπτικά βρώσιμη έλαια με ενδεχόμενες θεραπευτικές λειτουργίες (Ribarona2003). Οι ελιές σπάνια χρησιμοποιούνται στη φυσική τους μορφή, λόγω της μεγάλης πικράδας που έχουν παρ' όλα αυτά, αυτά καταναλώνονται σε κάθε μία από τις δύο μορφές, δηλαδή λάδι ή επιτραπέζιων ελιών. Η ελαιοευρωπαϊνή είναι το χημικό συστατικό που προκαλεί την πίκρα στις ελιές και με διάφορες διεργασίες εξαλείφεται ώστε αυτές να γίνουν πιο εύγευστες (Soler-Rivas 2000, Ryan1998).

Λόγω της αυξημένης ευαισθητοποίησης σχετικά με τα ευεργετικά αποτελέσματα της βέλτιστης διατροφής και των λειτουργικών τροφίμων για την

υγείασις σύγχρονες κοινωνίες, η παγκόσμια κατανάλωση της ελιάς και των προϊόντων της ελιάς έχει αυξηθεί σημαντικά, ιδίως σε περιοχές με υψηλά εισοδήματα, όπως οι Ηνωμένες Πολιτείες, η Ευρώπη, η Ιαπωνία, ο Καναδάς και η Αυστραλία, με αποτέλεσμα την ταχεία εμπορική ανάπτυξη των ελαιοκομικών προϊόντων

Σήμερα υπάρχουν στην Ελλάδα 150.000.000 περίπου ελαιόδεντρα, λειτουργούν 2.800 ελαιοτριβεία και 500.000 οικογένειες ζουν από την καλλιέργεια της ελιάς, αφού σε αρκετές - κυρίως άγονες - περιοχές το ελαιόλαδο αποτελεί το αποκλειστικό εισόδημα των κατοίκων.

Πίνακας 1: Κύριες χώρες παραγωγής ελιάς (Έτος 2011 από FAOSTAT)

Θέση	Χώρα	Παραγωγή	Καλλιεργήσιμη
—	Συνολική	19.845.300	9.634.576
01	 Ισπανία	7.820.060	2.330.400
02	 Ιταλία	3.182.204	1.144.420
03	 Ελλάδα	2.000.000	850.000
04	 Τουρκία	1.750.000	798.493
05	 Μαρόκο	1.415.902	597.513
06	 Συρία	1.095.043	684.490
07	 Αλγερία	610.776	295.000
08	 Τυνησία	562.000	1,779.950
09	 Αίγυπτος	459.650	52.668
10	 Πορτογαλία	443.800	343.200

1.1.4 Μεσογειακή διατροφή

Ο όρος «Μεσογειακή διατροφή» βασίζεται στις διατροφικές συνήθειες και παραδόσεις της Κρήτης και της Νοτίου Ιταλίας την περίοδο του 1960. Αυτό το διατροφικό πρότυπο έκανε διάσημη την Ελλάδα, οδηγώντας τους επιστήμονες όλου του κόσμου να στρέψουν τον ενδιαφέρον τους τόσο στο «φαινόμενο της Κρήτης» χάρη στη μακροζωία του πληθυσμού της, όσο και γενικότερα στους λαούς της Μεσογείου. Η εφαρμογή της μεσογειακής διατροφής μπορεί να προσφέρει όλες τις θρεπτικές ουσίες που χρειάζεται ο ανθρώπινος οργανισμός, προάγοντας την υγεία και την ευεξία.

1.1.5 Θεραπευτικές ιδιότητες

Η Μεσογειακή διατροφή έχει συνδεθεί από καιρό με τον χαμηλό κίνδυνο καρδιακών παθήσεων. Οι μελέτες δείχνουν ότι μια μεσογειακού τύπου διατροφή είναι επωφελής σε όλους τους τομείς για τους καρδιαγγειακούς παράγοντες κινδύνους, συμπεριλαμβανομένης της καλής και κακής χοληστερόλης, των τριγλυκεριδίων, της αρτηριακής πίεσης και των επιπέδων του σακχάρου στο αίμα.

Το ελαιόλαδο, και ιδιαίτερα το έξτρα παρθένο, είναι αυτό που οι περισσότεροι άνθρωποι συνδέουν με μια μεσογειακού τύπου διατροφή γιατί είναι το κύριο διατροφικό λίπος και τα οφέλη του για την υγεία αποδίδονται κυρίως στην υψηλή περιεκτικότητα του σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (μονοακόρεστα) αλλά και λειτουργικών βιοδραστικών ουσιών όπως τοκοφερόλες, καροτενοειδή και φαινόλες με πολλαπλές βιολογικές δραστηριότητες (Patricia Vogel 2015).

Σε αντίθεση με άλλα φυτικά έλαια, το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο, το οποίο λαμβάνεται με φυσική πίεση από ολόκληρο τον καρπό της ελιάς είναι πλούσιο σε φαινολικά συστατικά που είναι υπεύθυνα για την ιδιαίτερη σταθερότητα του ελαιολάδου. Σε μελέτες ερευνήθηκαν κάποια από τα φαινολικά συστατικά του ελαιολάδου όπως η υδροξυτυροσόλη και η ελαιοευρωπαϊνή και βρέθηκε ότι έχουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση στην οποία μπορεί να οφείλεται η χαμηλή συχνότητα εμφάνισης στεφανιαίας νόσου και καρκίνου σε πληθυσμούς που ακολουθούν τη Μεσογειακή διατροφή (Soler-Rivas 1999).

1.2 Φύλλα ελιάς

Τα φύλλα της ελιάς είναι στενά, λογχοειδή, μακρουλά ή πλατιά, βγαίνουν στο βλαστό δυο-δυο αντικριστά και διατηρούνται για 2-3 χρόνια. Το γένος της ελιάς παρουσιάζει 20 είδη από τα οποία, το είδος *Olea europaea* παρουσιάζει οικονομικό ενδιαφέρον (ΥΓΦΠΠ 2002). Στη συγκεκριμένη εργασία τα φύλλα της ελιάς που χρησιμοποιήθηκαν, ανήκουν σε αυτό το είδος και συλλέχθηκαν από την ευρύτερη περιοχή του Δήμου Τεμπών-Λάρισας. Τα φύλλα ελιάς περιέχουν μεγαλύτερη ποσότητα πολυφαινολών από το ελαιόλαδο. Για παράδειγμα, η ποσότητα της ελαιοευρωπαϊνης η οποία είναι η πιο άφθονη φαινολική ένωση, κυμαίνεται από 0,005% και 0,12% στο ελαιόλαδο, ενώ σε φύλλα ελιάς κυμαίνεται μεταξύ 1% και 14%. Επίσης, η συνολική περιεκτικότητα των φλαβονοειδών και πολυφαινολών στα φύλλα ελιάς προσδιορίστηκε ως 2,058 mgGAE (ισοδύναμο γαλλικό οξύ) ανά 100gr και 858mgGTE (ισοδύναμο της κατεχίνης), τιμές παρόμοιες με το κόκκινο σταφύλι (Vogel 2015).

Τα φύλλα της ελιάς αποτελούν ένα μέρος των στερεών αποβλήτων των ελαιουργείων. Περιέχουν σημαντικές ποσότητες φαινολών οι οποίες με τη απόρριψη τους στο περιβάλλον δημιουργούν δυσμενείς επιπτώσεις αφού είναι τοξικές για τους υδρόβιους οργανισμούς αλλά από την άλλη μεριά μερικές από αυτές τις πολυφαινόλες μπορούν να αξιοποιηθούν από βιομηχανίες τροφίμων, φαρμάκων και καλλυντικών καθώς αποτελούν βιοενεργά συστατικά για τον άνθρωπο. Έτσι τα φύλλα της ελιάς αποτελούν φθινό υλικό σε σχέση με τα άλλα αρωματικά φυτά που καλλιεργούνται για αυτούς τους σκοπούς.

1.2.2 Χημική σύσταση

Η χημική σύσταση των φύλλων ελιάς που συλλέχθηκαν μετά από κλάδεμα και με προεπεξεργασία με ξήρανση στους 60⁰C φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 2: Χημική σύσταση φύλλων ελιάς

Συστατικά	Περιεκτικότητα(g/100g ξ.β.)
Οργανική ύλη	76.4 - 92.7
Πρωτεΐνες	6.31 - 10.9
Λίπη	2.28 - 9.57
Ολικό άζωτο ^a	35.2 - 49.2
Ολικές πολυφαινόλες	0.14 - 4.3
Εδώδιμες ίνες	34.9 - 41.3
Λιγνίνες	14.1 - 21.1
Ταννίνες	0.669 - 1.11

^a(g/100g συνολικού αζώτου)για το άζωτο που περιέχεται στα κυτταρικά τοιχώματα των φύλλων.)MolinaA 2003

Πιο συγκεκριμένα όσο αφορά τις φαινόλες, σύμφωνα με μελέτη του (Sansoucy 1985)το ποσοστό των φαινολών στα ξηρά μπορεί να μειωθεί κατά 36% σε σχέση με τα νωπά, δηλαδή υπάρχει μια απώλεια λόγω θερμικής επεξεργασίας. Ακόμα και στα ξηρά και τα φρέσκα κλαδιά το ποσοστό των φαινολών κυμαίνεται από 7-9g/100 gξ.β ή φ.β. Ακόμη σε φύλα με 8,8-22,6% ξύλο η περιεκτικότητα σε φαινόλη κυμαίνεται από 7,7-8,7g/100 gξ.β. Η χημική σύνθεση των φύλλων της ελιάς εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως την ποικιλία της ελιάς, τις κλιματολογικές συνθήκες, την ηλικία του δέντρου, την αναλογία ξύλου-φύλλων, το χρόνο συγκομιδής παρουσία ή μη εντομοκτόνων, λιπασμάτων κ.λ.π.

Εκτός από τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των πολυφαινολώνη μεγάλη συγκέντρωση των φύλλων ελιάς σε ιχνοστοιχεία, μέταλλα και βιταμίνες τα καθιστά χρήσιμο διατροφικό εργαλείο του ανθρώπου.

Πίνακας 3: Antioxidant activity of phenolic compounds from olive leaves

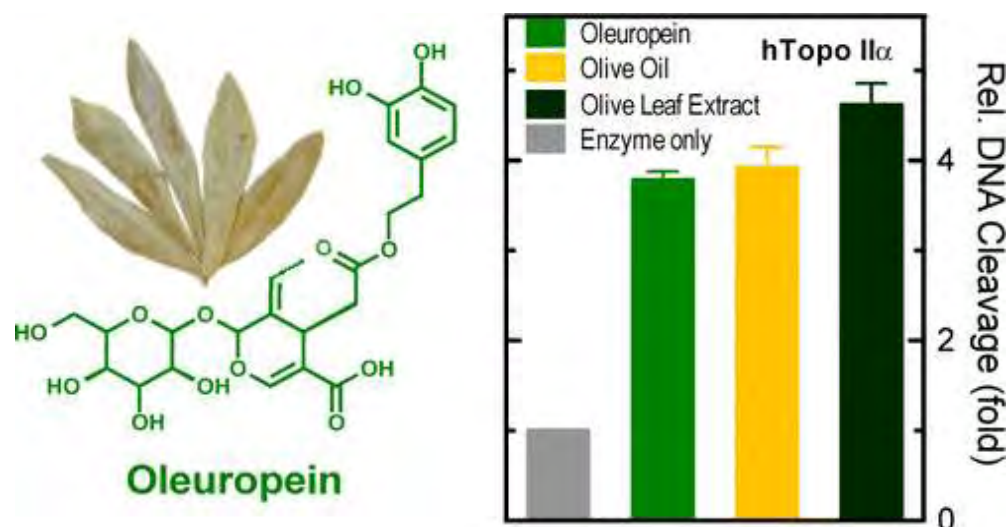
<i>Phenolic compound TEAC</i>	<i>(mmol/L)</i>
Olive leaf extract	1.58 ± 0.06
Rutin	2.75 ± 0.05
Catechin	2.28 ± 0.04
Luteolin	2.25 ± 0.11
Hydroxytyrosol	1.57 ± 0.12
Diosmetin	1.42 ± 0.07
Caffeic acid	1.37 ± 0.08
Verbascoside	1.02 ± 0.07
Oluropein	0.88 ± 0.09
Luteolin-7-glucoside	0.71 ± 0.04
Vanillic acid	0.67 ± 0.09
Diosmetin-7-glucoside	0.64 ± 0.09
Apigenin-7-glucoside	0.42 ± 0.03
Tyrosol	0.35 ± 0.05
Vanillin	0.13 ± 0.01

TEAC: Trolox equivalent antioxidant capacity. Adapted Benavente-Garcia et al. (2000)

1.3 Συστατικά φύλλων ελιάς και η επίδρασή τους στις λειτουργίες του οργανισμού

1.3.1 Ελαιοευρωπαϊνή

Η Ελαιοευρωπαϊνή είναι το κυρίαρχο φυσικό συστατικό των φύλλων της ελιάς και βρίσκεται σε υψηλά ποσοστά (μέχρι και 5%), Ασκεί αντιφλεγμονώδη και αντιοξειδωτική δράση έναντι του κυτταρικού θανάτου που προκαλείται από το οξειδωτικό στρες ενώ ταυτόχρονα εμφανίζει δραστηριότητα προ-οξειδωτική σε ανθρώπινα κύτταρα ηπατοκαρκινώματος (Katsoulieiris EN 2016).



Εικόνα 2: Ελαιοευρωπαϊνή

Ως ξεχωριστή ουσία ανακαλύφθηκε το 1908 από τους Bourquelot και Vintileco στο ελαιόλαδο, οι οποίοι και της έδωσαν το χαρακτηριστικό της όνομα. Πολύ αργότερα, το 1960, οι Panizzi, Scarpati και Oriente υπέδειξαν ότι το μόριο της ουσίας αυτής περιέχει γλυκόζη, β-3,4-διυδροξυ-φαινυλαιθανόλη (υδροξυτυροσόλη) και ένα οξύ το οποίο είναι γνωστό ως ελενολικόξύ (elenolic acid). Το οξύ αυτό ήταν ήδη γνωστό (παρασκευαζόταν με υδρόλυση εκχυλίσματος των ελαιοκάρπων με φωσφορικό οξύ) και είχε προταθεί από το 1962 ως φάρμακο κατά της υπέρτασης (Aviram & Fuhrman 2002).

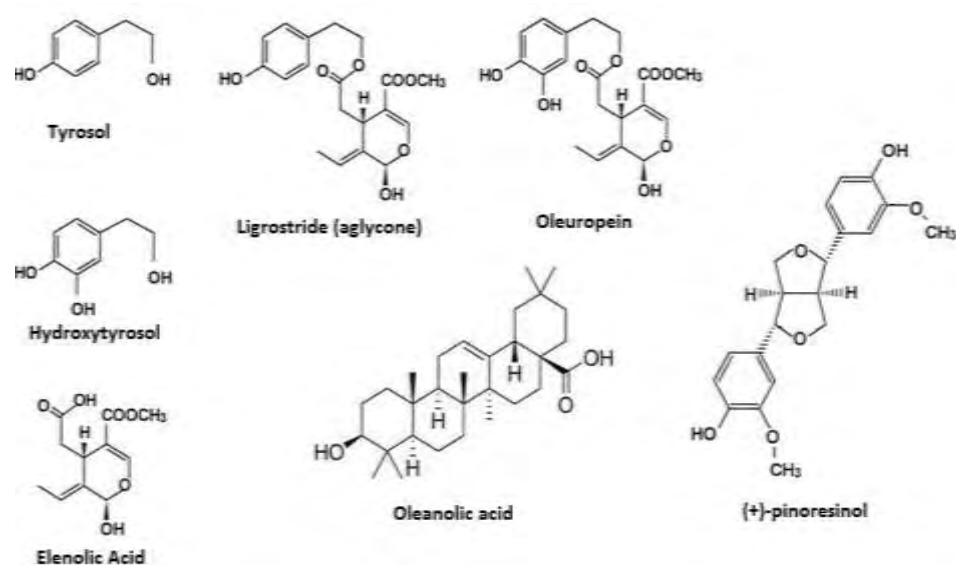
1.4 Φυτικές πολυφαινόλες

Οι πολυφαινόλες είναι ομάδα ενώσεων με παρόμοιες χημικές δομές, που ανήκουν στην ευρύτερη ομάδα των φυτοχημικών ουσιών που βρίσκονται στα φυτικά τρόφιμα και παρουσιάζουν ενεργό και ωφέλιμη βιολογική δράση. Οι πολυφαινόλες αποτελούν την μεγαλύτερη ομάδα, απαριθμώντας περίπου 8.000 ενώ εκτιμάται ότι σε μια μέση διατροφή καταναλώνουμε περίπου 1 ολόκληρο γραμμάριο ανά ημέρα από τις ουσίες αυτές.

1.4.1 Χημική δομή πολυφαινολών

Από χημική άποψη τα φαινολικά συστατικά έχουν βενζολικό πυρήνα ο οποίος φέρει μια ή περισσότερες υδροξυλομάδες και ταξινομούνται σε μη φλαβονοειδή και φλαβονοειδή με σκελετό $C_6C_3 C_6$.

Οι φαινόλες δημιουργούνται όταν το υδρογόνο του αρωματικού πυρήνα αντικατασταθεί από υδροξύλιο. Δομικά αποτελούνται από το φαινύλιο (C_6H_5- , που παριστάνεται συντομογραφικά ως Ph- ή και ως Φ-) και ένα υδροξύλιο. Οι απλές φαινόλες είναι υγρές ή στερεές ουσίες χαμηλού σημείου τήξεως. Είναι λίγο διαλυτές στο νερό, διαλύονται όμως στους κοινούς οργανικούς διαλύτες. Έχουν χαρακτηριστική μυρωδιά, είναι τοξικές και προκαλούν εγκαύματα στο δέρμα. Διακρίνονται σε μονοσθενείς με ένα, δισθενείς με δύο και σε πολυσθενείς με περισσότερα υδροξύλια.



(www.olivenews.gr)

Οι πολυφαινόλες εκτός από τα φλαβονοειδή περιλαμβάνουν και παράγωγά τους όπως εστέρες, μεθυλεστέρες, γλυκοζίτες κ.α. τα οποία προκύπτουν από την υποκατάσταση της βασικής τους δομής.

Οι πολυφαινόλες χωρίζονται σε τέσσερις κύριες ομάδες ανάλογα με την χημική τους δομή, οι οποίες είναι οι παρακάτω:

- **Φλαβονοειδή:** Αποτελούν την μεγαλύτερη υποομάδα πολυφαινόλων και είναι ιδιαίτερα ευεργετικά για την υγεία λόγω των αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων, της δράσης τους στην καταπολέμηση των φλεγμονών αλλά και της αντικαρκινικής τους δράσης.
- **Φαινολικά οξέα:** Παρέχουν αυξημένες αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές, αντικές και αντικαρκινικές ιδιότητες. Μία διατροφή πλούσια σε φρούτα και λαχανικά ολικής άλεσης μας παρέχει επαρκείς ποσότητες από Φαινολικά οξέα.
- **Ανθοκυανίνες:** Είναι αντιοξειδωτικές ουσίες που μας παρέχουν προστασία από τις φλεγμονές, τον καρκίνο και τις καρδιαγγειακές νόσους. Στην ουσία πρόκειται για τις χρωστικές που δίνουν το λαμπρό κόκκινο, μπλε και μοβ χρώμα στα ρόδια, στα σταφύλια, στα κόκκινα κρεμμύδια, στα μπλε μούρα κ.α.
- **Στιλβένια:** Με την πιο διάσημη από αυτά την *Ρεσβερατρόλη* - είναι ισχυρές αντιοξειδωτικές ουσίες με αντιφλεγμονώδη δράση, δράση κατά του Αλτσχάιμερ, των καρδιαγγειακών νόσων και ιδιαίτερα της αθηρωμάτωσης, του καρκίνου και του σακχαρώδους διαβήτη.(USDA).

1.4.2.Βιοσύνθεση πολυφαινολών

Η βιοσύνθεση των πολυφαινολών γίνεται με αρκετά διαφορετικές πορείες ενώ τα κύρια μονοπάτια είναι το μονοπάτι του σικιμικού οξέος και το μονοπάτι του μαλονικού οξέος(Καραταγλης 1994).

Το μονοπάτι του σικιμικού οξέος συμμετέχει στη βιοσύνθεση των περισσότερων φυτικών φαινολών. Η σημασία της πορείας αυτής δεν οφείλεται μόνο στο σχηματισμό των φαινολών αλλά κυρίως επειδή προμηθεύει τον αρωματικό δακτύλιο για το σχηματισμό αρωματικών αμινοξέων, της φαινυλαλαίνης, της τυροσίνης και της τρυπτοφάνης. Το μονοπάτι του σικιμικού οξέος έχει βρεθεί στα ανώτερα φυτά στους μύκητες και τα βακτήρια αλλά δεν υπάρχει στα ζώα. Επομένως τα ζώα δεν έχουν τρόπο να συνθέσουν τα τρία αυτά αρωματικά αμινοξέα και

συνεπώς τα προμηθεύονται έτοιμα από το φυτικό βασίλειο αφού είναι βασικές θρεπτικές ουσίες για τη διατροφή τους.

Πολλές από τις ομάδες των δευτερογενών φυτικών φαινολικών προϊόντων προέρχονται από την φαινυλαλαλίνη και την τυροσίνη π.χ. κινναμωνικό, π-κουμαρικό, καφεϊκό, φερουλικό, γαλλικό οξύ. Ένα κύριο βήμα για τη σύνθεση αυτών των παραγόντων είναι ή μετατροπή της φαινυλαλαλίνης σε κινναμωνικό οξύ με την αποβολή ενός μορίου αμμωνίας. Η αντίδραση καταλύεται από την αμμωνιακή λυάση της φαινυλαλαλίνης (PfenylalanineAmmonia- LyasePAL).

1.4.3 Μεταβολισμός και βιοδιαθεσιμότητα φυτικών πολυφαινολών

Για την κατανόηση των επιδράσεων των φυτικών πολυφαινολών στην ανθρώπινη υγεία, είναι απαραίτητο να μελετηθεί ο τρόπος με τον οποίο μεταβολίζονται. Ίσως για παράδειγμα ορισμένες από τις πολυφαινόλες που βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στις διάφορες τροφές να μην είναι ιδιαίτερα δραστικές μέσα στον ανθρώπινο οργανισμό ή να απορροφώνται σε μικρό βαθμό από το έντερο ή να αποβάλλονται πολύ γρήγορα. Πιστεύεται ότι η μέση πρόσληψη πολυφαινολών σε άτομα που τρώνε καθημερινά φυτικές τροφές είναι περίπου 1gr ανά ημέρα. (Buelga και Scalbert 2000) Τα δύο τρίτα αυτής της ημερήσιας πρόσληψης πιστεύεται ότι είναι φλαβονοειδή και το ένα τρίτο πολυφαινολικά οξέα. Scalbert και Williamson 2000). Ο μεταβολισμός των πολυφαινολών γίνεται μέσω ενός μονοπατιού που ακολουθείται γενικά για το μεταβολισμό των φαρμάκων (Scalbert και Williamson 2000). Οι αγλυκόνες (δηλαδή οι πολυφαινόλες που δεν είναι συνδεδεμένες με σάκχαρα) απορροφώνται από το λεπτό έντερο. Όμως πολλές από τις πολυφαινόλες που βρίσκονται στις τροφές υδρολύονται από ένζυμα του εντέρου ή από την εντερική μικροχλωρίδα πριν απορροφηθούν κυρίως από το παχύ έντερο. (Hollman και Katan 1997) Όταν η υδρόλυση γίνεται από τα βακτήρια του εντέρου τότε συνήθως μειώνεται η απορρόφηση των πολυφαινολών γιατί οι αγλυκονικές μορφές που σχηματίζονται αποικοδομούνται περαιτέρω σε διάφορα αρωματικά οξέα.

Διάφορες χημικές ομάδες, οι οποίες είναι κυρίως θειικές, μεθυλικές και γλυκουρονικές, προστίθενται στις πολυφαινόλες κατά την απορρόφησή τους από το λεπτό έντερο αλλά και στο ήπαρ (οι κυριότεροι όμως μεταβολίτες των πολυφαινολών στο πλάσμα του αίματος είναι τα γλυκουρονίδια) με σκοπό να γίνουν περισσότερο υδρόφιλες και έτσι να περιοριστεί η τοξική δράση τους καθώς διευκολύνεται η

απέκκριση τους είτε μέσω της χολής είτε με τα ούρα. Οι μεταβολίτες των πολυφαινολών δεν βρίσκονται στο πλάσμα σε ελεύθερη μορφή αλλά συνδέονται με πρωτεΐνες του πλάσματος και κυρίως με την αλβουμίνη.(Boulton1998)Αν και μέχρι σήμερα οι μεταβολίτες λίγων πολυφαινολών είναι γνωστοί, η αναγνώρισή τους είναι σημαντική γιατί μπορεί να έχουν διαφορετική δράση από τις αρχικές πολυφαινόλες.

Η συγκέντρωση των πολυφαινολών στο πλάσμα του αίματος μετά την κατανάλωση τροφών πλούσιων σε πολυφαινόλες ποικίλλει ανάλογα με την πολυφαινόλη και το είδος της τροφής (Coldham και Sauer 2000). Ενώ υπάρχουν αρκετές μελέτες σχετικά με τη συγκέντρωση των πολυφαινολών στο πλάσμα, λίγα είναι τα δεδομένα που αφορούν τη βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών στα διάφορα όργανα και ιστούς. Μελέτες που έγιναν με πειραματόζωα δείχνουν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις συγκεντρώσεις των πολυφαινολών στο πλάσμα και σε διάφορους ιστούς (π.χ. στη μήτρα, στον προστάτη, στο μαστό, στις ωοθήκες)(Fritz 1998).

1.4.4.Δραστικότητα πολυφαινολών

Η δραστικότητα των πολυφαινολών οφείλεται στην παρουσία φαινυλομάδας η οποία λόγω ευκινησίας του ατόμου του υδρογόνου εμφανίζει όξινο χαρακτήρα και στον βενζολικό πυρήνα που μπορεί να υποστεί ηλεκτρονιόφιλες υποκαταστάσεις.

Οι φυτικές πολυφαινόλες λόγω της ικανότητάς τους να δρουν έναντι των ελευθέρων ριζών έχουν γενικότερη ευεργετική επίδραση στον οργανισμό και θεωρείται ότι προλαμβάνουν ασθένειες που σχετίζονται με τις επιθετικές μορφές ελευθέρων ριζών. Έτσι λοιπόν φαίνεται, ότι οι φυτικές πολυφαινόλες έχουν προστατευτική δράση έναντι της εμφάνισης καρκίνου,την αρτηριοσκλήρυνσης και καρδιοπαθειών. Επίσης, είναι από διάφορες μελέτες γνωστό, ότι καθυστερούν την εμφάνιση των συμπτωμάτων του διαβήτη II και βελτιώνουν την κατάσταση των ασθενών(LeMarchand 2000).

Μελέτες έχουν δείξει ότι εκχυλίσματα πολυφαινολών ελιάς παρουσιάζουν σημαντική αντιγονοτοξική δραστικότητα τόσο πριν όσο και μετά την θεραπεία με ακτίνες X.(Benavente-GarcíaO).Επίσης,σε πρόσφατες μελέτες τα φύλλα ελιάς έχουν αναφερθεί για την αντιφλεγμονώδη, αντιοξειδωτική, αντιδιαβητική και αντι-υπερτασική τους δράση. (Botsoglou2014)

Επιπλέον, στα ευεργετικά αποτελέσματα των πολυφαινόλων των φύλλων ελιάς έχουν αναφερθεί η μείωση της συνολικής χοληστερόλης (TC), της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης χοληστερόλης (LDL-C) και των τριγλυκερίδιων (TG) με αποτέλεσμα τη μειωμένη συχνότητα εμφάνισης καρδιαγγειακών παθήσεων. (MetabCardiovascDis. 2008)

Μια μελέτη που αξιολόγησε τις επιδράσεις της ελαιοευρωπαϊνηςγιαμυοκαρδιακή βλάβη έδειξε ότι η χορήγηση της οδηγεί σε καρδιοπροστατευτική δράση (Manna 2004). Παρόμοιες μελέτες για υπερχοληστεροναιμία (Jemai H, 2009), επιβράδυνση της κυτταρικής γήρανσης και αντικαρκινικές ιδιότητες (Barrajon-Catalan 2015), φλεγμονές στη στοματική κοιλότητα (Khadija Mohamed 2013) προστατευτικά αποτελέσματα (Singal 1988).

Η καινοτόμος εταιρεία CreAgri, με έδρα την Καλιφόρνια παρουσίασε, στο ετήσιο συνέδριο του Institute of Food Technologists (IFT) 2013 που πραγματοποιήθηκε στις 13-16 Ιουλίου στο Σικάγο, το «Polyphemus», το πρώτο κρασί στο οποίο αντί για θειώδες χρησιμοποιήθηκε ως συντηρητικό πολυφαινόλες από ελιά. Το συγκεκριμένο κρασί, ποικιλίας Cabernet Sauvignon, αποτελεί καινοτομία στο χώρο και είναι προϊόν συνεργασίας εννέα χρόνων της CreAgri και του οινοποιείου Caliscana, που βρίσκεται στην περιοχή Capalbio της Τοσκάνης. Στο Polyphemus προστέθηκε μια μικρή συγκέντρωση του HIDROX (R), ένα μείγμα από πολυφαινόλες ελιάς πλούσιο σε υδροξυτυροσόλη (hydroxytyrosol) προερχόμενο από το χυμό βιολογικών ελιών, για να αντικαταστήσει το θειώδες, ένα συντηρητικό που χρησιμοποιείται συνήθως ως αντιμικροβιακό, αντιοξειδωτικό και συντηρητικό στα κρασιά. Οι πολυφαινόλες ελιάς προστίθενται μετά τη ζύμωση του κρασιού σε μικρή ποσότητα (50-60 mg / λίτρο). Μελέτες που διεξήχθησαν στο συγκεκριμένο κρασί δείχνουν ότι η προσθήκη του HIDROX (R), όχι μόνο δεν μετέβαλε το χαρακτήρα του, αλλά εμπόδισε και την μετατροπή της αλκοόλης σε οξικό οξύ (ξύδι). «Το κρασί, μετά από εννέα χρόνια έχει ακόμα πολυπλοκότητα και εξαιρετική σταθερότητα μειώνοντας τις πιθανότητες οξείδωσης, συγκριτικά με τα παραδοσιακά Cabernet Sauvignons του οινοποιείου στα οποία έχει προστεθεί θειώδες», προσθέτει ο οινοποιός. Η νέα ανακάλυψη μπορεί να έχει εφαρμογή όχι μόνο στη βιομηχανία οίνου αλλά και στη βιομηχανία τροφίμων.

Σύμφωνα με την EFSA (Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων) η υδροξυτυροσόλη δρα ευεργετικά και στην υγεία και ευεξία των ανθρώπων, κυρίως λόγω της αντιοξειδωτικής της δράσης κατά της LDL.(winebees.wordpress.com)

1.4.5 Επιβλαβείς ιδιότητες

Πέρα από τις προστατευτικές ιδιότητες των φαινολών μπορούν να δημιουργήσουν και σοβαρά προβλήματα στην υγεία. Μετά από κατάποση πολυφαινολών έχουν αναφερθεί παθήσεις όπως γαστρεντερικές ενοχλήσεις, προβλήματα στο συκώτι και τα νεφρά, νευρικοί σπασμοί, αρρυθμίες στην καρδιά, καρδιαγγειακός κλονισμός ακόμα και θάνατος. Η χαμηλότερη αναφερόμενη δόση με συνέπεια το θάνατο ήταν 4,8 g από κατάποση μέσα σε 10 λεπτά. Έχουν γίνει μελέτες ακόμη για καρκινογένεση σε ποντίκια αλλά αποτελέσματα για τους ανθρώπους δεν υπάρχουν μέχρι στιγμής. Προβλήματα μπορούν να δημιουργηθούν ακόμη και όταν έρθει σε επαφή με το δέρμα όπως ερεθισμός, εγκαύματα ακόμη και νέκρωση ιστών. Όρια για δερμική έκθεση δεν υπάρχουν.(www.inhem.org/documents/ehc/ehc/ehc161.htm)

1.5 Οξειδωτικό στρες

1.5.1 Ελεύθερες Ρίζες και Δραστικά Είδη O₂.

Τα μόρια αποτελούνται από έναν ή περισσότερους ατομικούς πυρήνες, οι οποίοι περιβάλλονται από ηλεκτρόνια, τα οποία περιφέρονται γύρω από τον πυρήνα. Τα ηλεκτρόνια είναι διευθετημένα σε έναν αριθμό τροχιακών, τα οποία βρίσκονται σε διαφορετικές αποστάσεις από τον πυρήνα. Στα περισσότερα μόρια, τα ηλεκτρόνια που βρίσκονται σε κάθε τροχιακό, ζευγαρώνουν με ένα άλλο ηλεκτρόνιο. Τα δύο ηλεκτρόνια κάθε ζεύγους περιστρέφονται γύρω από τον εαυτό τους (spin) σε αντίθετες κατευθύνσεις. Τα ζευγαρωμένα ηλεκτρόνια διατηρούν το μόριο σχετικά σταθερό σε - *μικρότερη ενεργειακή κατάσταση*- και ως εκ τούτου λιγότερο δραστικό. Όταν ένα ή περισσότερα ηλεκτρόνια, ιδιαίτερα αυτά που βρίσκονται στα εξωτερικά τροχιακά του ατόμου, είναι ασύζευκτα, δεν έχουν δηλαδή ζευγάρι, τότε το μόριο γίνεται ασταθές -*σε μεγαλύτερη ενεργειακή κατάσταση*- και συνεπώς πιο δραστικό από άλλα μόρια.

Άτομα ή μόρια με ασύζευκτα ηλεκτρόνια ονομάζονται *παραμαγνητικά*, ενώ όταν δεν διαθέτουν τέτοια ηλεκτρόνια, *διαμαγνητικά*. Ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο έχει τεράστια έλξη στα ηλεκτρόνια γειτονικών ατόμων με αποτέλεσμα την πρόκληση

χημικών αντιδράσεων μεταξύ ατόμων ή μορίων, κατά τις οποίες έχουμε μεταφορά ηλεκτρονίων. Οι αντιδράσεις αυτές λέγονται *οξειδοαναγωγικές (redox)*. Κατά την οξείδωση έχουμε απώλεια ηλεκτρονίων, ενώ κατά την αναγωγή έχουμε απόκτηση ηλεκτρονίων, από ένα άτομο. Ένα άτομο ή μόριο με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια και ανεξάρτητη παρουσία, λέγεται **ελεύθερη ρίζα** και συμμετέχει πολύ εύκολα σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής με γειτονικά μόρια. Κατά τις αντιδράσεις αυτές όχι μόνο μεταβάλλονται σημαντικά τα γειτονικά μόρια στόχοι, αλλά μερικές φορές μεταβιβάζονται τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια από στόχο σε στόχο, δημιουργώντας έτσι μία δεύτερη, τρίτη κ.ο.κ. ελεύθερη ρίζα υπό μορφή αλυσιδωτής αντίδρασης. (Halliwell & Gutteridge, 1990). Η πολύ μεγάλη βλαπτική επίδραση των ελευθέρων ριζών οφείλεται ακριβώς στον πολλαπλασιασμό των μεταβολών που προκαλούνται από παρόμοιες αλυσιδωτές αντιδράσεις.

Συνολικά, όλα τα μοριακά είδη που περιλαμβάνουν οξυγόνο, είτε είναι ελεύθερες ρίζες είτε όχι, ονομάζονται δραστικά είδη οξυγόνου (ΔΕΟ).

Τα κυριότερα ΔΕΟ είναι:

- η ρίζα σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet -}$),
- η ρίζα υδροξυλίου ($-OH^{\bullet}$),
- η ρίζα υπεροξειδίου ($-ROO^{\bullet}$),
- το O_2 απλής κατάστασης,
- το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2)
- και το υποχλωριώδες οξύ ($HOCl$).

Στα δραστικά αυτά μοριακά είδη συμπεριλαμβάνεται επίσης και η δραστική μορφή αζώτου, το μονοξείδιο του αζώτου (NO^{\bullet}), το οποίο είναι ελεύθερη ρίζα (με τελεία συμβολίζεται η ελεύθερη ρίζα, ενώ με (-) συμβολίζεται το αρνητικό φορτίο της ρίζας και με R, ένα άτομο ή μία ομάδα ατόμων, κυρίως αλυσίδα ατόμων άνθρακα).

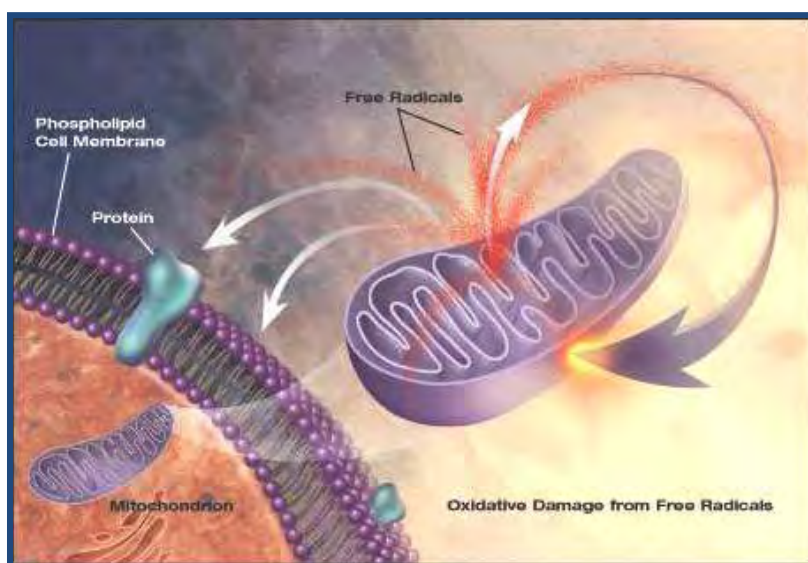
1.5.2 Πως Δημιουργούνται οι Ελεύθερες Ρίζες στον Οργανισμό μας.

Οι ελεύθερες ρίζες δημιουργούνται στον οργανισμό μας, είτε από φυσιολογικές διαδικασίες είτε από εξωτερικές πηγές. Οι κυριότερες από τις φυσιολογικές διαδικασίες παραγωγής ελευθέρων ριζών περιλαμβάνουν:

- Την παραγωγή ελευθέρων ριζών σουπεροξειδίου, ως παραπροϊόν ή «χημικό ατύχημα» κατά τη λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων

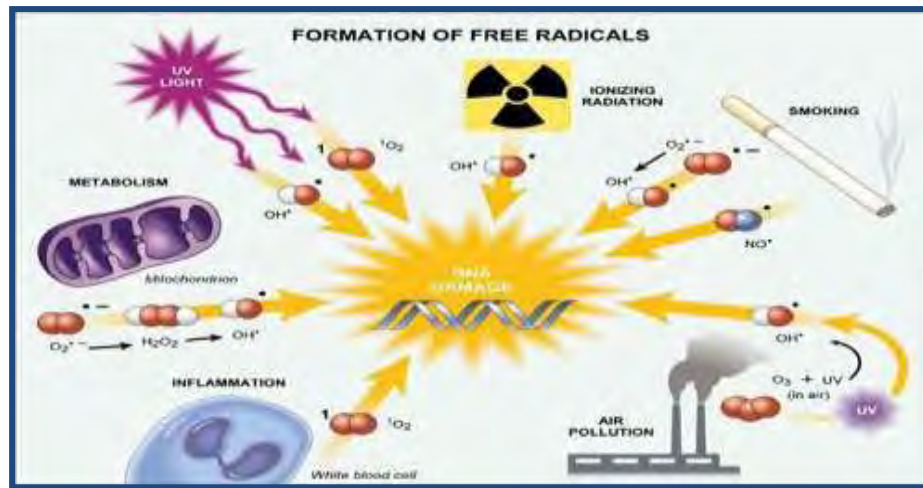
των κυττάρων. Κατά τη διαδικασία αυτή ορισμένα ηλεκτρόνια ξεφεύγουν από τα μόρια που μεταφέρουν τα ηλεκτρόνια στην αναπνευστική αλυσίδα και περνούν στο οξυγόνο, ανάγοντάς το σε σουπεροξειδίο.

- Τη φυσιολογική δράση οξειδωτικών ενζύμων όπως, οι λιποξυγονάσες, οι κυκλοοξυγονάσες, οι υπεροξειδάσες και οι αφυδρογονάσες όπου παράγονται ελεύθερες ρίζες ως παραπροϊόντα των ενζυμικών αντιδράσεων.
- Την παραγωγή ελευθέρων ριζών υδροξυλίου, οι οποίες είναι και οι πλέον δραστικές, με χημικές αντιδράσεις παρουσία μεταλλικών ιόντων.
- Την παραγωγή ελευθέρων ριζών ως μέρος της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος. Ορισμένα από τα κύτταρα του συστήματος αυτού παράγουν ελεύθερες ρίζες για να εξουδετερώσουν βακτήρια εισβολείς. Σε περιπτώσεις που η διαδικασία αυτή είναι εκτός ελέγχου, όπως συμβαίνει με τις αυτοάνοσες ασθένειες, μερικές ελεύθερες ρίζες που παράγονται προκαλούν βλάβες στα ίδια μας τα κύτταρα.



Εικόνα 3: Το DNA, οι Πρωτεΐνες και τα Λιπίδια, Αποτελούν τους Στόχους των Ελευθέρων Ριζών.

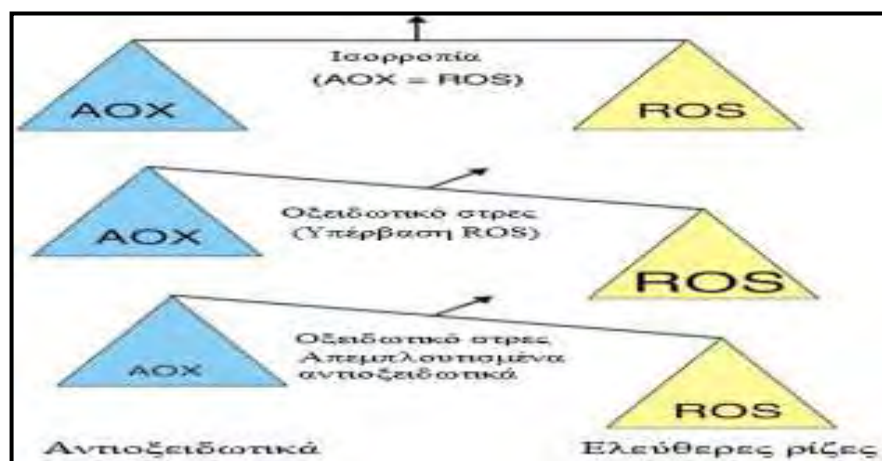
Ένας αριθμός παραγόντων που βρίσκεται εκτός του σώματος μας μπορεί επίσης να αποτελέσει πηγή παραγωγής ελευθέρων ριζών από τη στιγμή που θα έρθει σε επαφή με το σώμα μας. Μερικά παραδείγματα τέτοιων πηγών αποτελούν ο καπνός του τσιγάρου, οι ακτίνες-X, η υπεριώδης ακτινοβολία, διάφορες χημικές ενώσεις και φάρμακα καθώς επίσης το νέφος της ατμοσφαιρικής ρύπανσης (όζον, νιτροξειδία).



Εικόνα 4: Τρόποι Σχηματισμού των Ελευθέρων Ριζών.

1.5.3 Πως Εξουδετερώνονται τα Δραστικά Είδη Οξυγόνου (ΔΕΟ), στον Οργανισμό

Σε κάθε βιολογικό σύστημα, πρέπει να διατηρείται η ισορροπία μεταξύ του σχηματισμού και της απομάκρυνσης των ΔΕΟ. Έχει υπολογισθεί ότι περίπου 10.000 ελεύθερες ρίζες τη μέρα «βομβαρδίζουν» κάθε κύτταρο μας. (Rosen 1999). Η αύξηση των οξειδώσεων από τα ΔΕΟ οδηγεί τα κύτταρα σε μία κατάσταση που λέγεται **οξειδωτικό στρες** και είναι παράγοντας πρόκλησης ασθενειών. Λόγω της συνεχούς έκθεσης σε ΔΕΟ και για την πρόληψη του οξειδωτικού στρες, ο οργανισμός μας, όπως όλα τα φυτά και τα ζώα, έχει αναπτύξει για προστασία διάφορους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς στους οποίους παίρνουν μέρος αντιοξειδωτικές ουσίες.



Εικόνα 5: Οξειδωτικό Στρες.

Γενικά χαρακτηρίζουμε ως **αντιοξειδωτική ουσία** κάθε ουσία η οποία βρίσκεται σε

μικρές συγκεντρώσεις σε σύγκριση με το υπόστρωμα που οξειδώνεται και η οποία καθυστερεί σημαντικά ή αποτρέπει την οξείδωση του υποστρώματος αυτού. (VayaandAviram2001).

Τα αντιοξειδωτικά γενικά λειτουργούν με δύο τρόπους:

- Είτε παρεμποδίζουν τη δημιουργία ΔΕΟ,
- είτε σταματούν τη διάδοση των ελεύθερων ριζών που προκαλείται από τις αλυσιδωτές αντιδράσεις.

Επίσης είναι δυνατόν, η παρουσία κάποιου αντιοξειδωτικού (για παράδειγμα της βιταμίνης C), να συμβάλλει στη διατήρηση της αντιοξειδωτικής δράσης κάποιου άλλου αντιοξειδωτικού, όπως της τοκοφερόλης. Στην περίπτωση αυτή, έχουμε συνεργατική δράση των δύο αντιοξειδωτικών και λέμε ότι η βιταμίνη C έχει συν-αντιοξειδωτική δράση.

Ο όρος οξειδωτικό στρες περιγράφει την κατάσταση ανισορροπίας, ανάμεσα στις συγκεντρώσεις των δραστικών μορφών οξυγόνου ReactiveOxygenSpecies - (ROS) και των αντιοξειδωτικών αμυντικών μηχανισμών ενός οργανισμού. (Halliwell&Gutteridge, 1990, Dotan, 2004).

Το οξειδωτικό στρες προκαλείται συνήθως από:

- Μειωμένη δράση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Αυτό μπορεί να συμβεί είτε εξαιτίας μεταλλάξεων ή τοξικών παραγόντων που επηρεάζουν τη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων είτε από τη μείωση των διατροφικών αντιοξειδωτικών ουσιών.
- Αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών (ROS). Αυτό συμβαίνει είτε λόγω της έκθεσης των κυττάρων σε υψηλά επίπεδα ROS, λόγω της ύπαρξης παραγόντων που οδηγούν στην αυξημένη παραγωγή σε ROS.

Τα κυριότερα αντιοξειδωτικά της διατροφής αποτελούν λιποδιαλυτές και υδατοδιαλυτές φυτικές ενώσεις όπως η τοκοφερόλη, το καροτένιο, το λυκοπένιο, η βιταμίνη C, η λουτεΐνη και διάφορες πολυφαινόλες (φλαβονοειδή και άλλες ενώσεις).

1.5.4 Επίδραση των Ελευθέρων Ριζών στην Υγεία.

Έχει γίνει πλέον επιστημονικά αποδεκτό ότι η μεταβολή της απαραίτητης οξειδοαναγωγικής ισορροπίας των κυττάρων μας προς την κατάσταση του οξειδωτικού στρες, έχει ως αποτέλεσμα την εκδήλωση διαφόρων παθολογικών

καταστάσεων, ενώ επιπλέον, συμμετέχει και στη διαδικασία της γήρανσης. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το οξειδωτικό στρες οδηγεί σε οξείδωση των βασικών βιοχημικών συστατικών του κυττάρου, όπως τα λιπίδια, οι πρωτεΐνες και το DNA με αποτέλεσμα τη μεταβολή των δομικών και λειτουργικών τους ιδιοτήτων.

Ο κατάλογος των ασθενειών για τις οποίες έχουν ενοχοποιηθεί σε μεγαλύτερο ή μικρότερο βαθμό οι ελεύθερες ρίζες, αυξάνεται συνεχώς και περιλαμβάνει καρδιαγγειακές παθήσεις, τον καρκίνο, νευροεκφυλιστικές ασθένειες, τον καταρράκτη, τον διαβήτη και διάφορες αυτοάνοσες ασθένειες. Για παράδειγμα τα ΔΕΟ αρχικά οξειδώνουν τα φωσφολιπίδια της LDL. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση μονοκυττάρων στον υποενδοθηλιακό χώρο και τη μετατροπή τους σε μακροφάγα κύτταρα. Στη συνέχεια έχουμε οξείδωση και της πρωτεΐνης της LDL, οπότε λέμε ότι η LDL είναι πλήρως οξειδωμένη. Η οξειδωμένη LDL μεταφέρεται στο εσωτερικό των μακροφάγων μέσω ειδικών υποδοχέων, 3-4 φορές ταχύτερα από τη μη-οξειδωμένη LDL, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση μεγάλων ποσοτήτων οξειδωμένης LDL μέσα στα μακροφάγα τα οποία μετατρέπονται έτσι σε αφρώδη κύτταρα. Καθώς τα αφρώδη κύτταρα συσσωρεύονται κάτω από το ενδοθήλιο έχουμε την έναρξη του σχηματισμού της αθηρωματικής πλάκας, η οποία και οδηγεί περαιτέρω στην κλινική εκδήλωση της νόσου.

1.6 Σκοπός της εργασίας

Η παρούσα εργασία είχε ως σκοπό την απομόνωση–επεξεργασία πολυφαινολικών συστατικών από φύλλα ελιάς, σε μορφή υγρού εκχυλίσματος και σκόνης υψηλής προστιθέμενης αξίας, με την εφαρμογή της τεχνολογίας μικροκυμάτων. Σ' αυτό το στάδιο έγινε μέτρηση των συστατικών της σκόνης φύλλων ελιάς με την μέθοδο HPLC και προσδιορίστηκαν οι ολικές φαινόλες και τα επιμέρους συστατικά των φύλλων ελιάς. Στο πρώτο μέρος προσδιορίστηκε η αντιοξειδωτική δράση με τη χρήση των μεθόδων DPPH και ABTS. Στο δεύτερο μέρος της μελέτης εξετάστηκε η αντιμεταλλαξιγόνος δράση των εκχυλισμάτων έναντι βλαβών στο DNA που προκαλούνται από ελεύθερες ρίζες. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε πλασμιδιακόDNA στο οποίο και παρατηρήθηκε η αναστολή της πρόκλησης μονόκλωνων θραυσμάτων από παράγοντες που δρουν μέσω δραστικών μορφών οξυγόνου. Ως τέτοιοι παράγοντες χρησιμοποιήθηκαν η ρίζα του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) παρουσία UV ακτινοβολίας και οι

ρίζεσπεροξυλίου (ROO-) που παράχθηκαν από την θερμική διάσπαση του 2,2 - azobis-(2-amidinopropanehydrochloride) (AAPH).Ενώ στο τρίτο και τελευταίο στάδιο του πειράματος χρησιμοποιώντας κυτταρομετρία ροής προσδιοριστήκαν δείκτες οξειδωτικού στρες σε ενδοθηλιακά κύτταρα για να εξετάσουμε εάν υπάρχει αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος, έτσι ώστε, με την κατάλληλη προσθήκη αυτών σε ποτό, τρόφιμο ή φαρμακευτικό σκεύασμα, να προσδίδονται οι θετικές ιδιότητες των φύλλων ελιάς.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Εξοπλισμός και αντιδραστήρια

2.1 Φυτικό υλικό

Προηγήθηκε συλλογή φύλλων ελιάς. Η συλλογή έγινε δύο μέρες πριν την εκχύλιση από περιοχή η οποία βρίσκεται σε βουνοπλαγιά της περιοχής Τεμπών. Λόγω της κλίσης του εδάφους η περιοχή μπορεί να χαρακτηριστεί ως βιολογική καλλιέργεια γιατί στα δένδρα της περιοχής δεν γίνεται χρήση φυτοφαρμάκων ούτε άλλων σκευασμάτων.

2.2 Εκχύλιση με μικροκύματα (MAE: microwave assisted extraction)

Η εκχύλιση έγινε με Microwavesystem (MAC-75). Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες όπως η πίεση, η ποσότητα του υλικού και του διαλύτη στο πλαίσιο της βελτιστοποίησης της εκχύλισης με μικροκύματα με στόχο την παραλαβή του μέγιστου ποσοστού φαινολικών συστατικών από τα φύλλα ελιάς.

2.2.1 Τεχνολογία μικροκυμάτων.

Τις τελευταίες δεκαετίες υπάρχει έντονο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη νέων τεχνικών παραλαβής εκχυλισμάτων, με την χρήση των οποίων έχει τελικά επέλθει σημαντική μείωση στο χρόνο εκχύλισης και στον όγκο δείγματος διαλύτη. Έτσι άρχισε η χρήση των μικροκυμάτων (MW) στην εκχύλιση. Με τα μικροκύματα υπάρχει σημαντική μείωση στο χρόνο εκχύλισης, σε σχέση με τις κλασικές μεθόδους (Soxhlet). Με τις συμβατικές μεθόδους η θερμότητα μεταδίδεται από την θερμαντική πλάκα στο δοχείο θέρμανσης και από εκεί στο διάλυμα. Αντίθετα με τα μικροκύματα η θέρμανση ξεκινάει από το δείγμα, μιας και το δοχείο δεν απορροφά την ακτινοβολία των μικροκυμάτων. Όπως φαίνεται παρακάτω, η θερμότητα, που παράγεται από τα MW, είναι εξάρτηση του διαλύματος. Αυτό συμβαίνει μιας και υπάρχουν διαλύτες που απορροφούν τα MW (π.χ. μεθανόλη) και άλλοι που δεν την απορροφούν και επομένως δεν θερμαίνονται (π.χ. εξάνιο). Με την MAE υπάρχει επίσης και σημαντική μείωση στον όγκο δείγματος και διαλύτη, σε σχέση με την Soxhlet, λόγω της αποδοτικότερης εκχύλισης (Laura Rinaldi 2015).

Η τελευταία γενιά αντιδραστήρων μικροκυμάτων επιτρέπουν τον γρήγορο προγραμματισμό, συνθήκες αντίδρασης με παράλληλες δοκιμές, την καλύτερη

επιλογή διαλύτη, και συνθήκες που απαιτούν διαδικασίες συνεχούς ροής σε αντιδραστήρες μικροκυμάτων. Υποβοηθούμενες από μικροκύματα οι χημικές διαδικασίες, διαδραματίζουν καίριο ρόλο στο σχεδιασμό της βιώσιμης προετοιμασίας πολλών γραμμαρίων για να αντιμετωπιστεί το ανταγωνιστικό κόστος παραγωγής.

2.2.1i MICROWAVE SYSTEM MAC-75

Το σύστημα λειτουργεί με 4 Magnetrons για τη δημιουργία μικροκυμάτων τα οποία έχουν το καθένα ισχύ 1500watt με μέγιστη τα 6000Watt. Η περιστροφή της μπομπίνας είναι δυνατή για την καλύτερη απόδοση της εκχύλισης



Εικόνα 6: MICROWAVE SYSTEM MAC-75

Το σύστημα έχει μια μεγάλη κοιλότητα - 40 L που εξασφαλίζει τον έλεγχο της θερμοκρασίας, την πίεση, το χρόνο, το δείγμα υπό ανάδευση και το χρόνο ψύξης μετά την αντίδραση. Είναι ένα περιστρεφόμενο σύστημα που αποτελείται από ένα

εσωτερικό καλάθι στο οποίο τοποθετείται το υλικό εκχύλισης και αυτό εφαρμόζεται μέσα σε μια κοιλότητα ή εξωτερικό δοχείο στο οποίο τοποθετείται ο διαλύτης από μια οπή που υπάρχει στο πάνω μέρος του συστήματος και η οποία σφραγίζεται με βαλβίδα όταν προστεθεί ο επιθυμητός όγκος του διαλύτη

Ένα χρήσιμο χαρακτηριστικό σε αυτή τη συσκευή είναι η ανάπτυξη των στροφείων που φέρουν τα δοχεία πίεσης που είναι ανθεκτικά για ταυτόχρονη multisample ακτινοβολία, ένα σημαντικό εργαλείο, το οποίο χρησιμοποιείται τόσο στην πέψη του δείγματος όσο και στην οργανική σύνθεση.

Πρόκειται για μια εξαιρετική πλατφόρμα για τη σύνθεση στερεάς φάσης MW καθώς εξασφαλίζει καλή στερεά ανάμειξη και υψηλή επαναληψιμότητα από mg έως και kg υλικού.

Ένα κενό 330milbar μπορεί να εφαρμοστεί κατά τη διάρκεια της διαδικασίας με μια εξωτερική αντλία υγρού δακτυλίου για πιο εύκολη ρύθμιση. Επίσης η θερμοκρασία είναι ένας παράγοντας που μπορεί να ρυθμίζεται από την αρχή του προγράμματος για καλύτερα αποτελέσματα. Η πίεση υπό κενό αέρος είναι 75kPaskal.

Κάθε πρόγραμμα ελεγχόμενης θερμοκρασίας εκχύλισης είχε ένα στάδιο όπου η θερμοκρασία ανέβαινε ομαλά σύμφωνα με τη θερμοκρασία που είχε καθοριστεί. Σε ένα δεύτερο στάδιο η θερμοκρασία παρέμενε σταθερή και εφαρμόζεται η ισχύς που έχει καθοριστεί για την εκχύλιση. Τέλος ακολουθούσε πρόγραμμα ψύξης 5 min.

2.2.2 Διαδικασία εκχύλισης με μικροκύματα

Για τη διαδικασία της εκχύλισης χρησιμοποιήθηκε νερό αντίστροφης όσμωσης. Η ποσότητα του νερού και των φύλλων ελιάς ήταν σταθερή σε όλα τα προγράμματα και επιλέχθηκε η μεταβολή της θερμοκρασίας για την παραγωγή διαφορετικών εκχυλισμάτων.

Εφαρμόστηκαν τρία διαφορετικά προγράμματα εκχύλισης:

Στο πρώτο πρόγραμμα η ελεγχόμενη θερμοκρασία εκχύλισης είχε ένα στάδιο 45 min, όπου η θερμοκρασία ανέβαινε ομαλά μέχρι το σημείο 40⁰C και σε ένα δεύτερο στάδιο η θερμοκρασία παρέμενε σταθερή στους 40⁰C για 30 min. Στο δεύτερο στάδιο η ισχύς ήταν 6000 Watt και η πίεση 330milbar

Στο δεύτερο πρόγραμμα η ελεγχόμενη θερμοκρασία εκχύλισης είχε ένα στάδιο 45 min, όπου η θερμοκρασία ανέβαινε ομαλά μέχρι το σημείο 40⁰C και σε ένα δεύτερο στάδιο όπου εφαρμόζονταν σταθερή θερμοκρασία στους 60⁰C για 30 min.

Στο τρίτο πρόγραμμα η ελεγχόμενη θερμοκρασία εκχύλισης εφαρμόστηκε στο πρώτο στάδιο αυξανόμενη για 45min στους 70°C και στο δεύτερο στάδιο παρέμενε σταθερή στους 70°C για 30 min

Και στα τρία προγράμματα η πίεση και η ισχύς παρέμεναν ίδιες.

Οι μάζες φυτικού υλικού που χρησιμοποιήθηκαν και στα τρία προγράμματα εκχύλισης ήταν 6Kg, ενώ ο όγκος του νερού 30lt.

Πίνακας 4: Διαδικασία εκχύλισης

Βήμα προγράμματος	Χρόνος(min)	Ισχύς (Watt)	Πίεση (milbar)	Θερμοκρασία(°C)
1.A.Φάση	45	↑	↑	40
1.B. Φάση	30	6000	330	40
2.A.Φάση	45	↑	↑	30
2.B. Φάση	30	6000	330	60
3.A.Φάση	45	↑	↑	70
3.B. Φάση	30	6000	330	70

Στα εκχυλίσματα που ελήφθησαν προσδιορίστηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα. Τα δύο από τα τρία δεν παρουσίασαν ιδιαίτερο ενδιαφέρον όσο αφορά την αντιοξειδωτική τους δράση. Το εκχύλισμα που παράχθηκε στους 70 βαθμούς Κελσίου παρουσίασε αυξημένη αντιοξειδωτική ικανότητα. Στη συνέχεια έγινε συμπύκνωση του και προσδιορίστηκε εκ νέου το IC50. Η συμπύκνωση έγινε με τη χρήση FreezeDryer.



Εικόνα 7:α) Δείγμα 1 β) Δείγμα 2 γ) Δείγμα 3

2.2.3 Τεχνική ψυκτοξήρανσης (Freeze Drying)

Ξήρανση με κατάψυξη ή λυοφιλοποίηση είναι μία μέθοδος αφυδάτωσης η οποία συνήθως δεν προκαλεί συρρίκνωση ή σκλήρυνση του υλικού που ξηραίνεται. χρησιμοποιείται σήμερα κυρίως για την διατήρηση ευαίσθητων υλικών ή για να τα καταστήσει ικανά για πιο ασφαλή μεταφορά. Επιπλέον, γεύσεις, μυρωδιές και θρεπτικό περιεχόμενο γενικά παραμένουν αμετάβλητες, καθιστώντας τη διαδικασία δημοφιλή για τη συντήρηση τροφίμων. Τα λυοφιλωμένα προϊόντα τρόφιμα ή φάρμακα έχουν μακρά διάρκεια ζωής: σε σφραγισμένη συσκευασία που προστατεύονται από την υγρασία, το φως και το οξυγόνο, μπορούν να αποθηκευτούν σε θερμοκρασία δωματίου για πολλά χρόνια.

Η λειτουργία περιγράφεται ως εξής: Κατεβάζοντας σε μεγάλο βαθμό την θερμοκρασία ($-110\text{ }^{\circ}\text{C}$) και ελαττώνοντας την πίεση που περιβάλλει το υλικό, με την βοήθεια αντλίας, το νερό που βρίσκεται στο υλικό, από την στερεά φάση, μεταβαίνει στην αέρια φάση. Η λυοφιλίωση μπορεί να οδηγήσει σε εξαιρετικά χαμηλή περιεκτικότητα σε υγρασία, της τάξεως του 1-4%. Ο κατασκευαστής περιγράφει τέσσερα (4) στάδια στο *Freeze Drying*.

α) Πριν την Ξήρανση. (*Pre – Freezestep*).

β) Δημιουργία Κενού. (*Vacuumstep*). Εδώ, αφαιρείται ο αέρας και έτσι μειώνεται η πίεση στο σύστημα.

γ) Κύρια Ξήρανση. (*Primary Drying step*). Το νερό μετακινείται από το προϊόν, σε χαμηλή θερμοκρασία και πίεση, ρέοντας στο σύστημα σαν ατμός (εξάχνωση), προς τον συμπυκνωτή.

δ) Δευτερεύουσα Ξήρανση. (*Secontary Drying step*). Αφαιρείται και το νερό που περιβάλλει τις πρωτεΐνες.

Η ξήρανση των διαλυμάτων και η λήψη των δειγμάτων, σε μορφή σκόνης, για τον έλεγχο της αντιοξειδωτικής ικανότητας, εκτελέστηκε στην συσκευή *Freeze Dryer, CoolSafe*, με κατασκευάστρια εταιρεία την *SCANVAC*, από την Δανία.



Εικόνα 8:SCANVAC-CoolSafe

Χρησιμοποιήθηκαν 1500ml εκχυλίσματος τα οποία τοποθετήθηκαν σε τρεις φιάλες με ίσες ποσότητες περίπου στην κάθε μία, του μηχανήματος FreezeDryer. Από τη συμπύκνωση ελήφθησαν 150gr σκόνης μετά από 24 ώρες συμπύκνωσης. Η θερμοκρασία που έγινε η συμπύκνωση ήταν -110 βαθμούς Κελσίου υπό κενό αέρος. Έγινε επανάληψη της διαδικασίας και ελήφθησαν άλλα 100gr σκόνης. Μετά το πέρας της διαδικασίας προσδιορίστηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα του συμπυκνωμένου εκχυλίσματος. Επίσης από την παραγόμενη συμπυκνωμένη σκόνη των φύλλων ελιάς χρησιμοποιήθηκε ένα μέρος για να γίνει ενθυλάκωση σε μαλτοδεξτρίνησε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις (10% & 20%) και προσδιορίστηκε και σε αυτά τα νέα δείγματα η αντιοξειδωτική ικανότητα ώστε να εξεταστεί κατά πόσο μειώνεται ή όχι η αντιοξειδωτική ικανότητα της σκόνης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

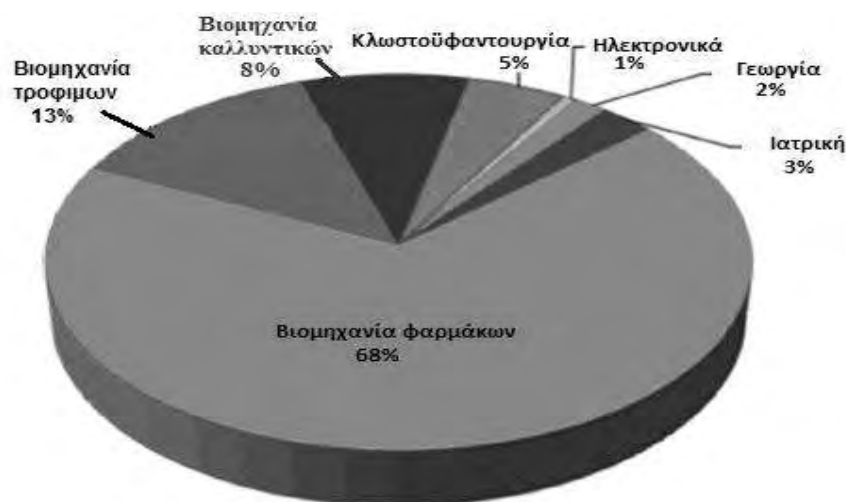


Εικόνα 9: Ξήρανση δειγμάτων με Freeze Dryer

2.3 ΜΙΚΡΟΕΝΘΥΛΑΚΩΣΗ -

2.3.1 Ορισμός

Ως μικροενθυλάκωση, αλλιώς (microencapsulation), ορίζεται η τεχνική κατά την οποία μια ουσία ή μίγμα ουσιών, περιβάλλεται από ένα άλλο υλικό, το οποίο ονομάζεται μέσο εγκλεισμού, ή ενσωματώνεται σε μια ομοιογενή ή ετερογενή μήτρα, καταλήγοντας τελικά στο σχηματισμό μικρών καψουλών. Εδώ και πολλές δεκαετίες, η τεχνική της ενθυλάκωσης βρίσκει ποικίλες εφαρμογές στη φαρμακοβιομηχανία, ενώ τα τελευταία χρόνια συναντάται και στη βιομηχανία των τροφίμων. Τα συστατικά που ενδιαφέρουν τη βιομηχανία τροφίμων από άποψη εγκλεισμού είναι π.χ. αρωματικά συστατικά, αιθέρια έλαια, γλυκαντικά, βιταμίνες, αντιοξειδωτικά, συντηρητικά, ένζυμα, ιχνοστοιχεία, μικροοργανισμοί, χρωστικές ουσίες, κ.α. Με τη συγκεκριμένη τεχνική μπορούν να προστατευτούν από ενδεχόμενη εξάτμιση, οξείδωση, απορρόφηση υγρασίας και θέρμανση. Όλες αυτές αποτελούν πιθανές φυσικοχημικές μεταβολές που μπορούν να συμβούν κατά την αποθήκευση ή και επεξεργασία του τροφίμου (Zeller, Gibbs 1999).



Σχήμα 1: Σχηματική απεικόνιση της κατανομής της εφαρμογής της μικροενθυλάκωσης σε διάφορους τομείς (Martins 1999).

Η τεχνική αυτή έχει πολλά πλεονεκτήματα όπως αύξηση της διαλυτότητας και του χρόνου αποθήκευσης των ουσιών, κάλυψη επιθυμητής οσμής και γεύσης, διατήρηση του αρώματος των ουσιών κατά τη διάρκεια αποθήκευσης τους, προστασία από μικροβιολογικές μολύνσεις κ.α.

2.3.2 Μέσα εγκλεισμού

Ως μέσα εγκλεισμού μπορούν να χρησιμοποιηθούν πολλά και διάφορα υλικά, το καθένα από τα οποία παρουσιάζει τόσο πλεονεκτήματα, όσο και μειονεκτήματα.

Οι πρωτεΐνες, τα λίπη, οι υδατάνθρακες, η κυτταρίνη, τα κόμματα, αλλά και άλλες συνθετικές ενώσεις που προκύπτουν από συνδυασμούς των παραπάνω, αποτελούν παραδείγματα τέτοιων υλικών. Η επιλογή της ουσίας που θα χρησιμοποιηθεί ως μέσο εγκλεισμού είναι πολύ σημαντική και δεν γίνεται τυχαία, αλλά εξαρτάται από τη φύση του προς ενθυλάκωση συστατικού και άλλους σημαντικούς παράγοντες. Τέλος, η ουσία που θα χρησιμοποιηθεί ως μέσο εγκλεισμού, είναι αναγκαίο να έχει την απαραίτητη έγκριση από τον αμερικανικό οργανισμό τροφίμων και φαρμάκων (FDA) ή την ευρωπαϊκή αρχή για την ασφάλεια των τροφίμων (EFSA).

2.3.3 Κύριες Τεχνικές για την ενθυλάκωση

Υπάρχουν πολλές τεχνικές που χρησιμοποιούνται στην ενθυλάκωση. Στο συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε η διαδικασία της ενθυλάκωσης σε άμυλο.

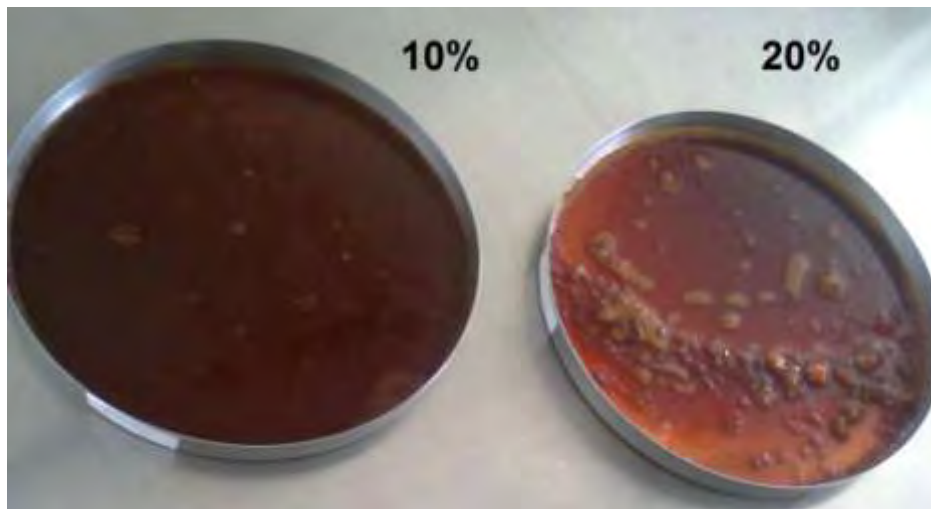
2.3.3.1. Διαδικασία ενθυλάκωσης σε άμυλο

Ως υλικό για την ενθυλάκωση του συμπυκνώματος φύλλων ελιάς χρησιμοποιήθηκε μαλτοδεξτρίνη και εφαρμόστηκε η τεχνική ξήρανσης με εξάχνωση (freeze dryer). Ο πειραματικός στόχος ήταν η παραγωγή ενθυλακωμένης σκόνης πολυφαινόλης με σκοπό να προστατευθεί η ενεργός ουσία της πολυφαινόλης αλλά και να καλυφθεί το χρώμα και η πικρή γεύση της (masking) με σκοπό να είναι περισσότερο κατάλληλη για χρήση σε βιο-λειτουργικά τρόφιμα. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις σκόνης η μία 10% και η άλλη 20% για να μελετηθεί η δραστηριότητά τους

. Η τεχνική της ενθυλάκωσης ακολούθησε τα παρακάτω στάδια:

- Α) 20 gr αμύλου και 80 gr πολυφαινόλης διαλύθηκαν σε 800 ml νερού και ακολούθησε πολύ δυνατή ανάδευση για 15 λεπτά τουλάχιστον μέχρι ομογενοποίησης.
- 10 gr αμύλου και 90 gr πολυφαινόλης διαλύθηκαν σε 800 ml νερού και ακολούθησε πολύ δυνατή ανάδευση για 15 λεπτά τουλάχιστον μέχρι ομογενοποίησης
- Στην συνέχεια τα υλικά ψύχθηκαν σε κατάψυξη για 20 λεπτά περίπου και αδειάστηκαν στις δύο ταψάκια και τοποθετήθηκαν στις κατάλληλες υποδοχές του μηχανήματος.
- Τέλος το μηχάνημα τέθηκε σε λειτουργία για περίπου 18 ώρες

Το τελικό αποτέλεσμα ήταν η παραγωγή καφέ σκόνης σε μορφή πούδρας με πιο ανοιχτό καφέ χρώμα το δείγμα 20% και πιο σκούρο χρώμα το δείγμα 10%. Οι μορφές των αποτελεσμάτων παρουσιάζονται στην Εικόνα που ακολουθεί.



Εικόνα 10: Ξήρανση ενθυλακωμένων προϊόντων

3 ΜΕΘΟΔΟΙ

Προσδιορισμός πολυφαινολών

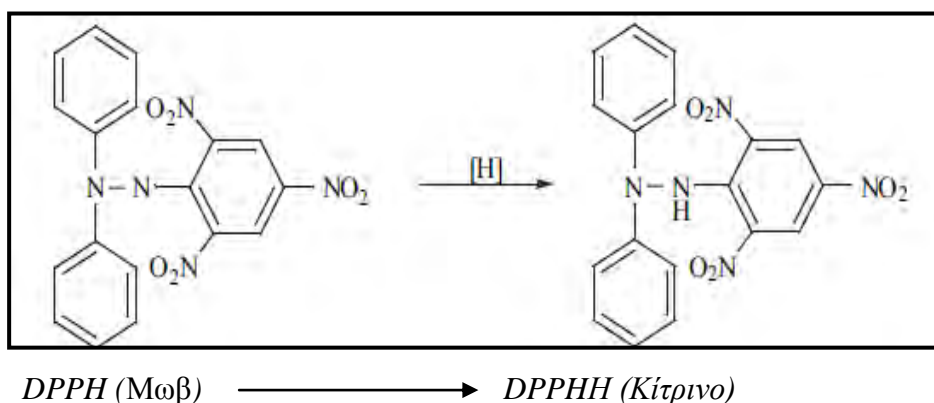
Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής και αντιμεταλλαξιγόνου ικανότητας των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκαν συνολικά τέσσερις in vitro μέθοδοι.

3.1 Εκτίμηση της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη Ρίζα DPPH'

3.1.1 Αρχή της Μεθόδου.

Η μέθοδος παρουσιάστηκε το 1995 από τους Brand-Williams. Ανήκει στις ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους για την εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας φυτικών δειγμάτων (Brand-William1995). Η μέθοδος χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, βασισμένη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης των αντιοξειδωτικών μορίων με την σταθερή αζωτούχα ρίζα 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH). Η ρίζα DPPH' μπορεί να αδρανοποιηθεί, είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου (singleelectrontransfer, SET) είτε μέσω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου (hydrogen atom transfer, HAT) (Prior 2005). Η 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH') είναι μία σταθερή ρίζα, φέρει μωβ χρώμα και απορροφά στα 517nm. Όταν προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH') **ανάγεται**, και μετατρέπεται σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (DPPH:H), όπως φαίνεται παρακάτω (Εικόνα 10). Η αναγωγή της ρίζας έχει σαν αποτέλεσμα, την μεταβολή του χρώματος του διαλύματος, από μωβ σε κίτρινο, μεταβολή, που είναι ανάλογη της συγκέντρωσης

της αντιοξειδωτικής ουσίας και την αντίστοιχη μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 517nm. Η μεταβολή της απορρόφησης προσδιορίζεται φωτομετρικά.



Εικόνα 11. Η Αναγωγή του $DPPH^{\bullet}$ σε $DPPH:H$

3.2.Πειραματική Διαδικασία.

Αρχικά προετοιμάζεται το διάλυμα $DPPH^{\bullet}$ την ημέρα του πειράματος και καλύπτεται με αλουμινόχαρτο γιατί είναι φωτοευαίσθητο (1000 μl μεθανόλης στο οποίο εμπεριέχονται 100 μM ρίζας $DPPH^{\bullet}$) και ακολουθεί η προετοιμασία των διαλυμάτων των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων σε διάφορες συγκεντρώσεις (πχ. 50, 100, 250, 500, 1000 μg/ml). Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης είναι 1000 μl. Πρώτα προστίθενται τα διαλύματα της εξεταζόμενης ουσίας, μετά η μεθανόλη και τέλος το διάλυμα της ρίζας, με σταθερό γρήγορο ρυθμό, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 11).

Ακολουθεί ανάδευση και επώαση των δειγμάτων στο σκοτάδι για 20 min, σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την επώαση, ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης στα 517nm. Η φασματοφωτομέτρηση έγινε με συσκευή HitachiU-1500 σε πλαστικές κυψελίδες του 1ml. Ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου γίνεται με 1 ml μεθανόλης (τυφλό). Τα δείγματα που περιείχαν μόνο μεθανόλη και $DPPH$ αποτελούσαν τους θετικούς μάρτυρες.

Επειδή υπάρχει πιθανότητα η ίδια η εξεταζόμενη ουσία να απορροφά στα 517nm, μετράται και η απορρόφηση της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη (Πίνακας 5). Όλα τα δείγματα εξετάζονται εις τριπλούν, με τουλάχιστον δύο πειράματα για το κάθε φυτικό εκχύλισμα, ενώ το διάλυμα της ρίζας $DPPH^{\bullet}$ σε μεθανόλη χρησιμοποιείται σαν δείγμα ελέγχου (control).

Πίνακας 5. Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων

	Τυφλό	Control	C1	C2	C3	C4	C5
Εκχύλισμα	-	-	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl
Μεθανόλη	1000μl	950μl	900μl	900μl	900μl	950μl	950μl
DPPH'	-	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl
V ΤΕΛ	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml

Πίνακας 6. Έλεγχος απορρόφησης της εξεταζόμενης ουσίας, σε μεθανόλη.

	C1	C2	C3	C4	C5
Εκχύλισμα	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl
Μεθανόλη	950μl	950μl	950μl	950μl	950μl
V ΤΕΛ	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml

3.3 Υπολογισμός της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας-Στατιστική Ανάλυση.

Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων υπολογίστηκε η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση των τιμών της απορρόφησης για κάθε δείγμα στα 517nm. Η αντιοξειδωτική ικανότητα κάθε εξεταζόμενης ουσίας υπολογίστηκε ως το ποσοστό αναστολής της δράσης της ρίζας DPPH και εκφράστηκε σαν το ποσοστό εξουδετέρωσης αυτής σύμφωνα με τον τύπο:

$$\% \text{ εξουδετέρωση της ρίζας DPPH} = [(A_0 - A_\delta) / A_0] \times 100$$

όπου:

A_0 : Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος ελέγχου.

A_δ : Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος (φυτικό εκχύλισμα).

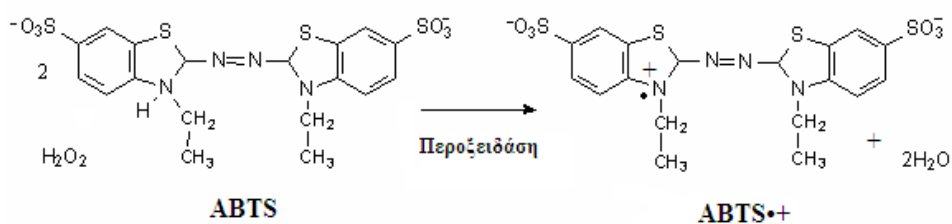
Για να προσδιοριστεί αν υπήρχαν στατιστικά σημαντικά διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος one-way ANOVA (οι υπολογισμοί έγιναν με το πρόγραμμα SPSS 17.0).

Επιπλέον, προσδιορίστηκε το IC₅₀, δηλαδή η συγκέντρωση των εξεταζόμενων ουσιών στην οποία προκαλούσαν μείωση των ριζών του DPPH κατά 50%, από τις γραφικές παραστάσεις της μεταβολής της % εξουδετέρωσης σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC₅₀, τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος

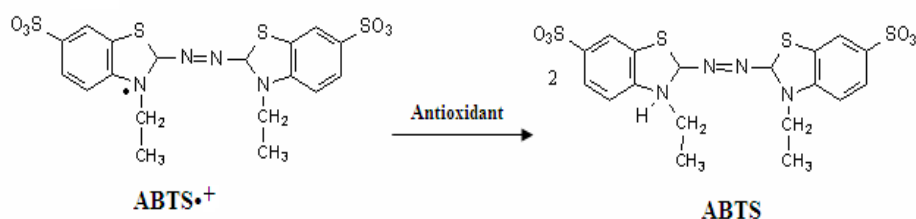
3.4. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας ABTS^{•+}

3.4.1 Αρχή μεθόδου ABTS^{•+}

Η μέθοδος εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας εν δυνάμει αντιοξειδωτικών μορίων, αναπτύχθηκε από τους Miller και Rice-Evans, (Rice-Evans et al., 1993), και βασίζεται σε μία αντίδραση αποχρωματισμού. Χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, βασιζόμενη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης αντιοξειδωτικών μορίων με την σταθερή ρίζα ABTS^{•+}. Το ABTS, [2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid)], παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) και μέσω της δράσης του ενζύμου περοξειδάση (HRP), οξειδώνεται και δημιουργείται η δραστική ρίζα ABTS^{•+} (κατιόν) (Εικόνα 11). Η συγκεκριμένη ρίζα έχει κυανοπράσινο χρώμα και απορροφά στα 730 nm. Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μιας ουσίας πρέπει αρχικά να προηγηθεί ο σχηματισμός της ρίζας και στην συνέχεια να ακολουθήσει η προσθήκη της εξεταζόμενης ουσίας ώστε να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των αντιοξειδωτικών παραγόντων με τους οξειδωτικούς παράγοντες που χρησιμοποιούνται για την οξείδωση του ABTS.



Εικόνα 17: Η οξειδωση του ABTS σε δραστική ρίζα



Εικόνα 12: Η αλληλεπίδραση του αντιοξειδωτικού με την ρίζα ABTS

Όταν στο διάλυμα προστεθεί μία ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα $\text{ABTS}^{\bullet+}$, ανάγεται είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου (single electrontransfer, SET) είτε μέσω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου (hydrogen atom transfer, HAT), με αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό του διαλύματος σε βαθμό ανάλογο της συγκέντρωσης του αντιοξειδωτικού και συνέπεια την μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 730 nm (Prior2005, Miller1993).,

3.4.2. Πειραματική διαδικασία

Αρχικά προετοιμάζονται τα διαλύματα και ακολουθεί η ετοιμασία των αραιώσεων των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων σε διάφορες συγκεντρώσεις (πχ. 5, 10, 25, 50,100 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Διάλυμα ABTS (1mM): Για τελική συγκέντρωση ABTS 1 mM σε τελικό όγκο αντίδρασης 1 mL (500 μl) φτιάχνουμε διάλυμα 2 mM. Για 10 mL διαλύματος ζυγίζουμε 10,97 mg ABTS και το διαλύουμε σε H_2O .

Διάλυμα H_2O_2 (30 μM): Για τελική συγκέντρωση H_2O_2 30 μM σε τελικό όγκο αντίδρασης 1 mL (50 μl) φτιάχνουμε διάλυμα 600 μM . Από το stock διάλυμα

H₂O₂ 30% 8,8 M αραιώνουμε με H₂O₂, ώστε να φτιάξουμε το διάλυμα των 600 μΜ.

Διάλυμα HRP (6 μΜ): Διαλύουμε 1mg του ενζύμου σε 10ml αποστειρωμένο νερό. Στη συνέχεια κάνουμε μια αραιώση 1/10 και χρησιμοποιούμε αυτό το διάλυμα για την αντίδραση.

Όλα τα παραπάνω διαλύματα προετοιμάζονται την ημέρα του πειράματος και καλύπτονται με αλουμινόχαρτο γιατί είναι φωτοευαίσθητα. Επιπλέον διατηρούνται σε πάγο κατά την διάρκεια του πειράματος. Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης είναι 1000μl στα οποία προστίθενται κατά σειρά το διάλυμα ABTS, το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂) και το ένζυμο περοξειδάση (HRP). Τα διαλύματα αναδεύονται και επωάζονται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 45 min. Στην συνέχεια ακολουθεί η προσθήκη των δειγμάτων σε διάφορες συγκεντρώσεις (πχ. 5, 10, 25, 50, 100 μg/ml), σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα. Η διάλυση των δειγμάτων έγινε με τη χρήση νερού ζυγίζοντας ένα γραμμάριο σκόνης από κάθε δείγμα και διαλύοντας το σε πέντε ml νερό. Όλα τα δείγματα εξετάζονται εις τριπλούν, με τουλάχιστον δύο πειράματα για κάθε φυτικό εκχύλισμα ενώ το διάλυμα των παραπάνω αντιδραστηρίων (ABTS, H₂O₂, HRP) χρησιμοποιείται σαν δείγμα ελέγχου (control). Μετά την επώαση και την προσθήκη των εκχυλισμάτων ακολουθεί ανάδευση και μέτρηση της απορρόφησης στα 730 nm. Επειδή υπάρχει πιθανότητα η εξεταζόμενη ουσία να απορροφά στα 730 nm, μετράται η απορρόφηση της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη χωρίς την παρουσία του ενζύμου (Πίνακας 7).

Πίνακας 7: Η διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες των αντιδραστηρίων

	Τυφλό	Control	C1	C2	C3	C4	C5
H ₂ O	450 μL	400 μL	400 μL	400 μL	400 μL	400μl	400μl
ABTS	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500μl	500μl
H ₂ O ₂	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50μl	50μl
HRP	-	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50ml	50ml
V τελ	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1mL	1mL	1mL
Επώαση 45 min							

Πίνακας 8: Έλεγχος απορρόφησης της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη

	Τυφλό	Control	C1	C2	C3	C4	C5
Εκχύλιση	-	-	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl
V τελ	1000μl	1000μl	1000μl	1000 μl	1000 μl	1000 μl	1000μl
	Τυφλό	C1	C2	C3	C4	C5	
H ₂ O	450 μL	450 μL	450 μL	450 μL	450 μL	450 μL	450 μL
ABTS	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL
H ₂ O ₂	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL
Εκχύλιση	-	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL
V τελ	1000μl	1000μl	1000μl	1000μl	1000μl	1000μl	1000μl

3.4.3 Υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας-Στατιστική ανάλυση

Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων υπολογίστηκε η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση των τιμών της απορρόφησης για κάθε δείγμα στα 730nm. Η αντιοξειδωτική ικανότητα κάθε εξεταζόμενης ουσίας υπολογίστηκε ως το ποσοστό αναστολής της δράσης της ρίζας ABTS^{•+} και εκφράστηκε σαν το ποσοστό εξουδετέρωσης αυτής σύμφωνα με τον τύπο:

$$\% \text{ εξουδετέρωση της ρίζας ABTS}^{\bullet+} = [(A_0 - A_s) / A_0] \times 100$$

όπου:

A_0 : Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος ελέγχου.

A_d : Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος (εκχύλισμα).

Για να προσδιοριστεί αν υπήρχαν στατιστικά σημαντικά διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος one-way ANOVA σε συνδυασμό με το τεστ του Dunnett (οι υπολογισμοί έγιναν με το πρόγραμμα SPSS 18.0). Επίσης, εκτιμήθηκε στατιστικά η συσχέτιση μεταξύ της εξουδετέρωσης της ρίζας του ABTS^{•+} που προκαλούσαν οι εξεταζόμενες ουσίες και της συγκέντρωσής τους με τον προσδιορισμό του συντελεστή συσχέτισης r κατά Spearman.

Επιπλέον, προσδιορίστηκε το IC₅₀, δηλαδή η συγκέντρωση των εξεταζόμενων ουσιών στην οποία προκαλούσαν μείωση των ριζών του ABTS^{•+} κατά 50%, από τις γραφικές παραστάσεις της μεταβολής της % εξουδετέρωσης σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC₅₀ τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος.

3.5 Μέθοδοι εκτίμησης αντιμεταλλαξιγόνου δράσης.

3.5.1 Γενικά

Η επαγόμενη πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA από ROS θεωρείται ότι εμπλέκεται σε σοβαρές παθολογικές καταστάσεις όπως οι μεταλλαξιγένεση και η καρκινογένεση (Stagos et al., 2005). Η παρατήρηση της αναστολής της βλάβης του DNA είναι ενδεικτική της πιθανής αντιμεταλλαξιγόνου δράσης των πολυφαινολικών ενώσεων των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων.

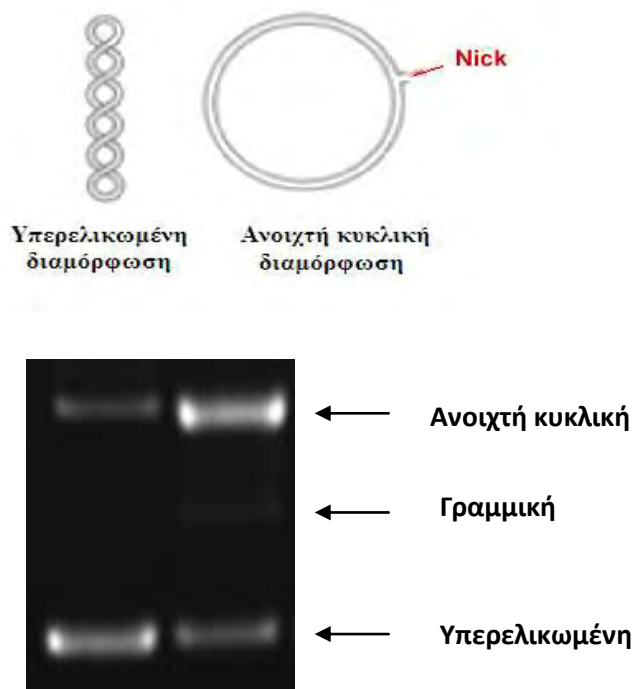
Για την εκτίμηση αυτής της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης, μέσω αναστολής της πρόκλησης βλαβών στο DNA από ελεύθερες ρίζες, χρησιμοποιήθηκαν δύο *in vitro* μέθοδοι, και δύο ρίζες αντίστοιχα. Η ρίζα υδροξυλίου (OH[•]) και η ρίζα περοξυλίου (ROO[•]).

Για τον προσδιορισμό της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε ως μοντέλο πλασμιδιακό DNA. Τα πλασμίδια είναι μικρά κυκλικά δίκλινα μόρια DNA που υπάρχουν στα βακτήρια και τις ζύμες, όπου και αντιγράφονται ως ανεξάρτητες μονάδες. Τα βακτήρια μπορεί να έχουν ένα ή περισσότερα αντίγραφα αυτών, τα οποία συμβάλλουν στην επιβίωσή τους σε αντίξοες συνθήκες, καθώς συνήθως φέρουν γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά. Το πλασμιδιακό DNA πλεονεκτεί στο ότι μπορεί να απομονωθεί πολύ εύκολα και σε

μεγάλη ποσότητα. Το σημαντικότερο όμως πλεονέκτημα του είναι ότι όταν τρέχει σε ένα gel ηλεκτροφόρησης εμφανίζεται κυρίως σε τρεις διαμορφώσεις (Εικόνα 12).

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

Οι παραπάνω διαμορφώσεις τρέχουν με διαφορετική ταχύτητα σε ένα gel ηλεκτροφόρησης. Η τελευταία εξαρτάται από το μέγεθος της διαμόρφωσης και μάλιστα όσο πιο μικρή είναι αυτή τόσο πιο γρήγορα διαπερνά τους πόρους της αгарόζης. Άρα το πλασμιδιακό DNA με υπερελικωμένη διαμόρφωση τρέχει πρώτο, δεύτερο εκείνο με τη γραμμική και τρίτο εκείνο με την ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση.



Εικόνα 13: Επαγόμενη από ρίζες Περοξυλίου (ROO[•]) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA

3.5.2. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Τα κύρια χημικά αντιδραστήρια, το αντιβιοτικό αμικιλίνη, το διάλυμα SDS (10%) και το ένζυμο ριβονουκλεάση (RNase) αποκτήθηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Το θρεπτικό μέσο LB Broth αποκτήθηκε από την ScharlauChemie (Barcelona, Spain). Το πλασμιδιακό DNA Bluescript-SK+ (Fermentas, USA) είχε εισαχθεί προηγουμένως σε δεκτικά βακτηριακά κύτταρα *E. Coli* DH5A.

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

Η συνολική καλλιέργεια χωρίζεται σε δύο επιμέρους καλλιέργειες των 50 mL. Οι καλλιέργειες φυγοκεντρώνται για 20 min στα 2057 g στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και στο ίζημα των βακτηρίων προστίθενται 4 mL διαλύματος [(100mL)-50 mM γλυκόζη, 25 mM Tris-Cl pH8, 10 mM EDTA, pH 8] και κατόπιν ακολουθεί επαναδιάλυση του ιζήματος. Τα δείγματα παραμένουν για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου στα οποία στην συνέχεια προστίθενται 8 mL διαλύματος 2 [(50mL) - 0,2 N NaOH, 1% SDS) και αναδεύονται 4-5 φορές πολύ απαλά για την αποφυγή απομόνωσης μαζί με το πλασμιδιακό DNA και χρωμοσωμικού DNA. Επειδή το διάλυμα είναι πολύ αλκαλικό, το πλασμιδιακό DNA μεταβαίνει από την υπερελικωμένη διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση, γι' αυτό αμέσως μόλις διαυγάσει το διάλυμα προστίθεται 6 mL διαλύματος 3 [(100 mL)- 5 M οξικό κάλιο C₂H₃O₂K, 11,5 mL οξικού οξέος]. Τα δείγματα αναδεύονται και παραμένουν για 7-8 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 20 min στα 3214g στους 4°C, στην συνέχεια το υπερκείμενο συλλέγεται και μεταφέρεται σε καινούριο σωλήνα με ταυτόχρονη μέτρηση του όγκου του και η φυγοκέντρηση επαναλαμβάνεται. Κατόπιν στο υπερκείμενο που συλλέγεται, προστίθενται διάλυμα προπανάλης (-20°C) σε όγκο ίσο με 60% του όγκου του υπερκείμενου. Τα δείγματα αναδεύονται και παραμένουν για 3-5min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρώνται για 20 min στα 3214g στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και στο ίζημα προστίθενται διάλυμα αιθανόλης 70% v/v (σε συνθήκες -20°C) σε όγκο ίσο με 50% του όγκου του υπερκείμενου. Ακολουθεί ανάδευση και φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 20 min στα 3214 g στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα (πλασμιδιακό DNA) αφού στεγνώσει επαναδιαλύεται σε διάλυμα TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA) στο οποίο είχε προστεθεί ένζυμο RNase 10 µg/mL για τη διάσπαση του RNA.

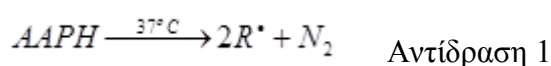
Ο προσδιορισμός της ποσότητας του πλασμιδιακού DNA που απομονώθηκε γίνεται με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 260 nm. Μία μονάδα οπτικής απορρόφησης στα 260 nm αντιστοιχεί σε συγκέντρωση DNA 50 µg/mL (1OD₂₆₀→50 µg/mL). Για τον προσδιορισμό της καθαρότητας του πλασμιδιακού DNA γίνεται μέτρηση της οπτικής απορρόφησης και στα 280nm και υπολογίζεται ο λόγος των τιμών της οπτικής απορρόφησης 260/280 (στα 280nm απορροφούν οι πρωτεΐνες και στα 260nm το DNA). Όταν ο λόγος είναι >1,8 η καθαρότητα του πλασμιδίου θεωρείται πολύ καλή. Για τον έλεγχο της διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 1% στα 100

V. Στην συνέχεια το πήκτωμα χρωματίζεται σε διάλυμα 0,5 µg/mL βρωμιούχου αιθιδίου για 30 min και αποχρωματίζεται σε απιονισμένο H₂O για 30 min. Ακολουθεί έκθεση του πηκτώματος σε συσκευή εκπομπής UV και φωτογράφιση του με το σύστημα ανάλυσης εικόνας MultiImage Light Cabinet της Alpha Innotech. Στη συνέχεια με τη χρησιμοποίηση του λογισμικού Alpha View της Alpha Innotech γίνεται ποσοτικοποίηση των ζωνών του DNA με βάση την οπτική τους πυκνότητα. Το πλασμιδιακό DNA που απομονώθηκε ήταν καλής καθαρότητας και βρίσκεται κατά 10-20% στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση πριν την πραγματοποίηση των πειραμάτων. Το πλασμίδιο τελικά χωρίζεται σε aliquots και τοποθετείται στους -20°C.

3.5.3 Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος εκτίμησης της προστατευτικής δράσης απέναντι στη δράση των ριζών ROO[•] βασίζεται στη μέθοδο των Changetal. (2001).

Οι ρίζες ROO[•] είναι από τις πιο συνηθισμένες ρίζες που παράγονται μέσα στον οργανισμό, αποτελώντας έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες που συμβάλλουν στην έναρξη της αλληλουχίας αντιδράσεων της οξειδωσης των λιπιδίων. Η χημεία των ριζών αυτών ποικίλει ανάλογα με την ομάδα R- που τις απαρτίζουν καθώς και το περιβάλλον στο οποίο παράγονται. Ως πηγή παραγωγής ριζών ROO[•] χρησιμοποιείται το AAPH [2,2'-Azobis (2-amidinopropane hydrochloride)]. Το AAPH σε θερμοκρασία 37°C διασπάται και οδηγεί στην παραγωγή ριζών ROO[•] (Αντιδράσεις 1,2).



Οι ρίζες ROO[•] έχουν την ικανότητα επίσης να προκαλούν μονόκλωνα σπασίματα στο DNA. Η δράση αυτή των ριζών στο πλασμιδιακό DNA έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή της διαμόρφωσης του από υπερελικωμένο, σε ανοιχτό κυκλικό και γραμμικό. Η εκτίμηση λοιπόν της αντιοξειδωτικής δράσης μιας ουσίας γίνεται μέσω της αναστολής της μετατροπής της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA στην ανοιχτή κυκλική ή γραμμική.

Η παρεμπόδιση της αλλαγής αυτής στην διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA από το εξεταζόμενο φυτικό εκχύλισμα ή την περιεχόμενη δραστική ουσία

αντικατοπτρίζει την προστατευτική δράση αυτών απέναντι στην δράση των ριζών ROO•.

Διαλύματα

EDTA 0.5M pH = 8.0

H ₂ O	EDTA	Προσθήκη NaOH μέχρι pH = 8.0
1lt	186.1gr	~20gr NaOH
500ml	93.05gr	~10gr NaOH
200ml	46.53gr	~5gr NaOH

Αποστείρωση και διατήρηση σε θερμοκρασία δωματίου.

TBE 5x

	Tris	Boric acid	EDTA 0.5M
1000 ml	54gr	27.5 gr	20 ml
500 ml	27gr	13.75 gr	10 ml
200 ml	10.8gr	5.5 gr	4 ml

Διατήρηση σε θερμοκρασία δωματίου.

TBE 1x

1/5 αραιώση διαλύματος TBE 5x. Διατήρηση σε θερμοκρασία δωματίου.

PBSpH=7,4

	1000ml	500ml
NaCl 137mM	8gr	4gr
KCl 2,7mM	0,2gr	0,1gr
Na ₂ HPO ₄ 8,1mM	1,44gr	0,72gr
KH ₂ PO ₄ 1,5mM	0,2gr	0,1gr

Αποστείρωση και διατήρηση σε θερμοκρασία δωματίου

ΛAPH 100mM

15,5mg + 500μlPBS

Προετοιμασία του διαλύματος πριν από την πραγματοποίηση της αντίδρασης, διατηρείται στον πάγο.

Loadingbuffer

10ml 25mgBromophenolBlue
4grsucroseor 30% glycerol

Διατήρηση -20°C για μεγάλο χρονικό διάστημα

Ethidium Bromide 10mg/ml

10 ml 100mgEth. Br.

Διάλυμα φωτοευαίσθητο, διατήρηση για μεγάλο χρονικό διάστημα

Διαδικασία

- Προετοιμασία 0,8% gel αγαρόζης σε TBE 1x
- Προετοιμασία διαλυμάτων αντίδρασης

Τα συστατικά της αντίδρασης (10μl) είναι τα εξής:

PBS

DNA Bluescript plasmid 3,2μg

AAPH 2,5mM

Η αντίδραση πραγματοποιείται με την προσθήκη των υλικών με την σειρά που βρίσκονται στον Πίνακα 9.

Πίνακας9:Η διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες των αντιδραστηρίων

	PBS	extract - polyphenol	DNA plasmid	AAPH
Control	8μl	-	2μl	-
AAPH 2.5mM	4μl	-	2μl	4μl

Για κάθε εξεταζόμενη ουσία ή εκχύλισμα χρησιμοποιείται ένα αρνητικό control (3,2μg πλασμίδιο), ένα θετικό control (3,2μg πλασμίδιο + 40mMH₂O₂-UV) και ένα control της εξεταζόμενης ουσίας στην μεγαλύτερη συγκέντρωση.

- Προσθήκη των διαλυμάτων με την σειρά του πίνακα
- Ανάδευση (spin-vortex-spin)
- Επώαση στους 37°C για 45 λεπτά
- Προσθήκη 3μl loading buffer
- Ανάδευση (spin-vortex-spin)
- Ηλεκτροφόρηση 100V για 1h περίπου σε gel αγαρόζης 0,8%
- Χρώση με Βρωμιούχο Αιθίδιο (0,5μg/ml) για 30 λεπτά
- Πλύση με H₂O για 30 λεπτά
- Φωτογραφία
- Ποσοτικοποίηση

3.5.4 Πειραματική διαδικασία

Η πειραματική διαδικασία είναι η ίδια και για τα τρία δείγματα δηλαδή την καθαρή σκόνη συμπυκνώματος φύλλων ελιάς την ενθυλακωμένη 10% και την ενθυλακωμένη 20%.

Αρχικά προετοιμάζεται το gel αгарόζης περιεκτικότητας 0,8 %, με διάλυση 0,8 g αгарόζης σε 100 ml TBE 1x (10mM Tris-Cl, Boric Acid, 0,5M EDTA), και απόχυσή του στο καλούπι της συσκευής ηλεκτροφόρησης.

Στη συνέχεια γίνεται η προετοιμασία των δειγμάτων αντίδρασης σύμφωνα με το πρωτόκολλο ως εξής:

α) Για την καθαρή σκόνη χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις
2,5, 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640, 1280, 2500 µg/ml

β) Για την ενθυλακωμένη σκόνη 10% χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω συγκεντρώσεις:

39, 78, 156, 312, 625, 1250µg/ml

γ) Για την ενθυλακωμένη 20% χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω συγκεντρώσεις:

78, 156, 312, 625, 1250µg/ml.

Πίνακας 10: Ποσότητες αντιδραστηρίων για το δείγμα της καθαρής σκόνης.

	PBS	Αντιοξειδωτικός παράγοντας	DNA plasmid	AAPH
Control(-)	8μl	-	2μl	-
AAPH100mM	4 μl	-	2μl	4μl
Καθαρή σκόνη (2,5 μg/ml)	1μl	3μl	2μl	4μl
Καθαρή σκόνη (5 μg/ml)	1μl	3μl	2μl	4μl
Καθαρή σκόνη (10 μg/ml)	1 μl	3μl	2μl	4μl
Καθαρή σκόνη (20 μg/ml)	1μl	3μl	2μl	4μl
Καθαρή σκόνη (40 μg/ml)	1 μl	3μl	2μl	4μl
Καθαρή σκόνη (80μg/ml)	1 μl	3μl	2μl	4μl
Καθαρή σκόνη (160 μg/ml)	1 μl	3μl	2μl	4μl
Καθαρή σκόνη (320μg/ml)	1 μl	3μl	2μl	4μl
Καθαρή σκόνη (640μg/ml)	1 μl	3μl	2μl	4μl
Καθαρή σκόνη (1280 μg/ml)	1 μl	3μl	2μl	4μl
Καθαρή σκόνηstock (2,5 μg/ml)	5 μl	3μl	2μl	(-)

Πίνακας11: Ποσότητες αντιδραστηρίων για το δείγμα της σκόνης 10%

	PBS	Αντιοξειδωτικός παράγοντας	DNA plasmid	AAPH
Control(-)	8μl	-	2μl	-
AAPH100mM	4 μl	-	2μl	4μl
Σκόνη 10% (39 μg/ml)	1μl	3μl	2μl	4μl
Σκόνη 10% (78 μg/ml)	1μl	3μl	2μl	4μl
Σκόνη 10% (156μg/ml)	1 μl	3μl	2μl	4μl
Σκόνη 10% (312μg/ml)	1μl	3μl	2μl	4μl
Σκόνη 10% (625μg/ml)	1 μl	3μl	2μl	4μl
Σκόνη 10% (1250μg/ml)	1 μl	3μl	2μl	4μl
Σκόνη 10% stock (39μg/ml)	5 μl	3μl	2μl	(-)

Πίνακας 12: Ποσότητες αντιδραστηρίων για το δείγμα της σκόνης 20%

	PBS	Αντιοξειδωτικός παράγοντας	DNA plasmid	AAPH
Control(-)	8μl	-	2μl	-
AAPH100mM	4 μl	-	2μl	4μl
Σκόνη 20% (78μg/ml)	1μl	3μl	2μl	4μl
Σκόνη 20% (156μg/ml)	1μl	3μl	2μl	4μl
Σκόνη 20% (312μg/ml)	1 μl	3μl	2μl	4μl
Σκόνη 20% (625μg/ml)	1μl	3μl	2μl	4μl
Σκόνη 20% (1250μg/ml)	1 μl	3μl	2μl	4μl
Σκόνη 20% (2500μg/ml)	1 μl	3μl	2μl	4μl
Σκόνη 20% stock (78μg/ml)	5 μl	3μl	2μl	(-)

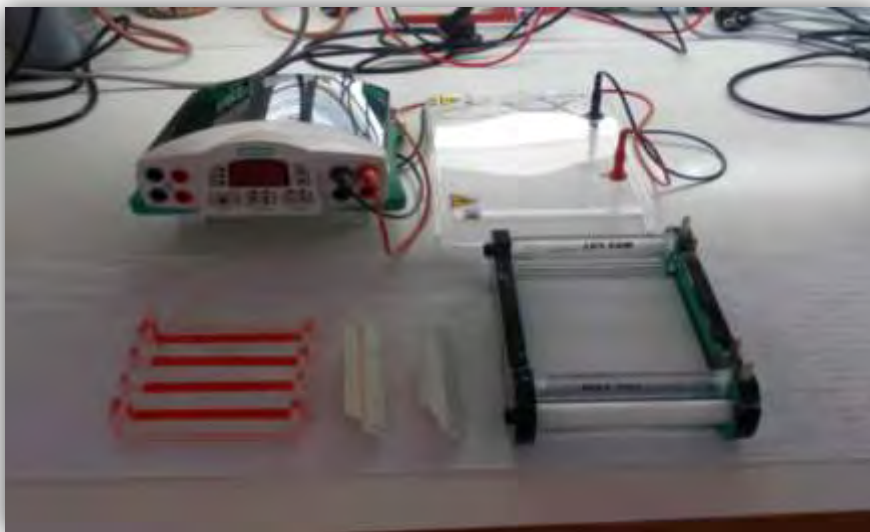
Κάθε δείγμα δοκιμάζεται και μόνο του μαζί με το πλασμιδιακό DNA στην μεγαλύτερη εξεταζόμενη συγκέντρωσή του για να παρατηρηθεί η πιθανή επίδραση του δείγματος στην υπερελικωμένη διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA.

Τα δείγματα τοποθετούνταν αφού πρώτα γίνει spinάδευση kaispin, στο σκοτάδι στους 37°C για 45 min. Μετά την επώαση, η αντίδραση τερματιζόταν με την προσθήκη 3 μl διαλύματος φόρτωσης (Loading Buffer - Χρωστική Bromophenol Blue 0.25% + 30% Glycerol) και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση (5V/cm) σε πηκτή (gel) αγαρόζης 0,8%w/v στα 100 V για 60 min. Χρησιμοποιήθηκαν οριζόντιες συσκευές ηλεκτροφόρησης Scie-Plas (M.B.) (Εικόνα 18) και το ρυθμιστικό διάλυμα ήταν TBE (10 mM Tris-HCl, 90 mM βορικό οξύ, 1mMEDTA, pH 8). Στη συνέχεια το gel βαφόταν σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (0,5μg/ml) για 30 min και ακολούθησε αποχρωματισμός του σε απιονισμένο νερό επίσης για 30 min. Οι

πηκτές μετά τον αποχρωματισμό τους τοποθετούνταν σε συσκευή εκπομπής UV και φωτογραφίζονταν με το σύστημα ανάλυσης εικόνας MultiImageLightCabinet της AlphaInnotech(Εικόνα 15). Στη συνέχεια με τη χρησιμοποίηση του λογισμικού AlphaView της AlphaInnotech έγινε ποσοτικοποίηση των ζωνών του DNA με βάση την οπτική τους πυκνότητα. Κάθε πείραμα γινόταν εις τριπλούν τουλάχιστον.



Εικόνα 14: Συσκευές ανάδευσης vortex και στροβιλισμού spin



Εικόνα 15: Συσκευές και διάταξη ηλεκτροφόρησης.



Εικόνα 16 : Σύστημα ανάλυσης εικόνας MultiImageLightCabinet της AlphaInnotech

3.5.5 Στατιστική ανάλυση

Η αναστολή της τοξικής δράσης των ριζών ROO[•], που παράγονται από την θερμική αποικοδόμηση του AAPH υπολογίστηκαν ως εξής:

$$\% \text{ αναστολή} = [(S_0 - S) / (S_{\text{control}} - S_0)] \cdot 100$$

Όπου:

S_{control} : το ποσοστό υπερελικωμένης μορφής πλασμιδίου στο αρνητικό control,

S_0 : το ποσοστό της υπερελικωμένης μορφής πλασμιδίου του θετικού control (DNA + 3 mM AAPH)

S : το ποσοστό της υπερελικωμένης μορφής του πλασμιδίου παρουσία του προς εξέταση αντιοξειδωτικού παράγοντα (εκχύλισμα) καθώς και του οξειδωτικού παράγοντα (15mM AAPH).

Από τα τρία ποσοστά αναστολής για κάθε εκχύλισμα βρέθηκε η μέση τιμή καθώς και το τυπικό σφάλμα (SE) για το καθένα. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του προγράμματος SPSS 18.0 και συγκεκριμένα μέσω ανάλυσης διακύμανσης δύο παραγόντων (ANOVA). Οι ζευγαρωτές συγκρίσεις έγιναν μέσω του test του Dunnet.

3.6 Επαγωγή θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες υδροξυλίου (OH•)

3.6.1 Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος εκτίμησης της προστατευτικής δράσης μιας ουσίας απέναντι στη δράση των ριζών OH• βασίζεται στη μέθοδο των Keum et al. (2000). Οι ρίζες OH• είναι από τις πιο ισχυρές δραστικές μορφές οξυγόνου, προσβάλλοντας τόσο το DNA όσο και τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια. Παρουσία UV ακτινοβολίας η ρίζα του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) έχει την ικανότητα να διασπάται οδηγώντας στην παραγωγή ριζών OH• (Αντίδραση 7).



Μία από τις επιδράσεις των ριζών OH• στο DNA είναι η πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων. Η δράση αυτή σε πλασμιδιακό DNA έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή της διαμόρφωσης του από υπερελικωμένο, σε ανοιχτό κυκλικό και γραμμικό. Έτσι η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης γίνεται μέσω της αναστολής της μετατροπής της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδίου στην ανοιχτή κυκλική ή γραμμική.

Η παρεμπόδιση της αλλαγής αυτής στην διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA από το εξεταζόμενο εκχύλισμα ή την περιεχόμενη δραστική ουσία αντικατοπτρίζει την προστατευτική δράση των μορίων αυτών απέναντι στην δράση των ριζών OH•.

Διαλύματα

EDTA 0.5M pH = 8.0

H₂O EDTA

Προσθήκη NaOH μέχρι pH = 8.0

1lt	186.1gr	~ 20gr NaOH
500ml	93.05gr	~ 10gr NaOH
250ml	46.53gr	~ 5gr NaOH

Αποστείρωση και διατήρηση σε θερμοκρασία δωματίου.

TBE 5x

	Tris	Boric acid	EDTA 0.5M
1000 ml	54gr	27.5 gr	20 ml
500 ml	27gr	13.75 gr	10 ml
200 ml	10.8gr	5.5 gr	4 ml

Διατήρηση σε θερμοκρασία δωματίου.

TBE 1x

1/5 αραιώση διαλύματος TBE 5x. Διατήρηση σε θερμοκρασία δωματίου.

Tris-HClEDTA [50mMTris-HCl 5mMEDTA (5x)]

Tris-HCl 1000mM

500ml 400mlH₂O + 60.5grTris

250ml 120mlH₂O + 15.12grTris

Προσθήκη HCl μέχρι pH = 8. Αποστείρωση και διατήρηση σε θερμοκρασία δωματίου.

H₂O₂ 40mM

20μl stock 30% + 860μlH₂O (φωτοευαίσθητο)

Προετοιμασία του διαλύματος πριν από την πραγματοποίηση της αντίδρασης. Το stock H₂O₂ είναι φωτοευαίσθητο, διατηρείται στον πάγο.

Loadingbuffer

10ml 25mg Bromophenol Blue

4gr sucrose or 30% glycerol

Διατήρηση -20°C για μεγάλο χρονικό διάστημα

Ethidium Bromide 10mg/ml

10 ml 100mg Eth. Br.

Το διάλυμα είναι φωτοευαίσθητο, διατήρηση για μεγάλο χρονικό διάστημα

Διαδικασία

- Προετοιμασία 0,8% gel αγαρόζης σε TBE 1x
- Προετοιμασία διαλυμάτων αντίδρασης

Τα συστατικά της αντίδρασης (10μl) είναι τα εξής:

10mM Tris-HCl – 1mM EDTA buffer (pH=8.0)

DNA Bluescript plasmid 3,2μg

H₂O₂ 40mM

Εξεταζόμενη ουσία ή εκχύλισμα σε διάφορες συγκεντρώσεις.

Η αντίδραση πραγματοποιείται με την προσθήκη των υλικών με την σειρά που βρίσκονται στον Πίνακα 13.

Πίνακας 13: Διαδοχική σειρά και προσθήκη αντιδραστηρίων

	Tris-HCl EDTA	H ₂ O	extract- polypheno 1	DNA plasmid	H ₂ O ₂	UV
Control	2μl	6μl	-	2μl	-	(-)
H ₂ O ₂ +UV	2μl	4μl	-	2μl	2μl	(+)

Για κάθε εξεταζόμενο δείγμα-ουσία χρησιμοποιείται ένα αρνητικό control (3,2μg πλασμίδιο), ένα θετικό control (3,2μg πλασμίδιο + 40mMH₂O₂-UV) και ένα control της εξεταζόμενης ουσίας στην μεγαλύτερη συγκέντρωση.

- Προσθήκη των διαλυμάτων με την σειρά του πίνακα
- Ανάδευση (spin-vortex-spin)

- Τοποθέτηση κάτω από λάμπα UV (300W Osram) σε απόσταση 52cm για 3 λεπτά ακριβώς
- Προσθήκη 3μl loading buffer
- Ανάδευση (spin-vortex-spin)
- Ηλεκτροφόρηση 70V για 1h περίπου σε gel αγαρόζης 0,8%
- Χρώση με Βρωμιούχο Αιθίδιο (0,5μg/ml) για 30 λεπτά
- Πλύση με H₂O για 30 λεπτά
- Φωτογραφία
- Ποσοτικοποίηση

Σημείωση

Κατά την πειραματική διαδικασία έγινε μια αλλαγή στο πρωτόκολλο όσο αφορά την συγκέντρωση του stock του H₂O₂

H₂O₂ 40mM

320μl stock 30% + 560μl H₂O (φωτοευαίσθητο)

Αυτή η συγκέντρωση χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα δείγματα

3.6.2 Πειραματική διαδικασία

Αρχικά προετοιμάζεται το gel αγαρόζης περιεκτικότητας 0,8 %, με διάλυση 0,8 g αγαρόζης σε 100 ml TBE 1x (10mM Tris-Cl, Boric Acid, 0,5M EDTA), και απόχυσή του στο καλούπι της συσκευής ηλεκτροφόρησης.

Εξετάστηκε η αντιμεταλλαξογόνος δράση των τριών δειγμάτων (καθαρής σκόνης, ενθυλακωμένης 10% και 20%)σε διαφορετικές συγκεντρώσεις σύμφωνα με τους παρακάτω πίνακες^{14,15,16}.

Αμέσως πριν από την πραγματοποίηση της αντίδρασης γίνεται η προετοιμασία του διαλύματος H₂O₂ συγκέντρωσης 40mM το οποίο είναι φωτοευαίσθητο, γι' αυτό και τυλίγεται με αλουμινόχαρτο, ενώ πριν την χρησιμοποίησή του διατηρείται στον πάγο.

Η αντίδραση πραγματοποιείται με την προσθήκη των υλικών με την σειρά που παρουσιάζεται.

Για το δείγμα 10% χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω συγκεντρώσεις.

ΠΙΝΑΚΑΣ 14: Δείγμα 10%

	Tris-HCl EDTA	H ₂ O	Αντιοξειδωτικός παράγοντας	DNA plasmid	H ₂ O ₂	UV
Control(-)	2 μl	7 μl	-	1μl	-	-
H ₂ O ₂ +UV (+)	2 μl	5 μl	-	1μl	2μl	+
Εκχ. (39 μg/ml)	2 μl	2 μl	3μl	1μl	2μl	+
Εκχ. (78 μg/ml)	2 μl	2 μl	3μl	1μl	2μl	+
Εκχ. (156 μg/ml)	2 μl	2 μl	3μl	1μl	2μl	+
Εκχ. (312 μg/ml)	2 μl	2 μl	3μl	1μl	2μl	+
Εκχ. (625 μg/ml)	2 μl	2 μl	3μl	1μl	2μl	+
Εκχ. (1250 μg/ml)	2 μl	2 μl	3μl	1μl	2μl	+

Για το δείγμα 20% χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω συγκεντρώσεις

ΠΙΝΑΚΑΣ 15: Δείγμα 20%

	Tris-HCl	H₂O	Αντιοξειδωτικός παράγοντας	DNA plasmid	H₂O₂	UV
Control(-)	2 μl	7 μl	-	1μl	-	-
H ₂ O ₂ +UV (+)	2 μl	5 μl	-	1μl	2μl	+
Εκχ. (78 μg/ml)	2 μl	2 μl	3μl	1μl	2μl	+
Εκχ. (156)	2 μl	2 μl	3μl	1μl	2μl	+
Εκχ. (312)	2 μl	2 μl	3μl	1μl	2μl	+
Εκχ. (382)	2 μl	2 μl	3μl	1μl	2μl	+
Εκχ. (625)	2 μl	2 μl	3μl	1μl	2μl	+
Εκχ. (1250)	2 μl	2 μl	3μl	1μl	2μl	+
Εκχ. (2500μg/	2 μl	4 μl	3μl	1μl	-	-

Για το δείγμα της καθαρής σκόνης χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω συγκεντρώσεις.

ΠΙΝΑΚΑΣ 16: Καθαρή σκόνη φύλλων ελιάς

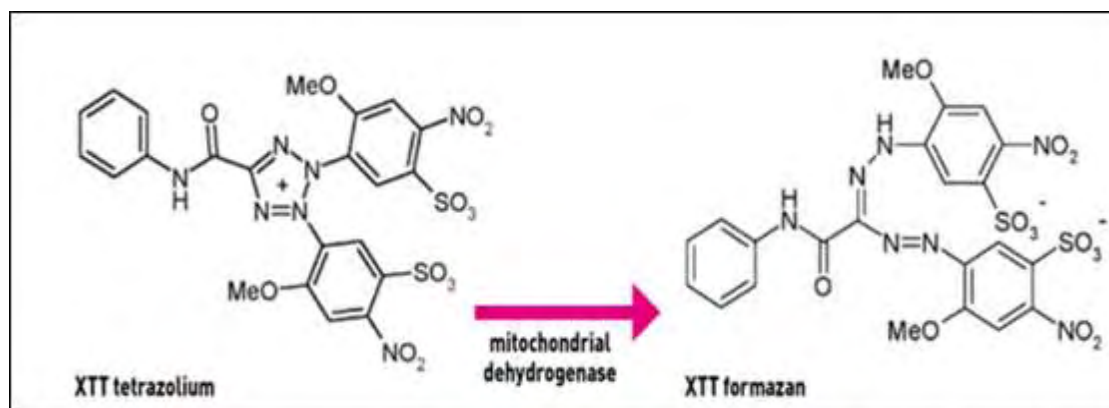
	Tris-HCl EDT A	H₂O	Αντιοξειδωτικός παράγοντας	DNA plasmid	H₂O₂	U V
Control(-)	2 μl	7 μl	-	1μl	-	-
H ₂ O ₂ +UV (+)	2 μl	5 μl	-	1μl	2μl	+
Εκχ. (2,5 μg/ml)	2 μl	2 μl	3μl	1μl	2μl	+
Εκχ. (5 μg/ml)	2 μl	2 μl	3μl	1μl	2μl	+
Εκχ. (10 μg/ml)	2 μl	2 μl	3μl	1μl	2μl	+
Εκχ. (20 μg/ml)	2 μl	2 μl	3μl	1μl	2μl	+
Εκχ. (40 μg/ml)	2 μl	2 μl	3μl	1μl	2μl	+
Εκχ. (80 μg/ml)	2 μl	2 μl	3μl	1μl	2μl	+
Εκχ. (160μg/ml)	2 μl	2 μl	3μl	1μl	2μl	+
Εκχ. (320μg/ml)	2 μl	4 μl	3μl	1μl	-	-
Εκχ. (640μg/ml)	2 μl	4 μl	3μl	1μl	-	-
Εκχ. (1280μg/ml)	2 μl	4 μl	3μl	1μl	-	-

3.7 Προσδιορισμός της κυτταροτοξικής δράσης της πρωτεΐνης με τη μέθοδο XTT

3.7.1. Αρχή μεθόδου

Για τον προσδιορισμό της επίδρασης της ενθυλακωμένης σκόνης 10% φύλλων ελιάς στα επιθηλιακά κύτταρα χρησιμοποιήθηκε το kit XTT assay της εταιρείας Roche. Η μέθοδος XTT αποτελεί μια χρωματομετρική δοκιμή για την μη ραδιενεργή ποσοτικοποίηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της βιωσιμότητας. Η μέθοδος

βασίζεται στον μεταβολισμό του τετραμωνιακού άλατος (XTT) από μιτοχονδριακές δεϋδρογονάσες κυττάρων στον μεταβολίτη φορμαζάνη. Η φορμαζάνη είναι υδατοδιαλυτή, έχει πορτοκαλί χρώμα και απορροφά στα 450-500 nm και έτσι μπορεί να προσδιοριστεί με φασματοφωτομέτρηση. Μείωση του αριθμού των ζώντων κυττάρων οδηγεί σε μειωμένο μεταβολισμό του τετραμωνιακού άλατος και συνεπώς σε μειωμένη απορρόφηση.



Εικόνα 17:Μεταβολισμός του XTT σε υδατοδιαλυτή φορμαζάνη από ζωντανά κύτταρα

3.7.2. Πειραματική διαδικασία

Μετά την αποκόλληση των κυττάρων με τρυψίνη 0,25% και την επαναιώρησή τους σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS, γινόταν μέτρησή τους με τη βοήθεια αντικειμενοφόρου πλάκας Neubauer. Στη συνέχεια, προστίθεται 5000 κύτταρα/θέση σε ένα «πιάτο» με 96 θέσεις (96-wellplate). Στα κύτταρα προστίθεται θρεπτικό υλικό με 10% FBS (Fetal Bovine Saline) και ακολουθούσε επώαση για 24 ώρες στους 37⁰C και σε 5% CO₂ προκειμένου να προσκολληθούν στον πάτο του ειδικού «πιάτου» καλλιέργειας. Μετά το πέρας της επώασης το θρεπτικό υλικό αφαιρούνταν και ακολουθούσε προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων της ενθυλακωμένης σκόνης σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS (ώστε να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των συστατικών του FBS με την ενθυλακωμένη σκόνη) συνολικού όγκου 100 μl. Τα κύτταρα στα οποία είχαμε προσθέσει τις διαφορετικές συγκεντρώσεις της σκόνης, επώαζονταν για 24 ώρες. Μετά την επώαση προστίθεται 50 μl από το αντιδραστήριο XTT σε κάθε θέση του 96-wellplate και ακολουθούσε επώαση για 4 ώρες. Αξίζει να σημειωθεί ότι το αντιδραστήριο XTT πρέπει να έχει αναλογία 50:1 μεταξύ των αντιδραστηρίων A και B από τα οποία αποτελείται το kit. Η προετοιμασία του αντιδραστηρίου, προκειμένου να υπάρχει η επιθυμητή αναλογία μεταξύ των A και B, γίνεται πάντα

πριν τη χρησιμοποίησή του. Σε κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκαν και δείγματα ως αρνητικοί μάρτυρες, τα οποία περιείχαν μόνο κύτταρα και όχι XTT reagent. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν και δείγματα μάρτυρες που περιείχαν το ενθυλακωμένο εκχύλισμα και XTT, χωρίς όμως να περιέχουν και κύτταρα, προκειμένου να παρατηρηθεί αν η συγκέντρωση της ενθυλακωμένης σκόνης φύλλων ελιάς επηρεάζει την τιμή της απορρόφησης. Μετά την τετράωρη επώαση προσδιορίζεται η απορρόφηση στα 450 nm με φασματοφωτόμετρο ELISA platereader (Biotek) και τη χρήση του λογισμικού Gen5 (Biotek). Η εξέταση της σκόνης έγινε σε δυο διαφορετικά πειράματα και στο κάθε πείραμα η κάθε συγκέντρωση εξεταζόταν σε τριπλά δείγματα. Η % αναστολή της σκόνης στην κυτταρική αύξηση των επιθηλιακών κυττάρων υπολογίστηκε από τον τύπο:

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



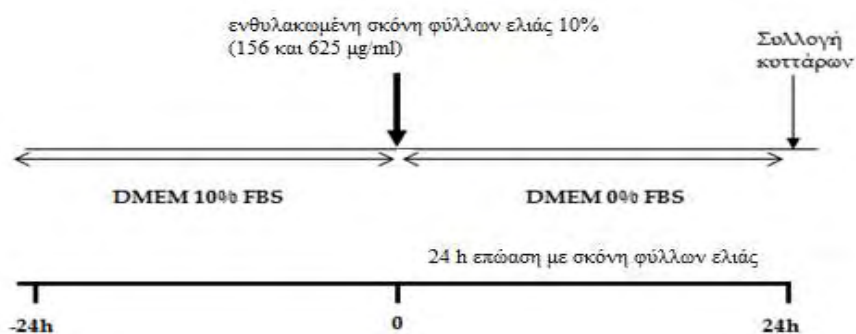
Εικόνα 18: α) αντικειμενοφόρος πλάκα Neubauer
β) 96-wellplate

3.8 Μελέτη της επίδρασης του ενθυλακωμένου εκχυλίσματος 10% στα επίπεδα της γλουταθειόνης, των ελευθέρων ριζών και των TBARS

Ο πειραματικός σχεδιασμός παρουσιάζεται στην Εικόνα 22. Τα κύτταρα επωάζονται σε 25cm² φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων με θρεπτικό υλικό DMEM (5 ml) το οποίο είναι εμπλουτισμένο με 10% FBS για 24 h. Στη συνέχεια γίνεται αφαίρεση του θρεπτικού μέσου και προστίθεται θρεπτικό υλικό DMEM απουσία ορού FBS. Στις φλάσκες που αποτελούσαν το μάρτυρα προστίθεται μόνο θρεπτικό υλικό απουσία ορού FBS (5 mL) ενώ στις φλάσκες των δειγμάτων προστίθεται και η ενθυλακωμένη σκόνη 10% (500 μL) στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις (156,

625mg/mL). Τα κύτταρα επωάζονται μετά την προσθήκη του δείγματος για 24 h. Στις φλάσκες που αποτελούσαν το μάρτυρα προστίθεται μόνο θρεπτικό απουσία ορού FBS.

Ακολουθεί αποκόλληση των κυττάρων με τρυψίνη 0,25%, επαναιώρηση σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS (2 ml) και φυγοκέντρηση στα 300g, στους 4°C για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και ακολουθεί πλύση των κυττάρων με 2 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών PBS (0,01 M με pH 7,4) και φυγοκέντρηση στα 300g, στους 4°C για 10 λεπτά. Στη συνέχεια απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναιωρείται σε 2 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών PBS (0,01 M με pH 7,4). Ακολούθησε ο προσδιορισμός των ελευθέρων ριζών και της γλουταθειόνης με κυτταρομετρία ροής και των επιπέδων TBARS φασματοφωτομετρικά αφού προηγήθηκε προσδιορισμός της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα μέσω του αντιδραστηρίου Bradford.



Εικόνα 19: Πειραματικός σχεδιασμός για την μελέτη της επίδρασης της ενθυλακωμένη σκόνη 10% στη γλουταθειόνη, τις ελεύθερες ρίζες, P.C., και τα TBARS στα κύτταρα. Τα κύτταρα επωάζονται για 24 h σε θρεπτικό υλικό DMEM εμπλουτισμένο με 10% σε ορό FBS. Το φαρδύ βέλος συμβολίζει την αλλαγή υλικού σε DMEM απουσία ορού FBS. Το λεπτό βέλος συμβολίζει την ολοκλήρωση των πειραμάτων και τη συλλογή των κυττάρων.

3.9 Μελέτη της επίδρασης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων

3.9.1. Αρχή μεθόδου

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

Πιο αναλυτικά, 200 μ l 20% TCA προστίθενται σε 200 μ l κυτταροπλασματικού αιωρήματος (κάθε δείγμα έχει το τυφλό του), τα δείγματα επωάζονται στον πάγο για 15 min και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 15000 g για 5 min στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και προστίθενται 500 μ L DNPH 10 mM (διαλυμένο σε 2,5N HCL) για τα δείγματα ή 500 μ L 2,5N HCL για τα τυφλά. Ακολουθεί επώαση των δειγμάτων για 1 h στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου με ενδιάμεση ανάδευση κάθε 15 min και στο τέλος φυγοκέντρηση στα 15000 g για 5 min στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και προστίθενται 1 ml 10% TCA. Ακολουθεί ανάδευση και φυγοκέντρηση στα 15000 g για 5 min στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και προστίθεται 1 ml μίγματος αιθανόλης-οξικού αιθυλεστέρα (1:1 v/v) ενώ γίνεται φυγοκέντρηση στα 15000 g για 5 min στους 4°C. Το συγκεκριμένο βήμα επαναλαμβάνεται δύο ακόμη φορές. Στο τέλος προστίθενται 1 ml 5M ουρίας (pH 2.3) και τα δείγματα επωάζονται στους 37°C για 15 min. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 15000 g για 3 min στους 4°C και μετριέται η απορρόφηση στα 375nm.

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

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

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

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

$\epsilon 375\text{DNPH}$ (nmol/ml): 0,022 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPΗ

Τιμή 5: Ο συντελεστής αραίωσης του αιωρήματος Ντελ.αντίδρασης/ μl πλάσματος [1000 μl /200 μl]).

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

3.9.2 Πειραματική διαδικασία υπολογισμού των επιπέδων CARB με φασματοφωτομετρία

Για τον προσδιορισμό των επιπέδων των πρωτεϊκών καρβονυλίων, τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε PBS σε αναλογία 1×10^6 κύτταρα / ml και στη συνέχεια λύθηκαν με υπερήχους. Μια τροποποιημένη μέθοδος όπως περιγράφεται στην μελέτη του Patsoukis και συν., (2004) χρησιμοποιήθηκε όπως περιγράφηκε προηγουμένως.

Οι συγκεντρώσεις της ενθυλακωμένης σκόνης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 156 και 625μg/ml.

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης πρωτεΐνης καρβονυλίου βασίστηκε στη μοριακή απορρόφηση συντελεστή του DNPΗ. Η δοκιμασία απαιτεί απόλυτη ποσότητα πρωτεΐνης άνω των 30 μg στο εξεταζόμενο δείγμα. Η συνολική συγκέντρωση των πρωτεϊνών του πλάσματος αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία Bradford. Κάθε πείραμα επαναλήφθηκε τουλάχιστον 3 φορές.

3.9.3 Στατιστική ανάλυση

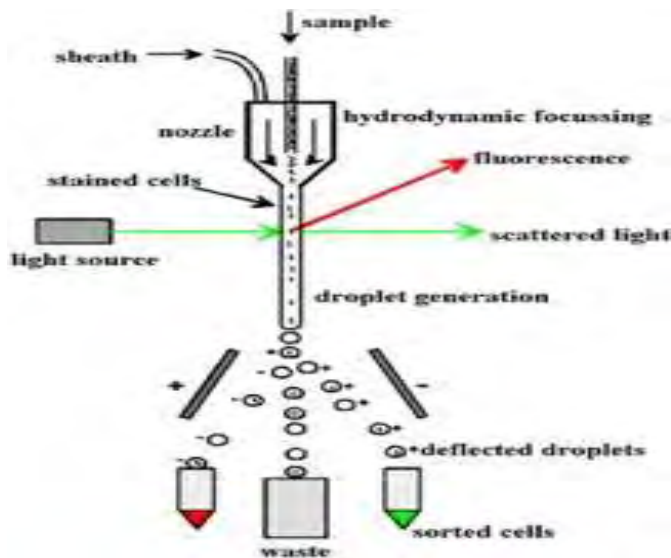
Τα δεδομένα αναλύθηκαν με μονόδρομη ανάλυση ANOVA που ακολουθείται από δοκιμή του Tukey για πολλαπλές συγκρίσεις κατά ζεύγη. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο $p < 0,05$. Για όλες τις στατιστικές αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό SPSS, έκδοση 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσο \pm το SEM.

4.Κυτταρομετρία Ροής

4.1.Αρχή Μεθόδου

Η κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry, FC) είναι μια τεχνική αυτοματοποιημένης κυτταρικής ανάλυσης που επιτρέπει τη μέτρηση μεμονωμένων σωματιδίων (κυττάρων, πυρήνων, χρωμοσωμάτων κ.λπ.) καθώς διέρχονται σε νηματική ροή από ένα σταθερό σημείο όπου προσπίπτει μία δέσμη φωτός. Τα πλεονεκτήματα της FC στηρίζονται κυρίως στη δυνατότητα να αναλύει με μεγάλη ταχύτητα, ακόμη και σε μικρά δείγματα, ταυτοχρόνως πολλαπλά φυσικά ή/ και χημικά χαρακτηριστικά του. Ένα άλλο χαρακτηριστικό πλεονέκτημα που δεν το έχει άλλη μέθοδος είναι ότι προσφέρει τη δυνατότητα της πολυπαραμετρικής ανάλυσης του δείγματος συμπεριλαμβανομένου και της θέσης του κυτταρικού κύκλου στην οποία βρίσκονται. Η δέσμη φωτός (συνήθως δέσμη λέιζερ) ενός μεμονωμένου μήκους κύματος κατευθύνεται διαμέσου μιας υδροδυναμικά συγκλίνουσας ροής υγρού, η οποία προσπίπτει επάνω στα κύτταρα, καθώς ρέουν υδροδυναμικά εστιασμένα το ένα μετά το άλλο. Ένας αριθμός ανιχνευτών περιβάλλουν το σημείο όπου η δέσμη του φωτός διαπερνάει τη ροή του υγρού: ένας σε ευθυγράμμιση με τη δέσμη φωτός, κάποιοι άλλοι κάθετοι σε αυτήν και ένας ή περισσότεροι ανιχνευτές φθορισμού. Κάθε σωματίδιο μεταξύ 0,2 και 150 μικρομέτρων αιωρούμενο στο υγρό που περνά διαμέσου της δέσμης σκεδάζει το φως προς κάποια κατεύθυνση και παράλληλα τα φθορίζοντα χημικά που βρίσκονται στο σωματίδιο ή επί της επιφάνειάς του μπορούν να διεγερθούν και να εκπέμψουν φως άλλου μήκους κύματος από αυτό της πηγής. Αυτός ο συνδυασμός σκεδασμένου και φθορίζοντος φωτός παραλαμβάνεται από τους ανιχνευτές και μετά από αναλύσεις είναι δυνατή η αποκόμιση πληροφοριών σχετικών με τη φυσική και χημική δομή κάθε μεμονωμένου σωματιδίου. Η εμπρόσθια σκέδαση "FSC" (εκ του Forward Scattering) σχετίζεται με τον όγκο του κυττάρου και η πλάγια σκέδαση "SSC" (εκ του Side Scattering) εξαρτάται από την εσωτερική πολυπλοκότητα του σωματιδίου (π.χ., σχήμα του πυρήνα, αριθμός κυτταροπλασματικών σωματιδίων ή αδρότητα κυτταρικής μεμβράνης). Κάποιες συσκευές κυτταρομετρίας ροής δεν περιλαμβάνουν τους ανιχνευτές φθορισμού και χρησιμοποιούν μόνο τη σκέδαση του φωτός για τις μετρήσεις. Άλλες, παράγουν απεικονίσεις του φθορισμού, της σκέδασης και της έντασης του φωτός για κάθε κύτταρο.



Εικόνα 20: Υδροδυναμική εστίαση του δείγματος μέσα από το θάλαμο ροής.

Στην κυτταρομετρία ροής το υπό εξέταση υλικό, το οποίο πρέπει να είναι υπό μορφή εναιωρήματος (αίμα, μυελός των οστών ή άλλο παρασκευασθέν εναιώρημα κυττάρων από ιστούς), υπόκειται σε επεξεργασία με ειδικά κατά περίπτωση μονοκλωνικά αντισώματα συζευγμένα με φθορίζουσες ουσίες ή με φθορίζουσες χρωστικές ανάλογες προς τη χημική παράμετρο που αναζητείται. Στη συνέχεια ένα ένα τα κύτταρα υπό την επίδραση ρυθμίσεων υδροδυναμικής εστίασης έρχονται σε επαφή με δύο έως τέσσερις ακτίνες laser διαφορετικού μήκους κύματος εκπεμπόμενης ακτινοβολίας και κατάλληλου για τη διέγερση των φθοριοχρωμάτων. Διάφοροι ειδικά διατεταγμένοι ανιχνευτές (έως και 18 βολταϊκές φωτοδιόδοι) μετρούν την ένταση του σκεδαζόμενου φωτός που προκύπτει από τη διάχυση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας μετά την πρόσκρουση της με τα κύτταρα προς όλες τις κατευθύνσεις στο χώρο. Λαμβάνονται κυρίως 4 φωτεινά σήματα: το απευθείας σκεδαζόμενο φως (FSC), το υπό ορθή γωνία σκεδαζόμενο φως (SSC), ο παραγόμενος φθορισμός και η απορρόφηση μέρους της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Ο συνδυασμός αυτών των φωτεινών σημάτων παράγει ένα ρεύμα παλμού που ενισχύεται και εκφράζεται σαν μία σειρά εξειδικευμένων παλμών, τα αναλογικά σήματα, τα οποία στη συνέχεια μετατρέπονται σε ψηφιακά με τους μετατροπείς αναλογικού σήματος σε ψηφιακό (ADC system). Τα σήματα αυτά καταχωρούνται, ταξινομούνται, δημιουργούνται οι κατανομές συχνότητας των υπό διερεύνηση κυτταρικών παραμέτρων και αναλύονται με την χρήση ειδικών προγραμμάτων ηλεκτρονικών υπολογιστών. Με αυτόν τον τρόπο μπορούν να

εξετασθούν δεκάδες κυτταρικές παράμετροι μεγάλου αριθμού κυττάρων σε μικρό χρονικό διάστημα (>1000 κύτταρα/δευτερόλεπτο). Εκτός από τη μελέτη των διαφόρων κυτταρικών χαρακτηριστικών, η τεχνική της κυτταρομετρίας ροής είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί και για διαλογή κυττάρων (cell sorting). Καθώς τα κύτταρα/σωματίδια του εναιωρήματος περνούν από την πηγή φωτός, δύναται εκλεκτικά να φορτισθούν και έτσι κατά την έξοδο τους διαχωρίζονται ανάλογα με το φορτίο τους, συλλέγοντας με αυτό τον τρόπο καθαρούς κυτταρικούς πληθυσμούς από το αρχικό μείγμα, με μεγάλη ταχύτητα και ακρίβεια.



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

4.2 Προσδιορισμός της γλουταθειόνης και των ελευθέρων ριζών με κυτταρομετρία ροής (flowcytometry)

4.2.1 Πειραματική διαδικασία

Μετά τη συλλογή των δειγμάτων ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 300g, στους 5°C για 10 λεπτά. Στη συνέχεια απομακρύνεται το υπερκείμενο και προστίθεται 150 μ LPBS και 15 μ L χρωστικής mercuryorange. Ακολουθεί επώαση για 30 λεπτά στους 37°C και σε 5% CO₂. Έπειτα, ξεπλένουμε με 250 μ LPBS και φυγοκεντρούμε στα 300g, στους 5°C για 10 λεπτά. Απομακρύνεται το υπερκείμενο, προστίθεται 250 μ LPBS και προχωράμε στην ανάλυση.

4.3 Προσδιορισμός επιπέδων ROS μέσω κυτταρομετρίας ροής

4.3.1 Αρχή μεθόδου

Για τον προσδιορισμό του συνολικού επιπέδου των ROS στα κύτταρα με κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιούμε τη χρωστική 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA). Η DCFDA μετά την είσοδό της στα κύτταρα από-ακετυλιώνεται από κυτταρικές εστεράσες σε ένα μη φθορίζον προϊόν το οποίο οξειδώνεται από τις ROS σε 2,7-dichlorofluorescein (DCF). Η DCF είναι μια φθορίζουσα χρωστική (excitation 495nm, emission 529nm) που μπορεί να προσδιοριστεί με κυτταρομετρία ροής. Άρα, από τα επίπεδα της DCF υπολογίζονται τα επίπεδα των ROS: όσο μεγαλύτερη η τιμή της DCF, τόσο περισσότερες οι ROS.

4.3.2 Πειραματική διαδικασία

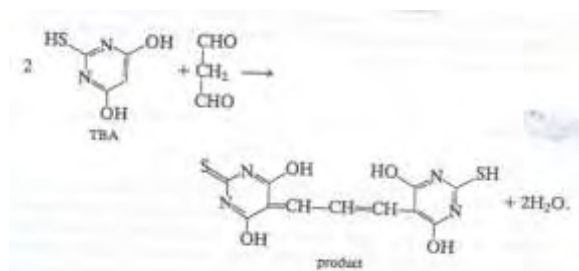
Με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής προσδιορίστηκαν επίσης τα επίπεδα ελευθέρων ριζών (ROS) στα επιθηλιακά κύτταρα έπειτα από επώαση με ενθυλακωμένη σκόνης φύλλων ελιάς 10% σε συγκεντρώσεις 156 και 625 $\mu\text{g/ml}$ για 24 ώρες. Μετά τη συλλογή των δειγμάτων ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 300g, στους 5°C για 10 λεπτά. Στη συνέχεια απομακρύνεται το υπερκείμενο και προστίθεται 150 μLPBS και 15 μL χρωστικής DCFDA. Ακολουθεί επώαση για 30 λεπτά στους 37°C και σε 5% CO_2 . Έπειτα, ξεπλύνουμε με 250 μLPBS και φυγοκεντρούμε στα 300g, στους 5°C για 10 λεπτά. Απομακρύνεται το υπερκείμενο, προστίθεται 250 μLPBS και προχωράμε στην ανάλυση. Προσδιορίστηκαν επίσης, τα επίπεδα ROS των κυττάρων υπό φυσιολογικές συνθήκες (control). Το πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων.

4.4 Προσδιορισμός του δείκτη λιπιδικής υπεροξειδωσης (TBARS)

4.4.1 Αρχή μεθόδου

Το οξειδωτικό στρες στο κυτταρικό περιβάλλον έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ασταθών υπεροξειδίων των λιπιδίων από τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Προϊόν της διάσπασης αυτών των ασταθών μορίων είναι η μηλονική διαλδεύδη (MDA). Η μηλονική διαλδεύδη μπορεί να προσδιοριστεί μέσω της αντίδρασής της με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA). Έτσι, τα TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances) εκφράζονται σαν ισοδύναμα της μηλονικής

διαλδεΐδης., η οποία σχηματίζει μία ένωση με το θειοβαρβιτουρικό οξύ με αναλογία 1/2 αντίστοιχα.



Εικόνα 22: Αντίδραση του TBA με την MDA

Η μέτρηση της μηλονικής διαλδεΐδης είναι μία φωτομετρική μέθοδος για τον προσδιορισμό του βαθμού υπεροξειδωσής των λιπιδίων. Για τον προσδιορισμό των TBARS χρησιμοποιήθηκε μια ελαφρά τροποποιημένη μέθοδος του Kelesetal., (2001).

4.4.2 Πειραματική διαδικασία

Τετρακόσια μL κυτταρικού αιωρήματος (80-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ πρωτεΐνη) για τα δείγματα ή 400 μl απεσταγμένο νερό για το τυφλό προστέθηκαν σε 500 μL TCA 35% και 500 μL Tris-HCL (200mM, pH 7.4) και ακολούθησε επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, προστέθηκε 1ml Na_2SO_4 (2M)-TBA (55mM) και τα δείγματα επώαστηκαν στους 95 $^\circ\text{C}$ για 45 λεπτά. Ακολούθησε μεταφορά των δειγμάτων στον πάγο για 5 λεπτά και έπειτα αφού προστέθηκε 1 mL TCA 70% τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 15000g για 3 λεπτά και η απορρόφηση του υπερκείμενου μετρήθηκε στα 530nm. Τα δείγματα χωρίς το κυτταρικό αιώρημα αποτελούσαν το τυφλό και ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου γίνεται με αέρα. Κάθε δείγμα εξετάζεται εις τριπλούν. Η μέτρηση απαιτεί >30 μg απόλυτη ποσότητα πρωτεΐνης.

4.4.3 Υπολογισμοί

Οι υπολογισμοί γίνονται με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$\text{TBARS (nmol / mg πρωτεΐνης)} = [(A_{\delta} - A_0) / 0,156] \times 7,5 / C_{\delta}$$

A_{δ} : Η μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος.

A_0 : Η μέση τιμή της απορρόφησης του τυφλού.

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

Τιμή 7,5: Ο συντελεστής αραιώσης του αιωρήματος ($V_{\text{τελ.αντιδρασης}}/\mu\text{L}$ αιωρήματος [3000 μL /400 μL]).

C_{δ} : Η συγκέντρωση mg/mL της πρωτεΐνης που προσδιορίστηκε μέσω του αντιδραστηρίου Bradford.

4.5 Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford

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

Για την πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις διαλύματος αλβουμίνης 10 mg/mL ώστε να προκύψουν διαλύματα συγκεντρώσεις 50, 100, 200, 400, 800, 1000 και 1400 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης 20 μL διαλύματος αλβουμίνης με τις παραπάνω συγκεντρώσεις προστέθηκε σε 1 mL διαλύματος αντιδραστηρίου Bradford. Τα δείγματα ανακινούνται απαλά και επωάζονται για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να σταθεροποιηθεί το χρώμα. Ακολουθεί μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 595 nm. Ως τυφλό χρησιμοποιείται διάλυμα που περιέχει 20 μL H_2O και 1 mL διαλύματος αντιδραστηρίου Bradford. Οι συγκεντρώσεις αλβουμίνης 50-1400 αντιστοιχούν στο γραμμικό τμήμα της καμπύλης.

Με βάση τις τιμές της οπτικής απορρόφησης στα 595 nm που αντιστοιχούσαν στις συγκεντρώσεις της αλβουμίνης κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη. Για τον προσδιορισμό της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης των δειγμάτων 20 μL προστίθενται κάθε φορά σε 1 mL διαλύματος αντιδραστηρίου Bradford. Ακολουθεί αντιστοίχιση της τιμής οπτικής απορρόφησης με την συγκέντρωση αλβουμίνης από την πρότυπη καμπύλη.

4.5.1 Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν μέσω της ανάλυσης διακύμανσης ενός παράγοντα, 1-wayANOVA. Οι ζευγαρωτές συγκρίσεις έγιναν μέσω ανάλυσης του τεστ του Tukey. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο $P < 0.05$. Για όλες τις στατιστικές αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα SPSS, version 13.0 (SPSS Inc., Chicago, Ill.). Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως $\text{mean} \pm \text{SEM}$.

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1 Στοιχεία Χημικής Ανάλυσης της καθαρής σκόνης εκχυλίσματος φύλλων ελιάς.

Πραγματοποιήθηκε χημική ανάλυση του καθαρού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς με τη μέθοδο HPLC. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα 17:

Πίνακας 17: Χημική ανάλυση με HPLC

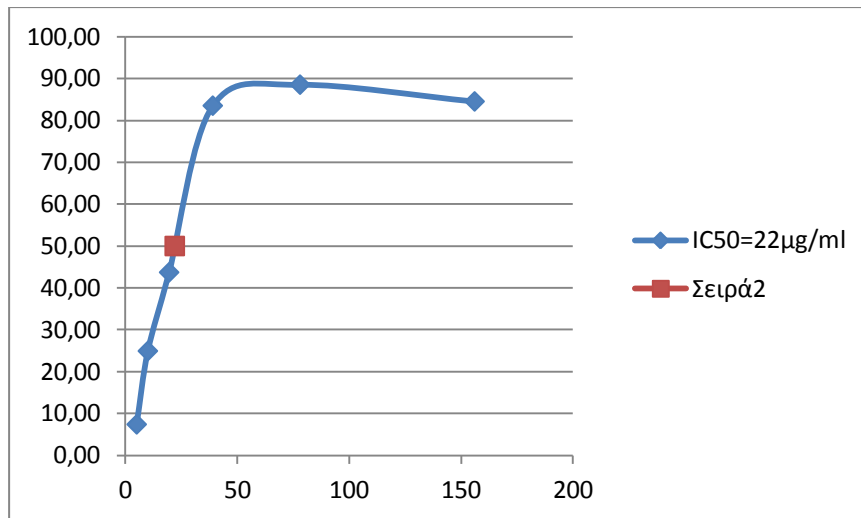
HPLC	mg/kg
Total Polyphenols	25910
Hydroxy-tyrosol (3,4 DHPEA)	902
Tyrosol (p, HPEA)	134
Dialdehydic form of decarboxymethyl oleuropein aglycon (3,4 DHPEH-EDA)	715
Dialdehydic form of decarboxymethyl ligstroside aglycon (p, HPEA-EDA)	419
Lignans	1433
Oleuropein aglycon (3,4 DHPEA-EA)	87
Ligstroside aglycon (p, HPEA-EA)	111

5.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων από φύλλα ελιάς μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH .

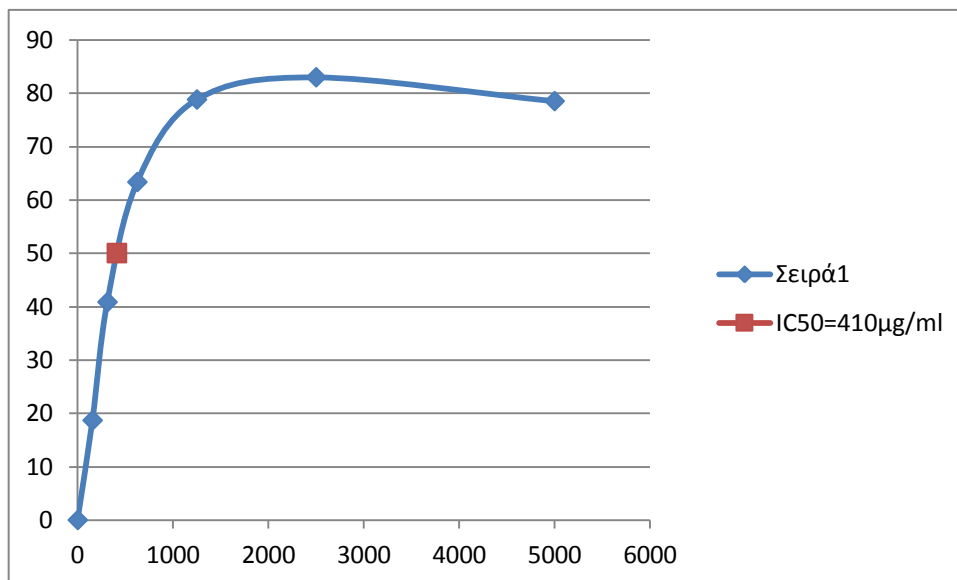
Συνολικά μελετήθηκαν 3 εκχυλίσματα από φύλλα ελιάς και εξετάστηκε η αντιοξειδωτική τους δράση σε 6 συγκεντρώσεις διαφορετικές για το κάθε εκχύλισμα. Για το ενθυλακωμένο εκχύλισμα 10% και 20% από 156, 312, 625, 1250, 2500, 5000μg/ml ενώ για το καθαρό εκχύλισμα από 5, 10, 20, 40, 80, 156μg/ml. Τα εκχυλίσματα μείωσαν δοσοεξαρτώμενα την απορρόφηση του διαλύματος DPPH στα 517nm γεγονός που δείχνει σημαντική ικανότητα αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH', δηλαδή αντιοξειδωτική ικανότητα. Οι τιμές IC₅₀ όλων των εκχυλισμάτων φαίνονται στο γράφημα 5.1 και είναι ενδεικτικές της αντιοξειδωτικής ικανότητας τους: όσο μικρότερη είναι η τιμή IC₅₀ τόσο μεγαλύτερη η αντιοξειδωτική ικανότητα του

εκχυλίσματος. Οι τιμές των IC_{50} κυμαίνονται από 22 μ g/ml έως 430 μ g/ml (Γράφημα 5.1).

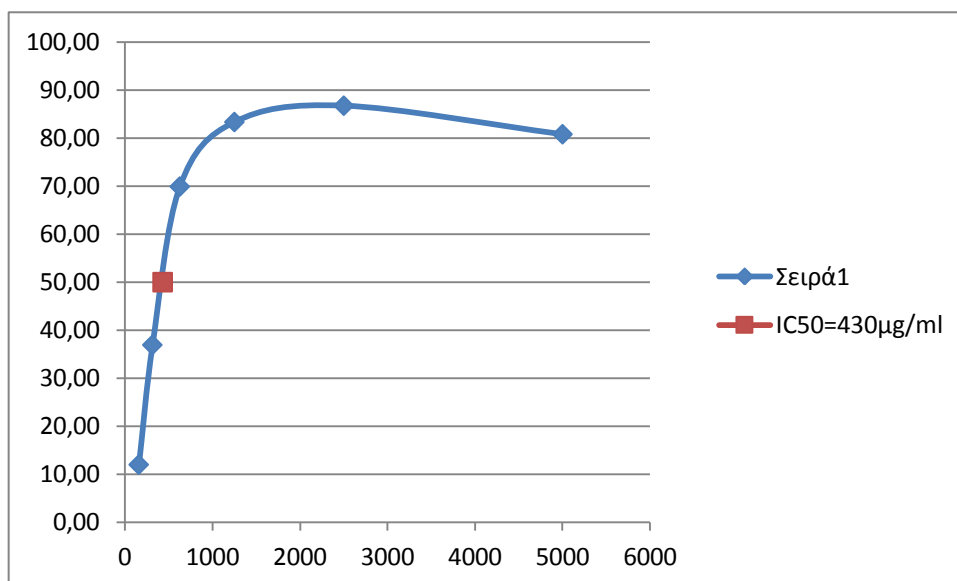
Το πιο ισχυρό ήταν το καθαρό εκχύλισμα φύλλων ελιάς με $IC_{50}=22\mu$ g/ml (Διάγραμμα 5.1.1) το δεύτερο ήταν το ενθυλακωμένο 10% με $IC_{50}=410\mu$ g/ml (Διάγραμμα 5.1.2) και τέλος τρίτο το ενθυλακωμένο εκχύλισμα 20% με $IC_{50}=430\mu$ g/ml (Διάγραμμα 5.1.3).



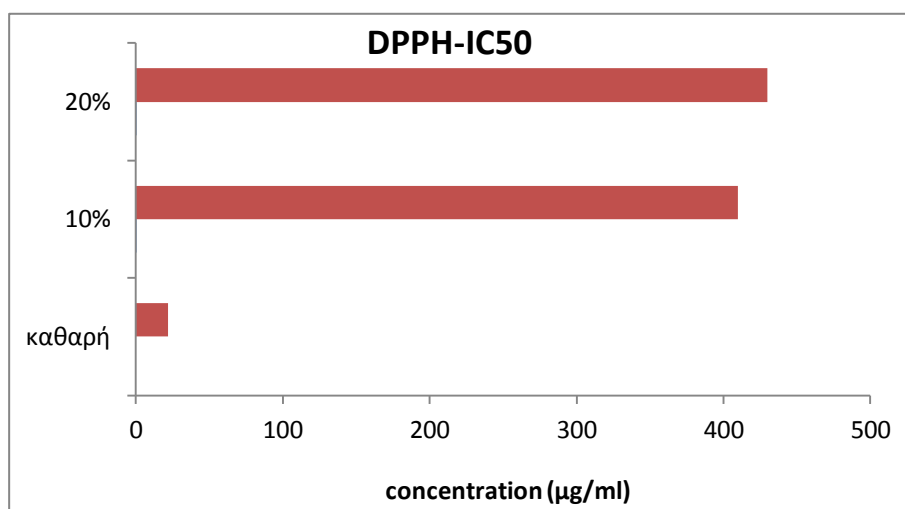
Διάγραμμα 5.1.1 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DRPH από το καθαρό εκχύλισμα φύλλων ελιάς.



Διάγραμμα 5.1.2 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DRPH από το 10% εκχύλισμα φύλλων ελιάς.



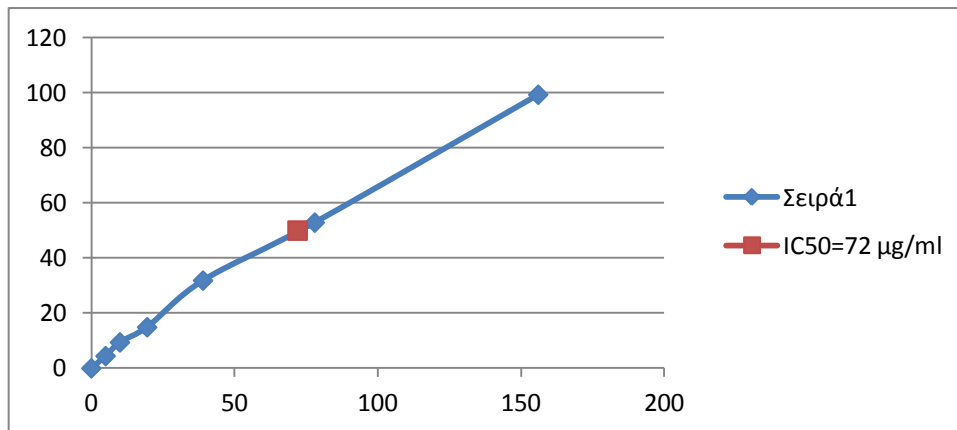
Διάγραμμα 5.1.3 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το 20% εκχύλισμα φύλλων ελιάς.



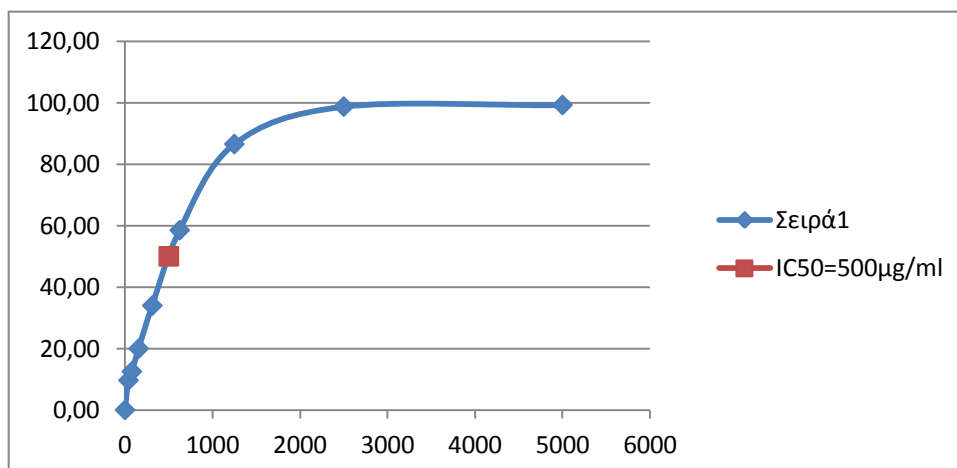
Γραφημα 5.1: Απεικονίζονται οι τιμές IC50 των εκχυλισμάτων από φύλλα ελιάς με την αλληλεπίδραση της ρίζας DPPH.

5.3 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων από φύλλα ελιάς μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS⁺ .

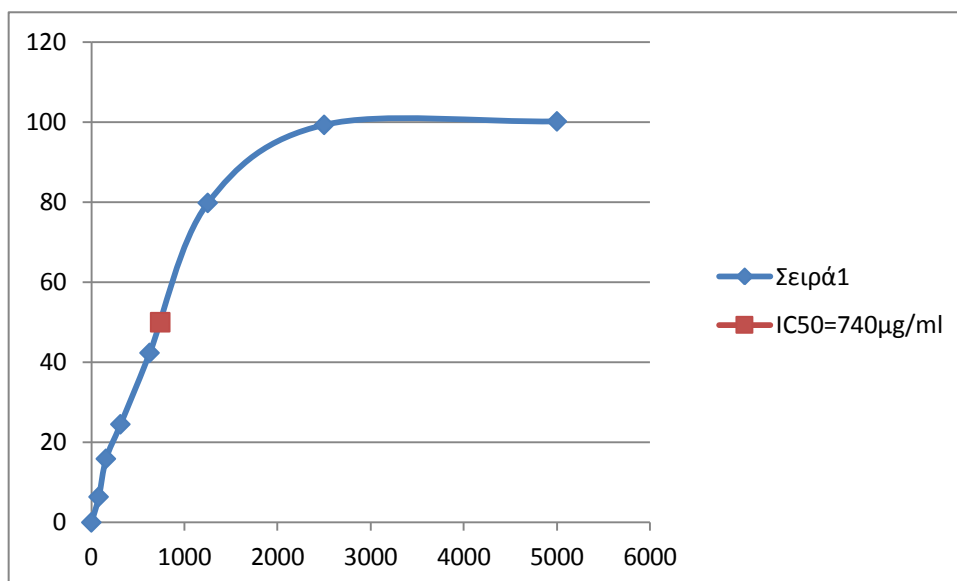
Συνολικά μελετήθηκαν 3 εκχυλίσματα από φύλλα ελιάς και εξετάστηκε η αντιοξειδωτική τους δράση σε συγκεντρώσεις διαφορετικές για το κάθε εκχύλισμα. Για το ενθυλακωμένο εκχύλισμα 10% εξετάστηκαν οι συγκεντρώσεις 39, 78, 156, 312, 625, 1250, 2500, 5000μg/ml για το ενθυλακωμένο εκχύλισμα 20% από 78, 156, 312, 625, 1250, 2500, 5000μg/ml ενώ για το καθαρό εκχύλισμα από 5, 10, 20, 40, 80, 156μg/ml. Τα περισσότερα εκχυλίσματα παρουσίασαν σημαντική ικανότητα αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS⁺. Οι τιμές IC₅₀ όλων των εκχυλισμάτων φαίνονται στο γράφημα 5.2 και είναι ενδεικτικές της αντιοξειδωτικής ικανότητας τους: όσο μικρότερη είναι η τιμή IC₅₀ τόσο μεγαλύτερη η αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος. Τα εκχυλίσματα που ήταν ενθυλακωμένα στη μαλτοδεξτρίνη ήταν λιγότερο ισχυρά από το εκχύλισμα που δεν ήταν ενθυλακωμένο και ήταν σε καθαρή μορφή παρουσιάζοντας αντιοξειδωτική ικανότητα με τιμές IC₅₀ μεταξύ 72μg/ml ως 740μg/ml(γράφημα 5.2). Το πιο ισχυρό εκχύλισμα δηλαδή η καθαρή σκόνη φύλλων ελιάς παρουσιάζει IC₅₀ με τη συγκεκριμένη μέθοδο 72μg/ml (διάγραμμα 5.2.1) στη συνέχεια το ενθυλακωμένο εκχύλισμα 10% παρουσιάζει IC₅₀ =500μg/ml(διάγραμμα 5.2.2)και τέλος το ενθυλακωμένο εκχύλισμα 20% παρουσιάζει IC₅₀ =740μg/ml(διάγραμμα 5.2.3).



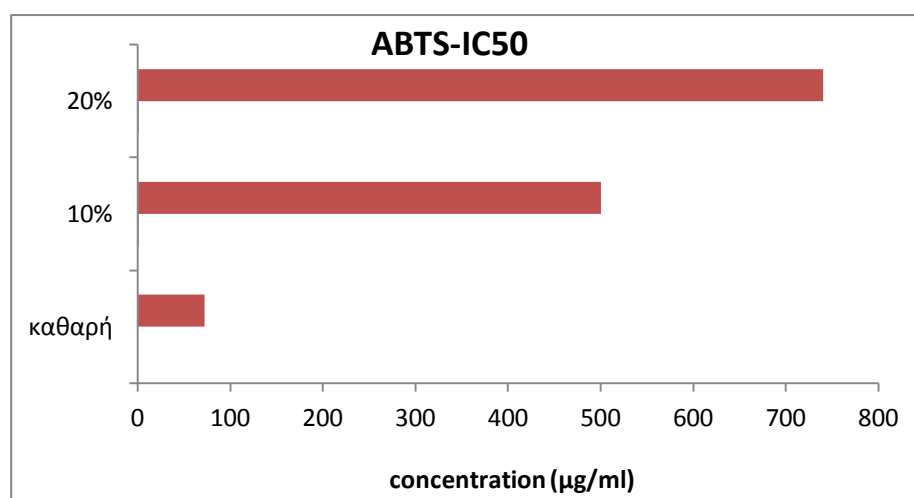
Διάγραμμα 5.2.1 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS από το καθαρό εκχύλισμα φύλλων ελιάς.



Διάγραμμα 5.2.2 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS από το ενθυλακωμένο 10% εκχύλισμα φύλλων ελιάς.



Διάγραμμα 5.2.3 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS από το ενθυλακωμένο 20% εκχύλισμα φύλλων ελιάς.



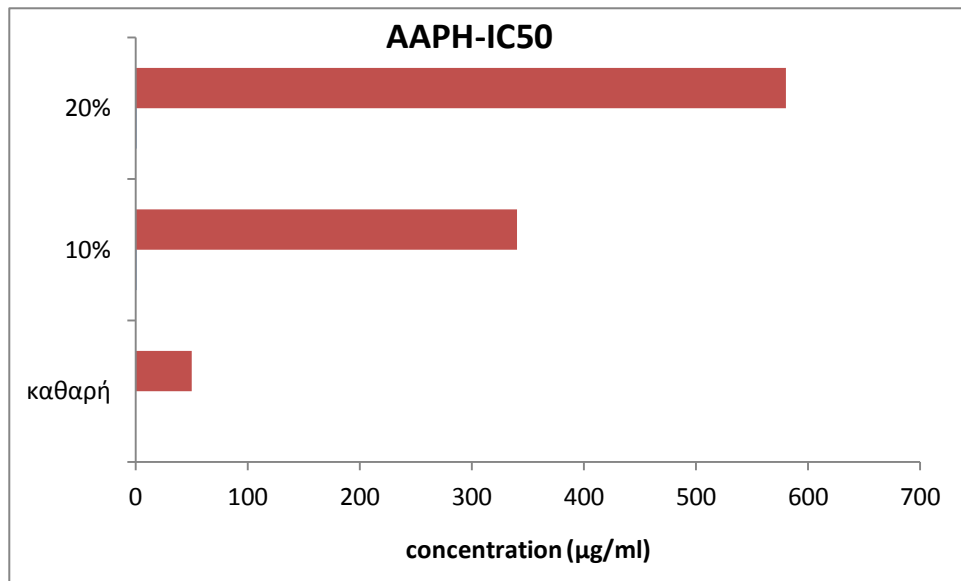
Γραφήμα 5.2: Απεικονίζονται οι τιμές IC50 των εκχυλισμάτων από φύλλα ελιάς με την αλληλεπίδραση της ρίζας ABTS .

5.4 Αποτελέσματα της επίδρασης των εκχυλισμάτων στην αναστολή της επαγωγής θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες περοξυλίου (ROO[•]) και εκτίμηση της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης τους.

Συνολικά μελετήθηκαν 3 εκχυλίσματα από φύλλα ελιάς και εξετάστηκε η αντιοξειδωτική τους δράση σε 6 συγκεντρώσεις διαφορετικές για το κάθε εκχύλισμα. Για το ενθυλακωμένο εκχύλισμα 10% εξετάστηκαν οι συγκεντρώσεις 39, 78, 156, 312, 625, 1250, /ml για το ενθυλακωμένο εκχύλισμα 20% από 78, 156, 312, 625, 1250, 2500, μg/ml ενώ για το καθαρό εκχύλισμα από 2,5, 5, 10, 20, 40, 80, 160, 312, 625, 1250μg/ml.

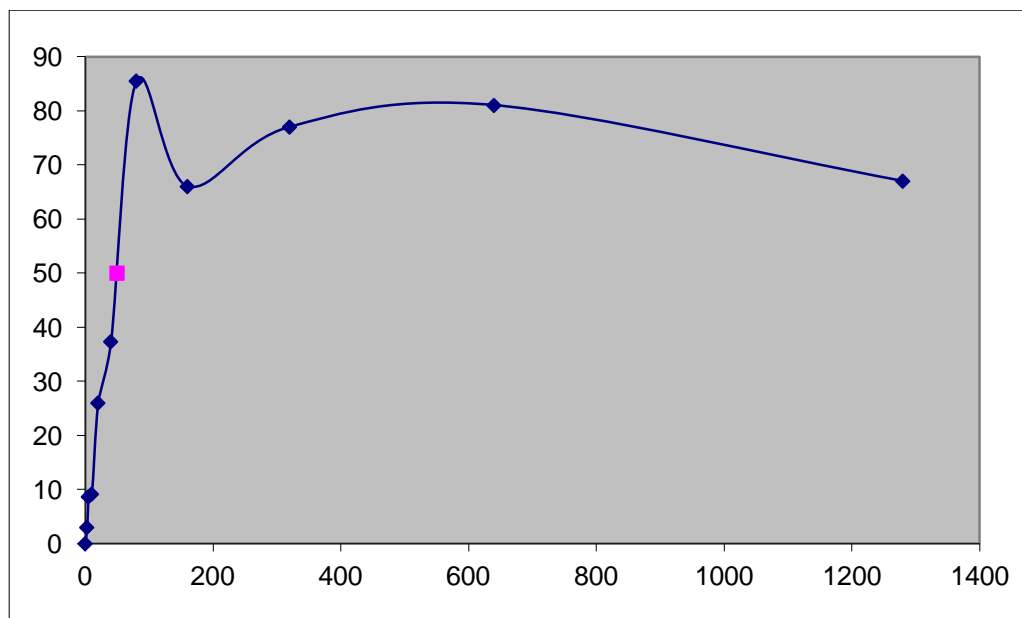
Τα εκχυλίσματα που μελετήθηκαν ανέστειλαν δόσοεξαρτώμενα την επαγωγή θραύσεων στο πλασμιδιακό DNA από ρίζες περοξυλίου (ROO[•]). Το γεγονός αυτό δείχνει ότι μπορούν να εξουδετερώνουν τις ρίζες περοξυλίου (ROO[•]), παρουσιάζοντας αντιοξειδωτική-αντιμεταλλαξιγόνο δράση. Το εύρος των τιμών IC₅₀ κυμαινόταν από 50μg/ml έως 580 μg/ml. Οι τιμές IC₅₀ όλων των εκχυλισμάτων φαίνονται στο γράφημα 5.3 και είναι ενδεικτικές της αντιοξειδωτικής ικανότητας τους: όσο μικρότερη είναι η τιμή IC₅₀ τόσο μεγαλύτερη η αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος. Τα εκχυλίσματα που ήταν ενθυλακωμένα στη μαλτοδεξτρίνη ήταν λιγότερο ισχυρά από το εκχύλισμα που δεν ήταν ενθυλακωμένο και ήταν σε καθαρή μορφή (γράφημα 5.3). Το πιο ισχυρό εκχύλισμα δηλαδή η καθαρή σκόνη φύλλων ελιάς παρουσιάζει IC₅₀ με τη συγκεκριμένη μέθοδο 50μg/ml (διάγραμμα 5.3.1) στη συνέχεια το ενθυλακωμένο εκχύλισμα 10% παρουσιάζει IC₅₀ =340μg/ml(διάγραμμα 5.3.2) και τέλος το ενθυλακωμένο εκχύλισμα 20% παρουσιάζει IC₅₀ =580μg/ml(διάγραμμα 5.3.3)

Στο παρακάτω γράφημα απεικονίζονται οι τιμές IC₅₀ όλων των εκχυλισμάτων, σχετικά με την αλληλεπίδρασή τους με την ρίζα AAPH^{•+}.

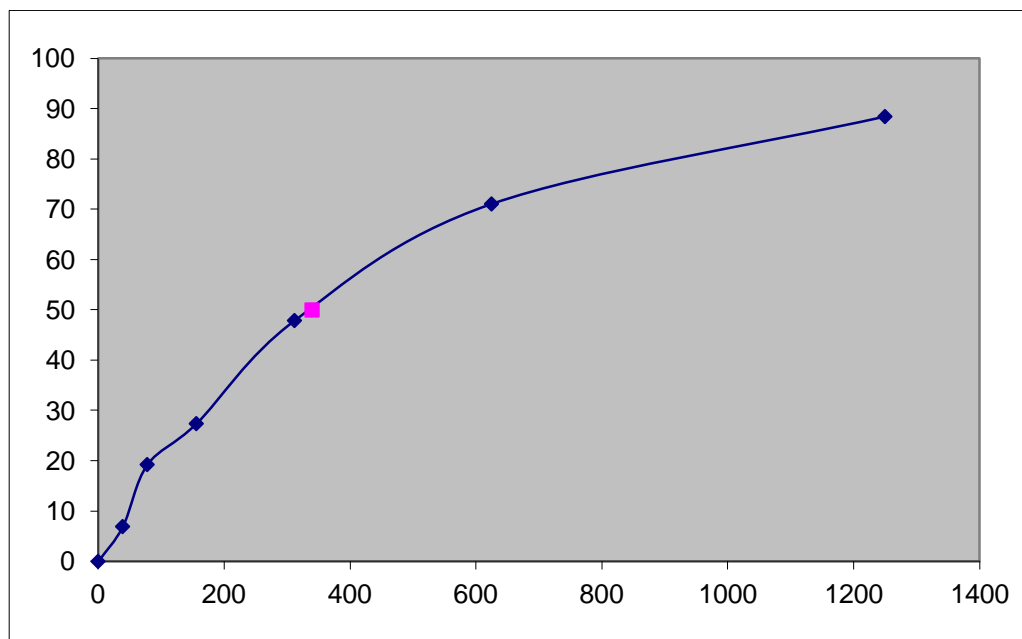


Γραφημα 5.3: Απεικονίζονται οι τιμές IC50 των εκχυλισμάτων από φύλλα ελιάς με την αλληλεπίδραση της ρίζας AAPH.

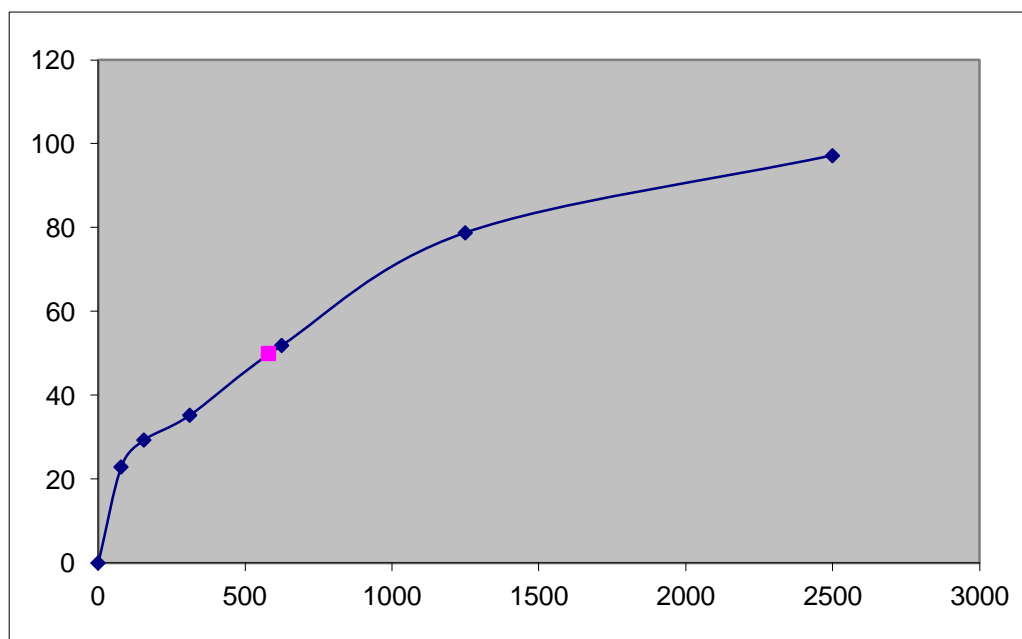
Παρακάτω παρατίθενται τα διαγράμματα που απεικονίζουν την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας AAPH⁺ από τα εξετασθέντα εκχυλίσματα.



Διάγραμμα 5.3.1: Επίδραση καθαρού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς, στις επαγόμενες από ρίζες ROO⁺ ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA. Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών ROO⁺

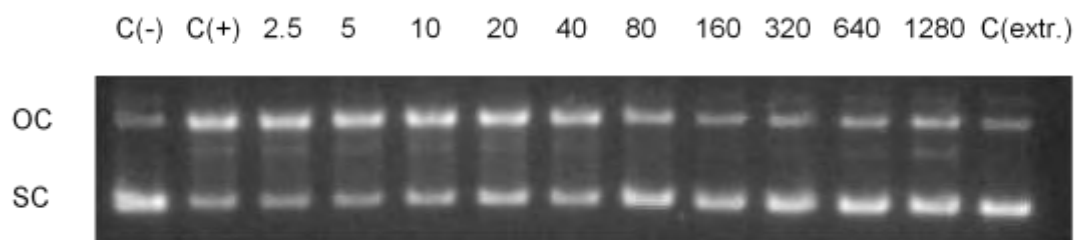


Διάγραμμα 5.3.2: Επίδραση ενθλακωμένου 10% εκχυλίσματος φύλλων ελιάς , στις επαγόμενες από ρίζες ROO^{*} ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA. Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών ROO^{*}.



Διάγραμμα 5.3.3: Επίδραση ενθλακωμένου 20% εκχυλίσματος φύλλων ελιάς , στις επαγόμενες από ρίζες ROO^{*} ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA. Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών ROO^{*}.

Αντιπροσωπευτικές εικόνες από την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων



Εικόνα 23 :Αντιπροσωπευτική φωτογραφία από την ηλεκτροφόρηση καθαρού δείγματος φύλλων ελιάς σε πήκτωμα αγαρόζης.

Σειρά 1: DNA plasmid

Σειρά 2: DNA plasmid + AAPH

Σειρά 3: DNA plasmid + AAPH + 5 µg/ml εκχυλίσματος

Σειρά 4: DNA plasmid + AAPH + 10 µg/ml εκχυλίσματος

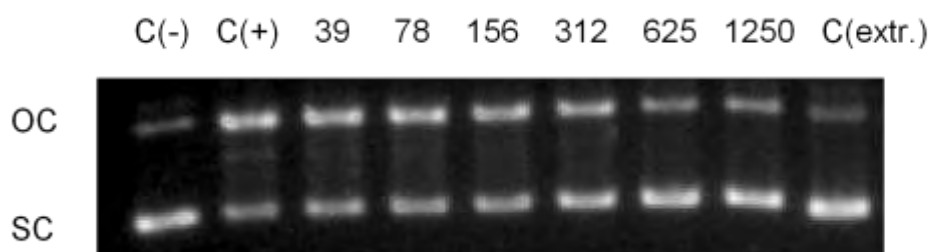
Σειρά 5: DNA plasmid + AAPH + 20 µg/ml εκχυλίσματος

Σειρά 6: DNA plasmid + AAPH + 40 µg/ml εκχυλίσματος

Σειρά 7: DNA plasmid + AAPH + 80µg/ml εκχυλίσματος

Σειρά 8: DNA plasmid + AAPH + 160 µg/ml εκχυλίσματος

Σειρά 9: DNA plasmid + 160 µg/ml εκχυλίσματος



Εικόνα 24 :Αντιπροσωπευτική φωτογραφία από την ηλεκτροφόρηση ενθυλακωμένου 10% δείγματος φύλλων ελιάς σε πήκτωμα αγαρόζης.

Σειρά 1: DNA plasmid

Σειρά 2: DNA plasmid + AAPH

Σειρά 3: DNA plasmid + AAPH + 39µg/ml εκχυλίσματος

Σειρά 4: DNA plasmid + AAPH + 78µg/ml εκχυλίσματος

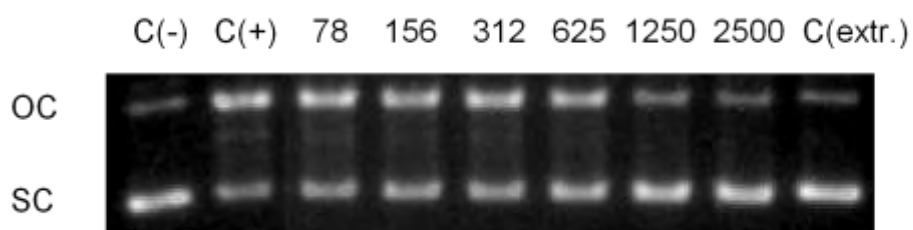
Σειρά 5: DNA plasmid + AAPH + 156µg/ml εκχυλίσματος

Σειρά 6: DNA plasmid + AAPH + 312µg/ml εκχυλίσματος

Σειρά 7: DNA plasmid + AAPH + 625µg/ml εκχυλίσματος

Σειρά 8: DNA plasmid + AAPH + 1250µg/ml εκχυλίσματος

Σειρά 9: DNA plasmid + 1250 µg/ml εκχυλίσματος



Εικόνα 25 :Αντιπροσωπευτική φωτογραφία από την ηλεκτροφόρηση ενθλακωμένου 20% δείγματος φύλλων ελιάς σε πήκτωμα αγαρόζης.

Σειρά 1: DNA plasmid

Σειρά 2: DNA plasmid + AAPH

Σειρά 3: DNA plasmid + AAPH + 78μg/ml εκχυλίσματος

Σειρά 4: DNA plasmid + AAPH + 156μg/ml εκχυλίσματος

Σειρά 5: DNA plasmid + AAPH + 312μg/ml εκχυλίσματος

Σειρά 6: DNA plasmid + AAPH + 625μg/ml εκχυλίσματος

Σειρά 7: DNA plasmid + AAPH + 1250μg/ml εκχυλίσματος

Σειρά 8: DNA plasmid + AAPH + 2500μg/ml εκχυλίσματος

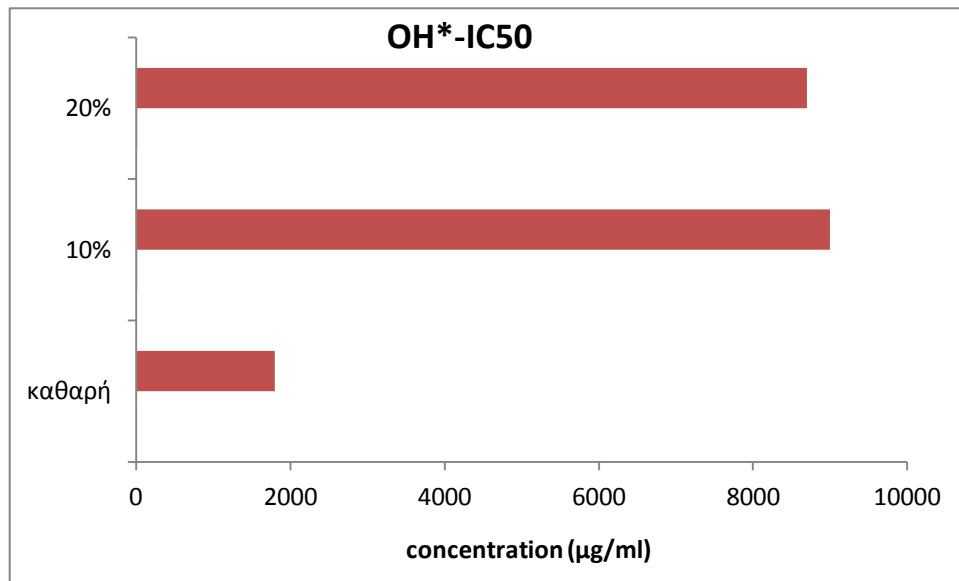
Σειρά 9: DNA plasmid + 2500μg/ml εκχυλίσματος

5.5 Αποτελέσματα της επίδρασης των εκχυλισμάτων στην αναστολή της επαγωγής θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες υδροξυλίου (OH[•]) και εκτίμηση της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης τους.

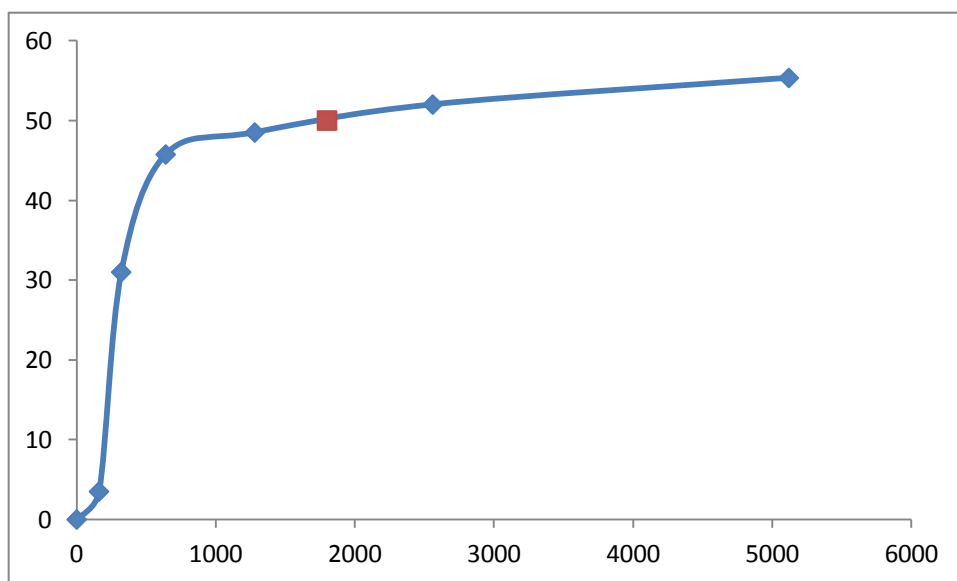
Συνολικά μελετήθηκαν 3 εκχυλίσματα από φύλλα ελιάς και εξετάστηκε η αντιοξειδωτική τους δράση σε 6 συγκεντρώσεις διαφορετικές για το κάθε εκχύλισμα. Για το ενθυλακωμένο εκχύλισμα 10% εξετάστηκαν οι συγκεντρώσεις 312, 625, 1250, 5000, 10000 μg/ml για το ενθυλακωμένο εκχύλισμα 20% από 312, 625, 1250, 2500, 5000, 10000 μg/ml ενώ για το καθαρό εκχύλισμα από 80, 160, 320, 640, 1280, 2560, 5120 μg/ml.

Τα εκχυλίσματα που μελετήθηκαν ανέστειλαν δόσοεξαρτώμενα την επαγωγή θραύσεων στο πλασμιδιακό DNA από ρίζες υδροξυλίου (OH[•]). Το γεγονός αυτό δείχνει ότι μπορούν να εξουδετερώνουν τις ρίζες υδροξυλίου (OH[•]), παρουσιάζοντας αντιοξειδωτική-αντιμεταλλαξιγόνο δράση. Το εύρος των τιμών IC₅₀ κυμαινόταν από 1800 μg/ml έως 9000 μg/ml.

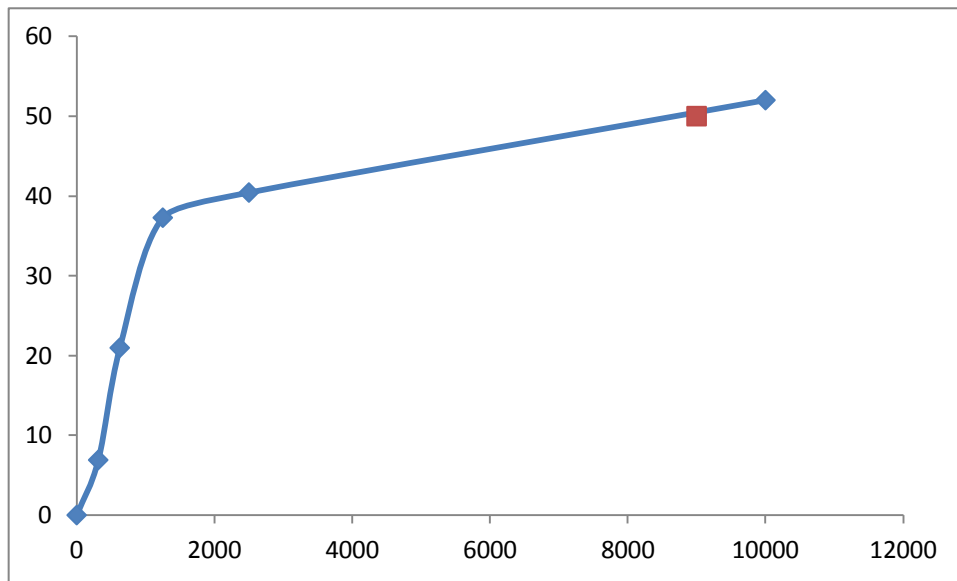
Στα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζεται η αντιοξειδωτική ικανότητα των δειγμάτων.



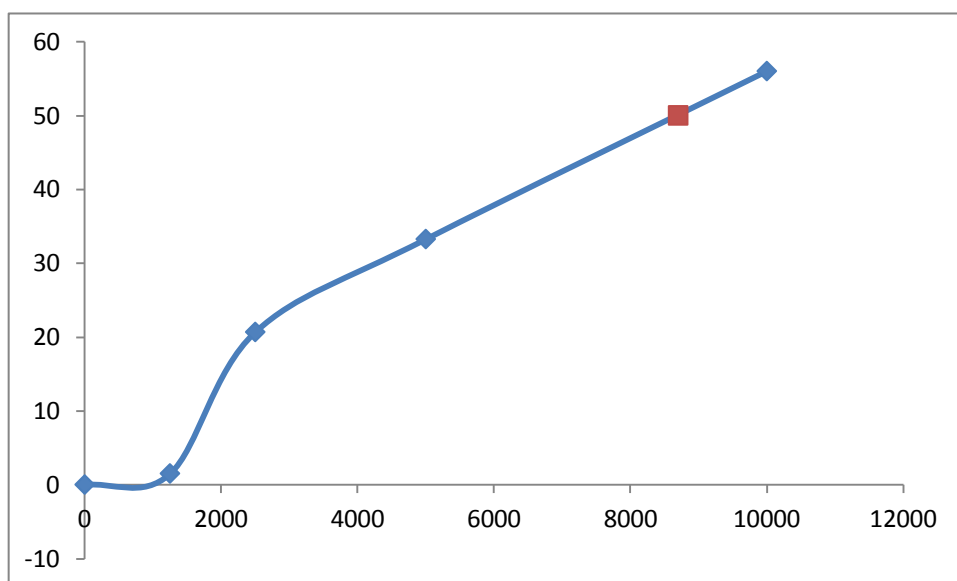
Γραφημα 5.4: Απεικονίζονται οι τιμές IC50 των εκχυλισμάτων από φύλλα ελιάς με την αλληλεπίδραση της ρίζα OH*.



Διάγραμμα 5.4.1: Επίδραση καθαρού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς, στις επαγόμενες από ρίζες OH* ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA. Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών OH*.



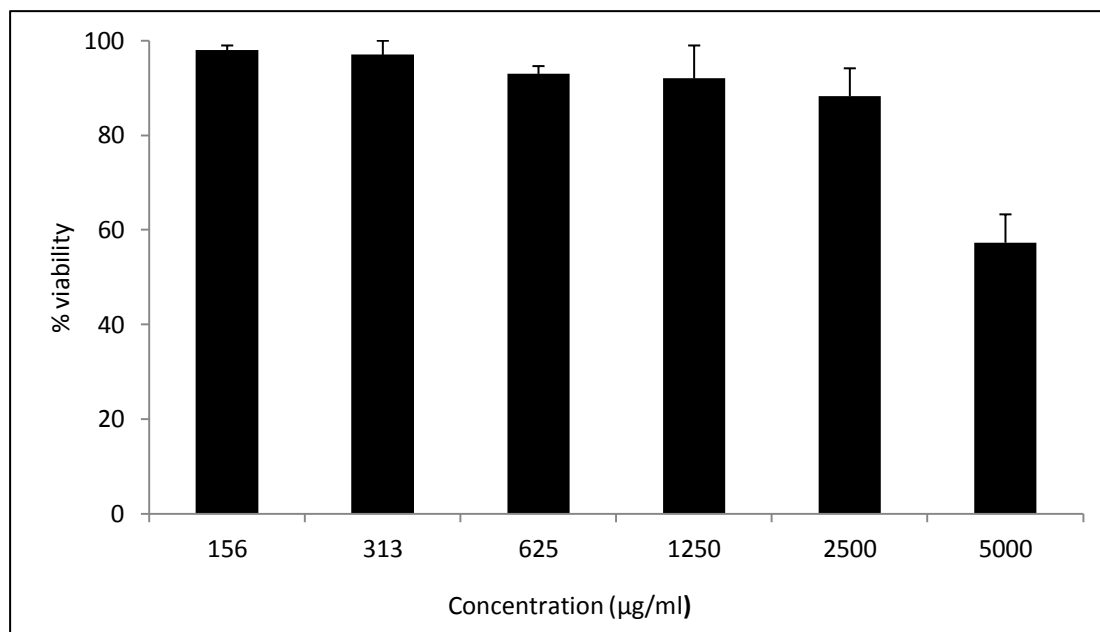
Διάγραμμα 5.4.2: Επίδραση ενθυλακωμένου 10% εκχυλίσματος φύλλων ελιάς , στις επαγόμενες από ρίζες OH^+ ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA. Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών OH^+ .



Διάγραμμα 5.4.3: Επίδραση ενθυλακωμένου 20% εκχυλίσματος φύλλων ελιάς , στις επαγόμενες από ρίζες OH^+ ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA. Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών OH^+ .

5.6 Προσδιορισμός κυτταροτοξικής δράσης της πρωτεΐνης με τη μέθοδο του ΧΤΤ.

Η ενθυλακωμένη σκόνη 10% δεν εμφάνισε κυτταροτοξική δράση στα επιθηλιακά κύτταρα στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία (156, 313, 625, 1250, 2500, 5000 $\mu\text{g/ml}$).



Γράφημα 5.5 : Η % αναστολή της κυτταρικής αύξησης από τις διαφορετικές συγκεντρώσεις της ενθυλακωμένης σκόνης 10%.

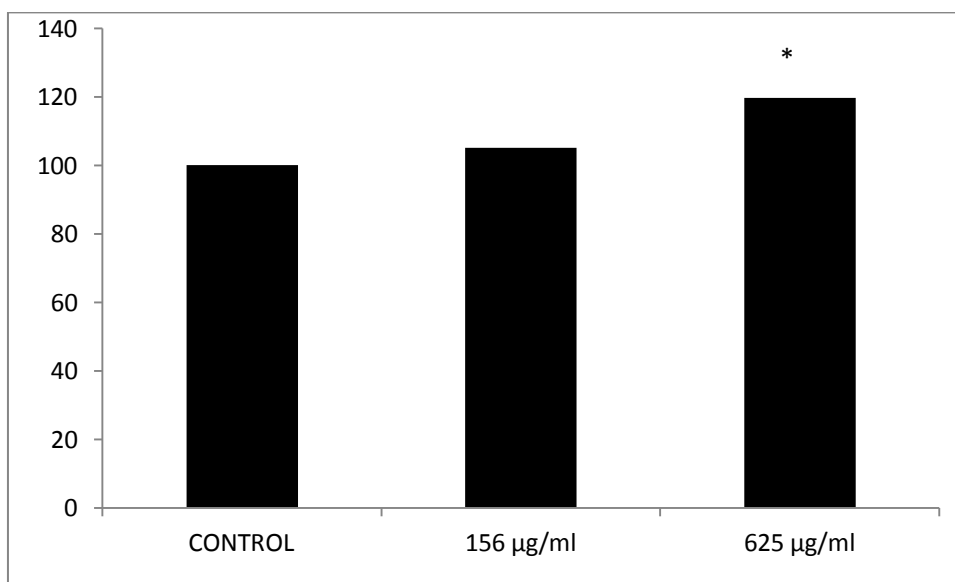
5.7 Αποτελέσματα επιπέδων γλουταθειόνης (GSH) μέσω κυτταρομετρίας ροής

Με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής προσδιορίστηκαν τα επίπεδα γλουταθειόνης (GSH) στα επιθηλιακά κύτταρα έπειτα από επώαση με το ενθυλακωμένο εκχύλισμα φύλλων ελιάς 10% στις συγκεντρώσεις 156 και 625 $\mu\text{g/ml}$ για 24 ώρες.

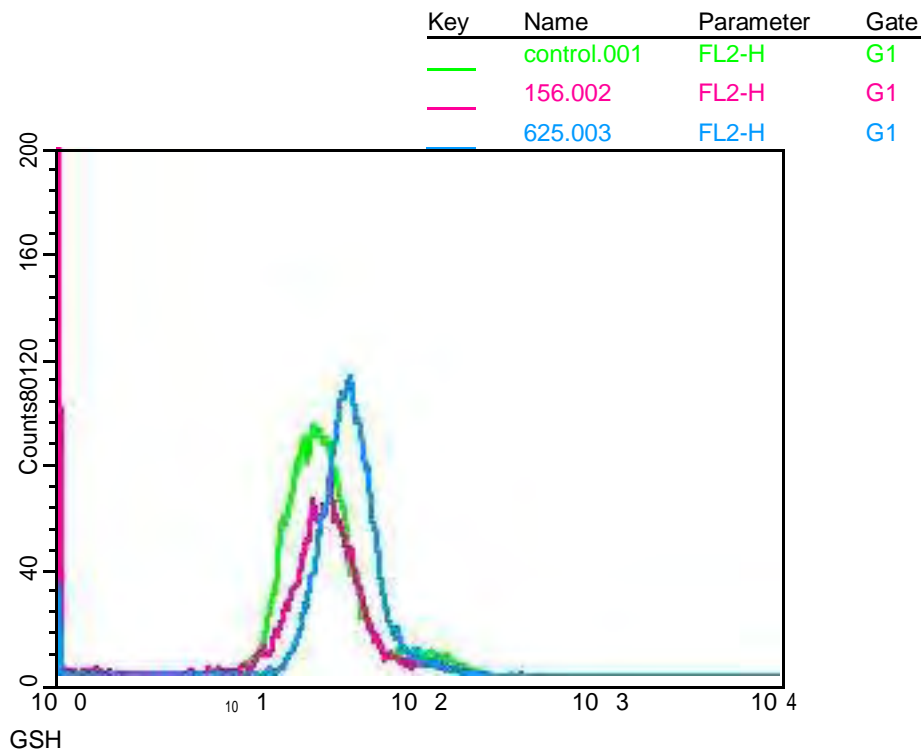
Προσδιορίστηκαν επίσης, τα επίπεδα της γλουταθειόνης των κυττάρων υπό φυσιολογικές συνθήκες (control). Το πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων.

Όπως φαίνεται στο γράφημα 5.5 τα επίπεδα της γλουταθειόνης με χορήγηση του ενθυλακωμένου εκχυλίσματος φύλλων ελιάς 10% παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα γλουταθειόνης στο δείγμα με συγκέντρωση 625 $\mu\text{g/ml}$ ενώ στο δείγμα 156 $\mu\text{g/ml}$ δεν υπάρχει σημαντική αύξηση σε σχέση με τα επίπεδα της γλουταθειόνης στο control.

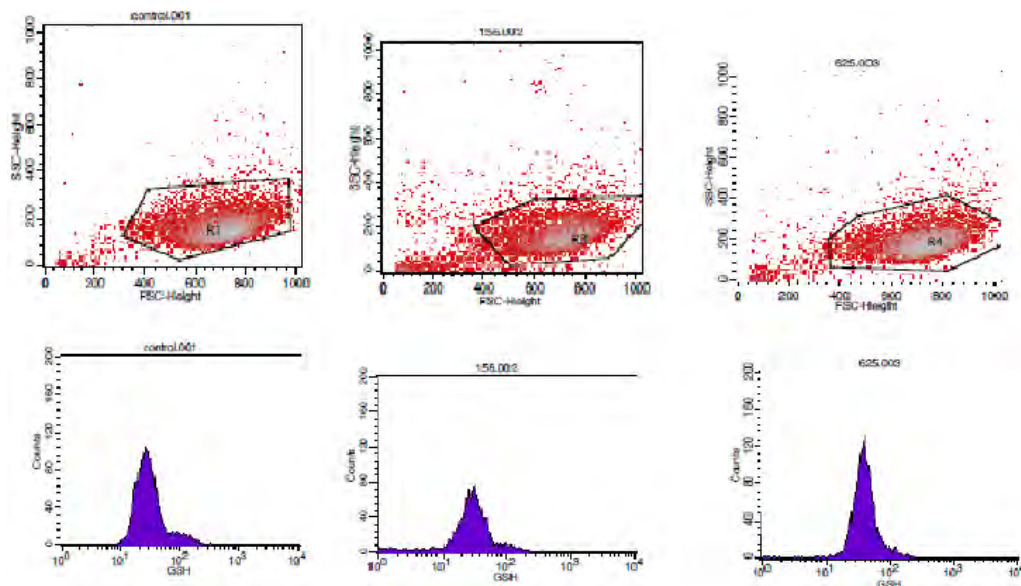
Στο γράφημα 3 φαίνεται η γραφική απεικόνιση των επιπέδων της γλουταθειόνης στα κύτταρα όπως μας το έδωσε το λογισμικό πρόγραμμα της κυτταρομετρίας ροής. Οι καμπύλες αντιστοιχούν στις διαφορετικές συγκεντρώσεις της ενθυλακωμένης σκόνης 10%. Όπως παρατηρείται στο γράφημα σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του δείγματος, έχουμε μετατόπιση της καμπύλης προς τα δεξιά. Αυτό υποδηλώνει αυξημένα επίπεδα γλουταθειόνης.



Γράφημα 5.6.1: Επίπεδα γλουταθειόνης (GSH) στα κύτταρα υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση ενθυλακωμένης σκόνης φύλλων ελιάς 10% για 24 ώρες *Στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το control ($P < 0.05$).



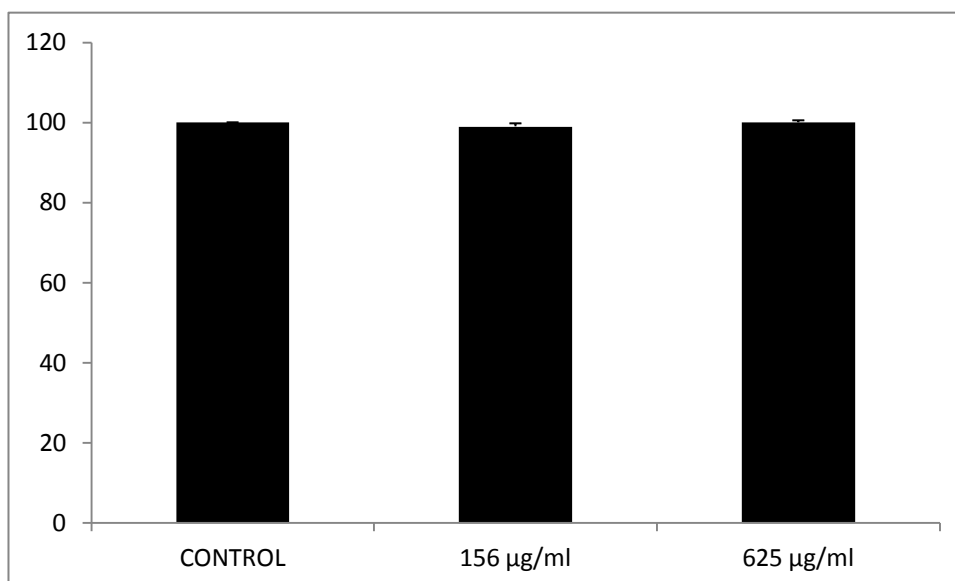
Γράφημα 5.6.2: Συγκεντρωτικό γράφημα των επιπέδων της γλουταθειόνης (GSH) από το λογισμικό της κυτταρομετρίας ροής.



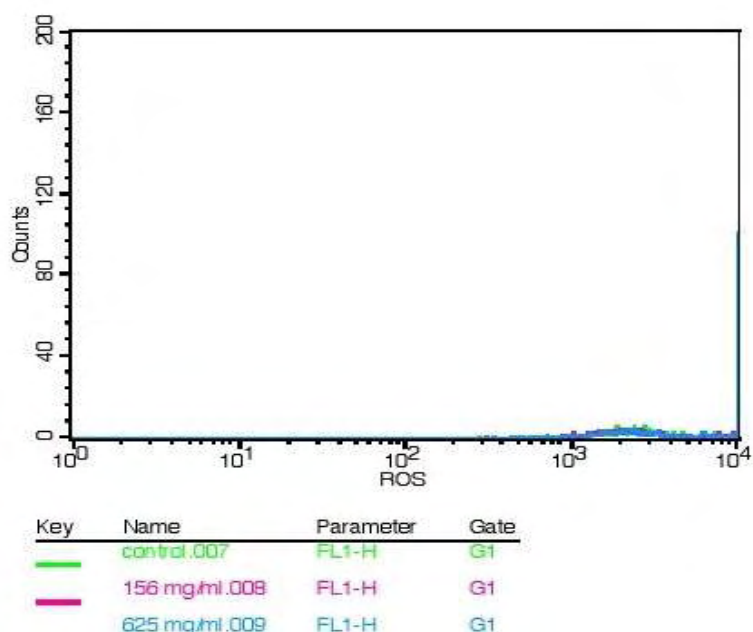
Εικόνα 26: Αντιπροσωπευτικές εικόνες γραφημάτων που δείχνουν την κοκκίωση (SSC) και το μέγεθος (FSC) των κυττάρων EA.hy926 (πάνω σειρά) και τη μεταβολή των επιπέδων γλουταθειόνης (κάτω σειρά) μετά από χρώση με MercuryOrange υπό φυσιολογικές συνθήκες (control) και υπό τη χορήγηση του δείγματος ενθυλακωμένης σκόνης φύλλων ελιάς 10%.

5.8 Προσδιορισμός επιπέδων ROS μέσω κυτταρομετρίας ροής

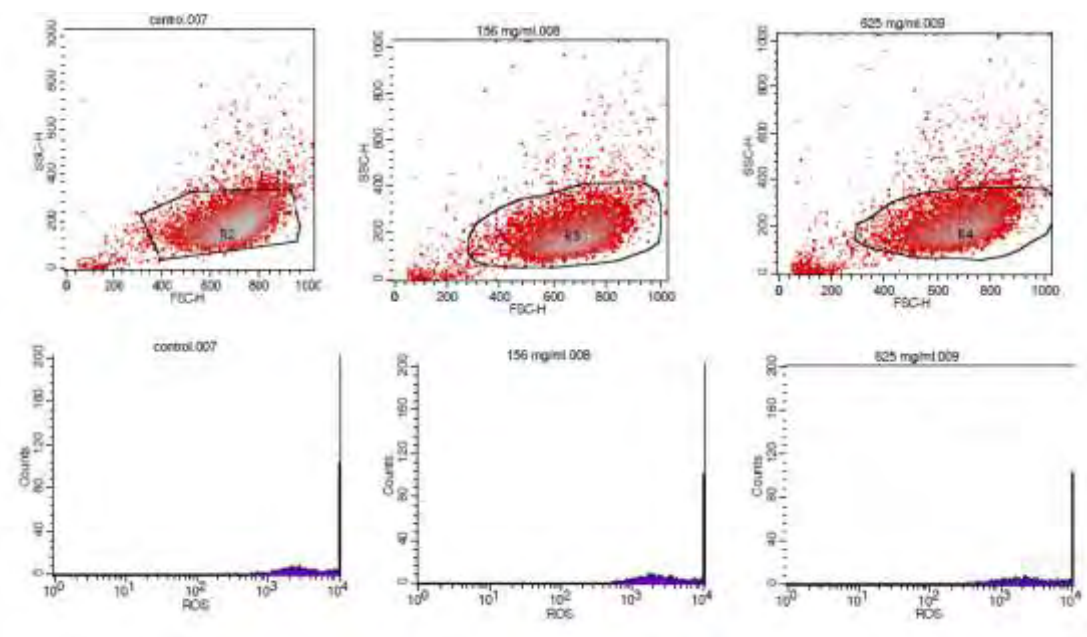
Στο γράφημα 5.7.1 φαίνεται η γραφική απεικόνιση των επιπέδων των ROS στα κύτταρα όπως μας το έδωσε το λογισμικό πρόγραμμα της κυτταρομετρίας ροής. Οι καμπύλες αντιστοιχούν στις διαφορετικές συγκεντρώσεις της ενθυλακωμένης σκόνης φύλλων ελιάς 10%. Όπως παρατηρείται στο γράφημα σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του εξεταζόμενου δείγματος φύλλων ελιάς σε 156 και 625 μg/ml δεν παρατηρείται καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή.



Γράφημα 5.7.1: Επίπεδα ελευθέρων ριζών (ROS) στα κύτταρα υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), και υπό τον συνδυασμό ενθυλακωμένης σκόνης φύλλων ελιάς 10% σε συγκεντρώσεις 156 και 625 μg/ml για 24 ώρες, Δεν παρατηρείται καμία σημαντική στατιστική μεταβολή ($P < 0.05$).



Γράφημα 5.7.2: Συγκεντρωτικό γράφημα των επιπέδων των ελευθέρων ριζών (ROS) από το λογισμικό της κυτταρομετρίας ροής.

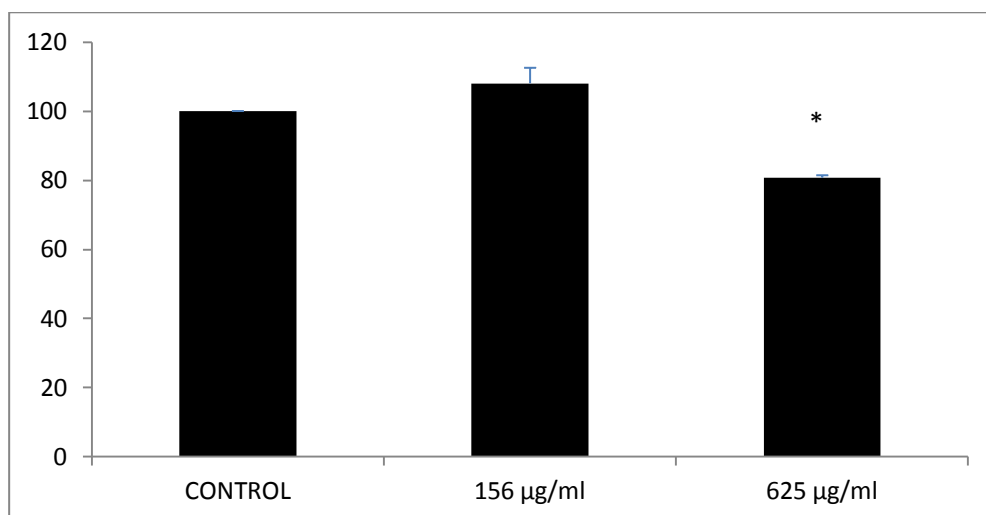


Εικόνα 26: Αντιπροσωπευτικές εικόνες γραφημάτων που δείχνουν την κοκκίωση (SSC) και το μέγεθος (FSC) των κυττάρων EA.hy926 (πάνω σειρά) και τη μεταβολή των επιπέδων των ελευθέρων ριζών ROS (κάτω σειρά) μετά από χρώση με DCFDA υπό φυσιολογικές συνθήκες (control) και υπό τη χορήγηση του δείγματος ενθυλακωμένης σκόνης φύλλων ελιάς 10%.

5.9 Προσδιορισμός των δραστικών ουσιών του θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBARS)

Ο προσδιορισμός των TBARS έγινε φασματοφωτομετρικά. Τα κύτταρα επώαστηκαν με την ενθυλακωμένη σκόνης φύλλων ελιάς 10% σε συγκεντρώσεις 156 και 625 $\mu\text{g/ml}$ για 24 ώρες. Προσδιορίστηκαν επίσης, τα επίπεδα των TBARS σε κύτταρα μάρτυρες (control) αλλά και η επίδραση της χορήγησης του δείγματος. Το πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων.

Όπως φαίνεται στο γράφημα 6 τα επίπεδα των TBARS της ενθυλακωμένης σκόνης εκχυλίσματος φύλλων ελιάς σε σχέση με το control ήταν μειωμένα επίπεδα TBARS κατά 19,30% για τη συγκέντρωση 625 $\mu\text{g/ml}$ ενώ για τη μικρότερη συγκέντρωση δεν παρατηρείται αξιόλογη μεταβολή.

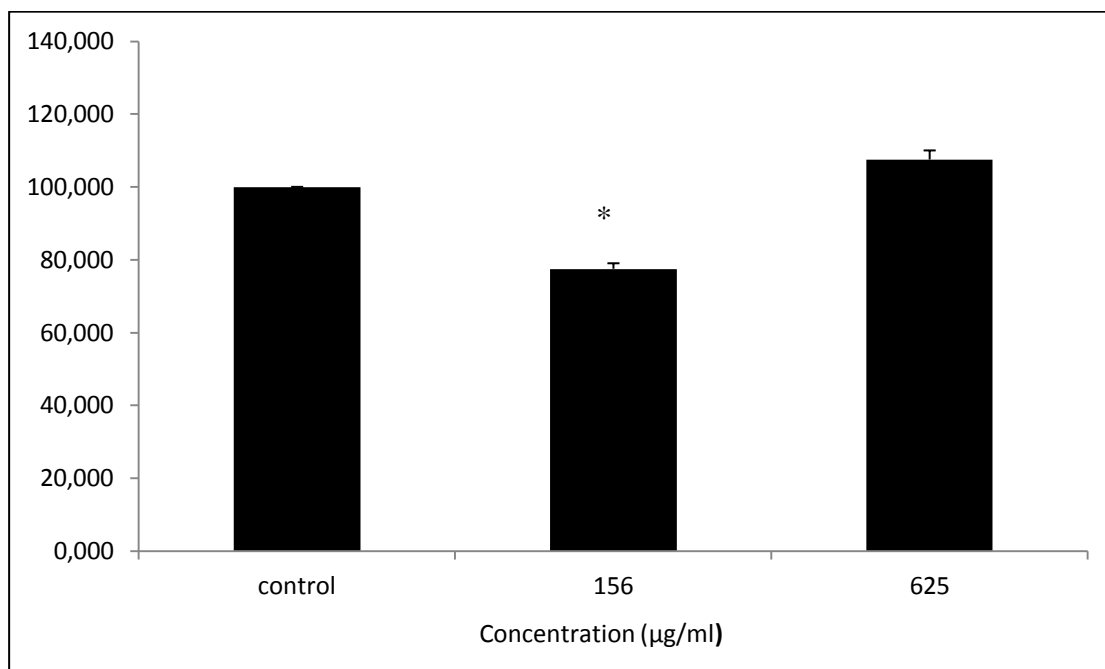


Γράφημα 5.8.: Εκατοστιαία επίπεδα των TBARS στα επιθηλιακά κύτταρα υπό φυσιολογικές συνθήκες (control) και υπό τον συνδυασμό ενθυλακωμένης σκόνης φύλλων ελιάς 10% (156 και 625 $\mu\text{g/ml}$) για 24 ώρες. * Στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το control. ($P < 0.05$).

5.10 Αποτελέσματα των επιπέδων CARB με φασματοφωτομετρία

Ο προσδιορισμός των CARB έγινε φασματοφωτομετρικά. Τα κύτταρα επώαστηκαν με την ενθυλακωμένη σκόνης φύλλων ελιάς 10% σε συγκεντρώσεις 156 και 625 $\mu\text{g/ml}$ για 24 ώρες. Προσδιορίστηκαν επίσης, τα επίπεδα των CARB σε κύτταρα μάρτυρες (control) αλλά και η επίδραση της χορήγησης του δείγματος. Το πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων.

Όπως φαίνεται στο γράφημα 5.8.2 τα επίπεδα των CARB της ενθυλακωμένης σκόνης εκχυλίσματος φύλλων ελιάς σε σχέση με το control ήταν μειωμένα κατά 22,5% για τη συγκέντρωση 156μg/ml ενώ για τη μεγαλύτερη συγκέντρωση 625 μg/ml δεν παρατηρείται αξιόλογη μεταβολή σε σχέση με το control.



Γράφημα 5.9: Εκατοστιαία επίπεδα των CARB στα ενδοθηλιακά κύτταρα υπό φυσιολογικές συνθήκες (control) και υπό τον συνδυασμό ενθυλακωμένης σκόνης φύλλων ελιάς 10% (156 και 625μg/ml) για 24 ώρες. *Στατιστικά σημαντικό σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου. ($P < 0.05$).

6 Συζήτηση

Τα τελευταία χρόνια παρουσιάζεται σημαντικό ενδιαφέρον για τη συστηματική και σε βάθος έρευνα των φαρμακολογικά δραστικών ουσιών των φύλλων ελιάς με απώτερο στόχο τη χρήση τους στον τομέα των τροφίμων, των φαρμάκων και των καλλυντικών. Σύμφωνα με επιστημονικές μελέτες, η χημική σύσταση των φύλλων της ελιάς είναι ιδιαίτερα σύνθετη, συγκεκριμένα περιέχουν πολυφαινόλες, διτερπένια, αλκαλοειδή, στερόλες, αμινοξέα, υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, χλωροφύλλες, πτητικές ενώσεις, ιχνοστοιχεία, μέταλλα και άλλες μη ταυτοποιημένες ενώσεις.

Ανάμεσα σε όλες αυτές τις διαφορετικές ουσίες, την πιο ενδιαφέρουσα χημική ομάδα απαρτίζουν οι ενώσεις που παρουσιάζουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Οι ενώσεις αυτές προστατεύουν τον οργανισμό από το οξειδωτικό στρες, το οποίο εκτιμάται ότι συμβάλλει στην ανάπτυξη ενός ευρέος φάσματος ασθενειών, όπως για παράδειγμα στη νόσο του Αλτσχάιμερ, στα καρδιαγγειακά νοσήματα, στη ρευματοειδή αρθρίτιδα κ.α. Έτσι, σύμφωνα με τις σύγχρονες τάσεις στη διατροφή, η αυξημένη κατανάλωση των αντιοξειδωτικών συμβάλλει στην καλή υγεία, στην ευεξία και στην καθυστέρηση των φαινομένων του γήρατος (Finkel 2000). Καθώς τα φυτά αποτελούν μια ιδιαίτερα πλούσια πηγή φυτικών πολυφαινολών, αφού παράγουν αρκετά από αυτά ως δευτερογενείς μεταβολίτες για την ικανοποίηση λειτουργικών τους αναγκών, αποτελούν τόσο αυτά όσο και τα προϊόντα τους αντικείμενο εκτεταμένης μελέτης στα πλαίσια αναζήτησης νέων χημειοπροστατευτικών παραγόντων. Αρκετές μελέτες έχουν γίνει για τα φύλλα ελιάς αλλά και άλλες βρίσκονται σε εξέλιξη, ως προς τα βιοδραστικά τους συστατικά και κυρίως τις φυτικές του πολυφαινόλες. Έχει αποδειχτεί επιστημονικά ότι τα πολυφαινολικά συστατικά και συγκεκριμένα η ελαιοευρωπαϊνή που βρίσκεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα φύλλα ελιάς, παρουσιάζουν αυξημένη αντιοξειδωτική ικανότητα και για το λόγο υπάρχει τελευταία αυξημένο ερευνητικό ενδιαφέρον για τα απόβλητα επεξεργασίας του ελαιόλαδου.

Για την παραλαβή των πολυφαινολικών συστατικών από φυσικά προϊόντα μπορούν να εφαρμοστούν διαφορετικά συστήματα εκχύλισης με μικροκύματα, συμπεριλαμβανομένων των φούρνων μικροκυμάτων που λειτουργούν σε ατμοσφαιρική πίεση (π.χ. οικιακού τύπου) ή εξοπλισμένων με κλειστά δοχεία υπό ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης (Zhang 2011. Routray 2012).

Κατά τη μελέτη της εκχύλισης φυτικών συστατικών με τη βοήθεια μικροκυμάτων πρέπει να λαμβάνονται υπόψη διάφορες παράμετροι που επηρεάζουν τη διαδικασία, όπως ο διαλύτης, η συγκέντρωση και ο όγκος του διαλύτη, η ισχύς των μικροκυμάτων, ο χρόνος εκχύλισης κτλ. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες όπως η πίεση, η ποσότητα του υλικού και του διαλύτη καθώς και ο χρόνος στο πλαίσιο της βελτιστοποίησης της εκχύλισης με μικροκύματα με στόχο την παραλαβή του μέγιστου ποσοστού φαινολικών συστατικών από τα φύλλα ελιάς. Εφαρμόστηκαν τρεις διαφορετικές συνθήκες εκχύλισης. Η πρώτη έγινε με θερμοκρασία 40°C σταθερή σ' όλη τη διάρκεια της εκχύλισης. Στη δεύτερη περίπτωση η θερμοκρασία ξεκινούσε από 40°C με μέγιστη στους 60°C, και στην τρίτη περίπτωση η θερμοκρασία παρέμενε στους 70°C σ' όλη τη διάρκεια της εκχύλισης. Οι υπόλοιποι παράγοντες παρέμεναν ίδιοι. Το αποτέλεσμα από τις τρεις περιπτώσεις ήταν ότι το εκχύλισμα από την τρίτη περίπτωση ήταν αυτό με το πιο σκούρο χρώμα και την πιο πικρή γεύση. Επίσης από τις μετρήσεις αντιοξειδωτικής ικανότητας και των τριών εκχυλισμάτων αυτό που πήραμε από την τρίτη περίπτωση ήταν και το πιο ισχυρό. Τα άλλα δύο δεν έδειξαν κάποια αξιόλογη αντιοξειδωτική δράση και γι' αυτό το λόγο δεν μελετήθηκαν περαιτέρω.

Ακόμη το πιο ισχυρό εκχύλισμα στο οποίο εφαρμόστηκε η μέθοδος Freeze Dryer και χρησιμοποιήθηκε ως μορφή σκόνης, μελετήθηκε τόσο ως καθαρό όσο και ενθυλακωμένο σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Η μέθοδος της ενθυλάκωσης επιλέχθηκε για να προσδιορίσουμε σε τι ποσοστό μειώνεται η αντιοξειδωτική του δράση αλλά και κατά πόσο μπορεί να προστατευθεί και να διατηρηθεί σε διάφορες χρήσεις. Η επιλογή της ενθυλάκωσης έγινε για να προστατευτούν τα βιοδραστικά συστατικά, την κάλυψη της πικρής γεύσης των φαινολών και να παραταθεί ο χρόνος ζωής των ουσιών.

Επιπλέον, ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη και εκτίμηση (με τη χρήση μοριακών μεθόδων) της αντιοξειδωτικής και αντιμεταλλαξιγόνου δράσης, των εκχυλισμάτων από φύλλα ελιάς τα οποία ήταν σε μορφή σκόνης καθώς και ενθυλακωμένα σε μαλτοδεξτρίνη, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Για την μελέτη των εκχυλισμάτων, χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις *in vitro* μέθοδοι, οι οποίες στηρίζονται στην εξουδετέρωση των σταθερών χημικών ριζών DPPH[•] και ABTS^{•+} από αντιοξειδωτικές ενώσεις και στην προστατευτική δράση έναντι της επαγόμενης οξειδωτική βλάβη του DNA από δραστικές μορφές οξυγόνου όπως είναι οι ρίζες OH[•]

και ROO^{\bullet} . Η επαγόμενη πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων από ROS θεωρείται ότι εμπλέκεται σε σοβαρές παθολογικές καταστάσεις όπως η μεταλλαξιγένεση και η καρκινογένεση (Stagos et al., 2005). Και στις 4 μεθόδους προσδιορίστηκε το IC_{50} , δηλαδή η συγκέντρωση των εξεταζόμενων ουσιών στην οποία προκαλούσαν μείωση-εξουδετέρωση των ριζών που χρησιμοποιήθηκαν κατά 50%. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC_{50} τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος. Με βάση τις τιμές των IC_{50} το σύνολο των εκχυλισμάτων που μελετήθηκαν παρουσίασαν ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας του DPPH[•] σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις. Το εύρος των τιμών IC_{50} κυμαινόταν από πιο 22μg/ml έως 430μg/ml. Η εξέταση των εκχυλισμάτων με τη ρίζα $ABTS^{++}$, έδειξε όπως και η μέθοδος με το DPPH ότι έχουν σημαντική ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας. Αντίστοιχα, το εύρος των τιμών IC_{50} κυμαινόταν από 72μg/ml έως 740μg/ml. Επίσης, η σειρά αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων διαφέρει ανάμεσα στη μέθοδο DPPH και ABTS λόγω πιθανόν της διαφορετικής χημικής δομής των δύο εξεταζόμενων ριζών. Αυτό δείχνει ότι για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων σχετικά με την αντιοξειδωτική δράση ενός εκχυλίσματος είναι προτιμότερο να χρησιμοποιούνται δύο ή περισσότερες ελεύθερες ρίζες.

Στη μέθοδο της πρόκλησης θραύσεων στο πλασμιδιακό DNA, τα εκχυλίσματα μπορούσαν να αναστείλουν τις προκαλούμενες από ρίζες OH^{\bullet} βλάβες στο πλασμιδιακό DNA, με τιμές IC_{50} από 1800-9000 μg/ml. Εκτός από τις ρίζες OH^{\bullet} , τα εκχυλίσματα δοκιμάστηκαν απέναντι και στην πρόκληση βλαβών στο DNA από τις ρίζες ROO^{\bullet} . Σύμφωνα με τις τιμές IC_{50} , όλα τα εκχυλίσματα επέδειξαν ισχυρή δόσοεξαρτώμενη προστατευτική δράση στην επαγόμενη από ρίζες ROO^{\bullet} βλάβη στο DNA. Το εύρος των τιμών IC_{50} κυμαινόταν από 50μg/ml έως 580 μg/ml. Συγκριτικά με όλες τις μεθόδους η καθαρή σκόνη εκχυλίσματος φύλλων ελιάς εμφανίζει τις χαμηλότερες τιμές IC_{50} σε σχέση με τα ενθυλακωμένα εκχυλίσματα όπως ήταν αναμενόμενο. Επίσης οι πολύ χαμηλές τιμές IC_{50} της καθαρής σκόνης αποδεικνύουν την ισχυρή αντιοξειδωτική δράση της. Η ανασταλτική δράση των εκχυλισμάτων έναντι των βλαβών που προκαλούνταν από ρίζες OH^{\bullet} στο DNA δείχνει ότι πιθανώς θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν τα εκχυλίσματα για χημειοπροστασία από παθολογικές καταστάσεις (π.χ. καρκινογένεση, νευροεκφυλιστικές ασθένειες) που οφείλονται σε επαγόμενες από ελεύθερες ρίζες βλάβες στο DNA. Μάλιστα, οι ρίζες αυτές παρήχθησαν με φωτόλυση του H_2O_2 μέσω υπερϊώδους ακτινοβολίας. Περιβαλλοντικές συνθήκες όπως η υπερϊώδης και η ιονίζουσα ακτινοβολία, οι

διάφοροι μολυσματικοί παράγοντες όπως είναι το κάπνισμα δύναται να προκαλούν τον σχηματισμό των δραστικών μορφών οξυγόνου (Halliwell, 1997), οι οποίες εκτός των άλλων επιπτώσεων έχουν κατηγορηθεί και για τη γήρανση του δέρματος. Επίσης, η υπεριώδης ακτινοβολία επάγει ένα μεγάλο αριθμό παθολογικών καταστάσεων στο δέρμα με πιο επιβλαβή τον καρκίνο του δέρματος. Η βλάβη του DNA έχει προσδιοριστεί ως αιτία του σχηματισμού αυτού του είδους του καρκίνου. Κατά συνέπεια, μια πιθανή εφαρμογή αυτών των εκχυλισμάτων θα ήταν η προσθήκη τους σε δερματολογικές κρέμες για προστασία από την υπεριώδη ακτινοβολία.

Στο τελευταίο στάδιο της παρούσας εργασίας διαπιστώθηκε η αντιοξειδωτική δράση ενδοκυτταρικά του ενθυλακωμένου εκχυλίσματος 10% που παρουσίασε την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα στις προηγούμενες μεθόδους, σε ενδοθηλιακά κύτταρα (κυτταρική σειρά EA.hy926), όπου προσδιορίστηκαν τα επίπεδα της γλουταθειόνης (GSH) και των ελευθέρων ριζών (ROS) με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής καθώς και της λιπιδικής υεροξείδωσης (TBARS). Πιο συγκεκριμένα, με τη βοήθεια της μεθόδου ΧΤΤ επιλέχθηκαν οι μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις 156 και 625 μg/ml για τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Με τη βοήθεια της κυτταρομετρίας ροής προσδιορίστηκαν τα επίπεδα της γλουταθειόνης (GSH). Η αύξηση των επιπέδων GSH επιβεβαιώνει ότι η ενθυλακωμένη σκόνη φύλλων ελιάς παρουσιάζει σημαντική αντιοξειδωτική ικανότητα. Επομένως, τα επίπεδα της γλουταθειόνης (GSH) αυξήθηκαν σημαντικά έπειτα από επώαση με την ενθυλακωμένη σκόνη. Ως πιθανή αιτία της παρατηρούμενης αύξησης στα επίπεδα GSH μπορεί να είναι η επαγωγή των μοριακών μηχανισμών που σχετίζονται με τη βιοσύνθεση της GSH, όπως για παράδειγμα η αύξηση είτε σε επίπεδο μεταγραφής ή μετάφρασης της έκφρασης των ενζύμων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση της GSH.

Ακόμη, με τη βοήθεια της κυτταρομετρίας ροής προσδιορίστηκαν τα επίπεδα των ROS, όπου δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικά σημαντική αλλαγή στο ενθυλακωμένο εκχύλισμα σε σχέση με τα επίπεδα του control. Αυτό το αποτέλεσμα ήταν σε αντίθεση με την αύξηση της GSH που προκλήθηκε από το εκχύλισμα. Δηλαδή, το αναμενόμενο ήταν το εκχύλισμα να μειώσει τα επίπεδα των ROS στα κύτταρα. Για το λόγο αυτό εξετάστηκε και αν το εκχύλισμα μπορεί μεν να μην μειώνει τα ελεύθερα επίπεδα των ROS, αλλά να αυξάνει την προστασία από οξειδωτικές βλάβες. Έτσι εξετάστηκε η πιθανή προστασία του εκχυλίσματος έναντι

της λιπιδικής υπεροξειδωσης. Πρόκειται για μια μέθοδο που ανιχνεύει φωτομετρικά τα επίπεδα της μηλονικής διαλδεϋδης (MDA) μέσω σύνδεσης με το θειοβαρβιτουρικό οξύ κι έτσι μπορούν να προσδιοριστούν τα επίπεδα λιπιδικής υπεροξειδωσης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα κύτταρα που επώαστηκαν με το ενθυλακωμένο εκχύλισμα 10% των φύλλων ελιάς παρουσίασαν σημαντική μείωση της λιπιδικής υπεροξειδωσης σε ποσοστό 19,3% σε σχέση με το control γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το εκχύλισμα προστατεύει από τη λιπιδική υπεροξειδωση. Επίσης, μειώθηκε η οξειδωση των πρωτεϊνών στα κύτταρα που προστέθηκε το εκχύλισμα κατά 22,5% σε σύγκριση με τα κύτταρα control.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα έδειξαν πως τα παραπροϊόντα της ελαιουργίας όπως είναι τα φύλλα ελιάς θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε συμπληρώματα διατροφής, καλλυντικά, και στη φαρμακολογία λόγω της ισχυρής αντιοξειδωτικής δράσης τους. Επίσης, στα ενδοθηλιακά κύτταρα φαίνεται ότι η αύξηση της αντιοξειδωτικής δράσης από το εκχύλισμα που ενθυλακώθηκε σε μαλτοδεξτρίνη οφείλεται κυρίως στην αύξηση των επιπέδων της GSH, η οποία οδήγησε και σε προστασία από λιπιδική υπεροξειδωση καθώς και την οξειδωση των πρωτεϊνών. Επιπλέον η ενθυλάκωση του εκχυλίσματος μπορεί να αυξήσει τη βιοδιαθεσιμότητα του, και έτσι μπορεί να χρησιμοποιηθεί από την βιομηχανία, για ενίσχυση – βελτίωση προϊόντων διατροφής και φαρμακευτικών σκευασμάτων αλλά και καλλυντικών, έτσι ώστε, με την κατάλληλη προσθήκη αυτών σε ποτό, τρόφιμο, καλλυντικό ή φαρμακευτικό σκεύασμα, να προσδίδονται οι αντιοξειδωτικές του ιδιότητες.

BIBΙΟΓΡΑΦΙΑ

- *Barrajón-Catalán E, Taamalli A, Quirantes-Piné R, Roldan-Segura C, Arráez-Román D, Segura-Carretero A, Micol V, Zarrouk M.J Pharm Biomed Anal. 201
Differential metabolomic analysis of the potential antiproliferative mechanism of olive leaf extract on the JIMT-1 breast cancer cell line.
- *Benavente-García O, Castillo J, Lorente J, Alcaraz M.J Med Food 2002 Fall;5(3):125-35
Radioprotective effects in vivo of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves against X-ray-induced chromosomal damage: comparative study several flavonoids and sulfur-containing compounds
- * Botsoglou E, Govaris A, Ambrosiadis I, Fletouris D, Botsoglou N Meat Sci. 2014 Oct;98(2):150-7. doi: 10.1016/j.meatsci.2014.05.015. Epub2014 May 2. Effect of olive leaf (*Olea Euro* L.) extracts on protein and lipid oxidation of longterm frozen -3 fatty acids enriched pork patties.
- * Boulton DW, Walle UK, Walle T. Extensive binding of the bioflavonoid quercetin to human plasma proteins. J Pharm Pharmacol. 1998 50:243–249.
- *Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C, “*Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity*”, Food Science and Technology, 28, 25–30, 1995.
- * Brenes, M., Garcia, A., Garcia, P., Rios, J. J., & Garrido, A. (1999). Phenolic compounds in Spanish olive oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry 47(9), 3535–3540.
- * Coldham και Sauer 2000. Coldham NG, Sauer MJ. Pharmacokinetics of [(14)C] Genistein in the rat: gender-related differences, potential mechanisms of biological action, and implications for human health. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2000 164:206–215.
- * Coldham και Sauer 2000. Coldham NG, Sauer MJ. Pharmacokinetics of [(14)C] Genistein in the rat: gender-related differences, potential mechanisms of biological action, and implications for human health. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2000 164:206–215.
- *Dotan Y, Lichtenberg D, Pinchuk L, “*Lipid peroxidation cannot be used as*

universal criterion of oxidative stress”, Progr Lipid Res, 43: 200-227, 2004.

* Diego Carnaroglio Laura Rinaldi, , Laura Rotolo, and Giancarlo Cravotto 2015
AMicrowave-Based Chemical Factory i the Lab: From Milligram to Multigram
Preparations

*Enviromentl health criteria for phenol
www.inhem.org/documents/ehc/ehc/ehc161.htm

*Finkel T. and Holbrook N. Oxidans, oxidative stress and the biology of ageing.
Nature, 48:239-247(2000)

* Fritz WA, Coward L, Wang J, Lamartiniere CA. Dietary genistein: perinatal
mammary cancer prevention, bioavailability and toxicity testing in the rat.
Carcinogenesis.1998 19:2151–2158

* Fuhrman B, Volkova N, Aviram M. Oxidative stress increases the expression
of the CD36 scavenger receptor and the cellular uptake of oxidized low-density
lipoprotein in macrophages from atherosclerotic mice: protective role of
antioxidants and of paraoxonase. Atherosclerosis. 2002 Apr;161(2):307-16.

* Gibbs, B. F., Kermasha, S., Alli, I., & Mulligan, N., 1999. Encapsulation in the food
: A review. International Journal of Food Science & Nutrition, 50, 213-224.

*Gooch E Ten plus one things you may not know about olive. Epikouria Magazine.
Fall-Spring. 2005. [accessed on 5 November 2011. Available online:
<http://www.epikouria.com/issue1/10+1-things-olives.php>

* google-olive tree cures

* Halliwell B, Cross CE. Oxygen derived species: their relation to human
disease and environmental stress. *Environ Health Perspect.* 1994 102:5-12.

* Halliwell B and Gutteridge JMC, “*Role of free radicals and catalytic metalions in
human disease: an overview*”, in Parker L, Glazer AN , *Methods in Enzyme* bgy
186, 1990.

* Halliwell B, Gutteridge JMC, “*The antioxidants of human extracellular fluids*”,
Archives of Biochemistry and Biophysics 280: 1–8, 1990.

* Halliwell B., (1997), Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutr
Rev* 55:S44–9

- * Hollman PC, Katan MB. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomed Pharmacother.* 1997 51:305–310.
- * Jemai H, El Feki A, Sayadi S. Antidiabetic and antioxidant effects of hydroxytyrosol and oleuropein from olive leaves in alloxan-diabetic rats. *J AgricFoodChem.* 2009; 57(19): 8798-804. DOI: 10.1021/jf901280r
- * Katsoulieiris EN The olive leaf extract oleuropein exerts protective effects against oxidant-induced cell death, concurrently displaying pro-oxidant activity in human hepatocarcinoma cells. 2016
- * Manna C, Migliardi V, Golino P, Scognamiglio A, Gallett P, Chiariello M Zappia V. Oleuropein prevents oxidative myocardial injury induced by ischemia and reperfusion. *J Nutr Biochem.* 2004; 15(8): 461-6.
- * Khadija Muhamed Ahmed, 2013 The effect of olive leaf extract in decreasing the expression of two pro-inflammatory cytokines in patients receiving chemotherapy for cancer. A randomized clinical trial
- * Martins I.M., Barreiro, M.F., Coelho, M., & Rodrigues, A.E. (2013). *Microencapsulation of essential oils with biodegradable polymeric carriers for cosmetic applications.* *Chemical Engineering Journal*, 245(0): 191-200.
- * Nesterenko, A., Alric, I., Silvestre, F., & Durrieu, V. (2013). Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness. *Industrial Crops and Products*, 42(0): 469-479.
- * Parzonko A, Czerwińska ME, Kiss AK, Naruszewicz M. Oleuropein and oleacein may restore biological functions of endothelial progenitor cells impaired by angiotensin II via activation of Nrf2/hemeoxygenase-1 pathway. *Phytomedicine.* 2013;20: 1088-94
- * Patsoukis N, Zervoudakis G, Panagopoulos NT, Georgiou CD, Angelatou F, Matsokis NA (2004). Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylene tetrazol-induced epileptic seizure. *Neurosci Lett* 357, 83-86.
- * Polyphenols benefits of olive leaf (*Olea europaea* L) to human health. Patricia Vogell, Isabel Kasper Machado^{2,3}, Juliano Garavaglia^{2,3}, Valdeni Terezinha Zani², 2015. Daiana de Souza² and Simone Morelo Dal Bosco^{1,2,104}

- *Prior R, Xianli W, Schaich K, “Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements”, *J Agric Food Chem*, , 53 (6) 1841-1856, 2005
- * Ribarova F., Zanev R., Shishkov S., Rizov N. α -Tocopherol, fatty acids and their correlations in Bulgarian foodstuffs. *J. Food Compos. Anal.* 2003;16:659–667
- * RosenG. ,et.AL., 1999 mechanism of superoxide generation by neuronal nitric-oxide synthase *J Biol Chem.* 1999 Apr 2;274(14):9573-80.
- * RosenG.M., et.al., 1999 Mechanism of superoxide generation by neuronal nitric-oxide synthase. *J Biol Chem.* 1999 Apr 2;274(14):9573-80.
- * RyanD., RobardsK. Phenolic compounds in olives. *Analyst.* 1998;123:31R–44R.
- * Sansoucy R., Alibes X., Berge O, Martilotti and Zoiopoulos (1985) Olive by products for animal feed FAO Animal production and health paper 43 ISBN 92-5-101488-4.
- * Soler-Rivas C., Epsin J.C., Wichers H.J. Oleuropein and related compounds. *J. Sci. Food Agric.* 2000;80:1013–1023.
- * Stagos D, Karaberis E anf Kouretas D, (2005), Assesment of antioxidant/ anticarcinogenic activity of plant extracts by a compination of molecural methods, *In Vivo:* 741-747
- *USDA Database for Flavonoid Content of Selected Foods www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc3220617
<http://ajcn.nutrition.org/content/81/1/215S.full>
<http://apjcn.nhri.org.tw/server/APJCN/VOLUME14/vol14.2/fullArticles/Vattem.pdf>
- *Vaya J, Aviram M, Mahmood S, Hayek T, Grenadir E, Hoffman A, Milo S. Free Radic Res. 2001 Selective distribution of oxysterols in atherosclerotic lesions and human plasma *May*;34(5):485-97. lipoproteins.
- * winebees.wordpress.com
- * W. Routray, V. Orsat. Microwave-assisted extraction of flavonoids: a review, *Food Bioprocess Technol.*, 5:409-424 (2012)
- * H.F. Zhang, X.H. Yang, Y. Wang. Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: current status and future directions, *Trends Food Sci. Technol.*, 22:672-688 (2011).

* Zeller, B. L., Saleeb, F. Z., & Ludescher, R. D., 1999. Trends in development of porous carbohydrate food ingredients for use in flavor encapsulation. Trends in Food Science & Technology, 9, 389-394

*Καραταγλης Σ. Φυσιολογία φυτών Γ' έκδοση 1994 Εκδόσεις Artof Text

* Υπουργείο γεωργίας, φυσικών πόρων και περιβάλλοντος Λευκωσίας(ΥΓΦΠΠ) (2002). Η ελιά.

* Χημεία Ιατρικών Επιστημών. Γ. Ε. ΜΑΝΟΥΣΑΚΗ Εκδόσεις Κυριακίδη Α.Ε 2000