



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

« Αποτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλίσματος ελαιόλαδου ενδημικής ποικιλίας Olea Europaea που εκφύεται στο Άγιο Όρος, σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα Eahy926 και ανθρώπινα κύτταρα του τράχηλου της μήτρας Hela »

« Assessment of the antioxidant activity of an olive oil total polyphenolic fraction from a Greek Olea europea variety in endothelial and Hela human cells »



Γεωργία-Άννα Χατζηευφραιμίδη

Λάρισα 2017

Τριμελής εξεταστική επιτροπή

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

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

Δημήτριος Κομιώτης: Καθηγητής Οργανικής Χημείας με έμφαση στη σύνθεση Βιοδραστικών Μορίων, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Δημήτριου Κουρέτα. Θα ήθελα λοιπόν να του εκφράσω τις ευχαριστίες μου για την ανάθεση του θέματος, την πολύτιμη βοήθεια του, το ενδιαφέρον αλλά και το χρόνο που διέθεσε για τη διεκπεραίωση της πτυχιακής μου εργασίας.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Δημήτριο Στάγκο για την βοήθεια του κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην υποψήφια διδάκτορα Παρασκευή Κούκα για την καθοριστική βοήθεια, την υπομονή, τον σεβασμό και για τον χρόνο που αφιέρωσε όλον αυτόν τον καιρό στο εργαστήριο. Ήταν δίπλα μου σε όλα και έτοιμη να μου μεταφέρει τις γνώσεις της σε κάθε μου απορία.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω και όλη την ομάδα του εργαστηρίου, οι οποίοι δημιούργησαν ένα φιλικό κλίμα συνεργασίας και ήταν πρόθυμοι να επιλύσουν οποιαδήποτε απορία μου.

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

Περίληψη

Από την αρχαιότητα είναι γνωστό ότι το ελαιόλαδο στη διατροφή μας είναι ζωτικής σημασίας για την υγεία του κάθε οργανισμού. Λόγω του γεγονότος ότι είναι τόσο διαδεδομένο και καταναλώνεται πολύ έχει στρέψει το επιστημονικό ενδιαφέρον πάνω του και ως αποτέλεσμα έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες με σκοπό την διερεύνηση των ιδιοτήτων του σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Στη συγκεκριμένη μελέτη εξετάστηκαν οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες ενός πολυφαινολικού κλάσματος ελαιολάδου (TPF), πλούσιο σε πολυφαινόλες, από μια Ελληνική ενδημική ποικιλία *Olea europaea*, που καλλιεργείται στο Άγιο Όρος. Αξιοσημείωτο είναι ότι μέχρι σήμερα, τουλάχιστον εξ όσων γνωρίζουμε, δεν υπάρχουν διαθέσιμες μελέτες που να διερευνούν τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες ενός συνολικού εκχυλίσματος ελαιόλαδου σε κυτταροκαλλιέργειες. Τα αποτελέσματα των αντιοξειδωτικών αξιολογήθηκαν σε κυτταρικό επίπεδο, και συγκεκριμένα σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα (EA.hy926) και καρκινικά κύτταρα τραχήλου της μήτρας (HeLa). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα το εκχύλισμα TPF προστατεύει τα κύτταρα από το οξειδωτικό στρες, εξαιτίας της ισχυρής αντιοξειδωτικής δράσης των πολυφαινολών του και βελτιώνει την οξειδοαναγωγική τους κατάσταση καθώς παρατηρείται αύξηση γλουταθειόνης (GSH) και μείωση της λιπιδιακής υπεροξείδωσης και των επιπέδων των καρβονυλίων.

Abstract

It is known that olive oil in our diet is vital for the health of each organism. Since it is so widely consumed, it has attracted scientific interest and several studies have been conducted in order to investigate its properties in various pathological situations. This study examined the antioxidant properties of a polyphenolic fraction of olive oil (TPF), rich in polyphenols, from a Greek endemic variety *Olea europaea* grown on Mount Athos. It is noteworthy to date that at least to our knowledge, there are no studies available to investigate the antioxidant properties of a total olive oil extract in cell cultures. The effects of antioxidants were evaluated at the cellular level, namely human endothelial cells (EA.hy926) and uterine cervical cancer cells (HeLa). According to the results, the TPF extract protects cells from oxidative stress due to the strong antioxidant action of its polyphenols and improves their redox status as we observed increased on glutathione (GSH) levels and decreased lipid peroxidation and protein carbonyl levels.

Περιεχόμενα

Τριμελής εξεταστική επιτροπή	2
Ευχαριστίες	3
Περίληψη	4
Abstract	5
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	11
1.1. Ελεύθερες ρίζες.....	11
1.2. Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS)	12
1.2.1. Δημιουργία Ελευθέρων Ριζών	13
1.3. Οξειδωτικό Στρες – Αντιοξειδωτική Άμυνα.....	15
1.4. Διαταραχές Οξειδωτικού Στρες	17
1.5. Ευεργετικές Επιδράσεις Ελεύθερων Ριζών.....	18
1.6. Πολυφαινόλες	19
1.6.1. Χημική Δομή Και Τάξεις Πολυφαινολών	19
1.6.2. Ευεργετικές Επιδράσεις Πολυφαινολών.....	21
1.7. Σημαντικά αντιοξειδωτικά μόρια που μελετήθηκαν	23
1.7.1. Γλουταθειόνη (GSH)	23
1.7.2. Λιγάνση της γ-γλουτάμυλο κυστεΐνης (<i>γ-gcl</i>)	24
1.7.3. Αλβουμίνη (Albumin).....	24
1.8. Γονίδιο glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH).....	25
1.9. Ελιά	25
1.9.1. Ελαιόλαδο	27
1.9.2. Χημική Σύσταση Ελαιολάδου	28
1.9.3. Πολυφαινολικες ενώσεις ελαιόλαδου	28
1.9.4. Διατροφική αξία Ελαιολάδου	29
1.10. Κυτταρικές σειρές.....	31

1.10.1. Ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926	31
1.10.2. Καρκινικά κύτταρα τραχήλου της μήτρας HeLa	32
2. ΣΚΟΠΟΣ	33
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	33
3.1. Το εκχύλισμα της μελέτης	33
3.2. Αντιδραστήρια	34
3.3. Καλλιέργεια των κυτταρικών σειρών EA.hy926 και HeLa.....	34
3.4. Προσδιορισμός της κυτταροτοξικής δράσης του εκχυλίσματος με τη μέθοδο XTT.....	35
3.5. Προσδιορισμός των επιπέδων της GSH και των ROS με κυτταρομετρία ροής	37
3.6. Λύση κυττάρων.....	38
3.6.1. Προσδιορισμός των επιπέδων των TBARS.....	39
3.6.2. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων	40
3.6.3. Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford.....	41
3.7. Western Blot Analysis	42
3.8. Προσδιορισμός αλβουμίνης μέσω του αντιδραστηρίου Bromocresol Green...	43
3.9. Στατιστική ανάλυση.....	44
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	44
4.1 Μέθοδος XTT	44
4.1.1. Ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα (EA.hy926)	45
4.1.2. Ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα τραχήλου της μήτρας (HeLa)	45
4.2. Προσδιορισμός της οξειδοαναγωγικής κατάστασης με κυτταρομετρία ροής ..	46
4.2.1. Επίπεδα γλουταθειόνης (GSH).	46
4.2.2. Επίπεδα δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS).	51
4.3 Ουσίες που αντιδρούν με το Θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS).....	54
4.3.1. Επίπεδα Tbars σε EA.hy926	54

4.3.2. Επίπεδα Tbars σε HeLa	55
3.4 Πρωτεϊνικά καρβονύλια (protein carbonyls)	56
3.4.1. Πρωτεϊνικά καρβονύλια σε EA.hy926	56
4.4.2. Πρωτεϊνικά καρβονύλια σε HeLa	56
4.5. Προσδιορισμός επιπέδων αλβουμίνης μέσω αντιδραστηρίου bromocresol green.....	57
4.5.1. Ποσοστό αλβουμίνης σε σχέση με την συνολική πρωτεΐνη σε EA.hy926	57
4.5.2. Ποσοστό αλβουμίνης σε σχέση με την συνολική πρωτεΐνη σε HeLa	58
4.6 Western blot	59
4.6.1 Επίπεδα αλβουμίνης σε EA.hy926, με western blot.....	59
4.6.2 Επίπεδα καταλυτικής υπομονάδας της γ - GCL (γ -GCLc) σε EA.hy926 ...	60
4.6.3. Επίπεδα αλβουμίνης σε HeLa, με western blot	61
4.6.4 Επίπεδα γ - GCLc σε HeLa.....	63
4.7. Συνοπτικά.....	64
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	65
6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	73

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Δραστικές μορφές οξυγόνου και τα ηλεκτρόνια της εξωτερικής τους στιβάδας.....	12
Εικόνα 2: Παραγωγή ROS στα μιτοχόνδρια.....	13
Εικόνα 3: Εξωγενείς παράγοντες που οδηγούν στην παραγωγή ελευθέρων ριζών.....	15
Εικόνα 4: Δημιουργία οξειδωτικού στρες	16
Εικόνα 5: Τρόπος δράσης μιας αντιοξειδωτικής ουσίας	17
Εικόνα 6: Διαταραχές που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες.....	18
Εικόνα 7: Δομή μιας φαινόλης	19
Εικόνα 8: Δράσεις των πολυφαινόλων	22
Εικόνα 9: Αντιδράσεις παραγωγής GSH	24
Εικόνα 10: Παραγωγή ελαιόλαδου στην Ελλάδα ανά περιφέρεια	27
Εικόνα 11: Ποικιλίες που συναντάμε στην Ελλάδα	28
Εικόνα 12: Κύριες πολυφαινόλες ελαιολάδου.....	29
Εικόνα 13: Αντιοξειδωτικές ουσίες στο ελαιόλαδο.....	30
Εικόνα 14: Χημική δομή ελαιοκανθάλης	30
Εικόνα 15: Χημική δομή βιταμίνης E.....	31
Εικόνα 16: Ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 από καλλιέργεια όπως φαίνονται σε ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο	32
Εικόνα 17: HeLa κύτταρα από καλλιέργεια όπως φαίνονται σε ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο	32
Εικόνα 18: Μεταβολισμός του XTT σε υδατοδιαλυτή φορμαζάνη από ζωντανά κύτταρα	36
Εικόνα 19: Υδροδυναμική εστίαση του δείγματος μέσα από θάλαμο ροής.....	37
Εικόνα 20: Οι πιθανοί μηχανισμοί με τους οποίους το TPF ασκεί τα αποτελέσματά του στα επίπεδα GSH.....	71

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Δραστικές μορφές οξυγόνου	12
Πίνακας 2: Χημική σύσταση ελαιόλαδου της μελέτης.....	33
Πίνακας 3: Συνοπτικά αποτελέσματα	64

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1:	45
Διάγραμμα 2:	46
Διάγραμμα 3:	47
Διάγραμμα 4:	48
Διάγραμμα 5:	49
Διάγραμμα 6:	50
Διάγραμμα 7:	51
Διάγραμμα 8:	52
Διάγραμμα 9:	53
Διάγραμμα 10:	54
Διάγραμμα 11:	55
Διάγραμμα 12:	55
Διάγραμμα 13:	56
Διάγραμμα 14:	57
Διάγραμμα 15:	58
Διάγραμμα 16:	58
Διάγραμμα 17:	59
Διάγραμμα 18:	61
Διάγραμμα 19:	62
Διάγραμμα 20:	63

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Ελεύθερες ρίζες

Ως ελεύθερη ρίζα ορίζεται ένα μόριο ή άτομο που περιέχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στιβάδα σθένους (Halliwell & Gutteridge, 1990) και μπορεί να προκύψει είτε με την προσθήκη είτε με την απώλεια ενός ηλεκτρονίου από την εξωτερική ηλεκτρονιακή του στιβάδα (Mylonas & Kouretas, 1999). Ασύζευκτο ηλεκτρόνιο ονομάζεται αυτό που καταλαμβάνει μόνο του ένα ατομικό ή μοριακό τροχιακό και πρόκειται για ιδιαίτερα ασταθή μόρια που έχουν την τάση να αντιδρούν εύκολα με άλλα μόρια οξειδώνοντάς τα. Παράλληλα οι ελεύθερες ρίζες ανάγονται σε μια πιο σταθερή δομή. Η αντίδραση αυτή γίνεται με σκοπό να συμπληρωθεί η εξωτερική στιβάδα των ελεύθερων ριζών. Η παραγωγή των ελευθέρων ριζών μπορεί να πραγματοποιηθεί υπό φυσιολογικές βιολογικές διαδικασίες που πραγματοποιούνται εντός των κυττάρων ενός οργανισμού αλλά και όταν ο οργανισμός εκτίθεται σε συγκεκριμένης τοξικότητας περιβάλλον. Οι ελεύθερες ρίζες είναι πολύ δραστικά μόρια και μπορούν να προκαλέσουν βλάβες σε διάφορα βιολογικά μακρομόρια με αποτέλεσμα να επηρεάσουν διάφορες φυσιολογικές λειτουργίες του κυττάρου και κατ' επέκταση του οργανισμού.(Lobo, Patil, Phatak, & Chandra, 2010)

Ελεύθερες ρίζες σχηματίζονται όταν διασπάται ένας ομοιοπολικός δεσμός και ένα ηλεκτρόνιο παραμένει με κάθε νεοσχηματισμένη χημική οντότητα. Οι ελεύθερες ρίζες είναι πολύ δραστικές, λόγω της παρουσίας των ασύζευκτων ηλεκτρονίων και τείνουν να "αποσπάσουν" ηλεκτρόνια από γειτονικά μόρια. Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδρούν είτε μεταξύ τους είτε με διάφορα άλλα μόρια τα οποία δεν είναι ρίζες. Όταν αντιδρούν μεταξύ τους οδηγούν στην παραγωγή μιας μη ρίζας. Η μη ρίζα αυτή συνήθως είναι λιγότερο δραστική από εκείνες που οδήγησαν στην παραγωγή της. Όταν οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με μία μη ρίζα, όπως είναι τα περισσότερα βιομόρια (DNA, λιπίδια, πρωτεΐνες), παράγονται νέες ρίζες οι οποίες στην συνέχεια μπορούν να αντιδράσουν με άλλα μόρια και να οδηγήσουν στην παραγωγή νέων ριζών. Η διαδικασία αυτή μπορεί να συνεχιστεί αλυσιδωτά με δυσμενείς συνέπειες για τον οργανισμό (B Halliwell & Gutteridge, 1990). Υπάρχουν διάφοροι τύποι ελευθέρων ριζών που μπορούν να έχουν ως κεντρικό άτομο το οξυγόνο, το άζωτο, το θείο, τον άνθρακα αλλά και άλλα μόρια.

Οι πλέον σημαντικές ελεύθερες ρίζες είναι μοριακά είδη με κέντρο το

οξυγόνο και μερικές φορές το άζωτο (Sengupta et al., 2004; Pani and Galeotti, 2010; AICR, 2007), το θείο (Battin et al., 2009; Pani and Galeotti, 2010) ή τον άνθρακα.

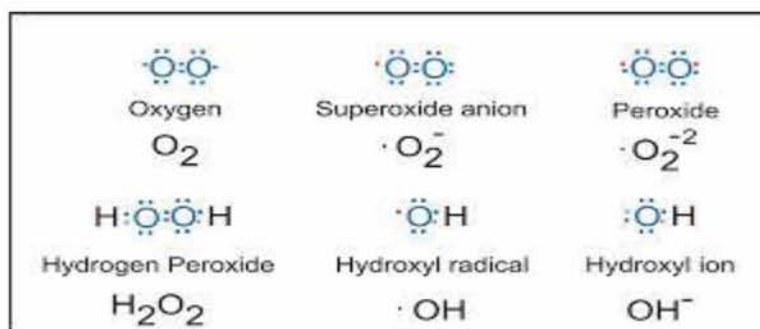
1.2. Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS)

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

Πίνακας 1: Δραστικές μορφές οξυγόνου

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

Στην παρακάτω εικόνα (εικόνα 1) απεικονίζονται δραστικές μορφές οξυγόνου και τα ηλεκτρόνια της εξωτερικής τους στιβάδας και μπορούν να διακριθούν τα μονήρη ηλεκτρόνια που διαθέτει το ανιόν σουπεροξειδίου και η ρίζα υδροξυλίου.



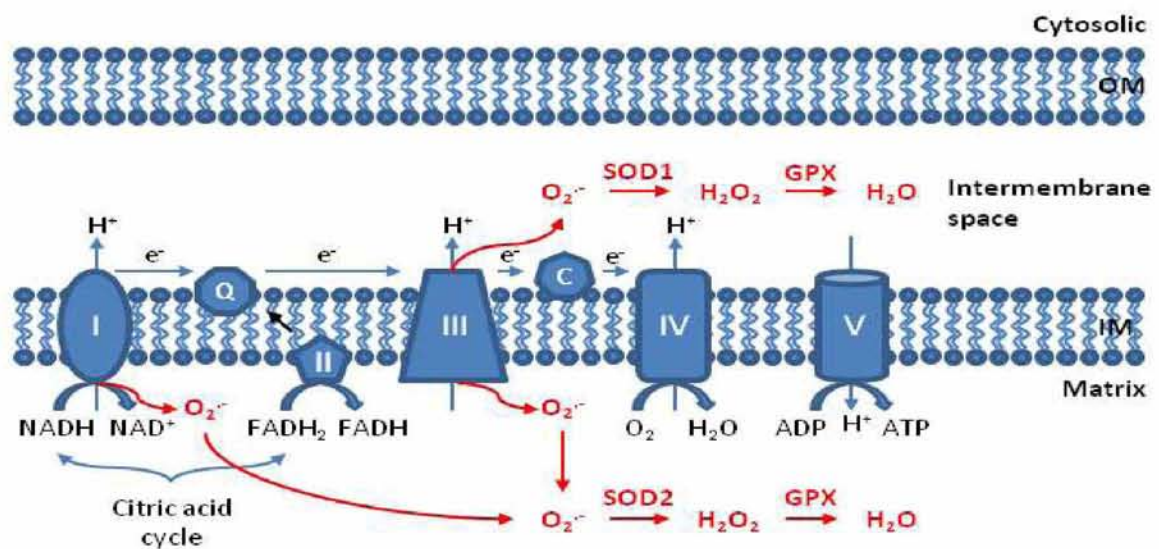
Εικόνα 1: Δραστικές μορφές οξυγόνου και τα ηλεκτρόνια της εξωτερικής τους στιβάδας

1.2.1. Δημιουργία Ελευθέρων Ριζών

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

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

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



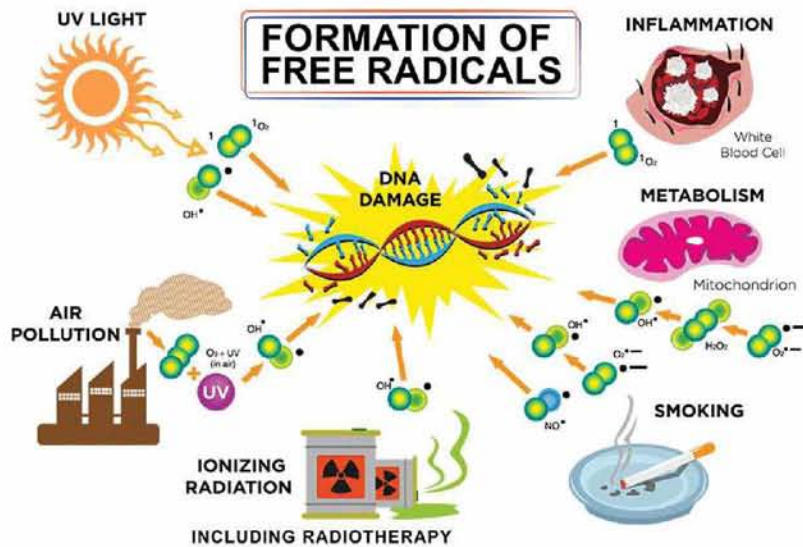
Εικόνα 2: Παραγωγή ROS στα μιτοχόνδρια

Β) Το υπόλοιπο οξυγόνου που εισέρχεται στην κυκλοφορία αλλά δε καταλήγει στα μιτοχόνδρια, χρησιμοποιείται από ενζυμικά συστήματα στο κυτταρόπλασμα και το ενδοπλασματικό δίκτυο, όπως η NADH οξειδάση, η οξειδάση του κυτταροχρώματος P450, η κυκλοξυγενάση, η λιποξυγενάση και η ξανθινοξειδάση. Αυτά τα ένζυμα με τη σειρά τους, μεταφέρουν σταδιακά ένα ηλεκτρόνιο στο μοριακό οξυγόνο, ώστε να μην το ανάγουν πλήρως και σε κάθε στάδιο παράγεται ένα ενδιάμεσο προϊόν. Κατά συνέπεια, έχουμε σταδιακή αναγωγή του μοριακού οξυγόνου προς νερό, με τα ενδιάμεσα προϊόντα να είναι κατά σειρά παραγωγής τους, το $O_2^{\cdot-}$, το H_2O_2 και το HO^{\cdot} (Παπαγαλάνης, 2014).

Γ) Κάποια ιόντα μετάλλων (σίδηρος, χαλκός, χρώμιο, κοβάλτιο, αρσενικό, κάδμιο, νικέλιο), που αποτελούν σημαντικούς ενζυμικούς συμπαράγοντες, όταν βρεθούν στην ελεύθερη μορφή τους μέσα σε βιολογικά συστήματα μπορούν να προκαλέσουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων σε ευπαθή μακρομόρια, όπως οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια και το DNA, προκαλώντας έτσι καταστροφές. (Barrera, 2012)

Δ) Τέλος, η παραγωγή ελεύθερων ριζών λαμβάνει χώρα και στο ανοσοποιητικό σύστημα. Πιο συγκεκριμένα, ορισμένα από τα κύτταρα του συστήματος αυτού παράγουν ελεύθερες ρίζες για να εξουδετερώσουν βακτήρια εισβολείς και βιολογικά υλικά (μεταμοσχευθέντα όργανα ή ιστοί). Τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα παρουσιάζουν αυξημένη κατανάλωση οξυγόνου που συνοδεύεται από παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων ελευθέρων ριζών. (Knight, 2000)

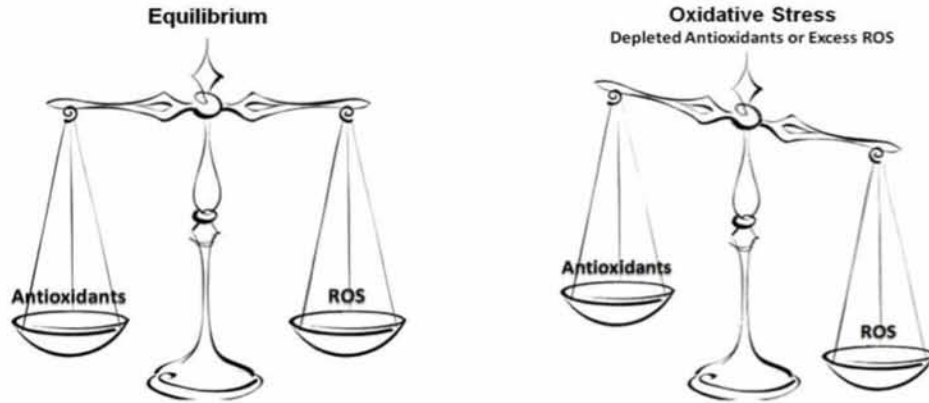
Εκτός από ενδογενείς παράγοντες, υπάρχουν και εξωγενείς όπως άγχος, διατροφή και τρόπος ζωής που είναι ικανοί να οδηγήσουν σε παραγωγή ελευθέρων ριζών. Συγκεκριμένα η έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία, υπεριώδους φωτός, περιβαλλοντικής μόλυνσης, χρήσης καπνού και η χρήση χημικών φαρμάκων, αλκοόλ και συντηρητικών των τροφών προκαλούν βλάβη στο DNA, στα λιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών και στις πρωτεΐνες. (Εικ.3) (Phaniendra, Jestadi, & Periyasamy, 2015)



Εικόνα 3: Εξωγενείς παράγοντες που οδηγούν στην παραγωγή ελευθέρων ριζών

1.3. Οξειδωτικό Στρες – Αντιοξειδωτική Άμυνα

Σε κάθε βιολογικό σύστημα πρέπει να διατηρείται η ισορροπία μεταξύ του σχηματισμού και της απομάκρυνσης δραστικών ειδών οξυγόνου και αζώτου. Σε περίπτωση, όμως, που προκύψει μια σοβαρή δυσαναλογία μεταξύ των δραστικών ειδών οξυγόνου και αζώτου και του αντιοξειδωτικού μηχανισμού του οργανισμού σε βάρος του τελευταίου, τότε παρατηρείται το φαινόμενο του οξειδωτικού στρες (Pisoschi & Pop, 2015). Το φαινόμενο αυτό, δημιουργεί μια άνιση σχέση προοξειδωτικής και αντιοξειδωτικής ισορροπίας, η οποία καταλήγει σε μια σειρά δομικών και λειτουργικών κυτταρικών αλλαγών, που μπορούν να οδηγήσουν το κύτταρο σε απόπτωση ή νέκρωση.(Espinosa-Diez et al., 2015) Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκληθεί είτε από μείωση της δράσης των αντιοξειδωτικών μηχανισμών είτε από αυξημένη παραγωγή δραστικών ειδών αζώτου και οξυγόνου. Στην πρώτη περίπτωση, παρατηρούνται διάφορες μεταλλάξεις και τοξικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων, εξάντληση των ενδογενών αντιοξειδωτικών παραγόντων λόγω πιθανής παθολογικής κατάστασης, καθώς και μείωση των αντιοξειδωτικών ουσιών που προσλαμβάνονται μέσω της τροφής. Στη δεύτερη περίπτωση, έχουμε έκθεση των κυττάρων σε υψηλά επίπεδα ROS που αυξάνουν την παραγωγή τους.(Birben, Sahiner, Sackesen, Erzurum, & Kalayci, 2012)



Εικόνα 4: Δημιουργία οξειδωτικού στρες

Ως αντιοξειδωτική ουσία ορίζουμε κάθε ουσία η οποία βρίσκεται σε μικρές συγκεντρώσεις σε σύγκριση με το υπόστρωμα που οξειδώνεται και η οποία καθυστερεί σημαντικά ή αποτρέπει την οξείδωση του υποστρώματος αυτού. (Vaya J. and Aviram M. 2001; Krinsky 2002).

Η βασική διάκριση των αντιοξειδωτικών γίνεται με βάση την προέλευσή τους (εξωγενή ή ενδογενή), τη διαλυτότητά τους (υδρόφιλα ή λιπόφιλα) και τη χημική τους φύση (ενζυμική ή μη ενζυμική). (Flora, 2009)

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

μερικά μέλη του συμπλέγματος βιταμινών Β και η γλουταθειόνη (Gerogianni & Gourgoulianis 2006).

Επιπρόσθετα, τα πιο συνηθισμένα εξωγενή αντιοξειδωτικά είναι η βιταμίνη C, η βιταμίνη E (τοκοφερόλες), βιταμίνη A, τα φλαβονοειδή, τα φυτοχημικά και ολιγοστοιχεία (π.χ. σελήνιο, χαλκός, ψευδάργυρος, μαγνήσιο) τα οποία μπορούν να χορηγηθούν ως συμπληρώματα διατροφής. (Bouayed & Bohn, 2010)

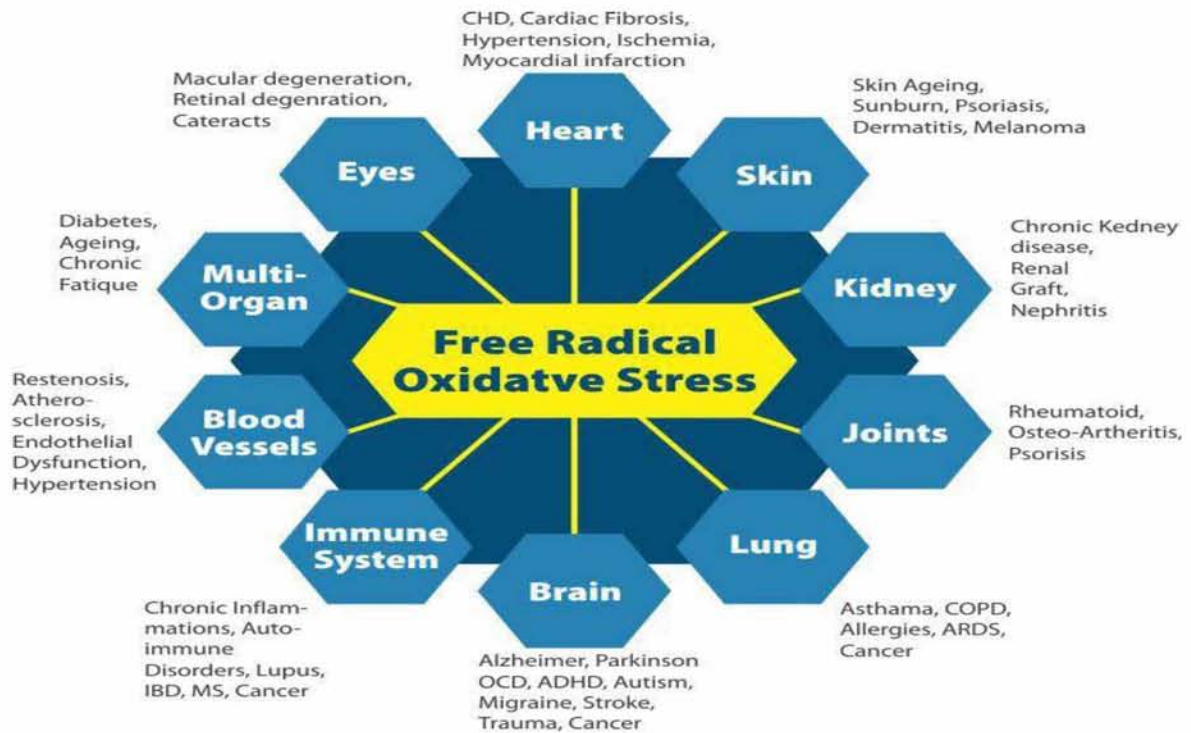


Εικόνα 5: Τρόπος δράσης μιας αντιοξειδωτικής ουσίας

1.4. Διαταραχές Οξειδωτικού Στρες

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

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



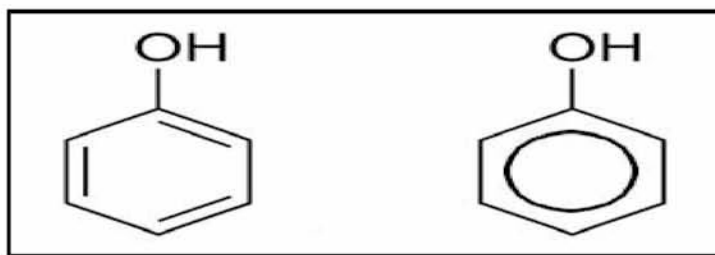
Εικόνα 6: Διαταραχές που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες

1.5. Ευεργετικές Επιδράσεις Ελεύθερων Ριζών

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

1.6. Πολυφαινόλες

Οι πολυφαινόλες είναι η μεγαλύτερη ομάδα φυτοχημικών (φυτικοί μεταβολίτες) και ένα αναπόσπαστο μέρος της διαίτας των ανθρώπων και των ζώων (Tsao, 2010). Είναι χημικές ενώσεις που αποτελούνται κυρίως από φυσικές, καθώς και συνθετικές ή ημισυνθετικές χημικές ουσίες, οι οποίες χαρακτηρίζονται από την παρουσία μεγάλων πολλαπλάσιων δομικών μονάδων της φαινόλης (Quideau, Deffieux, Douat-Casassus, & Pouysegue, 2011). Στη διεθνή βιβλιογραφία έχει επικρατήσει με τον όρο πολυφαινόλες να εννοείται μια μεγάλη ομάδα ενώσεων με ένα ή περισσότερα υδροξύλια απευθείας συνδεδεμένα με ένα άτομο άνθρακα ενός ή περισσότερων αρωματικών δακτυλίων. Ο χημικός τύπος της φαινόλης είναι C_6H_5OH , το απλούστερο των φαινολών.



Εικόνα 7: Δομή μιας φαινόλης

Γενικά τρόφιμα που περιέχουν σύνθετα μείγματα πολυφαινολών, είναι προϊόντα που καταναλώνονται ευρέως σε μεγάλες ποσότητες, όπως τα φρούτα και τα λαχανικά, το πράσινο τσάι, το μαύρο τσάι, το κόκκινο κρασί, ο καφές, η σοκολάτα, οι ελιές, τα εσπεριδοειδή, η σόγια και το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο. (Itagi & Singh, 2012) Επίσης, τα βότανα και μπαχαρικά, οι ξηροί καρποί και τα φύκια είναι επίσης δυνητικά σημαντικά για την παροχή ορισμένων πολυφαινολών (D'Archivio, Filesi, Vari, Sczzocchio, & Masella, 2010). Οι επιδράσεις στην υγεία εξαρτώνται από την ποσότητα που καταναλώνεται και από την βιοδιαθεσιμότητά τους. Οι πολυφαινολικές ενώσεις που βρίσκονται σε πολλά φαρμακευτικά φυτά, έχει βρεθεί ότι ρυθμίζουν τη δραστηριότητα ενζύμων και τη λειτουργία κυτταρικών υποδοχέων. (Middleton Jr., Kandaswami, & Theoharides, 2000)

1.6.1. Χημική Δομή Και Τάξεις Πολυφαινολών

Περισσότερες από 8.000 πολυφαινολικές ενώσεις έχουν εντοπιστεί σε διάφορα φυτικά είδη. Όλες οι φυτικές φαινολικές ενώσεις προκύπτουν από ένα κοινό

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

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

A) Φλαβονοειδή: Έχουν μια κοινή δομή, που αποτελείται από δύο δακτύλιους, οποίοι ενώνονται μεταξύ τους με 3 άτομα άνθρακα σχηματίζοντας έναν οξυγονωμένο ετερόκυκλο. Έτσι, μπορούν να διαιρεθούν σε 6 υποκατηγορίες ανάλογα με τον τύπο του ετερόκυκλου που εμπλέκεται. Αυτές είναι οι: φλαβονόλες, φλαβόνες, ισοφλαβόνες, φλαβανόνες, ανθοκυανιδίνες και φλαβανόλες (κατεχίνες, προανθοκυανιδίνες) (Manach et al. 2004; Han et al. 2007). Αποτελούν τη μεγαλύτερη ομάδα πολυφαινολικών ενώσεων που συναντάμε στην ανθρώπινη διατροφή. Τρόφιμα με υψηλή σύσταση σε φλαβονοειδή θεωρούνται το κόκκινο και πράσινο τσάι, η μαύρη σοκολάτα, τα βατόμουρα, τα κρεμμύδια, ο μαϊντανός, τα εσπεριδοειδή, οι μπανάνες και το κόκκινο κρασί (Hamly et al., 2006). Έρευνες έδειξαν ότι είναι ιδιαίτερα ευεργετικά ενάντια στον καρκίνο, τις φλεγμονές, το οξειδωτικό στρες και τις καρδιαγγειακές νόσους.

B) Μη φλαβονοειδή: Είναι κυρίως τα φαινολικά οξέα, οι λιγνάνες και τα στυλβένια. Τα φαινολικά οξέα χωρίζονται σε παράγωγα του βενζοϊκού οξέος (7 άτομα άνθρακα) και του κινamikού οξέος (9 άτομα άνθρακα) (Manach et al. 2004) και βρίσκονται κυρίως στα μήλα, τις φράουλες, τα κεράσια, τα ακτινίδια, τα κρεμμύδια, τον καφέ, το τσάι, τα βατόμουρα, η βρώμη, το κόκκινο κρασί και άλλα. Χαρακτηρίζονται από

αυξημένες αντικές, αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές και αντικαρκινικές ιδιότητες. Παραδείγματα φαινολικών οξέων είναι το καφεϊκό οξύ και το γαλλικό οξύ. Οι λιγνάνες περιέχονται σε διάφορα δημητριακά, τη σόγια, το βερίκοκο, το μπρόκολο, το λιναρόσπορο και το λάχανο. Μελέτες δείχνουν ότι παίζουν προστατευτικό ρόλο σε ασθένειες όπως ο καρκίνος, η οστεοπόρωση και η καρδιαγγειακή νόσος, αλλά ακόμα δεν έχουμε σαφή αποτελέσματα (Adlercreutz, 2007). Τα σιλβένια, τέλος, έχουν βρεθεί σε μικρές ποσότητες στην διατροφή του ανθρώπου και το πιο γνωστό αυτών είναι μια φυτοαλεξίνη, η ρεσβερατρόλη.

1.6.2. Ευεργετικές Επιδράσεις Πολυφαινόλων

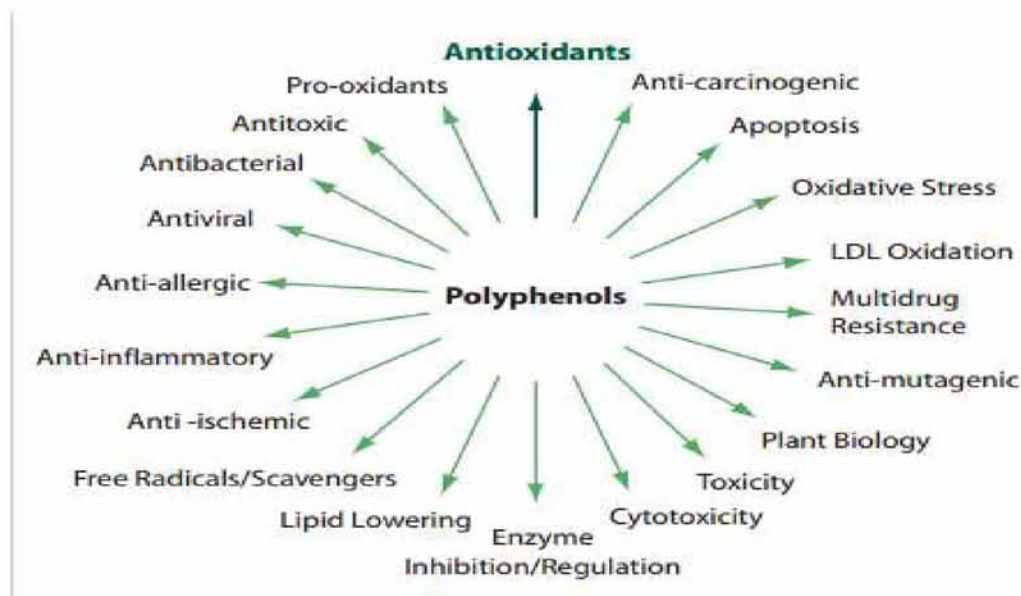
Οι πολυφαινόλες θεωρούνται μη θρεπτικά συστατικά, τα οποία όμως παρεμβαίνουν στην απορρόφηση απαραίτητων θρεπτικών συστατικών, όπως ο σίδηρος και άλλα μεταλλικά ιόντα, και στη δέσμευση πρωτεϊνών και πεπτικών ενζύμων. Οι επιπτώσεις τους στην υγεία εξαρτώνται από το ποσό της πρόσληψής τους και από τη βιοδιαθεσιμότητά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

Πιο συγκεκριμένα, μελέτες έδειξαν ότι οι πολυφαινόλες είναι ισχυρά αντιοξειδωτικά τα οποία σταθεροποιούν τις ελεύθερες ρίζες, δίνοντας σε αυτές ένα ηλεκτρόνιο ή ένα άτομο υδρογόνου. Μ' αυτόν τον τρόπο, καταστέλλουν την διάδοση των ελεύθερων ριζών (συμβαίνει μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης), μέσω της αναστολής ή απενεργοποίησης των ROS. Επίσης, δρουν ως άμεσοι δεσμευτές ριζών των αλυσιδωτών αντιδράσεων υπεροξειδωσης των λιπιδίων, με αποτέλεσμα να τις σταματούν, ενώ οι ίδιες οι πολυφαινόλες μετατρέπονται σε σταθερές ρίζες (είναι λιγότερο δραστικές). (R Rodrigo & Bosco, 2006) Επιπλέον, οι πολυφαινόλες δρουν και ως χηλικές ενώσεις, καθώς δεσμεύουν μέταλλα μετάπτωσης, όπως ο σίδηρος Fe^{2+} , μειώνοντας το ποσοστό της αντίδρασης Fenton και εμποδίζοντας την οξείδωση που συμβαίνει από τις πολύ δραστικές OH^{\bullet} . (Pietta et al., 1998) Επιπρόσθετα, μπορούν να δράσουν ως συν-αντιοξειδωτικά, αναγεννώντας βασικές βιταμίνες, αναστέλλοντας την οξειδάση της ξανθίνης, αλλά και αυξάνοντας διάφορα ενδογενή

αντιοξειδωτικά, όπως η υπεροξειδική δισμουτάση, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και η καταλάση. (Tsao, 2010)

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

Πειραματικές μελέτες σε ζώα ή ανθρώπινα καλλιεργούμενα κύτταρα έδειξαν ότι οι πολυφαινόλες παίζουν προστατευτικό ρόλο ενάντια στον καρκίνο, τις καρδιαγγειακές νόσους, το διαβήτη, τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες και την οστεοπόρωση. Άλλες ευεργετικές επιδράσεις τους όσον αφορά την υγεία του ανθρώπου, είναι η μείωση της πιθανότητας πρόκλησης ασθενειών της καρδιάς, ηπατικών ασθενειών, παχυσαρκίας, αθηροσκλήρωσης, διαφόρων αλλεργιών και ασθενειών του γαστρεντερικού σωλήνα. (Ramon Rodrigo, Libuy, Feliu, & Hasson, 2014) Παρακάτω φαίνονται οι ασθένειες με τις οποίες εμπλέκονται οι πολυφαινόλες. (Εικ. 7)



Εικόνα 8: Δράσεις των πολυφαινολών

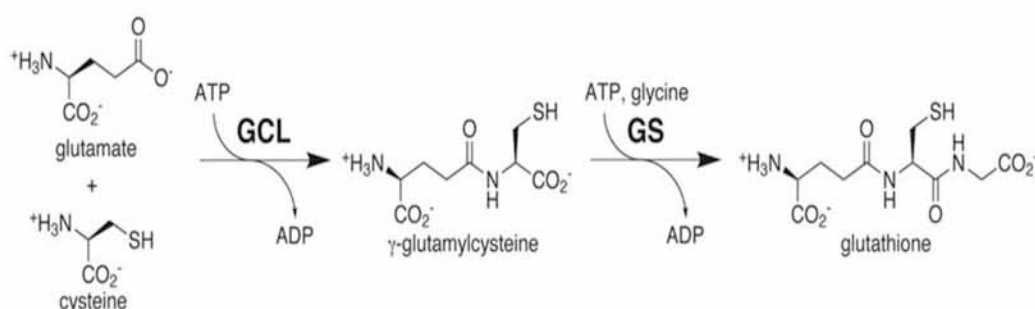
1.7. Σημαντικά αντιοξειδωτικά μόρια που μελετήθηκαν

1.7.1. Γλουταθειόνη (GSH)

Η γλουταθειόνη (*glutathione, GSH*), γνωστή (ιδίως παλαιότερα) και ως γλουταθειό, είναι οργανική χημική ένωση με σημαντική αντιοξειδωτική δράση στους ζωντανούς οργανισμούς. Από βιοχημικής πλευράς είναι ένα τριπεπτίδιο, το μόριο του οποίου αποτελείται από μόρια τριών διαφορετικών αμινοξέων: του γλουταμινικού οξέος, της κυστεΐνης (που περιέχει και το μοναδικό άτομο θείου σε όλη την ένωση) και της γλυκίνης. Η γλουταθειόνη, που απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1921 από τον Χόπκινς στη ζυθοζύμη και το ήπαρ των θηλαστικών, βρίσκεται σε αφθονία στους ζωικούς ιστούς και στις ζύμες, και λιγότερο στους ιστούς των φυτών. Η φυσιολογική περιεκτικότητα του ανθρώπινου αίματος σε γλουταθειόνη είναι 0,35 ως 0,45 gr ανά λίτρο. Μέσα στους οργανισμούς η ουσία υπάρχει σε δύο μορφές: μία ανηγμένη και μία οξειδωμένη. Αυτό της επιτρέπει να παίρνει μέρος στα φαινόμενα οξειδοαναγωγής των ιστών, να διαδραματίζει τον ρόλο μεταφορέα του υδρογόνου και να αποτελεί έναν από τους κύριους παράγοντες σταθερότητας του δυναμικού οξειδοαναγωγής του κυττάρου. Η μεταβολή του ποσοστού της ανηγμένης γλουταθειόνης στο αίμα και της σχέσεώς του με το ποσοστό της οξειδωμένης συνιστά ένδειξη μυϊκής κοπώσεως ή διάφορων νοσηρών καταστάσεων, όπως ο διαβήτης και η αβιταμίνωση. (Meister & Anderson, 1983)

1.7.2. Λιγάση της γ-γλουτάμυλο κυστεΐνης (*γ-gcl*)

Η γλουταθειόνη (GSH) όπως αναφέρθηκε είναι ένα τριπεπτιδίο αποτελούμενο από γλουταμινικό, κυστεΐνη και γλυκίνη. Το πρώτο βήμα στη σύνθεση της GSH καταλύεται από τη λιγάση της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης (*γ-GCL*). (Εικ.8) Η *γ-GCL* είναι ένα ετεροδιμερές ένζυμο αποτελούμενο από την καταλυτική (*GCLC*) και τη ρυθμιστική υπομονάδα (*GCLM*). Οι δύο υπομονάδες του ενζύμου εκφράζονται από διαφορετικά γονίδια που εντοπίζονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα. (Franklin et al., 2009)



Εικόνα 9: Αντιδράσεις παραγωγής GSH

Το πρώτο και αργό βήμα άρα και καθοριστικό βήμα της σύνθεσης της γλουταθειόνης καταλύεται από τη *γ-GCL*. Η σύνθεση της GSH ολοκληρώνεται με την προσθήκη γλυκίνης στη *γ-γλουτάμυλοκυστεΐνη* από τη συνθετάση της γλουταθειόνης (*GS*). Η καταλυτική υπομονάδα *γ-GCLC* (~ 73 kDa) διαθέτει όλες τις θέσεις δέσμευσης του υποστρώματος και είναι υπεύθυνη για όλη την κατάλυση. (Lu, 2009)

1.7.3. Αλβουμίνη (Albumin)

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

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

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

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

1.8. Γονίδιο glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)

Το GAPDH είναι γονίδιο house keeping και χρησιμοποιείται συχνά ως γονίδιο αναφοράς εδώ και πολλά χρόνια σε κηλίδες Northern, δοκιμασίες προστασίας Rnase και συμβατικές αναλύσεις RT-PCR. Η χρήση του ήταν αποδεκτή για τις μη / ημιποσοτικές τεχνικές όπου παρατηρείται μια ποιοτική αλλαγή. Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε για γονίδιο κανονικοποίησης επειδή είναι house keeping gene και έχει σταθερή έκφραση. (Huggett, Dheda, Bustin, & Zumla, 2005)

1.9. Ελιά

Η ελιά ή ελαιόδενδρο ή λιόδεντρο (επιστ. Ελαία, *Olea*) είναι γένος καρποφόρων δέντρων της οικογένειας των Ελαιοειδών (*Oleaceae*). Ο καρπός του ονομάζεται επίσης ελιά και από αυτόν παράγεται το ελαιόλαδο. Η ελιά υπήρξε το σύμβολο της θεάς Αθηνάς.

Το γένος *Olea* περιλαμβάνει τα εξής είδη και ποικιλίες:

- *Ελαία η αγρία* (*Olea sylvestris*), κοινώς αγρελιά ή αγρελίδι

- *Ελαία η ευρωπαϊκή (Olea europaea)* ή κοινή, το συνηθέστερα καλλιεργούμενο είδος ανά τον Κόσμο
- *Ελαία η αιολόκαρπος (Olea aeolocarpus)*
- *Ελαία η ηδύκαρπος (Olea nigra dulcis)*
- *Ελαία η ισπανική (Olea hispanica)*
- *Ελαία η κρανιόμορφος (Olea craniomorpha)*, κοινώς σουβλολιά
- *Ελαία η εκκρεμής (Olea pendula)*, κοινώς κρεβατοελιά
- *Ελαία η κωνική (Olea conica)* κοινώς ελιά σαλωνίτικη
- *Ελαία η λευκόκαρπος (Olea leucocarpa)*
- *Ελαία η μακρόκαρπος (Olea macrocarpa)*, κοινώς αετονυχολιά
- *Ελαία η μικρόκαρπος (Olea microcarpa)*, κοινώς λιανολιά ή λαδοελιά
- *Ελαία η μαστοειδής (Olea mamillaris)*, κοινώς λιάστρος
- *Ελαία η πρόμιος (Olea precox)*, κοινώς καλοκαιρίδα
- *Ελαία η σαλέρνιος (Olea salerniensis)*, κοινώς γαϊδουρολιά
- *Ελαία η στρεπτή (Olea contorta)*, κοινώς στριφτολιά
- *Ελαία η στρόγγυλος (Olea rotunda virida)*
- *Ελαία η υποστρόγγυλος (Olea subrotunda)*
- *Ελαία η σφαιρική (Olea sphaerica)*
- *Ελαία η υπόχλωρος (Olea virida)* (Γεωργάλας, Γ.Κ.)

Η ελιά ευδοκιμεί σε κλίματα εύκρατα χωρίς ακρότητες θερμοκρασίας (με μέση ετήσια θερμοκρασία 16°C) και υγρασίας, για αυτό είναι ευρύτατα διαδεδομένη στη μεσογειακή ζώνη (όπως στην Ελλάδα, στην Ιταλία, στην Ισπανία, στην Τουρκία, την Αλγερία και αλλού). (Γεωργάλας, n.d.)

Η καλλιέργεια της ελιάς στην χώρα μας καλύπτει έκταση 7 εκατομμυρίων στρεμμάτων δηλαδή 17% της καλλιεργούμενης γης. Στην παρακάτω εικόνα αναγράφεται η παραγωγή ελαιόλαδου στην Ελλάδα ανά περιφέρεια. (Εικ.10)

• Παραγωγή ελαιόλαδου ανά περιφέρεια	
• ΚΡΗΤΗ	125.000 τόν.
• ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΣ	87.000 τόν.
• ΔΥΤΙΚΗ ΕΛΛΑΔΑ	43.000 τόν.
• ΙΟΝΙΑ ΝΗΣΙΑ	38.000 τόν.
• ΒΟΡΕΙΟ ΑΙΓΑΙΟ	30.000 τόν.
• ΣΤΕΡΕΑ ΕΛΛΑΔΑ	22.000 τόν.
• ΗΠΕΙΡΟΣ	7.000 τόν.
• ΚΕΝΤΡΙΚΗ ΜΑΚΕΔΟΝΙΑ	6.000 τόν.
• ΝΟΤΙΟ ΑΙΓΑΙΟ	6.000 τόν.
• ΘΕΣΣΑΛΙΑ	6.000 τόν.
• ΑΤΤΙΚΗ	4.000 τόν.
• ΔΥΤΙΚΗ ΜΑΚΕΔΟΝΙΑ	3.000 τόν.
• ΑΝ. ΜΑΚΕΔΟΝΙΑ	2.000 τόν.
• ΚΑΙ ΘΡΑΚΗ	

Εικόνα 10: Παραγωγή ελαιόλαδου στην Ελλάδα ανά περιφέρεια

1.9.1. Ελαιόλαδο

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

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

Το ελαιόλαδο και οι βρώσιμες ελιές είναι μια σπουδαία λιπαρή ύλη στη διατροφή του ανθρώπου με αναμφισβήτητα βιολογική και θρεπτική αξία και για το λόγο αυτό θα πρέπει να αποτελούν αναπόσπαστο στοιχείο της διατροφής. Παρακάτω αναγράφονται οι διάφορες ποικιλίες που συναντάμε στην χώρα μας και ο τρόπος όπου φύονται. (Εικ.11)

ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ

α) Ελαιοποιήσιμες - Λαδολιές

Ποικιλία	Άλλα ονόματα	Καλλιεργείται σε
Κορωνέικη	Λιανολιά, Ψηλολιά, Λαδολιά, Κρητικιά ...	Κρήτη, Πελοπόννησος, Σάμος, Νησιά Ιονίου...
Μαστοειδής	Τσουνάτη, Μουρατολιά ...	Πελοπόννησος, Κρήτη
Λιανολιά Κερκύρας	Κορφολιά, Πρεβεζάνα ...	Κέρκυρα, Παξοί, Ζάκυνθος, Κεφαλονιά...
Κουτσουρελιά	Πατρινή, Λιανολιά, Πατρινιά Λαδολιά ...	Πελοπόννησος, Ναύπακτος
Βαλιανολιά	Κολοβή, Μυτιλινιά...	Μυτιλήνη, Χίος, Σκύρος

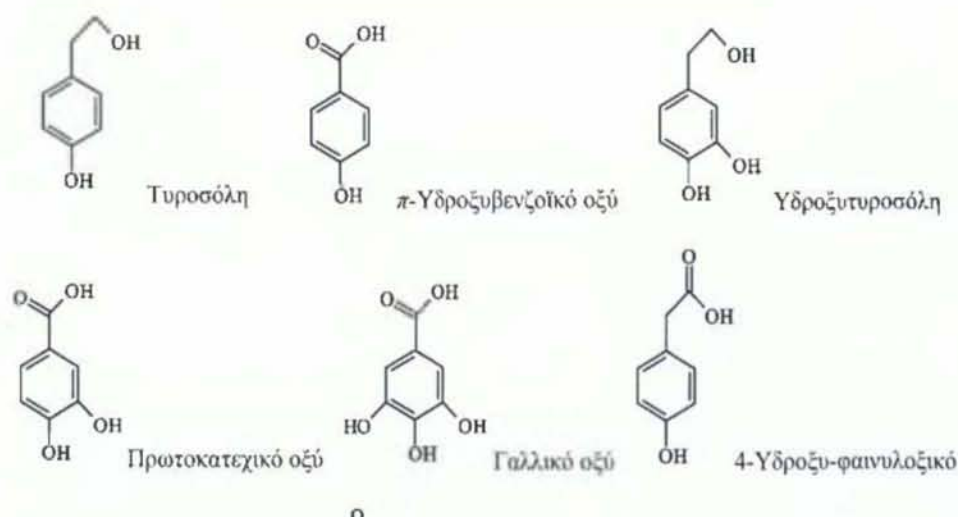
Εικόνα 11: Ποικιλίες που συναντάμε στην Ελλάδα

1.9.2. Χημική Σύσταση Ελαιολάδου

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

1.9.3. Πολυφαινολικές ενώσεις ελαιόλαδου

Η τυροσόλη, η υδροξυτυροσόλη (ΗΤ) και τα σεκοριδοειδή παράγωγά τους (λιγκστοσίδη, ελαιοευρωπαϊνη) συνεισφέρουν μεταξύ 60-80% της συνολικής περιεκτικότητας σε φαινολικές ενώσεις του παρθένου ελαιολάδου. Η σύσταση αυτών ποικίλει στα διαφορετικά ελαιόλαδα, ανάλογα με την ελαιοκαλλιέργεια και τη γεωγραφική προέλευση (Pastor et al., 2016). (Εικ.9)



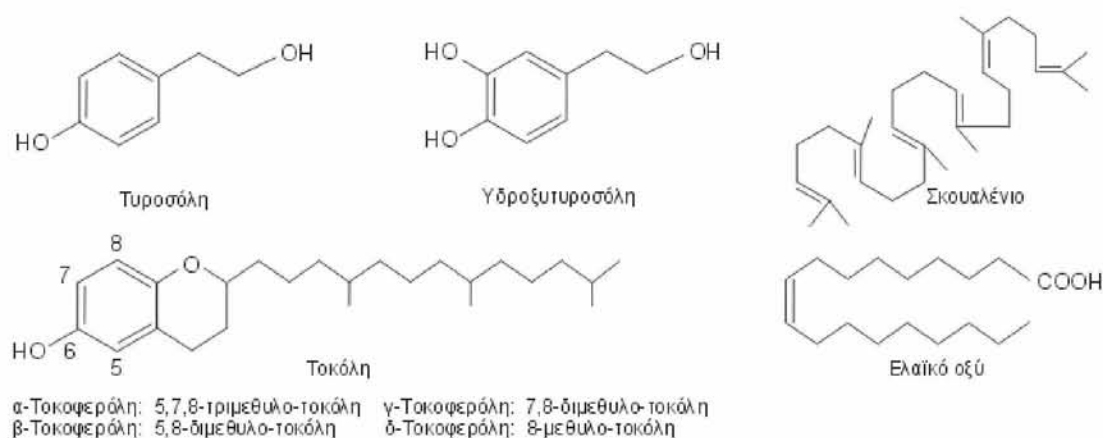
Εικόνα 12: Κύριες πολυφαινόλες ελαιολάδου

1.9.4. Διατροφική αξία Ελαιολάδου

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

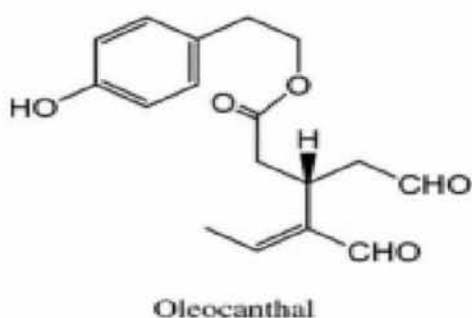
Τα ελαιόλαδα ξεχωρίζουν ως προς την επίδραση τους στην υγεία, ανάλογα με το πόσα αντιοξειδωτικά μπορούν να προσφέρουν. Ένα ελαιόλαδο που μπορεί να παρέχει 5 mg υδροξυτυροσόλης και παραγώγων της (σύμπλεγμα ελευρωπαίνης και τυροσόλης) την ημέρα προσφέρει προστασία από την οξείδωση της LDL (Δηλαδή προστασία του καρδιαγγειακού συστήματος). Η υδροξυτυροσόλη και η τυροσόλη βρίσκονται υπό ελεύθερη μορφή στο ελαιόλαδο σε ελάχιστο ποσοστό (>10 mg/kg). Η ελαιοκανθάλη, η ελαιασίνη και δευτερευόντως τα άγλυκα της ελευρωπαίνης και του λιγκτοσιδίου είναι οι κυριότερες μορφές συζευγμένης υδροξυτυροσόλης και τυροσόλης στα ελληνικά λάδια. Χρόνια έκθεση σε χαμηλές δόσεις αντιοξειδωτικών/αντιφλεγμονωδών ουσιών όπως η ελαιοκανθάλη προσφέρει

προστασία έναντι των καρδιαγγειακών παθήσεων και της γήρανσης. (Beauchamp, Gary K. et al. Nature 2005) (Εικ.10)



Εικόνα 13: Αντιοξειδωτικές ουσίες στο ελαιόλαδο

Η ελαιοκανθάλη (Εικ.11) συσχετίζεται με την προστασία έναντι του Alzheimer. Μελέτες έδειξαν ότι η ελαιοκανθάλη έχει την ικανότητα να αποτρέπει την συσσώρευση αμυλοειδούς-β (Αβ) *in vitro* και να ενισχύει την κάθαρση του Αβ από τους εγκεφάλους ποντικών άγριου τύπου *in vivo*. (Qosa et al., 2015) Η ελαιοκανθάλη του ελαιόλαδου έχει βρεθεί ότι έχει παρόμοια δράση με το αντιφλεγμονώδες φάρμακο *ibuprofene* (Beauchamp et al., 2005).

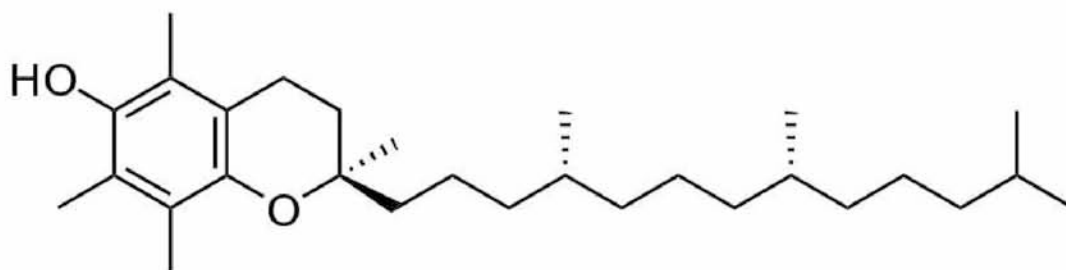


Εικόνα 14: Χημική δομή ελαιοκανθάλης

Η ελαιοευρωπεΐνη, η τυροσόλη, η υδροξυτυροσόλη και το σκουαλένιο (ένας υδρογονάνθρακας και τριτερπένιο, πρόδρομη ένωση της χοληστερόλης και άλλων στεροειδών) αποτελούν τις αντιοξειδωτικές ουσίες του ελαιόλαδου. Οι ενώσεις αυτές, με τη συνεισφορά της α-τοκοφερόλης (βιταμίνη Ε) και του φυτικού λιπαρού οξέος,

του ελαϊκού οξέος, εκκαθαρίζουν τις ελεύθερες ρίζες και μειώνουν τις οξειδωτικές βλάβες και το οξειδωτικό stress των αερόβιων οργανισμών.

Η βιταμίνη E (τοκοφερόλη) , (Εικ.12) είναι μια λιποδιαλυτή βιταμίνη που εμφανίζει έντονη αντιοξειδωτική δράση. Συνδέεται με τη διατήρηση της υγείας της καρδιάς σε συνδυασμό με τις πολυφαινόλες του ελαιόλαδου και τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα που περιέχει. Η αντιοξειδωτική δράση της βιταμίνης E του ελαιόλαδου έχει συσχετισθεί και με την πρόληψη της πρόωρης γήρανσης. (Parcerisa, Casals, Boatella, Codony, & Rafecas, 2000)

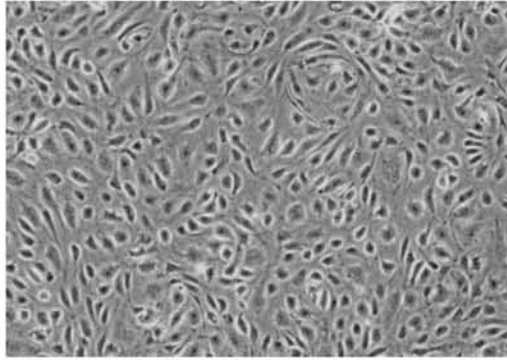


Εικόνα 15: Χημική δομή βιταμίνης E

1.10. Κυτταρικές σειρές

1.10.1. Ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926

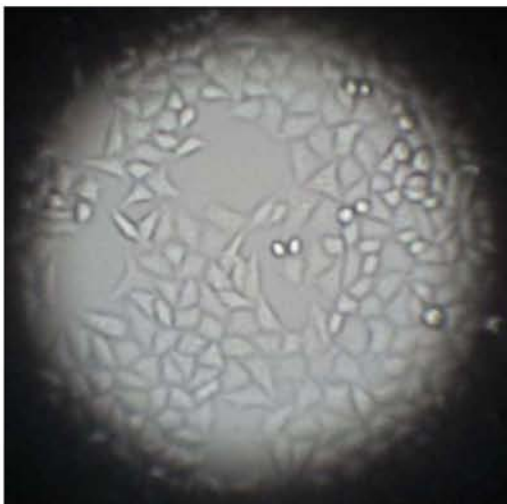
Τα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 δημιουργήθηκαν με σύντηξη ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων ομφάλιου φλέβας (HUVECs) με καρκινικά κύτταρα ανθρώπου της σειράς A549. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 χρησιμοποιούνται σήμερα ως ένα *ex vivo* μοντέλο για την μελέτη διάφορων φυσιολογικών και παθολογικών διεργασιών, ειδικά στον τομέα της έρευνας της αγγειογένεσης . (By, 2015)



Εικόνα 16: Ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 από καλλιέργεια όπως φαίνονται σε ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο

1.10.2. Καρκινικά κύτταρα τραχήλου της μήτρας HeLa

Τα HeLa είναι μια καρκινική σειρά κυττάρων του τραχήλου της μήτρας που πήραν το όνομά τους από τα αρχικά του ονόματος της πρώτης ασθενούς με τον συγκεκριμένο τύπο καρκίνου (Henrietta Lacks) στις αρχές του 1950. Ανήκαν σε μια Αφροαμερικάνα του Αμερικάνικου Νότου που εργαζόνταν ως καπνεργάτρια. Πέθανε το 1951 σε ηλικία 31 ετών από μια μορφή καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Ο γιατρός της κράτησε δείγμα των καρκινικών κυττάρων τα οποία καλλιεργήθηκαν στο εργαστήριο. Ήταν η πρώτη φορά που κύτταρα επιζούσαν εκτός του ανθρωπίνου σώματος. Τελικά έμελλε να αποτελέσουν ένα από τα ισχυρότερα εργαλεία της βιοϊατρικής έρευνας με τη χρησιμοποίησή τους σε πολλούς ερευνητικούς τομείς και χιλιάδες ερευνητικές εργασίες.



Εικόνα 17: HeLa κύτταρα από καλλιέργεια όπως φαίνονται σε ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο

2. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να εξεταστούν οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες ενός πολυφαινολικού κλάσματος ελαιολάδου (TPF), πλούσιο σε πολυφαινόλες, από μια Ελληνική ενδημική ποικιλία *Olea europaea*, που καλλιεργείται στο Άγιο Όρος. Αξίζει να σημειωθεί ότι μέχρι σήμερα, τουλάχιστον εξ όσων γνωρίζουμε, δεν υπάρχουν διαθέσιμες μελέτες που να διερευνούν τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες ενός συνολικού εκχυλίσματος ελαιολάδου σε κυτταροκαλλιέργειες. Τα αποτελέσματα των αντιοξειδωτικών αξιολογήθηκαν σε κυτταρικό επίπεδο, ιδιαίτερα σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα (EA.hy926) και καρκινικά κύτταρα τραχήλου της μήτρας (HeLa). Τα αποτελέσματα που θα προκύψουν θα παρέχουν σημαντικές πληροφορίες σχετικά με την πιθανή χρήση του TPF ως αντιοξειδωτικού συμπληρώματος διατροφής.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Το εκχύλισμα της μελέτης

Το πολυφαινολικό κλάσμα ελαιολάδου (TPF) που μελετήθηκε, το οποίο είναι πλούσιο σε πολυφαινόλες προέρχεται από μια Ελληνική ενδημική ποικιλία *Olea europaea*, που καλλιεργείται στο Άγιο Όρος. Στο παρακάτω πίνακα αναγράφεται η χημική σύσταση του ελαιόλαδου αυτού (πίνακας 2):

Πίνακας 2: Χημική σύσταση ελαιόλαδου της μελέτης

	ΦΙΛΤΡΑΡΙΣΜΕΝΟ	ΑΦΙΛΤΡΑΡΙΣΤΟ
Ελαιοκανθάλη (mg/kg)	265	160
Ελαιασίνη (mg/kg)	62	92
Άγλυκο ελεοευρωπαϊνης (μονοαλδευδική μορφή) (mg/kg)	16	10
Άγλυκο λιγκτροσίδη (μονοαλδευδική μορφή) (mg/kg)	8	10
Άγλυκο λιγκτροσίδη	108	110

(διαλδευδική μορφή) (mg/kg)		
Σύνολο παραγώγων τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης(mg/Kg)	459	382
D1(ελαιοκανθάλη+ελαιασίνη) (mg/kg)	327	252
Ελεύθερη τυροσόλη και υδροξυτυροσόλη (mg/kg)	<10 mg/kg	

3.2. Αντιδραστήρια

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

3.3. Καλλιέργεια των κυτταρικών σειρών EA.hy926 και HeLa

Τα κύτταρα είναι δωρεάν προσφορά του αξιότιμου καθηγητή κο. Κουτσιλιέρη (Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, Ελλάδα).

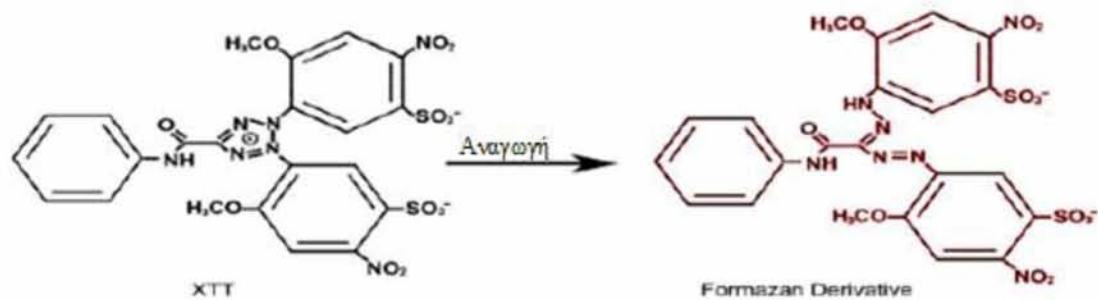
Οι κυτταρικές σειρές καλλιεργούνται σε φλάσκες επιφάνειας 75cm² σε θρεπτικό υλικό DMEM (10 ml) το οποίο ήταν εμπλουτισμένο με 10% FBS, 1% L-γλουταμίνη και 1% διάλυμα αντιβιοτικών σε ειδικό κλίβανο για επώαση και ανάπτυξη στους 37 °C και σε συγκέντρωση CO₂ 5%. Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με 10% ορό FBS μέχρι η επιφάνεια της φλάσκας να καλύπτεται από 70% έως 80% από κύτταρα. Όταν τα κύτταρα κάλυπταν το προαναφερθέν ποσοστό της επιφάνειας της φλάσκας, πραγματοποιούνταν επανακαλλιέργεια των κυττάρων. Η επανακαλλιέργεια των κυττάρων γινόταν μέσω της αποκόλλησης των κυττάρων

χρησιμοποιώντας 1 ml θρυψίνης (0,25%). Η θρυψίνη με την δράση της βοηθά στην αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια της φλάσκας. Η επώαση με την θρυψίνη διαρκούσε 5 min στους 37 °C. Στη συνέχεια ακολουθούσε επαναιώρηση των αποκολλημένων κυττάρων σε θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με 10% FBS. Τα κύτταρα μοιράζονταν σε καινούργιες φλάσκες, έτσι ώστε όταν κολλήσουν, σε κάθε καινούργια φλάσκα να καλύπτουν το 20% με 30% της επιφάνειας της. Η καλλιέργεια των κυττάρων έγινε με όσον το δυνατόν ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο ρεύματος αέρα συνεχούς ροής (Laminar air flow) για την αποφυγή επιμολύνσεων. Επίσης ανά τακτά χρονικά διαστήματα γινόταν έλεγχος των κυττάρων με σκοπό την διάγνωση πιθανών επιμολύνσεων.

3.4. Προσδιορισμός της κυτταροτοξικής δράσης του εκχυλίσματος με τη μέθοδο XTT (Huycck, Ampe, Troys, & Sciences, 2012)

Για να χρησιμοποιηθούν μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις για τη μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης, αρχικά προσδιορίστηκε η κυτταροτοξική δράση του εκχυλίσματος. Για τον προσδιορισμό της κυτταροτοξικής δράσης του εκχυλίσματος τόσο στα ενδοθηλιακά EA.hy926 κύτταρα όσο και στα καρκινικά του τραχήλου της μήτρας HeLa, στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις χρησιμοποιήθηκε το kit XTT assay της εταιρείας Roche.

Η μέθοδος XTT αποτελεί μια χρωματομετρική δοκιμή για την μη ραδιενεργή ποσοτικοποίηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της βιωσιμότητας. Η μέθοδος βασίζεται στον μεταβολισμό του τετραμμωνιακού άλατος (XTT) από μιτοχονδριακές δεϋδρογονάσες κυττάρων στον μεταβολίτη φορμαζάνη. Η φορμαζάνη είναι υδατοδιαλυτή, έχει πορτοκαλί χρώμα και απορροφά στα 450-500 nm και έτσι μπορεί να προσδιοριστεί φασματοφωτομετρικά. Μείωση του αριθμού των ζώντων κυττάρων οδηγεί σε μειωμένο μεταβολισμό του τετραμμωνιακού άλατος και συνεπώς σε μειωμένη απορρόφηση.



Εικόνα 18: Μεταβολισμός του XTT σε υδατοδιαλυτή φορμαζάνη από ζωντανά κύτταρα

Μετά την αποκόλληση των κυττάρων με θρυψίνη 0,25% και την επαναιώρησή τους σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS, γίνεται μέτρησή τους με τη βοήθεια της αντικειμενοφόρου πλάκας Neubauer. Στη συνέχεια, γίνεται επίστρωση 10^4 κυττάρων ανά θέση σε ένα τριβλίο 96 θέσεων (96-well plate). Στα κύτταρα επίσης προστίθεται θρεπτικό υλικό με 10% FBS (150μl) και ακολουθεί επώαση για 24 ώρες στους 37°C και σε CO_2 συγκέντρωσης 5% προκειμένου να προσκολληθούν. Μετά το πέρας της επώασης το θρεπτικό υλικό αφαιρείται και ακολουθούσε προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων TPF (12,0-96,0 μg/ml TPF για τα κύτταρα EA.hy926 και 7,5-100,0 μg/ml TPF για τα κύτταρα HeLa) σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS (ώστε να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των συστατικών του FBS με το εκχύλισμα συνολικού όγκου 100 μl. Τα κύτταρα στα οποία προστέθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις της του εκχυλίσματος, επώαστηκαν για 24 h. Στα πηγαδάκια που αποτελούν τα control γίνεται προσθήκη μόνο θρεπτικού, χωρίς εκχύλισμα. Για κάθε συγκέντρωση του εκχυλίσματος χρησιμοποιούνται τρία πηγαδάκια των οποίων τα κύτταρα σε καθένα από αυτά έχει προέλθει από διαφορετική φλάσκα. Επίσης, για κάθε συγκέντρωση αλλά και για το control χρησιμοποιείται τέταρτο πηγαδάκι που δεν περιέχει κύτταρα για να εκτιμηθεί η απορρόφηση του θρεπτικού και του εκχυλίσματος, στα 450 nm. Το πείραμα πραγματοποιείται εις τριπλούν. Έπειτα, το plate επώάζεται για 24 h στους 37°C και σε 5% CO_2 . Μετά την επώαση προστίθενται 50 μl από το μίγμα XTT reagent σε κάθε θέση και ακολουθεί επώαση για 4 h. (Το μείγμα του XTT reagent πρέπει να έχει την αναλογία 50:1 και η προετοιμασία του μίγματος γίνεται πριν τη χρησιμοποίησή του). Μετά την τετράωρη επώαση προσδιορίζεται η απορρόφηση στα 450 nm με φασματοφωτόμετρο ELISA plate reader (Biotek) και τη χρήση του λογισμικού Gen5 (Biotek). Η εξέταση του εκχυλίσματος και του tBHP έγινε σε τρία

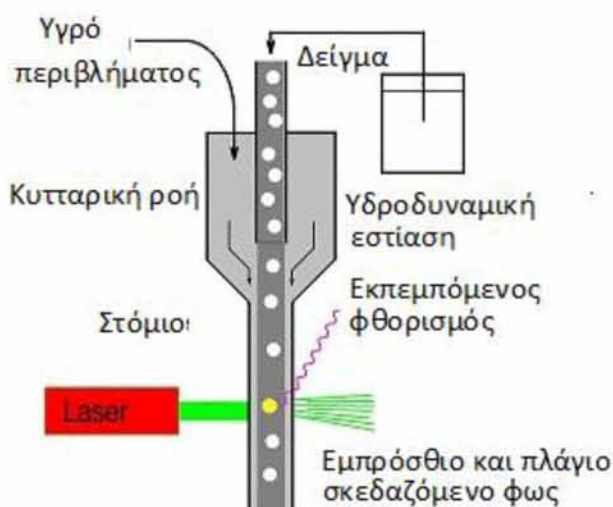
διαφορετικά πειράματα και στο κάθε πείραμα η κάθε συγκέντρωση εξεταζόταν σε τριπλά δείγματα. Η % αναστολή του εκχυλίσματος στην κυτταρική αύξηση των κυτταρικών σειρών EA.hy 926 και HeLa υπολογίστηκε από τον τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = \frac{(\text{Ab.αρνητικού μάρτυρα} - \text{Ab.δείγματος})}{\text{Ab.αρνητικού μάρτυρα]} \times 100$$

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

3.5. Προσδιορισμός των επιπέδων της GSH και των ROS με κυτταρομετρία ροής

Η κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry, FC) είναι μια τεχνική αυτοματοποιημένης κυτταρικής ανάλυσης που επιτρέπει τη μέτρηση μεμονωμένων σωματιδίων (κυττάρων, πυρήνων, χρωμοσωμάτων κ.λπ.) καθώς διέρχονται σε νηματική ροή από ένα σταθερό σημείο όπου προσπίπτει μία δέσμη φωτός. Η εμπρόσθια σκέδαση "FSC" (εκ του Forward Scattering) σχετίζεται με τον όγκο του κυττάρου και η πλάγια σκέδαση "SSC" (εκ του Side Scattering) εξαρτάται από την εσωτερική πολυπλοκότητα του σωματιδίου (π.χ., σχήμα του πυρήνα, αριθμός κυτταροπλασματικών σωματιδίων ή αδρότητα κυτταρικής μεμβράνης).



Εικόνα 19: Υδροδυναμική εστίαση του δείγματος μέσα από θάλαμο ροής

Τα ενδοκυτταρικά επίπεδα της GSH και των ROS προσδιορίστηκαν με κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιώντας τις χρωστικές mercury orange και DCF-DA, αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, η φθορίζουσα χρωστική mercury orange προσδένεται απευθείας στην GSH (μια ένωση που προσδένεται στοιχειομετρικά στις σουλφυδρυλικές ομάδες) ενώ η DCF-DA αποακετυλιώνεται από κυτταρικές εστεράσες σε μία μη φθορίζουσα ένωση, η οποία αργότερα οξειδώνεται από τις ROS στην φθορίζουσα DCF. Παρασκευάστηκε ένα στοκ διάλυμα της χρωστικής mercury orange (400 μM) διαλυμένης σε ακετόνη και αποθηκεύτηκε στους 4 °C, ενώ ένα φρέσκο διάλυμα της χρωστικής DCF-DA (100 μM) διαλυμένης σε μεθανόλη παρασκευαζόταν πριν από κάθε πείραμα. Το κυτταρικό αιώρημα επαναδιαλύεται σε 150 μl PBS και επωάζονται παρουσία της χρωστικής mercury orange (15 μl) (40μM) ή της χρωστικής DCF-DA (15 μl) (10μM), για τον προσδιορισμό της GSH ή των ROS αντίστοιχα, στο σκοτάδι στους 37°C για 30 min. Ακολουθεί πλύση και επαναδιάλυση των κυττάρων σε 250 μl PBS και φυγοκέντρηση στα 300 g, στους 4°C για 10 min. Το υπερκείμενο απομακρύνεται, προστίθενται 250 μl PBS και προχωράμε στην ανάλυση με τη χρήση κυτταρομέτρου ροής FACSCalibur (BD Biosciences, Franklin, Lakes, NJ, USA) με φάσμα διέγερσης και εκπομπής στα 488 και 530 nm για τα ROS και τα 488 και 580 nm για την GSH. Επίσης μετρήθηκαν η εμπρόσθια και δεξιά οπτική γωνία σκέδασης του φωτός που δείχνουν το μέγεθος και την εσωτερική πολυπλοκότητα των κυττάρων. Τα κύτταρα αναλύθηκαν με έναν ρυθμό 100-200 γεγονότων/δευτερόλεπτο. Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε 10.000 κύτταρα ανά δείγμα και η ένταση φθορισμού μετρήθηκε σε λογαριθμική κλίμακα. Τα δεδομένα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό BD Cell Quest software (Becton Dickinson). Το κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκε τουλάχιστον τρεις ανεξάρτητες φορές.

3.6. Λύση κυττάρων

Για τις μεθόδους προσδιορισμού επιπέδων πρωτεϊνών μέσω αντιδραστηρίου Bradford, TBARS, πρωτεϊνικά καρβονύλια, western blot και προσδιορισμός επιπέδων αλβουμίνης μέσω αντιδραστηρίου bromocresol green, έγινε λύση των κυττάρων σε ρυθμιστικό διάλυμα ράσιο-ανοσοκαταβύθισης (RIPA).

Σύσταση RIPA, pH 8: 50mM TRIS-HCL, 150mM NaCl, 0,25% SDS, 0,25% δεοξυχολικό νάτριο, 1mM EDTA, 1% Triton, 1 χαπάκι αναστολείς πρωτεασών (protease inhibitor cocktail tablete, cOmplet tables, mini, Roche, Germany).

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

3.6.1. Προσδιορισμός των επιπέδων των TBARS

Ο προσδιορισμός των επιπέδων των TBARS ενός δείκτης της λιπιδικής υπεροξειδωσης βασίστηκε στη μέθοδο των Keles et al. (2001). Κυτταρικό ελαιώδη πρωτεϊνική περιεκτικότητα 30μg αναμείχτηκε με 500 μl διαλύματος 35% TCA και 500 μl διαλύματος Tris-HCl (200 mM, pH 7,4). Τα δείγματα επωάζονται για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια προστίθενται 1 ml διαλύματος 2 M Na₂SO₄ και 55 mM TBA και τα δείγματα επωάζονται για 45 min στους 95°C (σε υδατόλουτρο). Μετά την επώαση τα δείγματα κρυσταίνονται για 5 min σε πάγο και ακολουθεί προσθήκη 1 ml διαλύματος 70% TCA. Μετά από ανάδευση, 1 ml του κάθε δείγματος φυγοκεντρείται στα 15000 g για 3 min στους 25°C. Ακολουθεί μέτρηση της οπτικής απορρόφησης του υπερκείμενου στα 530 nm. Τα δείγματα χωρίς το κυτταρικό αιώρημα (περιέχουν buffer RIPA) αποτελούσαν το τυφλό και ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου γίνεται με αέρα. Κάθε δείγμα εξετάζεται εις τριπλούν. Η φωτομέτρηση πραγματοποιήθηκε σε φασματοφωτόμετρο Hitachi U-1900 (σειριακός αριθμός. 2023-029; Hitachi, Ltd., Τόκιο, Ιαπωνία). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως nmol ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ ανά mg πρωτεΐνης του κυτταρικού αιωρήματος. Η συγκέντρωση των TBARS υπολογίζεται με βάση τον συντελεστή μοριακή απόσβεσης της MDA. Η μέτρηση απαιτεί >30μg απόλυτη ποσότητα πρωτεΐνης στο προς εξέταση δείγμα. Οι υπολογισμοί γίνονται με βάση τον παρακάτω τύπο:

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

Aδ: Η μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος.

A0: Η μέση τιμή της απορρόφησης του τυφλού.

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

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

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

3.6.2. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων βασίστηκε στη μέθοδο των Patsoukis et al. (2004). Πιο αναλυτικά, σε κυτταρικό εναιώρημα πρωτεϊνικής συγκέντρωσης 30 μg προστίθεται ίσος όγκος 20% TCA (κάθε δείγμα έχει το τυφλό του), τα δείγματα επωάζονται στον πάγο για 15 min και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 15000 g για 5 min στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και προστίθενται 500 μL DNPH 10 mM (διαλυμένο σε 2,5N HCL) για τα δείγματα ή 500 μL 2,5N HCL για τα τυφλά. Ακολουθεί επώαση των δειγμάτων για 1 h στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου με ενδιάμεση ανάδευση κάθε 15 min και στο τέλος φυγοκέντρηση στα 15000 g για 5 min στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και προστίθενται 1 ml 10% TCA. Ακολουθεί ανάδευση και φυγοκέντρηση στα 15000 g για 5 min στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και προστίθεται 1 ml μίγματος αιθανόλης-οξικού αιθυλεστέρα (1:1 v/v) ενώ γίνεται φυγοκέντρηση στα 15000 g για 5 min στους 4°C. Το συγκεκριμένο βήμα επαναλαμβάνεται δύο ακόμη φορές. Στο τέλος προστίθενται 1 ml 5M ουρίας (pH 2.3) και τα δείγματα επωάζονται στους 37°C για 15 min. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 15000 g για 3 min στους 4°C και μετριέται η απορρόφηση στα 375nm. Η φωτομέτρηση πραγματοποιήθηκε σε φασματοφωτόμετρο Hitachi U-1900 (σειριακός αριθμός. 2023-029; Hitachi, Ltd., Τόκιο, Ιαπωνία). Η συγκέντρωση πρωτεϊνικών

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

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

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

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

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

Τιμή 5: Ο συντελεστής αραιώσης του αιωρήματος Vτελ. αντίδρασης/ ml κυτταρικού εναιωρήματος [1000 ml /X ml]. Όπου X, ο όγκος σε ml του κυτταρικού εναιωρήματος που αντιστοιχεί σε συγκέντρωση πρωτεΐνης 30μg

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

3.6.3. Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford

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

Για την πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις διαλύματος αλβουμίνης 10 mg/ml ώστε να προκύψουν διαλύματα συγκεντρώσεις 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 μg/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 H₂O και 1 ml διαλύματος

αντιδραστηρίου Bradford. Οι συγκεντρώσεις αλβουμίνης 0.125-1 $\mu\text{g/ml}$ αντιστοιχούν στο γραμμικό τμήμα της καμπύλης.

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

3.7. Western Blot Analysis

Για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνικών επιπέδων της αλβουμίνης και της $\gamma\text{-GCLc}$ χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ανοσοαποτύπωσης. Στο πρωτεϊνικό κυτταρόλυμα προστίθεται 5 \times Loading buffer και ακολουθεί θέρμανση κοντά στο σημείο βρασμού για 3 min. Στη συνέχεια τα προς ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνικά δείγματα (30 μg πρωτεϊνικής συγκέντρωσης) ‘φορτώνονται’ και διαχωρίζονται σε 8% SDS-PAGE πηκτή ακρυλαμίδης για 45-60 min με τάση ρεύματος 150 V. Η πηκτή ακρυλαμίδιου διακρίνεται σε δύο επιμέρους μέρη: στο πρώτο τμήμα ή πηκτή πακεταρίσματος (stacking gel), όπου πακετάρονται τα δείγματα των πρωτεϊνών πριν διαχωριστούν. Η πηκτή πακεταρίσματος έχει σταθερό ποσοστό ακρυλαμίδης (5%) (3ml ddH₂O, 1,25 ml Tris 0.5 M pH 6.8, 650 μl 30% ακρυλαμίδη, 50 μl 10% SDS, 50 μl 10% APS, 5 μl TEMED), ανεξάρτητο από το μέγεθος των προς ανάλυση πρωτεϊνών. Στο δεύτερο τμήμα ή πηκτή διαχωρισμού (Resolving gel) (4,6ml ddH₂O, 2,5ml Tris 1.5 M pH 8.8, 2,7ml 30% ακρυλαμίδη, 100 μl 10% SDS, 100 μl 10% APS, 6 μl TEMED), της οποίας το ποσοστό ακρυλαμίδης εξαρτάται από το μοριακό μέγεθος των μορίων προς διαχωρισμό. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης ακολουθεί μεταφορά και καθήλωση των ηλεκτροφορητικά διαχωρισμένων μορίων από την πηκτή ακρυλαμίδιου σε μεμβράνη (PVDF). Συγκεκριμένα, το πήκτωμα τοποθετείται μέσα σε μία κασετίνα που περιέχει τα εξής υλικά με την ακόλουθη σειρά: σφουγγαράκι, διηθητικό χαρτί Whatman, το πήκτωμα και από πάνω τη μεμβράνη PVDF, διηθητικό χαρτί Whatman και σφουγγαράκι. Κλείνουμε την κασετίνα και τοποθετείται σε μια ειδική θήκη μέσα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και ηλεκτροφορείται για 2 h με τάση ρεύματος τα 110 V. Μετά την επιτυχή μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα στη μεμβράνη, η

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

3.8. Προσδιορισμός αλβουμίνης μέσω του αντιδραστηρίου Bromocresol Green

Για τον προσδιορισμό της αλβουμίνης μέσω του αντιδραστηρίου της βρωμοκρεσόλης (bromocresol green) χρησιμοποιήθηκε με μια μικρή τροποποίηση, το πρωτόκολλο Doumas et al. Σε 25μl δείγματος από την κάθε συγκέντρωση κυτταρικού εναιωρήματος προστίθεται 1ml βρωμοκρεσόλη. Το μίγμα επωάζεται για 20 λεπτά σε σκοτεινό μέρος σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα ακολουθεί η μέτρηση

της απορρόφησης του στα 628 nm. Κάθε πείραμα πραγματοποιείται 3 ανεξάρτητες φορές.

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

3.9. Στατιστική ανάλυση

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

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

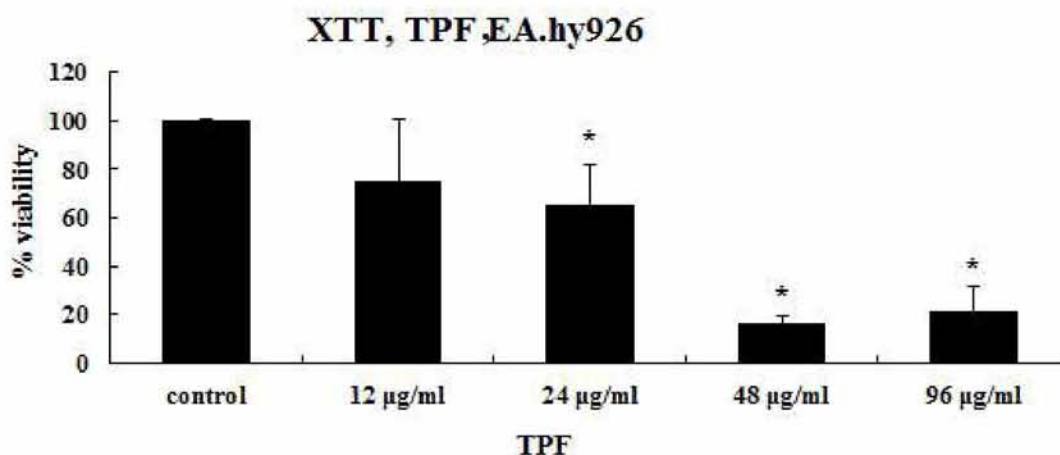
Οι συγκεντρώσεις του TPF, εκφράζονται ως η συγκέντρωση του εκχυλίσματος διαιρεμένη με την συγκέντρωση των πολυφαινολών, όπως αυτή υπολογίστηκε μέσω του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu.

4.1 Μέθοδος XTT

Με την μέθοδο XTT έγινε προσδιορισμός των κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων. Οι μη κυτταροτοξικές χρησιμοποιήθηκαν έτσι ώστε να γίνει εκτίμηση της επίδρασης τους στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό του κυττάρου.

4.1.1. Ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα (EA.hy926)

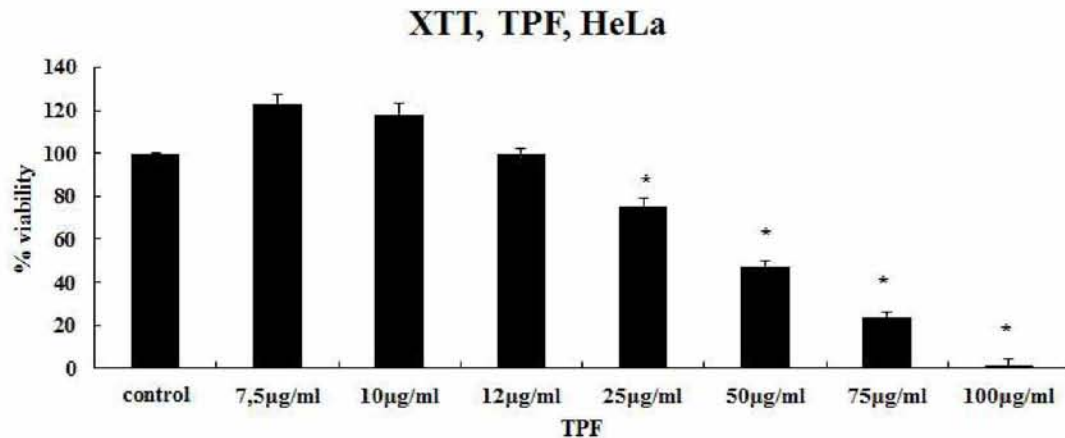
Στην κυτταρική σειρά EA.hy926, χορηγήθηκε εύρος συγκεντρώσεων από 12,0-96,0 $\mu\text{g/ml}$ TPF. Ωστόσο συγκεντρώσεις πάνω από 24,0 $\mu\text{g/ml}$ TPF ήταν κυτταροτοξικές. Συνεπώς, για τον έλεγχο τις αντιοξειδωτικής δράσης του εκχυλίσματος, χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις από 2,5-10,0 $\mu\text{g/ml}$.



Διάγραμμα 1: Προσδιορισμός κυτταροτοξικότητας TPF, στην κυτταρική σειρά EA.hy926, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης της ουσίας, με τη μέθοδο XTT. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control και παρουσιάζονται ως mean \pm SEM, (n=6). * $p < 0,05$ στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με το control.

4.1.2. Ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα τραχήλου της μήτρας (HeLa)

Στην κυτταρική σειρά HeLa, χορηγήθηκε εύρος συγκεντρώσεων από 7,5-100,0 $\mu\text{g/ml}$ TPF. Ωστόσο συγκεντρώσεις πάνω από 25,0 $\mu\text{g/ml}$ TPF ήταν κυτταροτοξικές. Συνεπώς, για τον έλεγχο τις αντιοξειδωτικής δράσης του εκχυλίσματος, χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις από 5,0-12,0 $\mu\text{g/ml}$.



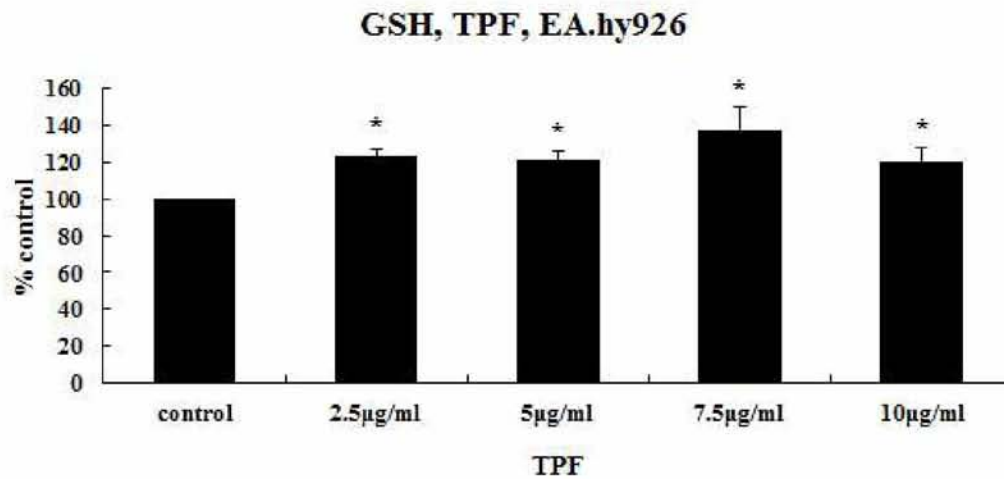
Διάγραμμα 2: Προσδιορισμός κυτταροτοξικότητας TPF, στην κυτταρική σειρά HeLa, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης της ουσίας, με τη μέθοδο XTT. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control και παρουσιάζονται ως mean ± SEM, (n=6). * $p < 0,05$ στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με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

4.2. Προσδιορισμός της οξειδοαναγωγικής κατάστασης με κυτταρομετρία ροής

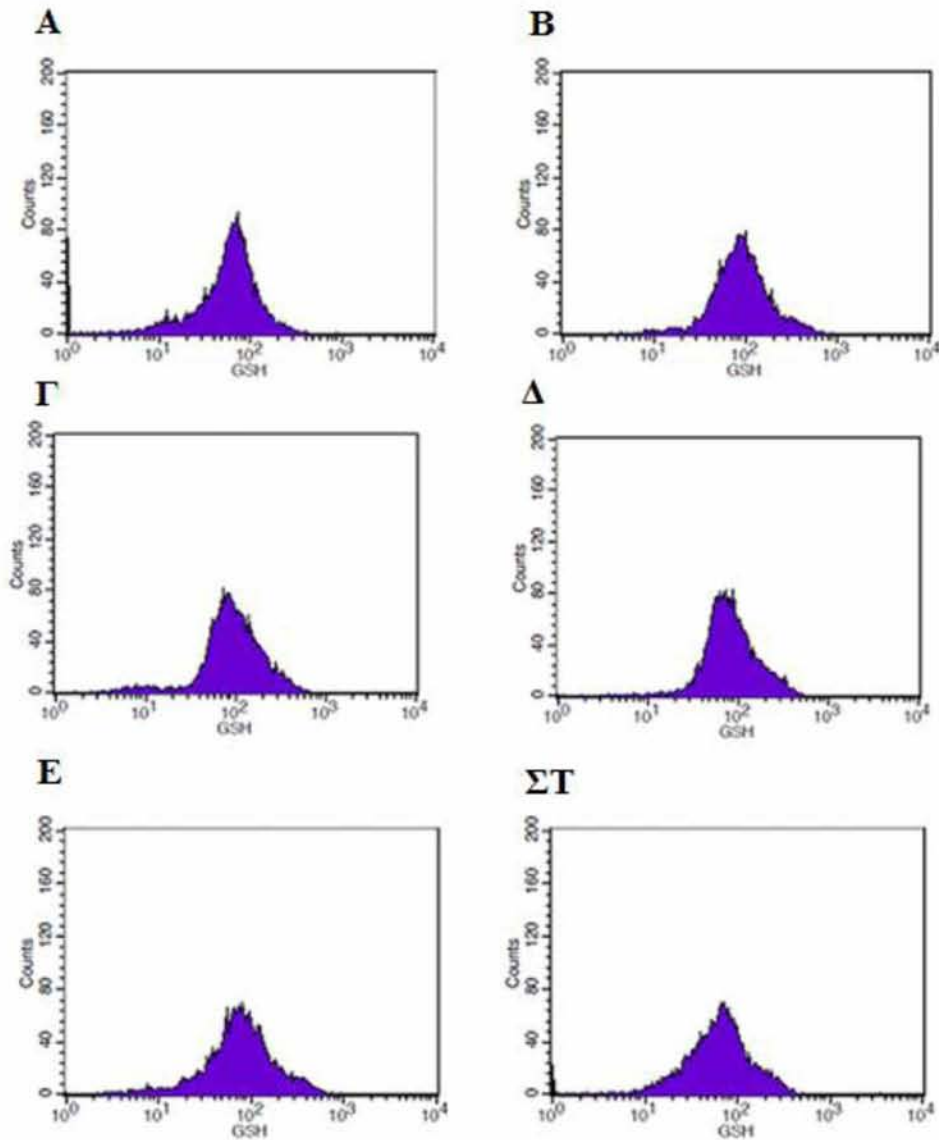
4.2.1. Επίπεδα γλουταθειόνης (GSH).

4.2.1.1. Επίπεδα γλουταθειόνης (GSH) στα EA.hy926.

Τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής έδειξαν πως το εκχύλισμα αύξησε στατιστικώς σημαντικά ($p < 0,05$), τα επίπεδα της GSH στην κυτταρική σειρά EA.hy926 κατά 23, 22, 38 και 20% στις συγκεντρώσεις 2,5, 5, 7,5 και 10 µg/ml TPF αντίστοιχα, σε σύγκριση με το control.



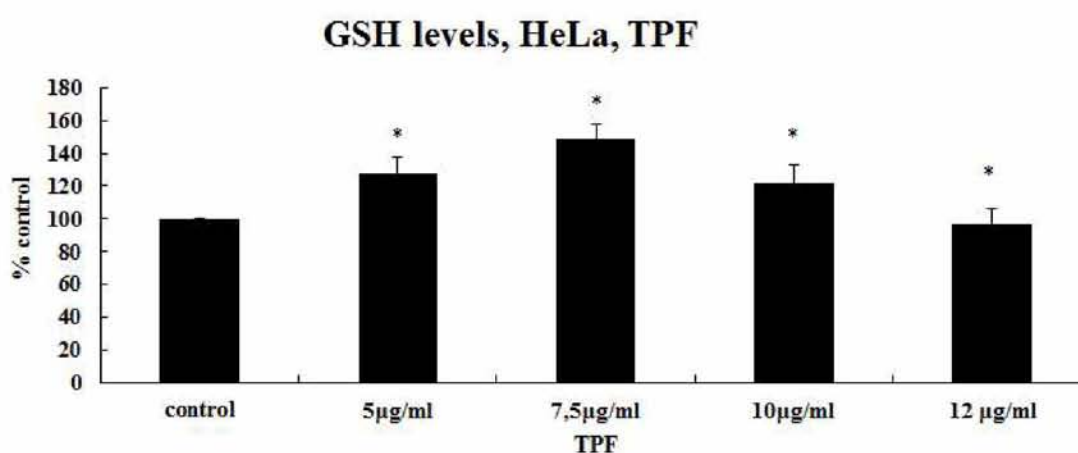
Διάγραμμα 3: Επίδραση TPF στα επίπεδα GSH, στην κυτταρική σειρά EA.hy926, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης του εκχυλίσματος, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control και παρουσιάζονται ως mean ± SEM, (n=6). * $p < 0,05$ στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με το control.



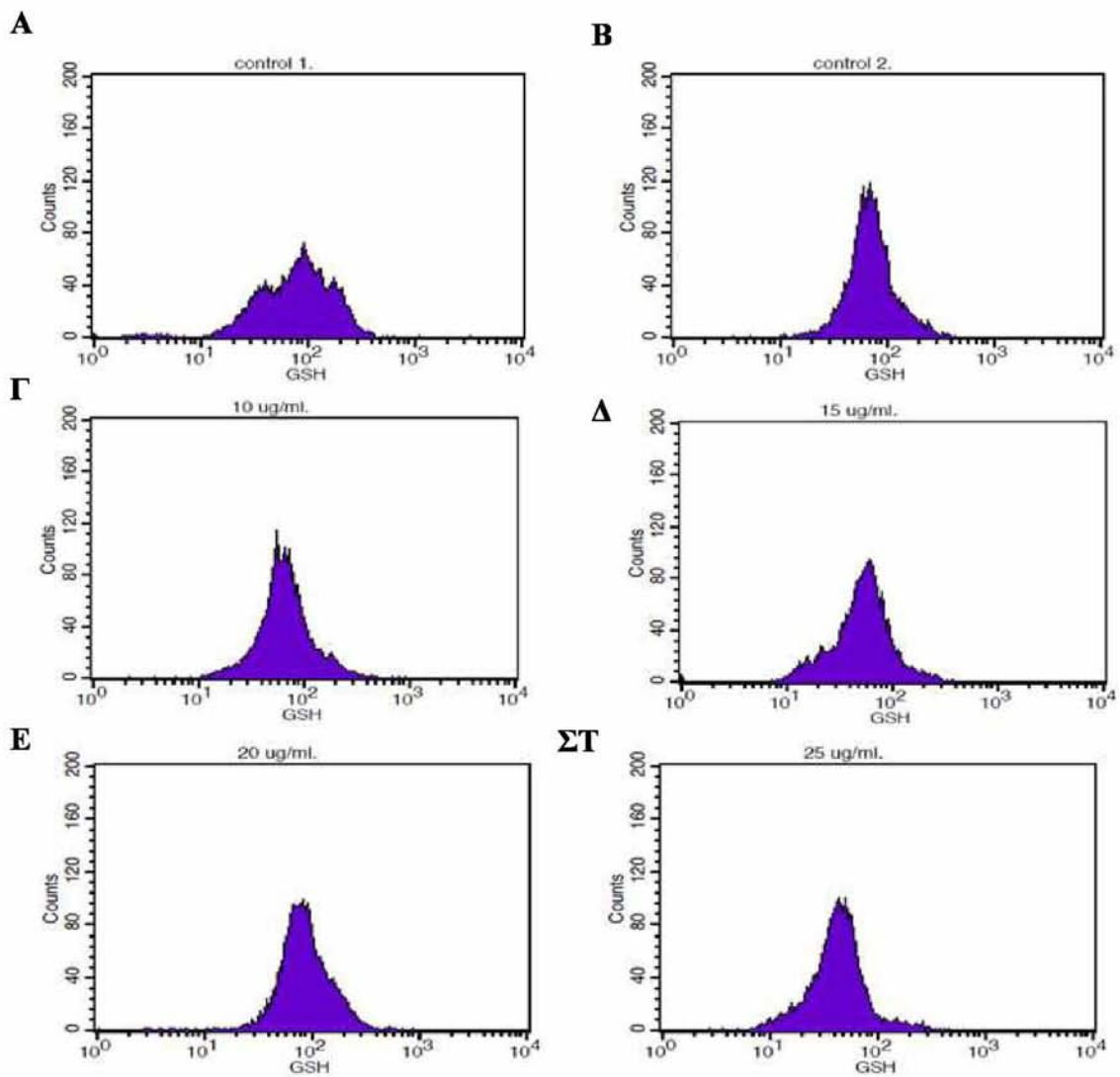
Διάγραμμα 4: Επίδραση TPF στα επίπεδα GSH στην κυτταρική σειρά EA.hy926. Τα ιστογράμματα παρουσιάζουν τον φθορισμό που εκπέμπεται από 10,000 κύτταρα κατά την μέτρηση της GSH, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Ο FL2 αντιπροσωπεύει τον φθορισμό που ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας 488 και 580 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και ως μήκος κύματος εκπομπής. Α και Β) Επίπεδα GSH στα controls (χωρίς TPF). Γ) Επίπεδα GSH στα 2,5 μg/ml TPF. Δ) Επίπεδα GSH στα 5 μg/ml TPF. Ε) Επίπεδα GSH στα 7,5 μg/ml TPF. ΣΤ) Επίπεδα GSH στα 10 μg/ml TPF.

4.2.1.2. Επίπεδα γλουταθειόνης (GSH) σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα τραχήλου της μήτρας (HeLa).

Τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής έδειξαν πως το εκχύλισμα αύξησε στατιστικώς σημαντικά ($p < 0,05$), τα επίπεδα της GSH στην κυτταρική σειρά HeLa κατά 28, 48, 22 % στις συγκεντρώσεις 5, 7,5, 10 $\mu\text{g/ml}$ TPF, αντίστοιχα, σε σύγκριση με το control. Ωστόσο, παρατηρήθηκε μικρή μείωση ($p < 0,05$) της GSH, κατά 3% σε σύγκριση με το control, στη συγκέντρωση 12 $\mu\text{g/ml}$ TPF η οποία δεν φαίνεται να έχει κάποια βιολογική σημασία.



Διάγραμμα 5: Επίδραση TPF στα επίπεδα GSH, στην κυτταρική σειρά HeLa, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης του εκχυλίσματος, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control και παρουσιάζονται ως mean \pm SEM, (n=6). * $p < 0,05$ στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με το control.

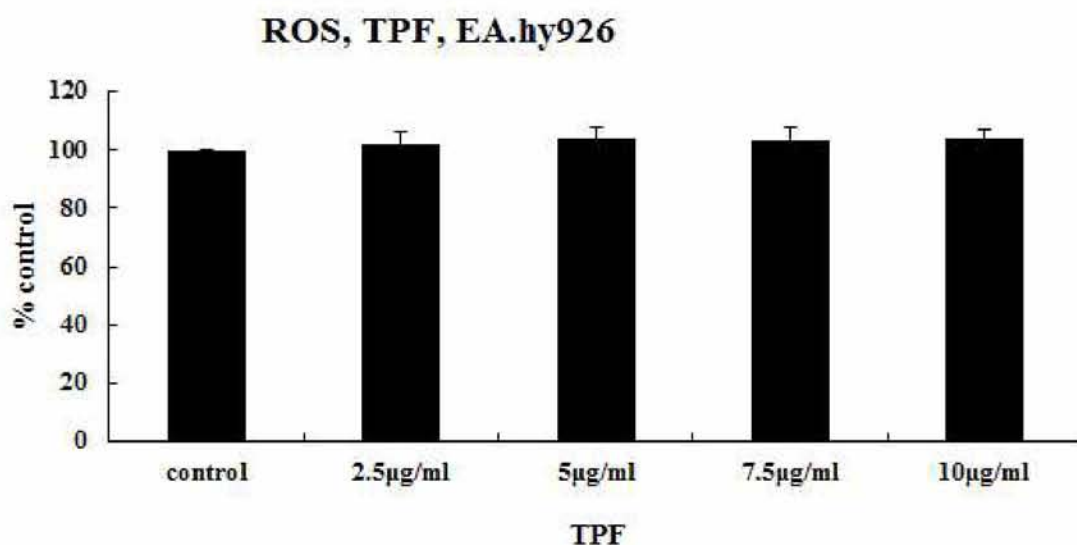


Διάγραμμα 6: Επίδραση TPF στα επίπεδα GSH στην κυτταρική σειρά HeLa. Τα ιστογράμματα παρουσιάζουν τον φθορισμό που εκπέμπεται από 10,000 κύτταρα κατά την μέτρηση της GSH, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Ο FL2 αντιπροσωπεύει τον φθορισμό που ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας 488 και 580 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και ως μήκος κύματος εκπομπής. Α και Β) Επίπεδα GSH στα controls (χωρίς TPF). Γ) Επίπεδα GSH στα 5 $\mu\text{g/ml}$ TPF. Δ) Επίπεδα GSH στα 7,5 $\mu\text{g/ml}$ TPF. Ε) Επίπεδα GSH στα 10 $\mu\text{g/ml}$ TPF. ΣΤ) Επίπεδα GSH στα 12 $\mu\text{g/ml}$ TPF.

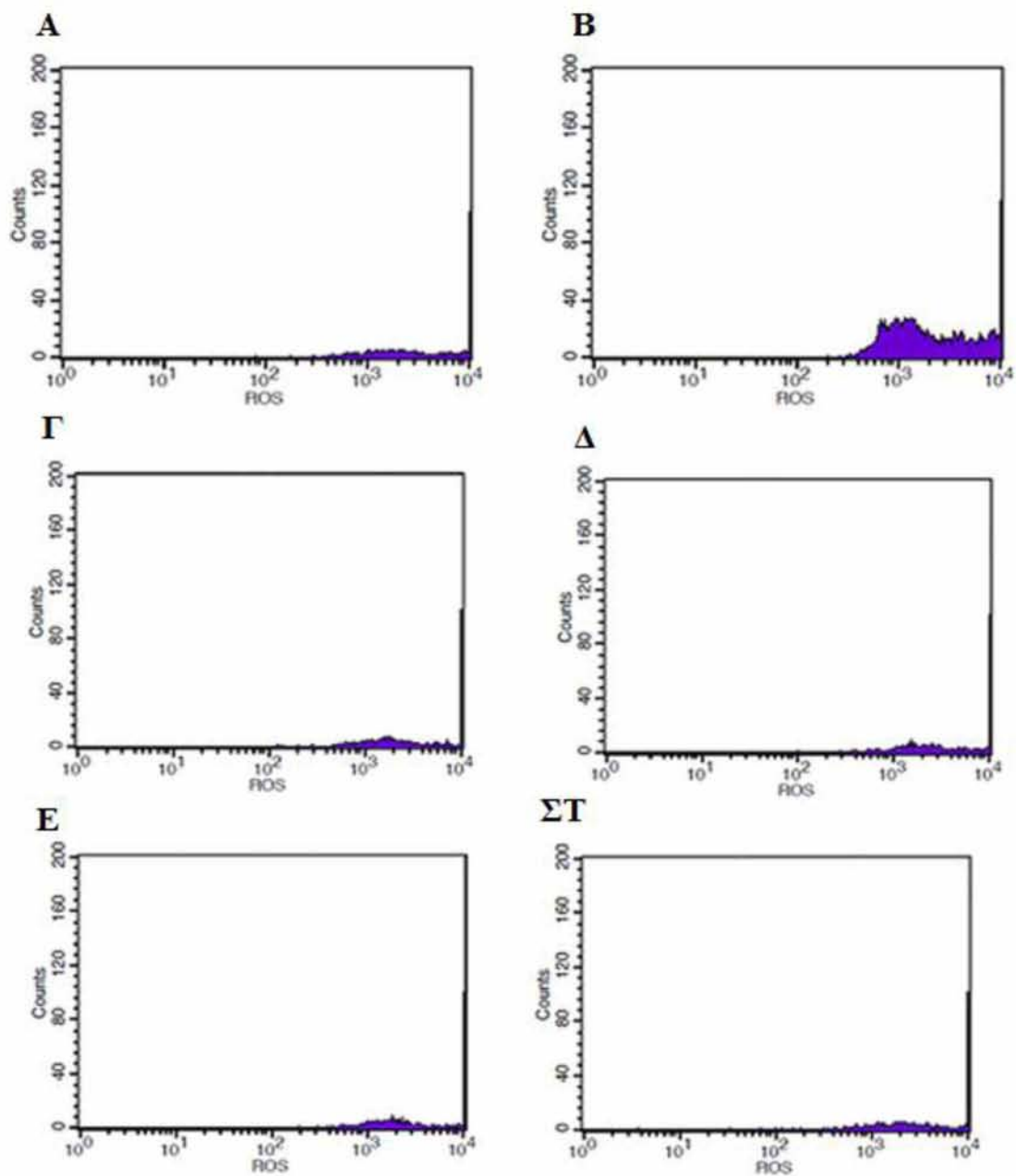
4.2.2. Επίπεδα δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS).

4.2.2.1. Επίπεδα ROS σε EA.hy926.

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



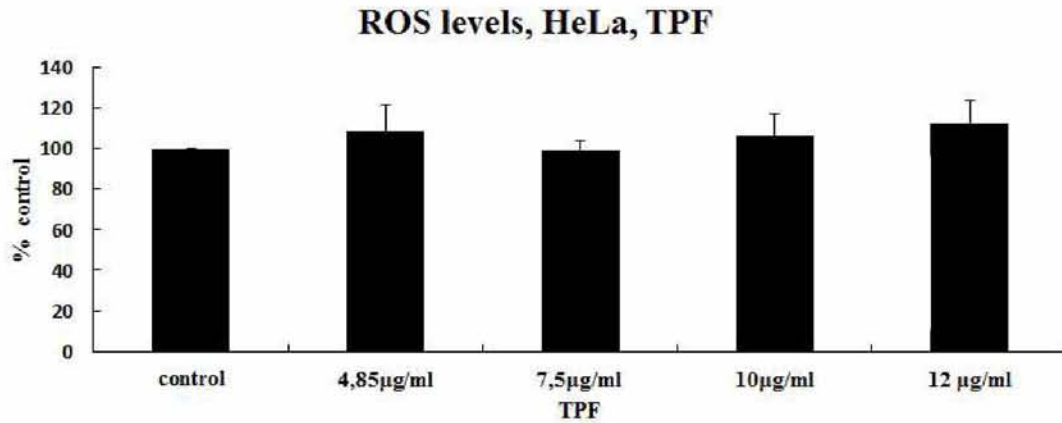
Διάγραμμα 7: Επίδραση TPF στα επίπεδα ROS, στην κυτταρική σειρά EA.hy926, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης του εκχυλίσματος, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control και παρουσιάζονται ως mean \pm SEM, (n=6). * $p < 0,05$ στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με το control.



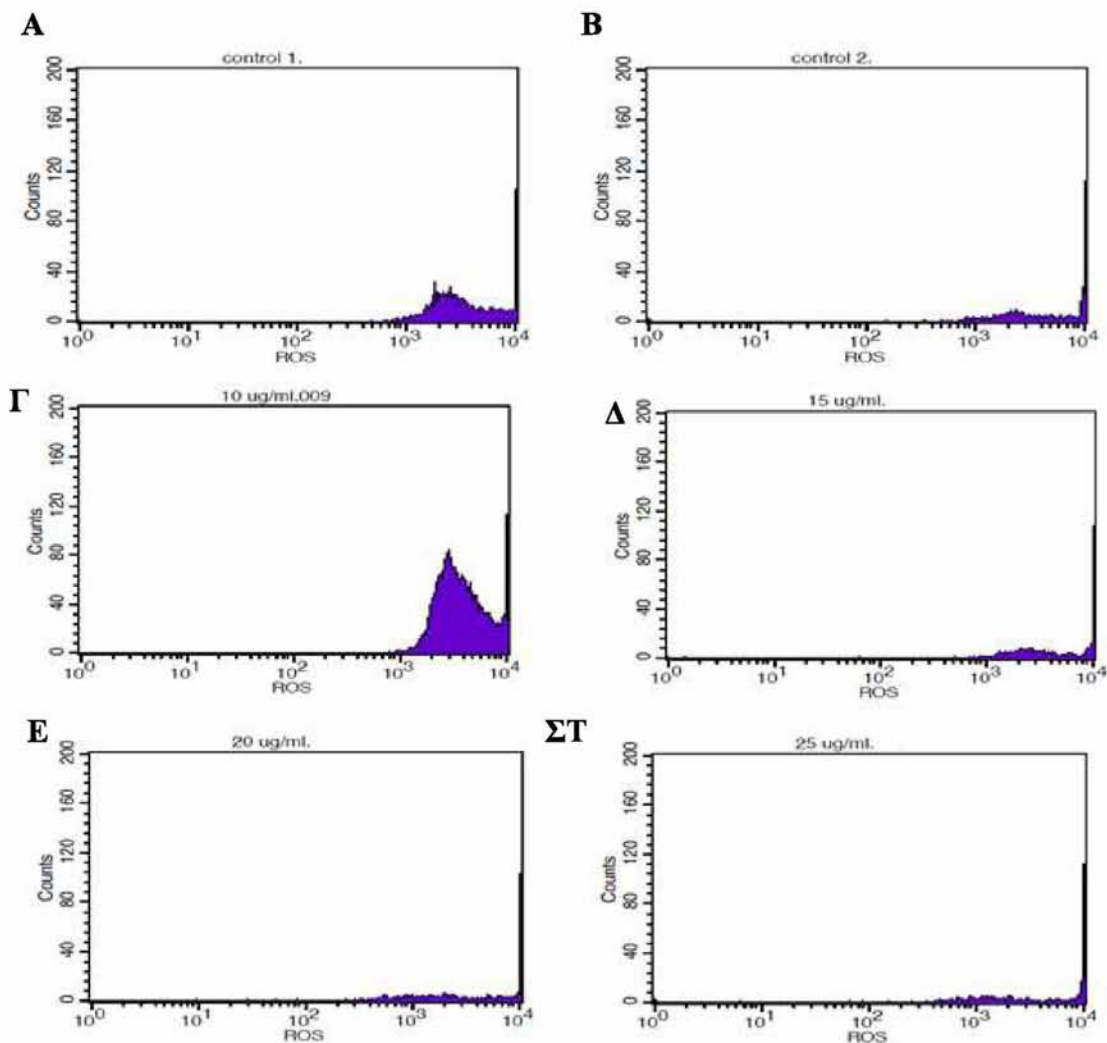
Διάγραμμα 8: Επίδραση TPF στα επίπεδα ROS στην κυτταρική σειρά C2C12. Τα ιστογράμματα παρουσιάζουν τον φθορισμό που εκπέμπεται από 10,000 κύτταρα κατά την μέτρηση της GSH, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Ο FL2 αντιπροσωπεύει τον φθορισμό που ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας 488 και 580 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και ως μήκος κύματος εκπομπής. Α και Β) Επίπεδα ROS στα controls (χωρίς TPF). Γ) Επίπεδα ROS στα 2,5 μg/ml TPF. Δ) Επίπεδα ROS στα 5 μg/ml TPF. Ε) Επίπεδα ROS στα 7,5 μg/ml TPF. ΣΤ) Επίπεδα ROS στα 10 μg/ml TPF.

4.2.2.2. Επίπεδα ROS στα HeLa.

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



Διάγραμμα 9: Επίδραση TPF στα επίπεδα ROS, στην κυτταρική σειρά HeLa, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης του εκχυλίσματος, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control και παρουσιάζονται ως mean ± SEM, (n=6). * $p < 0,05$ στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με το control.



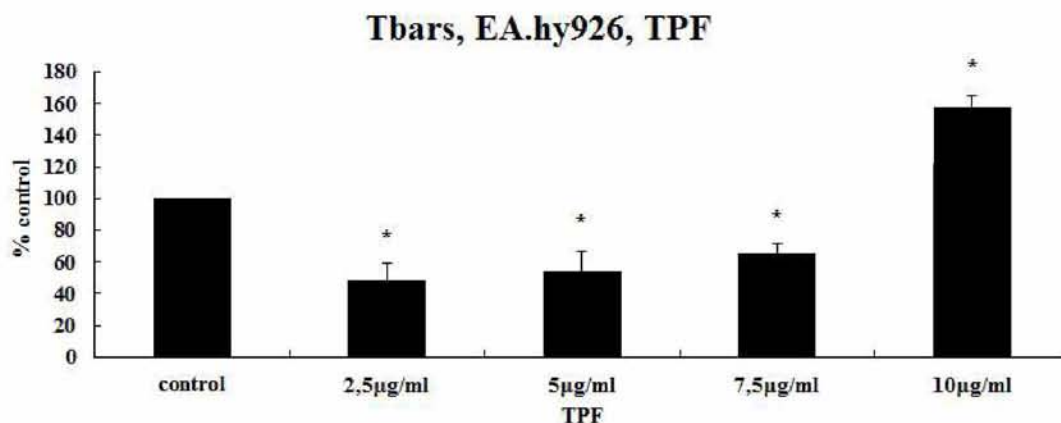
Διάγραμμα 10: Επίδραση TPF στα επίπεδα ROS στην κυτταρική σειρά HeLa. Τα ιστογράμματα παρουσιάζουν τον φθορισμό που εκπέμπεται από 10,000 κύτταρα κατά την μέτρηση της GSH, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Ο FL2 αντιπροσωπεύει τον φθορισμό που ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας 488 και 580 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και ως μήκος κύματος εκπομπής. Α και Β) Επίπεδα ROS στα controls (χωρίς TPF). Γ) Επίπεδα ROS στα 5 $\mu\text{g/ml}$ TPF. Δ) Επίπεδα ROS στα 7,5 $\mu\text{g/ml}$ TPF. Ε) Επίπεδα ROS στα 10 $\mu\text{g/ml}$ TPF. ΣΤ) Επίπεδα ROS στα 12 $\mu\text{g/ml}$ TPF.

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

4.3.1. Επίπεδα Tbars σε EA.hy926

Η χορήγηση TPF μείωσε στατιστικά σημαντικά ($p < 0,05$) την οξείδωση των λιπιδίων κατά 51,72, 46,15 και 34,95% σε σύγκριση με το control στις συγκεντρώσεις 2,5, 5 και 7,5 $\mu\text{g/ml}$ TPF αντίστοιχα. Ωστόσο στην συγκέντρωση των 10 $\mu\text{g/ml}$ TPF,

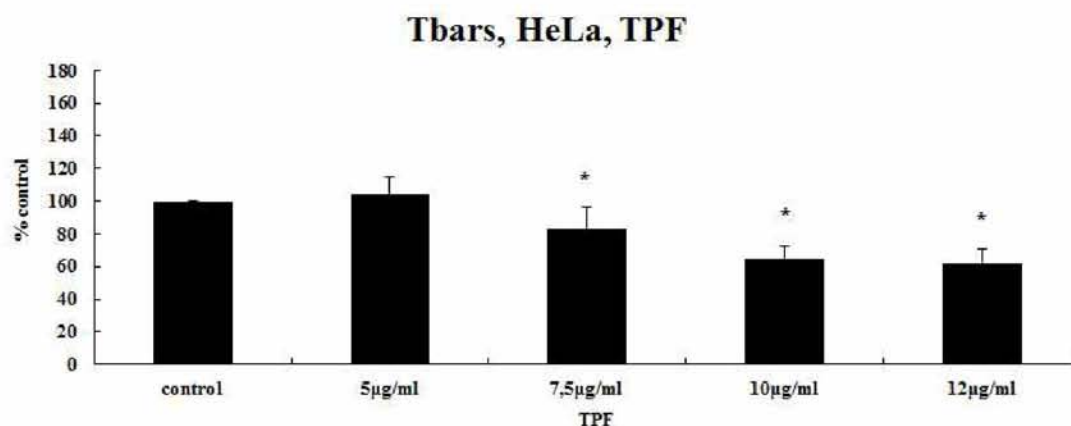
τα Tbars, αυξήθηκαν στατιστικά σημαντικά ($p < 0,05$), κατά 57,69% σε σύγκριση με το control.



Διάγραμμα 11: Επίπεδα Tbars, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης TPF στην κυτταρική σειρά EA.hy926. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control και παρουσιάζονται ως mean \pm SEM, (n=6). * $p < 0,05$ στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με το control.

4.3.2. Επίπεδα Tbars σε HeLa

Η χορήγηση TPF μείωσε στατιστικά σημαντικά ($p < 0,05$) την οξειδωση των λιπιδίων κατά 16,72, 34,83 και 37,92 % σε σύγκριση με το control στις συγκεντρώσεις 7,5, 10 και 12 $\mu\text{g/ml}$ TPF, αντίστοιχα.

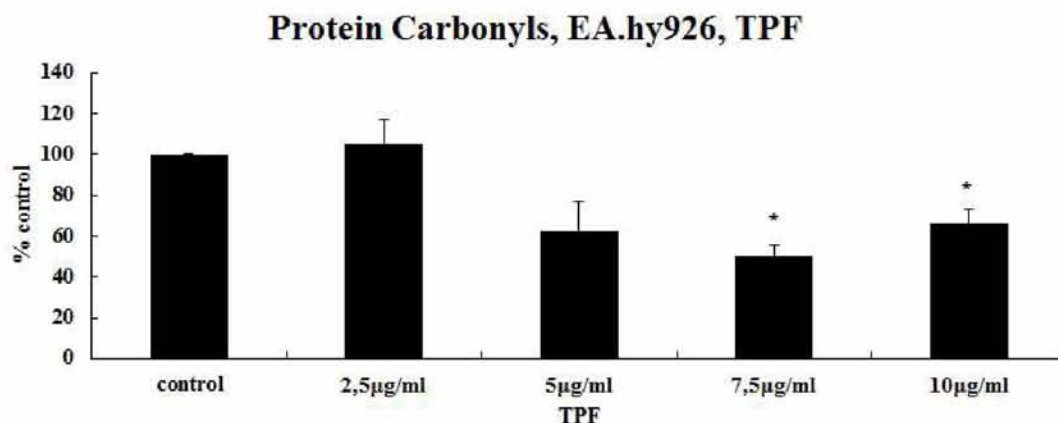


Διάγραμμα 12: Επίπεδα Tbars, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης TPF στην κυτταρική σειρά HeLa. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control και παρουσιάζονται ως mean \pm SEM, (n=6). * $p < 0,05$ στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με το control.

3.4 Πρωτεϊνικά καρβονύλια (protein carbonyls)

3.4.1. Πρωτεϊνικά καρβονύλια σε EA.hy926

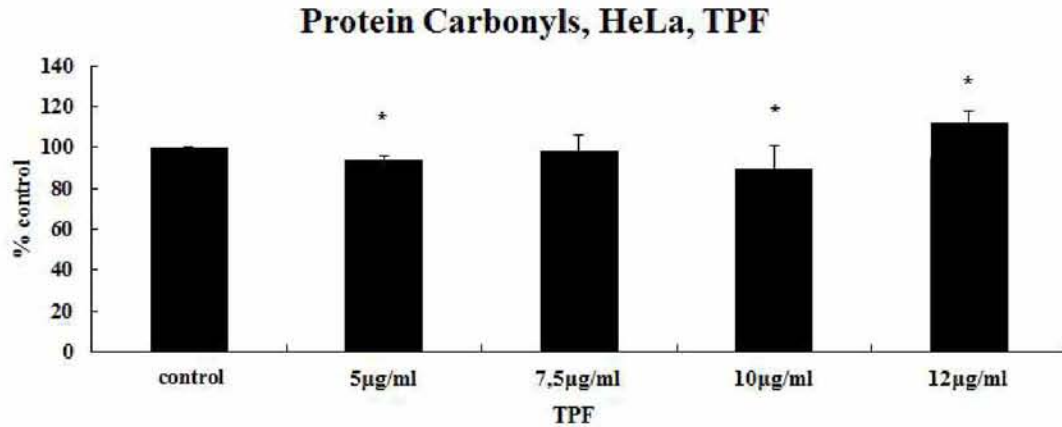
Η χορήγηση TPF μείωσε στατιστικά σημαντικά ($p < 0,05$) την οξείδωση των πρωτεϊνών στα EA.hy926 κύτταρα, κατά 49,88 και 33,65% σε σύγκριση με το control στις συγκεντρώσεις 7,5 και 10 $\mu\text{g/ml}$ TPF, αντίστοιχα.



Διάγραμμα 13: Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης TPF στην κυτταρική σειρά EA.hy926. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control και παρουσιάζονται ως mean \pm SEM, (n=6). * $p < 0,05$ στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με το control.

4.4.2. Πρωτεϊνικά καρβονύλια σε HeLa

Η χορήγηση TPF μείωσε στατιστικά σημαντικά ($p < 0,05$) την οξείδωση των πρωτεϊνών στα HeLa κύτταρα, κατά 6,12 και 10,06 % σε σύγκριση με το control στις συγκεντρώσεις 5 και 10 $\mu\text{g/ml}$ TPF, αντίστοιχα. Ωστόσο, στην μεγαλύτερη συγκέντρωση, 12 $\mu\text{g/ml}$ TPF, παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση ($p < 0,05$), κατά 12,64 % σε σύγκριση με το control.



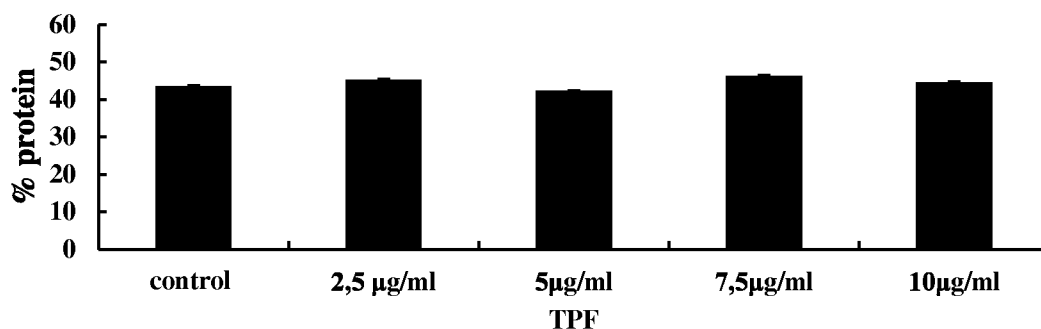
Διάγραμμα 14: Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης TPF στην κυτταρική σειρά HeLa. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control και παρουσιάζονται ως mean ± SEM, (n=6). * $p < 0,05$ στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με το control.

4.5. Προσδιορισμός επιπέδων αλβουμίνης μέσω αντιδραστηρίου bromocresol green

4.5.1. Ποσοστό αλβουμίνης σε σχέση με την συνολική πρωτεΐνη σε EA.hy926

Με το αντιδραστήριο Bradford μελετήσαμε την συνολική ποσότητα πρωτεΐνης, ενώ μέσω του αντιδραστηρίου bromocresol green, μετρήσαμε την ποσότητα της αλβουμίνης. Το παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζει το ποσοστό της αλβουμίνης σε σχέση με την συνολική πρωτεΐνη, το οποίο κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα στα δείγματα control (χωρίς TPF) και στα δείγματα με τις αυξανόμενες συγκεντρώσεις TPF. Συγκεκριμένα, το ποσοστό αλβουμίνης σε σχέση με την συνολική πρωτεΐνη είναι 43.51, 45.30, 42.33, 46.22, 44.58% πρωτεΐνη, στα δείγματα control, 2.5, 5, 7.5, 10 µg/ml TPF, αντίστοιχα.

Albumin, TPF, EA.hy926

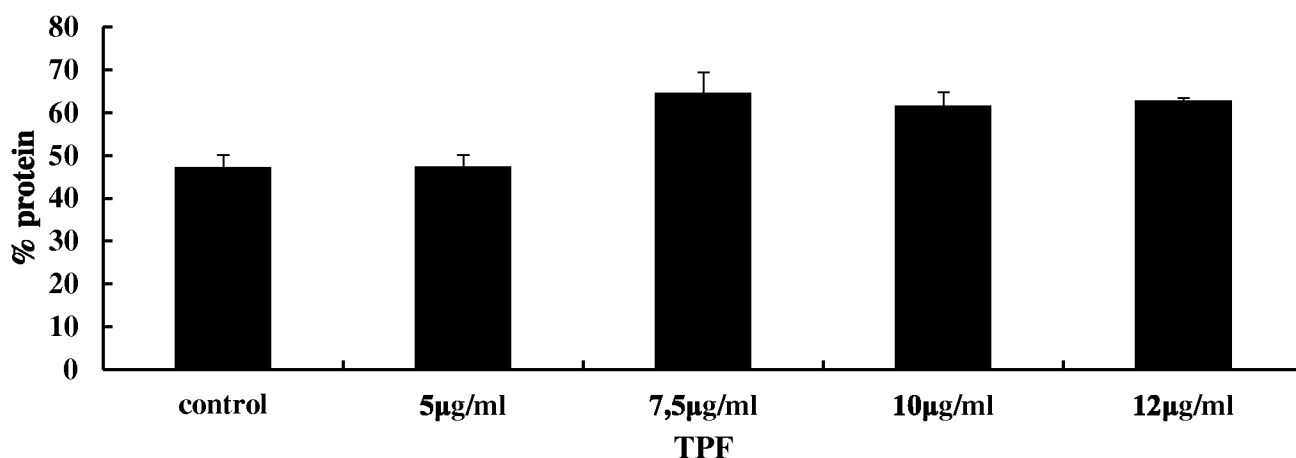


Διάγραμμα 15: Ποσοστό αλβουμίνης σε σχέση με την συνολική πρωτεΐνη, σε EA.hy926, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης TPF. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς τη συνολική πρωτεΐνη και παρουσιάζονται ως mean \pm SEM, (n=3).

4.5.2. Ποσοστό αλβουμίνης σε σχέση με την συνολική πρωτεΐνη σε HeLa

Με το αντιδραστήριο Bradford μελετήσαμε την συνολική ποσότητα πρωτεΐνης, ενώ μέσω του αντιδραστηρίου bromocresol green, μετρήσαμε την ποσότητα της αλβουμίνης. Το παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζει το ποσοστό της αλβουμίνης σε σχέση με την συνολική πρωτεΐνη. Συγκεκριμένα, το ποσοστό αλβουμίνης σε σχέση με την συνολική πρωτεΐνη είναι 47.31, 47.39, 64.66, 61.59, 62.86% πρωτεΐνη, στα δείγματα control, 2.5, 5, 7.5, 10 µg/ml TPF, αντίστοιχα.

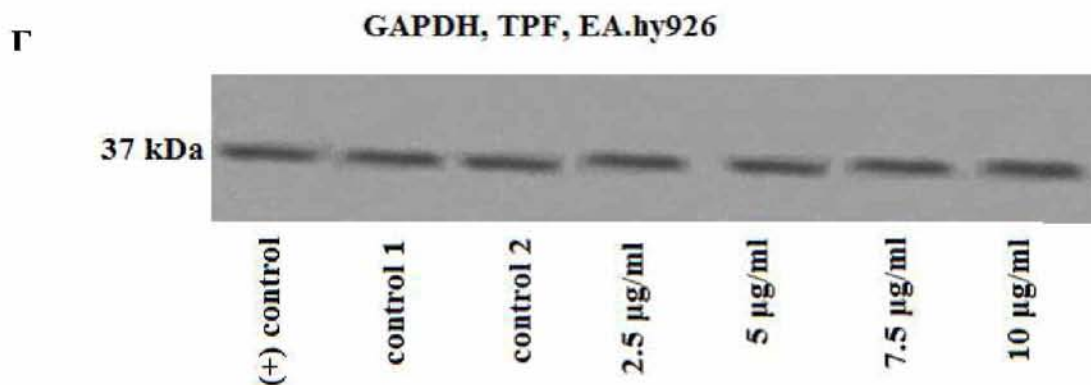
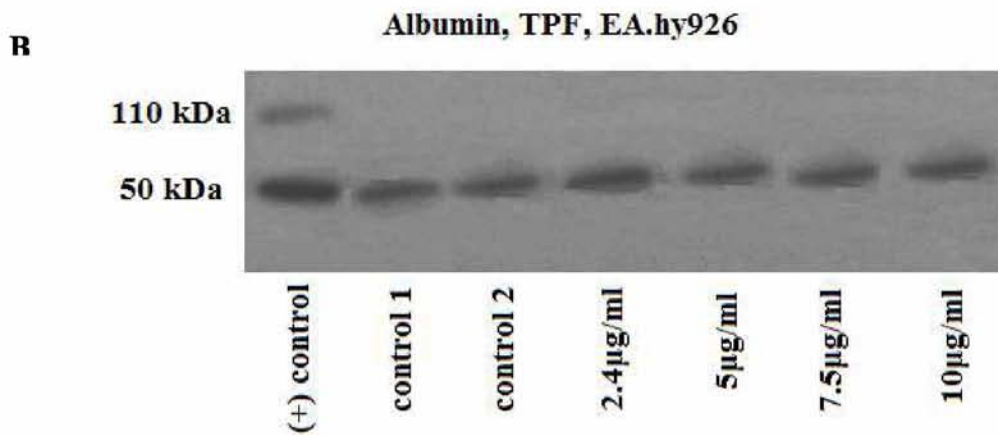
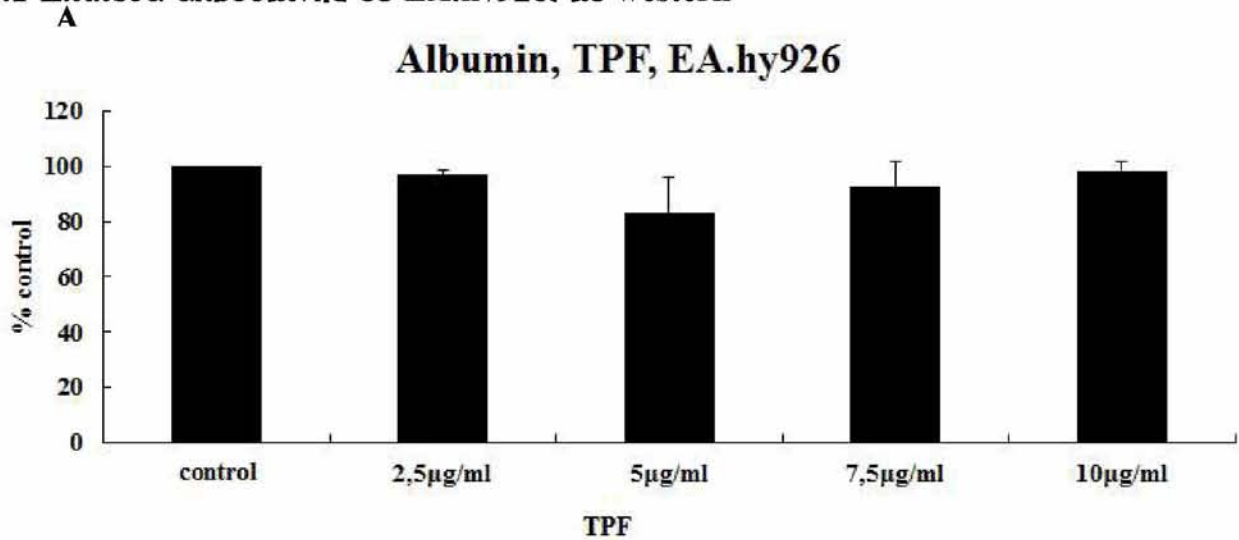
Albumin, TPF, HeLa



Διάγραμμα 16: Ποσοστό αλβουμίνης σε σχέση με την συνολική πρωτεΐνη, σε HeLa, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης TPF. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς τη συνολική πρωτεΐνη και παρουσιάζονται ως mean \pm SEM, (n=3).

4.6 Western blot

4.6.1 Επίπεδα αλβουμίνης σε EA.hy926, με western

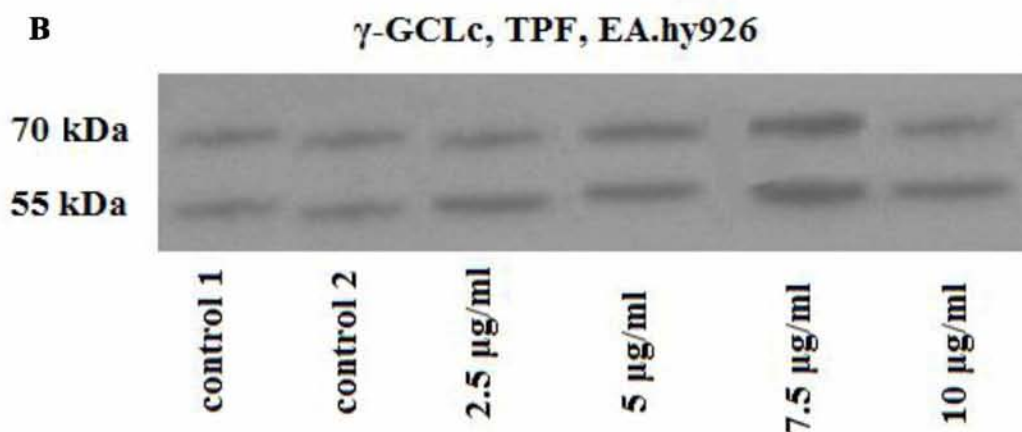
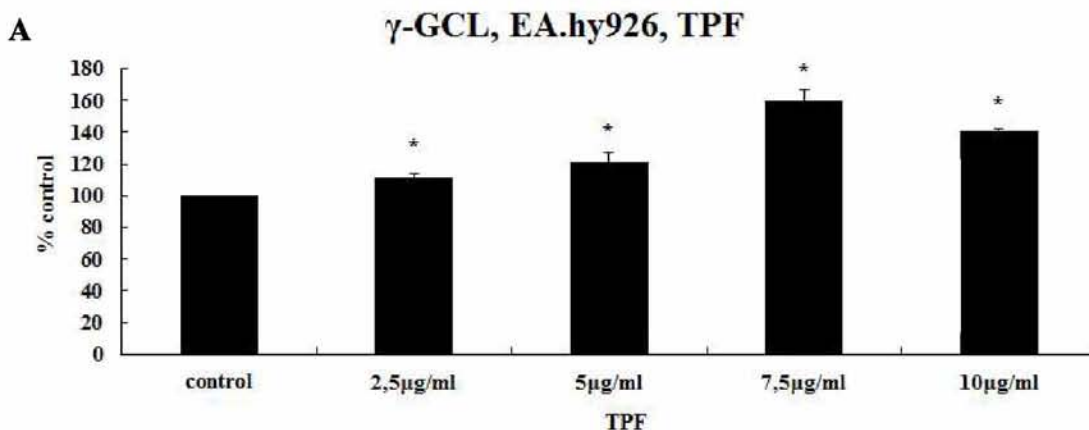


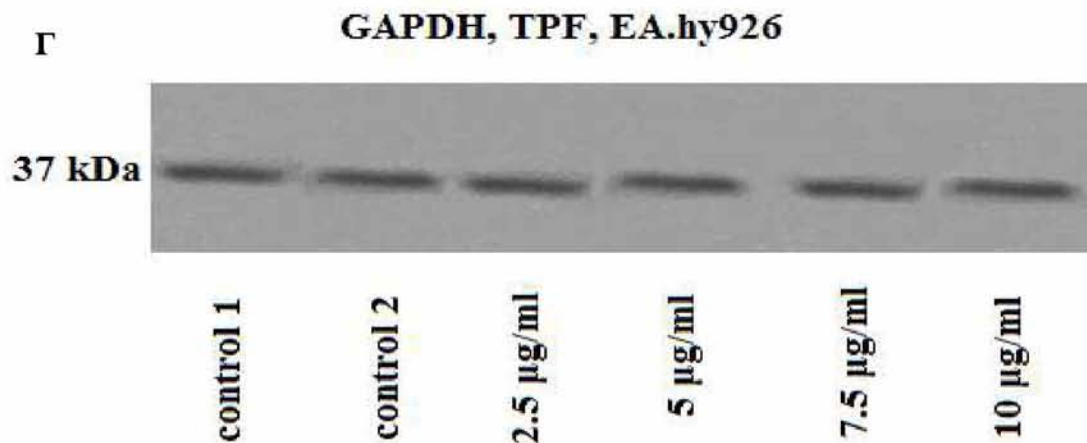
Διάγραμμα 17: Επίδραση TPF στα πρωτεϊνικά επίπεδα της αλβουμίνης, στην κυτταρική σειρά EA.hy926. Τα κύτταρα επωάστηκαν για 24 ώρες με τις συγκεντρώσεις 2.5, 5, 7.5 και 10 µg/ml TPF. Η ανάλυση της πρωτεϊνικής έκφρασης της αλβουμίνης πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Western blot. A) Αποτελέσματα της ανάλυσης Western blot εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο

ως προς το control. Η έκφραση του GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως μόριο κανονικοποίησης. Β) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση της πρωτεΐνης της αλβουμίνης. Γ) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση της πρωτεΐνης του GAPDH. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean \pm SEM (n=3) * $p < 0,05$, στατιστικώς σημαντικά σε σύγκριση με το control.

4.6.2 Επίπεδα καταλυτικής υπομονάδας της γ -GCL (γ -GCLc) σε EA.hy926

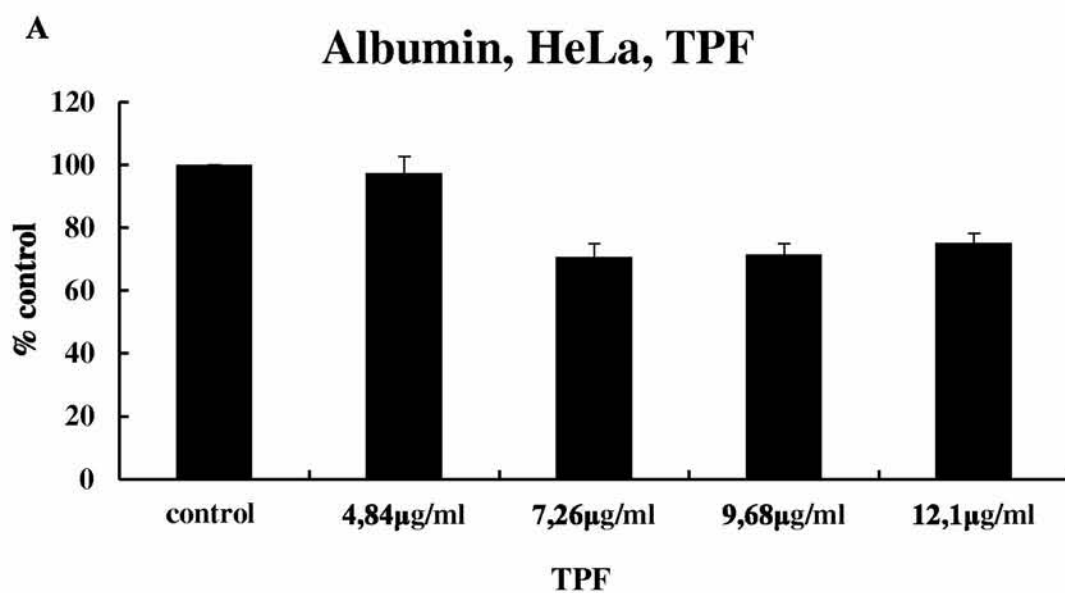
Έπειτα από 24 ώρες χορήγησης του εκχυλίσματος, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση ($p < 0,05$) στα επίπεδα πρωτεΐνης της γ -GCLc κατά 11,72, 21,36, 59,28, 41,34% σε σχέση με το control στις συγκεντρώσεις 2,5, 5, 7,5, 10 $\mu\text{g/ml}$ TPF, αντίστοιχα.

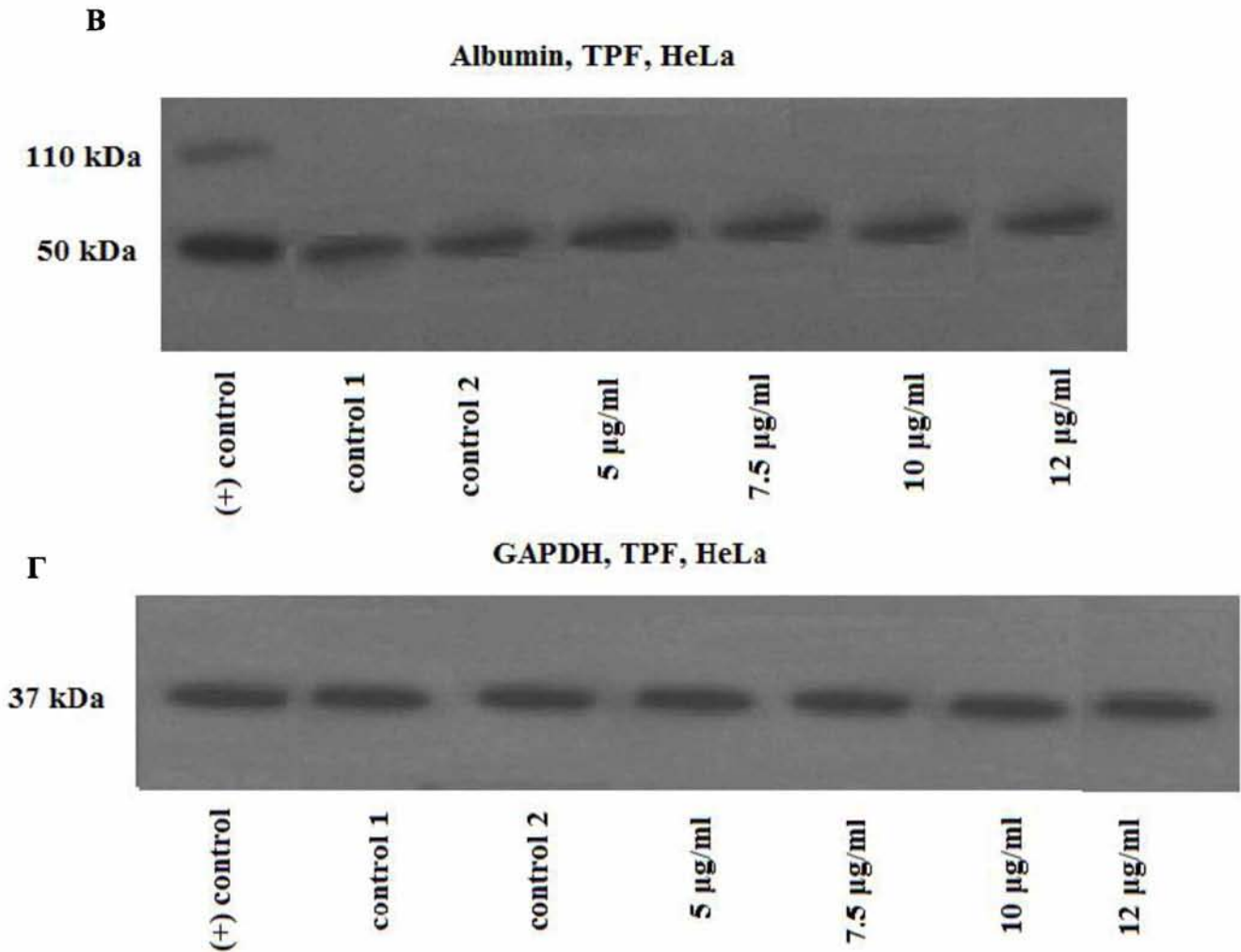




Διάγραμμα 18: Επίδραση TPF στα πρωτεϊνικά επίπεδα της γ -GCLc, στην κυτταρική σειρά EA.hy926. Τα κύτταρα επωάστηκαν για 24 ώρες με τις συγκεντρώσεις 2.5, 5, 7.5 και 10 $\mu\text{g/ml}$ TPF. Η ανάλυση της πρωτεϊνικής έκφρασης της γ -GCLc πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Western blot. Α) Αποτελέσματα της ανάλυσης Western blot εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control. Η έκφραση του GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως μόριο κανονικοποίησης. Β) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση της πρωτεΐνης της γ -GCLc. Γ) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση της πρωτεΐνης του GAPDH. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως $\text{mean} \pm \text{SEM}$ ($n=3$) $*p<0,05$, στατιστικώς σημαντικά σε σύγκριση με το control.

4.6.3. Επίπεδα αλβουμίνης σε HeLa, με western blot

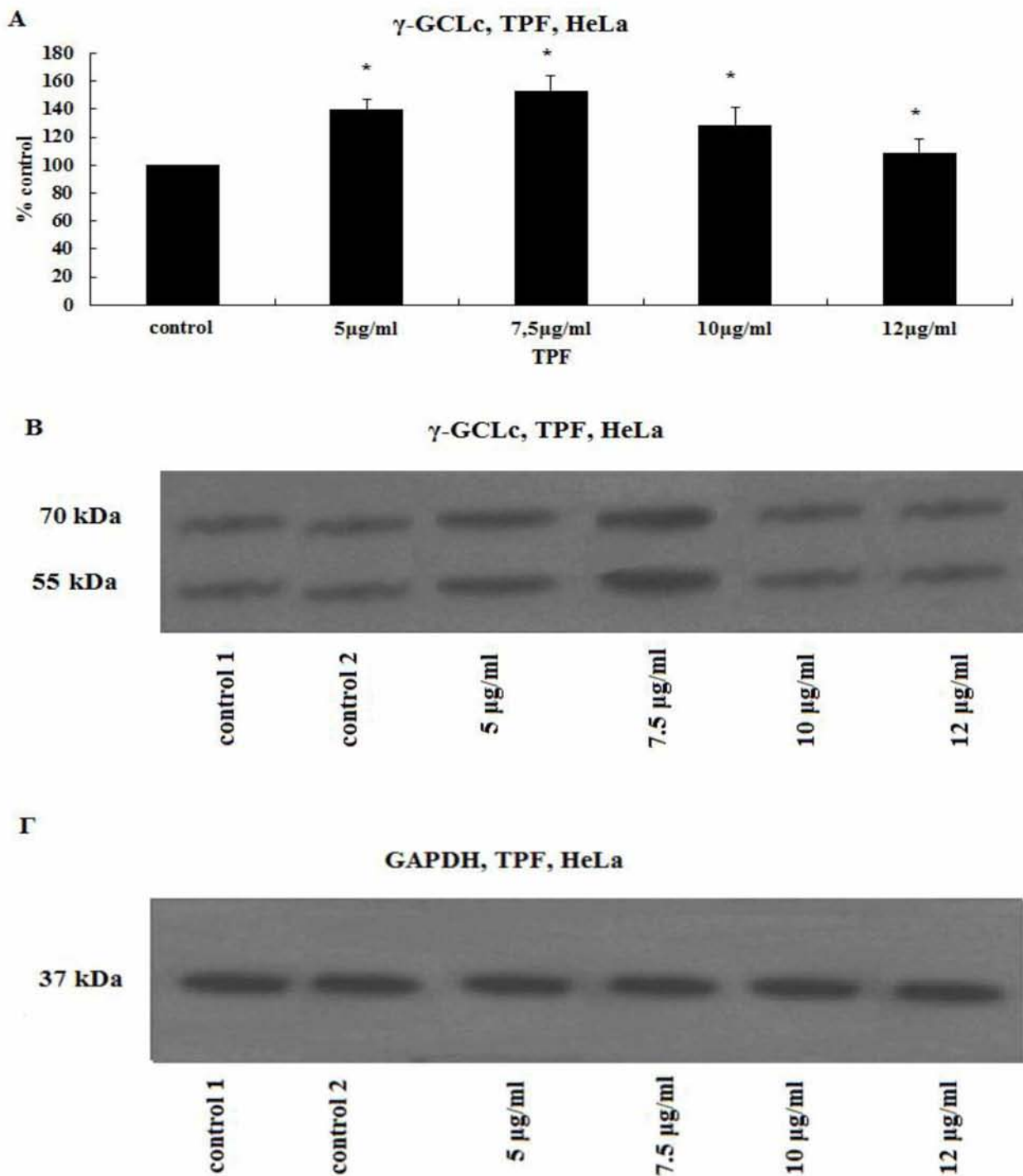




Διάγραμμα 19: Επίδραση TPF στα πρωτεϊνικά επίπεδα της αλβουμίνης, στην κυτταρική σειρά HeLa. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες με τις συγκεντρώσεις 2.5, 5, 7.5 και 10 µg/ml TPF. Η ανάλυση της πρωτεϊνικής έκφρασης της αλβουμίνης πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Western blot. Α) Αποτελέσματα της ανάλυσης Western blot εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control. Η έκφραση του GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως μόριο κανονικοποίησης. Β) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση της πρωτεΐνης της αλβουμίνης. Γ) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση της πρωτεΐνης του GAPDH. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean ± SEM (n=3) * $p < 0,05$, στατιστικώς σημαντικά σε σύγκριση με το control.

4.6.4 Επίπεδα γ -GCLc σε HeLa

Έπειτα από 24 ώρες χορήγησης του εκχυλίσματος, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση ($p < 0,05$) στα επίπεδα πρωτεΐνης της γ -GCLc κατά 39,77, 53,21, 28,31, 8,95% σε σχέση με το control στις συγκεντρώσεις 5, 7,5, 10 και 12 $\mu\text{g/ml}$ TPF, αντίστοιχα.



Διάγραμμα 20: Επίδραση TPF στα πρωτεϊνικά επίπεδα της γ -GCLc, στην κυτταρική σειρά HeLa. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες με τις

συγκεντρώσεις 5, 7.5, 10 και 12 $\mu\text{g/ml}$ TPF. Η ανάλυση της πρωτεϊνικής έκφρασης της γ -GCLc πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Western blot. Α) Αποτελέσματα της ανάλυσης Western blot εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control. Η έκφραση του GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως μόριο κανονικοποίησης. Β) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση της πρωτεΐνης της γ -GCLc. Γ) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση της πρωτεΐνης του GAPDH. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean \pm SEM (n=3) * $p < 0,05$, στατιστικώς σημαντικά σε σύγκριση με το control.

4.7. Συνοπτικά

Πίνακας 3: Συνοπτικά αποτελέσματα, ύστερα από 24 ώρες χορήγησης TPF, στα EA.hy926 και στα HeLA κύτταρα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control και παρουσιάζονται ως mean \pm SEM.

* $p < 0,05$ στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με το control

Κυτταρική σειρά	TPF ($\mu\text{g/ml}$)	GSH (mean \pm SEM)	ROS (mean \pm SEM)	TBARS (mean \pm SEM)	Protein carbonyls (mean \pm SEM)
EA.hy926	2,5	23 \pm 3*	2 \pm 4	-51,72 \pm 10,52 *	5,1 \pm 12,03
	5	22 \pm 5*	4 \pm 4	-46,15 \pm 13,05 *	-37,78 \pm 14,84
	7,5	38 \pm 12 *	3 \pm 4	-34,95 \pm 6,35 *	-49,88 \pm 5,16 *
	10	20 \pm 8 *	4 \pm 3	57,68 \pm 7,55 *	-33,65 \pm 7,18 *
HeLA	5	28 \pm 10 *	8 \pm 13	4,37 \pm 10,14	-6,12 \pm 1,97 *
	7,5	48 \pm 10 *	-1 \pm 8	-16,72 \pm 13,15 *	-1,78 \pm 7,83
	10	22 \pm 11 *	6 \pm 11	-34,83 \pm 7,26 *	-10,06 \pm 10,89 *
	12	-3 \pm 9 *	13 \pm 11	-37,92 \pm 8,8 *	12,64 \pm 5,43 *

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες ενός πολυφαινολικού κλάσματος ελαιολάδου (TPF), πλούσιο σε πολυφαινόλες, από μια Ελληνική ενδημική ποικιλία *Olea europaea*, που καλλιεργείται στο Άγιο Όρος. Μέχρι σήμερα, εξ όσων γνωρίζουμε, δεν υπάρχουν διαθέσιμες μελέτες που να διερευνούν τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες ενός συνολικού εκχυλίσματος ελαιολάδου σε κυτταροκαλλιέργειες.

Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων, προσδιορισμός της οξειδοαναγωγικής κατάστασης με κυτταρομετρία ροής, όπου ελέγχθηκαν τα επίπεδα γλουταθειόνης (GSH) και τα επίπεδα δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), έλεγχος των ουσιών που αντιδρούν με θιοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS- Thiobarbituric acid reactive substances) και τα πρωτεϊνικά καρβονύλια, προσδιορισμός επιπέδων αλβουμίνης μέσω αντιδραστηρίου bromocresol green και έλεγχος των επιπέδων αλβουμίνης (με western blot) και των επιπέδων της καταλυτικής υπομονάδας της γ-GCL. Έτσι, δόθηκε η ευκαιρία για εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την αντιοξειδωτική κατάσταση.

Τα αποτελέσματα των αντιοξειδωτικών αξιολογήθηκαν σε κυτταρικό επίπεδο, ιδιαίτερα σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα (EA.hy926) και καρκινικά κύτταρα τραχήλου της μήτρας (HeLa). Τα ενδοθηλιακά κύτταρα επιλέχθηκαν καθώς συγκροτούν το ενδότερο τμήμα των αγγείων και οι ελεύθερες ρίζες παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων ενώ η καρκινική κυτταρική σειρά επιλέχθηκε καθώς κυρίαρχη θέση μεταξύ των χημειοπροφυλακτικών παραγόντων για την πρόληψη του καρκίνου κατέχουν οι πολυφαινόλες.

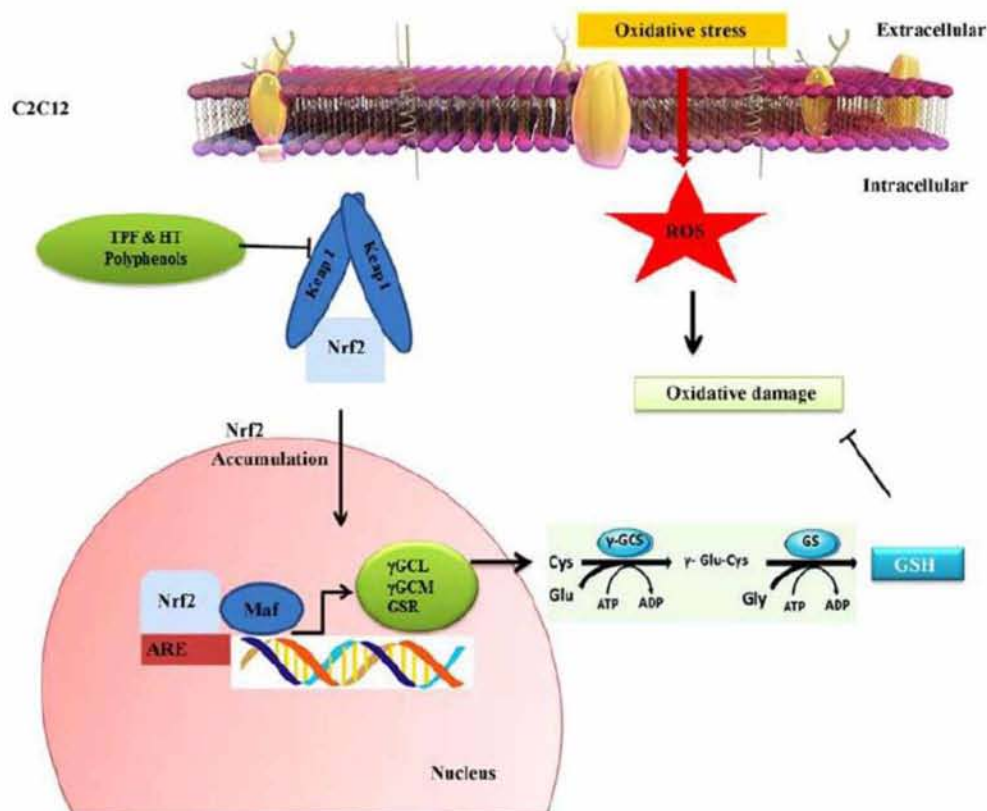
Το ελαιόλαδο είναι ένα αναπόσπαστο κομμάτι της μεσογειακής διατροφής και ένα προϊόν πλούσιο σε μονο-ακόρεστα λιπαρά και σε αντιοξειδωτικές ουσίες. Περιέχει επίσης ένα σύνολο διαφορετικών πολυφαινολών, με κυριότερες την ελαιευρωπαϊνή, την υδροξυτυροσόλη και την τυροσόλη.(Visioli, Bellomo, & Galli, 1998)

Αρχικά για να χορηγηθούν τα εκχυλίσματα στις κυτταρικές σειρές, έπρεπε πρώτα να υπολογιστούν οι κυτταροτοξικές τους συγκεντρώσεις, κάτι που έγινε με τη μέθοδο XTT. Στην κυτταρική σειρά EA.hy926, χορηγήθηκε εύρος συγκεντρώσεων

από 12,0-96,0 $\mu\text{g/ml}$ TPF. Ωστόσο συγκεντρώσεις πάνω από 24,0 $\mu\text{g/ml}$ TPF ήταν κυτταροτοξικές. Συνεπώς, για τον έλεγχο τις αντιοξειδωτικής δράσης του εκχυλίσματος, χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις από 2,5-10,0 $\mu\text{g/ml}$. Στην κυτταρική σειρά HeLa, χορηγήθηκε εύρος συγκεντρώσεων από 7,5-10,0 $\mu\text{g/ml}$ TPF. Ωστόσο συγκεντρώσεις πάνω από 25,0 $\mu\text{g/ml}$ TPF ήταν κυτταροτοξικές. Συνεπώς, για τον έλεγχο τις αντιοξειδωτικής δράσης του εκχυλίσματος, χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις από 5,0-12,0 $\mu\text{g/ml}$. Αυτό που παρατηρείται είναι ότι σε σχέση με τη καρκινική κυτταρική σειρά τραχήλου της μήτρας, τα ενδοθηλιακά κύτταρα φάνηκε να εμφανίζουν μεγαλύτερη ευαισθησία στα εκχυλίσματα TPF, καθώς μειώθηκε η συγκέντρωση εμφάνισης κυτταροτοξικότητας. Οι μικρές παρατηρούμενες διαφορές μεταξύ των δυο κυτταρικών σειρών πιθανότατα οφείλονται στη διαφορετική ικανότητα απορρόφησης και μεταβολισμού ξеноβιοτικών μορίων καθώς και στους διαφορετικούς μεμβρανικούς υποδοχείς που διαθέτουν. (Garcia-Canton, Minet, Anadon, & Meredith, 2013) Πρέπει επίσης να ληφθεί υπόψη ότι η μια κυτταρική σειρά αφορά καρκινικά κύτταρα.

Στη συνέχεια, γνωρίζοντας τη συγκέντρωση που το κάθε εκχύλισμα εμφανίζει τοξικότητα στην κάθε κυτταρική σειρά, προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις που θα χορηγούνταν στις καλλιέργειες ώστε να μελετηθεί η επίδρασή τους στα επίπεδα GSH και ROS με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής. Τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής έδειξαν πως το εκχύλισμα αύξησε στατιστικώς σημαντικά τα επίπεδα της GSH και στις δύο κυτταρικές σειρές. Αξιοσημείωτο είναι ότι πάνω από μια τιμή συγκέντρωσης εμφανίζεται προοξειδωτικό φαινόμενο, οδηγώντας στην παρατηρούμενη μείωση της αύξησης των επιπέδων γλουταθειόνης σε κάποιες από τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (Priftis et al., 2015), (Procházková, Boušová, & Wilhelmová, 2011). Επίσης, αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι η ελαιοευρωπαϊνή και η υδροξυτυροσόλη λειτουργούν προοξειδωτικά. Οι φαινόλες του ελαιολάδου έχει αποδειχθεί πως αυξάνουν τα επίπεδα της γλουταθειόνης και στο πλάσμα του ανθρώπου (Pliszka, Huszcza-Ciołkowska, & Wierzbicka, 2016). Η αύξηση της γλουταθειόνης ίσως οφείλεται στην υπερ-λειτουργία της GCL ή στην υπερλειτουργία της συνθετάσης της γλουταθειόνης και αυτό εξηγείται από την αύξηση των επιπέδων της GCL που βρέθηκε και αναλύεται παρακάτω. (Visioli, Wolfram, Richard, Abdullah, & Crea, 2009) Πιο αναλυτικά στην κυτταρική σειρά EA.hy926 παρατηρήθηκε αύξηση της γλουταθειόνης κατά 23, 22, 38 και 20% στις συγκεντρώσεις 2,5, 5, 7,5 και 10 $\mu\text{g/ml}$ TPF αντίστοιχα, σε σύγκριση με το control.

Ένας πιθανός μηχανισμός που εξηγεί την αύξηση της γλουταθειόνης είναι το μονοπάτι μεταγωγής σήματος Keap1-Nrf2. Η πρωτεΐνη Keap1 (Kelch-like ECH associated protein 1) λειτουργεί ως «αισθητήρας στρες». Υπό φυσιολογικές συνθήκες, ο Nrf2 ουβικιτινιλιώνεται από το σύμπλοκο Keap1-Cullin3 ubiquitin E3 λιγάση στο κυτταρόπλασμα και οδηγείται στο πρωτεάσωμα προς αποικοδόμηση. Όταν το κύτταρο εκτεθεί σε οξειδωτικό στρες ή τοξικά ξеноβιοτικά, η αποικοδόμηση του Nrf2 σταματά, ο Nrf2 σταθεροποιείται και οδηγείται στον πυρήνα. Μέσα στον πυρήνα, ο Nrf2 σχηματίζει διμερή με τις μικρές Maf πρωτεΐνες και επάγει την έκφραση γονιδίων-στόχων. (Suzuki, Otsuki, Keleku-Lukwete, & Yamamoto, 2016) Η Keap1 διαθέτει πολλά κατάλοιπα κυστεϊνών (Cys) τα οποία λειτουργούν ως αισθητήρες στρες. Οι Cys περιέχουν θειόλες (-SH) οι οποίες αντιδρούν με ηλεκτρονιόφιλα μόρια. Πολλά χημικά που δρουν ως ενεργοποιητές του Nrf2 αντιδρούν με αυτά τα κατάλοιπα κυστεϊνης (Suzuki et al., 2016). Ακόμα, υπάρχουν και εναλλακτικοί τρόποι ρύθμισης του Nrf2 όπως για παράδειγμα η ουβικιτινιλύωση έπειτα από φωσφορυλίωση από την GSK-3 που οδηγεί σε αναγνώριση από την β-TrCP (που με τη σειρά της συνδέεται σε μια E3 λιγάση ουβικιτίνης). (Harder et al., 2015) Μέσα στον πυρήνα, τα διμερή Nrf2-sMaf αναγνωρίζουν αλληλουχίες DNA γνωστές ως ARE (antioxidant response element) ή EpRE (electrophile response element). Ο Nrf2 επάγει την έκφραση γονιδίων υπεύθυνα για αποτοξικοποίηση, όπως NQO-1 (NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1), GSTs (glutathione S-transferases), Gclc (glutamate-cysteine ligase catalytic subunit) και Gclm (glutamate-cysteine ligase modifier subunit). (Suzuki et al., 2016)



Εικόνα 20: Οι πιθανοί μηχανισμοί με τους οποίους το TPF ασκεί τα αποτελέσματά του στα επίπεδα GSH

Όσον αφορά την κυτταρική σειρά των HeLa, τα επίπεδα της GSH έδειξαν στατιστική αύξηση. Ωστόσο, παρατηρήθηκε μικρή αλλά όχι στατιστικά σημαντική μείωση της GSH, κατά 3% σε σύγκριση με το control, στη συγκέντρωση 12 μg/ml TPF. Συγκεκριμένα, η μεταβολή των επιπέδων της GSH στα HeLa εμφάνιζε ‘καμπανοειδές’ σχήμα, δηλαδή η μέγιστη αύξηση GSH που παρατηρούνταν μειωνόταν σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Αυτό πιθανώς οφείλεται στο ότι μέχρι ενός επιπέδου οι πολυφαινόλες εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση, Η αύξηση αυτή της γλουταθειόνης είναι αρκετά σημαντική, καθώς η γλουταθειόνη έχει ένα σοβαρό αντιοξειδωτικό ρόλο. Είναι υπεύθυνη για την άμεση απομάκρυνση των ελευθέρων ριζών.(Livingstone & Davis, 2007) Ωστόσο πάνω από μια τιμή συγκέντρωσης εμφανίζεται προοξειδωτικό φαινόμενο, οδηγώντας στην παρατηρούμενη μείωση των επιπέδων γλουταθειόνης (Priftis et al., 2015), (Procházková, Boušová, & Wilhelmová, 2011). Επίσης, εξηγείται από το γεγονός ότι η ελαιοευρωπαϊνή και η υδροξυτυροσώλη λειτουργούν όπως είπαμε προοξειδωτικά, Η ελαιοευρωπαϊνή και η υδροξυτυροσώλη έχουν ικανότητα να ανάγουν τα μέταλλα και η ανηγμένη μορφή αυτών των μετάλλων καταλύει την παραγωγή OH· μέσω αντίδρασης FENTON. Η

ικανότητα των πολυφαινολών να δρουν αντιοξειδωτικά/προοξειδωτικά σε *in vivo* και σε *in vitro* συστήματα εξαρτάται από ένα σύνολο παραγόντων όπως η συγκεντρωσή τους και η δομή τους. (Maurya & Devasagayam, 2010)

Σε αντίθεση με την γλουταθειόνη τα επίπεδα των ROS στα ενδοθηλιακά και στα καρκινικά του τραχήλου της μήτρας κύτταρα δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές. Τα επίπεδα ROS που προσδιορίστηκαν αφορούν τα ενδοκυτταρικά επίπεδα ROS αφού δεν χρησιμοποιήθηκε εξωτερικός οξειδωτικός παράγοντας. Σε προηγούμενες μελέτες τους εργαστηρίου μας, διαπιστώθηκε επίσης ότι τα επίπεδα ROS δεν συνοδεύονται πάντοτε από μεταβολές στα επίπεδα οξειδωτικού στρες ή αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς. (Kerasioti et al., 2014)

Στην παρούσα μελέτη υπολογίστηκαν και τα επίπεδα των ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) δείκτης λιπιδικής υπεροξειδωσης. Η χορήγηση TPF στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 μείωσε την οξείδωση των λιπιδίων κατά 51,72, 46,15 και 34,95% σε σύγκριση με το control στις συγκεντρώσεις 2,5, 5 και 7,5 μg/ml TPF αντίστοιχα. Ωστόσο στην συγκέντρωση των 10 μg/ml TPF, τα Tbars, αυξήθηκαν κατά 57,69% σε σύγκριση με το control. Η μείωση των επιπέδων των TBARS σημαίνει μείωση της λιπιδιακής υπεροξειδωσης και ίσως οφείλεται στην μεγάλη αύξηση της γλουταθειόνης και των αντιοξειδωτικών μηχανισμών της. (Goutzourelas et al., 2014). Από την άλλη, η αύξηση που φάνηκε στην μεγαλύτερη συγκέντρωση ίσως οφείλεται σε προ-οξειδωτικό φαινόμενο. Τα αποτελέσματα ήταν ίδια και στα καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας HeLa όπου η χορήγηση TPF μείωσε την οξείδωση των λιπιδίων κατά 16,72, 34,83 και 37,92 % σε σύγκριση με το control στις συγκεντρώσεις 7,5, 10 και 12 μg/ml TPF αντίστοιχα. Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι μερικές από τις σημαντικότερες πολυφαινόλες που βρέθηκαν στα απόβλητα των ελαιοτριβείων (π.χ. υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη και καφεϊκό οξύ) είναι αποτελεσματικές στο να αναστείλουν την υπεροξειδωση των λιπιδίων. (Cardinali et al., 2012) (Rubio-Senent, de Roos, Duthie, Fernandez-Bolaos, & Rodriguez-Gutierrez, 2015)

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

(Dalle-Donne, Rossi, Giustarini, Milzani, & Colombo, 2003) Η χορήγηση TPF μείωσε στατιστικά την οξείδωση των πρωτεϊνών στα EA.hy926 κύτταρα, κατά 49,88 και 33,65% σε σύγκριση με το control στις συγκεντρώσεις 7,5 και 10 μg/ml TPF, αντίστοιχα. Αυτό επιβεβαιώνεται και από άλλες μελέτες που έχουν γίνει σε ενδοθηλιακά κύτταρα όπως για παράδειγμα με εκχύλισμα σταφυλιού που βρέθηκε ότι μείωσε σημαντικά τα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου, υποδεικνύοντας μία μείωση στην οξείδωση των πρωτεϊνών. Εδώ φαίνεται ότι η προστατευτική δράση του εκχυλίσματος μπορεί να αποδοθεί στη σημαντική αύξηση των επιπέδων της GSH σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου.(Goutzourelas et al., 2014) Η χορήγηση TPF μείωσε την οξείδωση των πρωτεϊνών στα HeLa κύτταρα, κατά 6,12 και 10,06 % σε σύγκριση με το control στις συγκεντρώσεις 5 και 10 μg/ml TPF, αντίστοιχα. Επομένως υπήρξε μείωση των επιπέδων καρβονυλίων όπως και σε μελέτες που έγιναν με ζωοτροφές που είχαν υποστεί προσθήκη υποπροϊόντων επεξεργασμένων υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου. Στην μελέτη εκείνη μειώνεται η οξείδωση των πρωτεϊνών που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες, όπως έδειξε η μείωση των επιπέδων των καρβονυλίων τόσο στο πλάσμα όσο και στους ιστούς που ελέγχθησαν, υποδεικνύοντας ότι οι αντιοξειδωτικές ενώσεις θα μπορούσαν να αποτρέψουν την οξείδωση των πρωτεϊνών στα μέρη του σώματος που έγινε έλεγχος. (Γερασόπουλος, 2016) Ωστόσο, στην μεγαλύτερη συγκέντρωση, 12 μg/ml TPF, παρατηρήθηκε αύξηση κατά 12,64 % σε σύγκριση με το control. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ένα μηχανισμό προ οξειδωτικού φαινομένου καθώς όσο αυξάνονταν η συγκέντρωση του TPF υπήρχε μείωση της οξείδωσης πρωτεϊνών μέχρι που φάνηκε να προκαλείται αύξηση της οξείδωσης πρωτεϊνών όταν η συγκέντρωση ήταν πολύ υψηλή. Οι πολυφαινόλες ενεργοποιούν αντιδράσεις ανακύκλωσης των ελευθέρων ριζών εμποδίζοντας την οξειδωτική τους δράση. Πέραν όμως της ωφέλιμης για τα βιολογικά συστήματα δράσης τους υπάρχει πληθώρα ενδείξεων και αντίστοιχες μελέτες στις οποίες επισημαίνεται η καταστροφική / προ-οξειδωτική δράση των αντιοξειδωτικών γενικότερα αλλά και των πολυφαινολών ειδικότερα.(Health, Of, & Flavonoid, 2000) Υποπροϊόντα της αυτοοξείδωσης των πολυφαινολών μπορεί να αλληλεπιδράσουν με βιομόρια ενεργοποιώντας αντιδράσεις λιπιδικής υπεροξείδωσης, οξείδωσης πρωτεϊνών και DNA και μείωσης των ενδογενών αντιοξειδωτικών. Η προ-οξειδωτική δράση των πολυφαινολών, των φλαβονοειδών ειδικότερα, είναι ανάλογη της συγκέντρωσής τους. Μετρήσεις

παραγωγής ελευθέρων ριζών μετά από αύξηση της συγκέντρωσης των φλαβονοειδών αποδεικνύουν την σχέση αυτή.(Procházková et al., 2011)

Συνεπώς το συμπέρασμα που προκύπτει είναι ότι το συγκεκριμένο εκχυλίσμα του ελαιολάδου με βάση τα αποτελέσματα των δεικτών αποτελεί ένα καλό αντιοξειδωτικό προϊόν, καθώς φαίνεται να μειώνει το οξειδωτικό στρες και να αυξάνει τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς.

Έπειτα από 24 ώρες χορήγησης του εκχυλίσματος προσδιορίστηκαν τα επίπεδα της καταλυτικής υπομονάδας της γ - GCL στα ενδοθηλιακά κύτταρα και παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση στα επίπεδα πρωτεΐνης της γ -GCLc κατά 11,72, 21,36, 59,28, 41,34% σε σχέση με το control στις συγκεντρώσεις 2,5, 5, 7,5, 10 $\mu\text{g/ml}$ TPF, αντίστοιχα που εξηγεί και την αύξηση της γλουταθειόνης κατά 23, 22, 38 και 20% στις συγκεντρώσεις αυτές αντίστοιχα που αναλύθηκε παραπάνω. Επίσης στα επίπεδα της γ - GCLc στα HeLa μετά από 24 ώρες χορήγησης του εκχυλίσματος, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση κατά 39,77, 53,21, 28,31, 8,95% σε σχέση με το control στις συγκεντρώσεις 5, 7,5, 10 και 12 $\mu\text{g/ml}$ TPF, αντίστοιχα. Εδώ πάλι μπορούμε να διακρίνουμε την σύνδεση αυτής της αύξησης της γ -GCLc με την αντίστοιχη αύξηση της γλουταθειόνης που διακρίνεται πιο πάνω στα HeLa. Όπως αναφέρθηκε ήδη η σύνθεση της γ -γλουταμυλοκυστεΐνης (GCS) ή λιγάση της γλουταμικής κυστεΐνης (GCL), είναι το πρώτο ένζυμο του μονοπατιού βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης, που καταλύει τη χημική αντίδραση σύνθεσης της γ -γλουταμυλοκυστεΐνης από L- γλουταμινικό οξύ και κυστεΐνη.(Glutamate, Ligase, Regulation, Electrophile, & Element, 2004) Σχεδόν κάθε ευκαρυωτικό κύτταρο, εκφράζει μια μορφή της πρωτεΐνης GCS, για τη σύνθεση της GSH, η οποία αποτελεί μέρος του αμυντικού μηχανισμού έναντι των ελευθέρων ριζών, καθώς χρησιμεύει ως δότης πρωτονίων και να αποτελεί έναν από τους κύριους παράγοντες σταθερότητας του δυναμικού οξειδοαναγωγής του κυττάρου.(Berndt, Lillig, & Flohé, 2014) Η στατιστικά σημαντική αύξηση λοιπόν των επιπέδων πρωτεϊνικής έκφρασης της GCS μπορεί να αποδοθεί στην επαγωγή της de novo σύνθεσης της γλουταθειόνης, Ένας πιθανός μηχανισμός που μπορεί να οδηγεί στην ενεργοποίηση αυτών των ενζύμων είναι μέσω της ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού του Nrf2. Ο μεταγραφικός παράγοντας Nrf2 παίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική οξειδοαναγωγική κατάσταση, όταν αποδεσμεύεται από την πρωτεΐνη Keap1, με την οποία είναι δεσμευμένος στο κυτταρόπλασμα,

μετατοπίζεται στον πυρήνα όπου προσδένεται στα AREs πολλών κυτταροπροστατευτικών γονιδίων και επάγει την έκφρασή τους (SOD-1, HO-1, CAT, GCS, GST) (Espinosa-Diez et al., 2015)

Με το αντιδραστήριο Bradford μελετήσαμε την συνολική ποσότητα πρωτεΐνης , ενώ μέσω του αντιδραστηρίου bromocresol green, μετρήσαμε την ποσότητα της αλβουμίνης. Η αλβουμίνη είναι μία αντιοξειδωτική πρωτεΐνη στα κύτταρα και συμμετέχει στην αποτοξικοποίηση και στην αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες. (Quinlan et al., 2005)

Το συμπέρασμα που προέκυψε από την παρούσα μελέτη ήταν ότι το εκχύλισμα ελαιολάδου του Αγίου Όρους προστατεύει τα κύτταρα από το οξειδωτικό στρες, εξαιτίας της ισχυρής αντιοξειδωτικής δράσης των πολυφαινολών του και βελτιώνουν την οξειδοαναγωγική κατάσταση των ενδοθηλιακών και καρκινικών τραχήλου της μήτρας κυττάρων. Ως εκ τούτου, μπορούν να χρησιμοποιηθεί το εκχύλισμα του συγκεκριμένου ελαιολάδου για παράδειγμα, στην ανάπτυξη αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων διατροφής και νέων προϊόντων που να χρησιμοποιούνται για την εξουδετέρωση του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από παθολογικές συνθήκες στο ενδοθήλιο και να προσφέρουν πρόληψη και προστασία σε φλεγμονές.

6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Γερασόπουλος, Κ. Δ. (2016). Αποτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας σε χοίρους και κοτόπουλα κρεατοπαραγωγής, μετά από χορήγηση ζωοτροφής, με πολυφαινολικά πρόσθετα από απόβλητα ελαιοτριβείου. *Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. Σχολή Επιστημών Υγείας. Τμήμα Βιοχημείας Και Βιοτεχνολογίας.*, (Αποτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας σε χοίρους και κοτόπουλα κρεατοπαραγωγής, μετά από χορήγηση ζωοτροφής, με πολυφαινολικά πρόσθετα από απόβλητα ελαιοτριβείου). Retrieved from <http://hdl.handle.net/11615/45823>
- Γεωργάλας, Γ. Κ. (n.d.). Μεγάλη Ελληνική Εγκυκλοπαιδεία Π. Δρανδάκη. Αθήνα.
- Παπαγαλάνης, Ν. (2014). Οξειδωτικό στρες και ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημα I . Δραστικές ρίζες οξυγόνου, *26*(3), 151–194.
- Adlercreutz, H. (2007). Lignans and human health. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, *44*(5–6), 483–525. <https://doi.org/10.1080/10408360701612942>
- Barrera, G. (2012). Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. *ISRN Oncology*, *2012*, 137289. <https://doi.org/10.5402/2012/137289>
- Beauchamp, G. K., Keast, R. S. J., Morel, D., Lin, J., Pika, J., Han, Q., ... Breslin, P. A. S. (2005). Phytochemistry: Ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. *Nature*, *437*(7055), 45–46. <https://doi.org/10.1038/437045a>
- Berndt, C., Lillig, C. H., & Flohé, L. (2014). Redox regulation by glutathione needs enzymes. *Frontiers in Pharmacology*, *5* JUL. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00168>
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *The World Allergy Organization Journal*, *5*(1), 9–19. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>
- Bouayed, J., & Bohn, T. (2010). Exogenous Antioxidants—Double-Edged Swords in Cellular Redox State: Health Beneficial Effects at Physiologic Doses versus Deleterious Effects at High Doses. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*,

3(4), 228–237. <https://doi.org/10.4161/oxim.3.4.12858>

By, J. J. (2015). From www.bloodjournal.org by guest on June 30, 2015. For personal use only. Fibrinolytic Properties of a Human, *71*(6), 1669–1675.

Cardinali, A., Pati, S., Minervini, F., D'Antuono, I., Linsalata, V., & Lattanzio, V. (2012). Verbascoside, isoverbascoside, and their derivatives recovered from olive mill wastewater as possible food antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(7), 1822–1829. <https://doi.org/10.1021/jf204001p>

D'Archivio, M., Filesi, C., Vari, R., Scazzocchio, B., & Masella, R. (2010). Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *International Journal of Molecular Sciences*, *11*(4), 1321–1342. <https://doi.org/10.3390/ijms11041321>

Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., & Colombo, R. (2003). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta*. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(03\)00003-2](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(03)00003-2)

El, S. N., & Karakaya, S. (2009). Olive tree (*Olea europaea*) leaves: potential beneficial effects on human health. *Nutrition Reviews*, *67*(11), 632–638. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2009.00248.x>

Espinosa-Diez, C., Miguel, V., Mennerich, D., Kietzmann, T., Sánchez-Pérez, P., Cadenas, S., & Lamas, S. (2015). Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biology*, *6*, 183–197. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.07.008>

Fitó, M., Cladellas, M., de la Torre, R., Martí, J., Muñoz, D., Schröder, H., ... Covas, M. I. (2008). Anti-inflammatory effect of virgin olive oil in stable coronary disease patients: a randomized, crossover, controlled trial. *European Journal of Clinical Nutrition*, *62*(4), 570–574. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602724>

Flora, S. J. S. (2009). Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2*(4), 191–206. <https://doi.org/10.4161/oxim.2.4.9112>

Franklin, C. C., Backos, D. S., Mohar, I., White, C. C., Forman, H. J., & Kavanagh,

- T. J. (2009). Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase. *Molecular Aspects of Medicine*, 30(1–2), 86–98. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.009>
- Garcia-Canton, C., Minet, E., Anadon, A., & Meredith, C. (2013). Metabolic characterization of cell systems used in in vitro toxicology testing: Lung cell system BEAS-2B as a working example. *Toxicology in Vitro*, 27(6), 1719–1727. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.05.001>
- Glutamate, H., Ligase, C., Regulation, G., Electrophile, T. H. E., & Element, R. (2004). Article in press, xx(xx), 1152–1159. <https://doi.org/10.1016/j.freeradboimed.2004.06.011>
- Goutzourelas, N., Stagos, D., Demertzis, N., Mavridou, P., Karterolioti, H., Georgadakis, S., ... Kouretas, D. (2014). Effects of polyphenolic grape extract on the oxidative status of muscle and endothelial cells. *Human & Experimental Toxicology*, 33(11), 1099–1112. <https://doi.org/10.1177/0960327114533575>
- Halliwell, B. (2008). Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 476(2), 107–112. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.01.028>
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in Enzymology*, 186, 1–85.
- Han, X., Shen, T., & Lou, H. (2007). Dietary Polyphenols and Their Biological Significance, 2, 950–988.
- Harder, B., Jiang, T., Wu, T., Tao, S., Rojo de la Vega, M., Tian, W., ... Zhang, D. D. (2015). Molecular mechanisms of Nrf2 regulation and how these influence chemical modulation for disease intervention. *Biochemical Society Transactions*, 43(4), 680–6. <https://doi.org/10.1042/BST20150020>
- Harnly, J. M., Doherty, R. F., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Bhagwat, S., & Gebhardt, S. (2006). Flavonoid content of U.S. fruits, vegetables, and nuts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(26), 9966–9977. <https://doi.org/10.1021/jf061478a>

- Health, P., Of, I., & Flavonoid, E. (2000). Lars Ernster Commemorative Issue Guest Editors : Enrique Cadenas and Kelvin J . A . Davies. *Science*, 29(0), 375–383.
- Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S., & Zumla, A. (2005). Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and Immunity*, 6(4), 279–84. <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6364190>
- Huyck, L., Ampe, C., Troys, M. Van, & Sciences, H. (2012). The XTT Cell Proliferation Assay Applied to Cell Layers Embedded in Three-Dimensional Matrix, (August), 382–392. <https://doi.org/10.1089/adt.2011.391>
- Itagi, H. B. N., & Singh, V. (2012). Preparation, nutritional composition, functional properties and antioxidant activities of multigrain composite mixes. *Journal of Food Science and Technology*, 49(1), 74–81. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0267-6>
- Kerasiotti, E., Stagos, D., Priftis, A., Aivazidis, S., Tsatsakis, A. M., Hayes, A. W., & Kouretas, D. (2014). Antioxidant effects of whey protein on muscle C2C12 cells. *Food Chemistry*, 155, 271–278. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.066>
- Kiritsakis, A., Kanavouras, A., & Kiritsakis, K. (2002). Chemical analysis, quality control and packaging issues of olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104(9–10), 628–638.
- Knight, J. A. (2000). Review: Free radicals, antioxidants, and the immune system. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 30(2), 145–158.
- Krinsky, N. I. (2002). Possible biologic mechanisms for a protective role of xanthophylls. *The Journal of Nutrition*, 132(3), 540S–542S.
- Livingstone, C., & Davis, J. (2007). Review: Targeting therapeutics against glutathione depletion in diabetes and its complications. *The British Journal of Diabetes & Vascular Disease*, 7(6), 258–265. <https://doi.org/10.1177/14746514070070060201>
- Lobo, V., Patil, a, Phatak, a, & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Review*, 4(8), 118–26. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>

- Lu, S. C. (2009). Regulation of glutathione synthesis. *Molecular Aspects of Medicine*, 30(1–2), 42–59. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.05.005>
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., & Jimenez, L. (2004a). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727–747.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., & Jimenez, L. (2004b). Polyphenols: foodsourcesandbioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727–747.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., & Remesy, C. (2005). Bioavailabilityandbioefficacyofpolyphenolsinhumans. I. Reviewof 97 bioavailabilitystudies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1 Suppl), 230S–242S.
- Maurya, D. K., & Devasagayam, T. P. A. (2010). Antioxidant and prooxidant nature of hydroxycinnamic acid derivatives ferulic and caffeic acids. *Food and Chemical Toxicology*, 48(12), 3369–3373. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.09.006>
- Meister, A., & Anderson, M. E. (1983). Glutathione. *Annual Review of Biochemistry*, 52, 711–760. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.52.070183.003431>
- Mennen, L. I., Walker, R., Bennetau-Pelissero, C., & Scalbert, A. (2005). Risks and safety of polyphenol consumption. *The American Journal of Clinical Nutrition*. <https://doi.org/81/1/326S> [pii]
- Middleton Jr., E., Kandaswami, C., & Theoharides, T. C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*, 52(4), 673–751. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=11121513%5Crhttp://www.pharmrev.org/cgi/content/full/52/4/673%5Crhttp://www.pharmrev.org/cgi/content/abstract/52/4/673>
- Parcerisa, J., Casals, I., Boatella, J., Codony, R., & Rafecas, M. (2000). Analysis of olive and hazelnut oil mixtures by high-performance liquid chromatography-

atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry of triacylglycerols and gas-liquid chromatography of non-saponifiable compounds (tocopherols and sterols). *Journal of Chromatography A*, 881(1–2), 149–158. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00352-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00352-6)

Pastor, A., Rodríguez-Morató, J., Olesti, E., Pujadas, M., Pérez-Mañá, C., Khymenets, O., ... de la Torre, R. (2016). Analysis of free hydroxytyrosol in human plasma following the administration of olive oil. *Journal of Chromatography A*, 1437, 183–190. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.02.016>

Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30(1), 11–26. <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>

Pietta, P., Simonetti, P., Gardana, C., Brusamolino, A., Morazzoni, P., & Bombardelli, E. (1998). Relationship between rate and extent of catechin absorption and plasma antioxidant status. *Biochem Mol Biol Int*, 46(5), 895–903. <https://doi.org/10.1080/15216549800204442>

Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55–74. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>

Pliszka, B., Huszcza-Ciołkowska, G., & Wierzbicka, E. (2016). Effects of solvents and extraction methods on the content and antiradical activity of polyphenols from fruits *Actinidia arguta*, *Crataegus monogyna*, *Gaultheria procumbens* and *Schisandra chinensis*. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*, 15(1), 57–63. <https://doi.org/10.17306/J.AFS.2016.1.6>

Poljsak, B. (2011). Strategies for reducing or preventing the generation of oxidative stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2011, 194586. <https://doi.org/10.1155/2011/194586>

Priftis, A., Stagos, D., Konstantinopoulos, K., Tsitsimpikou, C., Spandidos, D. A., Tsatsakis, A. M., ... Kouretas, D. (2015). Comparison of antioxidant activity between green and roasted coffee beans using molecular methods. *Molecular Medicine Reports*, 12(5), 7293–7302. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4377>

- Procházková, D., Boušová, I., & Wilhelmová, N. (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.01.018>
- Qosa, H., Batarseh, Y. S., Mohyeldin, M. M., El Sayed, K. A., Keller, J. N., & Kaddoumi, A. (2015). Oleocanthal Enhances Amyloid- β Clearance from the Brains of TgSwDI Mice and in Vitro across a Human Blood-Brain Barrier Model. *ACS Chemical Neuroscience*, 6(11), 1849–1859. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.5b00190>
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., & Pouysegu, L. (2011). Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 50(3), 586–621. <https://doi.org/10.1002/anie.201000044>
- Quinlan, G. J., Martin, G. S., & Evans, T. W. (2005). Albumin: biochemical properties and therapeutic potential. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 41, 1211–1219. <https://doi.org/10.1002/hep.20720>
- Rodrigo, R., & Bosco, C. (2006). Oxidative stress and protective effects of polyphenols: comparative studies in human and rodent kidney. A review. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol*, 142.
- Rodrigo, R., Libuy, M., Feliu, F., & Hasson, D. (2014). Polyphenolsindisease: fromdiettosupplements. *Currentpharmaceuticalbiotechnology*, 15(4), 304–317.
- Rubio-Senent, F., de Roos, B., Duthie, G., Fernández-Bolaños, J., & Rodríguez-Gutiérrez, G. (2015). Inhibitory and synergistic effects of natural olive phenols on human platelet aggregation and lipid peroxidation of microsomes from vitamin E-deficient rats. *European Journal of Nutrition*, 54(8), 1287–1295. <https://doi.org/10.1007/s00394-014-0807-8>
- Schieber, M., & Chandel, N. S. (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology*, 24(10), R453–R462. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>
- Spanidis, Y., Priftis, A., Stagos, D., Stravodimos, G. A., Leonidas, D. D., Spandidos, D. A., ... Kouretas, D. (2017). Oxidation of human serum albumin exhibits inter-individual variability after an ultra-marathon mountain race. *Experimental and*

Therapeutic Medicine, 13(5), 2382–2390. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4268>

- Suzuki, M., Otsuki, A., Keleku-Lukwete, N., & Yamamoto, M. (2016). Overview of redox regulation by Keap1–Nrf2 system in toxicology and cancer. *Current Opinion in Toxicology*, 1, 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2016.10.001>
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231–1246. <https://doi.org/10.3390/nu2121231>
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44–84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>
- Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Freeradicals, metalsandantioxidantsinoxidativestress-inducedcancer. *Chemico-Biologicalinteractions*, 160(1), 1–40. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>
- Visioli, F., Wolfram, R., Richard, D., Abdullah, M. I. C. B., & Crea, R. (2009). Olive Phenolics increase glutathione levels in healthy volunteers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5), 1793–1796. <https://doi.org/10.1021/jf8034429>

