



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

*“Αποτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων ανθών ελιάς, με συνδυασμό μοριακών τεχνικών”*

*“Assessment of the antioxidant activity of olive floral extracts, with various molecular techniques”*

**Βαλτά Καλλιόπη**



Λάρισα 2018

### **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.

**Λεάνδρος- Αλέξιος Σκαλτσούνης:** Καθηγητής του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Αθηνών.

## **Ευχαριστίες**

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Δημήτριου Κουρέτα. Θα ήθελα λοιπόν να του εκφράσω τις ευχαριστίες μου για την ανάθεση 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 ακόμα το ελαιόλαδο κατείχε ξεχωριστή θέση στη διατροφή λόγω των πολλών ευεργετικών επιδράσεων του στην ανθρώπινη υγεία και ευεξία, καθιστώντας το έτσι αντικείμενο σφοδρού ενδιαφέροντος στην επιστημονική κοινότητα. Το ενδιαφέρον αυτό έδωσε πνοή και σε πρωτοπόρες μελέτες, όπως αυτή των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων εκχυλισμάτων ανθών από ελιά και αγριελιά, οι οποίες εξετάζονται στη συγκεκριμένη πτυχιακή. Το γεγονός αυτό είναι αξιοσημείωτο, καθώς υπάρχει έλλειψη στην βιβλιογραφία μελετών που διερευνούν τις αντιοξειδωτικές ικανότητες εκχυλισμάτων ανθών. Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκε ένα πλήθος μεθόδων, όπως η ικανότητα εξουδετέρωσης ελευθέρων ριζών (ABTS•+), η εκτίμηση της προστατευτικής δράσης των εκχυλισμάτων απέναντι στην επαγόμενη από ρίζες ROO• πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA και τέλος η μελέτη σε κυτταρικό επίπεδο με τη χρήση κυτταρικής σειράς C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, όσον αφορά τη μέθοδο ABTS•+ όλα τα εκχυλίσματα εμφάνισαν αντιοξειδωτικές ικανότητες, με τη σειρά δραστηριότητας να είναι, από το πιο δραστικό στο πιο ασθενές: AGRI > KTKT > ANKT > EKPA. Όσον αφορά την προστασία του DNA, τόσο το AGRI με το ANKT, όσο και το ANKT με το EKPA, φάνηκε να έχουν ίση ικανότητα προστασίας του DNA. Τέλος το ANKT, με χρήση της μικρότερης συγκέντρωσης εκχυλίσματος οδήγησε σε στατιστικά σημαντική αύξηση της γλουταθειόνης. Γενικά μπορούμε να πούμε πως και τα τέσσερα εκχυλίσματα εμφάνισαν ικανοποιητική αντιοξειδωτική ικανότητα.

## **Abstract**

It is known that olive oil has always held a prominent place in diet, due to its beneficial effects on human health and well-being, thus making it the subject of great interest in the scientific community. Therefore, new innovative research has started taking place, such as that of the antioxidant properties of floral oil extracts of olive and wild olive trees that are examined in this study. This is remarkable, since bibliography lacks studies involving floral extracts. In this study, a variety of methods were used, such as the ability to scavenge free radicals (ABTS<sup>•+</sup>), the evaluation of the protective effect of the extracts against the induction of single-stranded DNA fragments and, finally, study at cellular level, using C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> cells. According to results, for the ABTS<sup>•+</sup> method, all extracts exhibited antioxidant activity, with the follow sequence of activity: AGRI > KTKT > ANKT > EKPA, where AGRI seems to possess the greatest antioxidant activity. Regarding the DNA protection assay, AGRI and ANKT exhibited similar activities, so as did ANKT and EKPA. Last, but not least, ANKT exhibited statistically significant increase in GSH levels, using the lowest concentrations. In general, all four extracts exhibited satisfactory antioxidant activity.

## Περιεχόμενα

Τριμελής εξεταστική επιτροπή.....	2
Ευχαριστίες.....	3
Περίληψη.....	4
Abstract.....	5
Κατάλογος εικόνων.....	8
Κατάλογος πινάκων.....	9
Κατάλογος διαγραμμάτων.....	9
1.Εισαγωγή.....	10
1.1 Ελεύθερες ρίζες.....	10
1.2 Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS).....	10
1.3 Δημιουργία ελευθέρων ριζών.....	11
1.4 Ευεργετικές επιδράσεις ελευθέρων ριζών.....	15
1.5 Οξειδωτικό στρες.....	15
1.6 Διαταραχές οξειδωτικού στρες.....	16
1.7 Αντιοξειδωτικά.....	18
1.8 Γλουταθειόνη.....	19
1.9 Πολυφαινόλες.....	20
1.10 Χημική δομή και τάξεις πολυφαινολών.....	21
1.11 Ευεργετικές επιδράσεις πολυφαινολών.....	23
1.12 Ελιά και αγριελιά.....	24
1.13 Κυτταρικές σειρές.....	26
2.Σκοπός.....	27
3. Υλικά και μέθοδοι.....	28
3.1 Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς.....	28

3.2. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας ABTS•+.....	29
3.3. Εκτίμηση της προστατευτικής δράσης απέναντι στην επαγόμενη από ρίζες ROO• πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA.....	31
3.3.1. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA.....	31
3.3.2. Μέθοδος χαλάρωσης πλασμιδιακού DNA (Plasmid relaxation assay).....	33
3.3.3 Εκτίμηση της προστατευτικής δράσης απέναντι στην επαγόμενη από ρίζες ROO• πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA.....	34
3.3.4 Ποσοτικός προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής/προστατευτικής δράσης απέναντι στην επαγόμενη από ελεύθερες ρίζες πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA.....	36
3.4 Προσδιορισμός της κυτταροτοξικής δράσης του εκχυλίσματος με τη μέθοδο ΧΤΤ.....	37
3.5 Προσδιορισμός των επιπέδων της GSH και των ROS με κυτταρομετρία ροής	38
3.6 Στατιστική ανάλυση.....	41
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	41
4.1 Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω δέσμευσης της ρίζας ABTS•+.....	41
4.2 Επαγόμενη από ρίζες περοξυλίου (ROO●) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA.....	42
4.3 Προσδιορισμός κυτταροτοξικής δράσης ουσιών με τη μέθοδο ΧΤΤ.....	43
4.4 Προσδιορισμός της οξειδοαναγωγικής κατάστασης με κυτταρομετρία ροής. . .	45
4.4.1 AGRI.....	45
4.4.2. ANKT.....	47
4.4.3 ΕΚΡΑ.....	48
4.4.4 ΚΤΚΤ.....	49
5.Συζήτηση.....	50
6.Βιβλιογραφία.....	55

## Κατάλογος εικόνων

<b>Εικόνα 1:</b> Δραστικές μορφές οξυγόνου και τα ηλεκτρόνια της εξωτερικής στιβάδας	11
<b>Εικόνα 2:</b> Παραγωγή ROS στα μιτοχόνδρια	13
<b>Εικόνα 3:</b> Πηγές ελεύθερων ριζών	15
<b>Εικόνα 4:</b> Οξειδωτικό στρες	16
<b>Εικόνα 5:</b> Διαταραχές που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες	18
<b>Εικόνα 6:</b> Τρόπος δράσης αντιοξειδωτικών παραγόντων	19
<b>Εικόνα 7:</b> Δομή γλουταθειόνης	19
<b>Εικόνα 8:</b> Κατηγορίες πολυφαινολών	20
<b>Εικόνα 9:</b> Χημική δομή πολυφαινολών	22
<b>Εικόνα 10:</b> Χημική δομή φλαβονοειδών	23
<b>Εικόνα 11:</b> Δράσεις πολυφαινολών	24
<b>Εικόνα 12:</b> Κυτταρική σειρά μυοβλαστών ποντικού	27
<b>Εικόνα 13:</b> Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς	29
<b>Εικόνα 14:</b> Παραγωγή της ρίζας του ABTS <sup>•-</sup> μέσω της δράσης περοξειδάσης παρουσία H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	30
<b>Εικόνα 15:</b> Μηχανισμός αλληλεπίδρασης αντιοξειδωτική ουσίας με τη ρίζα του ABTS <sup>•+</sup>	30
<b>Εικόνα 16:</b> Διαμορφώσεις του πλασμιδιακού DNA	34
<b>Εικόνα 17:</b> Χημική δομή της ένωσης AAPH και οι αντιδράσεις της θερμικής της διάσπασης και του σχηματισμού των ριζών ROO <sup>•</sup>	35
<b>Εικόνα 18:</b> Μεταβολισμός του XTT σε υδατοδιαλυτή φορμαζάνη από ζωντανά κύτταρα	37
<b>Εικόνα 19:</b> Υδροδυναμική εστίαση του δείγματος μέσα από το θάλαμο ροής	39
<b>Εικόνα 20:</b> Το μηχάνημα της κυτταρομετρίας ροής από την Becton-Dickinson	40
<b>Εικόνα 21:</b> Μονοπάτι μεταγωγής σήματος Keap1-Nrf2	54



## Κατάλογος πινάκων

<b>Πίνακας 1:</b> Δραστικές μορφές οξυγόνου.....	11
<b>Πίνακας 2.</b> Κατηγορίες πολυφαινολών και παραδείγματα των πιο σχετικών ουσιών. .....	21

## Κατάλογος διαγραμμάτων

<b>Διάγραμμα 1.</b> Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω δέσμευσης της ρίζας ABTS <sup>•+</sup> .....	42
<b>Διάγραμμα 2.</b> Επαγόμενη από ρίζες περοξυλίου (ROO●) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA.....	43
<b>Διάγραμμα 3.</b> Προσδιορισμός κυτταροτοξικότητας των εκχυλισμάτων, στην κυτταρική σειρά C <sub>2</sub> C <sub>12</sub> , έπειτα από 24 ώρες χορήγησης των εκχυλισμάτων, με τη μέθοδο XTT.....	45
<b>Διάγραμμα 4.</b> Επίδραση εκχυλίσματος ανθών αγριελιάς AGRI, στην κυτταρική σειρά C <sub>2</sub> C <sub>12</sub> , έπειτα από 24 ώρες χορήγησης των εκχυλισμάτων, μέσω κυτταρομετρίας ροής στα επίπεδα A) GSH, B) ROS.....	46
<b>Διάγραμμα 5.</b> Επίδραση εκχυλίσματος ανθών ελιάς ANKT, στην κυτταρική σειρά C <sub>2</sub> C <sub>12</sub> , έπειτα από 24 ώρες χορήγησης των εκχυλισμάτων, μέσω κυτταρομετρίας ροής στα επίπεδα A) GSH, B) ROS.....	47
<b>Διάγραμμα 6.</b> Επίδραση εκχυλίσματος ανθών ελιάς EKPA στην κυτταρική σειρά C <sub>2</sub> C <sub>12</sub> , έπειτα από 24 ώρες χορήγησης των εκχυλισμάτων, μέσω κυτταρομετρίας ροής στα επίπεδα A) GSH, B) ROS.....	48
<b>Διάγραμμα 7.</b> Επίδραση εκχυλίσματος ανθών ελιάς KTKT στην κυτταρική σειρά C <sub>2</sub> C <sub>12</sub> , έπειτα από 24 ώρες χορήγησης των εκχυλισμάτων, μέσω κυτταρομετρίας ροής στα επίπεδα A) GSH, B) ROS.....	49

## Εισαγωγή

### 1.1 Ελεύθερες ρίζες

Ως ελεύθερες ρίζες ορίζονται άτομα, μόρια ή ιόντα, τα οποία έχουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στιβάδα (Halliwell & Gutteridge, 1990) και μπορούν να προκύψουν με την προσθήκη ή με την απώλεια ενός ηλεκτρονίου από την εξωτερική ηλεκτρονιακή στιβάδα (Mylonas & Kouretas, 1999). Ασύζευκτο ηλεκτρόνιο ονομάζεται αυτό το οποίο καταλαμβάνει μόνο του ένα ατομικό ή μοριακό τροχιακό. Οι ελεύθερες ρίζες είναι ιδιαίτερα ασταθείς και έχουν την τάση να αντιδρούν εύκολα με άλλα μόρια, λόγω του ασύζευκτου ηλεκτρονίου που διαθέτουν, και να τα οξειδώνουν, ενώ ταυτόχρονα οι ίδιες ανάγονται προς μία πιο σταθερή δομή. Με τον τρόπο αυτό μπορούν να επηρεάσουν τις φυσιολογικές λειτουργίες του κυττάρου και κατ' επέκταση του οργανισμού, ενώ μπορούν να οδηγήσουν και σε παθολογικές καταστάσεις. Οι ελεύθερες ρίζες μπορεί να παραχθούν στον οργανισμό είτε σε φυσιολογικές συνθήκες, σε χαμηλές συγκεντρώσεις, είτε όταν ο οργανισμός εκτίθεται σε συγκεκριμένης τοξικότητας περιβάλλον.

Οι ελεύθερες ρίζες δημιουργούνται μετά από ομοιοπολικές, ετεροπολικές ή οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις κατά τις οποίες παράγονται είτε φορτισμένες είτε όχι ελεύθερες ρίζες. Ο όρος δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) αναφέρεται γενικά όχι μόνο σε ελεύθερες ρίζες με κεντρικό άτομο το οξυγόνο, αλλά περιλαμβάνει και μη ρίζες, όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) (Powers & Jackson, 2010).

Οι ελεύθερες ρίζες είναι απαραίτητες σε χαμηλές συγκεντρώσεις, καθώς συμμετέχουν σε πολλές κυτταρικές διαδικασίες, όπως η σηματοδότηση, η απόπτωση, η γονιδιακή έκφραση και η άμυνα έναντι σε παθογόνα. Μπορούν να αντιδράσουν είτε μεταξύ τους, οδηγώντας στην παραγωγή μιας μη ρίζας, η οποία είναι λιγότερο δραστική, είτε με άλλα μόρια, όπως DNA, πρωτεΐνες και λιπίδια παράγοντας νέες ρίζες, οι οποίες έχουν την ικανότητα να αντιδράσουν με άλλα μόρια και να τα οξειδώσουν, οδηγώντας έτσι σε μια αλυσιδωτή αντίδραση με δυσμενείς επιπτώσεις στον οργανισμό. Υπάρχουν διάφοροι τύποι ελευθέρων ριζών που μπορεί να έχουν ως κεντρικό άτομο το οξυγόνο, το άζωτο, το θείο, τον άνθρακα ή και άλλα μόρια.

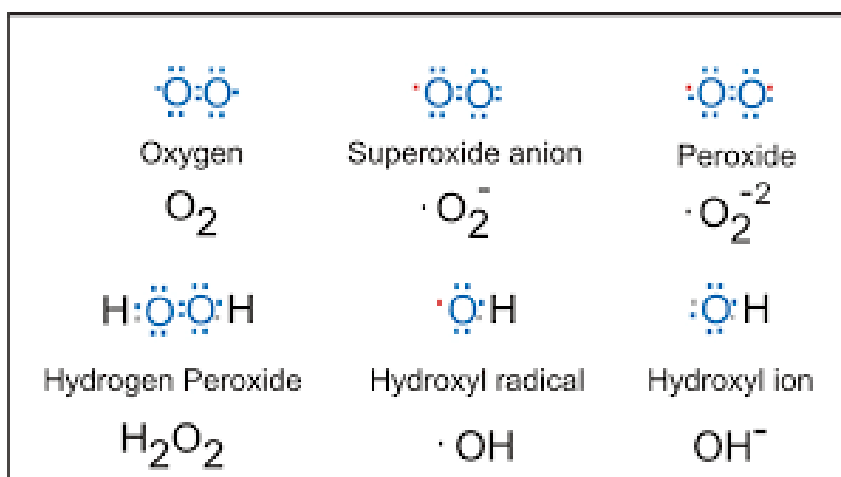
## 1.2 Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS)

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (πίνακας 1) είναι χημικά δραστικές ουσίες που περιέχουν οξυγόνο και διακρίνονται σε ρίζες και μη ρίζες, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

**Πίνακας 1: Δραστικές μορφές οξυγόνου**

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

Οι ROS μπορούν να προέλθουν από διάφορες πηγές όπως για παράδειγμα από έκθεση σε ακτινοβολία ή από το κάπνισμα, από τη δράση ουδετερόφιλων και μακροφάγων κατά τη φλεγμονή ή να προκύψουν ως παραπροϊόντα κατά τις αντιδράσεις της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια. Οι ROS μπορεί να έχουν είτε φυσιολογικό ρόλο στον οργανισμό, όπως για παράδειγμα άμυνα έναντι σε παθογόνα ή συμμετοχή σε σηματοδοτικά μονοπάτια, αλλά σε υψηλές συγκεντρώσεις είναι πιθανόν να οδηγήσουν σε καταστροφή κυτταρικών δομών, όπως λιπίδια και μεμβράνες, πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα (Rahman, 2007).



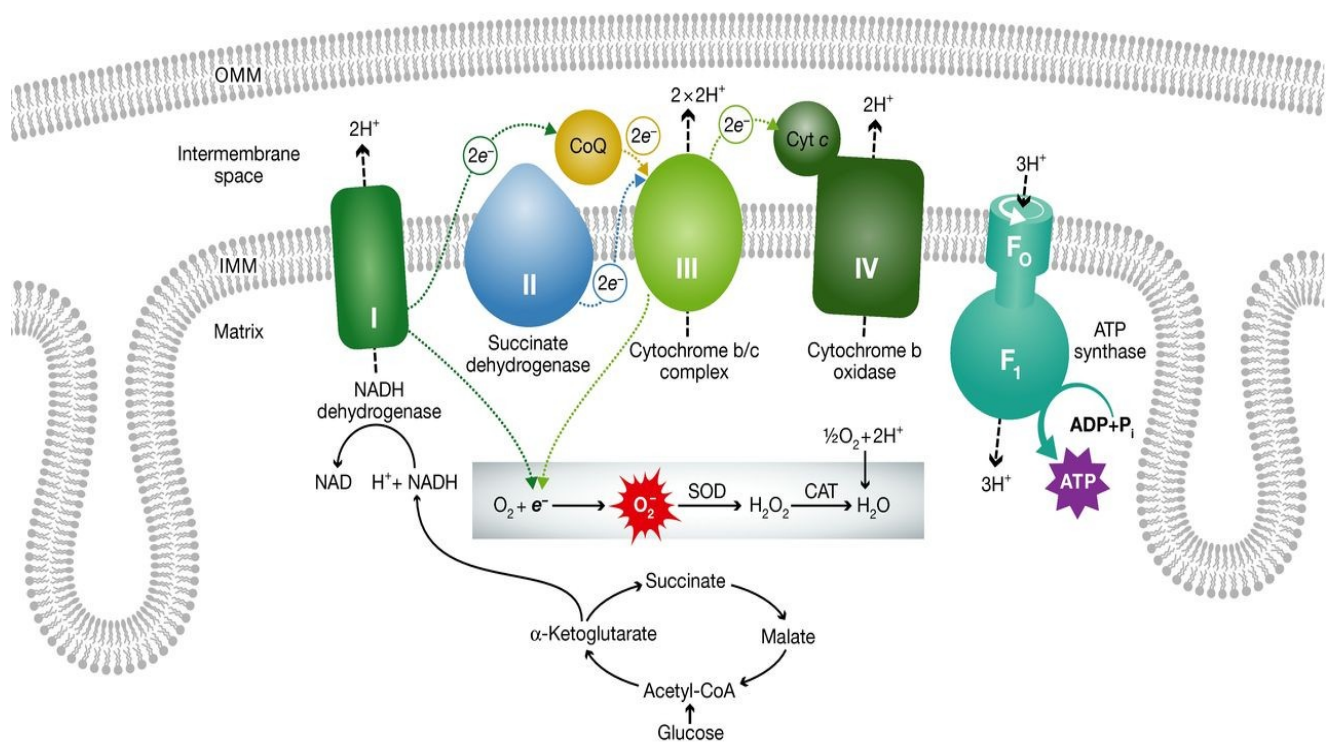
**Εικόνα 1:** Δραστικές μορφές οξυγόνου και τα ηλεκτρόνια της εξωτερικής στιβάδας

### 1.3 Δημιουργία ελευθέρων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να δημιουργηθούν τόσο από ενδογενείς όσο και από εξωγενείς πηγές.

Οι κυριότερες ενδογενείς πηγές ελευθέρων ριζών είναι:

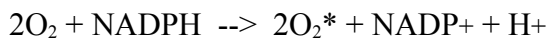
- 1) Η πιο σημαντική πηγή ελευθέρων ριζών είναι μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (εικόνα 2) στα μιτοχόνδρια, σύμφωνα με την οποία τα ηλεκτρόνια του NADH και FADH<sub>2</sub> μεταφέρονται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Το 95-99% περίπου του οξυγόνου που εισέρχεται στον οργανισμό χρησιμεύει για την παραγωγή ATP. Κατά τις αντιδράσεις παραγωγής ATP, τρία συμπλέγματα πρωτεϊνών ενσωματωμένων στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων (σύμπλεγμα NADH δεϋδρογονάσης, σύμπλεγμα αναγωγάσης κυτοχρώματος c, σύμπλεγμα οξειδάσης κυτοχρώματος c) και δύο ελεύθερα διαχεόμενα μόρια (ουβικινόνη και κυτόχρωμα c), συμμετέχουν στην μεταφορά ηλεκτρονίων, τα οποία ηλεκτρόνια μετακινούνται από το ένα σύμπλεγμα στο άλλο. Οι διαδικασίες αυτές έχουν ως αποτέλεσμα την αναγωγή του μοριακού οξυγόνου, το οποίο είναι και ο τελικός αποδέκτης των ηλεκτρονίων, και το οποίο ανάγεται πλήρως προς νερό. Η ενέργεια που δημιουργείται κατά τη μετακίνηση των πρωτονίων αποθηκεύεται ως ATP μέσω της συνθέτασης του ATP. Κατά τη διαδικασία αυτή πολύ μικρές ποσότητες μονήρους οξυγόνου και σουπεροξειδίου μπορεί να διαφύγουν, ιδιαίτερα από τα συμπλέγματα I και III, τα οποία όμως θα αναχθούν από την υπεροξειδική δισμουτάση, η οποία μετατρέπει το υπεροξείδιο σε H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, καθώς και το σύστημα θεωρεδοξίνης-περοξυρεδοξίνης 3 και την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, τα οποία μετατρέπουν το υπεροξείδιο σε H<sub>2</sub>O. Ωστόσο, παρόλο που το σύστημα αυτό είναι πολύ αποτελεσματικό, μικρές ποσότητες H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> μπορούν να διαφύγουν στο κυτταρόπλασμα με αποτέλεσμα να έχουμε παραγωγή ελευθέρων ριζών από τα μιτοχόνδρια (Παπαγαλάνης, 2014).



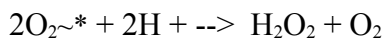
**Εικόνα 2:** Παραγωγή ROS στα μιτοχόνδρια

- 2) Λοιπό οξυγόνο. Το υπόλοιπο οξυγόνο (περίπου 5%) που εισέρχεται στην κυκλοφορία αλλά δε καταλήγει στα μιτοχόνδρια, χρησιμοποιείται από ενζυμικά συστήματα που βρίσκονται 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, το οποίο δεν ανάγεται πλήρως, αλλά 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<sub>2</sub><sup>•-</sup>, το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και το HO• (Παπαγαλάνης, 2014).
- 3) Ιόντα μετάλλων. 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).
- 4) Τέλος, η παραγωγή ελεύθερων ριζών μπορεί να λάβει 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). Η φαγοκυττάρωση μπορεί να ενεργοποιήσει διάφορες διαδικασίες, μία εκ των οποίων είναι και η αναπνευστική έκρηξη (respiratory burst), και η οποία είναι αποτέλεσμα της ενεργοποίησης της NADPH οξειδάσης. Το ένζυμο αυτό καταλύει την αντίδραση:

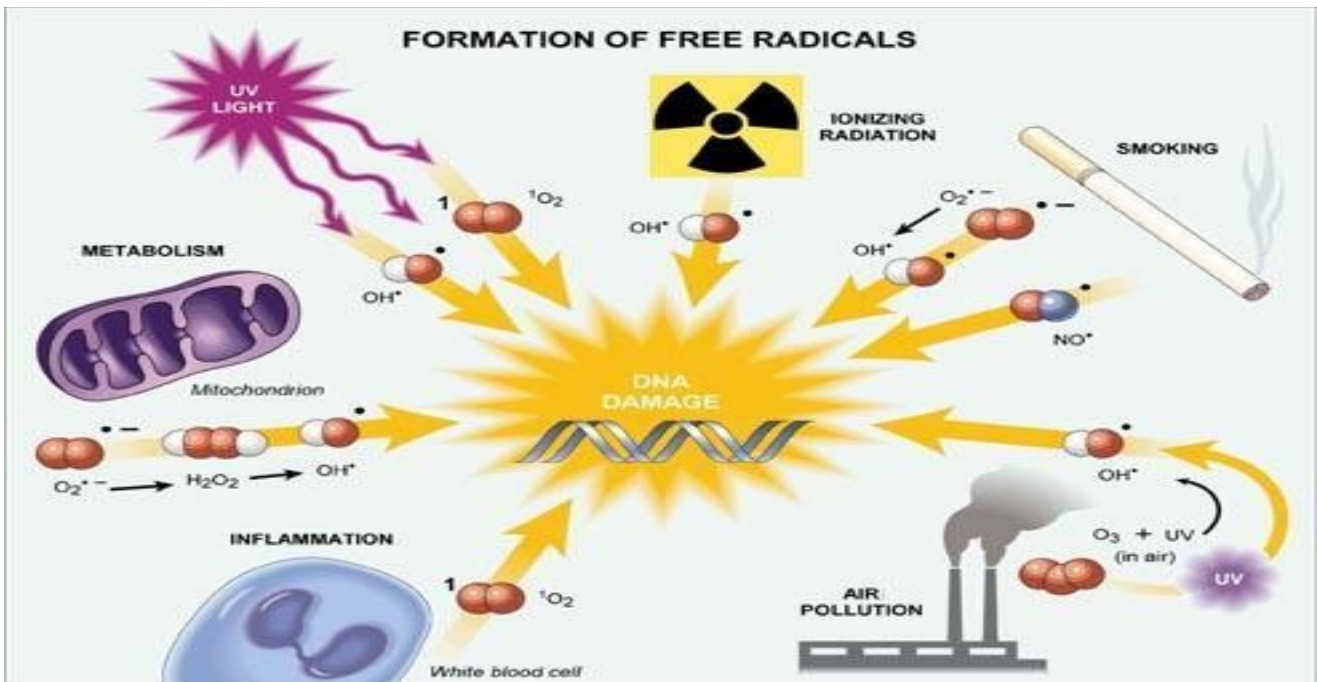


Το υπεροξείδιο στη συνέχεια μετατρέπεται από την υπεροξειδική δισμουτάση σε υπεροξείδιο του υδρογόνου:



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 το κάπνισμα, καθώς ο καπνός του τσιγάρου μπορεί να περιέχει οξειδωτικά, ελεύθερες ρίζες και οργανικές ενώσεις όπως σουπεροξείδιο και NO, ενώ μπορεί και να ενεργοποιήσει ενδογενείς μηχανισμούς των πνευμόνων όπως αύξηση της συγκέντρωσης ουδετερόφιλων και μακροφάγων. Ακόμα, η έκθεση σε όζον μπορεί να οδηγήσει στην υπεροξείδωση των λιπιδίων και σε αύξηση των ουδετερόφιλων στην αναπνευστική οδό. Άλλοι εξωγενείς παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την παραγωγή ελευθέρων ριζών είναι η υπεροξία, δηλαδή η έκθεση σε υψηλότερες από τις απαραίτητες συγκεντρώσεις οξυγόνου, καθώς και η έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία. Τέλος, το άγχος, η διατροφή και ο τρόπος ζωής είναι επίσης σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την δημιουργία ελευθέρων ριζών (Birben et al., 2012).



Εικόνα 3: Πηγές ελεύθερων ριζών

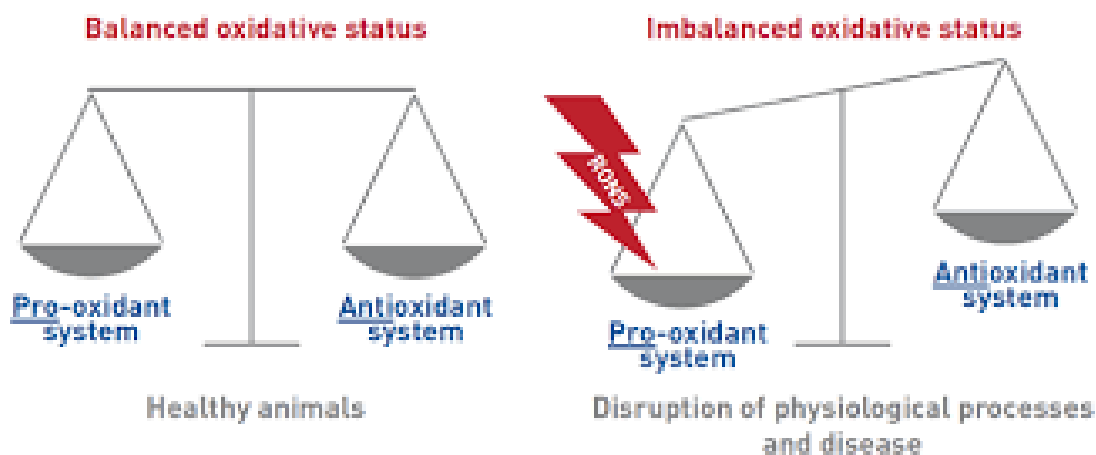
#### 1.4 Ευεργετικές επιδράσεις ελευθέρων ριζών

Όπως προαναφέρθηκε, οι ROS, σε χαμηλές συγκεντρώσεις έχουν ευεργετικές επιδράσεις στον οργανισμό, ενώ πολλές φορές είναι μάλιστα απαραίτητες. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμεύουν στην άμυνα του οργανισμού, απομακρύνοντας αντιγόνα με τη διαδικασία της φαγοκυττάρωσης, 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. Επομένως, οι ελεύθερες ρίζες δεν είναι μόνο επιβλαβείς για τον οργανισμό, αλλά αντιθέτως αναγκαίες για την πραγματοποίηση πολλών φυσιολογικών λειτουργιών και οι ευεργετικές τους δράσεις εξαρτώνται από την ισορροπία τους με τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς. Για τους λόγους αυτούς, η ημερήσια κατανάλωση αντιοξειδωτικών πρέπει να γίνεται με προσοχή και ανάλογα με τις εξατομικευμένες ανάγκες του κάθε ατόμου, ώστε να μην υπερβαίνει συγκεκριμένα όρια που θα οδηγήσουν στην πλήρη εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών (Dupre-Crochet, Erard, & Nusse, 2013; Schieber & Chandel, 2014a).

## 1.5 Οξειδωτικό στρες

Ως οξειδωτικό στρες ορίζεται η διαταραχή στην ισορροπία μεταξύ οξειδωτικών μηχανισμών και αντιοξειδωτικών, υπέρ των πρώτων, η οποία οδηγεί σε διακοπή της οξειδοαναγωγικής σηματοδότησης ή/και σε μοριακές βλάβες (Veskoukis, Tsatsakis, & Kouretas, 2012). Το οξειδωτικό στρες προκύπτει όταν η ισορροπία μεταξύ αντιοξειδωτικών και ROS διαταράσσεται είτε λόγω αύξησης της συγκέντρωσης των ROS είτε λόγω μείωσης της συγκέντρωσης ή της δράσης των αντιοξειδωτικών. Οι επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες στον οργανισμό εξαρτώνται από την έκταση των μεταβολών αυτών, καθώς μετά από περιορισμένη οξειδωτική βλάβη το κύτταρο μπορεί να επανέλθει στην αρχική του κατάσταση, αλλά σοβαρές διαταραχές μπορούν να οδηγήσουν σε κυτταρικό θάνατο, είτε με απόπτωση είτε με άμεση κυτταρική νέκρωση.

*Fig. 1 : Interaction between pro and anti-oxidants*



*Εικόνα 4:* Οξειδωτικό στρες

## 1.6 Διαταραχές οξειδωτικού στρες

Στην περίπτωση δημιουργίας οξειδωτικού στρες στον οργανισμό πολλά βιομόρια επηρεάζονται, με τις πιο σημαντικές επιδράσεις να είναι (Birben et al., 2012):

### 1) Επιδράσεις στο DNA

Οι ROS μπορεί να οδηγήσουν σε ποικίλες αλλαγές στο DNA, όπως για παράδειγμα σε εκφυλισμό των βάσεων, σε μονόκλωνες ή δίκλωνες ρήξεις ή σε μεταλλάξεις. Όλες αυτές είναι αλλαγές οι οποίες μπορούν να συσχετιστούν με διάφορες παθολογικές



καταστάσεις, όπως η καρκινογένεση, η γήρανση και η εμφάνιση αυτοάνοσων νοσημάτων.

#### 2) Επιδράσεις σε λιπίδια

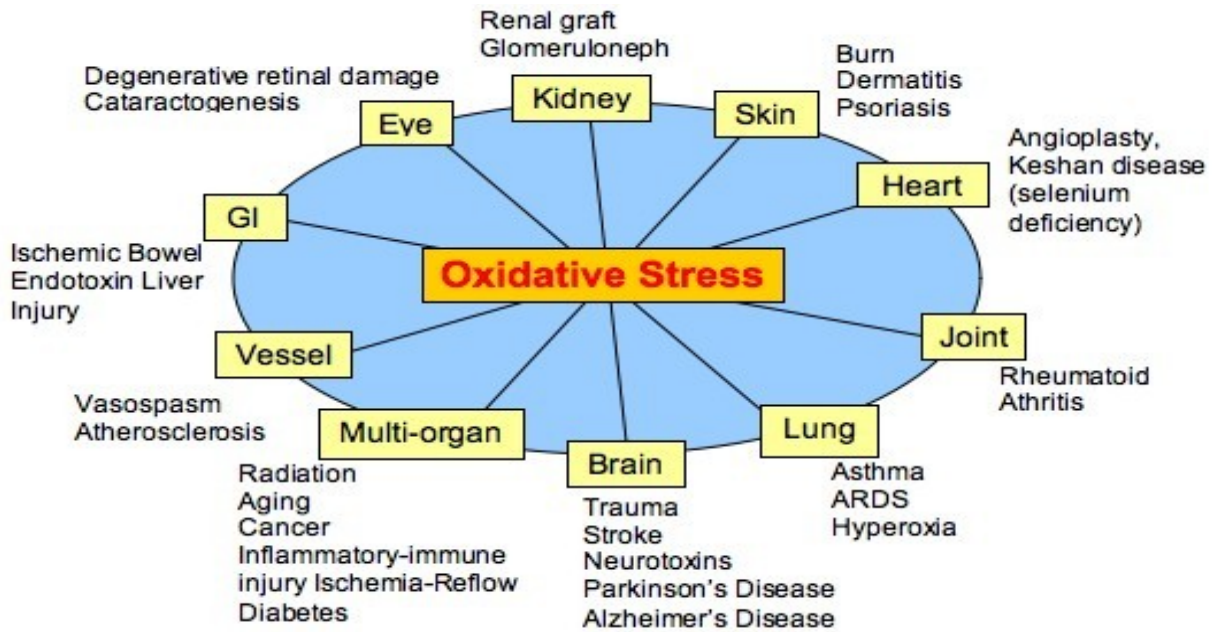
Οι ROS μπορεί να προκαλέσουν υπεροξειδωση λιπιδίων και να οδηγήσουν σε καταστροφή των κυτταρικών μεμβρανών, διαταράσσοντας κατ' επέκταση και την διαπερατότητα της μεμβράνης και τη λειτουργία μεμβρανικών υποδοχέων και ενζύμων που βρίσκονται προσδεδεμένα σε αυτή.

#### 3) Επιδράσεις σε πρωτεΐνες

Οι ROS μπορεί να προκαλέσουν κατακερμάτιση της πεπτιδικής αλυσίδας, αλλαγές στο ηλεκτρικό φορτίο των πρωτεϊνών και οξειδωση συγκεκριμένων αμινοξέων και για τους λόγους αυτούς μπορεί να οδηγήσουν σε αυξημένη πρωτεόλυση.

#### 4) Επιδράσεις στην κυτταρική σηματοδότηση

Οι ROS μπορούν να επάγουν την έκφραση διαφόρων γονιδίων που σχετίζονται με την κυτταρική σηματοδότηση, όπως για παράδειγμα του NF-kB και της AP-1, της p38, καθώς και διαφόρων κινασών. Ο Nf-kB είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας, ο οποίος, μετά την ενεργοποίησή του σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, εισέρχεται στον πυρήνα και ενεργοποιεί τη μεταγραφή διαφόρων γονιδίων που συμμετέχουν στην άμυνα του οργανισμού (πχ. IL-6, IL-1β, TNF-a, IL-8). Ο AP-1 είναι επίσης ένας μεταγραφικός παράγοντας, ο οποίος συμμετέχει σε ποικίλες κυτταρικές διαδικασίες, όπως ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η απόπτωση του κυττάρου. Ένα άλλο χαρακτηριστικό παράδειγμα μονοπατιού το οποίο ελέγχεται από το οξειδωτικό στρες είναι αυτό του Keap1- Nrf2. Σε φυσιολογικές συνθήκες ο Nrf2 αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη Keap1, η οποία τον οδηγεί προς αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα. Αλλά, τα αυξημένα επίπεδα ROS οδηγούν σε οξειδωση των ευαίσθητων σε οξειδοαναγωγή κυστεϊνικών καταλοίπων της Keap1 και αυτή αποδιατάσσεται από το σύμπλοκο. Επομένως ο Nrf2 είναι ελεύθερος να μεταναστεύσει στον πυρήνα, όπου δημιουργεί ετεροδιμερές με την πρωτεΐνη MAF και προσδένεται σε στοιχεία απόκρισης σε αντιοξειδωτικά (ARE's), τα οποία βρίσκονται στις ρυθμιστικές περιοχές πολλών αντιοξειδωτικών γονιδίων (Deshmukh et al., 2017; Schieber & Chandel, 2014b).

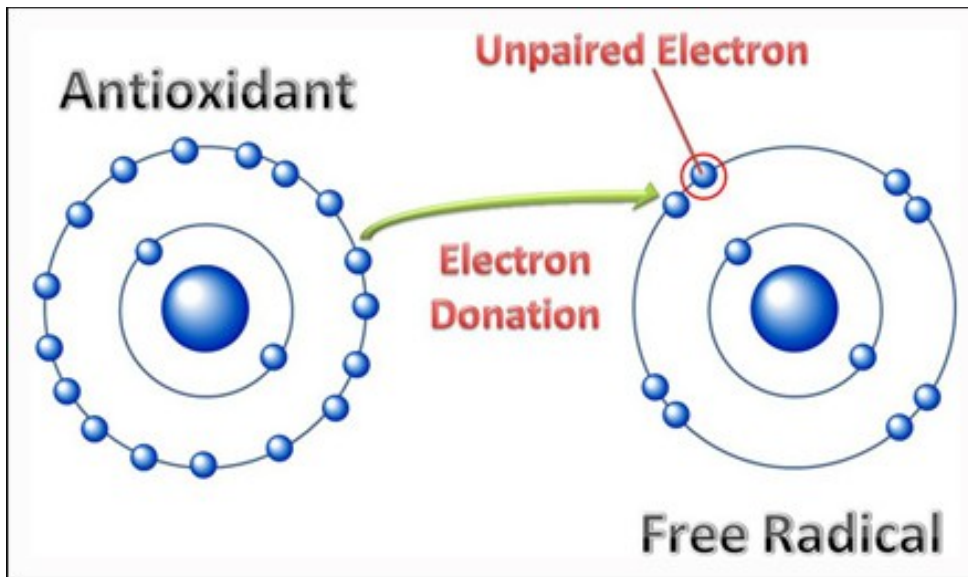


*Εικόνα 5:* Διαταραχές που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες

### 1.7 Αντιοξειδωτικά

Για να προστετευτεί ο οργανισμός έναντι του οξειδωτικού στρες, ένα πολύ καλά οργανωμένο σύστημα αντιοξειδωτικών αντιστέκεται σε οποιαδήποτε διαταραχή της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας του κυττάρου. Ως αντιοξειδωτικά ορίζονται ουσίες, οι οποίες βρίσκονται σε χαμηλή συγκέντρωση σε σχέση με το υπόστρωμά τους, και επιβραδύνουν ή παρεμποδίζουν την οξείδωση του υποστρώματος αυτού. Πιο συγκεκριμένα δρουν προσφέροντας στις ελεύθερες ρίζες το ηλεκτρόνιο ή το μόριο υδρογόνου που τους λείπει και είτε παρεμποδίζουν τη δράση τους είτε ενεργοποιούν τα ενδογενή αμυντικά συστήματα του οργανισμού.

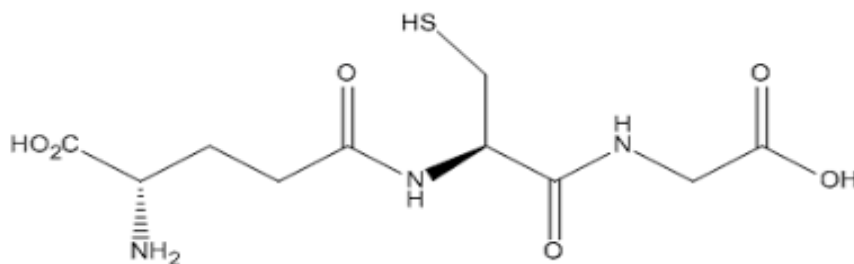
Τα αντιοξειδωτικά μπορεί να είναι είτε ενδογενή είτε εξωγενή. Τα ενδογενή αντιοξειδωτικά περιλαμβάνουν ένζυμα, όπως η σουπεροξειδική δισμουτάση, η περοξειδάση γλουταθειόνης και η καταλάση, καθώς και μη ενζυμικά συστήματα, όπως η γλουταθειόνη και το ουρικό οξύ. Εξωγενή αντιοξειδωτικά μπορεί να είναι οι βιταμίνες C, E, τα καροτενοειδή και οι πολυφαινόλες (Powers & Jackson, 2010).



**Εικόνα 6:** Τρόπος δράσης αντιοξειδωτικών παραγόντων

### 1.8 Γλουταθειόνη

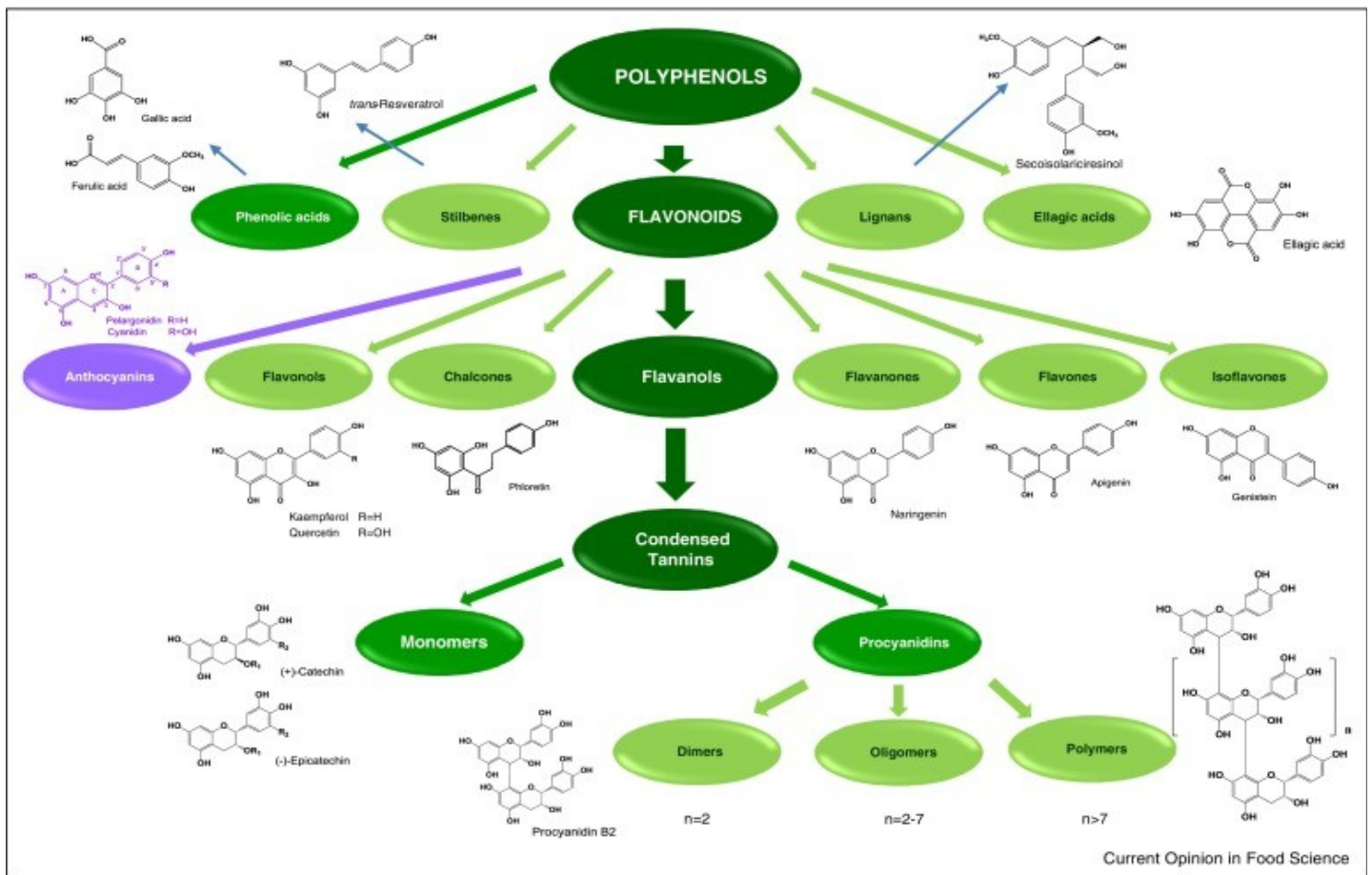
Όπως προαναφέρθηκε, η γλουταθειόνη είναι ένα από τα σημαντικότερα, μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά του οργανισμού. Είναι ένα τριπεπτίδιο που αποτελείται από γλουταμινικό οξύ, κυστεΐνη και γλυκίνη. Κατά την αντίδραση με ελεύθερες ρίζες οξειδώνεται σε GSSG, και ο λόγος [GSH]:[GSSG] χρησιμοποιείται ως δείκτης της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του κυττάρου. Η γλουταθειόνη συμμετέχει σε πολλές κυτταρικές αντιδράσεις. Αρχικά, ανιχνεύει τις δραστικές μορφές οξυγόνου και άλλες ελεύθερες ρίζες άμεσα, ή και έμμεσα μέσω ενζυμικών αντιδράσεων, κατά τις οποίες οξειδώνεται σε GSSG. Η GSSG μπορεί να μετατραπεί έπειτα ξανά σε GSH από την αναγωγή της γλουταθειόνης και να λάβει μέρος σε επόμενες αντιδράσεις. Επίσης μπορεί να αντιδράσει με διάφορους μεταβολίτες του κυττάρου και με ξενοβιοτικά (Veskoukis et al., 2012; Wu et al., 2004).



**Εικόνα 7:** Δομή γλουταθειόνης

## 1.9 Πολυφαινόλες

Οι πολυφαινολικές ενώσεις είναι μια από τις κυριότερες κατηγορίες αντιοξειδωτικών. Είναι δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών, με τουλάχιστον ένα αρωματικό δακτύλιο στο μόριό τους. Ο ρόλος τους συνίσταται στην προστασία των φυτών από ακτινοβολία και παθογόνα, καθώς και συμμετέχουν επίσης στην ανάπτυξη των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των φυτών. Οι κυριότερες κατηγορίες τους φαίνονται στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 8: Κατηγορίες πολυφαινολών

Οι φυτικές πολυφαινόλες έχουν αντιοξειδωτικές ικανότητες, καθώς μπορούν να αντιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες και να τις εξουδετερώνουν. Ωστόσο οι αντιοξειδωτικές τους ικανότητες είναι άμεσα συνδεδεμένες με την ποσότητα η οποία θα καταναλωθεί, με την βιοδιαθεσιμότητά τους καθώς και το χρονικό σημείο χορήγησης (Veskoukis et al., 2012). Βρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες σε τρόφιμα τα

οποία καταναλώνονται ευρέως στη μεσογειακή διατροφή, όπως στα φρούτα και στα λαχανικά, στο κόκκινο κρασί, στις ελιές και το ελαιόλαδο και στους ξηρούς καρπούς.

Συνήθως οι τροφές περιέχουν πολύπλοκα μίγματα πολυφαινόλων, και η σύστασή τους εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως περιβαλλοντικούς ή αγρονομικούς παράγοντες, από τον τρόπο αποθήκευσης του τροφίμου, καθώς και από την οποιαδήποτε εργοστασιακή επεξεργασία. (Manach et al., 2005).

### 1.10 Χημική δομή και τάξεις πολυφαινόλων

Οι πολυφαινόλες μπορούν να χωριστούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες, τα φλαβονοειδή και τα μη-φλαβονοειδή, όπως φαίνεται και στον παρακάτω πίνακα (Dei Cas & Ghidoni, 2018):

**Πίνακας 2. Κατηγορίες πολυφαινόλων και παραδείγματα των πιο σχετικών ουσιών.**

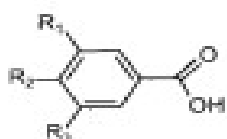
<b>Flavonoid Polyphenols</b>	
Flavones	apigenin, chrysin, diosmin, luteolin, baicalein
Isoflavones	daidzein, daidzin, genistein
Flavanones	hesperetin, narigenin
Flavonols	kaempferol, quercetin, rutine, myricetin, morin
Anthocyanidins	cyanidin, dephinidin, malvidin, pelargonidin, peonidin
Chalcones	butein, curcumin, xanthohumol
Flavanols	catechins, tannins
<b>Non-Flavonoid Polyphenols</b>	
Benzoic acids	vanillic acid, gallic acid, syringic acid
Cinnamic acids	caffeic acid, chlorogenic acid, CAPE, tannic acid
Stilbenes	resveratrol, piceatannol, isorhapontigenin, oxyresveratrol

Τα φλαβονοειδή περιέχουν δύο φαινολικούς δακτυλίους που συνδέονται με μια ανθρακική αλυσίδα. Μπορούν να διαιρεθούν στις εξής υποκατηγορίες: φλαβονόλες, φλαβόνες, ισοφλαβόνες, φλαβανόνες, ανθοκυανιδίνες και φλαβανόλες (πίνακας 2). Οι πολυφαινόλες μπορούν να πολυμεριστούν σε μεγαλύτερα μόρια, όπως είναι οι ταννίνες. Μερικά τρόφιμα στα οποία περιέχονται υψηλές συγκεντρώσεις φλαβονοειδών είναι το κόκκινο και πράσινο τσάι, η μαύρη σοκολάτα, τα βατόμουρα, τα κρεμμύδια, ο

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

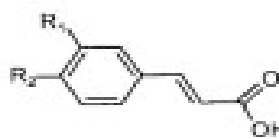
Στην κατηγορία των μη-φλαβονοειδών περιλαμβάνονται τα φαινολικά οξέα (παράγωγα βενζοϊκού και κινναμωμικού οξέος), τα στιλβενοειδή και άλλες πολυφαινόλες. Οι κύριες πηγές των φαινολικών οξέων είναι τα μήλα, οι φράουλες, τα κεράσια, τα ακτινίδια, τα κρεμμύδια, ο καφές, το τσάι, τα βατόμουρα, η βρώμη, το κόκκινο κρασί και άλλα.

### Hydroxybenzoic acids



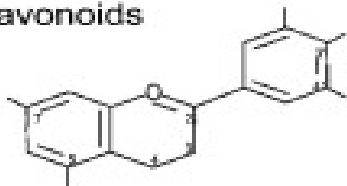
$R_1 = R_2 = \text{OH}, R_3 = \text{H}$  : Protocatechuic acid  
 $R_1 = R_2 = R_3 = \text{OH}$  : Gallic acid

### Hydroxycinnamic acids

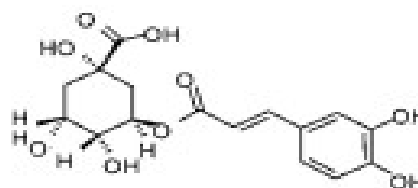


$R_1 = \text{OH}$  : Coumaric acid  
 $R_1 = R_2 = \text{OH}$  : Caffeic acid  
 $R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = \text{OH}$  : Ferulic acid

### Flavonoids

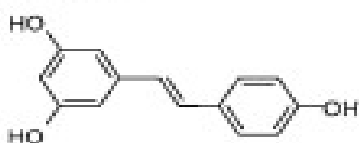


See Figure 2



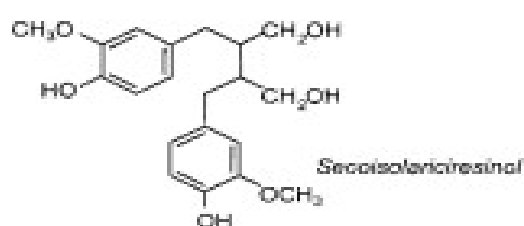
Chlorogenic acid

### Stilbenes



Resveratrol

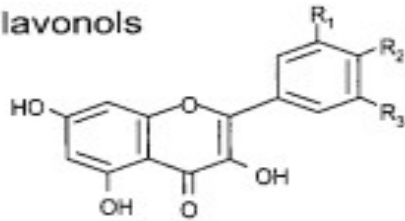
### Lignans



Secoisolariciresinol

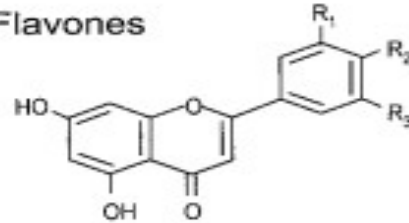
**Εικόνα 9:** Χημική δομή πολυφαινολών

### Flavonols



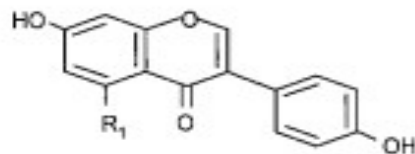
$R_2 = \text{OH}; R_1 = R_3 = \text{H}$  : Kaempferol  
 $R_2 = R_3 = \text{OH}; R_1 = \text{H}$  : Quercetin  
 $R_1 = R_2 = R_3 = \text{OH}$  : Myricetin

### Flavones



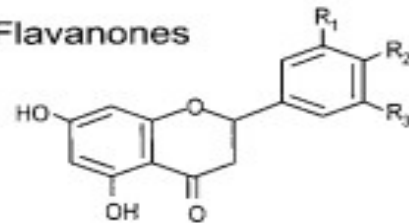
$R_1 = \text{H}; R_2 = \text{OH}$  : Apigenin  
 $R_1 = R_2 = \text{OH}$  : Luteolin

### Isoflavones



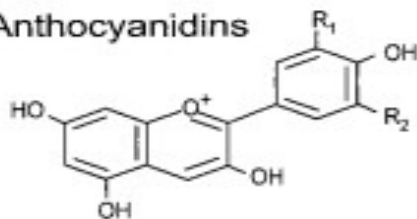
$R_1 = \text{H}$  : Daidzein  
 $R_1 = \text{OH}$  : Genistein

### Flavanones

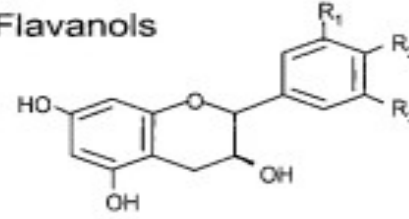


$R_1 = \text{H}; R_2 = \text{OH}$  : Naringenin  
 $R_1 = R_2 = \text{OH}$  : Eriodictyol  
 $R_1 = \text{OH}; R_2 = \text{OCH}_3$  : Hesperetin

### Anthocyanidins



### Flavanols



Εικόνα 10: Χημική δομή φλαβονοειδών

## 1.11 Ευεργετικές επιδράσεις πολυφαινόλων

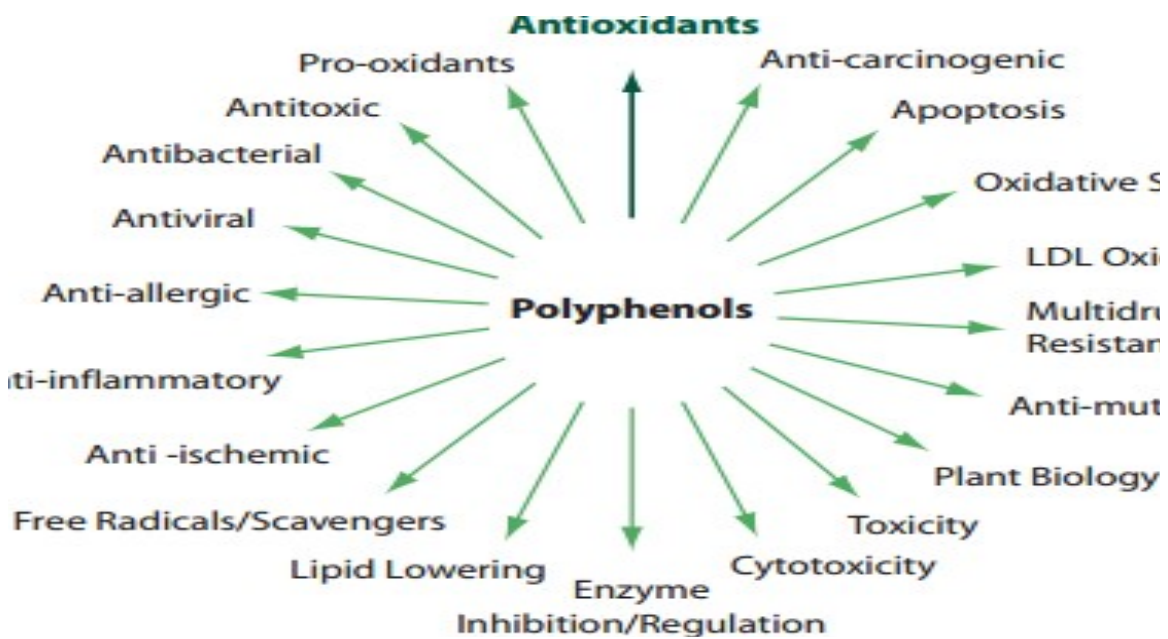
Οι πολυφαινόλες έχει δειχθεί πως κατέχουν σημαντικό ρόλο στην ανθρώπινη υγεία (Tsao, 2010). Κατανάλωση φρούτων, λαχανικών και προϊόντων ολικής αλέσεως έχει συνδεθεί με μείωση του ρίσκου εμφάνισης χρόνιων ασθενειών, όπως καρδιαγγειακές παθήσεις, καρκίνο και χρόνια φλεγμονή. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν πως οι παθήσεις αυτές σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες και οι πολυφαινόλες είναι το συστατικό των φρούτων που εμφανίζει την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα. Οι πολυφαινόλες μπορούν να καταστειλλουν την δημιουργία ελευθέρων ριζών, αναστέλοντας τον σχηματισμό ή εξουδετερώνοντας τις ελεύθερες ρίζες, μειώνοντας έτσι τον ρυθμό οξείδωσης.

Εκτός από την άμεση δράση τους, οι πολυφαινόλες μπορεί να δράσουν και έμμεσα βοηθώντας τη δράση διαφόρων αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως η καταλάση και η περοξειδάση γλουταθειόνης, ή να αναστείλλουν την έκφραση άλλων, όπως η οξειδάση



της ξανθίνης. Βέβαια, κατά τις αντιδράσεις εξουδετέρωσης των ελευθέρων ριζών, οι ίδιες οι πολυφαινόλες μετατρέπονται σε ελεύθερες ρίζες και μπορεί να αποκτήσουν προ-οξειδωτική ικανότητα, αν καταναλώνονται σε μεγάλες ποσότητες (Bouayed & Bohn, 2010).

Σύμφωνα με έρευνες έχει δειχθεί ότι οι πολυφαινόλες έχουν πιθανό αντιυπερτασικό ρόλο, μπορεί να συνδέονται με μείωση του κινδύνου εμφάνισης διαβήτη, καθώς και να συμμετάσχουν στην καταπολέμηση του καρκίνου (Dei Cas & Ghidoni, 2018; Keating & Martel, 2018; Namvar et al., 2013).



**Εικόνα 11:** Δράσεις πολυφαινολών

### 1.12 Ελιά και αγριελιά

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 κατείχε από αρχαιοτάτων χρόνων περίοπτη θέση στην ελληνική διατροφή, τόσο μάλιστα που υπήρξε και το σύμβολο της θεάς Αθηνάς.

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

- *Ελαία η αγρία (Olea sylvestris)*, κοινώς αγριελιά ή αγριελίδι
- *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 είναι πολύ εκτεταμένη και καλύπτει μάλιστα έκταση 7 εκατομμυρίων στρεμμάτων δηλαδή 17% της καλλιεργούμενης γης.

Η αγριελιά (*olea sylvestris*) είναι παρόμοια με τις καλλιεργούμενες ποικιλίες, με τη διαφορά ότι διαθέτει μικρότερα φύλλα και καρπούς και εμφανίζει θαμνώδη ανάπτυξη και καλύπτει μεγάλο μέρος βραχωδών πλαγιών σε παραθαλάσσιες περιοχές. Οι ποικιλίες αγριελιάς μπορεί να είναι οι εξής (Kiritsakis & Shahidi, 2017):

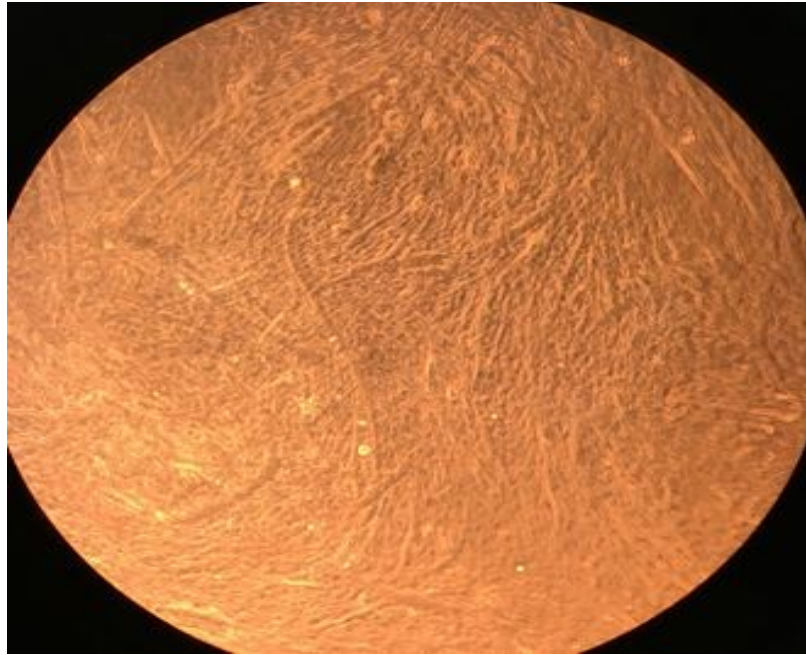
- *Almas (Hyroparthenos)*
- *Dryepis (Ryssi)*
- *Ehinos*
- *Favlia (Favlios)*
- *Gergerimos*

- *Goggylis*
- *Ishas*
- *Kallistefanos*
- *Kolymvas (Niktris oe Vomvia)*
- *Kotonis (Fylia)*
- *Moria*
- *Nitris*
- *Orhas (Orhemon)*
- *Rafanis*
- *Stemfylitis*
- *Trampellos*

Όσον αφορά τα άνθη του φυτού, η καρποφορία προϋποθέτει αρχικά την ύπαρξη ικανοποιητικού αριθμού ανθοφόρων οφθαλμών που θα δώσουν μια καλή ανθοφορία την άνοιξη. Η διαφοροποίηση των ανθοφόρων οφθαλμών ξεκινά τον Ιούλιο και ολοκληρώνεται το φθινόπωρο-χειμώνα, όπου και οι οφθαλμοί μπαίνουν σε λήθαργο. Με την επίδραση των χαμηλών θερμοκρασιών του χειμώνα βγαίνουν από το λήθαργο και δίνουν μικρές ανθοταξίες αρχικά, που στη συνέχεια μεγαλώνουν και μετά από 6-7 εβδομάδες ανθίζουν. Στη διάρκεια της πλήρους άνθησης που διαρκεί λίγες μέρες λαμβάνουν χώρα κατά σειρά η επικονίαση, η γονιμοποίηση και η καρπόδεση. Τα στάδια αυτά είναι πολύ ευαίσθητα σε αντίξοες συνθήκες του περιβάλλοντος, όπως η θερμοκρασία, η υγρασία, η θρεπτική κατάσταση και ποιότητα των ανθών (Breton & Berville, 2013; Sibbett & Ferguson, 2005; Hartmann, 1950).

### **1.13 Κυτταρικές σειρές**

Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε κατά τη διάρκεια των πειραμάτων είναι η C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>. Αποτελεί κυτταρική σειρά μυοβλαστών ποντικού. Διαφοροποιείται ραγδαία και οδηγεί στην δημιουργία μυοσωληναρίων, τα οποία διαθέτουν την ικανότητα να εκφράζουν χαρακτηριστικές μυϊκές πρωτεΐνες. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την *in vitro* μελέτη της μυογένεσης και της κυτταρικής διαφοροποίησης.



**Εικόνα 12:** Κυτταρική σειρά μυοβλαστών ποντικού

### **Σκοπός**

Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας ήταν να εξεταστεί η αντιοξειδωτική ικανότητα 4 πολυφαινολικών εκχυλισμάτων ανθών ελιάς και αγριελιάς. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν 3 εκχυλίσματα από άνθη ελιάς με τις κωδικές ονομασίες ΚΤΚΤ, ΕΚΡΑ και ΑΝΚΤ, καθώς και 1 εκχύλισμα ανθών αγριελιάς με την κωδική ονομασία ΑΓΡΙ. Η αξιολόγηση έγινε με τη χρήση των μεθόδων ΑΒΤS•+ για την μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, επαγόμενης από ρίζες περοξυλίου (R00•) πρόκλησης μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA και κυτταρομετρίας ροής για τον προσδιορισμό της οξειδοαναγωγικής κατάστασης. Ακόμα, είναι σημαντικό να τονιστεί ότι μέχρι σήμερα, τουλάχιστον εξ όσων γνωρίζουμε, δεν υπάρχουν στη βιβλιογραφία σχετικές μελέτες που να αφορούν την μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων από άνθη ελιάς και αγριελιάς. Τα αποτελέσματα των αντιοξειδωτικών αξιολογήθηκαν τόσο με φωτομετρικές μεθόδους, όσο και με χρήση πλασμιδίου και της κυτταρικής σειράς C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>. Τα συμπεράσματα που θα διεξαχθούν θα παρέχουν σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τις πιθανές χρήσεις των εκχυλισμάτων αυτών, για παράδειγμα σε φάρμακα ή σε καλλυντικά προϊόντα.

### 3. Υλικά και μέθοδοι

#### 3.1 Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς

##### Υλικά καλλιέργειας

Θρεπτικό υλικό:

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

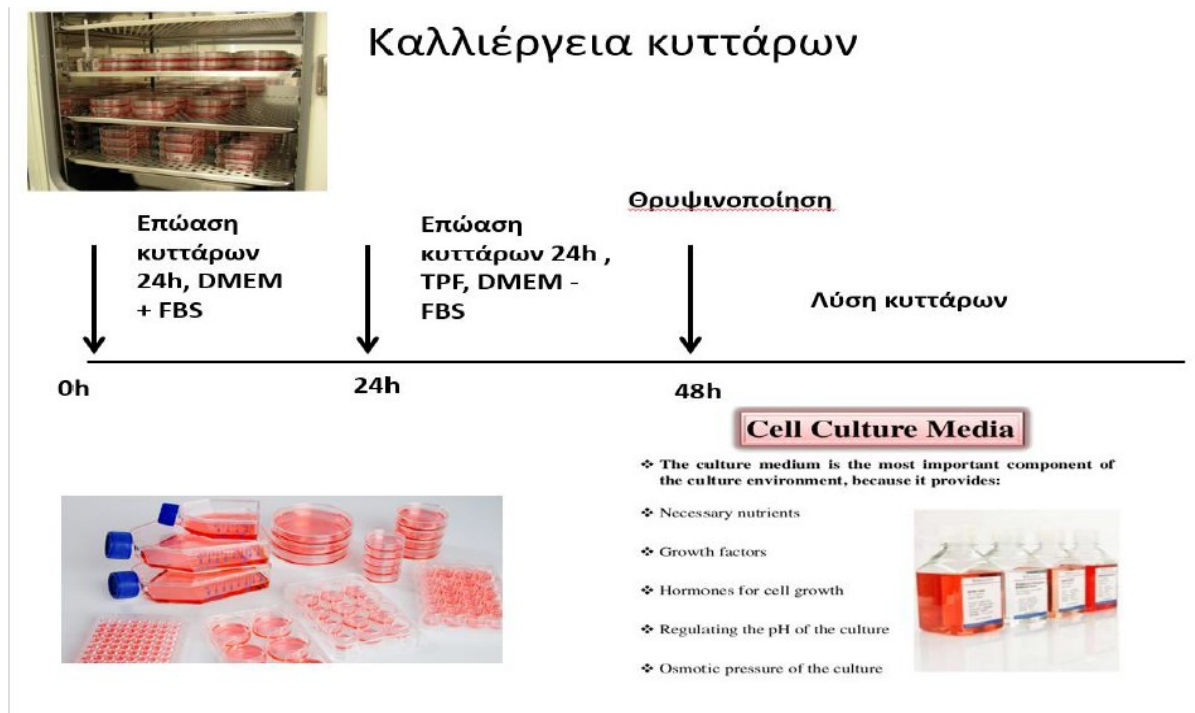
##### Διαδικασία Καλλιέργειας

Τα μυϊκά κύτταρα C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> αναπτύχθηκαν σε 25cm<sup>2</sup> φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων με θρεπτικό υλικό 5 ml DMEM ( Dulbecco's Modified Eagle Medium), το οποίο ήταν εμπλουτισμένο με 10% FBS (Fetal Bovine Serum), 1% L-γλουταμίνη και 1% διάλυμα πενικιλίνης [(100 units/ml)/στρεπτομυκίνης(100μg/ml)] και σε επωαστικό κλίβανο, όπου η θερμοκρασία ήταν στους 37°C και το CO<sub>2</sub> 5%.

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

πραγματοποιήθηκαν σε ειδικό θάλαμο καθέτου νηματικής ροής (Laminar air flow) με φως, αέρα και UV για αποστείρωση του χώρου εργασίας, όταν δε χρησιμοποιούταν.

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

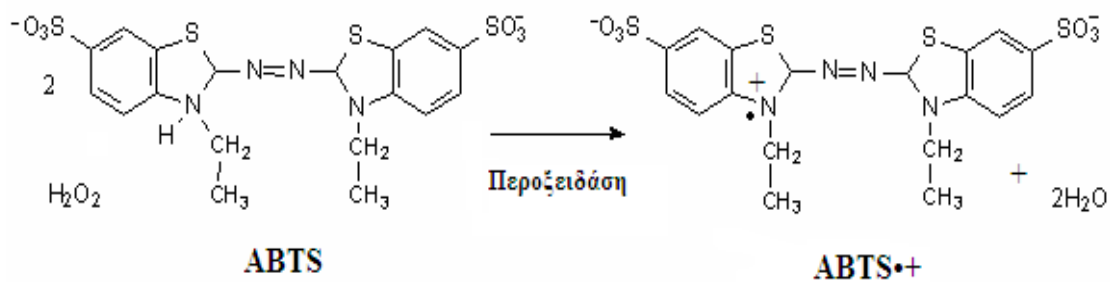


*Εικόνα 13:* Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς

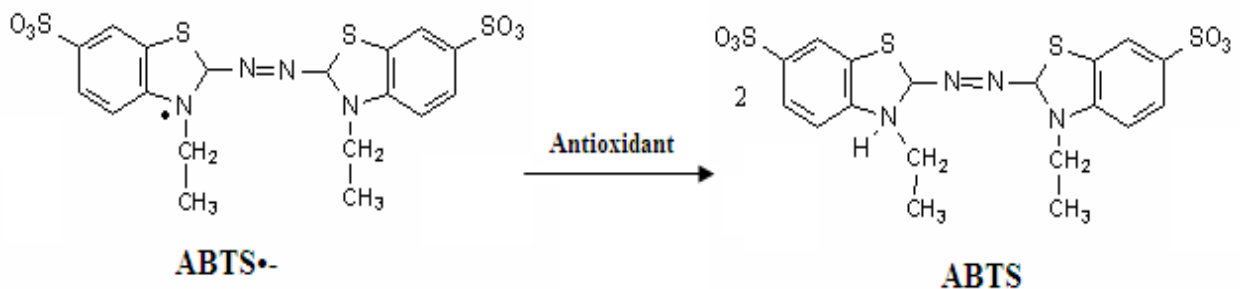
### 3.2. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας ABTS•+

Η μέθοδος εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας, βασισμένη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης με την ρίζα ABTS•+ (κατιόν) πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά από τους Miller και Rice-Evans (Miller et al., 1993). Ο μηχανισμός αλληλεπίδρασης των προς εξέταση αντιοξειδωτικών παραγόντων με την ρίζα ABTS•+ είναι όμοιος με εκείνον της ρίζας DPPH•, η οποία μπορεί να αδρανοποιηθεί είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου είτε μέσω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου (Prior et al., 2005). Ωστόσο σε αντίθεση με την ρίζα DPPH•, η οποία βρίσκεται ως σταθερή ρίζα εξαρχής, η ρίζα ABTS•+ πρέπει να παραχθεί από την οξείδωση του ABTS. Έτσι για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μιας ουσίας πρέπει πρώτα να

προηγηθεί ο σχηματισμός της ρίζας  $ABTS^{\bullet+}$  και να ακολουθήσει η προσθήκη της προς εξέταση ουσίας. Η προσθήκη του αντιοξειδωτικού παράγοντα γίνεται μετά την παραγωγή της ρίζας  $ABTS^{\bullet+}$  για να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των αντιοξειδωτικών παραγόντων με τους οξειδωτικούς παράγοντες που χρησιμοποιούνται για την οξείδωση του ABTS. Η οξείδωση του ABTS γίνεται είτε μέσω χημικών αντιδράσεων με διάφορα αντιδραστήρια, είτε μέσω δράσης ενζύμων όπως περοξειδασών (Arnao et al., 2001). Η ρίζα  $ABTS^{\bullet+}$  από την στιγμή που σχηματιστεί είναι σταθερή, έχει πράσινο χρώμα και απορροφά στα 730 nm. Όταν στο διάλυμα προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα  $ABTS^{\bullet+}$  ανάγεται με την προσθήκη ενός ατόμου υδρογόνου (ή ηλεκτρονίου) με αποτέλεσμα η οπτική απορρόφηση να ελαττώνεται. Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων η οξείδωση του ABTS πραγματοποιήθηκε ενζυμικά μέσω της δράσης μιας περοξειδάσης, της HRP, παρουσία  $H_2O_2$ .



**Εικόνα 14:** Παραγωγή της ρίζας του  $ABTS^{\bullet-}$  μέσω της δράσης περοξειδάσης παρουσία  $H_2O_2$



**Εικόνα 15:** Μηχανισμός αλληλεπίδρασης αντιοξειδωτική ουσίας με τη ρίζα του  $ABTS^{\bullet+}$

Πιο αναλυτικά, η δημιουργία της ρίζας πραγματοποιείται σε όγκο 1 mL στο οποίο περιέχονται 400μL H<sub>2</sub>O, 1 mM ABTS (500 μL), 30 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50 μL) και 6 μM περοξειδάση (50 μL). Αμέσως μετά την προσθήκη του ενζύμου τα δείγματα αναδεύονται και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι για 45 min (εμφάνιση πράσινου χρώματος). Μετά το πέρας της επώασης στα αντίστοιχα δείγματα προστέθηκαν 10 μl των εκχυλισμάτων σε διάφορες συγκεντρώσεις. Ακολούθησε ανάδευση και μέτρηση της απορρόφησης στα 730 nm. Στο μάρτυρα μετά τη δημιουργία της ρίζας δεν προστίθεται τίποτα. Σε κάθε πείραμα το εξεταζόμενο δείγμα μόνο του σε H<sub>2</sub>O με 1 mM ABTS, 30 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> αποτελούσε το τυφλό, ώστε να γίνει έλεγχος εάν οι ουσίες στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις, εμφάνιζαν απορρόφηση στα 730 nm. Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν και πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον δύο ανεξάρτητα πειράματα.

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

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

Όπου: A<sub>0</sub>: η οπτική απορρόφηση του θετικού μάρτυρα στα 730 nm

A<sub>d</sub>: η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 730 nm

### **3.3. Εκτίμηση της προστατευτικής δράσης απέναντι στην επαγόμενη από ρίζες ROO• πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA**

#### ***Αντιδραστήρια***

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

### 3.3.1. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

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

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

Κατόπιν στο υπερκείμενο που συλλέγεται, προστίθεται διάλυμα προπανόλης σε όγκο ίσο με 60% του όγκου του υπερκείμενου. Τα δείγματα αναδεύονται και παραμένουν για 3-5 min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρούνται για 20 min στα 3214 g στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και στο ίζημα προστίθεται διάλυμα αιθανόλης 70% v/v σε όγκο ίσο με 50% του όγκου του υπερκείμενου. Ακολουθεί ανάδευση και φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 20 min στα 3214 g στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα (πλασμιδιακό DNA) αφού στεγνώσει



επαναδιαλύεται σε διάλυμα TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, ένζυμο RNase 10 μg/mL).

Ο προσδιορισμός της ποσότητας του πλασμιδιακού DNA που απομονώθηκε γίνεται με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 260 nm. Μία μονάδα οπτικής απορρόφησης στα 260 nm αντιστοιχεί σε συγκέντρωση DNA 50 μg/mL ( $OD_{260nm} \cdot 50 \mu\text{g/mL}$ ). Για τον προσδιορισμό της καθαρότητας του πλασμιδιακού DNA γίνεται μέτρηση της οπτικής απορρόφησης και στα 280 nm και υπολογίζεται ο λόγος των τιμών της οπτικής απορρόφησης 260/280 (στα 280 απορροφούν οι πρωτεΐνες και στα 260 το DNA). Όταν ο λόγος είναι >1,8 η καθαρότητα του πλασμιδίου θεωρείται πολύ καλή. Για τον έλεγχο της διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 1% στα 100 V. Στην συνέχεια το πήκτωμα χρωματίζεται σε διάλυμα 0,5 μg/mL βρωμιούχου αιθιδίου για 30 min και αποχρωματίζεται σε απιονισμένο H<sub>2</sub>O για 30 min. Ακολουθεί φωτογράφιση του πηκτώματος με το σύστημα ανάλυσης εικόνας Vilber Lourmat DP-001 (Torcy, France) μετά από έκθεση του πηκτώματος σε συσκευή εκπομπής UV. Το πλασμιδιακό DNA που απομονώθηκε ήταν καλής καθαρότητας και βρίσκεται κατά 10-20% στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση πριν την πραγματοποίηση των πειραμάτων.

### 3.3.2. Μέθοδος χαλάρωσης πλασμιδιακού DNA (Plasmid relaxation assay)

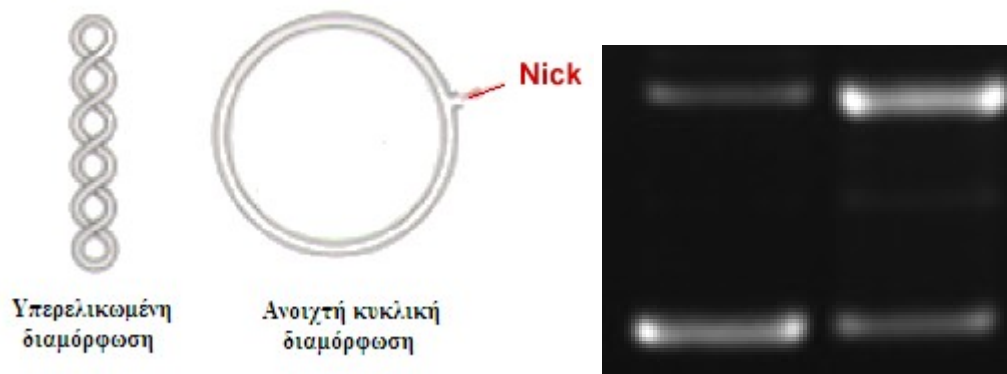
Η μέθοδος χαλάρωσης πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιήθηκε ως μοντέλο για παρατήρηση της αντιοξειδωτικής/προστατευτικής δράσης φυτικών εκχυλισμάτων ή βιοδραστικών ουσιών απέναντι στην επαγόμενη από οξειδωτικούς παράγοντες (π.χ. ελεύθερες ρίζες) και ένζυμα, πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA. Βασίζεται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

1. Η υπερελικωμένη διαμόρφωση (Supercoiled conformation), στην οποία το πλασμιδιακό DNA είναι άθικτο (χωρίς σπασίματα) και αποτελεί την πιο συμπυκνωμένη του μορφή.
2. Η ανοιχτή κυκλική (Open circular, relaxed conformation), στην οποία μεταβαίνει όταν προκαλούνται σε αυτό μονόκλινα σπασίματα. Οι υπερελικώσεις δεν υπάρχουν

και αυτό συμβαίνει είτε από ενζυμικούς είτε από άλλους παράγοντες (πχ. ελεύθερες ρίζες) που έχουν την ικανότητα να προκαλούν μονόκλινα σπασίματα στο DNA.

3. Η γραμμική διαμόρφωση (Linear conformation) στην οποία μεταβαίνει όταν φέρει δίκλινα σπασίματα (Εικόνα 16).

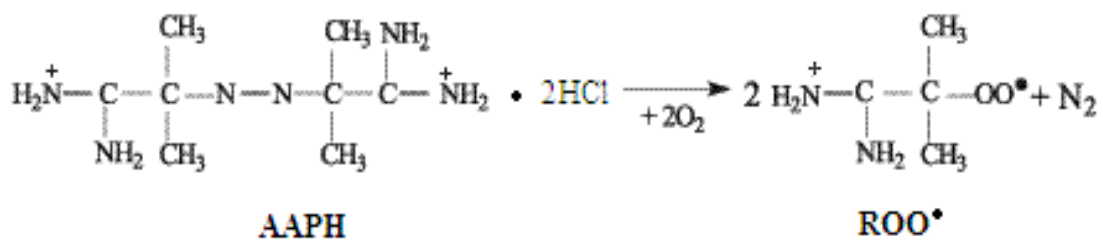
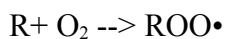
Όσο πιο μικρή είναι η διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA τόσο πιο γρήγορα διαπερνά τους πόρους της αгарόζης και εμφανίζεται πιο κάτω στο πήκτωμα της αгарόζης. Επομένως η υπερελικωμένη διαμόρφωση τρέχει πρώτη, δεύτερη η γραμμική και τρίτη η ανοιχτή κυκλική (Εικόνα 16). Η εκτίμηση της προστατευτικής δράσης των εξεταζόμενων δειγμάτων (φυτικών εκχυλισμάτων, κλασμάτων και καθαρών ουσιών) απέναντι στην ικανότητα ελευθέρων ριζών και άλλων οξειδωτικών παραγόντων, να προκαλούν μονόκλινα σπασίματα στο πλασμιδιακό DNA βασίζεται στην παρεμπόδιση της μετάβασης της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδίου στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση.



**Εικόνα 16:** Διαμορφώσεις του πλασμιδιακού DNA. (A) Σχηματική απεικόνιση της αλλαγής της διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA μετά από την πρόκληση σε αυτό μονόκλωνων θραυσμάτων (Nicks). (B) Φωτογραφία πηκτώματος αгарόζης στο οποίο φαίνεται οι τρεις κύριες διαμορφώσεις του πλασμιδιακού DNA. Στήλη 1: πλασμιδιακό DNA χωρίς την επίδραση οξειδωτικού παράγοντα (20% ανοιχτή κυκλική και 80% υπερελικωμένη διαμόρφωση). Στήλη 2: πλασμιδιακό DNA μετά από επίδραση οξειδωτικού παράγοντα (30% ανοιχτή κυκλική, 6% γραμμική και 64% υπερελικωμένη διαμόρφωση).

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

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



**Εικόνα 17:** Χημική δομή της ένωσης AAPH και οι αντιδράσεις της θερμικής της διάσπασης και του σχηματισμού των ριζών ROO•.

Πιο αναλυτικά η αντίδραση πραγματοποιείται σε όγκο 10  $\mu\text{L}$ . Στο μείγμα της αντίδρασης περιέχονται 1  $\mu\text{g}$  (2  $\mu\text{L}$ ) πλασμιδιακού DNA Bluescript-SK+, το εξεταζόμενο δείγμα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (3  $\mu\text{L}$ ) και 2,5 mM AAPH (4  $\mu\text{L}$ )

σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7,4 (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Όλα τα δείγματα αναδεύονται και επωάζονται στους 45 min στους 37°C στο σκοτάδι. Το AAPH προστίθεται λίγο πριν την επώαση. Μετά την επώαση η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη 3 μL διαλύματος φόρτωσης (0,25% χρωστικής κυανό της βρωμοφαινόλης και 30% γλυκερόλη). Το δείγμα, το οποίο περιέχει το πλασμιδιακό DNA μόνο του στο ρυθμιστικό διάλυμα αποτελεί τον αρνητικό μάρτυρα, ενώ το δείγμα που περιέχει το πλασμιδιακό DNA μαζί με 2,5 mM AAPH αποτελεί το θετικό μάρτυρα. Κάθε δείγμα δοκιμάζεται και μόνο του μαζί με το πλασμιδιακό DNA στην μεγαλύτερη εξεταζόμενη συγκέντρωσή του για να παρατηρηθεί η πιθανή επίδραση του δείγματος ή του διαλύτη στον οποίο είναι διαλυμένο το δείγμα στην υπερελικωμένη διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA.

Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8% σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE (10 mM Tris-HCl, 90 mM βορικό οξύ, 1mM EDTA, pH 8) για 1 h στα 70 V. Στη συνέχεια το πήκτωμα χρωματίζεται σε διάλυμα 0,5 μg/mL βρωμιούχου αιθιδίου για 30 min και αποχρωματίζεται σε απιονισμένο H<sub>2</sub>O για 30 min. Ακολουθεί φωτογράφιση του πηκτώματος και ανάλυση της φωτογραφίας. Η δράση του κάθε δείγματος δοκιμαζόταν εις τριπλούν στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις. Η αντιοξειδωτική/προστατευτική δράση των εξεταζόμενων δειγμάτων εκφράζεται ως το ποσοστό αναστολής της μετάβασης της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση παρουσία των ριζών ROO•.

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

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

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

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

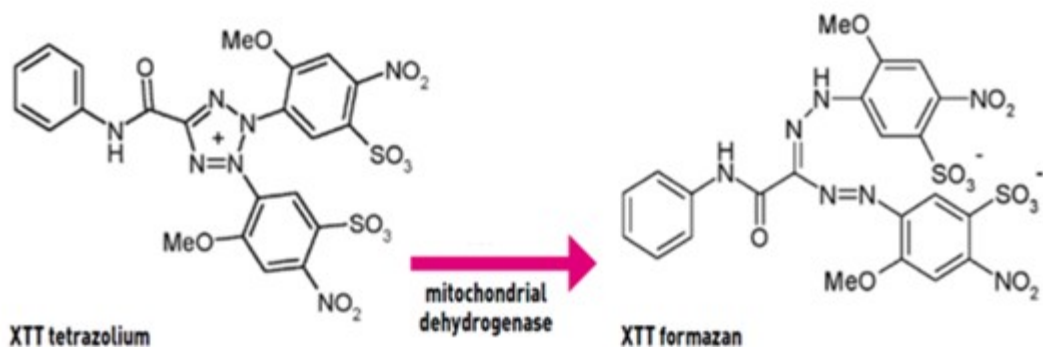
Sδ: Ποσοστό της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδίου του δείγματος (πλασμιδιακό DNA, ρίζες OH• ή ROO• και δείγμα [φυτικό εκχύλισμα, κλάσμα, καθαρή ένωση]).

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

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

### 3.4 Προσδιορισμός της κυτταροτοξικής δράσης του εκχυλίσματος με τη μέθοδο XTT

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



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

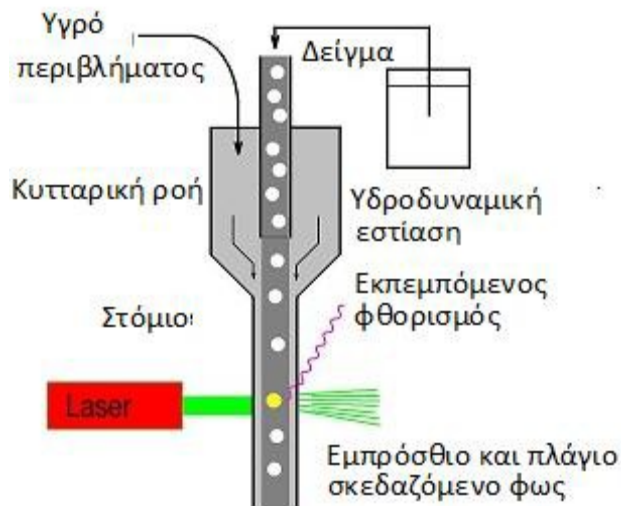
### Πειραματική Διαδικασία

- ❖ Εφόσον τα κύτταρα έχουν καλύψει το 70-80% της φλάσκας 25cm<sup>2</sup>, αποκολλώνται από την επιφάνεια της, με τη χρήση τρυψίνης 0,25% και ακολουθεί επαναιώρησή τους σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS σε falcon. Μέτρηση του αριθμού τους πραγματοποιείται, με τη βοήθεια αντικειμενοφόρου πλάκας Neubauer.
  - ❖ Στη συνέχεια, γίνεται επίστρωση 10.000 κύτταρα/θέση σε «πιάτα» 96 θέσεων (96-well plate) και προστίθεται σε αυτά 150μL θρεπτικό υλικό με 10% FBS (Fetal Bovine Saline). Ακολουθεί επώαση για 24 ώρες στους 37°C, σε 5% CO<sub>2</sub>, προκειμένου να προσκολληθούν στον πάτο του ειδικού «πιάτου» καλλιέργειας.
  - ❖ Μετά το πέρας της επώασης, το θρεπτικό υλικό αφαιρείται και ακολουθεί προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων (0.78, 1.56, 3.12, 6.24 mg/ml) σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS (ώστε να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των συστατικών του FBS με τα δείγματα) συνολικού όγκου 100 μl.
  - ❖ Επόμενο βήμα είναι η επώαση για 24 ώρες στους 37°C και σε 5% CO<sub>2</sub>.
  - ❖ Την επόμενη ημέρα προστίθενται 50 μl από το αντιδραστήριο XTT σε κάθε θέση των 96-well plates και ακολουθεί επώαση για 4 ώρες. Αξίζει να σημειωθεί ότι το αντιδραστήριο XTT πρέπει να έχει αναλογία 50:1 μεταξύ των αντιδραστηρίων A και B, από τα οποία αποτελείται το kit. Η προετοιμασία του αντιδραστηρίου, προκειμένου να υπάρχει η επιθυμητή αναλογία μεταξύ των A και B, γίνεται πάντα πριν τη χρησιμοποίησή του. Παράλληλα σε κάθε πείραμα χρησιμοποιούνται και δείγματα ως αρνητικοί μάρτυρες, τα οποία περιείχαν μόνο κύτταρα και όχι XTT. Επίσης, χρησιμοποιούνται και δείγματα μάρτυρες που περιείχαν το εκχύλισμα, χωρίς όμως να περιέχουν και κύτταρα, προκειμένου να παρατηρηθεί αν η συγκέντρωσή του επηρεάζει την τιμή της απορρόφησης.
  - ❖ Μετά την τετράωρη επώαση προσδιορίστηκε η απορρόφηση στα 450 nm με φασματοφωτόμετρο ELISA plate reader (Biotek) και τη χρήση του λογισμικού Gen5 (Biotek).
  - ❖ Η εξέταση των εκχυλισμάτων έγινε σε τρία ανεξάρτητα πειράματα.
- H % αναστολή των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων ελαιολάδου στην κυτταρική αύξηση της κυτταρικής σειράς C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, υπολογίστηκε από τον τύπο:

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

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



**Εικόνα 19:** Υδροδυναμική εστίαση του δείγματος μέσα από το θάλαμο ροής.

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



**Εικόνα 20:** Το μηχάνημα της κυτταρομετρίας ροής από την Becton-Dickinson.

Σε κάθε πείραμα παρασκευάζονται ένα διάλυμα της χρωστικής mercury orange (400  $\mu\text{M}$ ) διαλυμένης σε ακετόνη και ένα διάλυμα της χρωστικής DCF-DA (100  $\mu\text{M}$ ) διαλυμένης σε μεθανόλη. Το κυτταρικό αιώρημα επαναδιαλύεται σε 150  $\mu\text{l}$  PBS και



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

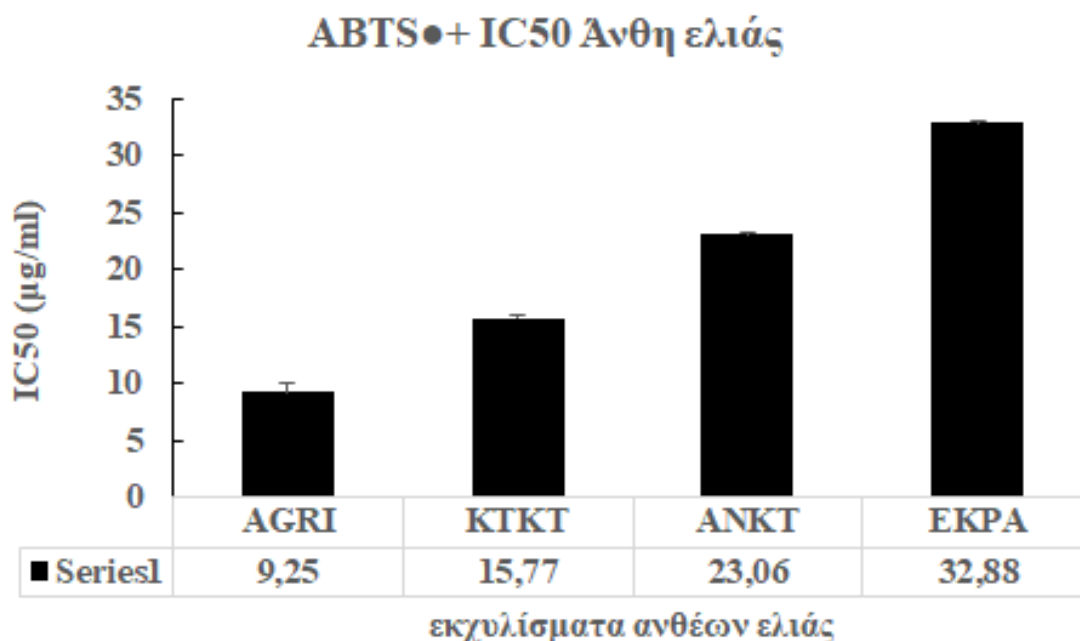
### **3.6 Στατιστική ανάλυση**

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

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1 Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω δέσμευσης της ρίζας ABTS<sup>•+</sup>

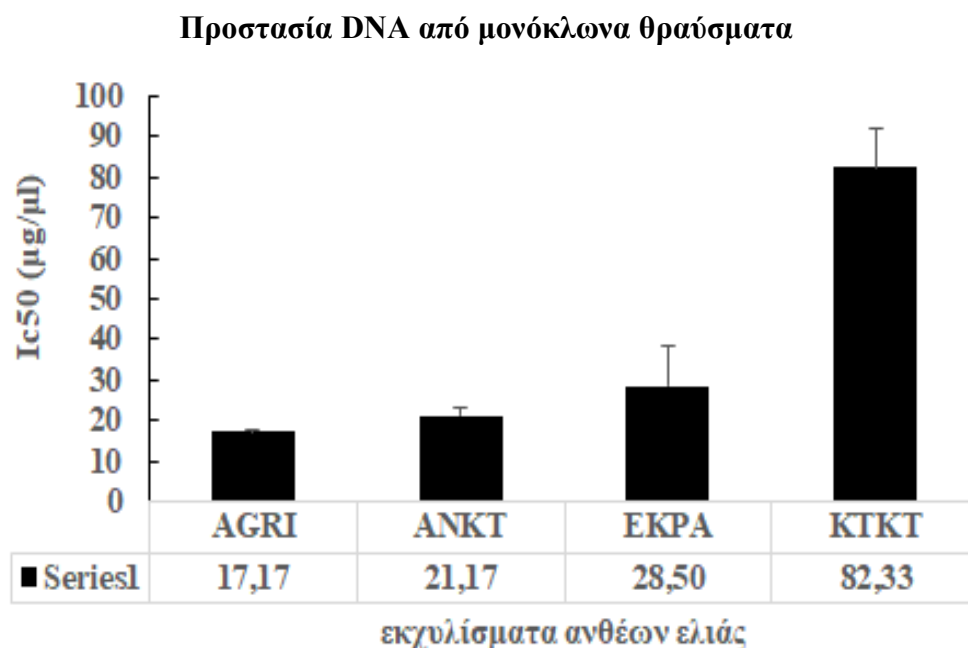
Με τη μέθοδο ABTS<sup>•+</sup>, μετρήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα τριών πολυφαινολικών εκχυλισμάτων ανθών ελιάς, με τις κωδικές ονομασίες ANKT, KTKT και EKPA, και ενός πολυφαινολικού εκχυλίσματος ανθών αγριελιάς με την κωδική ονομασία AGRI. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως IC<sub>50</sub>, δηλαδή τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος που απαιτείται για την εξουδετέρωση της ρίζας στο 50%. Όσο μικρότερη η τιμή του IC<sub>50</sub>, τόσο πιο ισχυρή η αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος. Το εκχύλισμα AGRI είχε IC<sub>50</sub> στα 9,25 μg/ml, το KTKT είχε IC<sub>50</sub> στα 15,77 μg/ml, το EKPA στα 32,88 μg/ml και το ANKT στα 23,06 μg/ml. Συνεπώς, το εκχύλισμα AGRI, είχε στατιστικά σημαντικά ( $p < 0,05$ ) μεγαλύτερη ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας του ABTS<sup>•+</sup>, σε σύγκριση με τα υπόλοιπα εκχυλίσματα. Ενώ συγκριτικά μπορούμε να πούμε ότι η σειρά δραστηκότητας για τα εκχυλίσματα, από το πιο δραστικό στο πιο ασθενές, κυμαίνεται AGRI > KTKT > ANKT > EKPA.



**Διάγραμμα 1.** Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω δέσμευσης της ρίζας ABTS<sup>•+</sup>. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως  $\pm$  SEM, (n=3).

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

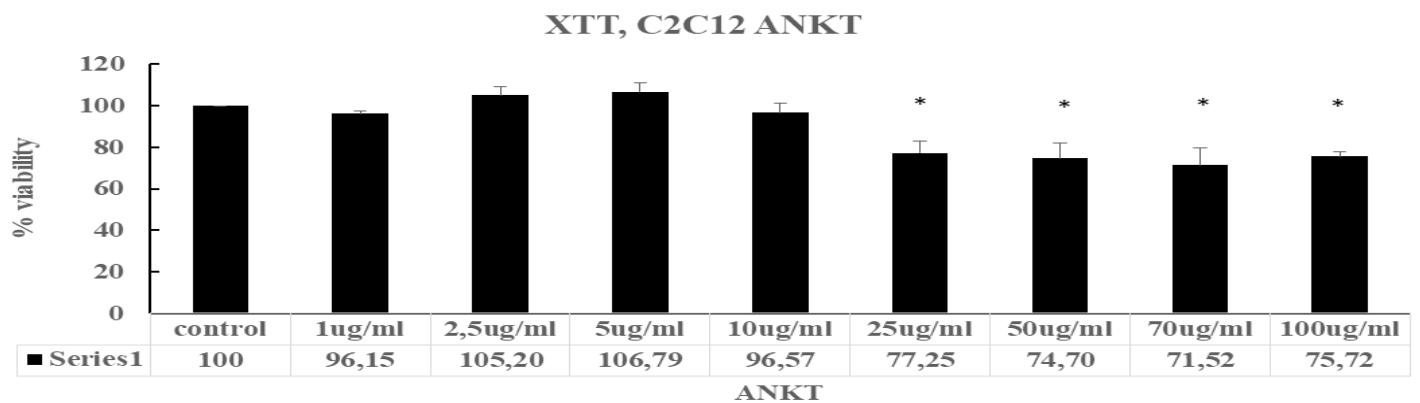
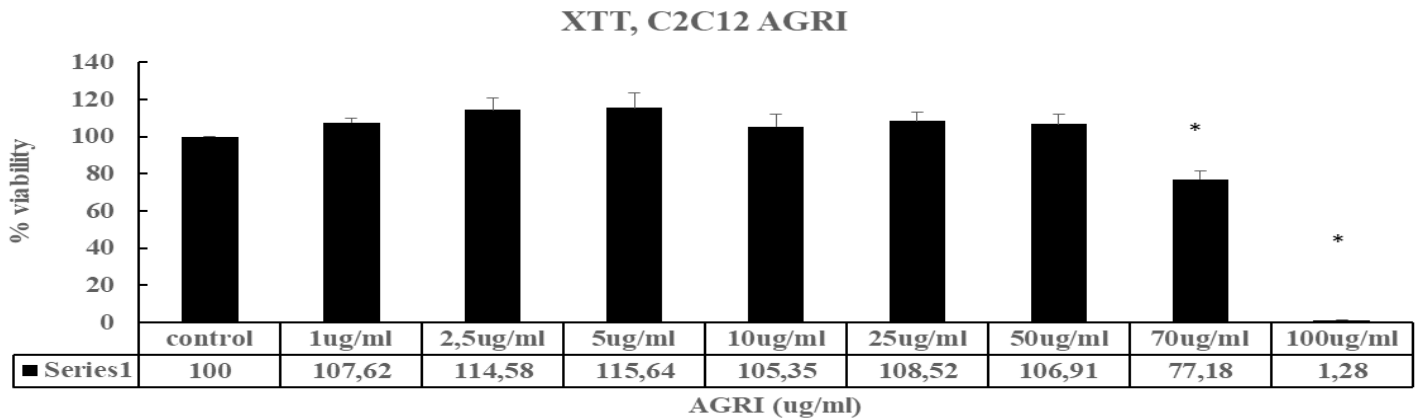
Με την μέθοδο των επαγόμενων θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA, προσδιορίστηκε η ικανότητα των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων ανθών ελιάς, να προστατεύουν το πλασμιδιακό DNA, από τα θραύσματα που προκαλούνται από τη ρίζα του ROO●. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως τα εκχυλίσματα AGRI, ANKT, EKPA είχαν στατιστικά σημαντικά ( $p < 0,05$ ), μεγαλύτερη ικανότητα να προστατεύουν τη θραύση του DNA, σε σχέση με το εκχύλισμα KTKT, καθώς εμφάνισαν  $IC_{50}$  στα 17,17, 21,17 και 28,50  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  σε αντίθεση με το KTKT, που εμφάνισε  $IC_{50}$  στα 82,33  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Ενώ συγκριτικά τα τρία αυτά εκχυλίσματα μεταξύ τους, φάνηκε ότι τόσο το AGRI με το ANKT, όσο και το ANKT με το EKPA, να έχουν ίση ικανότητα προστασίας του DNA. Ωστόσο, το εκχύλισμα AGRI, είναι στατιστικά σημαντικά κατά 11,33 % πιο δραστικό από το EKPA, καθώς εμφάνισε το χαμηλότερο  $IC_{50}$ .

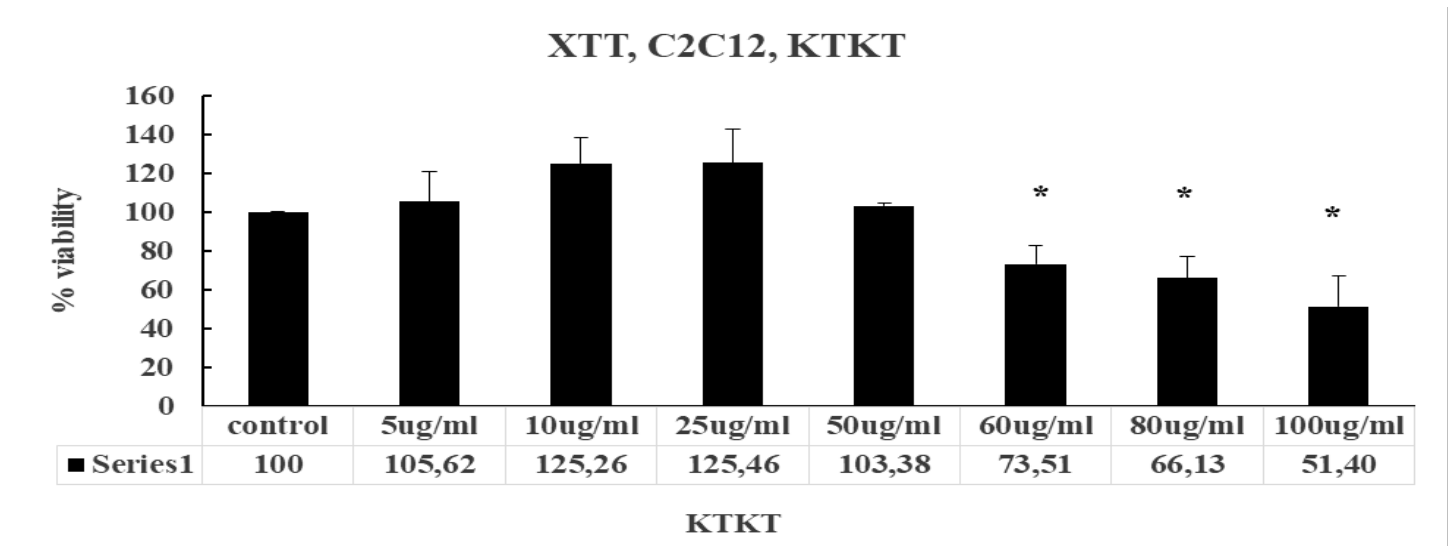
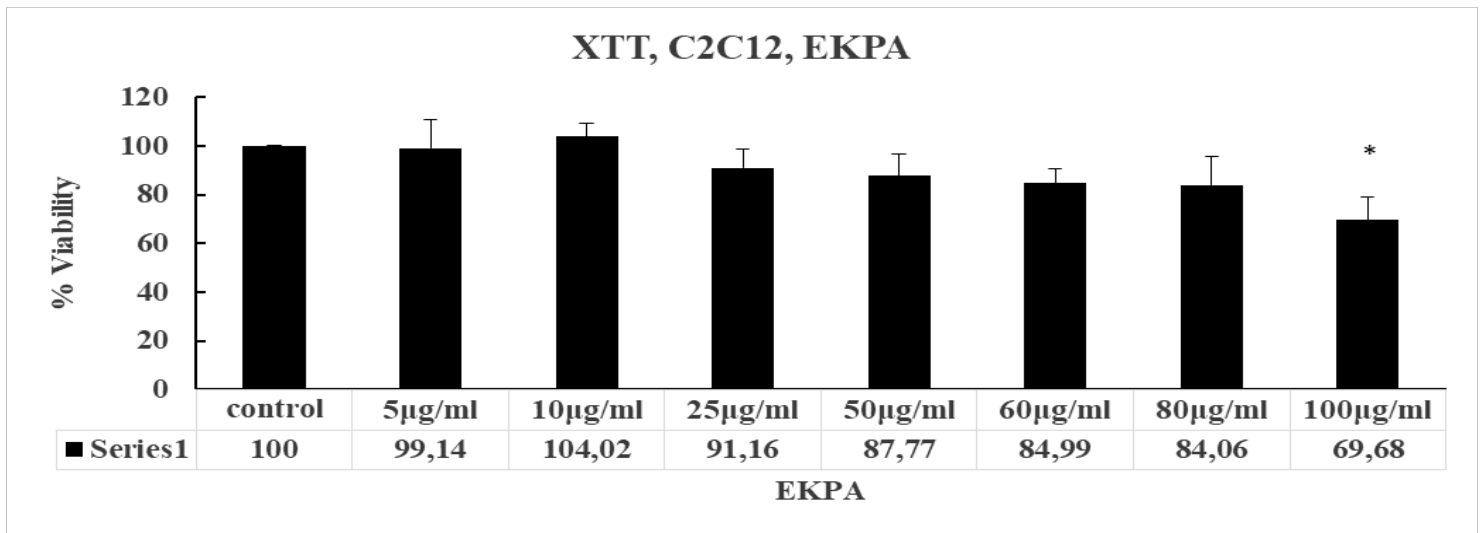


**Διάγραμμα 2.** Επαγόμενη από ρίζες περοξυλίου (ROO●) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως επί τις εκατό αναστολή σε σύγκριση με το control και παρουσιάζονται ως mean  $\pm$  SEM, (n=3).

### 4.3 Προσδιορισμός κυτταροτοξικής δράσης ουσιών με τη μέθοδο XTT.

Με την μέθοδο XTT έγινε προσδιορισμός των κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων. Οι μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις χρησιμοποιήθηκαν έτσι ώστε να γίνει εκτίμηση της επίδρασής τους στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό του κυττάρου. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν μυοβλάστες ποντικού ( $C_2C_{12}$ ), όπου και χορηγήθηκε εύρος συγκεντρώσεων από 1.0-100,0  $\mu\text{g/ml}$ . Ωστόσο συγκεντρώσεις πάνω από 70.0  $\mu\text{g/ml}$  AGRI, 25.0  $\mu\text{g/ml}$  ANKT, 100.0  $\mu\text{g/ml}$  EKPA και 60.0  $\mu\text{g/ml}$  KTKT ήταν κυτταροτοξικές. Συνεπώς, για τον έλεγχο τις αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων, χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις από 10.0-60.0  $\mu\text{g/ml}$  AGRI, 2.5-20.0  $\mu\text{g/ml}$  ANKT, 25.0-80.0  $\mu\text{g/ml}$  EKPA και 5.0-50.0  $\mu\text{g/ml}$  KTKT.





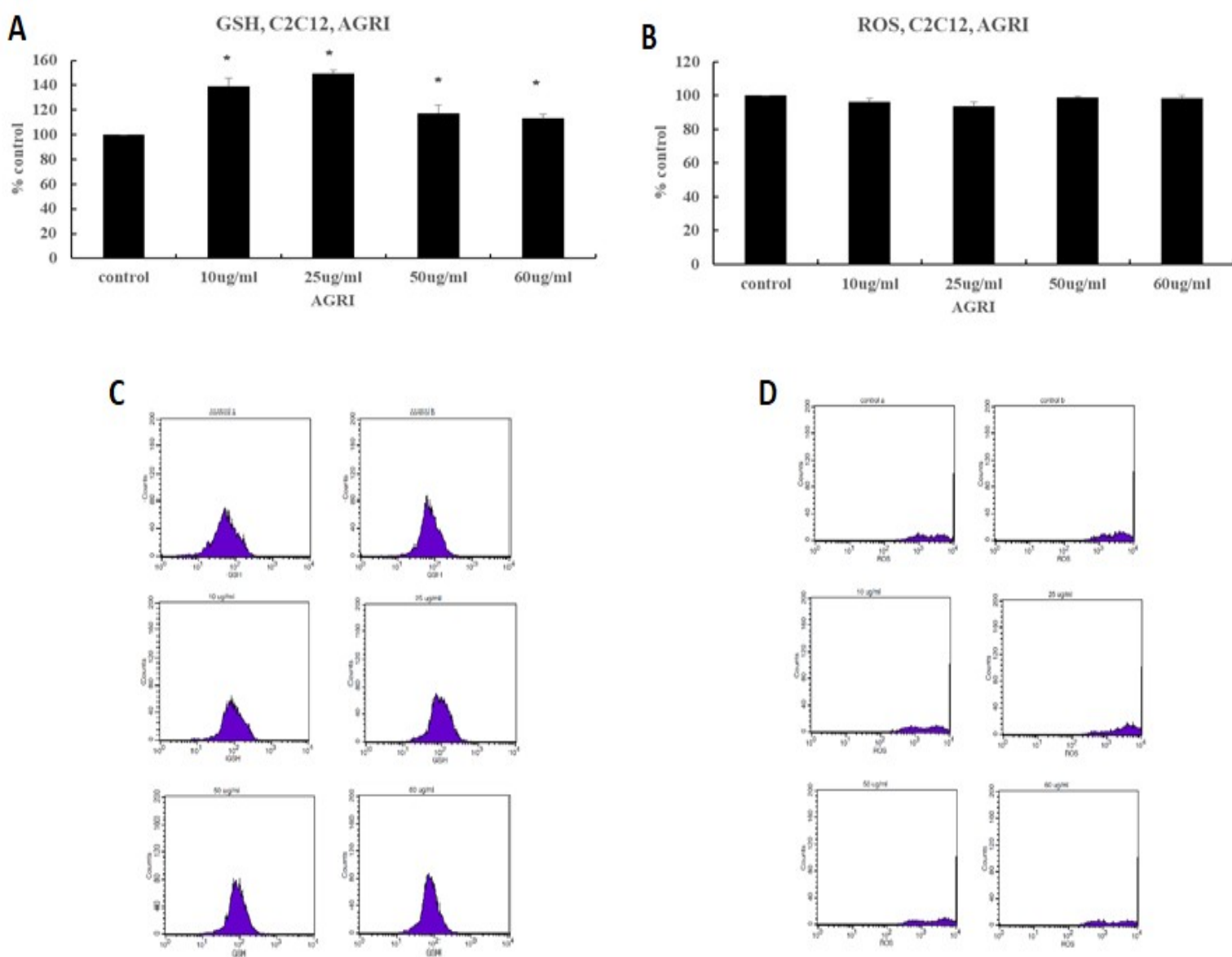
**Διάγραμμα 3.** Προσδιορισμός κυτταροτοξικότητας των εκχυλισμάτων, στην κυτταρική σειρά C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης των εκχυλισμάτων, με τη μέθοδο XTT. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control και παρουσιάζονται ως mean ± SEM, (n=6). \*p<0,05 στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με το control.

#### 4.4 Προσδιορισμός της οξειδοαναγωγικής κατάστασης με κυτταρομετρία ροής

Η οξειδοαναγωγική κατάσταση των κυττάρων (C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>), προσδιορίστηκε μέσω κυτταρομετρίας ροής, όπου έγινε εκτίμηση των επιπέδων γλουταθειόνης (GSH) και δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), έπειτα από 24 ώρες επώασης με τα εκχυλίσματα.

#### 4.4.1 AGRI

Τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής έδειξαν πως το εκχύλισμα AGRI αύξησε στατιστικά σημαντικά ( $p < 0,05$ ), τα επίπεδα της GSH κατά 39,18%, 49,28%, 17,54% και 13,25 % στις συγκεντρώσεις 10.0, 25.0, 50.0 και 60.0  $\mu\text{g/ml}$  AGRI αντίστοιχα, σε σύγκριση με το control (διάγραμμα 4A). Αντίθετα με τα επίπεδα GSH, τα επίπεδα ROS δεν παρουσίασαν καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή (διάγραμμα 4B).

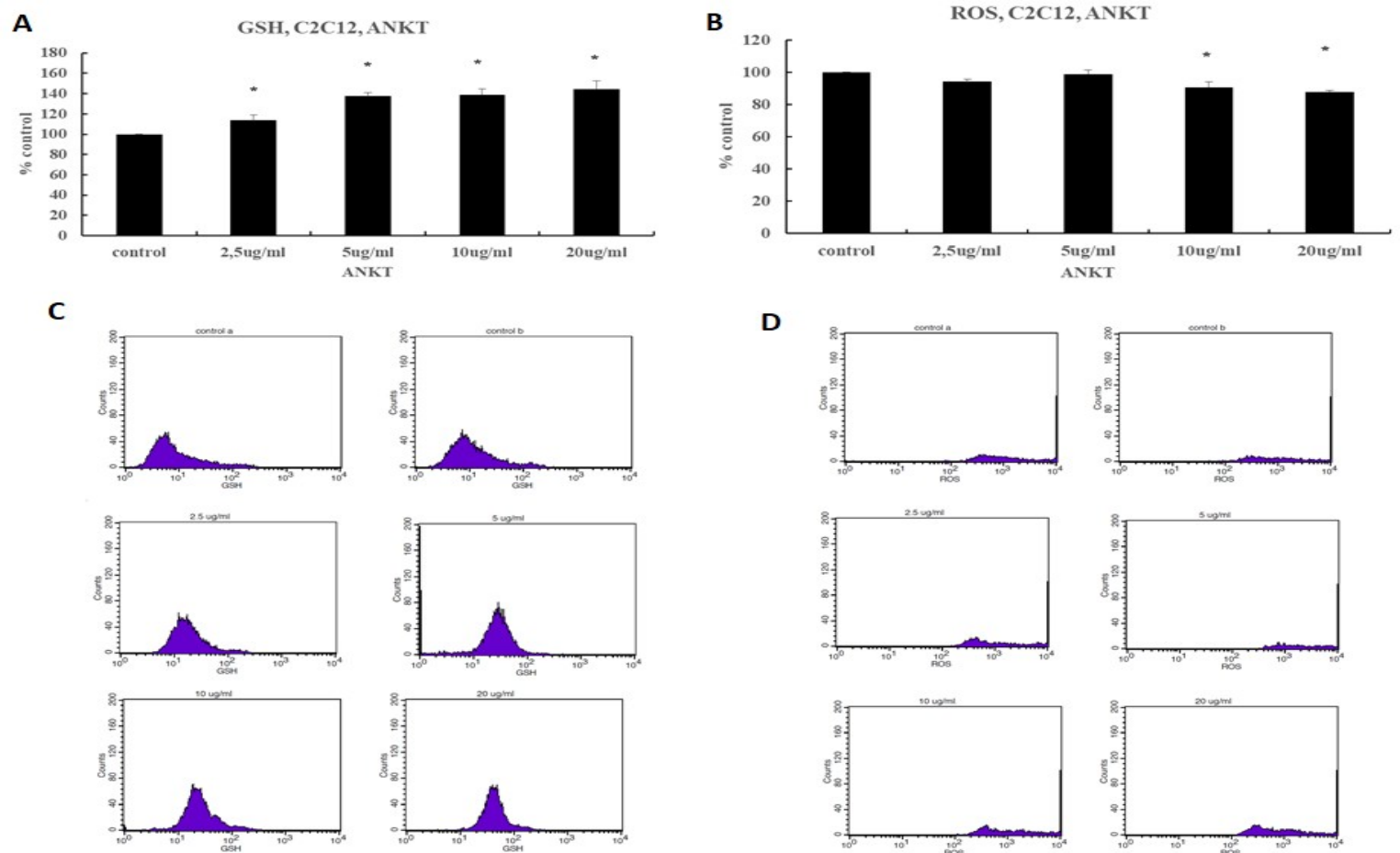


**Διάγραμμα 4.** Επίδραση εκχυλίσματος ανθών αγριελιάς AGRI, στην κυτταρική σειρά C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης των εκχυλισμάτων, μέσω κυτταρομετρίας ροής στα επίπεδα A) GSH, B) ROS. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο

ως προς το control και παρουσιάζονται ως mean  $\pm$  SEM, (n=3). \* $p < 0,05$  στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με το control. Τα ιστογράμματα παρουσιάζουν τον φθορισμό που εκπέμπεται από 10,000 κύτταρα κατά την μέτρηση της C)GSH και D)ROS μέσω κυτταρομετρίας ροής. Ο FL2 αντιπροσωπεύει τον φθορισμό που ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας 488 και 530-580 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και ως μήκος κύματος εκπομπής.

#### 4.4.2. ANKT

Τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής έδειξαν πως το εκχύλισμα ANKT αύξησε στατιστικώς σημαντικά ( $p < 0,05$ ), τα επίπεδα της GSH κατά 13,72%, 37,35%, 38,88% και 44,26 % στις συγκεντρώσεις 2,5, 5.0, 10.0 και 20.0  $\mu\text{g/ml}$  ANKT αντίστοιχα, σε σύγκριση με το control (διάγραμμα 5A). Ενώ τα επίπεδα ROS παρουσίασαν στατιστικά σημαντική μείωση κατά 9% και 12% στις συγκεντρώσεις 10.0  $\mu\text{g/ml}$  και 20.0  $\mu\text{g/ml}$  ANKT, αντίστοιχα (διάγραμμα 5B).

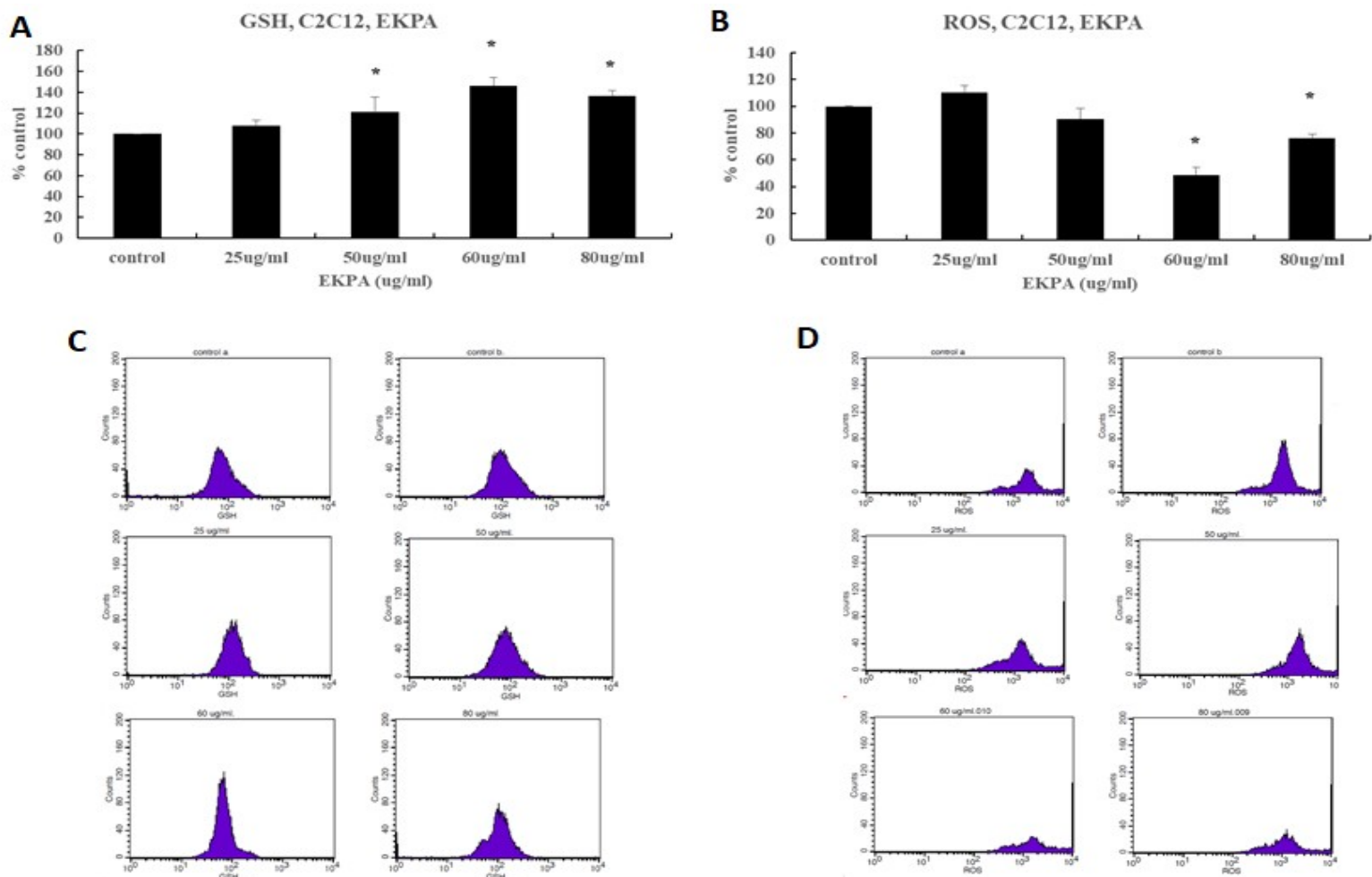


**Διάγραμμα 5.** Επίδραση εκχυλίσματος ανθών ελιάς ANKT, στην κυτταρική σειρά C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης των εκχυλισμάτων, μέσω κυτταρομετρίας ροής στα επίπεδα A) GSH, B) ROS. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control και παρουσιάζονται ως mean ± SEM, (n=3). \*p<0,05 στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με το control. Τα ιστογράμματα παρουσιάζουν τον φθορισμό που εκπέμπεται από 10,000 κύτταρα κατά την μέτρηση της C)GSH και D)ROS μέσω κυτταρομετρίας ροής. Ο FL2 αντιπροσωπεύει τον φθορισμό που ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας 488 και 530-580 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και ως μήκος κύματος εκπομπής.

#### **4.4.3 ΕΚΡΑ**

Τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής έδειξαν πως το εκχύλισμα ΕΚΡΑ αύξησε στατιστικώς σημαντικά ( $p<0,05$ ), τα επίπεδα της GSH κατά 21%, 46% και 387% στις συγκεντρώσεις 50.0, 60.0 και 80.0 μg/ml ΕΚΡΑ αντίστοιχα, σε σύγκριση με το control (διάγραμμα 6A). Ενώ τα επίπεδα ROS παρουσίασαν στατιστικά σημαντική μείωση κατά 51% και 24% στις συγκεντρώσεις 60.0 μg/ml και 80.0 μg/ml ΕΚΡΑ, αντίστοιχα (διάγραμμα 6B).

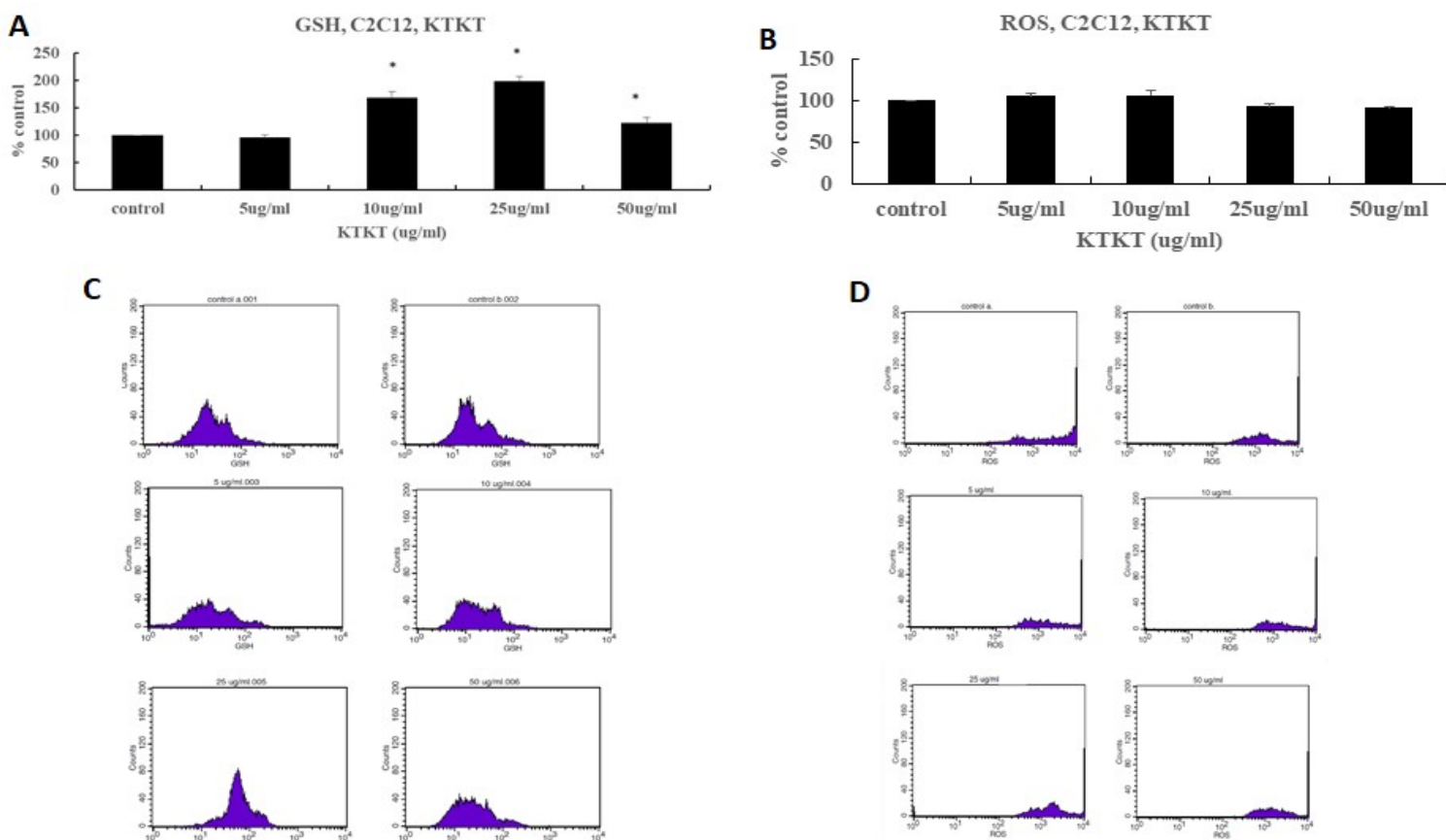




**Διάγραμμα 6.** Επίδραση εκχυλίσματος ανθών ελιάς EKPA στην κυτταρική σειρά C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης των εκχυλισμάτων, μέσω κυτταρομετρίας ροής στα επίπεδα A) GSH, B) ROS. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control και παρουσιάζονται ως mean ± SEM, (n=3). \*p<0,05 στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με το control. Τα ιστογράμματα παρουσιάζουν τον φθορισμό που εκπέμπεται από 10,000 κύτταρα κατά την μέτρηση της C)GSH και D)ROS μέσω κυτταρομετρίας ροής. Ο FL2 αντιπροσωπεύει τον φθορισμό που ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας 488 και 530-580 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και ως μήκος κύματος εκπομπής.

#### 4.4.4 ΚΤΚΤ

Τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής έδειξαν πως το εκχύλισμα ΚΤΚΤ αύξησε στατιστικώς σημαντικά ( $p < 0,05$ ), τα επίπεδα της GSH κατά 69,11%, 99,14% και 22,07% στις συγκεντρώσεις 10.0, 25.0 και 50.0  $\mu\text{g/ml}$  ΚΤΚΤ αντίστοιχα, σε σύγκριση με το control (διάγραμμα 7A). Ενώ αντίθετα, τα επίπεδα ROS δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική μεταβολή (διάγραμμα 7B).



**Διάγραμμα 7.** Επίδραση εκχυλίσματος ανθών ελιάς ΚΤΚΤ στην κυτταρική σειρά C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης των εκχυλισμάτων, μέσω κυτταρομετρίας ροής στα επίπεδα A) GSH, B) ROS. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control και παρουσιάζονται ως mean  $\pm$  SEM, (n=3). \* $p < 0,05$  στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με το control. Τα ιστογράμματα παρουσιάζουν τον φθορισμό που εκπέμπεται από 10,000 κύτταρα κατά την μέτρηση της C)GSH και D)ROS μέσω κυτταρομετρίας ροής. Ο FL2 αντιπροσωπεύει τον φθορισμό που ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας 488 και 530-580 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και ως μήκος κύματος εκπομπής.

## 5.Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι αντιοξειδωτικές ικανότητες τριών εκχυλισμάτων ανθών ελιάς (ANKT, KTKT και EKPA) και ενός εκχυλίσματος ανθών αγριελιάς (AGRI), με χρήση πληθώρας μοριακών τεχνικών. Πιο συγκεκριμένα, μέσω της μεθόδου ABTS<sup>•+</sup> μελετήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα των τεσσάρων εκχυλισμάτων. Στη συνέχεια τα εκχυλίσματα εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να παρεμποδίζουν την επαγόμενη από ρίζες ROO<sup>•</sup> πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων DNA. Ακόμα η αντιοξειδωτική δράση των υπό εξέταση δειγμάτων αξιολογήθηκε σε κυτταρικό επίπεδο, με την χρήση της κυτταρικής σειράς μυοβλαστών ποντικού (C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>), η οποία επιλέχθηκε λόγω της πληθώρας μελετών, που σχετίζονται με τα αποτελέσματα έκθεσης των κυττάρων αυτών σε πολυφαινόλες, καθώς και για το λόγο ότι η επίδραση των πολυφαινολών σε μυϊκά κύτταρα είναι σημαντική, ειδικά για κάποιες ομάδες ατόμων, όπως για παράδειγμα τους αθλητές (Goutzourelas et al., 2015; Kerasioti et al., 2014; Kouka et al., 2017). Προκειμένου να χρησιμοποιηθούν μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις των δειγμάτων στα πειράματα, η κυτταροτοξικότητά τους εκτιμήθηκε με την μέθοδο XTT. Τέλος έγινε προσδιορισμός της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των κυττάρων μέσω κυτταρομετρίας ροής, όπου ελέγχθηκαν τα επίπεδα γλουταθειόνης (GSH) και τα επίπεδα δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS). Τα εκχυλίσματα εμφάνισαν παρόμοια αντιοξειδωτική δράση.

Με τη μέθοδο ABTS<sup>•+</sup>, μετρήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων ανθών ελιάς. Σύμφωνα με μελέτες, στις οποίες έγινε χρήση διάφορων μεθόδων, στις οποίες συμπεριλαμβάνονται μέθοδοι όπως αυτές του ABTS<sup>•+</sup> και του DPPH, βρέθηκε ότι τα εκχυλίσματα ελιάς (Rossi et al., 2017; Žanetić, Cerretani, Del Carlo, & Špika, 2014) και αγριελιάς (Lafka et al., 2013) έχουν εμφανίσει αντιοξειδωτικές ικανότητες. Έτσι και στη συγκεκριμένη μελέτη, σύμφωνα με τα αποτελέσματα, όλα τα εκχυλίσματα εμφάνισαν αντιοξειδωτική ικανότητα, με το εκχύλισμα AGRI να έχει IC<sub>50</sub> στα 9,25 μg/ml, τιμή η οποία είναι η μικρότερη που παρατηρήθηκε. Συνεπώς, το εκχύλισμα AGRI, είχε στατιστικά σημαντικά ( $p < 0,05$ ) μεγαλύτερη ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας του ABTS<sup>•+</sup>, σε σύγκριση με τα υπόλοιπα εκχυλίσματα.

Τα αποτελέσματα της μεθόδου για την εκτίμηση της προστατευτικής δράσης των εκχυλισμάτων απέναντι στην επαγόμενη από ρίζες ROO• πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA, έδειξαν πως τα εκχυλίσματα AGRI, ANKT, EKPA είχαν στατιστικά σημαντικά ( $p < 0,05$ ), μεγαλύτερη ικανότητα να προστατεύουν τη θραύση του DNA, σε σχέση με το εκχύλισμα KTKT, καθώς εμφάνισαν IC<sub>50</sub> στα 17.17, 21.17 και 28,50 μg/μl αντίστοιχα, σε αντίθεση με το KTKT, που εμφάνισε IC<sub>50</sub> στα 82,33 μg/μl. Το εκχύλισμα AGRI εμφάνισε και σε αυτή τη μέθοδο το χαμηλότερο IC<sub>50</sub>. Έχειδειχθεί πως γενικά τα πολυφαινολικά εκχυλίσματα ελιάς και αγριελιάς πιθανώς εμφανίζουν αντικαρκινική δράση. Πιο συγκεκριμένα, εκχυλίσματα από καρπό αγριελιάς έχουν οδηγήσει σε μείωση των δεικτών ηπατικού καρκινώματος (Amereh et al., 2017), ενώ εκχυλίσματα από φύλλα ελιάς αναστέλλουν την ανάπτυξη και την διαφοροποίηση καρκινικών κυττάρων λευκαμίας (ABAZA et al., 2007). Επίσης, έχειδειχθεί πως οι πολυφαινόλες της ελιάς μειώνουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διεισδυτικότητα και την ανάπτυξη όγκου, σε μοντέλα καρκινικών κυττάρων του μαστού (Akl et al., 2014). Τελικά, έχει βρεθεί πως, οι πολυφαινόλες του ελαιολάδου μπορούν να επιδράσουν σε διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια του κυττάρου, επηρεάζοντας τον πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων, ενώ μπορεί να προστατεύουν και έναντι της χρόνιας φλεγμονής, η οποία μπορεί επίσης να οδηγήσει στην εμφάνιση καρκίνου (Boss et al., 2016).

Επιπλέον, εκτός των προαναφερθέντων, υπάρχει και πληθώρα μελετών στις οποίες τα εκχυλίσματα ελαιολάδου και παραπροϊόντων έχουν εμφανίσει αντιοξειδωτικές και αντικαρκινικές ιδιότητες (Barbaro et al., 2014; De Leonardis et al., 2008; El-Kholy et al., 2014; Kishikawa et al., 2015; Lafka et al., 2013; Papadopoulou et al., 2017; Salvini et al., 2006; Taamalli et al., 2012; Zeriouh et al., 2017) Για παράδειγμα, σύμφωνα με τους Zeriouh et al. (2017), εκχυλίσματα φύλλων αγριελιάς οδήγησαν σε μείωση της ανάπτυξης καρκίνου του παχέος εντέρου προάγοντας την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων. Επιπλέον, σύμφωνα με τους Salvini et al. (2006), κατανάλωση ελαιόλαδου μειώνει την πρόκληση βλαβών στο DNA, που οφείλονται σε οξειδωτικό στρες, ενώ σε πληθώρα μελετών έχειδειχθεί πως η ολεοευρωπαϊνή, μία από τις κυριότερες πολυφαινόλες του ελαιολάδου, εμφανίζει αντικαρκινικές και αντιοξειδωτικές ικανότητες (Barbaro et al., 2014). Επιπλέον, εκχυλίσματα από διάφορα μέρη της ελιάς, συμπεριλαμβανομένων των ανθών, έχουν εμφανίσει αντιοξειδωτικές, αντιβακτηριακές και αντιαλλεργικές ικανότητες (Kishikawa et al., 2015). Η σύσταση των εκχυλισμάτων από φύλλα ελιάς είναι παρόμοια με αυτή του

ελαιολάδου (De Leonardis et al., 2008), και το ίδιο ισχύει και για τα εκχυλίσματα των ανθών, τα οποία περιέχουν πολυφαινόλες όπως υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη και ολεοευρωπαϊνή (ABAZA et al., 2007; Reikik et al., 2018) και επομένως έτσι μπορούν να εξηγηθούν τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης.

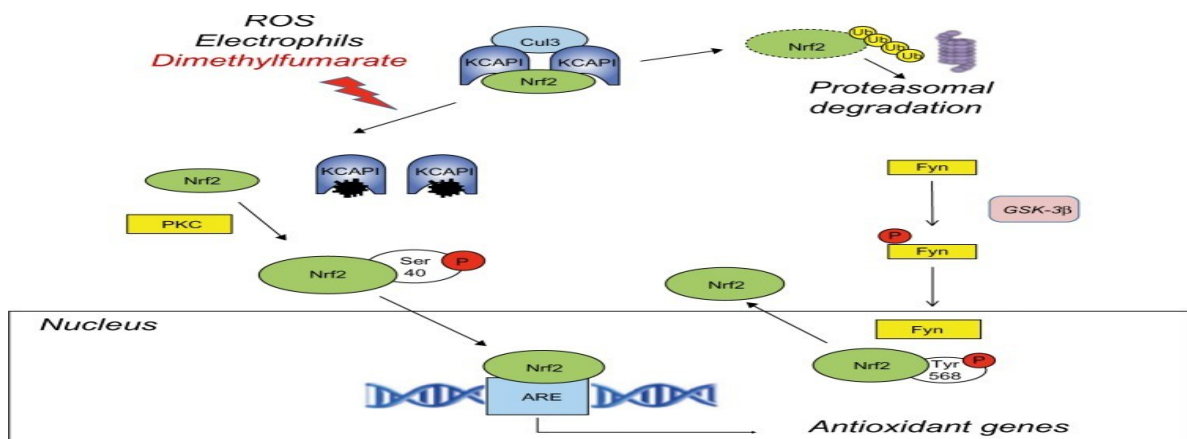
Τα αποτελέσματα από την μέθοδο XTT έδειξαν πως κυτταροτοξικότητα εμφανίστηκε για συγκεντρώσεις πάνω από 70.0 µg/ml για το AGRI, από 25.0 µg/ml για το ANKT, από 100.0 µg/ml για το EKPA και από 60.0 µg/ml για το KTKT. Συνεπώς χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις από 10.0-60.0 µg/ml AGRI, 2.5-20.0 µg/ml ANKT, 25.0-80.0 µg/ml EKPA και 5.0-50.0 µg/ml KTKT.

Μέσω της κυτταρομετρίας ροής μετρήθηκαν τα επίπεδα της γλουταθειόνης και των ROS, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων, σε κύτταρα μυοβλαστών ποντικού C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>.

Η GSH είναι η πιο άφθονη, μη πρωτεϊνική πηγήθειόλης στα κύτταρα. Είναι ένα σημαντικό ενδοκυτταρικό αντιοξειδωτικό, με αναγωγικές ιδιότητες, το οποίο προστατεύει τα κύτταρα από το οξειδωτικό στρες.

Τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής έδειξαν πως όλα τα εκχυλίσματα αύξησαν τα επίπεδα της GSH. Τα επίπεδα ROS δεν παρουσίασαν καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή για τα εκχυλίσματα AGRI και KTKT, ενώ παρουσίασαν στατιστικά σημαντική μείωση για τα εκχυλίσματα ANKT και EKPA. Πιο συγκεκριμένα, το εκχύλισμα AGRI αύξησε στατιστικώς σημαντικά ( $p < 0,05$ ), τα επίπεδα της GSH κατά 39,18%, 49,28%, 17,54% και 13,25 % στις συγκεντρώσεις 10.0, 25.0, 50.0 και 60.0 µg/ml AGRI αντίστοιχα, σε σύγκριση με το control, ενώ το εκχύλισμα KTKT αύξησε στατιστικώς σημαντικά ( $p < 0,05$ ), τα επίπεδα της GSH κατά 69,11%, 99,14% και 22,07% στις συγκεντρώσεις 10.0, 25.0 και 50.0 µg/ml KTKT αντίστοιχα, σε σύγκριση με το control. Όσον αφορά το εκχύλισμα ANKT, αυτό αύξησε στατιστικώς σημαντικά ( $p < 0,05$ ), τα επίπεδα της GSH κατά 13,72%, 37,35%, 38,88% και 44,26 % στις συγκεντρώσεις 2,5, 5.0, 10.0 και 20.0 µg/ml ANKT αντίστοιχα, σε σύγκριση με το control, ενώ τα επίπεδα ROS παρουσίασαν στατιστικά σημαντική μείωση κατά 9% και 12% στις συγκεντρώσεις 10.0 µg/ml και 20.0 µg/ml ANKT, αντίστοιχα. Και τελικά, το εκχύλισμα EKPA αύξησε στατιστικώς σημαντικά ( $p < 0,05$ ), τα επίπεδα της GSH κατά 21%, 46% και 387% στις συγκεντρώσεις 50.0, 60.0 και 80.0 µg/ml EKPA αντίστοιχα, σε σύγκριση με το control, ενώ τα επίπεδα ROS παρουσίασαν στατιστικά σημαντική μείωση κατά 51% και 24% στις συγκεντρώσεις 60.0 µg/ml και 80.0 µg/ml EKPA, αντίστοιχα.

Στη βιβλιογραφία δεν είναι διαθέσιμες μελέτες εκχυλισμάτων ανθών ελιάς και αγριελιάς. Σύμφωνα, λοιπόν, με πρόσφατες μελέτες, τόσο σε ζώα, όσο και στον άνθρωπο, στις οποίες έγινε χορήγηση πολυφαινολών, οι πιθανοί μοριακοί μηχανισμοί στους οποίους μπορεί να οφείλεται η αύξηση των επιπέδων της γλουταθειόνης, είναι οι εξής: i) αύξηση των ενζύμων που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεσή της (π.χ., λιγάση γ-γλουταμυλ κυστεΐνης και συνθετάση GSH), (ii) περίσσεια γλουταθειόνης από την αντίδρασή της με ελεύθερες ρίζες με αποτέλεσμα την άμεση εξουδετέρωσή τους, (iii) αύξηση της δραστηριότητας της ρεδοκτάσης γλουταθειόνης (GR), η οποία αναγεννά την γλουταθειόνη από την GSSG (οξειδωμένη μορφή) (Papadopoulou et al., 2017), (iv) ενεργοποίηση του μονοπατιού, που επάγεται από τον μεταγραφικό παράγοντα Nrf2 και ενεργοποιεί ARE's, σε καταστάσεις οξειδωτικού 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, η πρωτεΐνη Keap1, η οποία λειτουργεί ως «αισθητήρας στρες», καθώς διαθέτει πολλά κατάλοιπα Cys, τα οποία αντιδρούν με ηλεκτρονιόφιλα μόρια, αποδιατάσσεται από το σύμπλοκο και ο Nrf2 είναι ελεύθερος να εισέλθει στον πυρήνα, να σχηματίσει διμερή με τις μικρές MAF πρωτεΐνες, να προσδεθεί σε στοιχεία ARE's (antioxidant response elements) και να επάγει την έκφραση γονιδίων απόκρισης στο οξειδωτικό στρες (Suzuki, Otsuki, Keleku-Lukwete, & Yamamoto, 2016). 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 21:** Μονοπάτι μεταγωγής σήματος Keap1-Nrf2

Σε αντίθεση με την γλουταθειόνη τα επίπεδα των ROS δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές για όλα τα εκχυλίσματα. Πιο συγκεκριμένα, για τα εκχυλίσματα AGRI και KTKT τα επίπεδα ROS δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές αλλαγές, ενώ για τα εκχυλίσματα ANKT και EKPA τα επίπεδα ROS μειώθηκαν. 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 στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς (Kerasiotti et al., 2014). Σύμφωνα με άλλες έρευνες ωστόσο έχει δείχθει πως μπορεί να υπάρξει σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης αντιοξειδωτικών ενζύμων και των επιπέδων των ROS (Garrido et al., 2012; Goutzourelas et al., 2015). Η μείωση των ROS στις περιπτώσεις των ANKT και EKPA μπορεί επομένως να εξηγηθεί από την αύξηση τη γλουταθειόνης, η οποία έχει την ικανότητα να αντιδρά με ελεύθερες ρίζες και να τις εξουδετερώνει.

Καταλήγοντας, τα αποτελέσματα στο σύνολο τους έδειξαν πως τα τέσσερα πολυφαινολικά εκχυλίσματα εμφάνισαν αντιοξειδωτική και DNA προστατευτική δράση και φάνηκε να βελτιώνουν την οξειδοαναγωγική κατάσταση των μυοβλαστών ποντικού. Εντούτοις, από την σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ των εκχυλισμάτων φάνηκε πως το πιο ισχυρό τόσο όσο προς την αντιοξειδωτική δράση αλλά και ως προς την ικανότητα να προστατεύει το DNA από βλάβη ήταν το AGRI, ενώ το εκχύλισμα ANKT εμφάνισε αύξηση της γλουταθειόνης στα κύτταρα στη μικρότερη συγκέντρωση. Ωστόσο, η πολυφαινολική σύσταση των εκχυλισμάτων δεν είναι γνωστή.

Με την μελέτη αυτή έγινε μια πρώτη εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας πολυφαινολικών εκχυλισμάτων ανθών ελιάς και αγριελιάς, ωστόσο απαιτούνται επιπλέον έρευνες για την πλήρη κατανόηση των μοριακών μηχανισμών. Τα στερεά κατάλοιπα από τη βιομηχανία της παραγωγής ελαιολάδου, όπως για παράδειγμα τα φύλλα μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε διαιτητικές, φαρμακολογικές και κοσμετικές εφαρμογές (Guinda, 2006). Μελλοντικά παρόμοιες μελέτες θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν και στην ανάδειξη της βιολογικής αξίας των εκχυλισμάτων ανθών.

## Βιβλιογραφία

- ABAZA, L., TALORETE, T. P. N., YAMADA, P., KURITA, Y., ZARROUK, M., & ISODA, H. (2007). Induction of Growth Inhibition and Differentiation of Human Leukemia HL-60 Cells by a Tunisian Gerboui Olive Leaf Extract. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71(5), 1306–1312. <https://doi.org/10.1271/bbb.60716>
- Akl, M. R., Ayoub, N. M., Mohyeldin, M. M., Busnena, B. A., Foudah, A. I., Liu, Y. Y., & Ei Sayed, K. A. (2014). Olive phenolics as c-Met inhibitors: (-)-Oleocanthal attenuates cell proliferation, invasiveness, and tumor growth in breast cancer models. *PLoS ONE*, 9(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097622>
- Amereh Z., Hatami N., Shirazi F., Gholami S., Hosseini H., Noubarani M., Kamalinejad M., Andalib S., Keyhanfar F., Eskandari M. (2016). CANCER CHEMOPREVENTION BY OLEASTER (ELAEAGNUS ANGUSTIFOLI L.) FRUIT EXTRACT IN A MODEL OF HEPATOCELLULAR CARCINOMA INDUCED BY DIETHYLNITROSAMINE IN RATS. *EXCLI Journal*, 16:1046-1056. <http://dx.doi.org/10.17179/excli2017-389>
- Apostolos Kiritsakis & Fereidoon Shahidi. (2017). Olives and Olive Oil as Functional Foods (p. 10). John Wiley & Sons, Ltd.
- Arnao MB1, Cano A, Alcolea JF, A. M. (2001). Estimation of free radical-quenching activity of leaf pigment extracts. *Phytochem Anal*, 12(2), 138–143.
- Barbaro, B., Toietta, G., Maggio, R., Arciello, M., Tarocchi, M., Galli, A., & Balsano, C. (2014). Effects of the olive-derived polyphenol oleuropein on human health. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(10), 18508–18524. <https://doi.org/10.3390/ijms151018508>
- Barrera, G. (2012). Oxidative Stress and Lipid Peroxidation Products in Cancer Progression and Therapy. *ISRN Oncology*, 2012, 1–21. <https://doi.org/10.5402/2012/137289>
- Birben, E., Murat, U., Md, S., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *WAO Journal*, 5(January), 9–19. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>
- Boss, A., Bishop, K., Marlow, G., Barnett, M., & Ferguson, L. (2016). Evidence to Support the Anti-Cancer Effect of Olive Leaf Extract and Future Directions. *Nutrients*, 8(8), 513. <https://doi.org/10.3390/nu8080513>
- 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>
- Breton, Catherine, A. B. (2013). No Title. In *From the Olive Flower to the Drupe: Flower Types, Pollination, Self and Inter-Compatibility and Fruit Set*.
- De Leonardis, A., Aretini, A., Alfano, G., MacCiola, V., & Ranalli, G. (2008). Isolation of a hydroxytyrosol-rich extract from olive leaves (*Olea Europaea* L.) and



- evaluation of its antioxidant properties and bioactivity. *European Food Research and Technology*, 226(4), 653–659. <https://doi.org/10.1007/s00217-007-0574-3>
- Dei Cas, M., & Ghidoni, R. (2018). Cancer prevention and therapy with polyphenols: Sphingolipid-mediated mechanisms. *Nutrients*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/nu10070940>
- Deshmukh, P., Unni, S., Krishnappa, G., & Padmanabhan, B. (2017). The Keap1–Nrf2 pathway: promising therapeutic target to counteract ROS-mediated damage in cancers and neurodegenerative diseases. *Biophysical Reviews*, 9(1), 41–56. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0244-4>
- Dupre-Crochet, S., Erard, M., & Nusse, O. (2013). ROS production in phagocytes: why, when, and where? *Journal of Leukocyte Biology*, 94(4), 657–670. <https://doi.org/10.1189/jlb.1012544>
- El-Kholy, T. A., Hilal, M. A., Al-Abbadi, H. A., Serafi, A. S., Al-Ghamdi, A. K., Sobhy, H. M., & Richardson, J. R. C. (2014). The effect of extra virgin olive oil and soybean on dna, cytogenicity and some antioxidant enzymes in rats. *Nutrients*, 6(6), 2376–2386. <https://doi.org/10.3390/nu6062376>
- G. Steven Sibbett and Louise Ferguson. (2005). *Olive Production Manual*.
- Garrido, I., García-Sánchez, M., Casimiro, I., Casero, P. J., García-Romera, I., Ocampo, J. A., & Espinosa, F. (2012). Oxidative Stress Induced in Sunflower Seedling Roots by Aqueous Dry Olive-Mill Residues. *PLoS ONE*, 7(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046137>
- Goutzourelas, N., Stagos, D., Spanidis, Y., Liosi, M., Apostolou, A., Priftis, A., ... Kouretas, D. (2015). Polyphenolic composition of grape stem extracts affects antioxidant activity in endothelial and muscle cells. *Molecular Medicine Reports*, 12(4), 5846–5856. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4216>
- Guinda, A. (2006). Use of solid residue from the olive industry. *Grasas y Aceites*, 57(1), 107–115. <https://doi.org/10.3989/gya.2006.v57.i1.26>
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods in Enzymology*, 186(C), 1–85. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86093-B](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86093-B)
- 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>
- Hartmann, H. T. (1950). Olive Flower-Bud Formation, Nutrients Essential to Tree During March and April When Flower-Buds Are Forming Tests Show. *UCANR.EDU, California Agriculture*.
- Keating, E., & Martel, F. (2018). Antimetabolic Effects of Polyphenols in Breast Cancer Cells: Focus on Glucose Uptake and Metabolism. *Frontiers in Nutrition*, 5(April). <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00025>
- Kerasioti, 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>
- Kishikawa, A., Ashour, A., Zhu, Q., Yasuda, M., Ishikawa, H., & Shimizu, K. (2015).

- Multiple biological effects of olive oil by-products such as leaves, stems, flowers, olive milled waste, fruit pulp, and seeds of the olive plant on skin. *Phytotherapy Research*, 29(6), 877–886. <https://doi.org/10.1002/ptr.5326>
- Knight, J. A. (2000). Review: Free radicals, antioxidants, and the immune system. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 30(2), 145–158.
- Kouka, P., Priftis, A., Stagos, D., Angelis, A., Stathopoulos, P., Xinou, N., ... Kouretas, D. (2017). Assessment of the antioxidant activity of an olive oil total polyphenolic fraction and hydroxytyrosol from a Greek *Olea europaea* variety in endothelial cells and myoblasts. *International Journal of Molecular Medicine*, 40(3), 703–712. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3078>
- Lafka, T.-I., Lazou, A., Sinanoglou, V., & Lazos, E. (2013). Phenolic Extracts from Wild Olive Leaves and Their Potential as Edible Oils Antioxidants. *Foods*, 2(1), 18–31. <https://doi.org/10.3390/foods2010018>
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., & Rémésy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 intervention studies. *Am J Clin Nutr*, 81(March), 243S–255S. <https://doi.org/81/1/230S> [pii]
- Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., & Milner, A. (1993). A Novel Method for Measuring Antioxidant Capacity and its Application to Monitoring the Antioxidant Status in Premature Neonates. *Clinical Science*, 84(4), 407–412. <https://doi.org/10.1042/cs0840407>
- Mylonas C1, K. D. (1999). Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo*, 13(3), 295–309.
- Namvar, F., Mohamad, R., Baharara, J., Zafar-Balanejad, S., Fargahi, F., & Rahman, H. S. (2013). Antioxidant, antiproliferative, and antiangiogenesis effects of polyphenol-rich seaweed (*sargassum muticum*). *BioMed Research International*, 2013, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2013/604787>
- Niki, E. (1990). Free radical initiators as source of water- or lipid-soluble peroxy radicals. *Methods in Enzymology*, 186(C), 100–108. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86095-D](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86095-D)
- Papadopoulou, A., Petrotos, K., Stagos, D., Gerasopoulos, K., Maimaris, A., Makris, H., ... Kouretas, D. (2017). Enhancement of Antioxidant Mechanisms and Reduction of Oxidative Stress in Chickens after the Administration of Drinking Water Enriched with Polyphenolic Powder from Olive Mill Waste Waters. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8273160>
- Powers, S. K., & Jackson, M. J. (2010). Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev*, 88(4), 1243–1276. <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2007>. Exercise-Induced
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290–4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>
- Rahman, K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical Interventions in Aging*, 2(2), 219–236. <https://doi.org/http://dx.doi.org/>

- Rekik, O., Ben Mansour, A., & Bouaziz, M. (2018). Evaluation of phenolic composition and antioxidant activity changes in olive flowers during development using HPLC/DAD and LC-MS/MS. *Electrophoresis*, *39*(13), 1663–1672. <https://doi.org/10.1002/elps.201700200>
- Rossi, M., Caruso, F., Kwok, L., Lee, G., Caruso, A., Gionfra, F., ... Incerpi, S. (2017). Protection by extra virgin olive oil against oxidative stress in vitro and in vivo. Chemical and biological studies on the health benefits due to a major component of the Mediterranean diet. *PLoS ONE*, *12*(12), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189341>
- Salvini, S., Sera, F., Caruso, D., Giovannelli, L., Visioli, F., Saieva, C., ... Palli, D. (2006). Daily consumption of a high-phenol extra-virgin olive oil reduces oxidative DNA damage in postmenopausal women. *British Journal of Nutrition*, *95*(04), 742. <https://doi.org/10.1079/BJN20051674>
- Schieber, M., & Chandel, N. S. (2014a). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology*, *24*(10), R453–R462. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>
- Schieber, M., & Chandel, N. S. (2014b). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology*, *24*(10), R453–R462. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>.ROS
- 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>
- Taamalli, A., Arráez-Román, D., Zarrouk, M., Valverde, J., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2012). The Occurrence and Bioactivity of Polyphenols in Tunisian Olive Products and by-Products: A Review. *Journal of Food Science*, *77*(4). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02599.x>
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, *2*(12), 1231–1246. <https://doi.org/10.3390/nu2121231>
- Veskoukis, A. S., Tsatsakis, A. M., & Kouretas, D. (2012). Dietary oxidative stress and antioxidant defense with an emphasis on plant extract administration. *Cell Stress and Chaperones*, *17*(1), 11–21. <https://doi.org/10.1007/s12192-011-0293-3>
- Wu, G., Fang, Y., Yang, S., Lupton, J. R., & Turner, N. D. (2004). Recent Advances in Nutritional Sciences Glutathione Metabolism and Its Implications for Health 1. *Environmental Health*, *134*(December 2003), 489–492. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14988435>
- Zahra Amerreh, Nasrin Hatami, Farshad H. Shirazi, Saman Gholami, Seyed Hojjat Hosseini, Maryam Noubarani, Mohammad Kamalinejad, Sina Andalib, Fariborz Keyhanfar, M. R. E. (2017). CANCER CHEMOPREVENTION BY OLEASTER ( ELAEAGNUS HEPATOCELLULAR CARCINOMA INDUCED BY, 1046–1056.
- Žanetić, M., Cerretani, L., Del Carlo, M., & Špika, M. J. (2014). Phenolic profile and antioxidant activity of virgin olive oil from cv. Drobnica. *8th International Congress of Food Technologists, Biotechnologists and Nutritionists, Proceedings*, (June 2017).
- Zerriouh, W., Nani, A., Belarbi, M., Dumont, A., De Rosny, C., Aboura, I., ... Hichami,

A. (2017). Phenolic extract from oleaster (*Olea europaea* var. *Sylvestris*) leaves reduces colon cancer growth and induces caspase-dependent apoptosis in colon cancer cells via the mitochondrial apoptotic pathway. *PLoS ONE*, *12*(2), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170823>

Γεωργάλας, Γ. Κ. (n.d.). Μεγάλη Ελληνική Εγκυκλοπαιδεία Π. Δρανδάκη. Αθήνα.

Παπαγαλάνης, Ν. (2014). *No Title*.