

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ**  
Φυσιολογίας  
Ζωικών  
Οργανισμών



**ΤΜΗΜΑ**  
**Βιοχημείας &  
Βιοτεχνολογίας**  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Κούκα Παρασκευή

**Αποτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας ποικιλίας  
ελαιολάδου του Αγίου όρους με συνδυασμό μοριακών  
τεχνικών.**



Λάρισα 2020

«Αποτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας ποικιλίας ελαιολάδου του  
Αγίου όρους με συνδυασμό μοριακών τεχνικών»

«Assessment of the antioxidant activity of an olive oil derived from  
Mount Athos using molecular techniques»

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:**

Δημήτριος Κουρέτας (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ): Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Δημήτριος Στάγκος: Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Αλέξανδρος Κορτσάρης: Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης

## **ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:**

- 1) Δημήτριος Κουρέτας (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ): Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 2) Δημήτριος Στάγκος: Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 3) Αλέξανδρος Κορτσάρης: Ομότιμος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης
- 4) Λέανδρος – Αλέξιος Σκαλτσούνης: Καθηγητής του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- 5) Μαρία Χαλαμπαλάκη: Επίκουρη καθηγήτρια του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- 6) Δημήτριος Λεωνίδας: Καθηγητής Δομικής και λειτουργικής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 7) Κωνσταντίνος Ματθιόπουλος: Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής – Πρόεδρος, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

«Αποτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας ποικιλίας ελαιολάδου του  
Αγίου όρους με συνδυασμό μοριακών τεχνικών»

«Assessment of the antioxidant activity of an olive oil derived from  
Mount Athos using molecular techniques»

Κούκα Παρασκευή

Kouka Paraskevi

## Περίληψη

Τις τελευταίες δεκαετίες, τα επιστημονικά ευρήματα που τονίζουν τις ωφέλιμες συνέπειες για την υγεία των φυτικών προερχόμενων ενώσεων (δηλαδή φυτικά εκχυλίσματα πλούσια σε πολυφαινόλες) έχουν αυξηθεί σημαντικά. Η αξιολόγηση των ιδιοτήτων τέτοιων ενώσεων στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό είναι μια κοινή πρακτική για την αξιολόγηση της δυναμικής τους στην ενίσχυση της αντιοξειδωτικής και αντιγενοτοξικής άμυνας των ιστών, ολόκληρων οργανισμών ή στην καλή έκβαση μιας ασθένειας που σχετίζεται με τις ελεύθερες ρίζες.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή έγινε μια προσπάθεια έτσι ώστε να αποδοθεί στο ελαιόλαδο ένα «δακτυλικό αποτύπωμα» όσον αφορά τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των βιοφαινολικών συστατικών του, με *in vitro* δοκιμές, με τη χρήση κυτταροκαλλιιεργειών (φυσιολογικές και καρκινικές κυτταρικές σειρές) αλλά και *in vivo* δοκιμών. Εξετάσθηκαν εκχυλίσματα (μίγματα) ελαιολάδου με διαφορετική πολυφαινολική σύσταση, καθώς και οι κύριες πολυφαινόλες ως καθαρές απομονωμένες ενώσεις. Επιπλέον, έγινε έλεγχος της αντιοξειδωτικής ικανότητας πολυφαινολικών εκχυλισμάτων ανθέων ελιάς, τα οποία αποτελούν το λιγότερο μελετημένο τμήμα του ελαιόδεντρου. Τέλος, έγινε οξεία χορήγηση (σύντομο χρονικό διάστημα- 14 ημέρες) σε αρουραίους Wistar, ενός ελαιολάδου εμπλουτισμένου με πολυφαινόλες, με σκοπό να διαλευκανθεί ο μηχανισμός δράσης του σε *in vivo* σύστημα.

## Λέξεις κλειδιά

Ελαιόλαδο, άνθη ελιάς, πολυφαινόλες, οξειδωτικό στρες, οξειδοαναγωγική κατάσταση, κυτταρικές σειρές, αρουραίοι

## **Abstract**

In recent decades, scientific outcomes highlights the beneficial health effects of plant compounds, such as polyphenolic extracts. Evaluating the antioxidant potential of such compounds is a common practice for evaluating their potential in enhancement of the antioxidant defense system of tissues, entire organisms or the good outcome of a free radical-related disease.

This study was intended to provide an olive oil "fingerprint" based on its antioxidant properties due to biophenolic composition, using *in vitro*, cell cultures and *in vivo* based techniques. Extracts (mixtures) of olive oil with different polyphenolic composition as well as the main polyphenols as pure isolated compounds were examined. In addition, the antioxidant capacity of polyphenolic olive blossom extracts, which form the least studied part of the olive tree, were tested. Finally, an acute administration (short-term - 14 days), of a polyphenolic enriched olive oil, was made to Wistar rats in order to elucidate its molecular mechanism *in vivo*.

## **Key words**

Olive oil, olive blossoms, polyphenos, oxidative stress, redox state, cell lines, rats

# Κούκα Παρασκευή του Νικολάου

Λάρισα 2020

«Αποτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας ποικιλίας ελαιολάδου του  
Αγίου όρους με συνδυασμό μοριακών τεχνικών»

«Assessment of the antioxidant activity of an olive oil derived from  
Mount Athos using molecular techniques»

Διδακτορική διατριβή

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σχολή Επιστημών Υγείας

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

*Αριθμός προκαταρκτικών σελίδων: 27*

*Συνολικός αριθμός σελίδων: 305*

*Συνολικός αριθμός εικόνων: 57*

*Συνολικός αριθμός πινάκων: 23*

*Συνολικός αριθμός διαγραμμάτων: 46*

*Συνολικός αριθμός βιβλιογραφικών παραπομπών: 434*

## Πρόλογος

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε κατά τα έτη 2016-2020 στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας, κ. Δημήτριου Κουρέτα. Κατά το πρώτο έτος χρηματοδοτήθηκε από την εταιρεία Tsantalis μέσω σύμβασης με το Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, ενώ μετά το πέρας της χρηματοδότησης λήφθηκε υποτροφία από το Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας και Καινοτομίας (ΕΛΙΔΕΚ) με κωδικό έργου 5547.

### Σκοπός της μελέτης:

Τα τελευταία χρόνια τόσο η χρήση αντιοξειδωτικών όσο και η ευρεία κατανάλωση εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου έχουν απασχολήσει ιδιαίτερα την επιστημονική κοινότητα σχετικά με τις πιθανές ευεργετικές επιδράσεις τους στην υγεία, αποφέροντας πολυάριθμες δημοσιεύσεις και ενδιαφέροντα ευρήματα. Το ελαιόλαδο αποτελεί αναπόσπαστο τμήμα της Μεσογειακής διατροφής εδώ και αρκετές δεκαετίες, με την Ελλάδα μάλιστα να αποτελεί στο σήμερα την τρίτη ελαιοπαραγωγό δύναμη παγκοσμίως. Πληθώρα ερευνών τονίζουν την ευεργετική επίδραση της κατανάλωσης ελαιολάδου έναντι διαφόρων παθολογικών καταστάσεων. Παρόλα αυτά δεν είναι σαφής ούτε ο μοριακός μηχανισμός δράσης, ούτε το είδος και η ποσότητα του ελαιολάδου που απαιτούνται σε κάθε περίπτωση. Ο σκοπός της διατριβής ήταν η διερεύνηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας *in vitro* εκχυλισμάτων που προέρχονται από διάφορες ποικιλίες ελαιολάδων αλλά και ανθέων ελιάς (το λιγότερο μελετημένο τμήμα του ελαιόδεντρου). Καθώς επίσης μελετήθηκε και η επίδρασή τους στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό διαφόρων φυσιολογικών και καρκινικών κυτταρικών σειρών, σε βιοδείκτες οξειδωτικού στρες και στα επίπεδα έκφρασης αντιοξειδωτικών ενζύμων. Τέλος, το πιο πλούσιο πολυφαινολικά ελαιόλαδο χορηγήθηκε σε επίμυες και μετρήθηκαν βιοδείκτες της οξειδοαναγωγικής κατάστασης καθώς και τα επίπεδα έκφρασης αντιοξειδωτικών ενζύμων, ώστε να εξεταστεί η επίδραση της οξείας (σύντομο χρονικό διάστημα) κατανάλωσης ελαιολάδου σε δόση που αντιστοιχεί στην προτεινόμενη καθημερινή ποσότητα για τον άνθρωπο με βάση τις οδηγίες της EFSA, σε διάφορους ιστούς. Τα αποτελέσματα αναμένεται να βοηθήσουν στη διαλεύκανση του μοριακού μηχανισμού δράσης του ελαιολάδου μέσω του οποίου επιδρά στον



οργανισμό, με τελικό στόχο την βελτιστοποίηση της ποσότητας και της ποικιλίας που καταναλώνεται, ειδικά από ανθρώπους που πάσχουν από ασθένειες σχετιζόμενες με το οξειδωτικό στρες.

### Ερωτήματα

Τα βασικά ερωτήματα της έρευνας ήταν τα ακόλουθα:

1. Επιδρά η ποικιλία, ο τρόπος παραλαβής και η καλλιεργητική πρακτική του ελαιόδεντρου στην αντιοξειδωτική ικανότητα και το πολυφαινολικό περιεχόμενο των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων ελαιόλαδου;
2. Τα άνθη ελιάς έχουν παρόμοια δραστικότητα με το ελαιόλαδο;
3. Τι επίδραση έχουν τα εκχυλίσματα ανθέων ελιάς και ελαιόλαδου στην οξειδοαναγωγική κατάσταση σε επίπεδο κυττάρων;
4. Μέσω ποιων μοριακών μηχανισμών ασκεί το ελαιόλαδο την πιθανή αντιοξειδωτική του δράση;
5. Οι ισχυρές ιδιότητες που παρουσιάζει το ελαιόλαδο *in vitro*, εμφανίζονται και *in vivo*;

Δημοσιεύσεις που προέκυψαν από τη διδακτορική διατριβή:

1. Kouka P, Priftis A, Stagos D, et al.: Assessment of the antioxidant activity of an olive oil total polyphenolic fraction and hydroxytyrosol from a Greek *Olea europea* variety in endothelial cells and myoblasts. *Int J Mol Med* 40: 703–712, 2017.
2. Kouka P, Chatziefraimidi G-A, Raftis G, et al.: Antioxidant effects of an olive oil total polyphenolic fraction from a Greek *Olea europaea* variety in different cell cultures. *Phytomedicine* 47: 135–142, 2018.
3. Kouka Paraskevi, Tsakiri Grigoria, Tzortzi Dimitra, Dimopoulou Sofia, Sarikaki Georgia, Stathopoulos Panagiotis, Veskoukis Aristidis S., Halabalaki Maria SA-L: The Polyphenolic Composition of Extracts Derived from Different Greek Extra Virgin Olive Oils Is Correlated with Their Antioxidant Potency. *Oxid Med Cell Longev* 2019: 13, 2019.

4. Kouka P, Tekos F, Valta K, et al.: Olive tree blossom polyphenolic extracts exert antioxidant and antimutagenic activities in vitro and in various cell lines. *Oncol Rep*, 2019.
5. Aristidis Veskoukis, Efthalia Kerasioti AP, Paraskevi Kouka, Ypatios Spanidis SM and and Kouretas D: A battery of translational biomarkers for the assessment of the in vitro and in vivo antioxidant action of plant polyphenolic compounds: The biomarker issue. *Curr Opin Toxicol*, 2018.
6. Kouka P, Tekos F, Papoutsaki Z, et al. Olive oil induces both beneficial and harmful alterations on rat redox status depending on the tissue: the real life exposure scenario. *Toxicol Reports*. 2020. doi:10.1016/j.toxrep.2020.02.007

Under Review

Paraskevi Kouka, Aristidis S. Veskoukis, Demetrios Kouretas, Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention, 2E, Chapter 36: Antioxidants in olive oil phenolics: a focus on myoblasts, Elsevier S&T books

## Ευχαριστίες

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Δημήτριο Κουρέτα για την τιμή που μου έκανε να με εντάξει στην επιστημονική του ομάδα. Τον ευχαριστώ για τις γνώσεις που αποκόμισα δίπλα του καθώς και τα επιστημονικά επιτεύγματα, μαζί καταφέραμε να έχουμε σχεδόν 6 δημοσιεύσεις σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά.

Επίσης θα ήθελα να ευχαρίστησω τον κ Δημήτριο Στάγκο μέλος της τριμελούς μου επιτροπής για τη βοήθεια και τη συνεχή καθοδήγηση καθόλη τη διάρκεια φοίτησης μου.

Δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω την οικογένεια μου, που στάθηκε χορηγός όλα αυτά τα χρόνια. Καθώς και τους φίλους μου που με ενθάρρυναν σε κάθε μου βήμα.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στη νέα μου πλέον οικογένεια την Σωτηρίνα Μακρή, Αλέξανδρο Πρίφτη και Άκη Σπανίδη, για την στήριξη όλα αυτά τα χρόνια και τις στιγμές που μοιραστήκαμε. Καθώς και τους Ευθαλεία Κερασιώτη, Αριστείδη Βεσκούκη, Νίκο Γκουτζουρέλα, Αλέξανδρο Τουλουμτζίδη και Κώστα Γερασόπουλο. Επίσης, οφείλω να ευχαριστήσω τους προπτυχιακούς και μεταπτυχιακούς φοιτητών με τους οποίους συνεργάστηκα στα πλαίσια της πτυχιακής τους όλα αυτά τα χρόνια (Εριάννα Χατζηγεφρεμίδη, Γρηγόριο Ράφτη, Σοφία Δημοπούλου, Τσακίρη Γρηγορία, Καλλιόπη Βαλά, Τζώρτζη Δήμητρα, Ελένη Βάσση). Ενώ δε θα μπορούσα να παραλείψω τα νέα μέλη του εργαστηρίου, αλλά πολύ σημαντικά πλέον στη ζωή μου, Φώτη Τέκο, Αναστασία Πατούνα, Ζωή-Βασιλική Σκαπέρδα.

# Περιεχόμενα

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ: .....	3
ΕΠΤΑΜΕΛΗ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ: .....	3
Περίληψη .....	5
Abstract .....	6
Πρόλογος .....	8
Ευχαριστίες .....	11
Περιεχόμενα.....	12
Πίνακας εικόνων .....	21
Πίνακας πινάκων .....	23
Πίνακας διαγραμμάτων.....	24
Κεφάλαιο 1 – Εισαγωγή .....	27
1.1. Ελεύθερες ρίζες.....	27
Ιστορική αναδρομή .....	27
Ορισμός.....	29
Είδη ελευθέρων ριζών.....	30
Ιδιότητες κυρίων δραστικών μορφών οξυγόνου.....	32
Ρίζα σουπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot-}$ ) .....	32
Ρίζα υδροξυλίου ( $OH^{\bullet}$ ).....	33
Ρίζα περοξυλίου ( $ROO^{\bullet}$ ) .....	33
Υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) .....	33
Πηγές ελευθέρων ριζών .....	34
Μιτοχόνδρια.....	35
Περοξυσώματα .....	36
Ενδοπλασματικό δίκτυο.....	37
Άλλες πηγές .....	37

Μοριακοί στόχοι ελευθέρων ριζών.....	37
Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA).....	37
Ριβονουκλεϊνικό οξύ (RNA).....	38
Λιπίδια .....	39
Πρωτεΐνες.....	40
Φυσιολογικός ρόλος ελευθέρων ριζών .....	41
1.2. Οξειδωτικό στρες.....	43
Ιστορική αναδρομή .....	43
Ορισμός και είδη οξειδωτικού στρες.....	45
Προσαρμοστική απόκριση του οργανισμού στο οξειδωτικό στρες.....	47
Οξειδωτικό στρες και παθογένεια.....	48
1.3. Αντιοξειδωτικά .....	49
Ιστορική αναδρομή .....	49
Ορισμός.....	51
Τρόπος δράσης αντιοξειδωτικών .....	52
Ταξινόμηση των αντιοξειδωτικών .....	53
«Αντιοξειδωτικό παράδοξο» .....	56
1.4. Πολυφαινόλες/Βιοφαινόλες.....	57
Ιστορική αναδρομή .....	57
Ορισμός.....	58
Βιοσύνθεση φυτοφαινολών .....	59
Δομή και τάξεις βιοφαινολών .....	61
Προστατευτικός ρόλος βιοφαινολών .....	62
Στα φυτά .....	62
Στον άνθρωπο .....	63
Βιοδιαθεσιμότητα βιοφαινολών.....	64
Παρουσία και επίπεδα βιοφαινολών στα φυτικά προϊόντα. ....	68

Αμφιλεγόμενη δράση βιοφαινολών: «Παράδοξο» .....	69
1.5. Ελαιόλαδο .....	70
Ιστορική αναδρομή .....	70
Μυθολογία-Θρησκεία .....	73
Ορισμός.....	74
Κατηγορίες ελαιόλαδων.....	75
Χημική σύσταση ελαιόλαδου .....	75
Συνθήκες εδάφους και θερμοκρασίας ανάπτυξης ελαιόδεντρου.....	76
Ποικιλίες ελιάς.....	77
Παραλαβή ελαιόλαδου από τον καρπό .....	78
Φαινολικά συστατικά ελαιόλαδου .....	80
Φαινολικά οξέα.....	81
Φαινόλες .....	81
Λιγνάνια.....	82
Υδροξυ-χρωμάνια .....	82
Φλαβονοειδή.....	83
Σεκοϊριδοειδή.....	84
Βιοδιαθεσιμότητα φαινολικών ενώσεων ελαιόλαδου. ....	86
Γνωμοδότηση της Ευρωπαϊκής Επιτροπής Ασφάλειας Τροφίμων (EFSA) για τις βιοφαινόλες του ελαιόλαδου.....	88
Ελαιόλαδο και υγεία .....	89
Το χρηματιστήριο του ελαιολάδου .....	91
1.6. Άνθη ελιάς .....	92
Κεφάλαιο 2 .....	96
2.1 Υπόβαθρο μελέτης.....	96
2.2. Σκοπός διδακτορικής διατριβής.....	98
Κεφάλαιο 3 – Υλικά και μέθοδοι.....	99

3.1 Εισαγωγή .....	99
3.2 In vitro τεχνικές .....	101
3.2.1 Προσδιορισμός του βιοφαινολικού περιεχόμενου μέσω της μεθόδου Folin-Ciocalteu .....	101
3.2.2. Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω εξουδετέρωσης ελευθέρων ριζών .....	103
<b>3.2.2.1 Ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH•</b> .....	103
<b>3.2.2.2 Ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS<sup>•+</sup></b> .....	104
<b>3.2.2.3 Αναγωγική ισχύς</b> .....	105
<b>3.2.2.4 Εξουδετέρωση της ρίζας HO•</b> .....	106
<b>3.2.2.5 Εξουδετέρωση της ρίζας O<sub>2</sub>•-</b> .....	107
3.2.3 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής/προστατευτικής/αντιγενοτοξικής δράσης έναντι της πρόκλησης ρήξεων στο DNA από ελεύθερες ρίζες.....	108
<b>3.2.3.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA</b> .....	110
3.2.4 Αποτίμηση της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης εκχυλισμάτων μέσω της δοκιμασίας Ames .....	111
3.3 Κυτταροκαλλιέργειες.....	114
3.3.1 Κυτταρικές σειρές.....	114
<b>3.3.1.1 Ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα (EA.hy926)</b> .....	114
<b>3.3.1.2 Μυοβλάστες ποντικού (C2C12)</b> .....	115
<b>3.3.1.3 Ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας (HeLa)</b> .....	116
<b>3.3.1.4 Ανθρώπινα καρκινικά ηπατικά κύτταρα (HepG2)</b> .....	117
3.3.2 Συνθήκες καλλιέργειας .....	117
3.3.3 Προσδιορισμός των κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο XTT .....	118
3.3.5 Κυτταρομετρία ροής .....	121
3.3.6 Υπολογισμός ολικής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford .....	122
3.3.7 Υπολογισμός επιπέδων λιπιδικής υπεροξειδωσης (TBARS) .....	123
3.3.8 Υπολογισμός των επιπέδων οξειδωσης των πρωτεϊνών μέσω πρωτεϊνικών καρβονυλίων .....	124

3.3.9 Ποσοτικός προσδιορισμός έκφρασης γονιδίων με Real Time PCR.....	125
3.3.10 Αποτίμηση επιπέδων έκφρασης πρωτεϊνών με τη μέθοδο ανοσοαπώτωσης πρωτεϊνών (western blot) .....	128
3.4 In Vivo .....	129
3.4.1 Εργαστηριακά ζώα και εκχύλισμα ελαιολάδου .....	129
3.4.2 Συλλογή και προετοιμασία του αίματος και των ιστών.....	130
3.4.3 Προσδιορισμός δεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης .....	132
<b>3.4.3.1 Προσδιορισμός επιπέδων αιμοσφαιρίνης και πρωτεϊνών .....</b>	<b>132</b>
<b>3.4.3.2 Προσδιορισμός ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) .....</b>	<b>133</b>
<b>3.4.3.3 Ικανότητα διάσπασης υπεροξειδίου του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) .....</b>	<b>134</b>
<b>3.4.3.4 Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC).....</b>	<b>136</b>
<b>3.4.3.5 Προσδιορισμός πρωτεϊνικής οξείδωσης μέσω πρωτεϊνικών καρβονυλίων .....</b>	<b>138</b>
<b>3.4.3.6 Προσδιορισμός οξείδωσης λιπιδίων .....</b>	<b>139</b>
<b>3.4.3.7 Αποτίμηση επιπέδων έκφρασης γονιδίων-στόχων του Nrf2 μέσω Real-time PCR .....</b>	<b>140</b>
<b>3.4.3.8 Αποτίμηση επιπέδων έκφρασης πρωτεϊνών με Western Blot .....</b>	<b>141</b>
3.5 Στατιστική ανάλυση.....	141
Κεφάλαιο 4 – Μέρος I Αποτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας συνολικού πολυφαινολικού εκχυλίσματος ελαιολάδου ποικιλίας του Αγίου όρους (TPF) .....	141
4.1 Κύρια ευρήματα.....	141
4.2 Εισαγωγή – Σκοπός.....	142
4.2 Προέλευση και απομόνωση εκχυλίσματος.....	146
4.2.1 Εξαγωγή TPF από εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο (EVOO).....	146
4.2.2. HPLC-DAD ποιοτική και ποσοτική ανάλυση. ....	147
4.4 Αποτελέσματα.....	149
4.4.1 In Vitro τεχνικές.....	149
4.4.1.1 Αποτελέσματα Folin-Ciocalteu.....	149
4.4.1.2 Αποτελέσματα μεθόδου ρίζας DPPH .....	149
4.4.1.3 Εξουδετέρωση ρίζας ABTS* <sup>+</sup> .....	150
4.4.1.4 Ικανότητα εξουδετέρωσης ρίζας σουπεροξειδίου .....	151



4.4.1.5 Ικανότητα εξουδετέρωσης ρίζας υδροξυλίου .....	152
4.4.1.6 Αποτίμηση αναγωγικής ισχύς .....	152
4.4.1.7 Ικανότητα προστασίας του πλασμιδιακού DNA από μονόκλωνες θραύσεις προκαλλούμενες από ρίζες περοξυλίου .....	153
4.4.1.8 Δομική Ames .....	154
4.4.1.8 Στατιστική συσχέτιση in vitro δοκιμών .....	155
4.4.2 Αποτελέσματα δοκιμών σε κυτταροκαλλιέργειες .....	156
4.4.2.1 Έλεγχος κυτταροτοξικότητας.....	157
4.4.2.2 Αποτίμηση επιπέδων γλουταθειόνης (GSH) και δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) με κυτταρομετρία ροής .....	158
4.4.2.3 Εκτίμηση επιπέδων λιπιδικής υπεροξειδωσης (TBARS) .....	160
4.4.2.4 Εκτίμηση επιπέδων πρωτεϊνικής οξειδωσης (PC).....	162
4.4.2.5 Ποσοτική ανάλυση έκφρασης γονιδίων στόχων του μεταγραφικού παράγοντα NRF-2 σε πραγματικό χρόνο (Real time PCR).....	163
4.4.2.6 Αποτίμηση επιπέδων πρωτεϊνικής έκφρασης με Ανοσοαπώτωση πρωτεϊνών (Western blot).....	167
4.5 Συζήτηση - Μέρος I Αποτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας συνολικού πολυφαινολικού εκχύλισματος ελαιολάδου ποικιλίας του Αγίου όρους (TPF) ....	172
Κεφάλαιο 5 – Μέρος II Αποτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας καθαρών μορίων προερχόμενα από το ελαιόλαδο .....	185
5.1 Κύρια ευρήματα.....	185
5.2 Εισαγωγή – Σκοπός.....	186
5.3 Προέλευση και απομόνωση μορίων .....	187
5.4 Αποτελέσματα.....	189
5.4.1 Αντιοξειδωτική δράση καθαρών μορίων και κλασμάτων του ελαιολάδου .....	189
5.4.2 Αντιγενοτοξική δράση μορίων .....	192
5.4.3 Χορήγηση καθαρών μορίων σε κυτταρικές σειρές.....	194
5.4.3.1 Έλεγχος κυτταροτοξικότητας μέσω του εμπορικού κιτ ΧΤΤ. ....	194
5.4.3.2 Επίδραση των καθαρών μορίων στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό των κυτταρικών σειρών.....	195
5.5 Συζήτηση.....	202

Κεφάλαιο 6 – Μέρος III Συσχέτιση της πολυφαινολικής σύστασης και της αντιοξειδωτικής ικανότητας διαφορετικών πολυφαινολικών εκχυλισμάτων ελαιολάδου .....	205
6.1 Κύρια ευρήματα.....	205
6.2 Εισαγωγή- Σκοπός .....	205
6.3 Προέλευση και απομόνωση εκχυλισμάτων .....	210
6.4 Αποτελέσματα.....	213
6.4.1 Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων μέσω της ρίζας ABTS <sup>•+</sup> .....	213
6.4.2 Εκτίμηση αντιγετοξικής ικανότητας εκχυλισμάτων μέσω της ικανότητας προστασίας του πλασμιδιακού DNA από προκαλούμενες θραύσεις μέσω της ρίζας ROO <sup>•</sup> .....	214
6.4.3 Χορήγηση των εκχυλισμάτων ελαιολάδου στην κυτταρική σειρά HeLa. 216	
6.4.3.1 Έλεγχος κυτταροτοξικότητας με το εμπορικό κιτ ΧΤΠ.....	216
6.4.3.2 Επίδραση εκχυλισμάτων στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό των HeLa.....	216
6.4.3.3 Επίπεδα γονιδιακής έκφρασης με qPCR.....	219
6.5 Συζήτηση.....	222
Κεφάλαιο 7 – Μέρος IV Αποτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας πολυφαινολικών εκχυλισμάτων ανθέων ελιάς .....	228
7.1 Κύρια ευρήματα.....	228
7.2 Εισαγωγή- Σκοπός .....	228
7.3 Προέλευση και απομόνωση εκχυλισμάτων .....	231
7.4 Αποτελέσματα.....	232
7.4.1 HPLC ανάλυση .....	232
7.4.2 Εκτίμη αντιοξειωτικής δράσης εκχυλισμάτων .....	234
*α-δ Τιμές χωρίς κοινό γράμμα διαφέρουν σημαντικά ( $p < 0,05$ )......	235
7.4.3 Εκτίμηση αντιγενοτοξικής και αντιμεταλλαξιγόνου δραστηριότητας των εκχυλισμάτων όπως εκτιμήθηκε με τον προσδιορισμό προστασίας του πλασμιδιακού DNA και τη δοκιμή Ames.....	235

7.4.3 Χορήγηση των εκχυλισμάτων ανθέων ελιάς σε κυτταρικές σειρές .....	236
7.4.3.1 Συγκεντρώσεις όπου τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα παρουσίασαν κυτταροτοξικότητα όπως εκτιμήθηκε με τη δοκιμασία ΧΤΤ.....	236
7.4.3.2 Επίπεδα GHS και ROS σε κύτταρα EA.hy926 με κυτταρομετρία ροής.....	237
7.4.3.3 Επίπεδα GHS και ROS σε κύτταρα C2C12 .....	239
7.4.3.4 Επίπεδα GHS και ROS σε κύτταρα HeLa.....	241
7.4.3.5 Επίπεδα GHS και ROS σε κύτταρα HepG2.....	243
7.5 Συζήτηση.....	245
Κεφάλαιο 8 – Μέρος V In vivo .....	250
8.1 Κύρια ευρήματα.....	250
8.2 Εισαγωγή- Σκοπός .....	251
8.3 Προέλευση και απομόνωση εκχυλισμάτων .....	254
8.3.1 Ανάλυση βιοφαινολών ελαιολάδου .....	254
8.3.2 Ποιοτικός προσδιορισμός βιοφαινολών .....	255
Υδροξυτυροόλη .....	256
Τυροσόλη.....	256
Συριγκικό οξύ (I.S.) .....	256
Ελεασίνη .....	256
Ελευρωπαίνη.....	256
8.3.3 Ποσοτικός προσδιορισμός βιοφαινολών .....	257
Εκχύλισμα.....	257
Υδροξυτυροσόλη (mg/Kg) .....	257
Τυροσόλη (mg/Kg).....	257
Ελεασίνη .....	257
(mg/Kg).....	257
Ελεοκανθάλη .....	257
(mg/Kg).....	257
OLE_1394.....	257
2,79.....	257

10,36.....	257
316.....	257
590.....	257
8.4 Ζώα μελέτης.....	258
8.4.1 Πειραματικός σχεδιασμός.....	258
8.5 Αποτελέσματα.....	259
8.5.1 Βιοδείκτες οξειδοαναγωγής.....	259
8.5.2 Έκφραση γονιδίων (qPCR) και πρωτεϊνών (Western blot) .....	263
8.6 Συζήτηση.....	265
Κεφάλαιο 9 Σύνοψη.....	273
Βιβλιογραφία .....	278

## Πίνακας εικόνων

Εικόνα 1 Moses Gomberg (1866-1947).....	27
Εικόνα 2 Αριστερά απεικονίζεται ένα φυσιολογικό άτομο (πράσινο). Δεξιά απεικονίζεται μια ελεύθερη ρίζα (κόκκινο).....	30
Εικόνα 3 Πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών.....	35
Εικόνα 4 Ενδογενής παραγωγή ROS μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων .....	36
Εικόνα 5 Μετατροπή των λιπιδίων σε ρίζες.....	40
Εικόνα 6 Σύνοψη του σχηματισμού ελευθέρων ριζών, του οξειδωτικού στρες και της παθογένειας διαφόρων χρόνιων ασθενειών .....	43
Εικόνα 7 Χρονοδιάγραμμα σημαντικών ευρημάτων στην έρευνα του οξειδωτικού στρες.....	44
Εικόνα 8 Οξειδωτικό στρες. ....	45
Εικόνα 9 Οξειδωτικό στρες και η σχέση του με την οξειδοαναγωγική σηματοδότηση .....	47
Εικόνα 10 Οξειδωτικό στρες και ασθένειες.....	49
Εικόνα 11 Δράση αντιοξειδωτικών .....	52
Εικόνα 12 Μερικά από τα κύρια ενδογενή ενζυμικά αντιοξειδωτικά. ... Error! Bookmark not defined.	
Εικόνα 13 Δημιουργία δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) και αμυντικοί μηχανισμοί.....	55
Εικόνα 14 Προστατευτική ικανότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων .....	55
Εικόνα 15 Διάγραμμα της βιοσυνθετικής οδού των φυτοφαινολών. ....	60
Εικόνα 16 Χημικές δομές διάφορων τάξεων βιοφαινολών και οι κύριες διατροφικές πηγές τους..	62
Εικόνα 17 Πλειοτροπικά ευεργετικά αποτελέσματα για την υγεία των διαιτητικών φυτικών πολυφαινολών .....	64
Εικόνα 18 Μονοπάτι απορρόφησης βιοφαινολών .....	67
Εικόνα 19 Παράδειγμα απορρόφησης βιοφαινολών της μαύρης σοκολάτας .....	67
Εικόνα 20 Το σύμβολο Yin-Yang παρομοιάζει την ισορροπία μεταξύ των αντιοξειδωτικών και των προοξειδωτικών χαρακτηριστικών των φυτοφαινολών.....	70
Εικόνα 21 Συστήματα παραγωγής ελαιόλαδου και αποβλήτων ελαιουργείας στις διάφορες χρονολογικές εποχές. ....	72
Εικόνα 22 Καταγωγή και διάδοση της ελιάς. Διάγραμμα εξαπλώσεως της ελαιοκαλλιέργειας στις χώρες της Μεσογείου .....	73
Εικόνα 23 Η θεά Αθηνά φυτεύει την ελιά στον λόφο της Ακρόπολης.... Error! Bookmark not defined.	
Εικόνα 24 Ο Νώε στην κιβωτό και το περιστέρι με το κλαδί ελιάς. .... Error! Bookmark not defined.	
Εικόνα 25 Ελαιόλαδο και επιτραπέζιες ελιές .....	75
Εικόνα 26 Θερμικά κριτήρια ελιάς.....	77
Εικόνα 27 Οι ποικιλίες ελιάς στη Ελλάδα και στο εξωτερικό .....	78
Εικόνα 28 Μορφολογία ελιάς..... Error! Bookmark not defined.	
Εικόνα 29 Σύγχρονος τρόπος παραγωγής ελαιόλαδου .....	79
Εικόνα 30 Διάγραμμα της διαδικασίας που ακολουθείται για την εξαγωγή του ελαιόλαδου .....	79

Εικόνα 31 Χημικές δομές φαινολικών οξέων και παράγωγων αυτών. ....	81
Εικόνα 32 Χημικές δομές υδροξυτυροσόλης και τυροσόλης.....	82
Εικόνα 33 Χημικές δομές πινοζερινόλης και 1-ακετοξυπινореζινόλη. ....	82
Εικόνα 34 Βασική δομή σκελετού των φλαβονοειδών και των κατηγοριών τους.....	84
Εικόνα 35 Δομές σεκοροειδών.....	85
Εικόνα 36 Οι δομές των φαινολών που υπάρχουν στις ελιές και το ελαιόλαδο .....	86
Εικόνα 37 Ευρωπαϊκή Επιτροπή Ασφάλειας Τροφίμων.....	Error! Bookmark not defined.
Εικόνα 38 Ελαιόλαδο και υγεία .....	90
Εικόνα 39 Το άνθος της ελιάς. ....	93
Εικόνα 40 Περιεχόμενο των ανθέων σε βιοφαινόλες ανάλογα με το αναπτυξιακό στάδιο.....	94
Εικόνα 41 Τα τρία επίπεδα για την ολιστική αξιολόγηση της δράσης των φυτικών εκχυλισμάτων .....	100
Εικόνα 42 Οι προτεινόμενοι βιοδείκτες για τον χαρακτηρισμό των φυτικών ενώσεων.....	101
Εικόνα 43 Μηχανισμός αντίδρασης 2,2-διφαινυλ-1-πικρυλυδραζυλ (DPPH) με αντιοξειδωτικό παράγοντα .....	104
Εικόνα 44 Μηχανισμός αντίδρασης της ρίζας 2,2'-αζινοδισ-(3-αιθυλο-βενζοθειαζολίνη-σουλφονικό οξύ (ABTS•+) με αντιοξειδωτικό παράγοντα. ....	105
Εικόνα 45 Αρχή μεθόδου αναγωγικής ισχύς.....	106
Εικόνα 46 Μορφές υπερελίκωσης του πλασμιδιακού DNA.....	108
Εικόνα 47 Μηχανισμός δράσης του tBOOH .....	112
Εικόνα 48 Ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα (EA.hy926).....	Error! Bookmark not defined.
Εικόνα 49 Μυοβλάστες ποντικού (C2C12) υπό μικροσκόπιο φωτός, μεγέθυνση 10x	Error! Bookmark not defined.
Εικόνα 50 Εικόνα πολλαπλού φθορισμού κυττάρων HeLa .....	Error! Bookmark not defined.
Εικόνα 51 Ανθρώπινα καρκινικά ηπατικά κύτταρα (HepG2). .....	Error! Bookmark not defined.
Εικόνα 52 Μετατροπή του ΧΤΤ στην αντίστοιχη φορμαζάνη.....	118
Εικόνα 53 Αντικειμενοφόρος πλάκα Neubauer. ....	119
Εικόνα 54 Πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης. ....	122
Εικόνα 55 Εικόνα από το πήκτωμα αγαρόζης.....	154
Εικόνα 56 Πιθανός μηχανισμός δράσης των πολυφαινολών του TPF, μέσω μονοπατιού Keap1-Nrf2 .....	180
Εικόνα 57 Διαγραμματική απεικόνιση της διαδικασίας εκχύλισης.....	211

## Πίνακας πινάκων

Πίνακας 1 Κυριότερες ROS/RNS, οι οποίες παράγονται κατά τον κυτταρικό μεταβολισμό.....	31
Πίνακας 2 Σημαντικές φυσιολογικές λειτουργίες ελευθέρων ριζών.....	42
Πίνακας 3 Τα διαφορετικά είδη του οξειδωτικού στρες.....	46
Πίνακας 4 Πηγές θρεπτικών αντιοξειδωτικών ουσιών.....	54
Πίνακας 5 Κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν τη βιοδιαθεσιμότητα των διαιτητικών βιοφαινολών στους ανθρώπους.....	65
Πίνακας 6 Αλληλουχίες εκκινητών για C2C12.....	127
Πίνακας 7 Αλληλουχίες εκκινητών για HeLa, HepG2, EA.hy926.....	128
Πίνακας 8 Αλληλουχίες εκκινητών.....	140
Πίνακας 9 Συσχετίσεις κατά Pearson in vitro δοκιμών.....	156
Πίνακας 10 Τα καθαρά μόρια και κλάσματα μορίων.....	188
Πίνακας 11 Στατιστικές συγκρίσεις μεταξύ των IC50 των μορίων για τη μέθοδο DPPH.....	190
Πίνακας 12 Στατιστικές συγκρίσεις μεταξύ των IC50 των μορίων για τη μέθοδο ABTS•+.....	191
Πίνακας 13 Στατιστικές συγκρίσεις μεταξύ των IC50 των μορίων για τη μέθοδο ετίμησης της αντιγεντοξικής δράσης των μορίων.....	193
Πίνακας 14 Έλεγχος κυτταροτοξικότητας των καθαρών μορίων στις κυτταρικές σειρές C2C12, EA.hy926, HepG2, HeLa, έπειτα από 24h επώασης.....	194
Πίνακας 15 Συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο Ελληνικών παρθένων ελαιολάδων.....	206
Πίνακας 16 Σύσταση και προέλευση πολυφαινολικών εκχυλισμάτων λαδιού.....	212
Πίνακας 17 Συγκεντρώσεις (mg/ g ελαιολάδου) των βιοφαινολών: υδροξυτυροσόλη (HT), τυροσόλη (T) και τα παράγωγά τους (δεσμευμένες μορφές).....	212
Πίνακας 18 Οι τιμές IC50 των εκχυλισμάτων ελαιολάδου όπως υπολογίσθηκαν για τη μέθοδο ABTS•+.....	214
Πίνακας 19 Οι τιμές IC50 των εκχυλισμάτων ελαιολάδου όπως υπολογίσθηκαν με τη δοκιμασία προστασίας του πλασμιδιακού DNA.....	216
Πίνακας 20 Οι τιμές IC50 των εκχυλισμάτων στις δοκιμασίες DPPH• και ABTS•+ και το συνολικό πολυφαινολικό τους περιεχόμενο.....	235
Πίνακας 21 Αντιγεντοξική και αντιμεταλλαξιγόνος δραστικότητα των εξετασθέντων εκχυλισμάτων.....	236
Πίνακας 22 Στον πίνακα παρουσιάζεται η συγκέντρωση στην οποία εμφανίστηκε κυτταροτοξικότητα.....	237
Πίνακας 23 Ενώσεις αναφοράς. Ο χρόνος κατακράτησης (RT, min) και το μήκος κύματος (UV, nm) της μέγιστης απορρόφησης κάθε αναλυόμενης ουσίας.....	256
Πίνακας 24 Ποσοτικός προσδιορισμός των φαινολικών συστατικών.....	257
Πίνακας 25 Ποσοτικός προσδιορισμός των κυριότερων βιοφαινολών.....	257

## Πίνακας διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1 Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος .....	102
Διάγραμμα 2 Ικανότητα TPF να εξουδετερώνει την τεχνητή ρίζα DPPH. ....	150
Διάγραμμα 3 Ικανότητα TPF να εξουδετερώνει την τεχνητή ρίζα ABTS*+ . ....	151
Διάγραμμα 4 Ικανότητα TPF να εξουδετερώνει την ρίζα σουπεροξειδίου. ....	151
Διάγραμμα 5 Αναγωγική ισχύς TPF. ....	153
Διάγραμμα 6 Ικανότητα TPF να προστατεύει το πλασμιδιακό DNA από μονόκλωνες θραύσεις προκαλούμενες από ρίζες περοξυλίου (n=3). ....	154
Διάγραμμα 7 Δοκιμή Ames, TPF .....	155
Διάγραμμα 8 Προσδιορισμός κυτταροτοξικότητας TPF, στις κυτταρικές σειρές A) C2C12, B) EA.hy926, Γ) HeLa, Δ) HepG2.....	157
Διάγραμμα 9 Επίδραση TPF, στα επίπεδα GSH, στις κυτταρικές σειρές A) C2C12, B) EA.hy926, Γ) HeLa, Δ) HepG2.....	159
Διάγραμμα 10 Επίδραση TPF, στα ενδογενή επίπεδα ROS, στις κυτταρικές σειρές A) C2C12, B) EA.hy926, Γ) HeLa, Δ) HepG2.....	160
Διάγραμμα 11 Επίδραση TPF, στα επίπεδα λιπιδικής υπεροξειδωσής (TBARS), στις κυτταρικές σειρές A) C2C12, B) EA.hy926, Γ) HeLa, Δ) HepG2.....	161
Διάγραμμα 12 Επίδραση TPF, στα επίπεδα πρωτεϊνικής οξειδωσής (PC), στις κυτταρικές σειρές A) C2C12, B) EA.hy926, Γ) HeLa, Δ) HepG2.....	163
Διάγραμμα 13 Επίδραση TPF (7,5 µg/ml) στα επίπεδα έκφρασης γονιδίων-στόχων του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 στα C2C12 .....	164
Διάγραμμα 14 Επίδραση TPF (7,5 µg/ml) στα επίπεδα έκφρασης γονιδίων-στόχων του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 στα EA.hy926 .....	165
Διάγραμμα 15 Επίδραση TPF (10 µg/ml) στα επίπεδα έκφρασης γονιδίων-στόχων του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 στα HeLa .....	166
Διάγραμμα 16 Επίδραση TPF (1 µg/ml) στα επίπεδα έκφρασης γονιδίων-στόχων του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 στα HepG2 .....	167
Διάγραμμα 17 Επίδραση TPF στα πρωτεϊνικά επίπεδα της γ-GCLc, στην κυτταρική σειρά C2C12 .	168
Διάγραμμα 18 Επίδραση TPF στα πρωτεϊνικά επίπεδα της γ-GCLc, στην κυτταρική σειρά EA.hy926 .....	169
Διάγραμμα 19 Επίδραση TPF στα πρωτεϊνικά επίπεδα της γ-GCLc, στην κυτταρική σειρά HeLa, .	170
Διάγραμμα 20 Επίδραση TPF στα πρωτεϊνικά επίπεδα της γ-GCLc, στην κυτταρική σειρά HepG2.	171
Διάγραμμα 21 Ικανότητα εξουδετέρωσης της τεχνητής ρίζας DPPH.....	190
Διάγραμμα 22 Ικανότητα εξουδετέρωσης της τεχνητής ρίζας ABTS*+ .....	191
Διάγραμμα 23 Διάγραμμα συσχέτισης των δύο μεθόδων αποτίμησης της αντιοξειδωτικής δράσης των μορίων, DPPH και ABTS*+.....	192



Διάγραμμα 24 Εκτίμηση της αντιξειωτικής ικανότητας των μορίων μέσω της ικανότητας τους να προστατεύουν τον πλασμιδιακό DNA από προκαλούμενες θραύσεις της ρίζας ROO• .....	193
Διάγραμμα 25 Επίδραση καθαρών μορίων, στα επίπεδα GSH, στην κυτταρική σειρά C2C12 .....	196
Διάγραμμα 26 Επίδραση καθαρών μορίων, στα ενδογενή επίπεδα ROS, στην κυτταρική σειρά C2C12.....	197
Διάγραμμα 27 Επίδραση καθαρών μορίων, στα επίπεδα GSH, στην κυτταρική σειρά EA.hy926 A) .....	198
Διάγραμμα 28 Επίδραση καθαρών μορίων, στα ενδογενή επίπεδα ROS, στην κυτταρική σειρά EA.hy926.....	198
Διάγραμμα 29 Επίδραση καθαρών μορίων, στα επίπεδα GSH, στην κυτταρική σειρά HepG2 .....	199
Διάγραμμα 30 Επίδραση καθαρών μορίων, στα ενδογενή επίπεδα ROS, στην κυτταρική σειρά HepG2.....	200
Διάγραμμα 31 Επίδραση καθαρών μορίων, στα επίπεδα GSH, στην κυτταρική σειρά HeLa .....	201
Διάγραμμα 32 Επίδραση καθαρών μορίων, στα ενδογενή επίπεδα ROS, στην κυτταρική σειρά HeLa .....	202
Διάγραμμα 33 Αντιοξειδωτική ικανότητα εκχυλισμάτων ελαιολάδου .....	214
Διάγραμμα 34 Η αντιξειωτική ικανότητα των εξετασθέντων εκχυλισμάτων ελαιολάδου .....	215
Διάγραμμα 35 Τα επίπεδα GSH κυττάρων HeLa .....	217
Διάγραμμα 36 Τα επίπεδα ROS κυττάρων HeLa .....	218
Διάγραμμα 37 Επίδραση των εκχυλισμάτων ελαιολάδου στην ποσοτική έκφραση γονιδίων στόχου του μεγραφικού παράγοντα Nrf2 σε κύτταρα HeLa .....	222
Διάγραμμα 38 Χρωματογραφήματα HPLC των υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων ανθέων ελιάς .....	233
Διάγραμμα 39 Σχετική ανάλυση ποσοτικοποίησης των κυριότερων συστατικών των εκχυλισμάτων ανθέων ελιάς με χρήση HPLC στα 254 nm. ....	233
Διάγραμμα 40 Επίδραση εκχυλισμάτων ανθέων ελιάς, στα επίπεδα GSH, στην κυτταρική σειρά EA.hy926.....	238
Διάγραμμα 41 Επίδραση εκχυλισμάτων ανθέων ελιάς, στα επίπεδα ROS, στην κυτταρική σειρά EA.hy926.....	239
Διάγραμμα 42 Επίδραση εκχυλισμάτων ανθέων ελιάς, στα επίπεδα GSH, στην κυτταρική σειρά C2C12.....	240
Διάγραμμα 43 Επίδραση εκχυλισμάτων ανθέων ελιάς, στα επίπεδα ROS, στην κυτταρική σειρά C2C12.....	241
Διάγραμμα 44 Επίδραση εκχυλισμάτων ανθέων ελιάς, στα επίπεδα GSH, στην κυτταρική σειρά HeLa.....	242
Διάγραμμα 45 Επίδραση εκχυλισμάτων ανθέων ελιάς, στα επίπεδα ROS, στην κυτταρική σειρά HeLa.....	243
Διάγραμμα 46 Επίδραση εκχυλισμάτων ανθέων ελιάς, στα επίπεδα GSH, στην κυτταρική σειρά HepG2.....	244

Διάγραμμα 47 Επίδραση εκχυλισμάτων ανθέων ελιάς, στα επίπεδα ROS, στην κυτταρική σειρά HepG2.....	245
Διάγραμμα 48 Το χρωματογράφημα RP-HPLC-DAD του δείγματος OLE_1394 ελαιολάδου .....	255
Διάγραμμα 49 RP-HPLC-DAD χρωματογραφήματος του αναλυθέντος δείγματος OLE_1394 .....	256
Διάγραμμα 50 Τα αποτελέσματα χορήγησης ελαιολάδου στους βιοδείκτες οξειδοαναγωγής του αίματος. (Α) GSH σε RBCL, (Β) Καταλάση σε RBCL. (C) TAC στο πλάσμα, (Δ) TBARS στο πλάσμα, (Ε) CARB στο πλάσμα. ....	260
Διάγραμμα 51 Επίδραση της χορήγησης ελαιολάδου στα επίπεδα GSH (ανηγμένη γλουταθειόνη) των ιστών αρουραίου.....	261
Διάγραμμα 52 Επίδραση της χορήγησης ελαιολάδου στα επίπεδα διάσπασης του H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> των ιστών αρουραίου.....	261
Διάγραμμα 53 Επίδραση της χορήγησης ελαιολάδου στα επίπεδα ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας των ιστών αρουραίου. ....	262
Διάγραμμα 54 Επίδραση της χορήγησης ελαιολάδου στα επίπεδα λιπιδικής υπεροξείωσης των ιστών αρουραίου.....	262
Διάγραμμα 55 Επίδραση της χορήγησης ελαιολάδου στα επίπεδα πρωτεϊνικής οξείδωσης των ιστών αρουραίου.....	263
Διάγραμμα 56 Τα αποτελέσματα της χορήγησης ελαιολάδου στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που σχετίζονται με τους ενδογενείς αντιοξειδωτικούς αμυντικούς μηχανισμούς σε επιλεγμένους ιστούς αρουραίων Α) Εγκεφάλου, Β) Πάγκρεας, Γ) Σπλήνα. ....	264
Διάγραμμα 57 Επίδραση της χορήγησης ελαιολάδου στα επίπεδα πρωτεϊνών των αντιοξειδωτικών ενζύμων σε επιλεγμένους ιστούς αρουραίων Α) Εγκεφάλου, Β) Πάγκρεας, Γ) Σπλήνα .....	265

# Κεφάλαιο 1 – Εισαγωγή

## 1.1. Ελεύθερες ρίζες

### Ιστορική αναδρομή

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον σχετικά με το ρόλο των ελεύθερων ριζών στη βιολογία των οργανισμών, εξαιτίας του βασικού ρόλου που κατέχουν τόσο σε διάφορες φυσιολογικές διαδικασίες, καθώς και τη συμμετοχή τους σε ένα ευρύ φάσμα ασθενειών. Ο Λουί-Μπερνάρ Γκυτόν ντε Μορβώ (Louis-Bernard Guyton de Morveau) καθιέρωσε τη φράση «ρίζα» (radical) το 1785, η οποία υιοθετήθηκε από τον Αντουάν Λωράν Λαβουαζιέ (Antoine Lavoisier) το 1789 στο έργο του *Traité Élémentaire de Chimie* (ελλ. μτφ.: «Στοιχειώδης πραγματεία της Χημείας»). Η ρίζα ταυτοποιούνταν ως βασική ρίζα συγκεκριμένων οξέων (η αγγλόφωνη λέξη radical είναι λατινογενής, και κατάγεται από τη λατινική λέξη radix, που στα ελληνικά σημαίνει «ρίζα», αντίστοιχος Ελληνικός όρος). Ιστορικά, ο όρος «ρίζα», στη θεωρία ριζών χρησιμοποιούνταν για διάφορα τμήματα μορίων (ή πολυατομικών ιόντων), κυρίως όταν αυτό διατηρούταν αναλλοίωτο στη διάρκεια χημικών αντιδράσεων. Αυτά τα τμήματα σήμερα καλούνται «λειτουργικές ομάδες» (functional groups, στην ελλ. βιβλιογραφία αποδίδονται και με τον όρο «χαρακτηριστικές ομάδες»). (1).



**Εικόνα 1** Moses G (1866-1947). Πηγή [https://el.wikipedia.org/wiki/Χημική\\_ρίζα](https://el.wikipedia.org/wiki/Χημική_ρίζα)

Πρώτη φορά το 1900, ο Μόουζες Γκόμπεργκ (Moses Gomberg) (Error! Not a valid bookmark self-reference.) , καθηγητής Χημείας του Πανεπιστημίου του Μίσιγκαν των Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής (ΗΠΑ), εξέφρασε την εικασία του σχετικά με την ύπαρξη μιας οργανικής ελεύθερης ρίζας, του τριφαινυλομεθυλίου ( $\text{Ph}_3\text{C} \cdot$ ) σε ζωντανό σύστημα (2).

Αργότερα το 1954, Η Ρεμπέκα Γκέρσμαν (Rebeca Gerschman) πρότεινε τη θεωρία «των ελεύθερων ριζών και της τοξικότητας του οξυγόνου», σύμφωνα με την οποία η τοξικότητα του οξυγόνου οφείλεται στην ικανότητα του να συμμετέχει στο σχηματισμό ελεύθερων ριζών (3). Την ίδια χρονιά, ο Μπάρι Κομονέρ (Barry Commoner) με μελέτες ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού (EPR) επιβεβαίωσε την ύπαρξη

ελευθέρων ριζών σε βιολογικά υλικά (4). Το 1956, ο Ντενχάμ Χάρμαν (Denham Harman), πρότεινε τη θεωρία των «ελεύθερων ριζών» βάση της οποίας «οι ελεύθερες ρίζες διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στη διαδικασία της γήρανσης» (1).

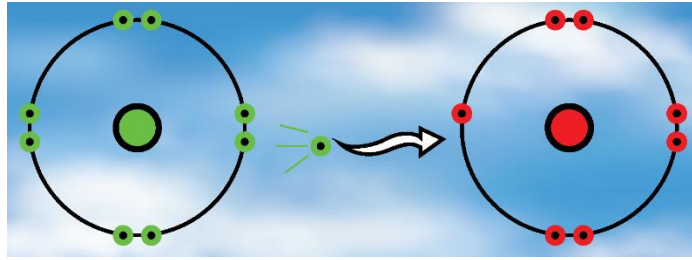
Μια δεύτερη εποχή έρευνας σχετικά με το ρόλο των ελευθέρων ριζών ξεκίνησε το 1969 από τους Μακόρντ (J M McCord) και Φρίντοβιτς (I Fridovich), οι οποίοι ανακάλυψαν την σουπεροξειδική δισμουτάση (Superoxide dismutase, SOD), το πρώτο ενζυμικό αμυντικό σύστημα έναντι των ανιόντων σουπεροξειδίου (5). Για πρώτη φορά το 1971, ο Λοσέν (G Loschen) έδειξε ότι οι δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive oxygen species, ROS) δημιουργούνται κατά την κυτταρική αναπνοή (6), μια θεωρία η οποία υποστηρίχτηκε επίσης και από τους Νόλ (H Nohl) και Χέγνερ (D Hegner) (1978) (7). Το 1977, οι Μιτάλ (CK Mittal) και Μουράντ (F Murad) ανέφεραν ότι η ρίζα υδροξυλίου, (OH<sup>·</sup>) επάγει το σχηματισμό του δεύτερου αγγελιοφόρου μορίου, της κυκλικής μονοφωσφορικής γουανοσίνης (cGMP) ενεργοποιώντας το ένζυμο γουανυλική κυκλάση (8). Αργότερα το 1989, Οι Χάλλιγουελ (B Halliwell) και Γκούτερριτζ (JMC Gutteridge) ανέφεραν ότι τα ROS περιλαμβάνουν τόσο ελεύθερες ρίζες όσο και μη ριζικά παράγωγα οξυγόνου (9). Έκτοτε υπάρχει πληθώρα δεδομένων που τεκμηριώνουν το ρόλο των ελεύθερων ριζών σε διάφορες παθοφυσιολογικές συνθήκες.

Συνοπτικά, μπορούμε να διακρίνουμε τρεις διαφορετικές περιόδους έρευνας σχετικά με τις ελεύθερες ρίζες. Την πρώτη, όπου ο Χάρμαν (David Harman, 1956), χαρακτήρισε τις ελεύθερες ρίζες σαν το “κουτί της Πανδώρας, πηγή όλων των κακών”, όντας υπεύθυνες για διάφορες κυτταρικές βλάβες, την καρκινογέννηση και διάφορες εκφυλιστικές διαδικασίες όπως η γήρανση. Έπειτα, κατά την δεύτερη εποχή, οι McCord και Fridovich, μετά την ανακάλυψη της SOD, έπεισαν αρκετούς συνεργάτες τους για τον απαραίτητο ρόλο των ελευθέρων ριζών στη φυσιολογία του κυττάρου. Κατά την τρίτη περίοδο ερευνών, έχουν έρθει αρκετά ερευνητικά δεδομένα στο φως τα οποία αποδεικνύουν ότι οι ελεύθερες ρίζες έχουν και θετικές/απαραίτητες επιδράσεις στους οργανισμούς, με κύριους πρεσβευτές τους Mittal και Murard. Τέλος, από τις αρχές του 21ου αιώνα, υπάρχει ένα μεγάλο σύνολο αποδεικτικών στοιχείων που δείχνουν ότι οι ζώντες οργανισμοί όχι μόνο έχουν προσαρμοστεί στη συνύπαρξη με τις ελεύθερες ρίζες αλλά στην πραγματικότητα έχουν αναπτύξει μηχανισμούς για την πλεονεκτική χρήση των ελεύθερων ριζών. Σημαντικές φυσιολογικές λειτουργίες που περιλαμβάνουν ελεύθερες ρίζες ή τα παράγωγά τους είναι η ρύθμιση του

αγγειακού τόνου, η ανίχνευση τάσης οξυγόνου και η ρύθμιση λειτουργιών που ελέγχονται με βάση τη συγκέντρωση του οξυγόνου, η ενίσχυση της μεταγωγής σήματος από διάφορους μεμβρανικούς υποδοχείς, συμπεριλαμβανομένου του υποδοχέα αντιγόνου των λεμφοκυττάρων και κυτταρικές αποκρίσεις στο οξειδωτικού στρες που εξασφαλίζουν τη διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης (10).

## Ορισμός

Ιστορικά, η έννοια χημική ρίζα (αγγλικά chemical radical) περιέγραφε ομάδες ατόμων που δεν υπόκεινται σε μεταβολή στη διάρκεια μιας χημικής αντίδρασης. Στη σύγχρονη Χημεία, ο όρος ελεύθερη (χημική) ρίζα (αγγλικά free (chemical) radical) είναι ένα άτομο, ένα μόριο ή ένα ιόν στα οποία κάποιο εξωτερικό τροχιακό δεν καταλαμβάνεται από ζεύγος ηλεκτρονίων, αλλά από ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο (μονήρες ηλεκτρόνιο) με ικανότητα για ανεξάρτητη ύπαρξη, γι' αυτό μπορεί να θεωρηθεί ότι έχει έναν ή περισσότερους εν δυνάμει ομοιοπολικούς δεσμούς (**Εικόνα 2**). Συνεπώς, ο περιττός αριθμός ηλεκτρονίων κάνει μια ελεύθερη ρίζα ασταθή, βραχύβια και ιδιαίτερα αντιδραστική. Με κάποιες αποκλείσεις, αυτοί οι δυνάμει δεσμοί κάνουν τις ελεύθερες ρίζες εξαιρετικά δραστικές χημικά έναντι άλλων (πιο συμβατικών) χημικών ουσιών ή ακόμη και άλλων ελευθέρων ριζών, ακόμη και του ίδιου είδους. Λόγω της υψηλής αντιδραστικότητας, μπορούν να αφαιρέσουν ηλεκτρόνια από γειτονικά μόρια προκειμένου να επιτευχθεί σταθερότητα. Έτσι το επιτιθέμενο μόριο χάνει το ηλεκτρόνιό του και γίνεται το ίδια ελεύθερη ρίζα, ξεκινώντας μια αλυσιδωτή αντίδραση, που τελικά βλάπτει το κύτταρο. Οι ελεύθερες ρίζες πολύ συχνά διμερίζονται (ή πολυμερίζονται) πολύ γρήγορα, αν δύο (ή περισσότερες) έλθουν σε επαφή μεταξύ τους. Οι πιο πολλές ελεύθερες ρίζες είναι σταθερές μόνο σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις σε αδρανή μέσα (συνήθως ευγενή αέρια) ή σε κενό (11,12).



**Εικόνα 2** Αριστερά απεικονίζεται ένα φυσιολογικό άτομο (πράσινο). Δεξιά απεικονίζεται μια ελεύθερη ρίζα (κόκκινο). Πηγή εικόνας: <http://www.konstantinioncenter.org/?p=2998>

### Είδη ελευθέρων ριζών

Οι πιο σημαντικές ελεύθερες ρίζες είναι μοριακά είδη με κέντρο το οξυγόνο (ROS), το άζωτο (RNS), το θείο (RSS) και τον άνθρακα (RCS) (13). Ωστόσο, τόσο οι ROS όσο και οι RNS συνιστούν την πλειοψηφία των ελευθέρων ριζών (14). Ο ρόλος των ROS / RNS είναι διττός, καθώς εμφανίζουν τόσο ωφέλιμη όσο και τοξική δράση στα ζωντανά συστήματα. Πιο συγκεκριμένα, σε μέτρια ή χαμηλά επίπεδα παρέχουν ευεργετικά αποτελέσματα, καθώς συμμετέχουν σε πληθώρα φυσιολογικών λειτουργιών όπως στην ανοσολογική απόκριση (δηλαδή την άμυνα κατά των παθογόνων μικροοργανισμών), σε διάφορα κυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια, σε μιτωτικές διαδικασίες αλλά και στην ρύθμιση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του κυττάρου (15,16). Ωστόσο, σε υψηλότερη συγκέντρωση, τόσο οι ROS όσο και οι RNS συνεργούν στην εμφάνιση του οξειδωτικού στρες (ο όρος θα αναλυθεί εκτενέστερα σε επόμενο υποκεφάλαιο), προκαλώντας βλάβες στα βιομόρια του κυττάρου (1). Στον **Πίνακα 1**, παρουσιάζονται οι κυριότερες ROS/RNS, οι οποίες παράγονται κατά τον κυτταρικό μεταβολισμό.

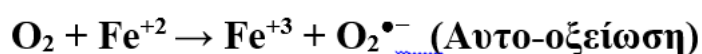
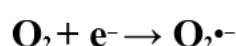
**Πίνακας 1 Κυριότερες ROS/RNS, οι οποίες παράγονται κατά τον κυτταρικό μεταβολισμό. Ο χρόνος ημιζωής ορισμένων ριζών εξαρτάται από το περιβάλλον. ROS: Δραστικές μορφές οξυγόνου, RNS: Δραστικές μορφές αζώτου (1,17).**

Ελεύθερη ρίζα	Σύμβολο	Χρόνος ημιζωής
Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS)		
Ρίζες		
Ανιόν Σουπεροξειδίου	$O_2^{\cdot-}$	$10^{-6}$ δευτερόλεπτα
Ρίζα Υδροξυλίου	$OH^{\cdot}$	$10^{-10}$ δευτερόλεπτα
Ρίζα Αλκοξειδίου	$RO^{\cdot}$	$10^{-6}$ δευτερόλεπτα
Ρίζα Περοξυλίου	$ROO^{\cdot}$	17 δευτερόλεπτα
Μη ρίζες		
Υπεροξειδίο Υδρογόνου	$H_2O_2$	Σταθερό
Μονήρες Οξυγόνο	$^1O_2$	$10^{-6}$ δευτερόλεπτα
Όζον	$O_3$	Δευτερόλεπτα
Οργανικό περοξειδίο	$ROOH$	Σταθερό
Υποχλωριώδες Οξύ	$HOCl$	Σταθερό (λεπτά)
Υποβρωμιώδες Οξύ	$HOBr$	Σταθερό (λεπτά)
Δραστικές μορφές Αζώτου (RNS)		
Ρίζες		
Οξειδίο του αζώτου	$NO^{\cdot}$	Ανάλογα με το περιβάλλον
Διοξειδίο του αζώτου	$NO_2^{\cdot}$	Δευτερόλεπτα
Μη ρίζες		
Περοξυνιτρίτης	$ONOO^{\cdot}$	$10^{-3}$ Δευτερόλεπτα
Κατιόν Νιτροζυλίου	$NO^+$	Δευτερόλεπτα
Ανιόν Νιτροζυλίου	$NO^{\cdot}$	Δευτερόλεπτα
Τριοξειδίο του Δινατρίου	$N_2O_3$	Δευτερόλεπτα
Τετραοξειδίο του Δινατρίου	$N_2O_4$	Δευτερόλεπτα
Νιτρώδες οξύ	$HNO_2$	Δευτερόλεπτα
Περοξυνιτρικό οξύ	$ONOOH$	Σταθερό
Χλωρίδιο του Νιτριλίου	$NO_2Cl$	Δευτερόλεπτα

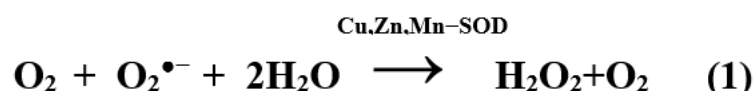
Ιδιότητες κυρίων δραστικών μορφών οξυγόνου

Ρίζα σουπεροξειδίου ( $O_2^{\bullet-}$ )

Η ρίζα σουπεροξειδίου ( $O_2^{\bullet-}$ ) είναι από της σημαντικότερες μορφές ROS, σχηματίζεται τόσο από ενζυμικές αντιδράσεις αυτοοξειδωσης, όσο και από μη ενζυμικές αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων, στις οποίες μεταφέρεται ένα ηλεκτρόνιο στο μοριακό οξυγόνο (18). Παράγεται κυρίως εντός των μιτοχονδρίων και η ικανότητα να αλληλοεπιδρά με τα βιομόρια είναι χαμηλή. Τα ένζυμα που συμμετέχουν στην παραγωγή σουπεροξειδίου είναι η οξειδάση της ξανθίνης (19), η λιποοξυγενάση (20), η κυκλοοξυγενάση (21) και η NADPH οξειδάση (22). Μπορεί να υφίσταται σε δύο μορφές, την ανιονική μορφή ( $O_2^{\bullet-}$ ) ή την υδροπεροξυλική ρίζα ( $HO_2$ ) σε χαμηλό pH (23). Η υδροπεροξυλική ρίζα μπορεί πιο εύκολα να διαπεράσει τη διπλοστιβάδα φωσφολιπιδίων συγκριτικά με την φορτισμένη μορφή του ανιόντος. Ωστόσο, υπό φυσιολογικό pH, επικρατέστερη μορφή είναι του σουπεροξειδικού ανιόντος, το οποίο δρα ως αναγωγικός παράγοντας και ανάγει τα σύμπλοκα σιδήρου όπως το κυτόχρωμα c και το σίδηρο-αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ ( $Fe^{+2}$ -EDTA), όπου ο  $Fe^{+3}$  ανάγεται σε  $Fe^{+2}$ . Μπορεί επίσης να δρα ως οξειδωτικός παράγοντας οξειδώνοντας το ασκορβικό οξύ και την τοκοφερόλη.



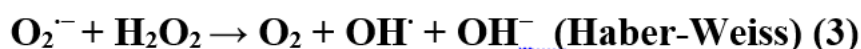
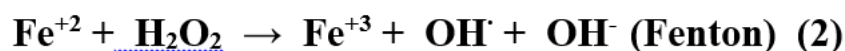
Η ρίζα σουπεροξειδίου αντιδρά με μια άλλη ρίζα σουπεροξειδίου (Εξίσωση 1), στην οποία η μια ρίζα οξειδώνεται σε οξυγόνο ενώ η άλλη ανάγεται σε υπεροξείδιο του υδρογόνου.





## Ρίζα υδροξυλίου (OH•)

Η ρίζα υδροξυλίου είναι η ουδέτερη μορφή του ιόντος υδροξειδίου και είναι μια εξαιρετικά δραστική ελεύθερη ρίζα (24). Μπορεί να αντιδρά ισχυρά τόσο με οργανικά όσο και με ανόργανα μόρια, όπως το DNA, τις πρωτεΐνες, τα λιπίδια και τους υδατάνθρακες και προκαλεί σοβαρές βλάβες στα κύτταρα περισσότερο από οποιαδήποτε ROS (25). Δημιουργείται μέσω αντιδράσεων Fenton (εξίσωση 2), όπου το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> αντιδρά με μεταλλικά ιόντα (Fe<sup>+2</sup>, Cu<sup>+</sup>), συχνά δεσμευμένο σε σύμπλοκα με διάφορες πρωτεΐνες όπως η φερριτίνη (μια ενδοκυτταρική πρωτεΐνη που αποθηκεύει σίδηρο) και σερουλοπλασμίνη (πρωτεΐνη που φέρει χαλκό) ή άλλα μόρια. Υπό συνθήκες στρες, η υπέρμετρη απελευθέρωση O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, ελευθερώνει σίδηρο από τη φερριτίνη όπου συμμετέχει στην αντίδραση Fenton για να σχηματίσει OH• (26). Επίσης, η ρίζα υδροξυλίου σχηματίζεται και από την αντίδραση Haber-Weiss, η οποία γίνεται μεταξύ ριζών σουπεροξειδίου και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (εξίσωση 3) (27).



## Ρίζα περοξυλίου (ROO•)

Προέρχεται από το οξυγόνο στα ζωντανά συστήματα. Η απλούστερη μορφή ρίζας περοξυλίου είναι η ρίζα σουπεροξυλίου (HOO•) η οποία σχηματίζεται από την πρωτονίωση του σουπεροξειδίου (28). Περίπου το 0,3% του συνολικού O<sub>2</sub><sup>•-</sup> στο κυτοσόλιο ενός τυπικού κυττάρου είναι στην πρωτονιωμένη μορφή. Αρχίζει την υπεροξειδωση λιπαρών οξέων και μπορεί επίσης να προωθήσει την ανάπτυξη όγκων (29).

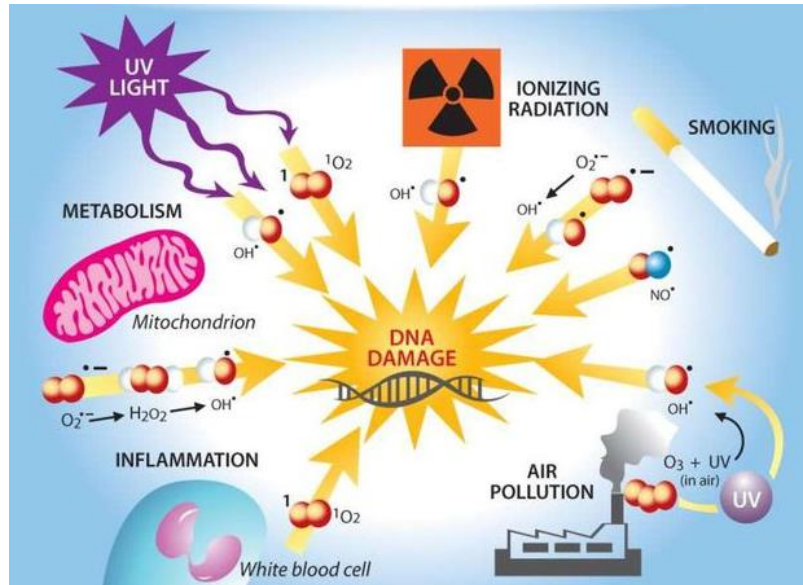
## Υπεροξείδιο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου σχηματίζεται in vivo από το ένζυμο σουπεροξειδική δισμουτάση (SOD) (Εξίσωση 1). Δεν είναι ελεύθερη ρίζα αλλά μπορεί

να προκαλέσει αλλοιώσεις στο κύτταρο σε σχετικά χαμηλή συγκέντρωση (10  $\mu\text{M}$ ). Μπορεί εύκολα να διεισδύσει στις βιολογικές μεμβράνες. Το  $\text{H}_2\text{O}_2$  δεν έχει άμεση επίδραση στο DNA αλλά μπορεί να το βλάψει παράγοντας ρίζα υδροξυλίου ( $\text{OH}^\bullet$ ) παρουσία ιόντων μετάλλων (30). Τα βασικά αντιοξειδωτικά ένζυμα που έχουν την ικανότητα να εξαλείψουν το  $\text{H}_2\text{O}_2$  είναι η καταλάση, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και οι περοξειρεδοξοζίνες.

### Πηγές ελεύθερων ριζών

Τα ROS μπορούν να παραχθούν από ενδογενείς ή εξωγενείς πηγές (Εικόνα 3). Οι ενδογενείς πηγές ROS περιλαμβάνουν διάφορα κυτταρικά όργανα όπως μιτοχόνδρια, υπεροξυσώματα και ενδοπλασματικό δίκτυο, όπου η κατανάλωση οξυγόνου είναι υψηλή. Οι εξωγενείς πηγές περιλαμβάνουν την ρύπανση αέρα και νερού, την υπεριώδη ακτινοβολία, την κατανάλωση αλκοόλ, διάφορους τρόπους μαγειρέματος (καπνιστό κρέας, επαναχρησιμοποιημένο λάδι, λίπος, ψήσιμο σε κάρβουνα), διάφορα φάρμακα (πχ παρακεταμόλη, μπλεομυκίνη, δοξορουμπυκίνη, αιθανόλη), ο τετραχλωράνθρακας ( $\text{CCl}_4$ ), ο καπνός του τσιγάρου, μεταβατικά μέταλλα (Cd, Hg, Pb, As), βαρέα μέταλλα (Fe, Cu, Co, Cr), βιομηχανικοί διαλύτες, φυτοφάρμακα, υψηλή θερμοκρασία κ.α.

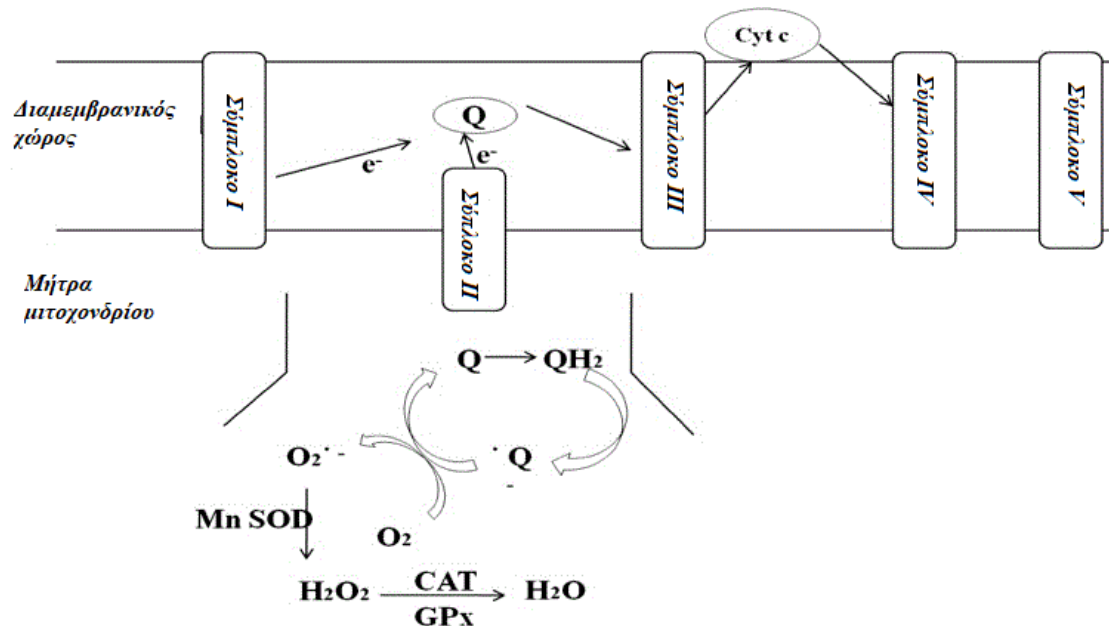


**Εικόνα 3 Πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών**

### Μιτοχόνδρια

Το μεγαλύτερο μέρος των ενδοκυτταρικών επιπέδων ROS προέρχεται από τα μιτοχόνδρια (Εικόνα 4). Οι ρίζες σουπεροξειδίου παράγονται σε δύο μεγάλες θέσεις στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, το σύμπλοκο I (NADH αφυδρογονάση) και το σύμπλοκο III (αναγωγή κυτοχρώματος c - ουβικινόνης). Η μεταφορά ηλεκτρονίων από το σύμπλοκο I ή II στο συνένζυμο Q ή την ουβικινόνη (Q) έχει ως αποτέλεσμα την αναγωγή του συνένζυμου Q ( $QH_2$ ). Η ανηγμένη μορφή  $QH_2$  αναγεννά το συνένζυμο Q μέσω ενός ασταθούς ενδιάμεσου ανιόντος ημικινόνης ( $\cdot Q^-$ ) στον κύκλο Q. Η σχηματισμένη  $\cdot Q^-$  μεταφέρει αμέσως τα ηλεκτρόνια στο μοριακό οξυγόνο που οδηγεί στον σχηματισμό ριζών σουπεροξειδίου. Η δημιουργία σουπεροξειδίου είναι μη ενζυμική διεργασία συνεπώς όσο μεγαλύτερος είναι ο μεταβολικός ρυθμός του κυττάρου, τόσο μεγαλύτερη είναι η παραγωγή των ROS (31). Το ανιόν σουπεροξειδίου μετατρέπεται σε υπεροξείδιο του υδρογόνου με τη δράση της σουπεροξειδικής δισμουτάσης του μαγγανίου (MnSOD). Το  $H_2O_2$  μπορεί να διασπαστεί μέσω του ενζύμου της καταλάσης (CAT) και της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx). Τα άλλα μιτοχονδριακά συστατικά που συμβάλλουν στο

σχηματισμό ROS περιλαμβάνουν την μονοαμινοξειδάση, την α-κετογλουταρική αφυδρογονάση, τη φωσφορική αφυδρογονάση γλυκερόλης και την p66shc (32).



Εικόνα 4 Ενδογενής παραγωγή ROS μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων

## Περοξυσώματα

Στα περοξυσώματα η αναπνευστική οδός περιλαμβάνει τη μεταφορά ηλεκτρονίων από διάφορους μεταβολίτες στο οξυγόνο που οδηγεί σε σχηματισμό  $H_2O_2$  (33), ωστόσο δεν συζευγνύεται με την οξειδωτική φωσφορυλίωση για την παραγωγή ATP και η ελεύθερη ενέργεια απελευθερώνεται με τη μορφή θερμότητας. Επιπλέον, από τα περοξεισώματα παράγονται  $H_2O_2$ ,  $O_2^{\bullet-}$ ,  $OH^{\bullet}$  και  $NO^{\bullet}$ . Η β-οξείδωση των λιπαρών οξέων είναι η κύρια μεταβολική διαδικασία που παράγει  $H_2O_2$  στα περοξεισώματα. Επιπλέον, άλλα έζυμα των περοξυσωμάτων όπως οι οξειδάσες ακυλο-CoA, οξειδάση D-αμινοξέος, L-α-υδροξυ οξειδάση, ουρική οξειδάση, οξειδάση ξανθίνης, O-ασπαρτική οξειδάση παράγουν διαφορετικά ROS (34).

## Ενδοπλασματικό δίκτυο

Τα ένζυμα του ενδοπλασματικού δικτύου όπως τα ένζυμα του κυτοχρώματος p450, b5 και η οξειδάση των διαμινών, συμβάλλουν και αυτά εξίσου στο σχηματισμό των ROS. Ένα από τα πιο σημαντικά ένζυμα που συμμετέχει σε αυτήν τη διαδικασία είναι η οξειδάση των θειολών Ero1p, που καταλύει τη μεταφορά ηλεκτρονίων από διθειόλες στο μοριακό οξυγόνο, με αποτέλεσμα το σχηματισμό H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (35).

## Άλλες πηγές

Οι άλλες ενδογενείς πηγές ROS περιλαμβάνουν τη σύνθεση προσταγλανδινών, την αυτο-οξείδωση της αδρεναλίνης, τα φαγοκύτταρα, την ανηγμένη ριβοφλαβίνη, FMNH<sub>2</sub>, FADH<sub>2</sub>, το κυτόχρωμα p450, την ενεργοποίηση των ανοσοκυττάρων, τη φλεγμονή, το στρες, την υπερβολική άσκηση, τη λοίμωξη, τον καρκίνο, τη γήρανση, την ισχαιμία (11).

## Μοριακοί στόχοι ελευθέρων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες (ROS / RNS) παράγονται από τον φυσιολογικό μεταβολισμό και εμπλέκονται σε διάφορες φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις. Όταν υπάρχει ανισορροπία μεταξύ των αντιοξειδωτικών και των οξειδωτικών μορίων, οι ελεύθερες ρίζες συσσωρεύονται προκαλώντας βλάβη στα μακρομόρια του κυττάρου, όπως τα νουκλεϊνικά οξέα, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια. Αυτό οδηγεί σε βλάβη των ιστών και κατ' επέκταση σε διάφορες ασθένειες όπως σακχαρώδη διαβήτη, νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Πάρκινσον, Αλτσχαιμερ), διάφορες μορφές καρκίνου, καρδιαγγειακές παθήσεις, καταρράκτης, ρευματοειδή αρθρίτιδα, άσθμα, επιβραδύνοντας σημαντικά την πρόοδο της νόσου.

## Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA)

Οι ROS / RNS μπορούν να προκαλέσουν οξειδωτικές βλάβες στα νουκλεϊνικά οξέα. Το μιτοχondριακό DNA είναι πιο ευάλωτο στην επίθεση των ROS συγκριτικά με

το πυρηνικό DNA, καθώς βρίσκεται σε άμεση απόσταση από τον τόπο δημιουργίας των ROS. Επίσης, τα μιτοχόνδρια υπολείπονται συστημάτων επιδιόρθωσης βλαβών του γενετικού υλικού. Καταλυτικό ρόλο παίζει η ρίζα  $\text{OH}^\bullet$ , η οποία αντιδρά άμεσα με όλα τα συστατικά του DNA, όπως οι βάσεις πουρίνης και πυριμιδίνης και ο σκελετός σακχάρων δεοξυριβόζης (9), προκαλώντας τόσο μονόκλωνες όσο και δίκλωνες θραύσεις στο DNA. Η ρίζα  $\text{OH}^\bullet$  αφαιρεί άτομα υδρογόνου και παράγει έναν αριθμό τροποποιημένων βάσεων πουρίνης (π.χ. 8-υδροξυδεοξυ γουανοσίνη, 8-υδροξυ δεοξυ αδενοσίνη, 2,6-διαμινο-4-υδροξυ-5-φορμαμιδοπυριμιδίνη) και πυριμιδίνης (π.χ. 5-υδροξυδεοξυ ουριδίνη, 5-υδροξυ δεοξυκυτιδίνη, υδαντοΐνη) αλλά και διασταυρωμένων δεσμών μεταξύ DNA-πρωτεΐνης (cross links). Η 8-υδροξυ δεοξυγουανοσίνη (8-OHdG) θεωρείται ως βιοδείκτης της οξειδωτικής βλάβης του DNA και εμπλέκεται στη μεταλλαξιγένεση, την καρκινογένεση και τη γήρανση. Τα επίπεδα του 8-OHdG είναι υψηλότερα στο μιτοχονδριακό DNA από ό, τι στο πυρηνικό DNA (36).

Οι RNS, και κυρίως ο περοξυνιτρίτης ( $\text{OONO}^-$ ), αλληλοεπιδρούν με την γουανίνη (G) για την δημιουργία νιτρικών και οξειδωτικών βλαβών του DNA, όπως η 8-νιτρογουανίνη και η 8-οξοδεοξυγουανοσίνη, αντίστοιχα (37). Η 8-νιτρογουανίνη που δημιουργείται είναι ασταθής και μπορεί να απομακρυνθεί αυθόρμητα, με αποτέλεσμα το σχηματισμό μιας απουρινικής θέσης (38). Αντιθέτως, η αδενίνη (A) μπορεί να συζευτεί με 8-νιτρογουανίνη κατά τη διάρκεια της σύνθεσης του DNA με αποτέλεσμα μεταβολές γουανίνης-θυμίνης (G-T) (39). Κατά συνέπεια, η 8-νιτρογουανίνη προκαλεί μεταλλάξεις στο DNA και εμπλέκεται στην καρκινογένεση.

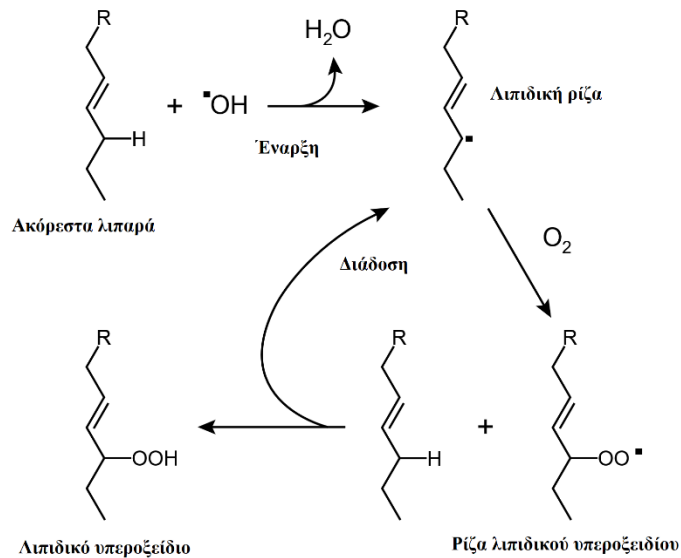
### Ριβονουκλεϊνικό οξύ (RNA)

Το RNA είναι πιο επιρρεπές στις οξειδωτικές βλάβες συγκριτικά με το DNA, λόγω της μονόκλωνης φύσης του, της έλλειψης ενεργού επιδιορθωτικού μηχανισμού, της μικρότερης πρωτεϊνικής προστασίας σε σχέση με το DNA και επιπλέον της στενής γειτνίασης του κυτταροπλασματικού RNA με τα μιτοχόνδρια, τα οποία όπως ήδη αναφέρθηκε είναι από τις πιο σημαντικές πηγές παραγωγής ROS. Η 7, 8-διυδρο-8-οξο-γουανοσίνη (8-οξοG) είναι το πιο εκτεταμένα μελετημένο προϊόν βλάβης του RNA, τα

επίπεδα του οποίου είναι αυξημένα σε αρκετές παθολογικές καταστάσεις όπως η νόσος του Αλτςχαιμερ (40) , η αιμοχρωμάτωση (41) και οι μυοπάθειες (42).

## Λιπίδια

Τα λιπίδια της μεμβράνης, κυρίως τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα των φωσφολιπιδίων, είναι επιρρεπή σε οξειδωση από ελεύθερες ρίζες. Η υπεροξειδωση των λιπιδίων είναι πολύ σημαντική *in vivo* λόγω της συμμετοχής της σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Η υπεροξειδωση των λιπιδίων έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της λειτουργικότητας της μεμβράνης, καθώς προκαλεί μειωμένη ρευστότητα και απενεργοποίηση μεμβρανικών ενζύμων και υποδοχέων (43). Η βλάβη αρχίζει, όταν οποιαδήποτε ελεύθερη ρίζα επιτίθεται σε ένα λιπαρό οξύ (LH) και αφαιρεί υδρογόνο από τις ομάδες μεθυλενίου ( $\text{CH}_2$ ), με αποτέλεσμα τον σχηματισμό μιας λιπιδικής ρίζας ( $\text{L}\cdot$ ). Η λιπιδική ρίζα μπορεί να αντιδράσει με το μοριακό οξυγόνο για να σχηματίσει μία λιπιδική υπεροξειδική ρίζα ( $\text{LOO}\cdot$ ) (Εικόνα 5). Η ρίζα ( $\text{LOO}\cdot$ ) που προκύπτει υφίσταται αναδιάταξη μέσω αντίδρασης κυκλοποίησης για να σχηματισθούν ενδοπεροξειδία, τα οποία τελικά σχηματίζουν μηλονική αλδεΐδη (MDA) και 4-υδροξυλενενάλη (4-HNA), τα τοξικά τελικά προϊόντα υπεροξειδωσης λιπιδίων που προκαλούν βλάβη στο DNA και τις πρωτεΐνες (44). Οι  $\text{LOO}\cdot$  μπορούν περαιτέρω να διαδώσουν τη διαδικασία υπεροξειδωσης με την αφαίρεση ατόμων υδρογόνου από άλλα λιπιδικά μόρια. Τα ισοπροστανία (ουσίες παρόμοιες με την προσταγλανδίνη που παράγονται από το σώμα με την εστεροποίηση του αραχιδονικού οξέος) αποτελούν το πιο σημαντικό προϊόν της υπεροξειδωσης των λιπιδίων του αραχιδονικού οξέος και θεωρούνται ως δείκτες της οξειδωτικής βλάβης των λιπιδίων (14).



**Εικόνα 5** Μετατροπή των λιπιδίων σε ρίζες (Πηγή: <https://maunakeatea.com/fat-becomes-free-radicals-and-green-tea-antioxidants-neutralize-free-radicals/>).

## Πρωτεΐνες

Η οξείδωση των πρωτεϊνών μπορεί να προκληθεί από ρίζες  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $\text{OH}^{\bullet}$ , υπεροξύλιο, αλκοξύλιο, υδροϋπεροξύλιο καθώς επίσης και από τα μη ριζικά είδη όπως τα  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_3$ ,  $\text{HOOI}$ , μονήρες οξυγόνο και  $\text{OONO-}$  (45). Το ROS οξειδώνει διαφορετικά πρωτεϊνικά αμινοξέα, προκαλώντας το σχηματισμό δεσμών πρωτεϊνών-πρωτεϊνών (cross links), με αποτέλεσμα τη μετουσίωση και την απώλεια της λειτουργικότητάς τους, την απώλεια ενζυμικής δραστηριότητας, την απώλεια της λειτουργίας των υποδοχέων και των πρωτεϊνών μεταφοράς (46). Τα θειούχα αμινοξέα, όπως η μεθειονίνη και η κυστεΐνη, είναι πιο επιρρεπή σε οξειδωτικές τροποποιήσεις ενώ μετατρέπονται σε δισουλφίδια και σουλφοξείδια μεθειονίνης, αντίστοιχα.

Οι βλάβες των ROS στα διαφορετικά αμινοξέα έχουν σαν αποτέλεσμα τον σχηματισμό διαφορετικών προϊόντων οξείδωσης. Η τρυπτοφάνη σχηματίζει νιτροτρυπτοφάνη, κινουρενίνη, φορμυλοκινουρενίνη. Η φαινυλαλανίνη σχηματίζει 2,3-δihydroξυφαινυλαλανίνη, 2-, 3- και 4-υδροξυφαινυλαλανίνη. Η τυροσίνη σχηματίζει 3,4-δihydroξυφαινυλαλανίνη, νιτροτυροσίνη. Η ιστιδίνη σχηματίζει 2-



οξοϊστιδίνη, ασπαραγίνη, ασπαρτικό οξύ, Η αργινίνη σχηματίζει γλουταμινική ημι-αλδεΰδη. Η λυσίνη σχηματίζει α-Αμινοαδипική ημιαλδεΰδη. Οι μορφές προλίνης 2-πυρρολιδόνη, 4- και 5-υδροξυπρολίνη πυρογλουταμικό οξύ, γλουταμινική ημι-αλδεΰδη. Η θρεονίνη σχηματίζει 2-αμινο-3-κετοβουτυρικό οξύ. Η λευκίνη και η βαλίνη σχηματίζουν κατάλοιπα υδροξυλίου (47).

Οι οξειδωτικές βλάβες που προκαλούν οι ROS στα αμινοξέων των πρωτεϊνών, όπως τη λυσίνη, την προλίνη, τη θρεονίνη και την αργινίνη παράγουν καρβονυλοπαράγωγα. Η παρουσία καρβονυλικών ομάδων στις πρωτεΐνες έχει θεωρηθεί ως ο δείκτης της οξειδωτικής βλάβης των πρωτεϊνών από ROS (48). Οι άλλοι ειδικοί δείκτες οξειδώσεως πρωτεϊνών είναι Ο-τυροσίνη (ένας δείκτης για τη ρίζα υδροξυλίου) και 3-νιτροτυροσίνη (ένας δείκτης για RNS). Η αύξηση των επιπέδων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων παρατηρείται σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις όπως η νόσος του Αλτςχαιμερ (49), η νόσος του Πάρκινσον (50), η μυϊκή δυστροφία (51), η ρευματοειδής αρθρίτιδα (52), η αθηροσκλήρωση (53) και τη γήρανση (54).

Συνοπτικά, σε υψηλές συγκεντρώσεις, οι ελεύθερες ρίζες και τα μη ριζικά δραστικά είδη είναι επικίνδυνα για τους ζώντες οργανισμούς και βλάπτουν τα κυτταρικά συστατικά. Σε μέτριες συγκεντρώσεις, ωστόσο, το μονοξειδίο του αζώτου (NO), το ανιόν του σουπεροξειδίου και τα ROS διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο ως ρυθμιστές στις διαδικασίες σηματοδότησης, που ως επί των πλείστων προστατεύουν τα κύτταρα από το οξειδωτικό στρες και αποκαθιστούν την οξειδοαναγωγική ομοιόσταση.

Φυσιολογικός ρόλος ελευθέρων ριζών

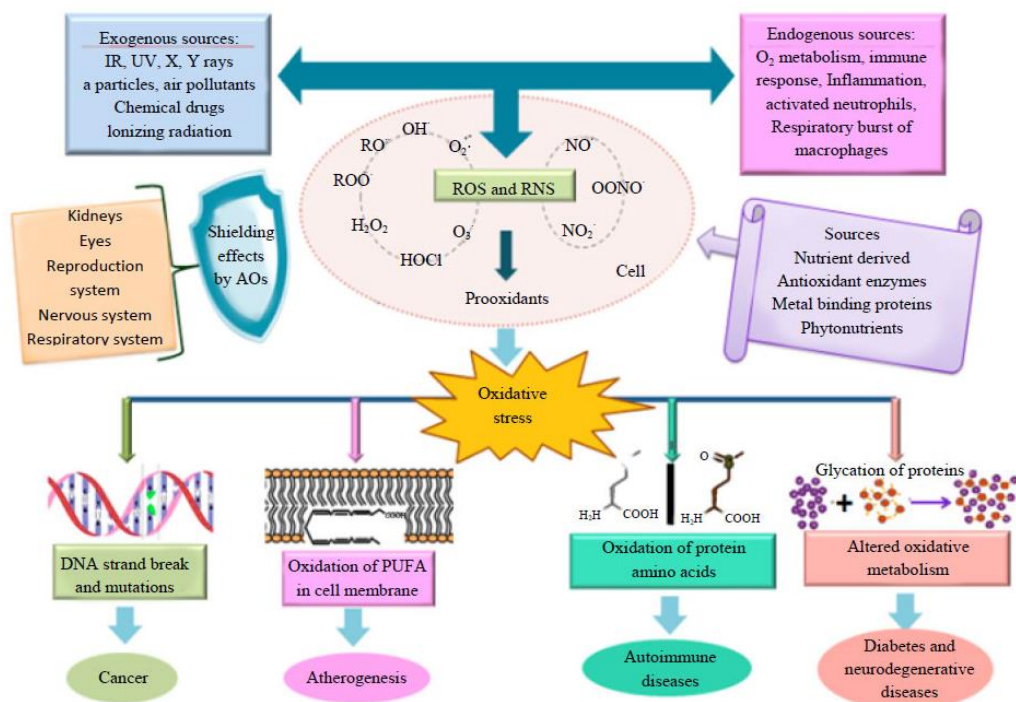
Σε χαμηλές ή μέτριες συγκεντρώσεις, τα ROS και RNS είναι απαραίτητα για τη διαδικασία ωρίμανσης διαφόρων κυτταρικών δομών και μπορούν να λειτουργήσουν ως «όπλα» για το αμυντικό σύστημα του ξενιστή. Πράγματι, τα φαγοκύτταρα (ουδετερόφιλα, μακροφάγα, μονοκύτταρα) απελευθερώνουν ελεύθερες ρίζες για να καταστρέψουν παθογόνα μικρόβια (10,13). Η σημασία της παραγωγής ROS από το ανοσοποιητικό σύστημα φαίνεται καθαρά σε ασθενείς με κοκκιωματώδη νόσο. Οι ασθενείς αυτοί έχουν μειωμένης δραστηριότητας μεμβρανικό σύστημα NADPH οξειδάσης, το οποίο καθιστά ανίκανη την παραγωγή ανιόντων σουπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot-}$ ), με αποτέλεσμα την συνεχή και επίμονη μόλυνση (10,55).

Άλλα ευεργετικά αποτελέσματα των ROS και RNS περιλαμβάνουν το ρόλο τους στα διάφορα συστήματα κυτταρικής σηματοδότησης (56–58). Η παραγωγή τους από την NADPH οξειδάση (μη φαγοκυτταρική ισομορφή) παίζει βασικό ρόλο στη ρύθμιση σηματοδοτικών μονοπατιών σε διάφορους τύπους μη φαγοκυτταρικών κυττάρων, όπως ινοβλαστών, ενδοθηλιακών, αγγειακών, λείων μυϊκών κυττάρων, καρδιακών μυοκυττάρων και ιστού θυρεοειδούς. Για παράδειγμα, το μονοξείδιο του αζώτου (NO) είναι ένας διακυτταρικός αγγειοφόρος για τη ρύθμιση της ροής του αίματος, της θρόμβωσης και της νευρικής δραστηριότητας (56). Το NO είναι επίσης σημαντικό για την μη ειδική άμυνα του ξενιστή και για τη θανάτωση ενδοκυτταρικών παθογόνων και όγκων. Μια άλλη ευεργετική δράση των ελεύθερων ριζών είναι η επαγωγή μιας μιτογόνος απόκρισης (56,57). Στον **Πίνακα 2** αναφέρονται μερικές φυσιολογικές δράσεις των ελεύθερων ριζών (10).

**Πίνακας 2** Σημαντικές φυσιολογικές λειτουργίες ελεύθερων ριζών. **Reactive oxygen species; ROS.**

Τύπος Ρίζας	Πηγή Ρίζας	Φυσιολογική διαδικασία
Μονοξείδιο του αζώτου (NO <sup>*</sup> )	Συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου	Χαλαρή λείων μυών (έλεγχος του αγγειακού τόνου) και διάφορες λειτουργίες εξαρτώμενες από cGMP
Ρίζα σουπεροξειδίου (O <sub>2</sub> <sup>*</sup> ) και σχετικές ROS	NAD(P)H οξειδάση	Έλεγχος εξερισμού Έλεγχος της παραγωγής ερυθροποιητίνης και άλλων επαγόμενων από την υποξία λειτουργιών Ομαλή χαλάρωση των μυών Μεταγωγή σήματος από διάφορους μεμβρανικούς υποδοχείς ενίσχυση ανοσολογικής απόκρισης
Ρίζα σουπεροξειδίου (O <sub>2</sub> <sup>*</sup> ) και σχετικές ROS	Οποιαδήποτε πηγή	Αντιδράσεις οξειδωτικού στρες και διατήρηση οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης

Στην Εικόνα 6 συνοψίζονται ο σχηματισμός των ελεύθερων ριζών και η συμμετοχή τους σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις του κυττάρου μέσω του φαινομένου του οξειδωτικού στρες, το οποίο θα οριστεί αναλυτικά στο επόμενο υποκεφάλαιο.



Εικόνα 6 Σύνοψη του σχηματισμού ελευθέρων ριζών, του οξειδωτικού στρες και της παθογένειας διαφόρων χρόνιων ασθενειών (53).

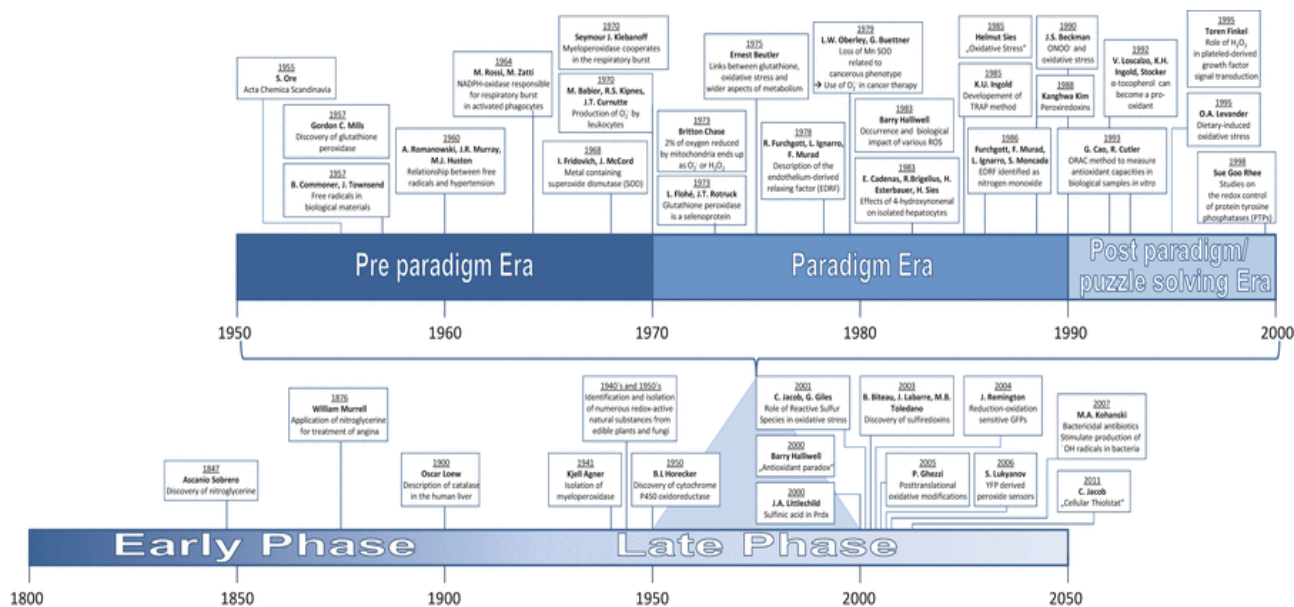
## 1.2. Οξειδωτικό στρες

### Ιστορική αναδρομή

Η αρχή της βασικής έννοιας του στρες και των κυτταρικών αποκρίσεων στο στρες χρονολογείται από το 1936 (59), ενώ η έννοια του οξειδωτικού στρες διατυπώθηκε το 1985 στο βιβλίο με τίτλο «Οξειδωτικό στρες (Oxidative Stress)» (60). Μέχρι σήμερα (2019), εμφανίζονται περίπου 209.107 καταχωρήσεις στη βάση δεδομένων PubMed για αυτόν τον όρο (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=oxidative+stress>).

Οι έρευνες στο πεδίο της βιολογίας της οξειδοαναγωγής στον 20ό αιώνα συνδέονται με τα ονόματα Warburg, Wieland, Michaelis, Szent-György, Krebs,

Chance, Bücher, Klingenberg και πολλούς άλλους (61). Η γνώση στη δεκαετία του '70 τεκμηριώθηκε σε μια συνολική ανασκόπηση του μεταβολισμού των υδροπεροξειδίων (62). Στο εγχειρίδιο "Ελεύθερες ρίζες στη βιολογία και την ιατρική", ένα εκτενές κεφάλαιο αφιερώνεται στο οξειδωτικό στρες (9). Οι σημαντικές πρώιμες συνεισφορές προήλθαν από διάφορους τομείς της εφαρμοσμένης έρευνας, όπως η χημεία του καουτσούκ και η χημεία τροφίμων, εξετάζοντας τις αντιδράσεις οξείδωσης που σχετίζονται με τη βουλκανισμό του ελαστικού (63) ή με την υποβάθμιση των λιπιδίων στα τρόφιμα (τάγγισμα) και σε μεγάλο βαθμό όσον αφορά την υπεροξείδωση των λιπιδίων (64). Το 1970, η διατύπωση "τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε οξειδωτικό στρες" χρησιμοποιήθηκε για να περιγράψει την προσθήκη υπεροξειδίου του υδρογόνου σε ερυθροκύτταρα (65). Οι τοξικές επιδράσεις των φαρμάκων, που σχετίζονται με την "οξειδοαναγωγή" και την υπεροξείδωση των λιπιδίων προσέλκυσαν το ενδιαφέρον από νωρίς (66). Είναι σημαντικό ότι οι τοξικές επιδράσεις πολλών αντικαρκινικών παραγόντων λειτουργούν με βάση την αρχή της οξειδοαναγωγής (67–69). Στην Εικόνα 7 παρουσιάζεται το χρονοδιάγραμμα με τα σημαντικότερα ευρήματα στο πεδίο του οξειδωτικού στρες.



**Εικόνα 7 Χρονοδιάγραμμα σημαντικών ευρημάτων στην έρευνα του οξειδωτικού στρες. Πηγή: (70)**

## Ορισμός και είδη οξειδωτικού στρες

Η βασική έννοια του οξειδωτικού στρες διαμορφώθηκε το 1985 ως «διαταραχή στην ισορροπία προοξειδωτικών και αντιοξειδωτικών υπέρ των πρώτων» (60) (Εικόνα 8). Οι επόμενες δεκαετίες χαρακτηρίστηκαν από θεμελιώδεις ανακαλύψεις σχετικά με την κατανόηση της οξειδοαναγωγικής ρύθμισης και σηματοδότησης, οδηγώντας στον σημερινό ορισμό του οξειδωτικού στρες, που το ορίζει ως «την ανισορροπία μεταξύ προοξειδωτικών και αντιοξειδωτικών υπέρ των προοξειδωτικών, που οδηγούν σε διακοπή της οξειδοαναγωγικής σηματοδότησης/ελέγχου και / ή σε μοριακή βλάβη» (71).

Ο μεγάλος αριθμός των οξειδωτικών ουσιών και η τεράστια ποικιλία τους όσον αφορά τη χημική και βιολογική τους δραστηριότητα, οδηγεί σε μια σειρά υπομορφών οξειδωτικού στρες, που υποδηλώνονται από τους διαφορετικούς τρόπους παραγωγής τους, μερικά από τα οποία είναι: φυσιολογικό (oxidative eustress), παθοφυσιολογικό (oxidative distress), αναγωγικό (reductive), προοξειδωτικό (prooxidant), του ενδοπλασματικού δικτύου, που σχετίζεται με την επάρκεια θρεπτικών συστατικών, φωτοοξειδωτικό, και αυτό που προκαλείται από την ακτινοβολία και την υψηλή θερμοκρασία κ.α. Στον Πίνακα 3 παρουσιάζονται τα διαφορετικά είδη του οξειδωτικού στρες με την αγγλική/διεθνή ορολογία (61,72).



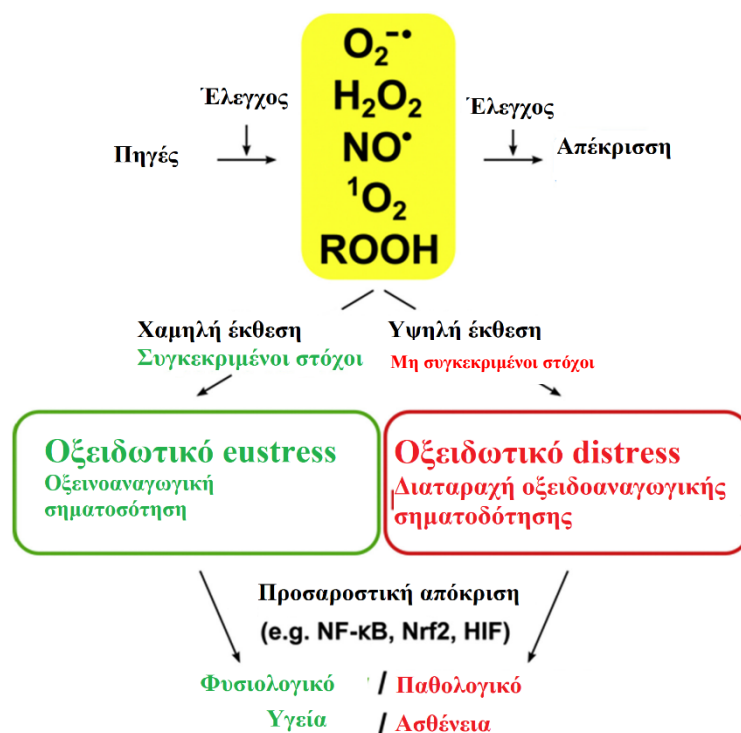
**Εικόνα 8 Οξειδωτικό στρες.**

**Πίνακας 3 Τα διαφορετικά είδη του οξειδωτικού στρες όπως εμφανίζονται στη διεθνή βιβλιογραφία. Πηγή: (61)**

<b>Term (Διαφορετικά είδη οξειδωτικού στρες)</b>
Physiological oxidative stress (oxidative eustress)
Pathophysiological oxidative stress (oxidative distress)
Nutritional, dietary, postprandial oxidative stress
Photooxidative stress (UV-A, UV-B, visible, infrared-A)
Radiation-induced oxidative stress
Reductive stress
Nitrooxidative, nitrosative, nitrative stress
Hyperoxic stress
Hypoxic stress
Endoplasmic reticulum (ER) stress
Proteotoxic stress, Disulfide stress
Glyco-oxidative stress
Carbonyl stress
Nanoparticle-induced oxidative stress
Environmental stress (sulphur dioxide, nitrogen dioxide, ozone)
Redox stress, electrophilic stress
Shear stress
Energy stress, metabolic stress
Oxidant stress, prooxidant stress

Από τον ορισμό προκύπτει ότι το οξειδωτικό στρες μπορεί να ταξινομηθεί ανάλογα με την ένταση, με κλίμακες εντάσεως που κυμαίνονται από το φυσιολογικό οξειδωτικό στρες (eustress) έως το τοξικό, το οποίο βλάπτει τα βιομόρια (distress) (73,74). Στην Εικόνα 9 απεικονίζεται η διαφορά έπειτα από την έκθεση σε διάφορους οξειδωτικούς παράγοντες. Η χαμηλή έκθεση των κυττάρων και των οργανισμών προωθεί την κυτταρική οξειδοαναγωγική σηματοδότηση, ενώ η υψηλή έκθεση έχει ως αποτέλεσμα τη διακοπή της οξειδοαναγωγικής σηματοδότησης ή / και τη βλάβη σε μη συγκεκριμένους μοριακούς στόχους (61). Το ρητό του Paracelsus, "Η δόση κάνει το δηλητήριο", είναι ένα τοξικολογικό παράδειγμα του 21ου αιώνα (75), κατάλληλο για τον ορισμό του οξειδωτικού στρες. Πιο περιγραφικά ωστόσο, θα μπορούσαμε να πούμε πως το κρίσιμο σημείο είναι η δόση σε συγκεκριμένο χωροχρονικό πλαίσιο (61). Οι

αρχές που διέπουν την οργάνωση της οξειδοαναγωγικής βιολογίας συνοψίζονται ως ο «κώδικας Redox» (76).



**Εικόνα 9 Οξειδωτικό στρες και η σχέση του με την οξειδοαναγωγική σηματοδότηση. Πηγή: (61)**

Προσαρμοστική απόκριση του οργανισμού στο οξειδωτικό στρες

Όταν στο κύτταρο υπάρχει οξειδωτικό περιβάλλον έχει ως αποτέλεσμα την έναρξη μιας απόκρισης, η οποία εφαρμόζεται μέσω μοριακών μονοπατιών που προκαλούν την ενεργοποίηση της γονιδιακής έκφρασης. Το αποτέλεσμα είναι η διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας και της ομοιόστασης του κυττάρου. Κύριοι τέτοιοι " ρυθμιστές" είναι τα μονοπάτια Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) / Keap1(Kelch-like erythroid cell-derived protein with CNC homology-associated protein 1) (77) και ο NF-κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) / IκB (inhibitor of kappa B) (78). Ο Nrf2, μετά την μετατόπιση του στον πυρήνα ενεργοποιεί διάφορα αμυντικά ένζυμα (αντιοξειδωτικά, μεταβολικά). Ομοίως, ο NF-κB, μετά την μετατόπιση του στον πυρήνα, ενεργοποιεί την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται σε αντιδράσεις φλεγμονής, ανοσίας και οξείας φάσης (61).

Άλλες αποκρίσεις του κυττάρου στο οξειδωτικό στρες περιλαμβάνουν την επαγόμενη από υποξία απόκριση, την απόκριση θερμικού σοκ, την απόκριση μη σωστά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών. Ενώ όταν υπάρχει εκτεταμένη κυτταρική βλάβη, ενεργοποιούνται μηχανισμοί απομάκρυνσης όπως η αυτοφαγία, η μιτοφαγία, η απόπτωση, και η νεκρόπτωση (61).

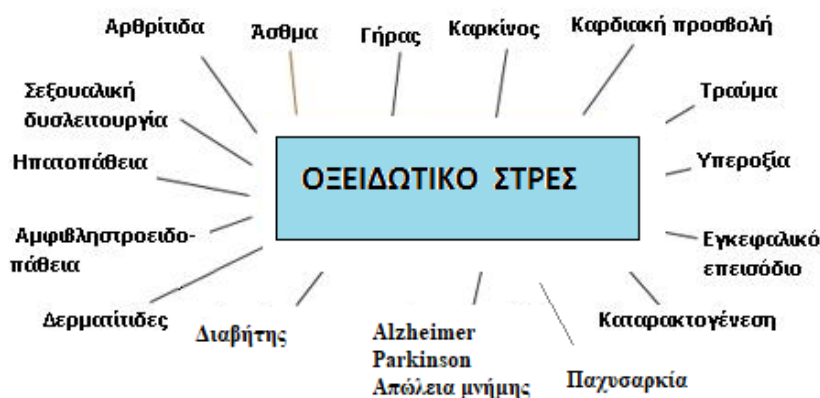
Το φαινόμενο της «Όρμησης (Hormesis)» αποτελεί ένα πρότυπο κυτταρικής άμυνας. Ένα κύτταρο ή οργανισμός εμφανίζει μια διφασική απόκριση στην έκθεση σε αυξανόμενες ποσότητες μιας ουσίας ή κατάστασης. Εντός της ορμετικής ζώνης, όπου η έκθεση σε τοξίνες και άλλους στρεσογόνους παράγοντες είναι σε χαμηλές συγκεντρώσεις, υπάρχει γενικά μια ευνοϊκή βιολογική απόκριση (79). Η έννοια αυτή είναι γνωστή από την αρχαιότητα από τον Μιθριδάτη (80).

#### Οξειδωτικό στρες και παθογένεια

Όπως ήδη αναφέρθηκε το οξειδωτικό στρες μπορεί να εμφανιστεί όταν τα κύτταρα δεν έχουν την δυνατότητα να ουδετεροποιήσουν ικανοποιητικά την περίσσεια των ελεύθερων ριζών που σχηματίζονται και αυτό έχει ως συνέπεια να διαταράσσεται η κυτταρική σηματοδότηση. Το οξειδωτικό μπορεί να βλάψει τόσο τις κυτταρικές μεμβράνες όσο και άλλες βασικές κυτταρικές δομές όπως τις πρωτεΐνες, τα λιπίδια, τις λιποπρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα (DNA/RNA) (10,81). Για παράδειγμα, περίσσεια της ρίζας υδροξυλίου και σουπεροξειδίου, έχει σαν αποτέλεσμα την βλάβη των κυτταρικών μεμβρανών και λιποπρωτεϊνών, μια διαδικασία που ονομάζεται υπεροξειδωση λιπιδίων. Αυτή η αντίδραση οδηγεί στο σχηματισμό μαλοναλδιαλδεύδης (MDA) και συζευγμένων ενώσεων διενίου, οι οποίες είναι κυτταροτοξικές και μεταλλαξιογόνες. Η υπεροξειδωση των λιπιδίων είναι μια αλυσιδωτή αντίδραση, δηλαδή μόλις αρχίσει, εξαπλώνεται ταχέως και επηρεάζει μεγάλο αριθμό λιπιδικών μορίων (82,83). Οι πρωτεΐνες μπορεί επίσης να καταστραφούν από τις ROS / RNS, οδηγώντας σε δομικές μεταβολές και απώλεια ενζυμικής δραστηριότητας (58). Η οξειδωτική βλάβη στο DNA οδηγεί στον σχηματισμό μεταλλάξεων. Το κύτταρο διαθέτει αρκετούς μηχανισμούς για την εξουδετέρωση αυτών των προσβολών χρησιμοποιώντας ένζυμα επιδιόρθωσης DNA και / ή αντιοξειδωτικά (81). Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκαλέσει μια ποικιλία



χρόνιων και εκφυλιστικών ασθενειών, καθώς και τη διαδικασία της γήρανσης. Στην Εικόνα 10 συνοψίζονται μερικές από τις παθολογικές καταστάσεις στις οποίες εμπλέκεται το οξειδωτικό στρες.



Εικόνα 10 Οξειδωτικό στρες και ασθένειες.

### 1.3. Αντιοξειδωτικά

#### Ιστορική αναδρομή

Μία από τις μεγαλύτερες εξελικτικές αλλαγές στο ιστορικό της μοριακής εξέλιξης ήταν η αλλαγή από μια μη οξειδωτική ατμόσφαιρα σε μια ατμόσφαιρα που περιείχε ένα μεγάλο ποσοστό οξυγόνου που τελικά έφτασε το 20%, όπως συμβαίνει σήμερα. Αυτή η αλλαγή ξεκίνησε όταν τα κυανοβακτήρια, που περιέχουν χλωροφύλλη, εμφανίστηκαν στους ωκεανούς. Περίπου 2 δισεκατομμύρια χρόνια πριν, το οξυγόνο στην ατμόσφαιρα ήταν μόλις στο 0,02%. Ενώ, πριν 400 εκατομμύρια χρόνια το ποσοστό αυτό κυμάνθηκε στο σημερινό επίπεδο του 20%. Ως αποτέλεσμα, οι αναερόβιοι οργανισμοί, που ήταν η μόνη μορφή ζωής μέχρι τότε, είτε θα μπορούσαν να εξελιχθούν ώστε να παράγουν αντιοξειδωτικά μόρια προκειμένου να προστατευθούν από το μοριακό οξυγόνο, είτε θα μπορούσαν να υποχωρήσουν σε αναερόβια περιβάλλοντα (84).

Τα αντιοξειδωτικά χρησιμοποιήθηκαν για πρώτη φορά τον 19ο αιώνα στη βιομηχανία ελαστικών, όταν παρατηρήθηκε ότι ορισμένα μόρια, τα οποία εντοπίστηκαν εμπειρικά, θα μπορούσαν να επιβραδύνουν την υποβάθμιση και να επιτρέψουν τη βελτιστοποίηση της διαδικασίας βουλκανισμού. Σήμερα γνωρίζουμε ότι η παραγωγή και η χρήση αντιδράσεων από καουτσούκ γίνεται με ελεύθερες ρίζες και οξυγόνο και τα αντιοξειδωτικά είναι ακόμα ένα χρήσιμο εργαλείο στα χέρια εκείνων που πρέπει να βελτιστοποιήσουν την απόδοση των ελαστικών. Τον 20<sup>ο</sup> αιώνα, τα αντιοξειδωτικά εντάσσονται στην αναδυόμενη βιομηχανία τροφίμων, ως βασικό εργαλείο για τον περιορισμό της οξειδωτικής υποβάθμισης των αποθηκευμένων τροφίμων. Ωστόσο, πρέπει να τονιστεί ότι εκείνη τη χρονική περίοδο, οι γνωστοί μηχανισμοί οξείδωσης αλλά και, η σημασία του αντιοξειδωτικού, ήταν καθαρά και μόνο εμπειρική, μέσω της ομαδοποίησης που γινόταν για οποιαδήποτε ένωση ή διαδικασία οδηγούσε στο αποτέλεσμα της βραδείας αποικοδόμησης και τάγγισης (85). Στο τέλος του 18<sup>ου</sup> αιώνα, αν και η γνώση για τις ελεύθερες ρίζες ήταν ανεπαρκής, υπήρχε γνώση σχετικά με το οξυγόνο, τόσο για τον σημαντικό του ρόλο για τη ζωή, αλλά και για την υποβάθμιση του βιολογικού υλικού. Η πιο σημαντική γνώση για τις οξειδωτικές τροποποιήσεις που προκαλούν οι ελεύθερες ρίζες, της σύγχρονης βιολογίας δίνεται στις αρχές της δεκαετίας του '50 όταν, στο Μπουένος Άιρες, οι Gerchman Rebecca και Daniel Gilbert διαπίστωσαν ότι το τοξικό αποτέλεσμα της ακτινοβολίας ενισχύθηκε σημαντικά από την παρουσία οξυγόνου. Όσον αφορά τα αντιοξειδωτικά, ένα ορόσημο στην εξέλιξη της γνώσης είναι η ανακάλυψη του Albert Szent-Györgyi, στην δεκαετία του '30, ο οποίος ξεκινώντας από τη μελέτη των "dell'imbrunimento" μύλων, ανακάλυψε τη βιταμίνη C. Οι ίδιοι ερευνητές μελέτησαν επίσης το αντιοξειδωτικό αποτέλεσμα των πολυφαινολών που απαντώνται στα φυτά (85).

Έπειτα από 50-60 χρόνια έγινε γνωστό ότι η αναπνοή (που είναι μια μορφή ελεγχόμενης καύσης) απαιτούσε οξυγόνο και ότι η αναπνοή θα μπορούσε να δημιουργήσει ελεύθερες ρίζες. Σε αυτή τη βάση ο Denim Harman πρότεινε τη θεωρία των ελεύθερων ριζών στη γήρανση: αν χρησιμοποιήσουμε οξυγόνο για να μετατρέψουμε την ενέργειά μας, δεν μπορούμε να ξεφύγουμε από την τοξικότητά του (86). Οι επιστημονικές πληροφορίες που είναι διαθέσιμες σήμερα μπορούν πλέον να ερμηνεύσουν τα φαινόμενα από το κυτταρικό επίπεδο μέχρι εκείνο της κβαντικής μηχανικής. Αλλά ποια είναι η ιατρική και η διατροφική διάσταση όλων; Στην πράξη,

διάφορες επιδημιολογικές μελέτες συμφωνούν ότι "η λήψη αντιοξειδωτικών στη διατροφή είναι καλή" σε σχέση με τη μείωση του κινδύνου χρόνιων εκφυλιστικών νόσων, κυρίως αθηροσκλήρωσης και ενδεχομένως τη μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου (87). Επιπλέον, έχει φανεί ότι πολλές φυσικές πολυφαινολικές ενώσεις και διάφορα συνθετικά αντιοξειδωτικά μπορούν να δράσουν μέσω του ελέγχου της έκφρασης ενός εύρους γονιδίων του κυττάρου, έναν μηχανισμό που ελάχιστα ή καθόλου δεν έχει να κάνει με τις μεταβολές του τυπικού αντιοξειδωτικού αποτελέσματος της μείωσης των οξειδίων. Με άλλα λόγια σήμερα τα ρυθμιστικά στοιχεία των αντιοξειδωτικών των τροφίμων χαρακτηρίζονται ως Διατροφολογιογονιδιοματική (Nutrigenomics) (87).

## Ορισμός

Ως αντιοξειδωτικός παράγοντας, ορίζεται μια ουσία η οποία όταν βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις συγκριτικά με εκείνες ενός προς οξείδωση υποστρώματος, επιβραδύνει ή εμποδίζει την οξείδωση αυτού του υποστρώματος. Πιο συγκεκριμένα τα αντιοξειδωτικά προσφέρουν στις ελεύθερες ρίζες το ηλεκτρόνιο ή το μόριο υδρογόνου, που τους λείπει και έτσι είτε εμποδίζουν τη δράση τους, είτε ενεργοποιούν τα ενδογενή αμυντικά συστήματα του οργανισμού (*Εικόνα 11*) (88).

Στη Χημεία, ο όρος αντιοξειδωτικά αναφέρεται σε κάθε ουσία που αναστέλλει την οξειδωτική φθορά π.χ βενζίνης, ελαστικών, πλαστικών, σαπουνιών κλπ. Ενώ στη Βιοχημεία, ο όρος περιγράφει ένα ένζυμο ή άλλη οργανική ουσία, όπως βιταμίνη Ε ή βήτα καροτένιο, με ικανότητα να εξουδετερώνει τις βλαπτικές επιδράσεις της οξείδωσης σε ζωικούς ιστούς.



**Εικόνα 11 Δράση αντιοξειδωτικών. Πηγή:** [http://chemanthology.blogspot.com/2015/12/blog-post\\_5.html](http://chemanthology.blogspot.com/2015/12/blog-post_5.html)

#### Τρόπος δράσης αντιοξειδωτικών

Όταν ένα αντιοξειδωτικό καταστρέφει μια ελεύθερη ρίζα, το ίδιο καθίσταται οξειδωμένο. Επομένως, οι αντιοξειδωτικοί πόροι πρέπει να αποκαθίστανται συνεχώς στο σώμα. Έτσι, ενώ σε ένα συγκεκριμένο σύστημα ένα αντιοξειδωτικό είναι αποτελεσματικό έναντι των ελεύθερων ριζών, σε άλλα συστήματα το ίδιο αντιοξειδωτικό μπορεί να καταστεί αναποτελεσματικό. Επίσης, σε ορισμένες περιπτώσεις, ένα αντιοξειδωτικό μπορεί ακόμη να δράσει ως προ-οξειδωτικό π.χ. μπορεί να δημιουργήσει το ίδιο ROS / RNS (13).

Η αντιοξειδωτική διαδικασία μπορεί να λειτουργήσει με δύο τρόπους: τερματισμός αλυσιδωτής αντίδρασης ή πρόληψη. Ο τερματισμός της αλυσιδωτής αντίδρασης περιλαμβάνει τα εξής βήματα, όταν μια ρίζα απελευθερώνει ή κλέβει ένα ηλεκτρόνιο, σχηματίζεται μια δεύτερη ρίζα. Η τελευταία ασκεί την ίδια δράση σε άλλο μόριο στόχο και συνεχίζει είτε μέχρι να σταθεροποιηθεί από κάποιο αντιοξειδωτικό (βιταμίνη C, E, καροτενοειδή κ.λπ.) είτε απλά αποσυντίθεται σε ένα επιβλαβές προϊόν. Το πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα μιας τέτοιας αλυσιδωτής αντίδρασης είναι η υπεροξείδωση των λιπιδίων. Κατά την πρόληψη, ένα αντιοξειδωτικό ένζυμο όπως η δισμουτάση του σουπεροξειδίου, η καταλάση και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης μπορεί να αποτρέψει την οξείδωση με μείωση του ρυθμού έναρξης της αλυσιδωτής

αντίδρασης, π.χ. είτε με την εξουδετέρωση ελευθέρων ριζών είτε με σταθεροποίηση μετάλλων μεταπτώσεως όπως ο χαλκός και ο σίδηρος (13).

Βάσει του τρόπου δράσης οι αντιοξειδωτικοί παράγοντες διακρίνονται σε "αναχαιτιστές" των οξειδωτικών όπως η τρανσφερίνη, η λακτοφερίνη, η αλβουμίνη και η σερουλοπλασμίνη. Σε "εκκαθαριστές" των ελευθέρων ριζών, όπως η καταλάση, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η τρανσφεράση, και τα καροτενοειδή. Σε "επισκευαστικούς" παράγοντες του αμυντικού οξειδωτικού συστήματος, όπως κάποιες πρωτεάσες, τρασφεράσες και ένζυμα επισκευής του DNA (13).

### Ταξινόμηση των αντιοξειδωτικών

Το κύτταρο διαθέτει πληθώρα μηχανισμών για να αντισταθμίσει το οξειδωτικό στρες με την παραγωγή αντιοξειδωτικών, τα οποία είτε σχηματίζονται φυσικά *in situ* (ενδογενή αντιοξειδωτικά) είτε διατίθενται εξωτερικά μέσω της τροφής (εξωγενή αντιοξειδωτικά). Οι ρόλοι των αντιοξειδωτικών είναι να εξουδετερώσουν την περίσσεια των ελευθέρων ριζών και να προστατεύουν τα κύτταρα από τις τοξικές τους επιδράσεις και να συμβάλλουν στην πρόληψη των ασθενειών (14).



Τα ενδογενή αντιοξειδωτικά μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες τα ενζυμικά και τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά.

Τα κύρια ενζυμικά αντιοξειδωτικά που εμπλέκονται άμεσα στην εξουδετέρωση των ROS και RNS είναι: η δισμουτάση του σουπεροξειδίου (SOD), η καταλάση (CAT), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) και η αναγωγή της γλουταθειόνης (GRx) (14,15,81). Η SOD (Εικόνα

**Εικόνα 12 Μερικά από τα ενδογενή ενζυμικά αντιοξειδωτικά**

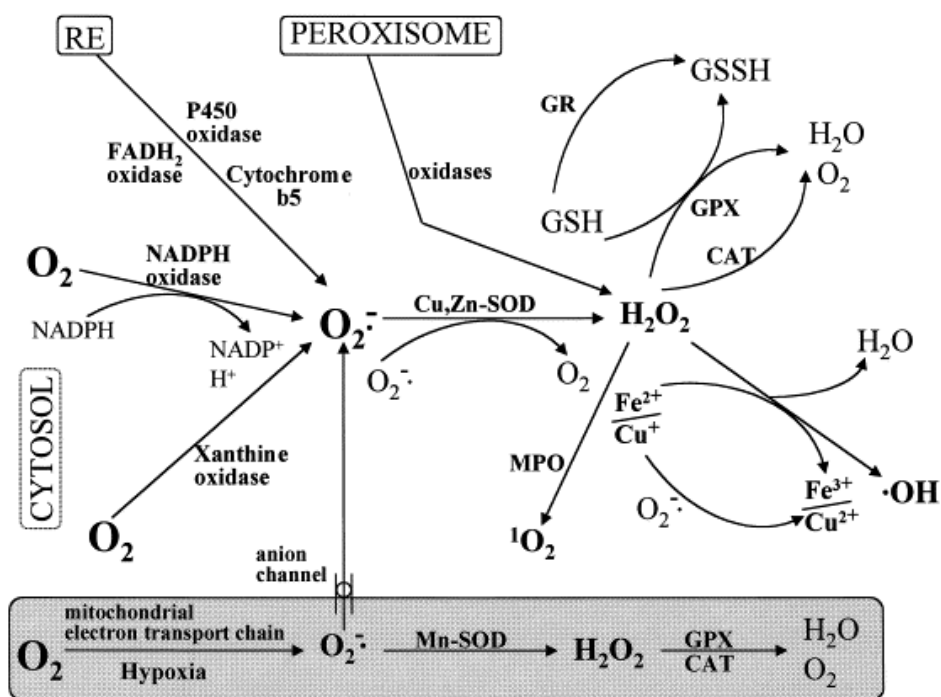
14), βρίσκεται στην πρώτη γραμμή άμυνας έναντι των ελευθέρων ριζών, καταλύοντας τη διάσπαση της ρίζας ανιόντων σουπεροξειδίου (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) στο υπεροξειδίο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) με αναγωγή (Εικόνα 12). Το σχηματιζόμενο H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> μετατρέπεται σε νερό και οξυγόνο (O<sub>2</sub>)

μέσω της καταλάσης (CAT) ή της υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx). Η GPx (σελινοπρωτεΐνη) απομακρύνει το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> χρησιμοποιώντας το για να οξειδώσει την ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH) σε οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG). Η αναγωγή της γλουταθειόνης (φλαβοπρωτεΐνη), αναγεννά την GSH από την GSSG, με το NADPH ως αναγωγικό. Εκτός από το υπεροξείδιο του υδρογόνου, η GPx μειώνει επίσης τα λιπιδικά ή μη λιπιδικά υδροϋπεροξειδία, ενώ οξειδώνει τη γλουταθειόνη (GSH) (Εικόνα 13) (10,14,56,81).

Τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά διαιρούνται επίσης σε μεταβολικά και θρεπτικά. Τα μεταβολικά αντιοξειδωτικά που ανήκουν σε ενδογενή αντιοξειδωτικά, παράγονται από το μεταβολισμό στο σώμα, όπως το λιποϊκό οξύ, η γλουταθειόνη, η L-αργινίνη, το συνένζυμο Q10, η μελατονίνη, το ουρικό οξύ, η χολερυθρίνη, οι χηλικές πρωτεΐνες μετάλλων, η τρανσφερίνη κλπ. Ενώ τα θρεπτικά αντιοξειδωτικά που ανήκουν σε εξωγενή αντιοξειδωτικά είναι ενώσεις που δεν μπορούν να παραχθούν στο σώμα και πρέπει να παρέχονται μέσω τροφίμων ή συμπληρωμάτων όπως η βιταμίνη E, η βιταμίνη C, τα καροτενοειδή, τα ιχνοστοιχεία (σελήνιο, μαγγάνιο, ψευδάργυρος), τα φλαβονοειδή, τα ωμέγα-3 και 6 λιπαρά οξέα, κλπ (14). Στον Πίνακα 4, παρουσιάζονται οι πηγές μερικών από των πιο σημαντικών αντιοξειδωτικών ουσιών που λαμβάνουμε μέσω της τροφής.

#### Πίνακας 4 Πηγές θρεπτικών αντιοξειδωτικών ουσιών

	Πηγές
<b>Βιταμίνη A</b>	Αβγό, βούτυρο, γάλα και γαλακτομικά προϊόντα, συκώτι, ιχθυέλαιο
<b>Βιταμίνη C</b>	Φρούτα (εσπεριδοειδή, φραγκοστάφυλα, φράουλες, πράσινα φυλλώδη λαχανικά (σπανάκι μαρούλι) και ανθακραμβοειδή (μπρόκολο, κουνουπίδι
<b>Βιταμίνη E</b>	Φυτικά έλαια, κυρίως ελαιόλαδο
<b>B-καροτένιο</b>	Φρούτα (κυρίως εσπεριδοειδή, πορτοκάλια, μανταρίνια, κίτρα), λαχανικά,)
<b>Σελήνιο</b>	Κρέας, συκώτι, θαλασσινά
<b>Φλαβονοειδή</b>	Κόκκινο κρασί, φρούτα, λαχανικά



**Εικόνα 13** Δημιουργία δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) και αμυντικοί μηχανισμοί. GR = αναγωγή γλουταθειόνης. MPO = μυελοϋπεροξειδάση; RE = ενδοπλασματικό δίκτυο. Πηγή: (89).



**Εικόνα 14** Προστατευτική ικανότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων. Πηγή: <https://www.cell-logic.com.au/antioxidants-part-2/>

## «Αντιοξειδωτικό παράδοξο»

Ο όρος «αντιοξειδωτικό παράδοξο» (Antioxidant paradox) συχνά χρησιμοποιείται για να περιγράψει το γεγονός ότι οι ρίζες οξυγόνου και άλλες δραστικές μορφές οξυγόνου εμπλέκονται σε διάφορες ασθένειες του ανθρώπου, ωστόσο η χορήγηση μεγάλων δόσεων διαιτητικών συμπληρωμάτων αντιοξειδωτικών σε ανθρώπους, στις περισσότερες μελέτες φαίνεται να έχει μικρό ή και καθόλου προληπτικό ή θεραπευτικό αποτέλεσμα. Γιατί συμβαίνει αυτό; Πρώτον, ο ρόλος των ROS στην προέλευση και / ή την εξέλιξη των περισσότερων ασθενειών του ανθρώπου είναι ασαφής, αν και είναι πιθανώς φαίνεται να συμμετέχουν σημαντικά στον καρκίνο, και τις νευροεκφυλιστικές νόσους. Δεύτερον, οι ενδογενείς αντιοξειδωτικοί αμυντικοί μηχανισμοί στο ανθρώπινο σώμα είναι πολύπλοκοι, αλληλοσυνδεδεμένοι και προσεκτικά ρυθμισμένοι. Η «συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα» του σώματος φαίνεται να μην ανταποκρίνεται στις υψηλές δόσεις διαιτητικών αντιοξειδωτικών, έτσι ώστε η ποσότητα οξειδωτικής βλάβης στα βασικά βιομόρια σπάνια αλλάζει. Πράγματι, ο χειρισμός των ενδογενών αντιοξειδωτικών επιπέδων (π.χ. παρέχοντας αδύναμα προ-οξειδωτικά) μπορεί να είναι μια πιο χρήσιμη προσέγγιση στη θεραπεία και την πρόληψη ασθενειών, στις οποίες τα δραστικά είδη οξυγόνου είναι σημαντικά, από την κατανάλωση μεγάλων δόσεων διαιτητικών αντιοξειδωτικών (90).

Οι δόσεις αντιοξειδωτικών που χρησιμοποιούνται μέχρι στιγμής μπορεί να είναι λανθασμένες - υπάρχουν (περιορισμένα) στοιχεία (μέχρι σήμερα) ότι οι χαμηλότερες δόσεις ή / και τα μείγματα αντιοξειδωτικών μπορεί να έχουν μεγαλύτερο όφελος από τις υψηλότερες δόσεις απλών ενώσεων/μορίων/παραγόντων (91–94). Πράγματι, υψηλές δόσεις απλών μορίων μπορεί να παρεμβαίνουν στην πρόσληψη άλλων θρεπτικών συστατικών, π.χ. α-τοκοφερόλη, γ-τοκοφερόλης, β-καροτένιο και άλλων καροτενοειδών (91,95,96). Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι πληθώρα μελετών υποστηρίζει πως στην υπερχοληστερολαιμία και την παχυσαρκία στους ανθρώπους, δύο ασθένειες που οδηγούν σε αυξημένη λιπιδική υπεροξείδωση, η κανονικοποίηση των αυξημένων επιπέδων χοληστερόλης στο πλάσμα σε φυσιολογικά επίπεδα, μπορεί να έχει περισσότερη "αντιοξειδωτική δράση" από ότι εάν κάποιος καταναλώσει υψηλές δόσεις αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων (92,97–102). Θα ήταν λοιπόν ενδιαφέρον, να



καταστήσουμε το φάσμα των αντιοξειδωτικών αρκετά ευρύ και τις δόσεις αρκετά χαμηλές, ώστε να ανακαλύψουμε τα ευεργετικά χαρακτηριστικά των διαιτητικών φρούτων και λαχανικών (103).

## 1.4. Πολυφαινόλες/Βιοφαινόλες

### Ιστορική αναδρομή

Ο όρος "βιοφαινόλες" επινοήθηκε για πρώτη φορά από τους Romeo και Uccella το 1996 για να δηλώσει τις βιοενεργές φαινόλες που απαντώνται στις ελιές αντικαθιστώντας τον πιο κοινό και λιγότερο χημικώς ακριβή όρο "πολυφαινόλες". Σήμερα ο όρος "βιοφαινόλες" πέρα από την χημεία της ελιάς χρησιμοποιείται για να περιγράψει όλες τις φυτικές φαινόλες. Οι βιοφαινόλες αποτελούν τη μεγαλύτερη ομάδα δευτερογενών φυτικών μεταβολιτών κατέχοντας ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δραστηριοτήτων. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων τριών δεκαετιών, οι βιοφαινόλες κατέλαβαν τόσο την επιστημονική προσοχή, όσο και την ευρεία χρήση τους στη βιομηχανία τροφίμων, ενώ προσέλκυσαν το ενδιαφέρον των καταναλωτών, λόγω του αντιοξειδωτικού τους δυναμικού στη διατήρηση των τροφίμων και τη διατήρηση της ανθρώπινης υγείας. Ο ορισμός "βιοφαινόλες" σήμερα συμπεριλαμβάνει όλες τις φαινολικές ενώσεις βοτανικής προέλευσης (104).

Όλα ξεκίνησαν με το πρωτοποριακό έργο του Denham Harman στη δεκαετία του 1950, ο οποίος θεωρείται ο πατέρας της θεωρίας σχετικά με τις ελεύθερες ρίζες στη γήρανση. Ο Harman έδειξε ότι τα αντιοξειδωτικά που λαμβάνονται μέσω τροφής, μπορούν να παρατείνουν τη διάρκεια ζωής ασθενών ποντικών τελικού σταδίου (105). Στη δεκαετία του 1960, ο Sanojki πρότεινε ότι οι εκφυλιστικές ασθένειες μπορεί να προκύψουν έπειτα από την υπερπαραγωγή ROS (106). Το 1972 ο Harman κάνει αναφορά για το μιτοχονδριακό ρόλο στην παραγωγή ελεύθερων ριζών και τη βιολογική γήρανση (107). Το 1985, ο Sies εισήγαγε τον πιο περιγραφικό ορισμό για το «οξειδωτικό στρες» (60,72,108). Η δεκαετία του 1980 ήταν μια καμπή στην ιστορία τη έρευνας του οξειδωτικού στρες και των αντιοξειδωτικών. Ενώ η δεκαετία του 90'

χαρακτηρίστηκε από τις όλο και αυξανόμενα ανησυχίες σχετικά με την ασφάλεια των συνθετικών αντιοξειδωτικών, όπου σε συνδυασμό με την ανάπτυξη της φυσικοθεραπείας (naturotherapy), προκάλεσαν το κινήγι για την εύρεση φυσικών αντιοξειδωτικών. Ο όρος «βιοφαινόλες» είναι το κύριο ορόσημο στην έρευνα των πολυφαινολών στη δεκαετία του 1990 (104).

## Ορισμός

Οι βιοφαινόλες αποτελούν τη μεγαλύτερη ομάδα δευτερογενών φυτικών μεταβολιτών με πανταχού παρουσία στα φυτά. Ωστόσο, η «ειρωνεία» του γεγονότος, έγκειται στο ότι δεν υπάρχει ακριβής βιοχημικός και πλήρης όρος για την περιγραφή των φυτικών φαινολών. Ο όρος "πολυφαινόλες" είναι ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος όρος για την περιγραφή των φυτικών φαινολικών ενώσεων. Αρχικά, ο όρος "πολυφαινόλες" χρησιμοποιήθηκε για να περιγράψει φυτικά φαινολικά πολυμερή, τις ταννίνες (109). Η "κατάχρηση" του όρου "πολυφαινόλη" για να περιγράψει τις μονομερείς ενώσεις πιθανότατα κληρονομείται από τη χημεία του οίνου. Ο Robards και οι συνεργάτες του επανειλημμένα αμφισβήτησαν την εγκυρότητα της χρήσης του όρου "πολυφαινόλης" για να περιγράψει απλές φαινολικές ενώσεις με έναν αρωματικό βενζολικό δακτύλιο (110–112).

Ο Quideau και οι συνεργάτες του, διερεύνησαν διεξοδικά τη χρήση του όρου "πολυφαινόλες" (113). Επαναπροσδιόρισαν τις πολυφαινόλες ως «δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών που προέρχονται αποκλειστικά από την πρόδρομη ένωση του σικιμικού, η οποία προκύπτει από τα μονοπάτια φαινυπροπανοειδών και / ή των πολυκετιδικών, που χαρακτηρίζονται από περισσότερους από έναν φαινολικό δακτύλιο και στερούνται οποιασδήποτε λειτουργικής ομάδας αζώτου στην βασική τους δομή» (113). Ο ορισμός αυτός, συμπεριλαμβάνει τις φυτικές φαινόλες που έχουν δύο φαινολικούς δακτυλίους όπως τα φλαβονοειδή και τα φαινολικά ολιγομερή. Ωστόσο, ο ορισμός αυτός δεν περιλαμβάνει τις ενώσεις με ένα φαινολικό δακτύλιο. Επιπλέον, αποκλείονται οι φαινολικές ενώσεις που περιέχουν άζωτο, π.χ. τα προϊόντα συζεύξεως της χολίνης (104).

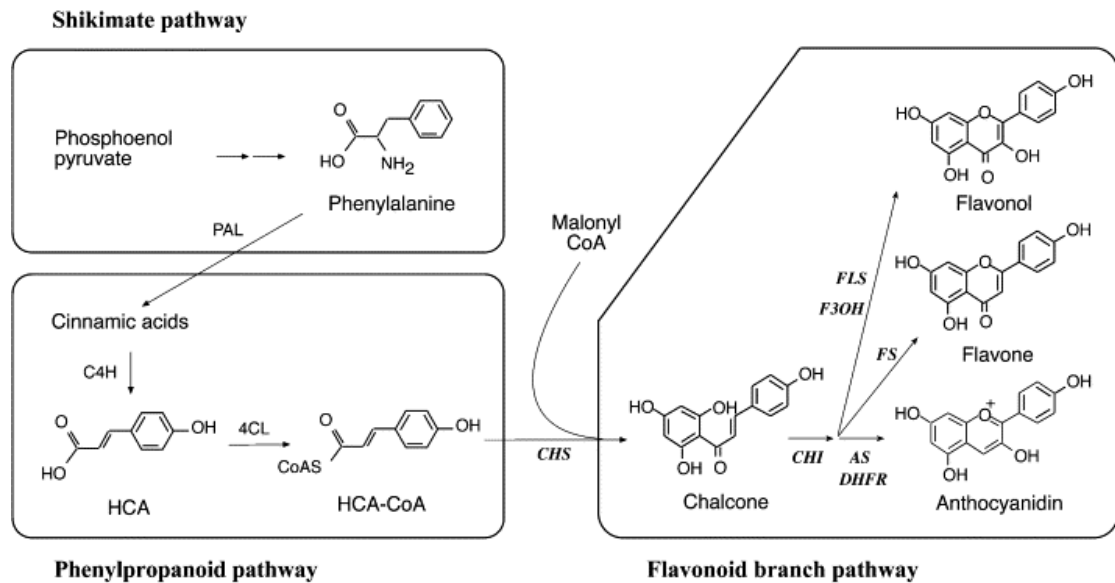
Ο όρος "βιοφαινόλες", που προτάθηκε από τους Romeo και Uccella το 1996, αποτελεί μια πληρέστερη και χημικά ακριβής έκφραση για να περιγράψει τις φυτικές

φαινόλες, από τις απλές μονοφαινόλες μέχρι τα πολύπλοκα πολυμερή μόρια. Το πρόθεμα "βιο" υποδηλώνει τη βιολογική προέλευση σε αντίθεση με τις συνθετικές ενώσεις. Ένα σημαντικό μειονέκτημα για τη χρήση αυτού του όρου μπορεί να είναι το πλήθος των φαινολικών ενώσεων που δεν απαντώνται φυσικά στους φυτικούς ιστούς αλλά παράγονται κατά την επεξεργασία μετά την συγκομιδή ή/και το χειρισμό των φυτικών ιστών όπως είναι η κανολόλη σε έλαιο κανόλα, οι ισοχρωμάνες και λιγνάνες στο παρθένο ελαιόλαδο.

Ως εκ τούτου, ως βιοφαινόλες θα πρέπει να ορίζονται οι "φαινολικές ενώσεις που απομονώνονται από φυτικούς ιστούς ή προϊόντα που προέρχονται από τα μονοπάτια σικιμικού- φενυλοπροπανοειδών και / ή πολυκετιδίων, συμπεριλαμβανομένων των παραγώγων τους, των συζευγμάτων τους, των προϊόντων αποδόμησης και των μεταβολιτών τους". Έτσι, οι "βιοφαινόλες" γίνονται ένας όρος «ομπρέλα» που αναφέρεται σε όλα τα φαινολικά μόρια που έχουν βοτανική προέλευση (104).

#### Βιοσύνθεση φυτοφαινολών

Οι φαινόλες είναι χημικές ενώσεις που χαρακτηρίζονται από τουλάχιστον έναν αρωματικό δακτύλιο ( $C_6$ ) που φέρει μία ή περισσότερες ομάδες υδροξυλίου. Τα υδροξυκιναμικά οξέα (HCAs) και τα φλαβονοειδή έχουν τους βασικούς σκελετούς άνθρακα  $C_6-C_3$  και  $C_6-C_3-C_6$ , αντίστοιχα. Τα HCAs και τα φλαβονοειδή παράγονται από την φαινυλαλανίνη, μέσω της οδού του σικιμικού, της γενικής οδού φαινυλοπροπανοειδών και της ειδικής οδού φλαβονοειδών. Στην Εικόνα 15 συνοψίζονται οι βιοσυνθετικές οδοί και οι βασικές δομές των HCA και των φλαβονοειδών.



**Εικόνα 15** Διάγραμμα της βιοσυνθετικής οδού των φυτοφαινολών. Τα HCA και τα φλαβονοειδή προέρχονται από το κινναμικό οξύ το οποίο σχηματίζεται από φαινυλαλανίνη μέσω της αμωνιακής λυάσης της φαινυλαλανίνης (PAL). Το κινναμικό οξύ τροποποιείται σε HCA από την κινναμωμική-4-υδροξυλάση (C4H) και την ο-μεθυλτρανσφεράση. Το ένζυμο 4-κουμαρικό: CoA λιγάση (4CL) καταλύει το σχηματισμό του υδροξυκινναμοΐλ CoA (HCA-CoA) και αυτά τα ενεργοποιημένα ενδιάμεσα χρησιμοποιούνται για τη βιοσύνθεση των φλαβονοειδών και της λιγνίνης. Η σύνθεση των φλαβονοειδών ξεκινά με τη συμπύκνωση του HCA-CoA και τριών μορίων μηλονικού CoA που καταλύονται από τη συνθάση της χαλκόνης (CHS). Η χαλκόνη μετατρέπεται περαιτέρω σε άλλες υποομάδες φλαβονοειδών, συμπεριλαμβανομένων φλαβονών, φλαβονόλης και ανθοκυανίνης μέσω της ισομεράσης της χαλκόνης (CHI), 3-υδροξυλάση φλαβανόνης (F3OH), συνθετάση της ισοφλαβόνης (ISF), συνθάση φλαβόνου (FS), συνθάση φλαβονόλης (FLS) αναγωγάση (DHFR) και συνθάση ανθοκυανίνης (AS). Πηγή: (114).

Τα φλαβονοειδή συνήθως συσσωρεύονται στα επιδερμικά κύτταρα των φυτικών οργάνων όπως λουλούδια, φύλλα, μίσχοι, ρίζες, σπόροι και φρούτα, και βρίσκονται σε γλυκοσιδικές μορφές (γλυκοζιδια) και μη γλυκοσιδικές μορφές (αγλυκόνες). Ο υποκυτταρικός εντοπισμός των γλυκοσιδίων περιορίζεται κυρίως σε υδρόφιλες περιοχές, όπως τα κενοτόπια και οι αποπλάστες. Ωστόσο, έχουν επίσης βρεθεί σε χλωροπλάστες και ετιοπλάστες. Οι αγλυκόνες έχουν αναφερθεί ότι εντοπίζονται σε λιπόφιλες περιοχές όπως αδένες ελαίων και κηρώδη στρώματα (114).

## Δομή και τάξεις βιοφαινολών

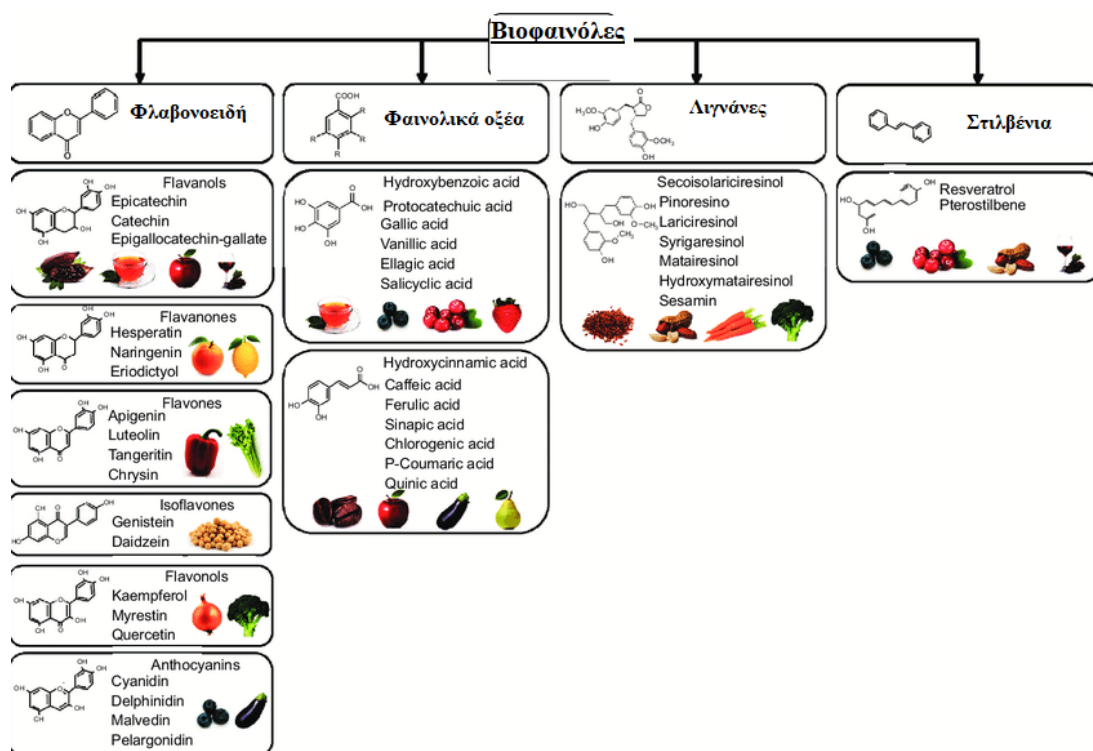
Πάνω από 8.000 βιοφαινολικές ενώσεις έχουν ταυτοποιηθεί σε διάφορα φυτικά είδη. Όλες οι φυτικές φαινολικές ενώσεις προκύπτουν από ένα κοινό ενδιάμεσο, την φαινυλαλανίνη ή το πρόδρομο μόριο του σικιμικού οξέος. Κυρίως εμφανίζονται σε συζευγμένες μορφές, με ένα ή περισσότερα κατάλοιπα σακχάρου συνδεδεμένα με ομάδες υδροξυλίου, αν και υπάρχουν επίσης άμεσες συνδέσεις του σακχάρου (πολυσακχαρίτης ή μονοσακχαρίτης) με έναν αρωματικό άνθρακα. Η σύνδεση και με άλλες ενώσεις, όπως τα καρβοξυλικά και τα οργανικά οξέα, οι αμίνες, τα λιπίδια και άλλες φαινόλες, είναι επίσης συχνή (115). Οι βιοφαινόλες μπορούν να ταξινομηθούν σε διαφορετικές ομάδες ως συνάρτηση του αριθμού φαινολικών δακτυλίων που περιέχουν και βάσει δομικών στοιχείων που συνδέουν αυτούς τους δακτυλίους μεταξύ τους. Οι κύριες κατηγορίες περιλαμβάνουν φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή, στιλβένια και λιγνάνες (116). Η Εικόνα 16 απεικονίζει τις διαφορετικές ομάδες βιοφαινολών και τις χημικές τους δομές, καθώς και τις κύριες διατροφικές πηγές τους (κόκκινο κρασί, φρούτα λαχανικά, μαύρη σοκολάτα, ελαιόλαδο, τσάι, ξηροί καρποί).

Τα φαινολικά οξέα υποδιαιρούνται περαιτέρω σε υδροξυλ- βενζοϊκά και υδροξυλ κινναμικά οξέα. Τα φαινολικά οξέα αφορούν περίπου το ένα τρίτο των βιοφαινολικών ενώσεων στη διατροφή μας και απαντώνται σε όλες τις φυτικές τροφές, αλλά είναι ιδιαίτερα άφθονα σε φρούτα με όξινη γεύση. Το καφεϊκό οξύ, το γαλλικό οξύ, το φερουλικό οξύ είναι μερικά κοινά φαινολικά οξέα.

Τα φλαβονοειδή είναι οι πολυπληθέστερες βιοφαινόλες στη διατροφή του ανθρώπου και μοιράζονται μια κοινή βασική δομή που χαρακτηρίζεται από δύο αρωματικούς δακτυλίους, οι οποίοι συνδέονται μαζί με τρία άτομα άνθρακα που σχηματίζουν έναν οξυγονωμένο ετερόκυκλο. Βιογενετικά, ο ένας δακτύλιος συνήθως προκύπτει από ένα μόριο ρεσορκινόλης και ο άλλος δακτύλιος προέρχεται από το μονοπάτι του σικιμικού. Έχουν εντοπιστεί πάνω από 4.000 είδη φλαβονοειδών, πολλά από τα οποία ευθύνονται για τους χρωματισμούς των λουλουδιών, των φρούτων και των φύλλων (117). Με βάση το τύπο του εμπλεκόμενου ετερόκυκλου, τα φλαβονοειδή μπορούν να χωριστούν σε έξι υποκατηγορίες: φλαβονόλες, φλαβόνες, φλαβανόνες, φλαβανόλες, ανθοκυανίνες και ισοφλαβόνες.

Τα στυλβένια, με πιο χαρακτηριστικό τη ρεσβερατρόλη, περιέχουν δύο φαινυλο-ομάδες που συνδέονται με μια γέφυρα μεθυλενίου. Τα στυλβένια στα φυτά δρουν ως αντιμυκητιακές ενώσεις και φυτοαλεξίνες, που συντίθενται μόνο ως αντίδραση σε λοίμωξη ή τραυματισμό.

Τέλος, οι λιγνάνες είναι δι-φαινολικές ενώσεις που περιέχουν τη δομή 2,3-διβενζυλοβουτανίου, το οποίο σχηματίζεται με διμερισμό δύο κατάλοιπων κινναμωμικού οξέος (114).



**Εικόνα 16** Χημικές δομές διάφορων τάξεων βιοφαινολών και οι κύριες διατροφικές πηγές τους. Πηγή: (118).

### Προστατευτικός ρόλος βιοφαινολών

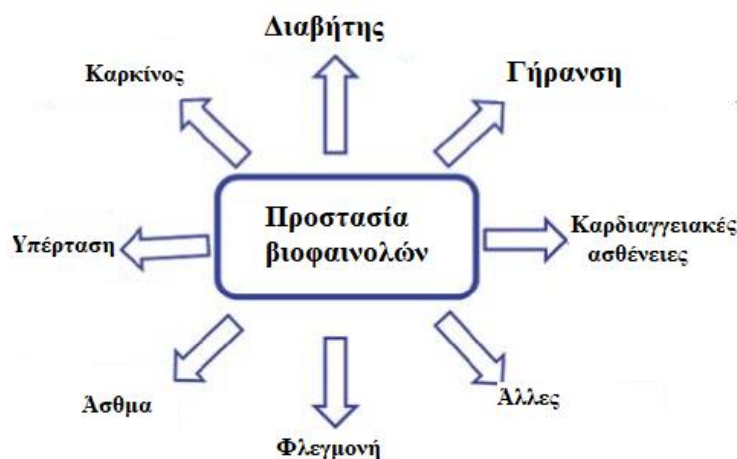
#### Στα φυτά

Τα περισσότερα φυτά συνθέτουν φαινυλοπροπανοειδή, συμπεριλαμβανομένων φλαβονοειδών και HCAs. Ωστόσο, η συσσώρευση φαινολών στα φυτά μπορεί να προκληθεί τόσο από αβιοτικές όσο και βιοτικές καταπονήσεις. Για παράδειγμα η

υπεριώδης ακτινοβολία, η υψηλή ηλιοφάνεια, οι χαμηλές θερμοκρασίες, οι τραυματισμοί, τα χαμηλά θρεπτικά συστατικά και τα παθογόνα (119). Το αβιοτικό στρες προάγει την παραγωγή ROS εντός των κυττάρων (120). Ωστόσο, εκτός από επίδραση στρεσογόνων παραγόντων, ROS σχηματίζονται και κατά τη διάρκεια του κανονικού μεταβολισμού των φυτών (121). Συνεπώς, οι φυτο-φαινόλες δουν προστατευτικά έναντι του στρες που προκαλείται στα φυτά.

Στον άνθρωπο

Διάφορες επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει μια αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ του κινδύνου χρόνιων ανθρώπινων ασθενειών και της κατανάλωσης διατροφής πλούσιας σε βιοφαινόλες (122,123). Οι φαινολικές ομάδες στις βιοφαινόλες μπορούν να πάρουν ένα ηλεκτρόνιο και να σχηματίσουν σχετικά σταθερές ρίζες φαινοξυλίου, διακόπτοντας έτσι τις αλυσιδωτές αντιδράσεις οξειδωσης στα κυτταρικά συστατικά (124). Τα πλούσια σε βιοφαινόλες τρόφιμα και ποτά μπορούν να αυξήσουν την αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος. Αυτή η αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος έπειτα από κατανάλωση τροφίμων πλούσιων σε βιοφαινόλες μπορεί να εξηγηθεί είτε από την παρουσία αναγωγικών βιοφαινολών και των μεταβολιτών τους στο πλάσμα, είτε από τις επιδράσεις τους στις συγκεντρώσεις άλλων αναγωγικών παραγόντων (εξοικονόμηση των βιοφαινολών σε άλλα ενδογενή αντιοξειδωτικά ) ή από την επίδρασή τους στην απορρόφηση των προ-οξειδωτικών συστατικών τροφίμων, όπως του σιδήρου (125,126). Στην Εικόνα 17 παρουσιάζονται οι ασθένειες στις οποίες έχει φανεί να ασκούν ενεργητική επίδραση η κατανάλωση βιοφαινολικών ενώσεων και τροφών πλούσιων σε αυτές.



Εικόνα 17 Πλειοτροπικά ευεργετικά αποτελέσματα για την υγεία των διαιτητικών φυτικών πολυφαινολών

#### Βιοδιαθεσιμότητα βιοφαινολών

Ως βιοδιαθεσιμότητα ορίζεται η αναλογία της θρεπτικής ουσίας που υποβάλλεται σε πέψη, απορροφάται και μεταβολίζεται μέσω φυσιολογικών οδών. Η βιοδιαθεσιμότητα της κάθε βιοφαινόλης διαφέρει, ωστόσο, δεν υπάρχει σχέση μεταξύ της ποσότητας βιοφαινολών στα τρόφιμα και της βιοδιαθεσιμότητάς τους στο ανθρώπινο σώμα. Γενικά, οι αγλυκόνες μπορούν να απορροφηθούν από το λεπτό έντερο. Ωστόσο, οι περισσότερες βιοφαινόλες απαντώνται στα τρόφιμα με τη μορφή εστέρων, γλυκοζιδίων ή πολυμερών που δεν μπορούν να απορροφηθούν σε φυσική μορφή (127). Πριν από την απορρόφηση, αυτές οι ενώσεις υδρολύονται με τη βοήθεια εντερικών ενζύμων ή μέσω της μικροχλωρίδας του εντέρου. Κατά τη διάρκεια της απορρόφησης, οι πολυφαινόλες υποβάλλονται σε εκτεταμένη τροποποίηση, αρχικά συζεύγγονται στα εντερικά κύτταρα προτού οδηγηθούν στο ήπαρ, όπου και υποβάλλονται σε μεθυλίωση, θείωση και γλυκουρονιδίωση (128). Κατά συνέπεια, οι μορφές που φθάνουν στο αίμα και τους ιστούς είναι διαφορετικές από αυτές που υπάρχουν στα τρόφιμα και είναι πολύ δύσκολο να εντοπιστούν όλοι τους οι μεταβολίτες αλλά και να γίνει αξιολόγηση της βιολογικής τους δραστηριότητας (129). Σημαντικό είναι ότι η χημική δομή των βιοφαινολών είναι αυτή που καθορίζει το ρυθμό, την έκταση της απορρόφησης και τη φύση των μεταβολιτών που κυκλοφορούν στο πλάσμα και όχι η συγκέντρωσή τους. Οι πιο συνηθισμένες βιοφαινόλες στη



διατροφή μας δεν είναι απαραίτητως εκείνες που εμφανίζουν την υψηλότερη συγκέντρωση δραστικών μεταβολιτών στους ιστούς-στόχους. Κατά συνέπεια, οι βιολογικές ιδιότητες των βιοφαινολών διαφέρουν σημαντικά από την μία βιοφαινόλη στην άλλη.

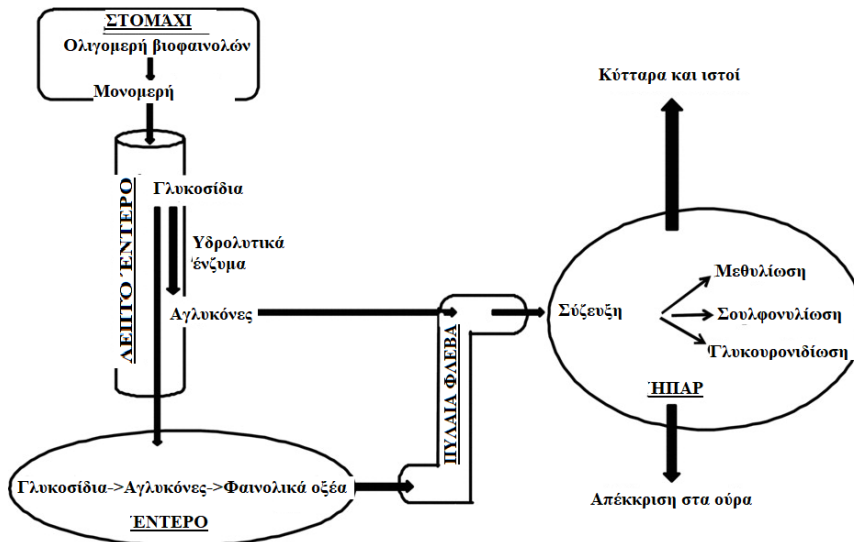
Οι βιοφαινόλες διαφέρουν επίσης στη θέση απορρόφησής τους στον άνθρωπο. Ορισμένες από τις βιοφαινόλες απορροφώνται καλά στην γαστρεντερική οδό, ενώ άλλες στο έντερο ή σε άλλο μέρος της πεπτικής οδού. Στα τρόφιμα, όλα τα φλαβονοειδή εκτός από τις φλαβανόλες υπάρχουν σε γλυκοζυλιωμένες μορφές. Η τύχη των γλυκοζιτών στο στομάχι δεν είναι ακόμη σαφής. Οι περισσότεροι από τους γλυκοζίτες αντέχουν κατά πάσα πιθανότητα στην όξινη υδρόλυση στο στομάχι και έτσι φθάνουν ανέπαφα στο έντερο, όπου μπορούν να απορροφηθούν μόνο αγλυκόνες και λίγοι γλυκοζίτες (130). Πειραματικές μελέτες που διεξήχθησαν σε αρουραίους έδειξαν ότι η απορρόφηση σε γαστρικό επίπεδο είναι δυνατή για μερικά φλαβονοειδή, όπως η κουρσετίνη, αλλά όχι για τους γλυκοζίτες (131). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί πρόσφατα, σε αρουραίους και ποντικούς, ότι οι ανθοκυανίνες απορροφώνται από το στομάχι (127,132). Επίσης, η χορήγηση καφέ σε αρουραίους φάνηκε να επηρεάζει την δραστηριότητα και την έκφραση διάφορων αντιοξειδωτικών ενζύμων σε όλους τους ιστούς και το αίμα. Σημαντικό, βέβαια είναι το γεγονός ότι επηρεάστηκαν και κάποια από τα ένζυμα του εγκεφάλου, το οποίο σημαίνει ότι κάποιες βιοφαινόλες έχουν πιθανόν την ικανότητα να διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (133). Στον Πίνακα 5 παρουσιάζονται οι κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν τη βιοδιαθεσιμότητα των διαιτητικών βιοφαινολών στον άνθρωπο.

**Πίνακας 5 Κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν τη βιοδιαθεσιμότητα των διαιτητικών βιοφαινολών στους ανθρώπους. Πηγή: (134).**

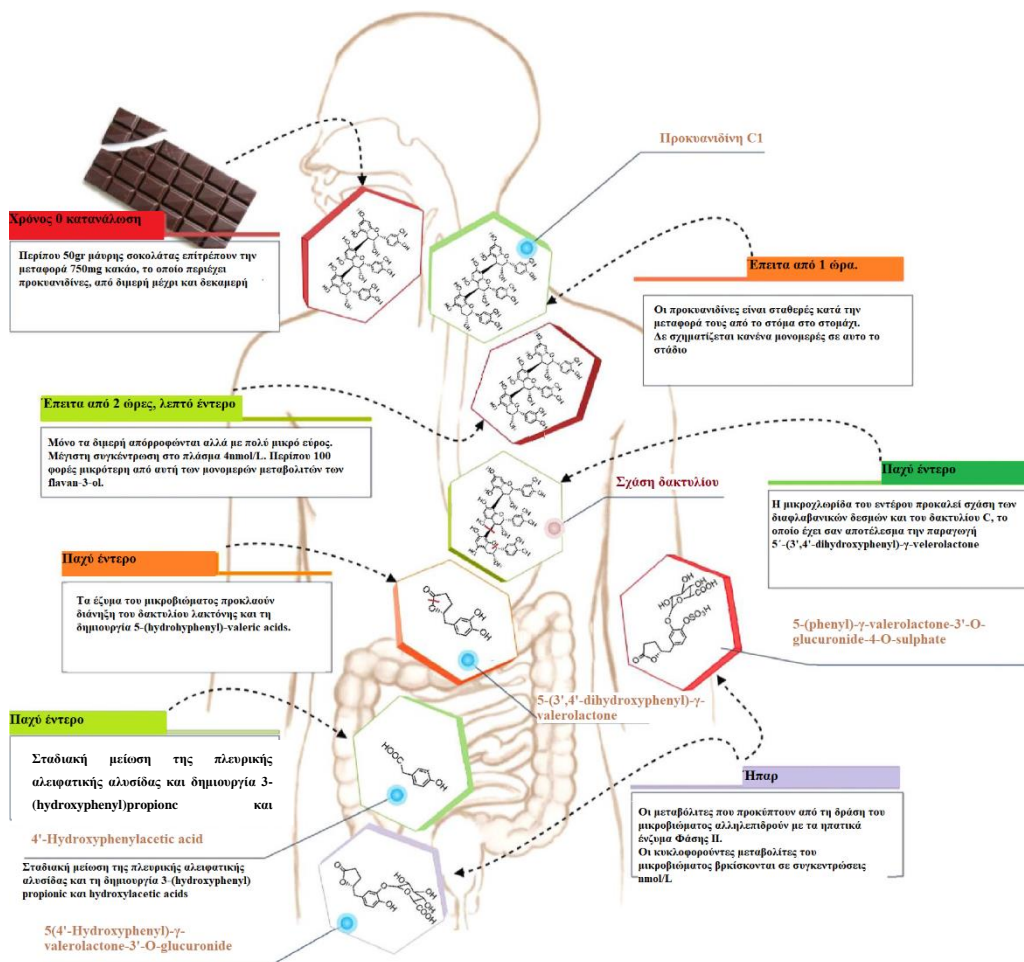
<b>Παράγοντες που αφορούν τις βιοφαινόλες.</b>	Χημική δομή, συγκέντρωση στη τροφή
<b>Παράγοντες που αφορούν την μορφή της τροφής.</b>	Υγρή, στερεή, ζωική ή φυτική προέλευσης, λιπαρά, φυτικές ίνες.
<b>Παράγοντες που αφορούν την επεξεργασία της τροφής.</b>	Θερμική επεξεργασία, λυοφιλίωση, ομογενοποίηση, αποθήκευση, μέθοδος μαγειρέματος
<b>Αλληλεπίδραση με άλλες ενώσεις.</b>	Πρωτεΐνες (π.χ. λευκοματίνη) ή αλληλεπιδράσεις με πολυφαινόλες με παρόμοιο μηχανισμό απορρόφησης
<b>Παράγοντες που σχετίζονται με τον ξενιστή.</b>	Εντερικοί παράγοντες, Ενζυμική δραστηριότητα, μικροβίωμα του εντέρου, παθολογικές καταστάσεις/διαταραχές/γενετικοί παράγοντες, φυσιολογικές συνθήκες
<b>Εξωτερικοί παράγοντες.</b>	Έκθεση σε διάφορα περιβάλλοντα, διαθεσιμότητα φαγητού.

Είναι σημαντικό να αναγνωριστούν οι κυκλοφορούντες μεταβολίτες, συμπεριλαμβανομένης της φύσης και των θέσεων των ομάδων σύζευξης επί της δομής των βιοφαινολών, καθώς οι θέσεις σύζευξης μπορούν να επηρεάσουν τις βιολογικές ιδιότητες τους. Οι μεταβολίτες των βιοφαινολών κυκλοφορούν στο αίμα όπου συνδέονται με πρωτεΐνες, ιδιαίτερα την αλβουμίνη (λευκωματίνη). Η αλβουμίνη παίζει σημαντικό ρόλο στη βιοδιαθεσιμότητα των βιοφαινολών. Η συγγένεια των βιοφαινολών με τη αλβουμίνη ποικίλλει ανάλογα με τη χημική τους δομή (135). Η δέσμευση στην αλβουμίνη μπορεί να έχει συνέπειες στον ρυθμό κάθαρσης των μεταβολιτών και για την μεταφορά τους σε κύτταρα και ιστούς. Τέλος, δεν είναι ακόμη σαφές εάν οι βιοφαινόλες πρέπει να είναι στην ελεύθερη μορφή για να ασκήσουν τη βιολογική τους δράση ή αν οι συνδεδεμένες με αλβουμίνη βιοφαινόλες μπορούν να ασκήσουν κάποια βιολογική δράση (136,137).

Η συσσώρευση των βιοφαινολών στους ιστούς είναι η πιο σημαντική φάση του μεταβολισμού τους, καθώς αυτή η συγκέντρωση έχει βιολογική δράση. Μελέτες έχουν δείξει ότι οι βιοφαινόλες είναι ικανές να διεισδύσουν στους ιστούς, ιδιαίτερα σε εκείνους στους οποίους μεταβολίζονται όπως το έντερο και το ήπαρ. Η απέκκριση των βιοφαινολών και των παραγώγων τους συμβαίνει μέσω ούρων και χολής. Έχει παρατηρηθεί ότι οι εκτεταμένα συζευγμένοι μεταβολίτες είναι πιθανότερο να απορριφθούν από τη χολή, ενώ χαμηλού βαθμού συζευγμένες βιοφαινόλες, όπως τα μονοθεϊκά, εκκρίνονται κατά προτίμηση στα ούρα. Η ποσότητα των μεταβολιτών που απεκκρίνονται στα ούρα συσχετίζεται περίπου με τις μέγιστες συγκεντρώσεις στο πλάσμα. Έτσι, οι ευεργετικές για την υγεία επιδράσεις των βιοφαινολών εξαρτώνται τόσο από την πρόσληψη όσο και από τη βιοδιαθεσιμότητα (127). Στην Εικόνα 18 απεικονίζεται το μονοπάτι απορρόφησης βιοφαινολών. Στην Εικόνα 19 παρουσιάζεται ένα παράδειγμα απορρόφησης των βιοφαινολών της μαύρης σοκολάτας.



Εικόνα 18 Μονοπάτι απορρόφησης βιοφαινολών. Πηγή: (134)



Εικόνα 19 Παράδειγμα απορρόφησης βιοφαινολών της μαύρης σοκολάτας. Πηγή:(138).

Παρουσία και επίπεδα βιοφαινολών στα φυτικά προϊόντα.

Η κατανομή των φαινολικών ενώσεων στους φυτικούς ιστούς, και στα κυτταρικά και υποκυτταρικά όργανα δεν είναι ομοιόμορφη. Τα αδιάλυτα φαινολικά βρίσκονται κυρίως στα κυτταρικά τοιχώματα, ενώ τα διαλυτά φαινολικά υπάρχουν στα κενοτόπια των φυτικών κυττάρων (139). Επίσης, δεν υπάρχει η παρουσία όλων των βιοφαινολών σε όλα τα φυτικά είδη. Ορισμένες βιοφαινόλες, όπως η κερκετίνη, βρίσκονται σε όλα τα φυτικά προϊόντα όπως φρούτα, λαχανικά, δημητριακά, χυμούς φρούτων, τσάι, κρασί κλπ., ενώ οι φλαβανόνες και οι ισοφλαβόνες είναι χαρακτηριστικές σε συγκεκριμένα τρόφιμα. Στις περισσότερες περιπτώσεις, τα τρόφιμα περιέχουν σύνθετα μείγματα βιοφαινολών. Τα εξωτερικά στρώματα των φυτών περιέχουν υψηλότερα επίπεδα φαινολικών ενώσεων συγκριτικά με εκείνα που βρίσκονται στα εσωτερικά μέρη (140).

Πολλοί παράγοντες επηρεάζουν την περιεκτικότητα των φυτών σε βιοφαινόλες, όπως ο βαθμός ωριμότητας κατά τη συγκομιδή, οι περιβαλλοντικοί παράγοντες, η επεξεργασία και η αποθήκευση. Η περιεκτικότητα των τροφίμων σε βιοφαινόλες επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από περιβαλλοντικούς παράγοντες καθώς και από εδαφικούς παράγοντες όπως ο τύπος εδάφους, η έκθεση στον ήλιο, οι βροχοπτώσεις κλπ. Το στάδιο ωριμότητας επηρεάζει σημαντικά τις συγκεντρώσεις και τις αναλογίες διαφόρων βιοφαινολών (141). Γενικά, έχει παρατηρηθεί ότι η περιεκτικότητα σε φαινολικά οξέα μειώνεται κατά την ωρίμανση, ενώ οι συγκεντρώσεις ανθοκυανίνης αυξάνονται. Πολλές βιοφαινόλες, ειδικά τα φαινολικά οξέα, εμπλέκονται άμεσα στην απόκριση των φυτών σε διαφορετικούς τύπους στρες, συμβάλλουν στην επούλωση κατεστραμμένων περιοχών, διαθέτουν αντιμικροβιακές ιδιότητες και συνεπώς οι συγκεντρώσεις τους μπορεί να αυξηθούν μετά από κάποια μόλυνση, τραυματισμό, αυξημένη θερμοκρασία/ηλιοφάνεια/ακτινοβολία (142).

Επιπλέον παράγοντας που επιδρά άμεσα την περιεκτικότητα των τροφίμων σε βιοφαινόλες είναι η αποθήκευση, κατά την οποία οξειδώνονται (143). Οι αντιδράσεις οξειδωσης οδηγούν στον σχηματισμό περισσότερων ή λιγότερων πολυμερισμένων ουσιών, οι οποίες οδηγούν σε αλλαγές στην ποιότητα των τροφίμων, ιδιαίτερα στο χρώμα και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Τέτοιες αλλαγές μπορεί να είναι επωφελείς, όπως συμβαίνει στο μαύρο τσάι ή επιβλαβείς, όπως στο μαύρισμα των φρούτων. Η αποθήκευση αλεύρου σίτου έχει ως αποτέλεσμα την σημαντική απώλεια

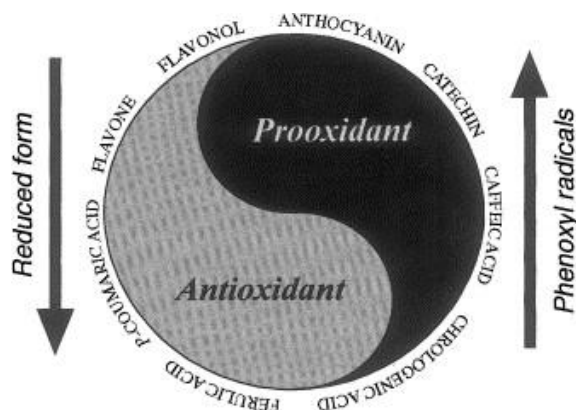
φαινολικών οξέων . Μετά από έξι μήνες αποθήκευσης, το αλεύρι έχει ποιοτικά τα ίδια φαινολικά οξέα, αλλά οι συγκεντρώσεις τους είναι 70% χαμηλότερες σε σχέση με τις νωπό προϊόν. Η αποθήκευση σε χαμηλές θερμοκρασίες (ψυγείο, κατάψυξη), αντίθετα, έχει μικρή επίδραση στην περιεκτικότητα των βιοφαινολών, όπως έχει φανεί σε μήλα, αχλάδια και κρεμμύδια. Τέλος, τρόπος μαγειρέματος έχει επίσης σημαντική επίδραση στη συγκέντρωση των βιοφαινολών. Τα κρεμμύδια και οι ντομάτες χάνουν περίπου 75-80% της αρχικής περιεκτικότητάς τους σε κερκετίνη μετά από βρασμό για 15 λεπτά, 65% μετά το μαγείρεμα σε φούρνο μικροκυμάτων και 30% μετά το τηγάνισμα (144).

#### Αμφιλεγόμενη δράση βιοφαινολών: «Παράδοξο»

Ο ορισμός της βιοφαινόλης, η λειτουργία στο φυτό, η λειτουργία στους ανθρώπους και οι μηχανισμοί δράσης είναι όλα αμφισβητούμενα ζητήματα. Για μεγάλο χρονικό διάστημα, οι βιοφαινόλες θεωρούνταν ως μη θρεπτικά συστατικά (anti-nutrients) καθώς συνδέονται με πρωτεΐνες και μειώνεται η βιοδιαθεσιμότητα τους (145). Σήμερα, οι βιοφαινόλες κατηγοριοποιούνται ως σημαντικά μικροθρεπτικά συστατικά (micronutrients) (146). Μία από τις πιο ενδιαφέρουσες αντιπαραθέσεις είναι αν οι βιοφαινόλες δρουν αντιοξειδωτικά ή προ-οξειδωτικά. Ο Barry Halliwell υποστηρίζει το «αντίθετο στρατόπεδο» (90,147,148), καθώς οι περισσότερες *in vitro* δοκιμασίες για τον έλεγχο της αντιοξειδωτικής δράσης δεν συνάδουν με τα πραγματικά βιολογικά συστήματα (149). Επιπλέον, οι συγκεντρώσεις βιοφαινολών στις *in vivo* παρεμβάσεις, δεν είναι αρκετά υψηλές ώστε να παρουσιάζουν οποιαδήποτε βιολογική αντιοξειδωτική δράση στους ιστούς. Εξαιρεση αποτελεί η γαστρεντερική οδός, όπου επιτυγχάνεται η υψηλότερη συγκέντρωση βιοφαινολών, όπου και δρουν προ-οξειδωτικά παράγοντας ROS (150). Οι έρευνες ωστόσο έχουν δείξει πως οι ROS, εκτός από τις βλαπτικές επιδράσεις στα βιομόρια, έχουν πολύ σημαντικό, ωφέλιμο και προστατευτικό ρόλο στα κύτταρα (90). Παραδόξως, οι βιοφαινόλες μπορούν να ασκήσουν κυτταροπροστατευτικά αποτελέσματα παράγοντας ένα ήπιο οξειδωτικού στρες, το οποίο μπορεί να επάγει την ενεργοποίηση του ενδογενούς αντιοξειδωτικού αμυντικού συστήματος (150). Ως εκ τούτου, επισημαίνει τις βιοφαινόλες ως «προ-

οξειδωτικά» και υποδηλώνει ότι η υπερκατανάλωση τους μπορεί να προκαλέσει μείωση έκφρασης/δράσης των ενδογενών αντιοξειδωτικών (148).

Συμπερασματικά, οι ανηγμένες μορφές των φυτοφαινολών έχουν αντιοξειδωτική δράση. Αντίθετα, η ρίζες φαινοξυλίου που παράγονται μέσω αντιοξειδωτικών αντιδράσεων πιθανόν δρουν προοξειδωτικά. Κάτω από κανονικές συνθήκες οι ρίζες φαινοξυλίου συνήθως δεν παρουσιάζουν επιβλαβή προοξειδωτική δράση, καθώς μετατρέπονται ταχέως σε μη ριζικά προϊόντα με αντιδράσεις πολυμερισμού ή ενζυμικής αναγωγής των ριζών. Ωστόσο, οι ρίζες φαινοξυλίου παρουσιάζουν κυτταροτοξική/προοξειδωτική δραστηριότητα όταν ο χρόνος ημιζωής τους παρατείνεται (spin stabilization) (114). Στην Εικόνα 20 φαίνεται το σύμβολο Yin-Yang, όπου παρομοιάζεται η ισορροπία μεταξύ των αντιοξειδωτικών και των προοξειδωτικών χαρακτηριστικών των φυτοφαινολών.



**Εικόνα 20** Το σύμβολο Yin-Yang παρομοιάζει την ισορροπία μεταξύ των αντιοξειδωτικών και των προοξειδωτικών χαρακτηριστικών των φυτοφαινολών. Αν και η ανηγμένη μορφή δρα αντιοξειδωτικά, η οξειδωμένη μορφή (ρίζες φαινοξυλίου), μπορεί να εμφανίζουν προοξειδωτική δράση, υπό συνθήκες που παρατείνουν τη διάρκεια ζωής των ριζών. Πηγή: (114).

## 1.5. Ελαιόλαδο

Ιστορική αναδρομή

Η ελιά ήταν ενδημική στη Μικρά Ασία και εξαπλώθηκε από το Ιράν, τη Συρία και την Παλαιστίνη στην υπόλοιπη Μεσογειακή λεκάνη πριν από 6.000 χρόνια. Είναι

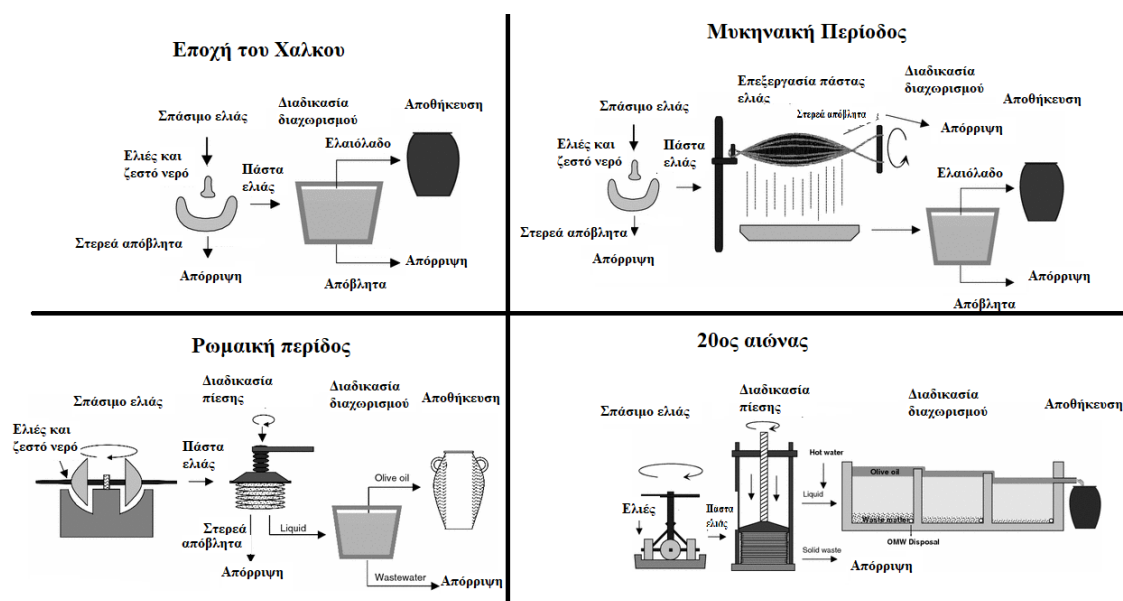
ένα από τα παλαιότερα γνωστά καλλιεργημένα δέντρα στον κόσμο, που καλλιεργούνται πριν την εφεύρεση της γραπτής γλώσσας. Αναπτύχθηκε στην Κρήτη το 3000 π.Χ. και αποτέλεσε την πιο σημαντική πηγή πλούτου του μινωικού βασιλείου (151). Οι Φοίνικες συνέβαλαν στην εξάπλωση της ελιάς στις μεσογειακές ακτές της Αφρικής και της Νότιας Ευρώπης. Ελιές βρέθηκαν σε αιγυπτιακούς τάφους από το 2.000 π.Χ. Η ελαιοκαλλιέργεια εξαπλώθηκε στους αρχαίους Έλληνες και στη συνέχεια στους Ρωμαίους.

Πριν από 1.400 χρόνια, ο προφήτης του Ισλάμ, ο Μωάμεθ, συμβούλευσε τους οπαδούς του να χρησιμοποιούν ελαιόλαδο στο σώμα τους και ο ίδιος χρησιμοποίησε λάδι στο κεφάλι του. Η χρήση του λαδιού βρίσκεται σε πολλές θρησκείες και πολιτισμούς. Χρησιμοποιήθηκε κατά τη διάρκεια ειδικών τελετών καθώς και γενικού μέτρου υγείας. Κατά τη διάρκεια της βάπτισης στη Χριστιανική εκκλησία, χρησιμοποιείται ακόμα και σήμερα το ελαιόλαδο («ιερό λάδι»), για να δώσει το χρίσμα στο νέο Χριστιανό. Το ελαιόλαδο χρησιμοποιήθηκε για να χρίσει τους πρώτους βασιλιάδες των Ελλήνων και των Εβραίων.

Σύμφωνα με τον Όμηρο, το λάδι ελιάς ή το «χρυσό υγρό», κατά την αρχαιότητα εκτός από τροφή, ήταν φάρμακο, πηγή μαγείας, δύναμης και έμβλημα καθαγιασμού και αγνότητας. Λεπτομερώς, στην αρχαία Ελλάδα, οι αθλητές και οι πολεμιστές το άλειψαν στο κορμί τους, με την πεποίθηση ότι θα τους χαρίσει ενέργεια και τύχη. Το λάδι διαμορφώθηκε ως διατροφικό προϊόν με την πάροδο του χρόνου ως συστατικό των περισσότερων φαγητών και αρτημάτων. Ενώ χρησιμοποιούνταν και για την επεξεργασία του λίνου και των ενδυμάτων. Στην εποχή του Σόλωνα όπου η καλλιέργεια του ελαιόλαδου έγινε συστηματική, θεσμοθετήθηκαν νόμοι σχετικά με την κυκλοφορία του. Στον Ιπποκράτειο Κώδικα απαντώνται πάνω από 60 φαρμακευτικές συνταγές του ελαιόλαδου, με τις πιο σημαντικές να αφορούν δερματικές παθήσεις. Επιπλέον γίνεται σαφής διαχωρισμός του ελαιόλαδου από άλλα έλαια, το οποίο σε συνδυασμό με σίτο και κρασί, διαμορφώνουν το θεμέλιο της ιπποκρατικής διατροφής. Στο βιβλίο του «Διαιτητική και Θεραπευτική», ο Ιπποκράτης γράφει για το λάδι: *«Οι ασκήσεις στη σκόνη και οι ασκήσεις με λάδι διαφέρουν στο εξής: Η σκόνη είναι κρύα, το λάδι είναι ζεστό. Το χειμώνα το λάδι ευνοεί περισσότερο την ανάπτυξη, γιατί εμποδίζει την ψυχρότητα να απομακρυνθεί από το σώμα. Το καλοκαίρι το λάδι με την παραγωγή λιώνει τη σάρκα καθώς αυτή ζεσταίνεται λόγω εποχής... Η εντριβή με λάδι και νερό μαλακώνει το σώμα και δεν το αφήνει να ζεσταθεί υπερβολικά».*

Η καλλιέργεια του ελαιολάδου χρονολογείται πριν από περίπου 6.000 χρόνια στην περιοχή της Μεσογείου, ενώ απολιθώματα ελιάς 20 εκτατ. χρόνων ανακαλύφθηκαν στο Λιβόρνο της Ιταλίας. Σχετικά με τον Ελλαδικό χώρο, η καλλιέργεια του πιθανολογείται ότι ξεκίνησε στην Κρήτη πριν από 3.500 χρόνια. Σύμφωνα με τα αρχαιολογικά ευρήματα που επιτέλεσε στο πρωτοκυκλαδικό ΙΙ (2.700-2.300 π.Χ.) νεκροταφείο Σπεδού το 1903 ο Κλωνός Στέφανος, μαρτυρεί την εύρεση ενός επάργυρου πήλινου αγγείου με ίχνη ελαιολάδου καθώς και ενός λύχνο ελαίου (*Πρακτικά Αρχαιολογικής Εταιρείας ΠΑΕ 1903 & 1906*). Το οποίο επιβεβαιώθηκε και την έρευνα στο χημείο του Εθνικού Πανεπιστημίου υπό τον καθηγητή Κ. Ζεγγέλη (152).

Η συστηματική παραγωγή του ελαιολάδου δημιούργησε προσοδοφόρο έδαφος για τη δημιουργία μία ολοένα εξελισσόμενης τεχνολογίας. Έτσι οι πέτρες έδωσαν τη θέση τους στους ληνούς και μετέπειτα στους ελαιόμυλους. Έτσι η μάλλαξη της ζύμης με τα χέρια διήλθε στη συμπίεση με το λοστό της Θηρασίας, στο πιεστήριο της κλασικής εποχής, τον ατέρμονα κοχλία του Ήρωνα για να ωριμάσει με τους οργανωμένους πλέον «ληνεώνας» Εικόνα 21 (153).



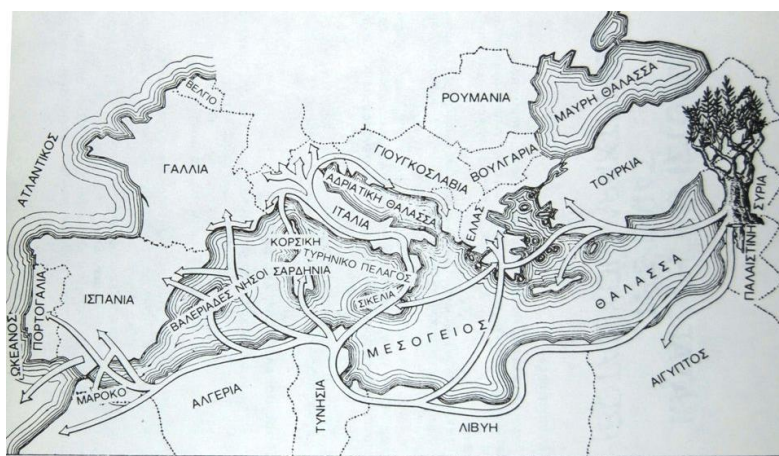
**Εικόνα 21** Συστήματα παραγωγής ελαιόλαδου και αποβλήτων ελαιουργείας στις διάφορες χρονολογικές εποχές. Πηγή: (153).

Τα ελαιόδεντρα στο «Όρος των Ελαιών» στην Ιερουσαλήμ φημολογούνται ότι έχουν ηλικία άνω των 2000 ετών με άγνωστη ποικιλία μέχρι σήμερα. Περισσότερα από



30 είδη ελαιόδεντρων είναι γνωστά (154). Ωστόσο, η προέλευση του είδους υπήρξε αντικείμενο πολλών συζητήσεων (155). Ο άνθρωπος καλλιεργούσε την ελιά για πολλές χιλιάδες χρόνια συνεπώς δεν είναι σαφές ποιες ποικιλίες προήλθαν από ποιες. Οι ποικιλίες σε μια χώρα έχουν βρεθεί ότι είναι πανομοιότυπες με διαφορετικές ονομασίες σε μια άλλη. Στην Μέση Ανατολή εξακολουθούν να υπάρχουν ελιές "άγριων" θάμνων και αντιπροσωπεύουν το αρχικό δέντρο από το οποίο προέρχονται όλες οι άλλες ελιές. Άλλες μελέτες, αναφέρουν πως υπάρχουν απολιθώματα που χρονολογούνται πριν από ένα εκατομμύριο χρόνια, τα οποία αποδεικνύουν την ύπαρξη ενός προγόνου της ελιάς στην Ιταλία (156) . Τα τελευταία χρόνια, η ελιά εξαπλώθηκε στη Βόρεια και Νότια Αμερική, την Ιαπωνία, τη Νέα Ζηλανδία και την Αυστραλία.

Σήμερα, καταμετρούνται περίπου 800.000.000 ελαιόδεντρα σε όλο τον κόσμο, και τα περισσότερα (95%) να βρίσκονται στη λεκάνη της Μεσογείου. Τα δέντρα ελιάς καλλιεργούνται ευρήτατα στον Ελλαδικό χώρο, περισσότερο από οποιοδήποτε άλλο σποροφόρο δένδρο, καθώς αντιστοιχούν στο 75% της συνολικής καλλιέργειας δέντρων ενώ απαντώνται στο 15% της γεωργικής γης.



**Εικόνα 22 Καταγωγή και διάδοση της ελιάς. Διάγραμμα εξαπλώσεως της ελαιοκαλλιέργειας στις χώρες της Μεσογείου. Πηγή: <https://slideplayer.gr/slide/2534729/>.**



**Εικόνα 23 Η θεά Αθηνά φυτεύει ελιά στον λόφο της Ακρόπολης.**  
Πηγή: <http://www.islands.us/greek-food/use-of-olive-oil/>.

Η Αθήνα έλαβε το όνομά της από τη θεά Αθηνά που έδωσε την ελιά στους Έλληνες ως προσφορά. Ο Δίας είχε διαβεβαιώσει πως θα χαρίσει την Αττική στον θεό ή στη θεά που έκανε την πιο ωφέλιμη ανακάλυψη. Το δώρο της Αθηνάς η ελιά, χρήσιμο για το φως, τη θερμότητα, το φαγητό, το φάρμακο και το άρωμα, επιλέχθηκε ως μια πιο ειρηνική εφεύρεση, από το άλογο του Ποσειδώνα, που χαρακτηρίστηκε ως ένα γρήγορο και ισχυρό εργαλείο πολέμου. Η Αθηνά φύτεψε την αρχική ελιά σε ένα βραχώδη λόφο που γνωρίζουμε σήμερα ως Ακρόπολη (Εικόνα 23). Η ελιά που φύεται εκεί σήμερα φημολογείται ότι προέρχεται από τις ρίζες του αρχικού δέντρου.



**Εικόνα 24 Ο Νώε με το κιβωτό και το περιστέρι με το κλαδί της ελιάς.**

Στην ιστορία του κατακλυσμού, στην Παλαιά Διαθήκη, ο Νώε απελευθέρωσε ένα περιστέρι, το οποίο επέστρεψε κρατώντας ένα κλαδί ελιάς, ένα σημάδι της εύρεσης στεριάς και ένα σύμβολο της αποκατάστασης της ειρήνης μεταξύ Θεού και ανθρώπων (153).

## Ορισμός

Ελαιόλαδο είναι το λάδι που προκύπτει από τους καρπούς της ελιάς (*Olea europaea*). Με βάση με την ισχύουσα ποιοτική κατάταξη «παρθένο ελαιόλαδο είναι το έλαιο που παραλαμβάνεται μόνο με μηχανικές /άλλες φυσικές μεθόδους επεξεργασίες, σε συνθήκες που δεν αλλοιώνουν το ελαίο, ενώ δεν έχουν υποβληθεί σε καμία κατεργασία, εκτός της πλύσης, της μετάγγισης, της φυγοκέντρωσης και της διήθησης. Εξαιρέση αποτελούν τα έλαια που παραλαμβάνονται με διαλύτες και έχουν υποστεί χημική ή βιοχημική επεξεργασία, με τεχνικές επανεστεροποίησης ή πρόσμιξης με έλαια άλλης φύσης». Συνεπώς, το παρθένο ελαιόλαδο, είναι το λάδι «φυσικός χυμός», το οποίο περιέχει άθικτα όλα τα βασικά συστατικά της ελιάς (βιταμίνες, ιχνοστοιχεία, μικροστοιχεία) άρα και εκείνο που έχει όλα τις ωφέλιμα χαρακτηριστικά για την υγεία.

(Κώδικας Τροφίμων, Ποτών και Αντικειμένων Κοινής Χρήσης, Άρθρο 71, παράγραφος 1).



## **Εικόνα 25 Ελαιόλαδο και επιτραπέζιες ελιές.**

### Κατηγορίες ελαιόλαδων

Τα παρθένα ελαιόλαδα διαχωρίζονται ανάλογα με την περιεκτικότητά τους σε ελεύθερα λιπαρά οξέα (οξύτητα):

- Εξαιρετικό Παρθένο Ελαιόλαδο: Το καλύτερο ποιοτικά λάδι με οξύτητα  $\leq 0,8\%$
- Παρθένο Ελαιόλαδο: οξύτητα  $\leq 2,0\%$ .
- Ελαιόλαδο Λαμπάντε: οξύτητα  $> 2,0\%$  (ακατάλληλο για βρώση).
- Μειονεκτικό παρθένο ελαιόλαδο: μέτρια ποιότητα, οξύτητα  $> 2\%$ .
- Μείγμα ελαιόλαδου από εξευγενισμένα και παρθένα ελαιόλαδα: οξύτητά  $\sim 1\%$ .
- Ραφιναρισμένο ελαιόλαδο: οξύτητα  $\sim 0,3\%$ .
- Πυρηνέλαιο: προέρχεται από την ανάμειξη ραφιναρισμένου πυρηνέλαιου και παρθένου ελαιόλαδου.
- Αγουρέλαιο: το πρώτο λάδι της ελιάς.

### Χημική σύσταση ελαιόλαδου

Η βασική χημική σύσταση του ελαιόκαρπου είναι: νερό (50%), έλαιο (22%), πρωτεΐνες (1.6%), σάκχαρα (19.1%), κυτταρίνη (5.8%) και ανόργανα συστατικά (1.5%). Άλλα βασικά στοιχεία των ελαιόκαρπων είναι πηκτίνες, οργανικά οξέα, χρωστικές (χλωροφύλλες, καροτενοΐδη, ανθοκυανίνες), και γλυκοζίδια των φαινολών (ολευρωπεΐνη). Στους ελαιόκαρπους έχουν επίσης ανιχνευθεί και ένζυμα, όπως κυτταρινάσες, χλωροφυλλάσες, πολυγαλακτουρονάση, πηκτινестεράση, λιπάσες, λιποξυγενάση (LOX), φαινολοξειδάση (PO) και υπεροξειδάση (POD). Το 96-98% του ελαιόλαδου βρίσκεται στο μεσοκάρπιο (157,158).

Οι λιπαρές ύλες, όπως και το ελαιόλαδο, κατά βάση αποτελούνται από τριακυλογλυκερόλες. Εκτός από τις τριακυλογλυκερόλες, το ελαιόλαδο περιέχει και άλλα δευτερεύοντα συστατικά καθοριστικά για τη σταθερότητα, το άρωμα του. Ο ποσοτικός προσδιορισμός αυτών των συστατικών, τα οποία βρίσκονται σε χαμηλότερη συγκέντρωση συγκριτικά με τις τριάκυλογλυκερόλες, είναι υψίστης σημασίας για την ταυτοποίηση των διαφόρων τύπων ελαιόλαδου (156). Αυτά τα συστατικά είτε πηγάζουν από τον ελαιόκαρπο είτε δημιουργούνται κατά την παραλαβή του ελαιόλαδου (159), και είναι τα λεύθερα λιπαρά οξέα (προϊόντα υδρόλυσης των τριγλυκεριδίων), μονο- και διακυλογλυκερόλες, φωσφολιπίδια, στερόλες, αλειφατικές αλκοόλες, φαινόλες, τοκοφερόλες, χρωστικές, πτητικές οργανικές ενώσεις, και διάφορες ρητινοειδείς και ζελατινοειδείς ουσίες.

Τα στοιχεία του ελαιόλαδου διαχωρίζονται σε σαπωνοποιήσιμα (ακυλογλυκερόλες, φωσφολιπίδια, ελεύθερα λιπαρά οξέα, κ.α.) και μη σαπωνοποιήσιμα (υδρογονάνθρακες, αλειφατικές αλκοόλες, στερόλες, φαινόλες, κ.α.). Το 98 - 99,5% περίπου των συστατικών είναι σαπωνοποιήσιμα και το υπόλοιπο μη σαπωνοποιήσιμα. Ωστόσο, είναι σημαντικό το γεγονός ότι ενώ το μη σαπωνοποιήσιμο κλάσμα είναι ποσοτικά πολύ μικρότερο, τα συστατικά που περιλαμβάνονται σε αυτό διαδραματίζουν σημαντικό διατροφικό και βιολογικό ρόλο (156).

Συνθήκες εδάφους και θερμοκρασίας ανάπτυξης ελαιόδεντρου.

Η ελιά φυτρώνει στις περισσότερες κατηγορίες εδαφών, με εξαίρεση εδάφη που κατακρατούν υγρασία ή σε εδάφη με  $6,5 < \text{pH} < 8,5$ , τα πολύ όξινα εδάφη δεν είναι ιδανικά. Η ελιά ευδοκίμει σε εδάφη με καλή περιεκτικότητα σε ασβέστιο και βόριο καθώς και καλή εξασφάλιση αποθεμάτων νερού. Ενώ για να είναι παραγωγικό το δέντρο ελιάς η κατάλληλη μέση ετήσια θερμοκρασία θα πρέπει να κυμαίνεται στους  $15 - 20^{\circ}\text{C}$ . Με ανώτερη θερμοκρασία τους  $40^{\circ}\text{C}$  και η μικρότερη τους  $-7^{\circ}\text{C}$ .

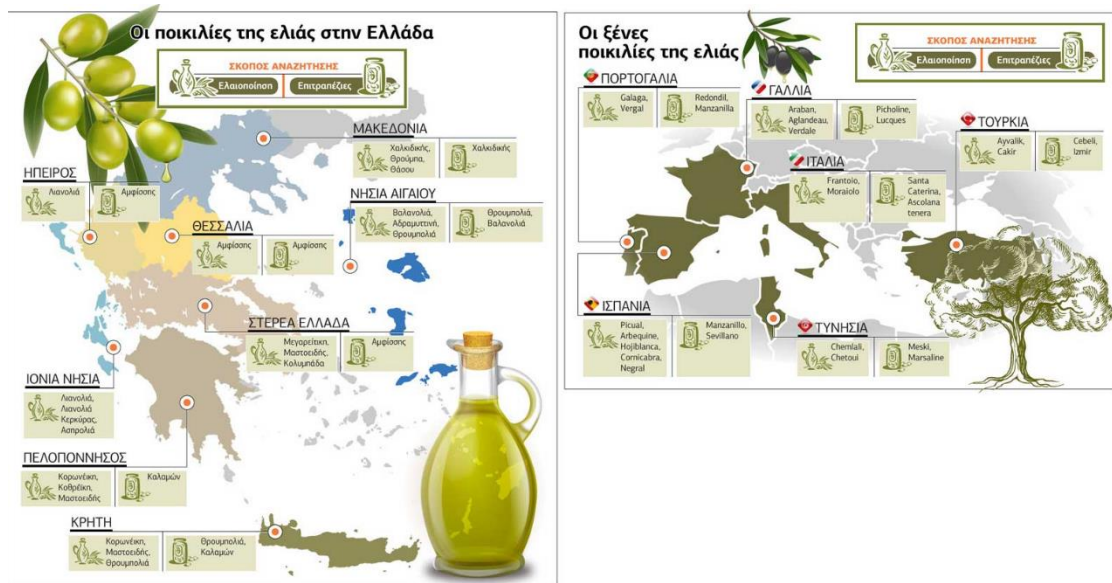
Θερμικά κριτήρια της ελιάς	
ΣΤΑΔΙΟ ΒΛΑΣΤΗΣΕΩΣ	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ ( $^{\circ}\text{C}$ )
Ληθαργική περίοδος (κίνδυνος ισχυρού παγετού)	$-12^{\circ}$ έως $-10^{\circ}$
Διακοπή ληθαργικής περιόδου (κίνδυνος παγετού)	$-7^{\circ}$ έως $-5^{\circ}$
Αναστολή βλαστήσεως	$9^{\circ}$ έως $10^{\circ}$
Ανάπτυξη ανθοταξιών	$14^{\circ}$ έως $15^{\circ}$
Άνθηση	$18^{\circ}$ έως $19^{\circ}$
Καρπόδεση	$21^{\circ}$ έως $22^{\circ}$
Αναστολή βλαστήσεως	$35^{\circ}$ έως $38^{\circ}$
Κίνδυνος εγκαυμάτων	Πάνω από $40^{\circ}$

Ενδεικτικές θερμικές απαιτήσεις της ανάπτυξης της ελιάς (οι θερμοκρασίες αυτές αποκλίνουν ανάλογα με την ποικιλία)  
ΠΗΓΗ: Lousseret et Brousse, 1978

## Εικόνα 26 Θερμικά κριτήρια ελιάς.

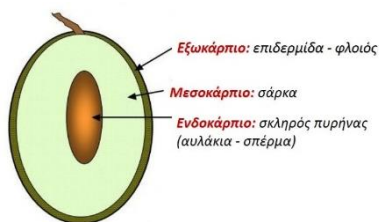
### Ποικιλίες ελιάς

Στην **Εικόνα 27** παρουσιάζονται οι ποικιλίες ελιάς στην Ελλάδα και το εξωτερικό, τόσο οι ελαιοποιήσιμες όσο και οι επιτραπέζιες.



**Εικόνα 27 Οι ποικιλίες ελιάς στη Ελλάδα και στο εξωτερικό. Πηγή:** <https://myoliveplant.gr/elainvas/poikilies-elias/>.

Παραλαβή ελαιόλαδου από τον καρπό



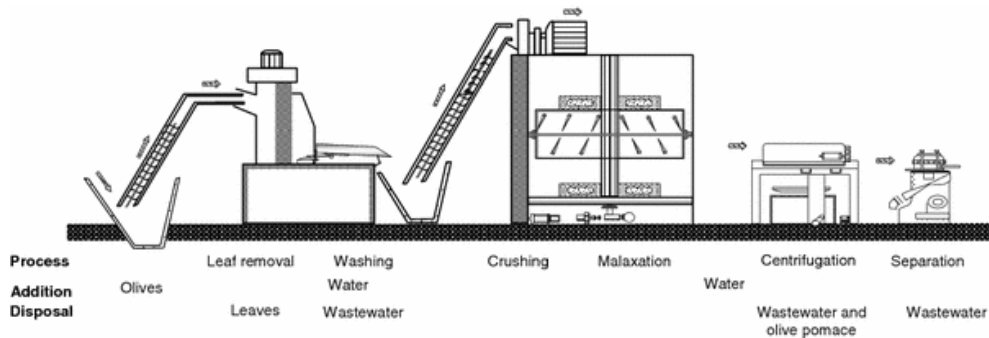
**Εικόνα 28 Μορφολογία**

Το ελαιόλαδο υπάρχει με τη μορφή μικρών σταγόνων στα κενोटόπια των κυττάρων του μεσοκάρπιου στον καρπό της ελιάς. Επίσης, διασκορπίζεται σε μικρότερο βαθμό στο κολλοειδές σύστημα του κυτταροπλάσματος του κυττάρου και σε μικρότερο βαθμό στο επικάρπιο και στο ενδοσπέρμιο (Εικόνα 28). Για να απελευθερωθεί το μεγαλύτερο μέρος

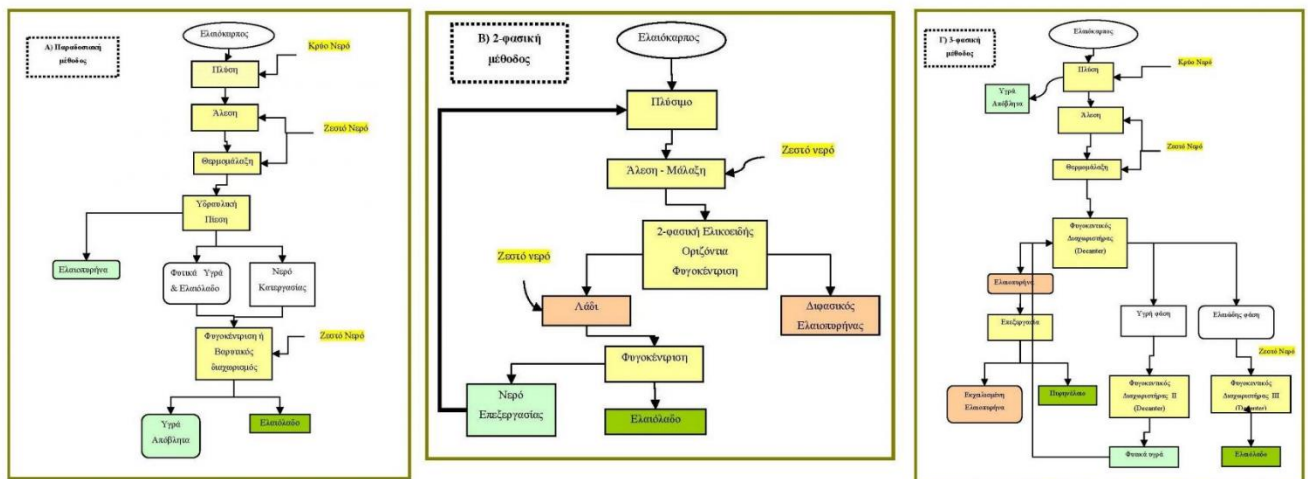
του ελαίου που υπάρχει στην ελιά κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας, είναι απαραίτητο να χρησιμοποιηθεί νερό σε διάφορα στάδια. Το νερό χρησιμοποιείται για πλύσιμο, ανάμιξη (όταν οι ελιές είναι εντελώς στεγνές) και αραίωση της πάστας και για τον τελικό διαχωρισμό του ελαιόλαδου. Το νερό που χρησιμοποιείται στα στάδια αυτά αντιστοιχεί στο 10%, 40% και 20% του αρχικού βάρους του ελαιόλαδου, αντίστοιχα. Από 5 κιλά ελιές παράγεται περίπου μετά την επεξεργασία 1 κιλό ελαιόλαδου.

Τα κύρια στάδια επεξεργασίας που απαιτούνται για την παραγωγή ελαιόλαδου περιλαμβάνουν: τη συγκομιδή, την απομάκρυνση των φύλλων και την πλύση, τη σύνθλιψη, την ανάμειξη, το διαχωρισμό του ελαιόλαδου και τη φυγοκέντρηση του ελαίου. Υπάρχουν τρία διαφορετικά συστήματα, ανάλογα με τη μέθοδο εκχύλισης: (α)

πίεση, (β) φυγοκέντρωση και (γ) διαδικασία εκλεκτικής διήθησης (διήθηση) (153). Μια τυπική διάταξη της διαδικασίας εκχύλισης, με βάση τη φυγοκέντρωση, μαζί με τις κύριες διεργασίες δίδεται στην Εικόνα 29. Η παραλαβή του ελαιόλαδου γίνεται με 3 τεχνικές κατεργασίας. Την παραδοσιακή μέθοδο, τη 2-φασική και την 3-φασική διαδικασία (Εικόνα 30).



**Εικόνα 29 Σύγχρονος τρόπος παραγωγής ελαιόλαδου. Πηγή: (153)**



**Εικόνα 30 Διάγραμμα της διαδικασίας που ακολουθείται για την εξαγωγή του ελαιόλαδου με την χρήση α) παραδοσιακής μεθόδου, β) 2-φασικού συστήματος, γ) 3-φασικού συστήματος. Πηγή: <http://www.prosodol.gr/?q=el/node/470>.**

## Φαινολικά συστατικά ελαιόλαδου

Το ελαιόλαδο αποτελείται από περίπου 30 φαινολικές ενώσεις (160,161) πολλές από τις οποίες συμβάλλουν στην αντοχή του ελαιόλαδου στην οξειδωτική τάγγιση (162). Έχει διαπιστωθεί ότι υπάρχει γραμμική σχέση μεταξύ της περιεκτικότητας σε φαινολικές ενώσεις και της οξειδωτικής σταθερότητας του εξαιρετικά παρθένου ελαιόλαδου (163). Η περιεκτικότητα του σε φαινολικές ενώσεις, εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως από τα στάδια παραγωγής (καλλιεργητικές πρακτικές, τεχνολογικές πρακτικές κατά της ελαιοποίησης) και αποθήκευσης του ελαιόλαδου, περιβαλλοντικές συνθήκες, ποικιλία καρπού (γενετικοί παράγοντες, βιοχημικοί δείκτες), βαθμός ωριμότητας καρπού κατά τη συλλογή, κλιματικές και εδαφολογικές συνθήκες, περιοχή προέλευσης, περίοδος συγκομιδής (164). Το συνολικό βιοφαινολικό περιεχόμενο του ελαιόλαδου κυμαίνεται μεταξύ 800 mg/kg και 1gr/kg (165).

Οι φαινολικές ενώσεις του ελαιόκαρπου είναι κυρίως γλυκοζίδες σεκοϊριδοειδών ενώσεων (όπως η ελαιοευρωπαϊνή και ο λιγκστροσίδης), φλαβονών (γλυκοζίτης της λουτεολίνης), φλαβονολών (ρουτίνη), ελενολικού οξέος και του βερμπασκοζίτη (παράγωγο του καφεϊκού οξέος) (166,167) και βρίσκονται σε όλα τα μέρη των φυτών από τις ρίζες και τα στελέχη μέχρι τα φύλλα και τους καρπούς. Με την ωρίμανση του καρπού και την αύξηση της υδρολυτικής δράσης, αυξάνονται οι απλές φαινόλες (υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη) καθώς και οι αγλυκόνες της ελαιοευρωπαϊνης και του βερμπασκοζίτη (168). Κατά κύριο λόγο οι φαινολικές ενώσεις βρίσκονται σε συζευγμένη μορφή (σύμπλοκες ενώσεις) γεγονός το οποίο μειώνει την τοξικότητα τους, αυξάνει τη διαλυτότητα τους και πιθανόν να συμβάλει στην ενδοκυτταρική διαμερισματοποίηση ορισμένων φαινολικών ενώσεων, ενώ βοηθάει και στην κυτταρική τους μεταφορά (167,169).

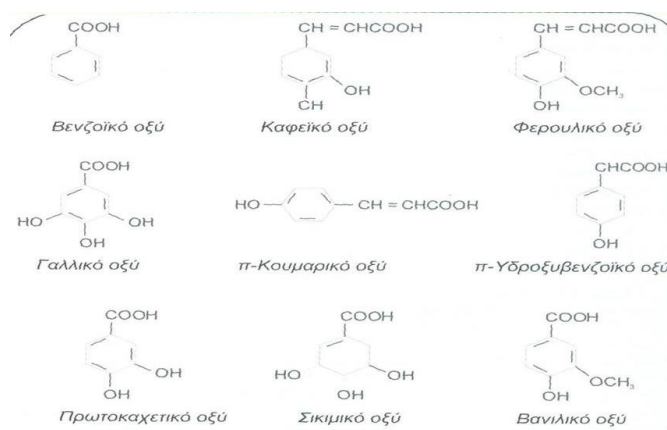
Οι φαινολικές ενώσεις, είναι πολικές και κατά κύριο λόγο υδατοδιαλυτές, αμυδρά λιποδιαλυτές ενώ έχουν αντιοξειδωτική δράση, μέσω της οποίας παρεμποδίζουν ή επιβραδύνουν της οξείδωση των ελαίων. Το πολικό μέρος του φαινολικού κλάσματος περιέχει φαινυλαλκοόλες και φαινυλοξέα, ενώ το μη πολικό μέρος περιέχει τα άγλυκα της λιγκστροσίδης και της ολευρωπεΐνης, διαλδεϋδικές



μορφές αυτών των άγλυκων, τις φλαβόνες λουτεολίνη και απιγενίνη και τα λιγνάνια 1-ακετοξυπινореζινόλη και πινореζονόλη (170).

### Φαινολικά οξέα

Τα φαινολικά οξέα είναι προϊόντα του υδροξυκιναμικού και του υδροξυβενζοϊκού οξέος και είναι η πρώτη χημική ομάδα που ανιχνεύθηκε στο ελαιόλαδο. Βρίσκονται σε συγκεντρώσεις μικρότερες από 1 mg/kg ελαιολάδου Σχετίζονται κυρίως με τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των φυτών και με τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες τους (170). Τα φαινολικά οξέα και παράγωγα αυτών είναι τα συριγικό οξύ, βανιλικό οξύ, γαλλικό οξύ, καφεϊκό οξύ, φερουλικό οξύ, κινναμικό οξύ, βενζοϊκό οξύ, ο-κουμαρικό οξύ, p-κουμαρικό οξύ, p-υδροξυβενζοϊκό οξύ, 4-(ακετοξυέθυλ)-1,2διυδροξυβενζίνιο (Εικόνα 31).



**Εικόνα 31 Χημικές δομές φαινολικών οξέων και παράγωγων αυτών.**

### Φαινόλες

Στην κατηγορία αυτή βρίσκονται κυρίως δύο ενώσεις με παρόμοιες δομές (Εικόνα 32), η τυροσόλη (4-υδροξυφαινύλο αιθανόλη) και η υδροξυτυροσόλη (2-(3,4-διυδροξυφαινύλο αιθανόλη). Αποτελούν τις πιο άφθονες ενώσεις στο ελαιόλαδο, και συναντώνται σε μεγάλες ποσότητες στον καρπό και στα φύλλα της ελιάς. Όσο

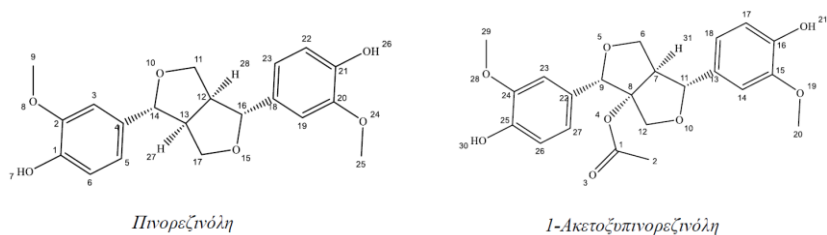
μεγαλύτερο χρονικό διάστημα παραμένει αποθηκευμένο το ελαιόλαδο η παρουσία τους γίνεται πιο εμφανής, καθώς προέρχονται από τη σταδιακή αποδόμηση των πιο σύνθετων μορίων (171). Οι ενώσεις αυτές χαρακτηρίζονται για αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες τους (172–174).



**Εικόνα 32** Χημικές δομές υδροξυτυροσόλης και τυροσόλης.

### Λιγνάνια

Τα λιγνάνια είναι ενώσεις που υπάρχουν κατά κύριο λόγο στον κορμό του ελαιόδεντρου. Στα λιγνάνια κατατάσσονται η πινορεζινόλη και η (+)-1-ακετοξυπινορεζινόλη (Εικόνα 33) (175) που συναντώνται στη σάρκα, στον πυρήνα του καρπού και κατά την εκχύλιση του ελαιόλαδου. Η συγκέντρωσή τους είναι σταθερή στις διάφορες ποικιλίες του ελαιόλαδου, ενώ ταυτόχρονα αποτελούν μια ταυτότητα σχετικά με τον τόπο προέλευσης του (176).



**Εικόνα 33** Χημικές δομές πινορεζινολής και 1-ακετοξυπινορεζινολής.

### Υδροξυ-χρωμάνια

Προκύπτουν κατά την μάλαξη από ένζυμα όπως οι γλυκοσιδάσες και οι εστεράσες που αυξάνουν την ποσότητα της υδροξυτυροσόλης και των καρβονυλικών μορίων και κατ' αυτό τον τρόπο ευνοείται η παρουσία των μορίων που είναι απαραίτητα για το σχηματισμό των ισοχρωμανίων. Στο ελαιόλαδο συναντώνται το 1-

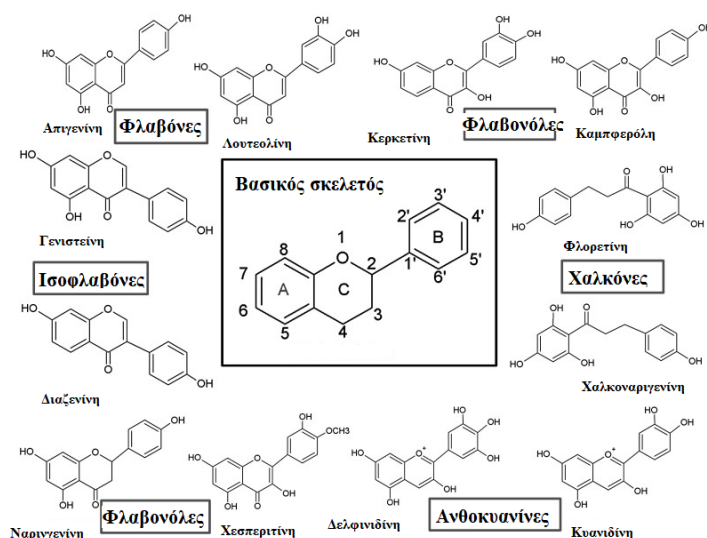
φαινυλο-6,7-διϋδροξυ-ισοχρωμάνιο και το 1-(3'-μεθοξυ-4'- υδροξυ)-φαινυλο-6,7-διϋδροξυ-ισοχρωμάνιο τα οποία σχηματίζονται από την αντίδραση υδροξυτυροσόλης με βενζαλδεϋδη ή βανιλίνη (177).

## Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή αποτελούν μια σημαντική κατηγορία οργανικών ενώσεων που μπορεί να βρίσκονται είτε ως μονομερή είτε ως πολυμερή, έπειτα από αντιδράσεις με άλλες φλαβονοειδείς και μη ενώσεις, σάκχαρα (D-γλυκόζη, L-ραμνόζη, γαλακτόζη, αραβινόζη, λιγνίνη και να σχηματίζουν γλυκοσυλιωμένες μορφές) , ή συνδυασμούς αυτών. Τα φλαβονοειδή είναι η πιο μελετημένη κατηγορία βιοφαινολών, περιλαμβάνει περισσότερες από 6000 ενώσεις και βρίσκονται σε αφθονία σε φρούτα, λαχανικά και ορισμένα ποτά. Πολυάριθμες μελέτες αναφέρουν τα ευεργετικά αποτελέσματα τους έναντι διαφόρων ασθενειών όπως ο καρκίνος, το Alzheimer, η αθηροσκλήρωση κ.α., καθώς και πολυάριθμες δράσεις που προάγουν την υγεία, ενώ αποτελούν αναπόσπαστο συστατικό μιας ποικιλίας εφαρμογών για θεραπευτική, φαρμακευτική, και καλλυντική χρήση. Αυτό συμβαίνει λόγω των αντιοξειδωτικών, αντιφλεγμονωδών, αντιμεταλλαξιγόνων και αντικαρκινογόνων ιδιοτήτων τους αλλά και την ικανότητά τους να επιδρούν σε βασικές ενζυμικές λειτουργίες. Είναι επίσης γνωστό ότι είναι ισχυροί αναστολείς διάφορων ενζύμων, όπως η οξειδάση της ξανθίνης (XO), η κυκλοοξυγενάση (COX), η λιποξυγενάση και η 3-κινάση φωσφοϊνοσιτιδής (178).

Χαρακτηριστικό της δομής τους είναι οι δύο αρωματικοί δακτύλιοι που συνδέονται διαμέσου ενός πυρανικού δακτυλίου που περιέχει οξυγόνο. Ενώ δύναται να υποδιαιρεθούν σε υποομάδες με βάση τον άνθρακα του δακτυλίου C στον οποίο συνδέεται ο δακτύλιος B, και τον βαθμό ακορεστότητας και οξείδωσης του δακτυλίου C (Εικόνα 34). Τα φλαβονοειδή στα οποία ο δακτύλιος B συνδέεται στη θέση 3 του δακτυλίου C ονομάζονται ισοφλαβόνες. Αυτά στα οποία ο δακτύλιος B συνδέεται στη θέση 4 ονομάζονται νεοφλαβονοειδή, ενώ εκείνα στα οποία ο δακτύλιος B συνδέεται στη θέση 2 μπορούν να υποδιαιρεθούν περαιτέρω σε διάφορες υποομάδες με βάση τα δομικά χαρακτηριστικά του δακτυλίου C. Αυτές οι υποομάδες είναι: φλαβόνες,

φλαβονολίνες, φλαβανόνες, φλαβανόλες, φλαβανόλες ή κατεχίνες, ανθοκυανίνες και χαλκόνες (Εικόνα 34).



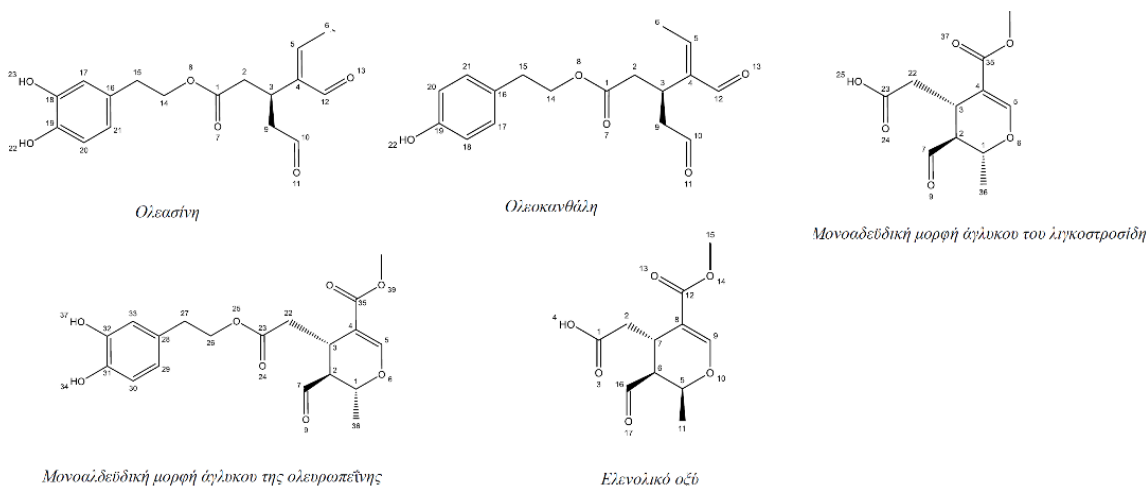
**Εικόνα 34 Βασική δομή σκελετού των φλαβονοειδών και των κατηγοριών τους. Πηγή: (178)**

### Σεκοϊριδοειδή

Οι σεκοϊριδοειδείς ενώσεις, προέρχονται από τα ιριδοειδή με άνοιγμα του δακτυλίου του κυκλοπεντανίου των ιριδοειδών και απαντώνται κυρίως στην οικογένεια Oleaceae, εκεί όπου ανήκει και η *Olea europaea* L. Κυρίως βρίσκονται σε γλυκοζυλιωμένη μορφή και προέρχονται από το βιοσυνθετικό μονοπάτι των τερπενίων (179). Χαρακτηριστικό της δομής τους είναι η παρουσία ελενολικού οξέος στην γλυκοζυλιωμένη ή στην απλή μορφή του και από μία φαινυλαίθυλο αλκοόλη (υδροξυτυροσόλη ή τυροσόλη). Κατά την ανάπτυξη και ωρίμανσης της ελιάς, επιτελούνται διάφορες βιοχημικές τροποποιήσεις. Όταν ο καρπός φθάσει σε ηλικία έξι μηνών, τα κύρια φαινολικά συστατικά είναι γλυκοζυλιωμένα σεκοϊριδοειδή (ολευρωπεΐνη και λιγκστροσίδης), ωστόσο τα μόρια αυτά δεν εντοπίζονται στο ελαιόλαδο, πιθανότατα λόγω της δράσης του ενζύμου β- γλυκοσιδάση, το οποίο τα υδρολύει κατά τη σύνθλιψη και μάλαξη του ελαιόκαρπου (167). Το χρονικό διάστημα της αποθήκευσης του ελαιόλαδου, ενεργούν υδρολυτικοί μηχανισμοί, οι οποίοι προάγουν την δημιουργία απλών φαινολών, δηλαδή υδροξυτυροσόλης και τυροσόλης από σύνθετα σεκοϊριδοειδικά παράγωγα (180).

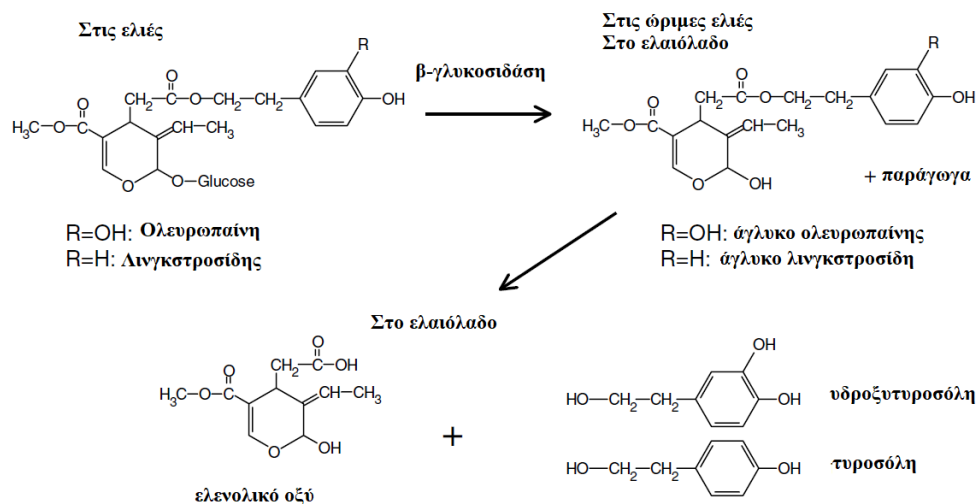
Τα κύρια σεκοροειδοειδή είναι (Εικόνα 35):

- Ελαιασίνη (oleasin) (διαλδεϋδική μορφή του 4-αποκαρβοξυλιωμένου άγλυκου της ελευρωπαΐνης)
- Ελαιοκανθάλη (Oleocanthal) (διαλδεϋδική μορφή του 4-αποκαρβοξυλιωμένου άγλυκου του λιγκστροσίδη)
- Λιγκστροσίδης και μονοαδεϋδική μορφή άγλυκου του λιγκστροσίδη (εστέρας της τυροσόλης και του ελενολικού οξέος συνδεδεμένο με μία μονάδα γλυκόζης),
- Μονοαδεϋδική μορφή άγλυκης ελευρωπαΐνης (εστέρας της υδροξυτυροσόλης (3,4-DHPEA) και του ελενολικού οξέος μαζί με μία μονάδα γλυκόζης)
- Ελενολικό οξύ



**Εικόνα 35** Δομές σεκοροειδών.

Στην Εικόνα 36 παρουσιάζονται οι δομές των φαινολών που υπάρχουν στις ελιές και το ελαιόλαδο, η αποικοδόμησή τους σε αγλυκόνες κατά την ωρίμανση και η υδρόλυση των αγλυκονών σε τυροσόλη και υδροξυτυροσόλη



**Εικόνα 36** Οι δομές των φαινολών που υπάρχουν στις ελιές και το ελαιόλαδο, η αποικοδόμησή τους σε αγλυκόνες κατά την ωρίμανση και η υδρόλυση των αγλυκονών σε τυροσόλη και υδροξυτυροσόλη. Πηγή: (181).

Βιοδιαθεσιμότητα φαινολικών ενώσεων ελαιόλαδου.

Η συγκέντρωση και η σύσταση των φαινολών του ελαιόλαδου, μαζί με τον βαθμό στον οποίο αυτά τα συστατικά απορροφώνται και μεταβολίζονται, είναι ουσιώδη για τον προσδιορισμό των επιδράσεων τους στην υγεία. Η βιοδιαθεσιμότητα των φαινολικών ενώσεων του ελαιόλαδου είναι το κλειδί για την επίτευξη ενός βιολογικού αποτελέσματος σε συγκεκριμένους ιστούς ή όργανα (182).

Η πλειοψηφία των ερευνών σχετικά με τη βιοδιαθεσιμότητα αυτών των ενώσεων έχει επικεντρωθεί στις δύο πιο άφθονες φαινολικές ενώσεις του ελαιόλαδου: την υδροξυτυροσόλη και την τυροσόλη (183). Έρευνες καταδεικνύουν ότι υπάρχει σημαντική απορρόφηση στους ανθρώπους (~ 40% -95%) αυτών των ενώσεων και μάλιστα με δόσοεξαρτώμενο τρόπο (161,184–187). Επιπλέον, ο Tuck και οι συνεργάτες τους (161) σημείωσαν την αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας υδροξυτυροσόλης και τυροσόλης όταν αυτές χορηγήθηκαν ως διάλυμα ελαιόλαδου σε σύγκριση με ένα υδατικό διάλυμα. Αυτό το εύρημα υποδηλώνει ότι το ίδιο το ελαιόλαδο μπορεί να λειτουργήσει ως προστατευτικός παράγοντας που εμποδίζει την διάσπαση των φαινολικών ενώσεων στην γαστρεντερική οδό πριν από την απορρόφηση τους (161). Ο Vissers και οι συνεργάτες του (186) εξακρίβωσαν ότι η

απορρόφηση των άγλυκο λιγκτροσίδη, υδροξυτυροσόλης, τυροσόλης και άγλυκο ολευρωπαΐνης, κυμαίνονταν στο 55% -66% σε ανθρώπους. Μία πολύ μικρότερη ποσότητα αυτών των φαινολικών ανιχθέυθη στα ούρα (5% -16%). Επιπλέον, ο Miro Casas και οι συνάδελφοί του (187) εξέφρασαν μια μέση ανάκτηση στα ούρα, κατά 25% της χορηγούμενης τυροσόλης. Οι Visioli κ.α. (188) επίσης ανέφεραν την ουρική έκκριση υδροξυτυροσόλης σε ποσοστά 30% -60% και τυροσόλης 20% -22%. Αυτά τα στοιχεία δείχνουν ότι ο ανθρώπινος οργανισμός μετά τη κατανάλωση απορροφά ένα σημαντικό μέρος των φαινολικών ενώσεων του ελαιολάδου. Επιπλέον, σε μελέτη που διεξήχθη σε αρουραίους, από τους Serra κ.α (189), φάνηκε ότι έπειτα από μια μόνο κατάποση φαινολικών ενώσεων ελαιολάδου, οι φαινολικές ενώσεις απορροφήθηκαν, μεταβολίστηκαν και διανεμήθηκαν μέσω της κυκλοφορίας του αίματος περίπου σε όλα τα τμήματα του σώματος, ενώ διαπέρασαν και τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό.

Επίσης, έχει παρατηρηθεί διαφορετικός ρυθμός μεταβολισμού μεταξύ διαφορετικών φαινολικών ενώσεων του ελαιόλαδου. Ο μεγαλύτερος αριθμός μεταβολιτών που παρήχθησαν μετά την κατάποση 50ml ελαιόλαδου, υψηλής βιοφαινολικής σύστασης, έχει βρεθεί με την υδροξυτυροσόλη, το άγλυκο ολευρωπαΐνης και την ελαιοκανθάλη, με κυκλοφορούντες μεταβολίτες που κυμαίνονται από 10-60 μg. Αντιθέτως, βρέθηκε ο χαμηλότερος αριθμός μεταβολιτών με την τυροσόλη, την λουτεολίνη, την απιγενίνη, την πινορεζινόλη και την ακετοξυπινορεζινόλη (190). Στην περίπτωση ανεπαρκών απορροφούμενων φαινολικών ενώσεων, έχει υποτεθεί ότι αυτές οι ενώσεις μπορεί να ασκούν τοπικά αντιοξειδωτική δράση στην γαστρεντερική οδό. Η παραπάνω υπόθεση στηρίζεται μερικώς από έρευνα που αποδεικνύει την ικανότητα δέσμευσης ελεύθερων ριζών, από τις βιοφαινόλες του ελαιόλαδου, τόσο στα κόπρανα όσο και στα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα (191). Περαιτέρω, έχει προταθεί ότι οι μη-απορροφούμενες βιοφαινόλες μπορεί να ασκούν αντιμικροβιακή δράση στη γαστρεντερική οδό (192).

Η κατανάλωση εξαιρετικά παρθένου ελαιόλαδου για τους μεσογειακούς πληθυσμούς ανέρχεται στα 30-50 gr / ημέρα (193). Αν υποθέσουμε ότι αυτή η ποσότητα ελαιόλαδου περιέχει 200 mg βιοφαινόλες και ο ρυθμός απορρόφησης τους κυμαίνεται μεταξύ 40% - 95%, μπορεί να υποτεθεί ότι η ποσότητα των βιοφαινολών ελαιόλαδου που προσλαμβάνονται είναι περίπου 4-9 mg/ημέρα. Είναι σημαντικό να τονιστεί το γεγονός ότι πολλές in vivo μελέτες χρησιμοποιούν υπερφυσιολογικές συγκεντρώσεις βιοφαινολών (>10M) (194). Ως εκ τούτου, είναι δύσκολο να

μεταφραστεί αυτό σε φυσιολογική δόση. Συνεπώς, απαιτείται μελλοντική έρευνα χρησιμοποιώντας συγκεντρώσεις που μπορούν να εξαχθούν στους ανθρώπους. Επίσης, πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι τα φαινορικά συστατικά του ελαιολάδου που καταναλώνονται σε μια δίαιτα ενδεχομένως αλληλεπιδρούν και με άλλες ενώσεις των τροφών. Συνεπώς, είναι σημαντικό να ληφθούν υπόψη αυτοί οι παράγοντες όταν διερευνώνται τα οφέλη για την υγεία τέτοιων συστατικών στον άνθρωπο (195).

Γνωμοδότηση της Ευρωπαϊκής Επιτροπής Ασφάλειας Τροφίμων (EFSA) για τις βιοφαινόλες του ελαιόλαδου



**Εικόνα 37** Ευρωπαϊκή Επιτροπή Ασφάλειας Τροφίμων.

Η Ευρωπαϊκή Επιτροπή Ασφάλειας Τροφίμων (European Food Safety Association-EFSA) γνωμοδότησε ισχυρισμούς υγείας σχετικά με τις βιοφαινόλες του ελαιόλαδου, οι οποίοι περιγράφονται στο Άρθρο 13 της ρύθμισης (EC) No

1924/2006 (<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2033>). Οι άνωθεν ισχυρισμοί αφορούν τη δράση των βιοφαινολών του ελαιόλαδου όπως αυτές προσλαμβάνονται μέσω της κατάποσης/τροφής, με τις ακόλουθες δράσεις:

- Προστασία των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL) από οξειδωτικές βλάβες
- Διατήρηση φυσιολογικών επιπέδων HDL- χοληστερόλης στο αίμα
- Τη διατήρηση φυσιολογικών επιπέδων πίεσης στο αίμα
- Αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες
- Συμβολή στην υγεία του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος
- Συμβολή στην διατήρηση της φυσιολογικής λειτουργίας του γαστρεντερικού σωλήνα
- Συμβολή στην άμυνα του οργανισμού έναντι εξωγενών παραγόντων
- Αντιβακτηριακές ιδιότητες

Η επιτροπή κατέληξε ότι στη μόνη περίπτωση που υφίσταται επιβεβαιωμένος συσχετισμός μεταξύ της κατανάλωσης βιοφαινολών ελαιόλαδου (με καθορισμένη



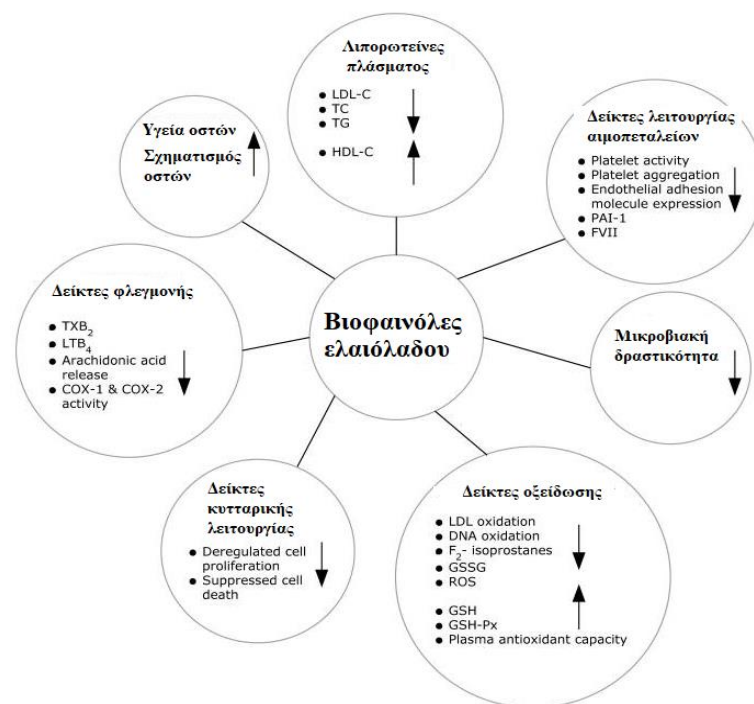
περιεκτικότητα υδροξυτυροσόλης και παραγώγων της) και κάποιας ευεργετικής για τον οργανισμό συνέπειας ήταν στην περίπτωση της οξειδωτικής προστασίας των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL). Πιο συγκεκριμένα απαραίτητη προϋπόθεση είναι να υπάρχει ελάχιστη κατανάλωση 5 mg υδροξυτυροσόλης ή/και παραγώγων της (π.χ. σύμπλοκα ολευρωπεΐνης και τυροσόλης) καθώς η συγκεκριμένη ποσότητα αντιπροσωπεύει μια μέση ποσότητα ελαιόλαδου που μπορεί να καταναλωθεί ημερησίως στα πλαίσια μιας ισορροπημένης διατροφής. Ωστόσο, ότι αφορούσε τις υπόλοιπες επιθυμητές δράσεις (Διατήρηση φυσιολογικών επιπέδων HDL-χοληστερόλης στο αίμα / Διατήρηση φυσιολογικών επιπέδων πίεσης στο αίμα / Αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες / Συμβολή στην υγεία το ανώτερου αναπνευστικού συστήματος / Συμβολή στην διατήρηση της φυσιολογικής λειτουργίας του γαστρεντερικού σωλήνα / Συμβολή στην άμυνα του οργανισμού έναντι εξωτερικών παραγόντων / Αντιβακτηριακές ιδιότητες), η επιτροπή κατέληξε στο συμπέρασμα ότι τα μέχρι στιγμής δεδομένα δεν τεκμηριώνουν επαρκώς ισχυρισμούς υγείας της EFSA.

#### Ελαιόλαδο και υγεία

Η μεσογειακή διατροφή συνδέεται με χαμηλότερη συχνότητα εμφάνισης αθηροσκλήρωσης, καρδιαγγειακής νόσου, νευροεκφυλιστικών ασθενειών και ορισμένων τύπων καρκίνου. Τα εμφανή ωφέλιμα αποτελέσματα για την υγεία έχουν αποδοθεί εν μέρει στη διατροφική κατανάλωση παρθένου ελαιόλαδου από τους μεσογειακούς πληθυσμούς. Μελέτες *in vivo* (άνθρωποι και ζώα) και *in vitro* έχουν αποδείξει ότι οι βιοφαινόλες του ελαιολάδου έχουν θετικές επιδράσεις σε διάφορες πτυχές της υγείας, όπως στις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος, στο οξειδωτικό στρες, στους φλεγμονώδεις δείκτες, στην αιμοπεταλιακή και κυτταρική λειτουργία, την αντιμικροβιακή δράση και την υγεία των οστών (196). Επίσης, έχουν αναφερθεί ότι μειώνουν τη νοσηρότητα και επιβραδύνουν την πρόοδο καρδιαγγειακών, νευροεκφυλιστικών και καρκινικών ασθενειών. Οι αντικαρκινικές ιδιότητες των βιοφαινολών του ελαιολάδου έγκειται στο γεγονός ότι έπειτα από μελέτες έχει φανεί να επάγουν την απόπτωση, μειώνουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την κυτταρική βιωσιμότητα, μειώνουν την αγγειογένεση, καθυστερούν τον κυτταρικό κύκλο, ενεργοποιούν γονίδια απόκρισης στο στρες, προλαμβάνουν την μετάσταση,

αυξάνουν την ευαισθησία στη χημειοθεραπεία, επηρεάζουν τον κυτταροσκελετικό (197,198).

Ο μηχανισμός δράσης των βιοφαινόλων είναι πλειοτροπικός, ωστόσο σχετίζεται κυρίως με την αντιοξειδωτική τους δράση. Οι φυσικές βιοφαινόλες μειώνουν το επίπεδο των δραστικών μορφών οξυγόνου και προστατεύουν τα βιομόρια από την οξειδωτική βλάβη. Επίσης ρυθμίζουν το ανθρώπινο ανοσοποιητικό σύστημα, επηρεάζοντας τον πολλαπλασιασμό των λευκών αιμοσφαιρίων και την παραγωγή κυτοκινών. Η ολεωρωπαίνη, η υδροξυτυροσόλη και τα παράγωγά τους είναι βιοφαινολικές ενώσεις που είναι άφθονες στο ελαιόλαδο. Είναι ισχυρά αντιοξειδωτικά και εμφανίζουν αντικαρκινικές, αντιαγγειακές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Στην Εικόνα 38 παρουσιάζονται κάποιες από τις αναρίθμητες ευεργετικές ικανότητες των βιοφαινόλων του ελαιολάδου στην υγεία του ανθρώπου.



**Εικόνα 38** Ελαιόλαδο και υγεία. Πηγή: (196).

## Το χρηματιστήριο του ελαιολάδου

Με βάση την έκθεση του Διεθνούς Συμβουλίου Ελαιολάδου (IOOC. 2011. 'International Olive Oil Council), οι Μεσογειακές χώρες αντιπροσώπευαν περίπου το 97% της παγκόσμιας ελαιοκαλλιέργειας, υπολογιζόμενη σε περίπου 10 εκατ. εκτάρια. Ενδημούν πάνω από 800 εκατομμύρια ελαιόδεντρα που καλλιεργούνται σήμερα σε όλο τον κόσμο, από τα οποία πάνω από το 90% χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ελαιολάδου ενώ τα υπόλοιπα για επιτραπέζιες ελιές. Εκτιμάται ότι περισσότεροι από 2.500.000 τόνοι ελαιολάδου παράγονται κάθε χρόνο σε ολόκληρο τον πλανήτη. Περίπου το 81% της καθολικής παραγωγής γίνεται από την Ευρωπαϊκή Κοινότητα (Ισπανία, Ιταλία, Ελλάδα, Πορτογαλία και Γαλλία), ενώ η Εγγύς Ανατολή συνεισφέρει περίπου το 7% και η Βόρεια Αφρική εφοδιάζει περίπου το 11%. Το υπόλοιπο 1% προέρχεται από την Αμερική, κυρίως από την Αργεντινή, το Μεξικό, το Περού και τις Ηνωμένες Πολιτείες.

Στο χρηματιστήριο του ελαιολάδου, η Ελλάδα υστερεί. Παρότι το ελαιόλαδο αποτελεί βασικό τμήμα της ελληνικής οικονομίας, καθώς αφορά το 9% της αξίας αγροτικής παραγωγής στην Ελλάδα (έναντι 1% στην Ευρώπη). Η Ελλάδα είναι η τρίτη μεγαλύτερη παραγωγός χώρα ελαιολάδου παγκοσμίως (μετά την Ισπανία και την Ιταλία), με παραγωγή της τάξης των 0,3 εκατ. τόνων, συνεισφέροντας το 0,4% του ΑΕΠ (Εθνική Τράπεζα Ελλάδος, 2015). Ο μεγαλύτερος παραγωγός ελαιολάδου είναι η Ισπανία. Ωστόσο, αν και τα Ισπανικά λάδια υπολείπονται ποιότητας, συγκριτικά με τα Ελληνικά, κατακλύζουν την παγκόσμια αγορά. Οι Ιταλοί εξάγουν μεγαλύτερες ποσότητες ελαιολάδου από ότι παράγουν ετησίως, γι' αυτό και κάνουν εισαγωγές χύμα ελαιόλαδου από άλλες χώρες, μεταξύ άλλων και από την Ελλάδα, και το επανεξάγουν τυποποιημένο, κερδίζοντας υπεραξία τυποποίησης περίπου €1,3/κιλό (Εθνική Τράπεζα Ελλάδος, 2015). Σύμφωνα με το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιολάδου, παρόλη την παράδοση ετών και το γεγονός ότι η χώρα μας είναι πρώτη στην κατάταξη της διεθνούς αγοράς στην παραγωγή εξαιρετικά παρθένου ελαιόλαδου, τα οικονομικά κέρδη για την Εθνική Οικονομία είναι ελάχιστα, καθώς οι εξαγωγές αναφέρονται κυρίως σε μη τυποποιημένο ελαιόλαδο. Χαρακτηριστικά, το 2007 οι συνολικές εξαγωγές ελαιολάδου προς την ΕΕ έφτασαν τους 104.000 τόνους, ωστόσο μόνο οι 8.500 τόνοι αποτελούσαν τυποποιημένο ελαιόλαδο (ποσοστό 8%). Οι υπόλοιποι 95.500 τόνοι

(ποσοστό 92%) ήταν χύμα ελαιόλαδο, ενώ 9.400 τόνοι ελαιολάδου δόθηκαν σε τρίτες χώρες (όλο εμφιαλωμένο) (IOOC. 2011. 'International Olive Oil Council).

Οι Έλληνες παραγωγοί δεν μπόρεσαν να μπου δυναμικά στη διεθνή αγορά, με συνέπεια το μερίδιο της Ελλάδας σε τυποποιημένο ελαιόλαδο, να πέσει από το 6% της δεκαετίας του 1990 στο 4%. Κύριες αιτίες που δρουν περιοριστικά στη δυναμική του κλάδου στην Ελλάδα, αποτελεί ο χαμηλός βαθμός τεχνολογικής εξέλιξης των ελαιοτριβείων, ο χαμηλός βαθμός τυποποίησης (μόνο το 27% της συνολικής παραγωγής ελαιολάδου τυποποιείται, έναντι του 50% και 80% της Ισπανίας και Ιταλίας, αντίστοιχα) και τέλος η αδυναμία διάρθρωσης του Ελληνικού κλάδου ελαιοπαραγωγής (Εθνική Τράπεζα Ελλάδος, 2015).

Σε ένα εξαιρετικά εναλλασσόμενο διεθνές εμπόριο, το ελληνικό ελαιόλαδο έχει ως κύριο χαρακτηριστικό την ανώτερη ποιότητα του. Ωστόσο, για να γίνει ανταγωνιστική η Ελλάδα στη διεθνή αγορά, θα πρέπει να δώσει βαρύτητα στην τυποποίηση, την καθετοποίηση και τις οικονομίες κλίμακας. Τα κέρδη από μια τέτοια αλλαγή θα είναι αξιόλογα, καθώς σύμφωνα με την κλαδική μελέτη της Εθνικής Τράπεζας Ελλάδος, η τυποποίηση και η δημιουργία Ελληνικού brand έχουν τη δυνατότητα να ενισχύσουν τα έσοδα από εξαγωγές ελληνικού ελαιολάδου κατά €250 εκατ. ετησίως (Εθνική Τράπεζα Ελλάδος, 2015).

## 1.6. Άνθη ελιάς

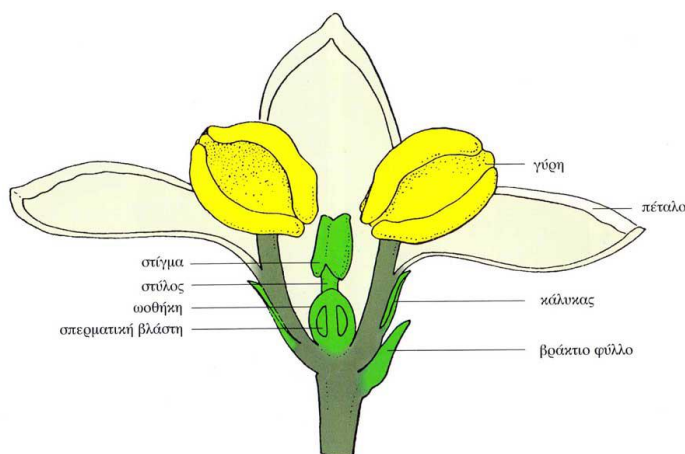
Η ελιά (*Olea europaea.L*) είναι το πιο εκτεταμένα καλλιεργημένο δέντρο στον κόσμο, καλύπτοντας έκταση 10 εκατομμυρίων εκταρίων. Η φαινολογία των λουλουδιών της ελιάς χαρακτηρίζεται από έναν ετήσιο κύκλο, ο οποίος περιλαμβάνει τον σχηματισμό άνθους κατά το προηγούμενο καλοκαίρι, την αδράνεια κατά τη διάρκεια της κρύας περιόδου, την εμφάνιση ανθοφόρων οφθαλμών στο τέλος του χειμώνα και την ανάπτυξη της δομής των λουλουδιών σε ανθοταξίες και στην άνθιση την άνοιξη (199).

Με τη διέλευση του χειμώνα από τους βλαστοφόρους οφθαλμούς δημιουργούνται ανθοφόροι οφθαλμοί μέσω της διαδικασίας «διαφοροποίησης», οι οποίοι δημιουργούν την ανθοταξία και τελικά τον καρπό, με τη θερμοκρασία να

κατέχει πρωταγωνιστικό ρόλο. Ο κύκλος καρποφορίας διαρκεί ένα έτος και διακρίνεται σε τέσσερις φάσεις, τη βλάστηση, την διαφοροποίηση, την ανάπτυξη των ανθικών μερών και τέλος την καρπόδεση και ωρίμανση. Εδώ σημαντικό ρόλο για την επιτυχία της καρποφορίας έχουν η θερμοκρασία, η λίπανση και η υγρασία του εδάφους.

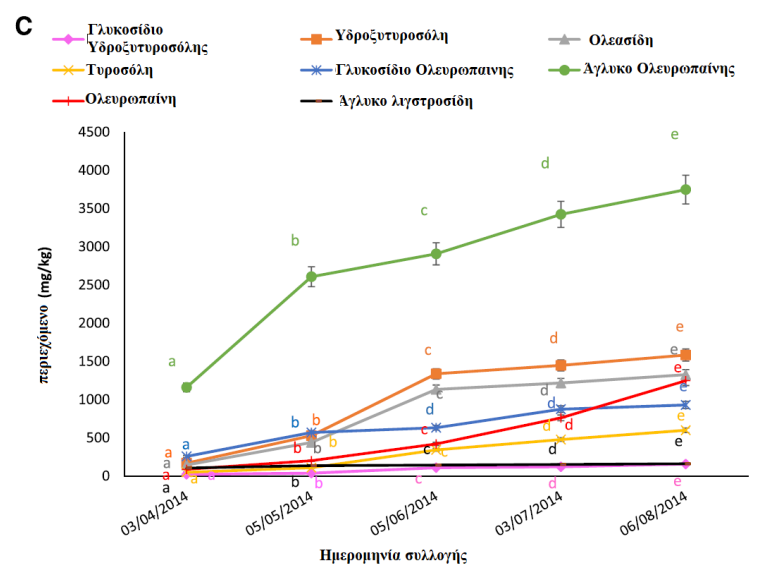
Η θερμοκρασία και το φως είναι οι κύριοι περιβαλλοντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την άνθηση. Συγκεκριμένα, η βέλτιστη θερμοκρασία για καλύτερη άνθηση φαίνεται να είναι 10-13 °C, για μια περίοδο 9-10 εβδομάδων, ενώ για την καρπόδεση 20- 22°C, τέλος για την ωρίμανση 15 - 18°C. Επιπρόσθετα, η ευαισθησία στο φως είναι πιθανόν να εξαρτάται από την ποικιλία της ελιάς, καθώς ορισμένες ποικιλίες απαιτούν λιγότερο φως για τη μετατροπή των μπουμπουκιών σε λουλούδια (200). Ωστόσο, ένα ζεστό φθινόπωρο με μεγάλη ηλιοφάνεια μπορεί να ευνοήσει καρπούς με περισσότερη περιεκτικότητα ελαίου, σε αντίθεση με ένα βροχερό και ψυχρό φθινόπωρο. Επιπλέον, τα θρεπτικά συστατικά εξαρτώνται από το φορτίο των φρούτων, έτσι το νάτριο (Na) και το κάλιο (K) μειώνονται όταν το φορτίο των φρούτων είναι υψηλό, αντιθέτως, το ασβέστιο (Ca) αυξάνεται. Τέλος, τα υψηλά επίπεδα χλωρογενικών οξέων επάγουν τον μετασχηματισμό των οφθαλμών σε άνθη (200).

Τα άνθη της ελιάς διακρίνονται σε ταξιανθίες βότρυος (**Εικόνα 39**). Τα άνθη είναι μικρά, κίτρινα με 4 πέταλα, 4 σέπαλα, 2 ανθήρες και ένα κανονικό ή πυρωμένο ύπερο. Η ελιά ανθίζει περίπου στα τέλη Μαΐου έως τις αρχές Ιουνίου (201,202). Κάθε ταξιανθία αποτελείται από 10-60 άνθη ανάλογα με την ποικιλία. Τα άνθη διακρίνονται σε δύο κατηγορίες (203), το ερμαφρόδιτο ή τέλειο, το οποίο περιλαμβάνει 2 στήμονες και έναν κανονικό ύπερο και το ατελές άνθος, το οποίο έχει έναν υποπλαστικό ύπερο (204).



**Εικόνα 39 Το άνθος της ελιάς.**

Το άνθος είναι ένα σημαντικό μέρος του φυτού και περιέχει μια μεγάλη ποικιλία από φυσικά αντιοξειδωτικά, όπως φαινολικά οξέα, ανθοκυανίνη, φλαβονοειδή, άγλυκο ελευρωπαίνης σε συγκεντρώσεις από 1.158 έως 3.746 g/kg, υδροξυτυροσόλη από 0.168 έως 1.581 g/kg και ολεοσίδη από 0.143 έως 1.325 g/kg. Τα επίπεδα των βιοφαινολών εξαρτώνται από το αναπτυξιακό στάδιο του άνθους, το γονότυπο του, τις περιβαλλοντικές συνθήκες καθώς και με τους διαφορετικούς μεταβολικούς ρυθμούς του φυτού κατά την ανάπτυξη (205). Πιο συγκεκριμένα, το συνολικό περιεχόμενο σε φαινόλες και ο-διφαινόλη στα άνθη αυξάνεται όσο αυξάνεται το αναπτυξιακό στάδιο του άνθους με τις χαμηλότερες τιμές να παρατηρούνται στο πρώιμο στάδιο της συγκομιδής και τις μέγιστες στο τελευταίο στάδιο (205). Στην Εικόνα 40 φαίνεται πως μεταβάλλεται το περιεχόμενο των διάφορων βιοφαινολών στα άνθη ελιάς, ανάλογα με το αναπτυξιακό στάδιο κατά τη συλλογή.



**Εικόνα 40 Περιεχόμενο των ανθέων σε βιοφαινόλες ανάλογα με το αναπτυξιακό στάδιο. Πηγή: (205).**

Οι φαρμακευτικές χρήσεις των ανθέων ελιάς δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως. Παρόλο που υπάρχουν αναφορές που αναλύουν την πολυφαινολική σύστασή τους και τη βιολογική τους δράση (206). Ένα ώριμο δέντρο ελιάς παράγει περίπου 500.000 λουλούδια, αλλά μόνο το 1-2% αυτών δίνουν καρπό που φτάνει μέχρι την ωριμότητα (204). Κάθε ταξιανθία περιέχει 15-30 λουλούδια, ανάλογα με την ποικιλία (199). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι καρποί που προήλθαν από το 1% του συνολικού πληθυσμού λουλουδιών αρκούν για την παραγωγή μιας καλής εμπορικής σοδειάς (204,207).

Συνεπώς, η ελιά χρησιμοποιεί ένα πολύ μικρό ποσοστό των λουλουδιών της για να παράξει ώριμο καρπό, ενώ το υπόλοιπο και μεγαλύτερο μέρος των λουλουδιών πέφτει στο έδαφος και αποικοδομείται χωρίς κάποιο όφελος, συμβάλλοντας στην αύξηση του οργανικού φορτίου του εδάφους.

Καθώς αυξάνεται η παραγωγή ελαιολάδου, το ίδιο ισχύει και για τα υποπροϊόντα του, τα οποία μπορούν να προκαλέσουν περιβαλλοντικά προβλήματα, όπως τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου, τα φύλλα και τα άνθη. Έτσι, απαιτούνται νέοι τρόποι χρήσης των υποπροϊόντων αυτών παραδείγματος χάρη ως αντιοξειδωτικά ή ως τρόφιμα, πρόσθετα τροφίμων, λειτουργικά τρόφιμα, καλλυντικά και φάρμακα, καθώς κάθε φυτικό υλικό έχει τις μοναδικές του ιδιότητες όσον αφορά τις φαινολικές ενώσεις.

Φαίνεται από τη βιβλιογραφία (19) ότι τα λουλούδια ελιάς διαθέτουν μεγάλο αριθμό βιοδραστικών ενώσεων με μεγάλο ενδιαφέρον για την ανθρώπινη υγεία. Έτσι, μια πιθανή εκμετάλλευση του βιολογικού ρόλου των ανθέων ελιάς, που συνήθως πέφτει στο έδαφος και χάνεται, μπορεί να προσφέρει μεγάλη οικονομική στήριξη στους παραγωγούς καθώς και φυσικές πηγές για τη βιομηχανία φαρμάκων και τροφίμων, ελαχιστοποίησε την ανάγκη βιομηχανικής παραγωγής χημικών ενώσεων.

## Κεφάλαιο 2

### 2.1 Υπόβαθρο μελέτης

Η ικανότητα της τροφής/διατροφής να προάγει και να διατηρεί την υγεία των ανθρώπων αλλά και να προλαμβάνει ασθένειες, αποτελεί ένα αποδεδειγμένο επιστημονικό γεγονός. Ωστόσο, η δύναμη των συστατικών των τροφίμων στη θεραπεία διάφορων παθήσεων είναι μια αμφισβητούμενη έννοια. Η ιδέα της χρήσης τροφίμων ως φαρμακευτική θεραπεία δεν είναι καινοφανής. Ο πατέρας της ιατρικής Ιπποκράτης, δήλωσε εδώ και αιώνες «Φάρμακο ας γίνει η τροφή σας και η τροφή σας ας γίνει φάρμακό σας», ο οποίος πίστευε πως η διατροφή είναι το σπουδαιότερο πράγμα για την σωματική και ψυχική υγεία, και πως τα καλύτερα φάρμακα τα προσφέρει η φύση απλόχερα. Αυτή η φράση του Ιπποκράτη σηματοδοτεί την έρευνα για τα τρόφιμα τις τελευταίες δύο δεκαετίες. Η έρευνα στις μέρες μας έχει τροφοδοτηθεί από ένα πραγματικό ενδιαφέρον από τη βιομηχανία και τους καταναλωτές, ενώ οι ισχυρισμοί υγείας των διατροφικών προϊόντων συμβάλουν σημαντικά στις διατροφικές επιλογές των καταναλωτών. Το θεραπευτικό δυναμικό των τροφίμων είναι ένα από τα πιο συχνά ερευνητικά θέματα, από το οποίο έχουν προκύψει νέοι επιστημονικοί όροι όπως «διατροφοφαρμακολογία» (nutraceuticals), «διατροφογονιδιομηχανία» (nutrigenomics), «διατροφοπρωτεομική» (nutriproteomics), «nutraceuticals», «λειτουργικά τρόφιμα» (functional foods) κ.α. (208,209).

Υπάρχει μια πληθώρα εμπλεκόμενων παραγόντων πίσω από την έρευνα σχετικά με τις φαρμακευτικές ιδιότητες των τροφίμων. Καθώς ο γηράσκων πληθυσμός αυξάνεται σταθερά, υπάρχει όλο και μεγαλύτερη ανάγκη εύρεσης λύσεων για την καλύτερη υγεία των υπερήλικων ατόμων. Επιπλέον, τόσο ο αγχωτικός όσο και ο καθιστικός τρόπος ζωής αλλά και η αυξημένη κατανάλωση πρόχειρων φαγητών έχουν μετατρέψει την παχυσαρκία σε παγκόσμια επιδημία. Τα παραπάνω κιλά και η παχυσαρκία αποτελούν μείζονες συντελεστές προδιάθεσης για χρόνιες ασθένειες όπως καρδιαγγειακές παθήσεις, διαβήτη, νευροεκφυλιστικές ασθένειες και καρκίνο (210). Ταυτόχρονα, οι χρόνιες ασθένειες αποτελούν την κύρια αιτία θνησιμότητας παγκοσμίως (211). Η προσέγγιση της δυτικής ιατρικής έχει επανειλημμένα αποτύχει να θεραπεύσει ή να σταματήσει την εξέλιξη αυτών των σύνθετων ασθενειών. Επιπλέον,



οι ανεπιθύμητες παρενέργειες των σημερινών φαρμάκων είναι συχνά πιο σοβαρές από την ίδια την ασθένεια. Ο κίνδυνος μικροβιακής λοίμωξης δεν έχει πλήρως αντιμετωπιστεί, καθώς υπάρχει αντοχή/ανοσία στα υπάρχοντα φάρμακα αλλά και μείωση του αριθμού εύρεσης νέων αντιμικροβιακών ουσιών. Ως εκ τούτου, η ανάγκη για πιο αποτελεσματικές και ασφαλέστερες εναλλακτικές λύσεις κάνει επιτακτική την ανάγκη να ψάξουμε για τους «κρυμμένους θησαυρούς της μητέρας φύσης». Δεν υπάρχει αμφιβολία ότι ο πιο πολύτιμος θησαυρός όλων είναι τα φυτά (104). Το φυτικό βασίλειο προσφέρει φάρμακα για ανθρώπους εδώ και πολλά χρόνια. Σχεδόν το ένα τέταρτο των σημερινών φαρμάκων προέρχεται από τα φυτά (212), τα οποία ακόμα και στην εποχή μας εξακολουθούν να αποτελούν σημαντική πηγή για την ανακάλυψη νέων ενώσεων στη φαρμακευτική βιομηχανία. Τις τελευταίες δεκαετίες, σχεδόν το 50% των νέων φαρμάκων είναι φυτικής προέλευσης ή ανάλογα αυτών (213). Η κλασική πρακτική των φαρμακευτικών εταιριών για την παραγωγή φαρμάκων, ήταν η χρήση των φυτών ως μέσο για την ανακάλυψη νέων ενώσεων ή ισχυρών βιοδραστικών μορίων. Δεδομένου ότι η βιοδραστικότητα είναι ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των φυτοχημικών (214), η πρακτική αυτή καταργείται σταδιακά και την θέση της παίρνει μια πιο ολιστική και ολοκληρωμένη άποψη, αυτή της χρήσης φυτικών μειγμάτων, εκχυλισμάτων ή μερικώς καθαρισμένων εκχυλισμάτων (215). Το 2016, η παγκόσμια αγορά των «nutraceuticals» ξεπέρασε τα 207 δισεκατομμύρια αμερικάνικα δολάρια (216).

Η πιο διαδεδομένα υγιεινή διατροφή είναι σίγουρα η «μεσογειακή διατροφή», η οποία υποστηρίζεται από μια πληθώρα επιδημιολογικών μελετών (217). Οι πρώτες παρατηρήσεις σχετικά με τη χαμηλή συχνότητα εμφάνισης στεφανιαίων καρδιακών παθήσεων (CHD), έγιναν στη Νάπολη το 1952 από τον Ancel Keys (218), όπου και τέθηκε ο πρώτος ακρογωνιαίος λίθος σχετικά με το μεσογειακό πρότυπο διαίτας και υγείας. Η δύναμη της μεσογειακής διατροφής για την καταπολέμηση των ασθενειών και την προαγωγή της υγείας υποστηρίχθηκε από τα πρωτοποριακά για την εποχή ευρήματα του Serge Renaud το 1992 που έκανε αναφορά για το «γαλλικό παράδοξο» (French Paradox) (219). Ενώ η γαλλική διατροφή είναι σχετικά υψηλότερη σε κορεσμένα λιπαρά, η συχνότητα εμφάνισης CHD στους Γάλλους ήταν χαμηλή. Αν και αυτά τα ευρήματα προκάλεσαν τεράστια αντιπαράθεση και αμφισβητήθηκαν σε πολυάριθμες μελέτες, τα ευρήματα των Keys και Renaud έδωσαν σημαντική ώθηση στη μελέτη των δραστικών συστατικών της μεσογειακής διατροφής. Ο κοινός κρίκος

μεταξύ των κυριότερων συστατικών της μεσογειακής διατροφής, δημητριακά ολικής αλέσεως, όσπρια, λαχανικά, φρούτα, εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο και κόκκινο κρασί, είναι η υψηλή περιεκτικότητα φυτικών φαινολικών ενώσεων που αναφέρονται ως πολυφαινόλες ή βιοφαινόλες (220). Οι βιοφαινόλες κατέχουν ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες και συμβάλλουν στην εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών. Το οξειδωτικό στρες είναι μια κατάσταση του κυττάρου που εμφανίζεται όταν υπάρχει σοβαρή ανισορροπία μεταξύ της ικανότητας του βιολογικού συστήματος να παράγει και να αποτοξινώνει τις ελεύθερες ρίζες, ενώ παράλληλα επηρεάζεται η κυτταρική σηματοδότηση. Το οξειδωτικό στρες φαίνεται να παίζει κεντρικό ρόλο στη διαδικασία γήρανσης και στην παθολογία διαφόρων ασθενειών. Ως εκ τούτου, οι βιοφαινόλες χρησιμεύουν ως φυσικά αντιοξειδωτικά τα οποία συμβάλλουν στη «διόρθωση» αυτής της οξειδωτικής ανισορροπίας. Σε πολλές πειραματικές μελέτες, οι βιοφαινόλες έχουν δείξει ένα ευρύ φάσμα φαρμακολογικών δραστηριοτήτων πέρα από τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες (104).

## 2.2. Σκοπός διδακτορικής διατριβής

Ο σκοπός της διδακτορικής αυτής διατριβής, είναι η αποτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας ενός βιοφαινολικού εκχυλίσματος ελαιολάδου του Αγίου Όρους, αλλά και ξεχωριστά οι κύριες βιοφαινόλες (καθαρές ενώσεις) του με συνδυασμό μοριακών τεχνικών, τόσο με *in vitro* προσέγγιση όσο και σε διάφορες κυτταρικές σειρές και *in vivo* μοντέλο. Επιλέον κρίθηκε απαραίτητο να γίνει αποτίμηση το πως η διαφορετική πολυφαινολική σύσταση που έχουν τα ελαιόλαδα αντικατοπτρίζεται στις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες. Τέλος, καθώς παρατηρήθηκε έλλειψη στη διεθνή βιβλιογραφία σχετικά με την αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών των ανθέων ελιάς, επιπρόσθετος στόχος μας ήταν να επισημάνουμε τις ευεργετικές τους ιδιότητες, μιας πηγής αντιοξειδωτικών που κατά βάση παραμένει ανεκμετάλεπτη. Τελικός στόχος είναι η δημιουργία ελαιολάδων υψηλής προστιθέμενης αξίας, βιολειτουργικών σκευασμάτων, τα οποία θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συμπλήρωμα διατροφής στον άνθρωπο, αυξάνοντας την αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού, καθώς και προιόντων με φαρμακευτική και καλλυντική χρήση.

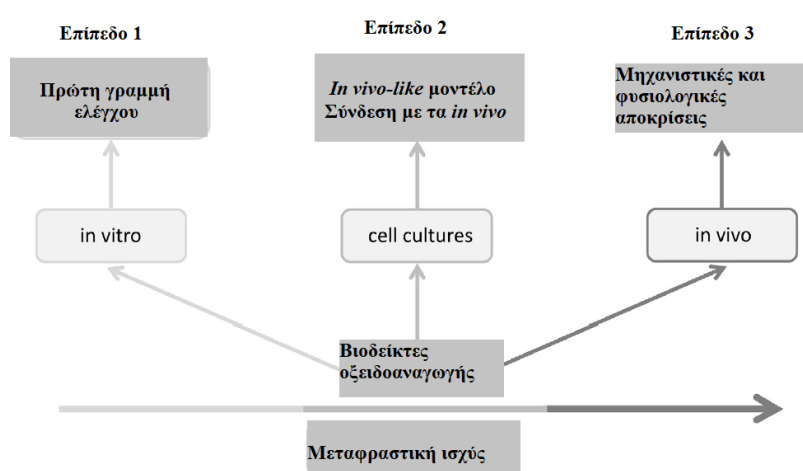
## Κεφάλαιο 3 – Υλικά και μέθοδοι

### 3.1 Εισαγωγή

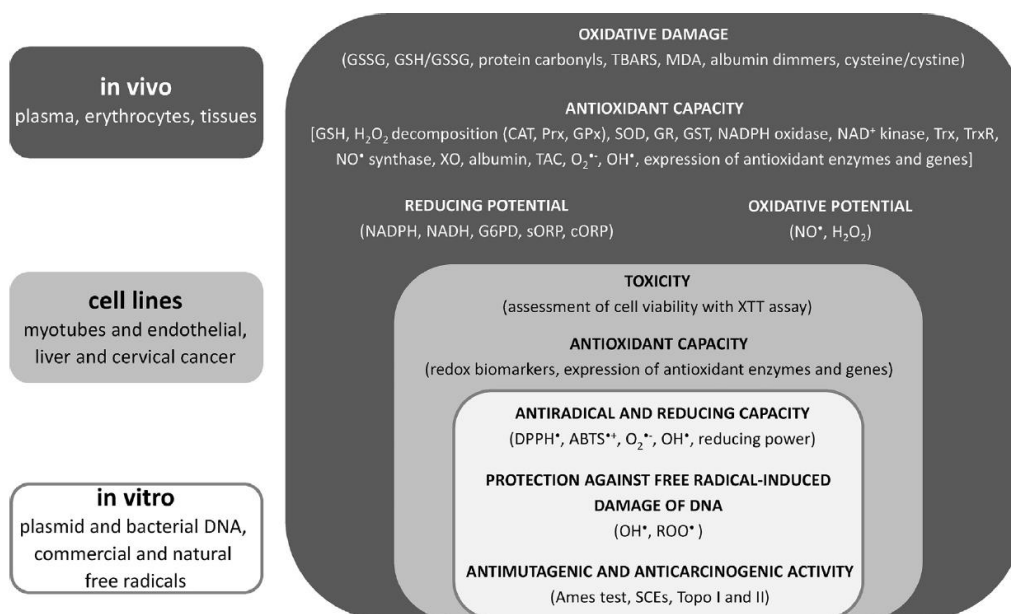
Τις τελευταίες δεκαετίες, τα επιστημονικά ευρήματα που τονίζουν τις ωφέλιμες συνέπειες για την υγεία των φυτικών προερχόμενων ενώσεων, όπως τα φυτικά εκχυλίσματα πλούσια σε πολυφαινόλες, έχουν αυξηθεί σημαντικά. Οι κύριοι άξονες για την αξιολόγηση της δυναμικής αυτών των ενώσεων αφορούν την ενίσχυση της αντιοξειδωτικής και αντιγενοτοξικής άμυνας των ιστών και ακόμη και ολόκληρων οργανισμών. Το εργαστήριο φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών και Τοξικολογίας, έχει 20ετή εμπειρία όσον αφορά την αντιοξειδωτική δράση φυτικών εκχυλισμάτων και την επίδραση τους στην οξειδοαναγωγική ισορροπία. Αποτέλεσμα των πολυετών ευρημάτων πάνω στη φυσιολογία του οξειδωτικού στρες, αποτέλεσε η δημιουργία ενός «πρωτοκόλλου» το οποίο ακολουθείται προκειμένου να γίνει μια ολιστική αξιολόγηση ενός φυτικού εκχυλίσματος και αφορά όλα τα πρωτόκολλα που θα αναλυθούν εκτενώς παρακάτω. Συνεπώς, στη μελέτη που δημοσιεύτηκε το 2019 από τον Βεσκούκη Α. και την υπόλοιπη ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου μας (221), παρατίθεται ένα σύνολο βιοδεικτών για τη μέτρηση των αντιοξειδωτικών, αντιμεταλλαξιογόνων και αντιγενοτοξικών ικανοτήτων των φυτικών ενώσεων σε τρία επίπεδα.

Το πρώτο επίπεδο αφορά τον χαρακτηρισμό των φυτικών ενώσεων *in vitro*, μέσω της ανίχνευσης της αντιοξειδωτικής και αναγωγικής τους ικανότητας αλλά και των αντιμεταλλαξιογόνων και αντιγενοτοξικών ιδιοτήτων τους. Στο δεύτερο επίπεδο, οι προηγούμενες μετρήσεις πραγματοποιούνται σε ένα διαφορετικό σύστημα, αυτών των κυτταρικών σειρών. Αν και οι κυτταρικές σειρές θεωρούνται ως *in vitro* σύστημα, είναι αδιαμφισβήτητο ότι είναι ένα *in vivo* περιβάλλον και επομένως μια σύνδεση για τις *in vivo* μελέτες, για το λόγο ότι οι κυτταρικές σειρές είναι μεταβολικά ενεργές. Θα μπορούσαμε να χαρακτηρίσουμε τις κυτταρικές σειρές ως *in vivo-like* σύστημα. Το τρίτο επίπεδο, περιλαμβάνει τη χορήγηση φυτικών ενώσεων *in vivo*, σε πειραματόζωα ή ανθρώπους είτε ατομικά είτε ως συμπληρώματα διατροφής. Οι βιοδείκτες που εξετάζονται σχετικά με την οξειδωτική βλάβη, την αντιοξειδωτική ικανότητα και το

οξειδοαναγωγικό δυναμικό κυττάρων/ιστών φαίνεται να είναι κατάλληλα εργαλεία στην προσπάθεια να εξάγονται ασφαλείς συμπεράσματα από τα *in vitro* στα *in vivo* μοντέλα και παράλληλα να γίνει ολιστική αποτίμηση της βιολογικής δράσης φυτικών πολυφαινολικών ενώσεων στο πλαίσιο της οξειδοαναγωγικής βιολογίας και της τοξικολογίας. Στην Εικόνα 41 παρουσιάζονται τα τρία επίπεδα για την ολιστική αξιολόγηση της δράσης των φυτικών εκχυλισμάτων και στην **Εικόνα 42**, οι προτεινόμενοι βιοδείκτες για τον χαρακτηρισμό των φυτικών ενώσεων τόσο στα *in vitro*, *in vivo-like* και *in vivo* συστήματα.



**Εικόνα 41** Τα τρία επίπεδα για την ολιστική αξιολόγηση της δράσης των φυτικών εκχυλισμάτων. Πηγή: (221).



**Εικόνα 42** Οι προτεινόμενοι βιοδείκτες για τον χαρακτηρισμό των φυτικών ενώσεων τόσο στα *in vitro*, *in vivo*-like και *in vivo* συστήματα. GSSG: oxidized form of glutathione, GSH: reduced form of glutathione, TBARS: thiobarbituric acid reactive substances, MDA: malonyldialdehyde, CAT: catalase, Prx: peroxiredoxins, SOD: superoxide dismutase, GPx: glutathione peroxidase, GR: glutathione reductase, GST: glutathione S-transferase, NADPH: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced, NAD<sup>+</sup>: nicotinamide adenine dinucleotide oxidized, Trx: thioredoxin, TrxR: thioredoxin reductase, XO: xanthine oxidase, TAC: total antioxidant capacity, NADH: nicotinamide adenine dinucleotide reduced, G6PD: glucose 6-phosphate dehydrogenase, sORP: static oxidation-reduction potential, cORP: capacity oxidation-reduction potential, XTT: (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide), DPPH<sup>•</sup>: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical, ABTS<sup>•+</sup>: 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) radical, SCEs: sister chromatid exchanges, Topo I and II: topoisomerases I and II. Πηγή: (221)

## 3.2 In vitro τεχνικές

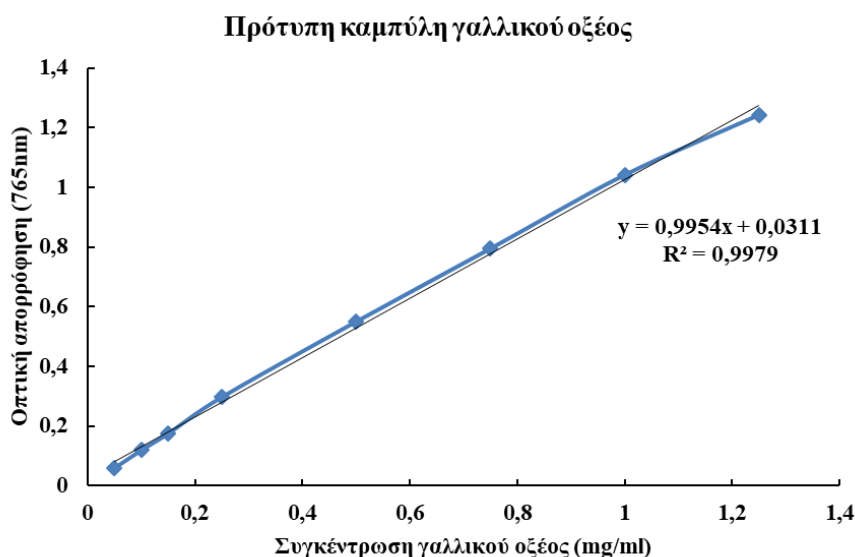
### 3.2.1 Προσδιορισμός του βιοφαινολικού περιεχόμενου μέσω της μεθόδου Folin-Ciocalteu

Ο προσδιορισμός του βιοφαινολικού περιεχομένου γίνεται μέσω του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu, το οποίο αποτελείται από μίγμα σύνθετων πολυμερών ιόντων από φωσφομολυβδαινικά και φωσφοβολφραμικά ετεροπολυμερή οξέα. Το διάλυμα με το μίγμα είναι σημαντικό να είναι αλκαλικό, το οποίο επιτυγχάνεται με

την προσθήκη κορεσμένου διαλύματος ανθρακικού νατρίου ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). Οι βιοφαινολικές ενώσεις αλληλεπιδρούν με το μίγμα και δίνουν μία έντονη μπλε χρώση, η οποία έχει απορρόφηση στα 765nm (222).

Πιο συγκεκριμένα σε τελικό όγκο αντίδρασης 2 ml αναμίχθηκαν νερό ( $\text{dH}_2\text{O}$ , 1 ml) και το εκάστοτε εκχύλισμα (20  $\mu\text{l}$ ). Το κάθε εκχύλισμα έχει το δικό του τυφλό στο οποίο αντί για εκχύλισμα είχε ίση ποσότητα  $\text{dH}_2\text{O}$ . Έπειτα, έγινε προσθήκη του αντιδραστήριου FC (100  $\mu\text{l}$ ), ανακίνηση των δειγμάτων και προσθήκη του διαλύματος  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  25% w/v (280  $\mu\text{l}$ ), ενώ έγινε 3 λεπτά επώαση σε θερμοκρασία δωματίου και συμπλήρωση του όγκου μέχρι τα 2ml με  $\text{dH}_2\text{O}$ . Ακολούθησε επώαση για μία ώρα στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου (RT) και φωτομέτρηση στα 765 nm. Κάθε δείγμα αναλύθηκε 3 ανεξάρτητες φορές. Επίσης καταγράφηκε η οπτική απορρόφηση των εκχυλισμάτων χωρίς το FC ώστε να αφαιρεθεί από την τελική απορρόφηση .

Για τους υπολογισμούς χρησιμοποιήθηκε πρότυπη καμπύλη μιας πρότυπης βιοφαινόλης, αυτής του γαλλικού οξέος. Να τονιστεί η δοκιμασία FC είναι γραμμική για συγκεντρώσεις βιοφαινολών έως και 1,4 mg/ml. Η πρότυπη καμπύλη δημιουργήθηκε με συγκεντρώσεις 0.05, 0.1, 0.15, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 2.0 και 2.5 mg/ml γαλλικού οξέος Διάγραμμα 1:



**Διάγραμμα 1 Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος**

Με βάση τις τιμές οπτικής απορρόφησης της κάθε συγκέντρωσης προέκυψε η εξίσωση  $y = 0,9954x + 0,0311$  ( $R^2 = 0,99$ ). Το βιοφαινολικό περιεχόμενο αναφέρεται ως mg GA/mg εκχυλίσματος, όπου GA: Gallic acid.

3.2.2. Αποτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω εξουδετέρωσης ελευθέρων ριζών

### 3.2.2.1 Ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH•

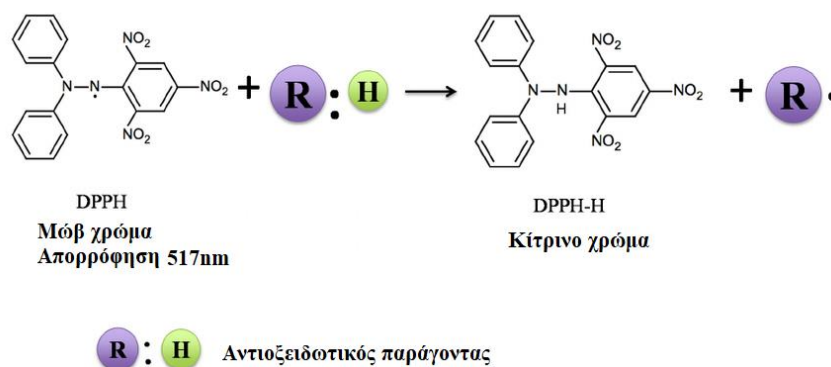
Η μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας ενός εκχυλίσματος συναρτάται στην εξουδετέρωση της τεχνητής σταθερής ελεύθερης ρίζας 1,1-διφαινυλ-πικρυλδραζιλίου (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH•) (223). Οι ενώσεις αντιδρούν και εξουδετερώνουν το DPPH• είτε με τη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου (SET) είτε ενός ατόμου υδρογόνου (HAT). Το DPPH• είναι μια σταθερή οργανική ρίζα αζώτου, μωβ χρώματος με μέγιστο απορρόφησης στα 517 nm. Η εξουδετέρωσή της σχηματίζει την ομόλογη υδραζίνη (DPPH-H) κίτρινου χρώματος, προκαλώντας μείωση της απορρόφησης (Εικόνα 43).

Συγκεκριμένα, σε τελικό όγκο αντίδρασης 1 ml έγινε προσθήκη 0,9 mL μεθανόλης, 50 μL του εκάστοτε υπό εξέταση εκχυλίσματος σε εύρος συγκεντρώσεων και 50 μL DPPH• (0,1 mM), ανακίνηση, επώαση στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου και φωτομέτρηση στα 517 nm. Κάθε συγκέντρωση είχε και το αντίστοιχο τυφλό (απουσία της ρίζας), ενώ ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε μόνο η ρίζα με τη μεθανόλη. Το φωτόμετρο μηδενίστηκε με μεθανόλη. Κάθε δείγμα μετρήθηκε τρεις φορές ενώ πραγματοποιήθηκαν τρία ανεξάρτητα πειράματα. Ενώ υπολογίστηκε η τιμή  $IC_{50}$ , η οποία περιγράφει τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος που προκαλεί εξουδετέρωση της ρίζας κατά 50%. Η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων (radical scavenging capacity, RSC), υπολογίστηκε με βάση την ακόλουθη εξίσωση:

$$\% \text{ εξουδετέρωση της ρίζας} = [(Ac - Ad)/Ac] \times 100$$

Ac: Οπτική απορρόφηση του μάρτυρα

Ad: Οπτική απορρόφηση του δείγματος



**Εικόνα 43** Μηχανισμός αντίδρασης 2,2-διφαινυλ-1-πικρυλυδραζυλ (DPPH) με αντιοξειδωτικό παράγοντα. R: H = αντιοξειδωτικός παράγοντας. R = σχηματιζόμενη ρίζα του αντιοξειδωτικού παράγοντα. Πηγή: (224).

### 3.2.2.2 Ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS<sup>•+</sup>

Αυτή η μέθοδος αφορά την εξουδετέρωση της ρίζας 2,2'-αζινοδις-(3-αιθυλοβενζοθειαζολίνη-σουλφονικό οξύ (2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid), ABTS<sup>•+</sup>) (225). Ο μηχανισμός είναι παρόμοιος με τη ρίζα DPPH<sup>•</sup>, με τη μόνη διαφορά ότι το ABTS<sup>•+</sup> σε σχέση με το DPPH<sup>•</sup> δεν είναι σταθερή ρίζα, συνεπώς απαιτείται πρώτα να δημιουργηθεί και έπειτα να γίνει προσθήκη του εκάστοτε εκχυλίσματος. Κατά το σχηματισμό της ρίζας ABTS<sup>•+</sup> το διάλυμα αποκτά πράσινο χρώμα, με μέγιστη απορρόφηση στα 730 nm. Η προσθήκη αντιοξειδωτικού παράγοντα προκαλεί αποχρωματισμό του διαλύματος και μείωση απορρόφησης (Εικόνα 44).

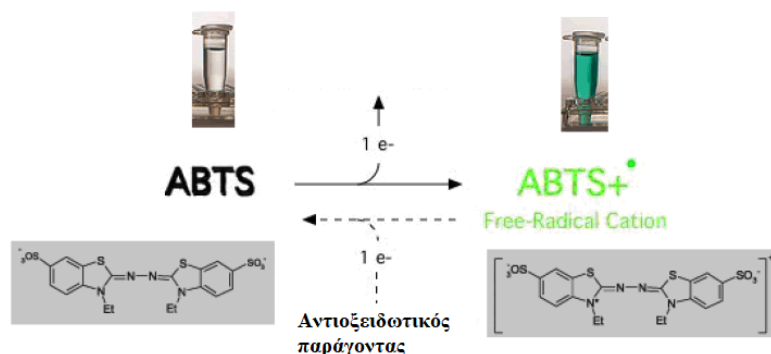
Σε τελικό αντίδρασης 1 ml, πραγματοποιείται η δημιουργία της ρίζας ABTS<sup>•+</sup> (1mM), με την προσθήκη 6μM περοξειδάσης του χρένου (Horseradish peroxidase, HRP), και 30μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Αφού γίνει ανάδευση και επώαση στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 45 min, γίνεται προσθήκη των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων σε εύρος συγκεντρώσεων (ετκός από τον μάρτυρα) και η καταγραφή της οπτικής απορρόφησης στα 730 nm. Όπως και στην προηγούμενη δοκιμασία, κάθε συγκέντρωση εκχυλίσματος είχε και το αντίστοιχο τυφλό (χωρίς την προσθήκη της HRP). Τα δείγματα μετρήθηκαν εις τριπλούν ενώ έγιναν τρία ανεξάρτητα πειράματα. Η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων (radical scavenging capacity, RSC), υπολογίστηκε με βάση την ακόλουθη εξίσωση:



$$\% \text{ εξουδετέρωση της ρίζας} = [(A_c - A_d)/A_c] \times 100$$

A<sub>c</sub>: Οπτική απορρόφηση του μάρτυρα

A<sub>d</sub>: Οπτική απορρόφηση του δείγματος



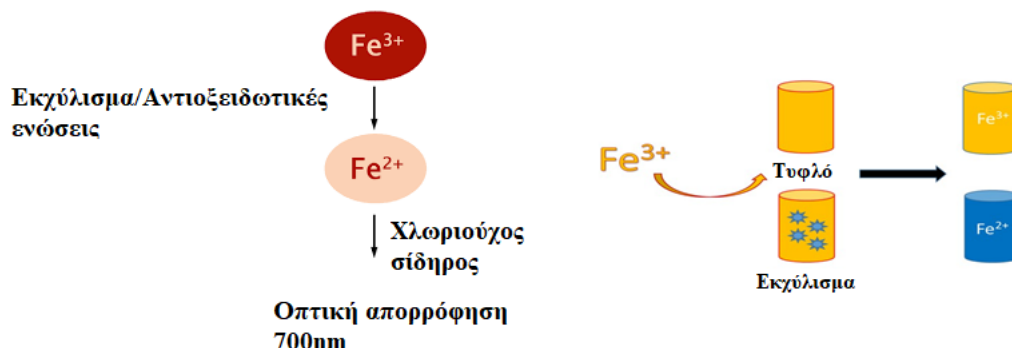
**Εικόνα 44 Μηχανισμός αντίδρασης της ρίζας 2,2'-αζινοδις-(3-αιθυλο-βενζοθειαζολίνη-σουλφονικό οξύ (ABTS•+) με αντιοξειδωτικό παράγοντα. Πηγή: (226).**

### 3.2.2.3 Αναγωγική ισχύς

Το πειραματικό αυτό πρωτόκολλο (227) αξιολογεί την αναγωγική ισχύ των εκχυλισμάτων, δηλαδή την ικανότητα τους να προσφέρουν ηλεκτρόνια. Ουσίες με αναγωγική ικανότητα ανάγουν τον Fe<sup>3+</sup> σε Fe<sup>2+</sup> ο οποίος στη συνέχεια συμπλοκοποιείται με τον χλωριούχο σίδηρο με μέγιστη απορρόφηση τα 700 nm (Εικόνα 45). Όσο αυξημένη είναι η οπτική απορρόφηση τόσο αυξημένη είναι και η αναγωγική ισχύς των εξεταζόμενων δειγμάτων.

Πιο αναλυτικά, σε φωσφορικό διάλυμα (0,2M, pH 6,6) δημιουργήθηκε εύρος συγκεντρώσεων των εξεταζόμενων δειγμάτων. Εν συνεχεία, 250 μl από την κάθε συγκέντρωση αναμίχθηκαν με 250 μl σιδηροκυανιούχου καλίου (1%) και επώαστηκαν στους 50 °C για 20 λεπτά. Έπειτα, τα δείγματα κρύωσαν στον πάγο για 5 λεπτά και προστέθηκαν 250 μl TCA (10%), όπου και έγινε φυγοκέντρωση στις ακόλουθες συνθήκες: 3000 g, 10 min, 25°C. Από το υπερκείμενο συλλέχθηκαν 500 μl τα οποία αναμίχθηκαν με 500 μl dH<sub>2</sub>O και 100 μl χλωριούχου σιδήρου (0,1 %). Ακολούθησε ανάδευση, επώαση για 10 λεπτά σε RT και φωτομέτρηση στα 700 nm. Κάθε συγκέντρωση του εκχυλίσματος είχε και το αντίστοιχο τυφλό, η απορρόφηση του

οποίου αφαιρέθηκε από την τελική απορρόφηση. Κάθε δείγμα εξετάστηκε 3 ανεξάρτητες φορές. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως η συγκέντρωση εκχυλίσματος που είχε οπτική απορρόφηση 0,5.



Εικόνα 45 Αρχή μεθόδου αναγωγικής ισχύς. Πηγή: <https://www.cellbiolabs.com/sites/default/files/STA-859-frap-assay-kit.pdf>

### 3.2.2.4 Εξουδετέρωση της ρίζας HO•

Η αρχή της μεθόδου περιλαμβάνει (228) την παραγωγή ρίζας υδροξυλίου μέσω αντίδρασης Fenton, η οποία ακολούθως οξειδώνει τη δεοξυριβόζη παράγοντας μαλονδιαλδεΐδη, η οποία αλληλεπιδρά με το θειοβαρβιτουρικό οξύ σχηματίζοντας ένα έγχρωμο προϊόν με μέγιστη απορρόφηση τα 520 nm. Τα υπο εξέταση εκχυλίσματα, ανάλογα με το αντιοξειδωτικό περιεχόμενό τους, παρεμποδίζουν την οξείδωση της δεοξυριβόζης ελαττώνοντας έτσι την οπτική απορρόφηση.

Πιο συγκεκριμένα, 75 μl δείγματος σε εύρος συγκεντρώσεων, αναμείχθηκαν μαζί με 225 μl ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (0,2 M, pH 7,4), 75 μl 2-δεοξυριβόζης (10 mM), 75 μl FeSO<sub>4</sub>-EDTA (10 mM), 262,5 μl H<sub>2</sub>O και 75 μl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 mM), έγινε επώαση για 1 ώρα στους 37°C. Έπειτα, προστέθηκαν 375 μl TCA (2,8%) και 375 μl TBA (1%) και τα δείγματα επώαστηκαν στους 95°C για 10 λεπτά. Τα δείγματα κρύωσαν στον πάγο για 10 λεπτά και φυγοκεντρήθηκαν (3000 g, 10 min, 25°C). Η φωτομέτρηση έγινε στα 520 nm. Χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας ο οποίος, δεν περιείχε δείγμα, ενώ τα τυφλά για την κάθε συγκέντρωση δείγματος στερούσαν H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν και πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα.

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων υπολογίστηκε με βάση την ακόλουθη εξίσωση,

$$\% \text{ Εξουδετέρωσης ρίζας} = \{(A_0 - A_\delta) / A_0\} \times 100\%$$

**A<sub>0</sub>** η οπτική απορρόφηση του μάρτυρα

**A<sub>δ</sub>** η οπτική απορρόφηση του δείγματος :

### 3.2.2.5 Εξουδετέρωση της ρίζας O<sub>2</sub><sup>•-</sup>

Η αρχή της μεθόδου για την εξουδετέρωση της ρίζας O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (229), βασίζεται στο σύστημα PMS-NADH το οποίο, παράγει ρίζα σουπεροξειδίου και την επακόλουθη αναγωγή του NBT σε φορμαζάνη, με μέγιστη απορρόφηση στα 560 nm. Ένα βιοφαινολικό εκχύλισμα μπορεί να αναστείλει τη μετατροπή αυτή, ελαττώνοντας έτσι την οπτική απορρόφηση.

Πιο αναλυτικά, 800 μl ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl (16 mM, pH 8,0) προστέθηκαν σε 125 μl NBT (300 μM), 125 μl NADH (468 μM) και 125 μl PMS (60 μM) και 50 μl δείγματος σε εύρος συγκεντρώσεων. Ακολούθησε ανάδευση και επώαστηκαν για 30 λεπτά στο σκοτάδι. Τέλος καταγράφηκε η οπτική τους απορρόφηση στα 560 nm. Ο μάρτυρας δεν είχε δείγμα, ενώ το τυφλό κάθε συγκέντρωσης δεν είχε PMS. Κάθε δείγμα εξετάστηκε 3 ανεξάρτητες φορές.

Για τον υπολογισμό της εξουδετέρωσης προσδιορίστηκε η τιμή IC<sub>50</sub>, από την καμπύλη εξουδετέρωσης/συγκέντρωσης. Το ποσοστό εξουδετέρωσης της ρίζας για κάθε συγκέντρωση προέκυψε από την ακόλουθη εξίσωση,

$$\% \text{ Εξουδετέρωσης ρίζας} = \{(A_0 - A_\delta) / A_0\} \times 100\%$$

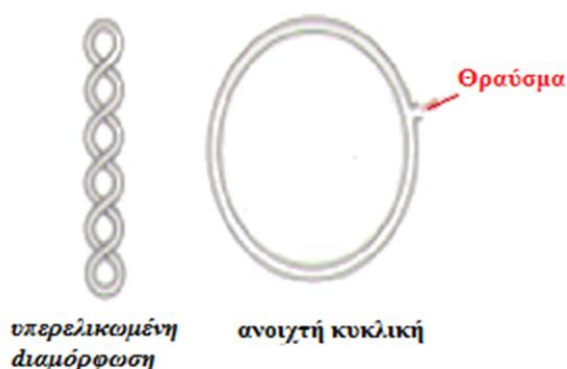
A<sub>0</sub>, η οπτική απορρόφηση του μάρτυρα

A<sub>δ</sub> η οπτική απορρόφηση του δείγματος:

### 3.2.3 Αποτίμηση της αντιοξειδωτικής/προστατευτικής/αντιγενοτοξικής δράσης έναντι της πρόκλησης ρήξεων στο DNA από ελεύθερες ρίζες

Η αποτίμηση της προστατευτική ικανότητας των εκχυλισμάτων έναντι του DNA πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου χαλάρωσης πλασμιδιακού DNA (Plasmid relaxation assay) από κάποιον οξειδωτικό παράγοντα. Η μέθοδος βασίζεται στην διαφορετική κινητικότητα του πλασμιδιακού DNA σε πήκτωμα αγαρόζης ανάλογα με τη διαμόρφωσή του (βαθμός υπερελίκωσης). Το πλασμιδιακό DNA απαντάται κατά κύριο λόγο σε τρεις διαμορφώσεις (Εικόνα 46):

- Την υπερελικωμένη. Αφορά την πιο συμπαγή δομή, όπου το DNA είναι άθικτο. Συνεπώς, τρέχει πιο γρήγορα.
- Την ανοιχτή κυκλική. Σε αυτή τη μορφή μεταβαίνει έπειτα από μονόκλωνα θραύσματα (π.χ. από τη επίδραση οξειδωτικών παραγόντων) και τρέχει πιο αργά στην πηκτή.
- Τη γραμμική διαμόρφωση, που προκύπτει έπειτα από δίκλωνες ρήξεις.



**Εικόνα 46 Μορφές υπερελίκωσης του πλασμιδιακού DNA.**

Η προστατευτική δράση των εκχυλισμάτων έναντι του DNA, υπολογίζεται ως προς την ικανότητα τους να εξουδετερώνουν τους οξειδωτικούς παράγοντες και συνεπώς να εμποδίζουν της μετατροπή του DNA από την υπερελικωμένο διαμόρφωση στις άλλες δύο που αναφέρθηκαν. Συγκεκριμένα, από την επαγόμενη από ρίζες ROO• πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA (230).

Πιο αναλυτικά, χρησιμοποιήθηκε ο οξειδωτικός παράγοντας 2,2'-Azobis(2-amidinopropane hydrochloride) (AAPH), ο οποίος έπειτα από θερμική διάσπαση δίνει ρίζες περοξυλίου (ROO•). Αυτό το είδος ρίζας είναι παρόμοιο με τις ρίζες που προκύπτουν φυσιολογικά ως προϊόν της λιπιδικής υπεροξειδωσης. Θα πρέπει να τονιστεί, πως οι ρίζες αυτές προκαλούν μονόκλωνες ρήξεις στο DNA, συνεπώς και σε αλλαγή διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA. Αναμένεται λοιπόν πως ένα βιοφαινολικό εκχύλισμα θα προστατέψει το DNA διατηρώντας την αρχική υπερελικωμένη μορφή.

Πιο συγκεκριμένα, σε τελικό όγκο αντίδρασης 10 μl αναμίχθηκαν 3,2 μg πλασμιδιακό DNA, εύρος συγκεντρώσεων των εκχυλισμάτων και 2,5 mM AAPH σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS (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>, pH 7,4). Έγινε ανάδευση και φυγοκέντρηση των δειγμάτων, ενώ ακολούθησε επώαση για 45 λεπτά στον επωαστικό κλίβανο (37°C). Η αντίδραση διακόπηκε με την προσθήκη του διαλύματος φόρτωσης (0,25% χρωστικής κυανό της βρωμοφαινόλης και 30% γλυκερόλη). Ο αρνητικός μάρτυρας απουσία AAPH και εκχυλίσματος, ενώ ο θετικός μάρτυρας απουσία εκχυλίσματος. Να τονιστεί πως το κάθε εκχύλισμα στη μέγιστη συγκέντρωση εξετάστηκε απουσία AAPH, για να επιβεβαιωθεί ότι δεν επιδρά στο DNA. Στη συνέχεια, οι αντιδράσεις φορτώθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8% σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1X (10 mM Tris-HCl, 90 mM βορικό οξύ, 1mM EDTA, pH 8), και ηλεκτροφορήθηκαν για 1 ώρα στα 70 V. Τέλος, έγινε χρώση της πηκτής με βρωμιούχο αιθίδιο (0,5 μg/ml) για 30 λεπτά. Ακολούθησε πλύση με dH<sub>2</sub>O για το ίδιο χρονικό διάστημα.

Η ποσοτικοποίηση των ζωνών πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Alpha Innotech. Κάθε δείγμα μετρήθηκε τρεις ανεξάρτητες φορές. Υπολογίστηκε η τιμή IC<sub>50</sub> για το κάθε εκχύλισμα, δηλαδή η συγκέντρωση που αναστέλλει κατά 50% τη μετάβαση του πλασμιδίου από την υπερελικωμένη στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση, η οποία προκύπτει από την καμπύλη αναστολής/συγκέντρωσης. Η % αναστολή υπολογίστηκε σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = [(S_{\theta} \times -S_{\delta}) / (S_{\theta} - S_0)] \times 100$$

$S_{\theta}$ : Ποσοστό υπερελικωμένης διαμόρφωσης στο θετικό μάρτυρα

$S_{\delta}$ : Ποσοστό υπερελικωμένης διαμόρφωσης στο δείγμα

$S_0$ : Ποσοστό υπερελικωμένης διαμόρφωσης στον αρνητικό μάρτυρα

### 3.2.3.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Στη συγκεκριμένη δοκιμή χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο Bluescript-SK+ το οποίο, προήλθε από καλλιέργεια βακτηρίων *Escherichia coli*. Η διαδικασία ξεκινά με την επιμόλυνση 5 ml θρεπτικού μέσου (LB broth, NaCl, 100 μg/ml αμπικιλίνη) με *E. coli* που έχουν το πλασμίδιο. Με το πέρας της επώασης 4 ωρών στους 37°C υπό ανάδευση (210 rpm), ακολούθησε ολονύκτια ανακαλλιέργεια σε 100 ml θρεπτικού. Για την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA, αρχικά έγινε διαχωρισμός της καλλιέργειας σε δυο σωλήνες των 50 ml. Ακολούθησε φυγοκέντρηση (4000 g, 10 min, 4°C) και απόρριψη του υπερκείμενου. Τα ιζήματα επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε 4 ml διαλύματος 1 (50 mM γλυκόζη, 25 mM Tris-Cl, 10 mM EDTA, pH 8) και επώαστηκαν για 5 λεπτά σε RT. Έπειτα, προστέθηκαν 8 ml διαλύματος 2 (0,2 N NaOH, 1% SDS) με ήπια ανακίνηση. Το αλκαλικό διάλυμα προξένησε διάγυαση, ενώ αμέσως πραγματοποιήθηκε προσθήκη 6 ml διαλύματος 3 (5M C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>K, 11,5% οξικό οξύ). Τα δείγματα επώαστηκαν για 8 λεπτά σε RT και φυγοκεντρήθηκαν (3214 g, 20 min, 4°C) και μεταφορά του υπερκείμενου σε καινούριο σωλήνα. Το υπερκείμενο αφού ογκομετρήθηκε φυγοκεντρήθηκε στις ίδιες συνθήκες. Το νέο υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε καθαρό σωλήνα όπου και έγινε προσθήκη παγωμένης προπανόλης, σε όγκο ίσο με 60% του όγκου του υπερκείμενου, φυγοκέντρηση (3214 g, 20 min, 4°C) και απομάκρυνση του υπερκείμενου. Στο ίζημα προστέθηκε κρύα αιθανόλη 70% v/v σε όγκο ίσο με 50% του όγκου του υπερκείμενου. Μετά από ανάδευση και νέα φυγοκέντρηση (3214 g, 20 min, 4°C), το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα αφού ξηράθηκε επαναδιαλυτοποιήθηκε σε διάλυμα TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, RNase 10 μg/ml).

Η ποσοτικοποίηση του DNA έγινε με καταγραφή της οπτικής απορρόφησης στα 260nm. Απορρόφηση ίση με ένα αντιστοιχεί σε 50 µg/ml DNA. Η εκτίμηση της καθαρότητας του δείγματος από πρωτεΐνες ολοκληρώθηκε μέσω καταγραφής της απορρόφησης στα 280 nm και υπολογίστηκε ο λόγος 260/280, όπου τιμές >1,8 αφορούν δείγμα μεγάλης καθαρότητας.

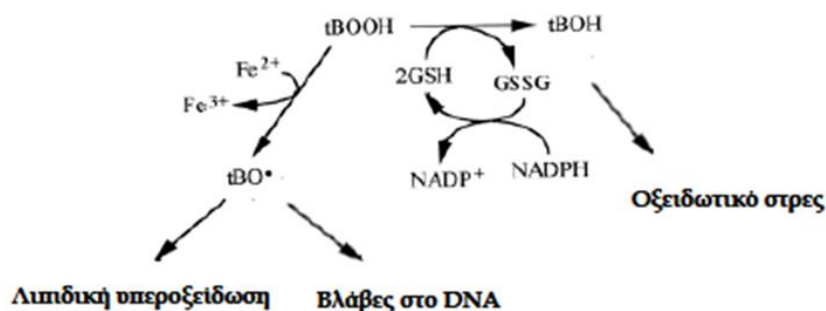
### 3.2.4 Αποτίμηση της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης εκχυλισμάτων μέσω της δοκιμασίας Ames

Η μέθοδος αυτή είναι υπεύνηνη για την εύρεση πιθανών μεταλλαξιγόνων ή αντιμεταλλαξιγόνων ενώσεων ή/και εκχυλισμάτων (231), με τη χρήση του βακτηρίου *Salmonella typhimurium* και πιο συγκεκριμένα το στέλεχος TA102, το οποίο είναι ευαίσθητο σε οξειδωτικές βλάβες που επάγονται από ROS, ενώ φέρει και κάποιες μεταλλάξεις οι οποίες το καθιστούν ιδανικό. Αυτές περιλαμβάνουν την αδρανοποίηση ενός ενζύμου του οπερονίου της ιστιδίνης που κάνει το βακτήριο αυξότροφο ως προς το αμινοξύ αυτό. Η συγκεκριμένη μετάλλαξη (*hisG428*) αφορά μία μετάλλαξη τερματισμού (TAA) και βρίσκεται στο πλασμίδιο pAQ1 που υπάρχει σε πολλά αντίγραφα στα κύτταρα TA102, με αποτέλεσμα να πολλαπλασιαστούν οι πιθανές θέσεις αναστροφών μεταλλάξεων και παράλληλα οι πιθανότητες εμφάνισης επαναμεταλλαγμένων αποικιών. Συμπληρωματικά, το πλασμίδιο pAQ1 παρέχει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό τετρακυκλίνη, που χρησιμοποιείται ως δείκτης ανίχνευσης. Επιπρόσθετα, το στέλεχος TA102 φέρει τη μετάλλαξη *rfa* η οποία, προκαλεί το σχηματισμό ελλειμματικού λιποπολυσακχαριτικού στρώματος στο βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα, συνεπώς αυτό να είναι διαπερατό σε μεγαλομοριακές ενώσεις. Επιπλέον, περιέχει το πλασμίδιο pKM101 το οποίο, έχει την ικανότητα να αυξάνει μεταλλάξεις προκαλούμενες από χημικές ενώσεις και υπεριώδη ακτινοβολία καθώς ευνοεί τον επιδιορθωτικό μηχανισμό βλαβών DNA που είναι επιρρεπής σε λάθη (error-prone recombinational repair pathway).

Η καλλιέργεια του στελέχους αυτού σε θρεπτικό υλικό με ίχνη ιστιδίνης επιτρέπει μικρό αριθμό διαιρέσεων (6-8) όπου ενδέχεται να γίνουν επαναμεταλλάξεις στο οπερόνιο της ιστιδίνης, και να δημιουργηθεί ξανά ο άγριος τύπος. Τα επαναμεταλλαγμένα βακτήρια μπορούν έτσι να αναπτυχθούν φυσιολογικά,

δημιουργώντας σταθερού αριθμού αποικίες (~ 200-300/τρυβλίο για το TA102). Η παράλληλη προσθήκη μιας μεταλλαξιγόνου ένωσης, προκαλεί δοσοεξαρτώμενη αύξηση στον αριθμό των επαναμεταλλάξεων και συνεπώς των αποικιών, ενώ ένας αντιμεταλλαξιγόνος παράγοντας ελατώνει τις αποικίες.

Στην διατριβή αυτή προστέθηκε ο μεταλλαξιγόνος παράγοντας t-BOOH, σε ποσότητα όπου οι παρατηρούμενες αποικίες διπλασιάζονται, ενώ παράλληλα χορηγήθηκαν τα διάφορα εκχυλίσματα σε εύρος συγκεντρώσεων προκειμένου να ελεγχθεί η πιθανή αντιμεταλλαξιγόνου δράση τους. Το οργανικό υδροϋπεροξειδίο t-BOOH αποτελεί έναν οξειδωτικό παράγοντα οποίος, μειώνει τα ενδογενή επίπεδα GSH μέσω της GPx ενώ ταυτόχρονα αντιδρά με ιόντα  $Fe^{2+}$  δημιουργώντας ρίζες t-BO•. Και οι δυο αυτοί μηχανισμοί σχετίζονται με την οξείδωση βιομορίων (Εικόνα 47) (232).



**Εικόνα 47 Μηχανισμός δράσης του tBOOH. Πηγή: (232).**

Για να γίνει εκτίμηση της αντιμεταλλαξιγόνου ικανότητας των εκχυλισμάτων, θρεπτικό υλικό Nutrient Broth, επιμολύνθηκε με το βακτηριακό στέλεχος *Salmonella typhimurium* TA102 και τοποθετήθηκαν για επώαση στον κλίβανο (37°C) μέχρι η οπτική απορρόφηση στα 540 nm να είναι ίση με 0,1-0,2 ( $1-2 \cdot 10^9$  αποικίες/ml), δηλαδή η καλλιέργεια είναι στην εκθετική φάση αύξησης. Έπειτα, σε σωλίνες που τοποθετήθηκαν μέσα σε υδατόλουτρο (45°C), αναμίχθηκαν 100 μl καλλιέργειας, 2 ml διαλύματος Top Agar (NaCl, Agar και ίχνη ιστιδίνης), 50 μl t-BOOH (0,4 mM) και 50 μl εκχυλίσματος σε εύρος συγκεντρώσεων. Η θερμοκρασία των 45°C συμβάλει ώστε να μην γίνει πήξη του άγαρ αλλά και για να μην προκληθεί μη αναστρέψιμη θερμική βλάβη στα βακτήρια. Τέλος, το περιεχόμενο των σωλίνων επιστρώθηκαν σε τρυβλία



που περιείχαν θρεπτικό υπόστρωμα Glucose Minimal άγαρ [γλυκόζη και άλατα Vogel-Bonner ( $MgSO_4$ , κιτρικό οξύ,  $K_2HPO_4$ ,  $Na_2NH_2PO_4$ )]. Ακολούθησε επώαση σε κλίβανο ( $37^\circ C$ ) για 48 ώρες και καταμέτρηση των επαναμεταλλαγμένων αποικιών.

Για κάθε συγκέντρωση έγιναν τρεις επαναλήψεις, ενώ πραγματοποιήθηκαν τρία ανεξάρτητα πειράματα. Ο αρνητικός μάρτυρας απουσία οξειδωτικό παράγοντα και εκχυλίσματος, ενώ ο θετικός μάρτυρας απουσία εκχυλίσματος. Συμπληρωματικά, έγινε έλεγχος της επίδρασης των δύο μεγαλύτερων συγκεντρώσεων των εκχυλισμάτων στα βακτήρια χωρίς την προσθήκη οξειδωτικού παράγοντα.

Η επιλογή της συγκέντρωσης του t-BOOH έγινε έπειτα από έλεγχο εύρος συγκεντρώσεων του (0,2, 0,4, 0,8 και 1,6 mM/τρυβλίο) ως προς την μεταλλαξιγόνο δράση στα βακτήρια. Η συγκέντρωση 0,4 mM/τρυβλίο διπλασίασε τις παρατηρούμενες επαναμεταλλάξεις σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα, ωστόσο δεν παρουσίασε τοξικότητα σε σχέση με τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Παράλληλα, έγινε έλεγχος της κυτταροτοξικότητας και του t-BOOH και των εκχυλισμάτων μέσω μικροσκοπίου (40x μεγέθυνση), καθώς εκτός επαναμεταλλαγμένων αποικιών, κάθε τρυβλίο έχει και αρκετές μικροσκοπικές αποικίες (background lawn) που δεν είναι ορατές με το μάτι. Η ύπαρξή τους οφείλεται στα ίχνη ιστιδίνης στο Top Agar που επιτρέπει κάποιες διαιρέσεις ακόμα και στα μη επαναμεταλλαγμένα βακτήρια. Συνεπώς, γίνεται σύγκριση μεταξύ της πυκνότητας των μικροαποικιών στον αρνητικό μάρτυρα σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα και αν παρόμοιας πυκνότητας τότε το εξεταζόμενο εκχύλισμα χαρακτηρίζεται μη τοξικό. Αν είναι ήπια τοξικό τότε υπάρχει μείωση των μικροαποικιών. Τέλος, αν παρουσιάζει έντονη τοξικότητα τότε οι αποικίες απουσιάζουν εντελώς.

Για την ποσοτικοποίηση της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης, υπολογίστηκε η τιμή IC50 από το διάγραμμα αναστολής/συγκέντρωσης. Η αναστολή της μεταλλαξιγόνου δράσης του t-BOOH από τα εκχυλίσματα υπολογίστηκε με βάση τον αριθμό των αποικιών σε κάθε τρυβλίο σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο:

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

$A_{\theta}$ : Οι επαναμεταλλαγμένες αποικίες His<sup>+</sup>/τροβλίο του θετικού μάρτυρα (TA102 και t-BOOH).

$A_{\delta}$ : Οι επαναμεταλλαγμένες αποικίες His<sup>+</sup>/τροβλίο παρουσία του εκχυλίσματος (TA102, εκχύλισμα και t-BOOH).

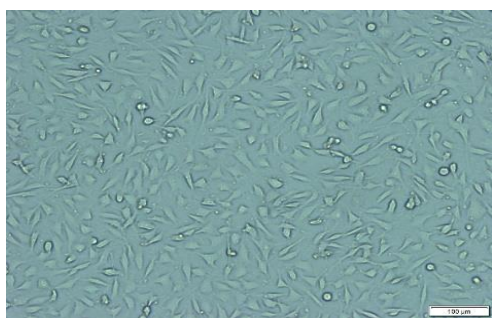
$A_0$ : Οι επαναμεταλλαγμένες αποικίες His<sup>+</sup>/τροβλίο στον αρνητικό μάρτυρα (TA102).

### 3.3 Κυτταροκαλλιέργειες

#### 3.3.1 Κυτταρικές σειρές

Στην εργασία αυτή εξετάστηκαν 4 διαφορετικές κυτταρικές σειρές, τόσο φυσιολογικές όσο και καρκινικές, ανθρώπινες και μη, έτσι ώστε να υπάρχει μια πιο σφαιρική εικόνα της δράσης των εκχυλισμάτων. Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι ακόλουθες.

##### 3.3.1.1 Ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα (EA.hy926)



**Εικόνα 48** Ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα (EA.hy926).

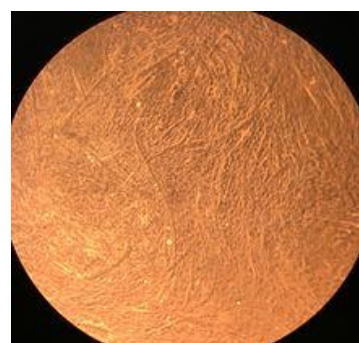
<http://www.grimm-space-research.com/page4/Blog/Blog.html>

Ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα (EA.hy926) (Εικόνα 48) τα οποία, αποτελούν μια υβριδική σειρά που προκύπτει από την σύντηξη, των ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων ομφαλικής φλέβας (HUVCEs) και των επίσης ανθρώπινων επιθηλιακών κυττάρων από πνευμονικό καρκίνωμα (A549) (233). Τα EA.hy926, εμφανίζουν λειτουργικά χαρακτηριστικά διαφοροποιημένων ενδοθηλιακών κυττάρων. Επίσης, τα ενδοθηλιακά κύτταρα αποτελούν το εσωτερικό μέρος όλων των αγγείων και οι επίδραση των ROS σε αυτά έχει πολύ σημαντικό ρόλο για την εμφάνιση καρδιαγγειακών παθήσεων (234). Χρησιμοποιούνται επίσης, ως ένα

*ex vivo* μοντέλο για τον έλεγχο διάφορων φυσιολογικών και παθολογικών διεργασιών, κυρίως στο πεδίο της αγγειογένεσης.

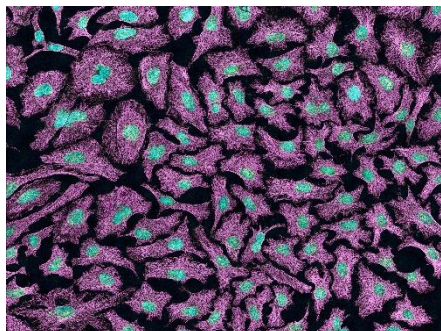
### 3.3.1.2 Μυοβλάστες ποντικού (C2C12)

Οι μυοβλάστες ποντικού (C2C12), είναι μια αθάνατη κυτταρική σειρά που προέρχεται από τα δορυφορικά κύτταρα του μηρού ποντικών 70 ώρες μετά από τραυματισμό (**Εικόνα 49**). Αποτελεί έναν υποκλώνο μυοβλαστών που είχαν αρχικά ληφθεί από τους Yaffe και Saxel στο Ινστιτούτο Επιστήμης Weizmann του Ισραήλ το 1977 (235). Αναπτύχθηκαν για *in vitro* μελέτες μυοβλαστών, ωστόσο είναι χρήσιμα στη βιοϊατρική έρευνα. Αυτά τα κύτταρα είναι ικανά για ταχύ πολλαπλασιασμό υπό συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης ορού και διαφοροποίηση σε μυοβλάστες υπό συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης ορού. Οι μονοπύρηνιοι μυοβλάστες μπορούν αργότερα, κάτω από χαμηλές συνθήκες ορού ή πείνας, να συντηχθούν και να σχηματίσουν πολυπύρηνους μυοσωλήνες, οδηγώντας στα πρόδρομα συσταλτικά σκελετικά μυϊκά κύτταρα και στη διαδικασία της μυογένεσης. Τα κύτταρα C2C12 χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της διαφοροποίησης των μυοβλαστών, των οστεοβλαστών και της μυογένεσης, για να εκφράσουν διάφορες πρωτεΐνες στόχους. Ενώ το οξειδωτικό στρες, κατά την έντονη άσκηση έχει ως αποτέλεσμα τη βλάβη και απόπτωση των κυττάρων (236).



**Εικόνα 49** Μυοβλάστες ποντικού (C2C12) υπό μικροσκόπιο μεγέθυνση 10x.  
[https://en.wikipedia.org/wiki/C2C12#cite\\_note-0-1](https://en.wikipedia.org/wiki/C2C12#cite_note-0-1)

### 3.3.1.3 Ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας (HeLa)

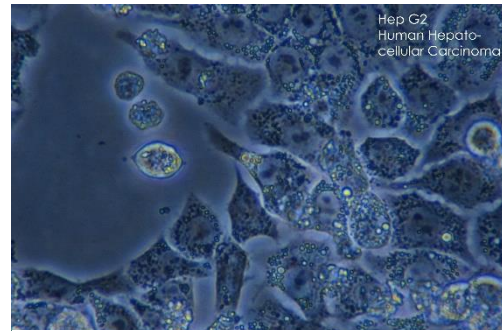


**Εικόνα 50** Εικόνα πολυφθορισμού κυττάρων HeLa. <https://www.tebu-bio.com/blog/2017/11/28/hela-cell-first-cell-line/>

Τα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας (HeLa) είναι μια αθάνατη κυτταρική σειρά (*Εικόνα 50*) καθώς και η παλαιότερη και συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη στην επιστημονική έρευνα (237). Η σειρά αυτή προήλθε από καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας που ελήφθησαν στις 8 Φεβρουαρίου 1951 από την Αφροαμερικανίδα Henrietta Lacks, εν αγνοία της, μιας ασθενής που πέθανε από καρκίνο. Η κυτταρική γραμμή βρέθηκε να είναι εξαιρετικά ανθεκτική και παραγωγική που δικαιολογεί την εκτεταμένη χρήση της στην επιστημονική έρευνα (238,239). Έγιναν μαζικές αναπαραγωγές των κυττάρων, ενώ έχουν χρησιμοποιηθεί από επιστήμονες σε διάφορους τύπους ερευνών, όπως έρευνα για διάφορες ασθένειες, χαρτογράφηση γονιδίων, επιπτώσεις τοξικών ουσιών σε οργανισμούς και ακτινοβολίας στον άνθρωπο (240). Επιπλέον, έχουν χρησιμοποιηθεί για να ελέγξουν την ευαισθησία του ανθρώπου σε διάφορες κολλητικές ταινίες, την κόλλα, τα καλλυντικά και πολλά άλλα προϊόντα. Είναι σημαντικό να τονιστεί, πως οι πολυφαινόλες κατέχουν δεσπόζουσα θέση, μεταξύ των χημειοπροστατευτικών παραγόντων, για την πρόληψη του καρκίνου γι αυτό και χρησιμοποιήθηκαν και στην παρούσα διατριβή (234). Οι επιστήμονες έχουν υπολογίσει ότι έχουν παραχθεί περίπου 50 εκατομμύρια τόνοι κυττάρων HeLa, ενώ υπάρχουν σχεδόν 11.000 διπλώματα ευρεσιτεχνίας που αφορούν αυτά τα κύτταρα (238).

### 3.3.1.4 Ανθρώπινα καρκινικά ηπατικά κύτταρα (HepG2)

Τα ανθρώπινα καρκινικά ηπατικά κύτταρα (HepG2) (**Εικόνα 51**) είναι μια αθάνατη κυτταρική σειρά η οποία προέρχεται από τον ηπατικό ιστό ενός 15χρονου Αμερικανικού εφήβου με Ευρωπαϊκή καταγωγή και καλά διαφοροποιημένο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Αυτά τα κύτταρα είναι επιθηλιακά σε μορφολογία,



**Εικόνα 51** Ανθρώπινα καρκινικά ηπατικά κύτταρα (HepG2).  
[https://en.wikipedia.org/wiki/Hep\\_G2](https://en.wikipedia.org/wiki/Hep_G2)

έχουν τυπικό αριθμό χρωμοσωμάτων 55 και δεν είναι ογκογόνα σε κάποια ποντίκια. Τα κύτταρα αυτά εκκρίνουν μια ποικιλία σημαντικών πρωτεϊνών πλάσματος, π.χ. αλβουμίνη, και πρωτεΐνες οξείας φάσης ινωδογόνο, άλφα 2-μακροσφαιρίνη, άλφα 1-αντιτρυψίνη, τρανσφερίνη και πλασμινογόνο. Αναπτύσσονται επιτυχώς σε καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας. Τα HepG2 αποτελούν μοντέλο για βιοχημικές και διατροφικές μελέτες καθώς και για μελέτες που αφορούν τον μεταβολισμό του ήπατος και την τοξικότητα των ξеноβιοτικών (241), την ανακάλυψη περιβαλλοντικών και διαιτητικών κυτταροτοξικών και γενετοξικών (και συνεπώς κυτταροπροστατευτικών και αντιγενετοξικών) παραγόντων, την διαλεύκανση της ηπατοκαρκινογένεσης, και την εύρεση μελέτες εύρεσης φαρμάκων στόχων, καθώς τα HepG2 διατηρούν τη μορφολογία και τις περισσότερες λειτουργίες των ηπατοκυττάρων (242). Επιπρόσθετα, οι πολυφαινόλες του ελαιολάδου απορροφώνται από το έντερο, αλλά η βιομετατροπή τους γίνεται κυρίως στο ήπαρ (243).

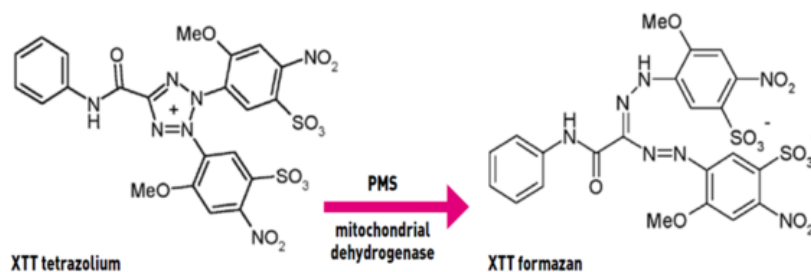
### 3.3.2 Συνθήκες καλλιέργειας

Όλες οι κυτταρικές σειρές αναπτύσσονται σε φλάσκες εμβαδού 25 ή 75 cm<sup>2</sup>, με θρεπτικό υλικό Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), το οποίο εμπεριέχει ορό βοδινού (FBS, 10% v/v), 2 mM L-γλουταμίνη και 100 U/ml διάλυμα στρεπτομυκίνης/πενικιλίνης, σε κλίβανο με θερμοκρασία 37°C και συγκέντρωση CO<sub>2</sub> 5%. Να σημειωθεί ότι μόνο το θρεπτικό μέσο για τα EA.hy926 περιελάμβανε επιπλέον 25mM HEPES. Τα κύτταρα καλλιεργούνται έως ότου φτάσουν το 80% της επιφάνειας

και έπειτα ανακαλλιεργούνται μέσω της διαδικασίας της θρυψινοποίησης (split). Για τη θρυψινοποίηση χρησιμοποιείται το ένζυμο θρυψίνη (0,25%) για 5 λεπτά στους 37°C, το οποίο κόβει τους δεσμούς των κυττάρων με τον πάτο της φλάσκας και φέρει τα κύτταρα σε αιώρημα. Έπειτα προστίθεται DMEM με FBS για να τερματίσει τη δράση του ενζύμου και τα κύτταρα μεταφέρονταν σε νέες φλάσκες με νέο θρεπτικό. Οι συνθήκες που κυριαρχούν είναι πλήρως ασηπτικές, καθώς όλες οι διεργασίες εκτελούνται σε θάλαμο ρεύματος αέρα καθέτου συνεχούς νηματικής ροής. Οι κυτταρικές σειρές καθόλη τη διάρκεια των πειραμάτων υπόκεινταν σε έλεγχο για επιμόλυνση μυκοπλάσματος με PCR, κάθε 3-4 περάσματα (split).

### 3.3.3 Προσδιορισμός των κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο XTT

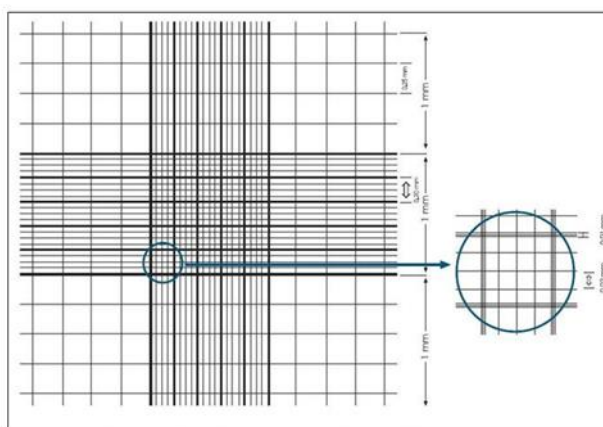
Προκειμένου να μην χρησιμοποιηθούν τοξικές για τα κύτταρα συγκεντρώσεις έτσι ώστε να μελετηθεί η επιρροή τους στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των κυττάρων, χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία XTT (Roche). Η μέθοδος αυτή αφορά μία χρωματομετρική δοκιμή που ανιχνεύει ποσοτικά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και βιωσιμότητα (Εικόνα 52). Η αρχή της μεθόδου αφορά τον μεταβολισμό του τετραμμωνιακού άλατος XTT στην αντίστοιχη φορμαζάνη από τις μιτοχονδριακές αφυδρογονάσες των ζωντανών κυττάρων. Η φορμαζάνη έχει πορτοκαλί χρώμα και απορροφά στα 450 nm. Η τοξική συγκέντρωση των εκάστοτε εκχυλισμάτων μειώνει τη βιωσιμότητα των κυττάρων και συνεπώς την παρατηρούμενη απορρόφηση.



#### Εικόνα 52 Μετατροπή του XTT στην αντίστοιχη φορμαζάνη.

Αρχικά, αφού τα κύτταρα επαναιωρηθούν στο θρεπτικό, μέσω θρυψινοποίησης, μεταφέρονται σε αντικειμενοφόρο πλάκα Neubauer, όπου και γίνεται καταμέτρηση

τους (Εικόνα 53), ώστε να υπολογίσουμε πόσα μl πρέπει να επιστρώσουμε σε κάθε πηγαδάκι στην πλάκα 96 θέσεων, για να υπάρχουν ισότιμα 10.000 κύτταρα. Από το επαναιώρημα των κυττάρων, παίρνουμε 10 μl κυττάρων και τα τοποθετούμε ανάμεσα από την καλυπτήδρα και την πλάκα. Έπειτα, γίνεται καταμέτρηση των κυττάρων στο κεντρικό τετράγωνο και στα τέσσερα γωνιακά. Βγάζουμε τον μέσο όρο [έστω:  $\mu.o. = (\alpha + \beta + \gamma + \delta + \sigma\tau) / 5$ ] και έπειτα πολλαπλασιάζουμε τον μέσο όρο με 25.000 [έστω  $\mu.o. * 25000 = X$ ]. Τα μl που θέλω σε κάθε πηγαδάκι προκύπτουν διαιρώντας το 10.000.000 με το X.



**Εικόνα 53 Αντικειμενοφόρος πλάκα Neubauer.**

Στη συνέχεια, γίνεται επίστρωση των κυττάρων με DMEM με FBS και επώαση για 24 ώρες στους 37°C. Μετά από 24 ώρες το θρεπτικό υλικό αντικαταστάθηκε από DMEM χωρίς FBS (καθώς το FBS αλληλεπιδρά με τις βιοφαινόλες και επηρεάζει τη δραστηριότητα τους) και εύρος συγκεντρώσεων των εκχυλισμάτων. Ακολουθεί επώαση στις ίδιες συνθήκες και χρονικό διάστημα με το προηγούμενο βήμα. Την τρίτη ημέρα, προστίθεται το αντιδραστήριο XTT, και ακολουθεί επώαση για 4 ώρες στους 37°C. Με το πέρας της επώασης, η πλάκα φωτομετρείται στα 450 και 630 nm σε ELISA plate reader. Η ποσοτικοποίηση γίνεται μέσω του λογισμικού Gen5. Η μέτρηση στα 630 nm έγινε για την κανονικοποίηση των τιμών μεταξύ των διαφορετικών πηγαδιών του τρυβλίου. Οι απορροφήσεις που προέκυψαν στα 630 nm αφαιρέθηκαν από αυτές των 450 nm. Ο μάρτυρας περιείχε κύτταρα απουσία εκχυλίσματος, ενώ κάθε συγκέντρωση εκχυλίσματος είχε και το αντίστοιχο τυφλό, απουσία κυττάρων, έτσι ώστε να αφαιρεθεί τυχόν απορρόφηση που μπορεί να προκύψει μόνο από το θρεπτικό ή/και το εκχύλισμα. Πραγματοποιήθηκαν 3 ανεξάρτητα πειράματα .

Η % βιωσιμότητα των κυττάρων (μετά την αφαίρεση των τυφλών) προκύπτει από τον ακόλουθο τύπο, όπου Abs = οπτική απορρόφηση:

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

### **Χορήγηση εκχυλισμάτων στις κυτταρικές σειρές**

Για την εκτίμηση των δεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης των κυττάρων έπειτα από τη χορήγηση των εκχυλισμάτων, χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά μεγέθη φλάσκας (25 και 75 cm<sup>2</sup>), ανάλογα με τις απαιτήσεις της κάθε τεχνικής σε πρωτεϊνικά επίπεδα. Πιο συγκεκριμένα, οι μικρές φλάσκες χρησιμοποιήθηκαν για την κυτταρομετρία ροής, μέσω της οποίας προσδιορίζονται τα ενδογενή επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) και των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS). Παράλληλα, οι μεγάλες φλάσκες χρησιμοποιήθηκαν α) για τις φωτομετρικές τεχνικές [προσδιορισμός επιπέδων λιπιδικής υπεροξειδωσης (TBARS) και πρωτεϊνικής καρβονυλίωσης (CARB)], β) για την αποτίμηση της γονιδιακής έκφρασης σε πραγματικό χρόνο με Real-Time PCR (qPCR) και γ) για τον υπολογισμό των πρωτεϊνικών επιπέδων μέσω ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών (Western blot).

Η χορήγηση των εκχυλισμάτων έγινε έπειτα από την κάλυψη της φλάσκας με κύτταρα στο 80%, σε DMEM χωρίς FBS στους 37°C, για 24 ώρες (εκτός από την qPCR, όπου έγινε επώαση σε τρεις διαφορετικές χρονικές στιγμές, 3h, 12h και 24h). Στη συνέχεια τα κύτταρα θρυψινοποιήθηκαν, φυγοκεντρήθηκαν (300g, 10 min, 4°C), ξεπλύθηκαν με PBS και ξαναφυγοκεντρήθηκαν στις ίδιες συνθήκες. Το ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε σε PBS. Για την κυτταρομετρία ροής απλώς έγινε χρώση του ιζήματος με τις αντίστοιχες χρωστικές για κάθε δείκτη, ενώ για τις υπόλοιπες τεχνικές έγινε λύση με υπερήχους για 1 λεπτό (70% amplitude, 0,7 sec κύκλος) και προσδιορισμός των πρωτεϊνικών επιπέδων με Bradford. Για την qPCR, το ίζημα λύθηκε μέσω kit (θα αναλυθεί παρακάτω).



### 3.3.5 Κυτταρομετρία ροής

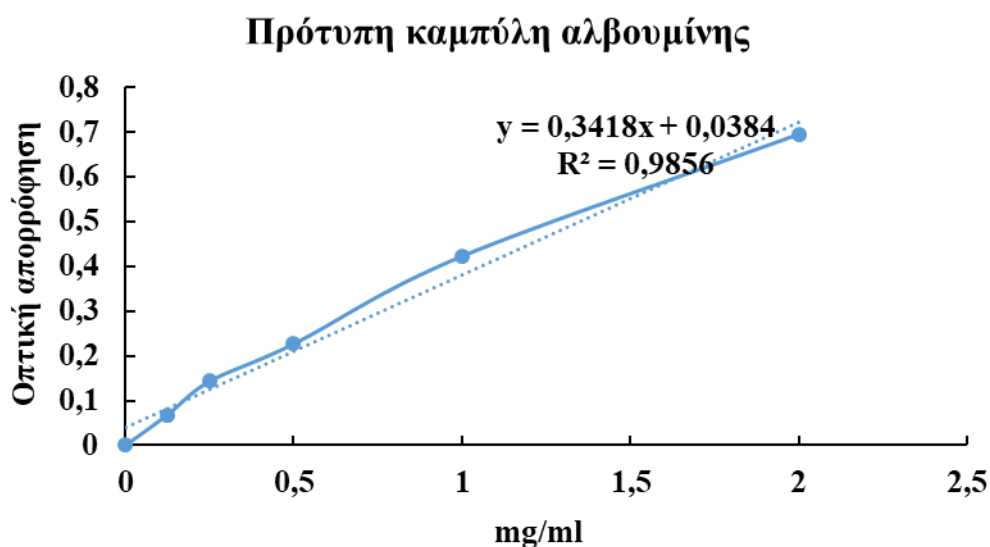
Κυτταρομετρία είναι η διαδικασία μέτρησης φυσικών και χημικών ιδιοτήτων των κυττάρων, καθώς αυτά βρίσκονται υπό τη μορφή εναιωρήματος. Με την συγκεκριμένη τεχνική, μπορεί να πραγματοποιηθεί παράλληλη μέτρηση και ανάλυση διαφορετικών χαρακτηριστικών ενός κυττάρου (ή σωματιδίου), μεγέθους 0,5-50μm, καθώς αυτό διέρχεται από μια ακτίνα φωτός, όπως το μέγεθος, η εσωτερική πολυπλοκότητα και η ένταση φθορισμού.

Η λειτουργία ενός κυτταρομέτρου ροής βασίζεται σε 3 κύρια συστήματα, το ρευστό, το οπτικό και το ηλεκτρονικό. Το ρευστό σύστημα (διαλύματα) μεταφέρει τα κύτταρα στο «σημείο εξέτασης». Το οπτικό σύστημα αποτελείται από το σύστημα οπτικής διέγερσης (excitation) και το σύστημα οπτικής συλλογής (collection). Το ηλεκτρονικό σύστημα αποτελείται από τους ανιχνευτές, τους ενισχυτές σήματος, τους επεξεργαστές σήματος και τον ηλεκτρονικό υπολογιστή.

Μέσω κυτταρομετρίας ροής μπορούμε να προσδιορίσουμε διάφορους δείκτες οξειδοαναγωγής σε κύτταρα και να μετρήσουμε τις βλάβες που προκύπτουν από μια οξειδωτική ένωση ή την αντιοξειδωτική δράση ενός εκχυλίσματος. Συγκεκριμένα, για την ποσοτικοποίηση των ROS εκμεταλλευόμαστε τη χρωστική 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA), η οποία μετά την είσοδό της στα κύτταρα από-ακετυλιώνεται από κυτταρικές εστεράσες σε ένα μη φθορίζον προϊόν το οποίο οξειδώνεται από τις ROS σε 2,7-dichlorofluorescein (DCF). Η DCF είναι μια φθορίζουσα χρωστική (excitation 495nm, emission 529nm) που μπορεί να ποσοτικοποιηθεί με κυτταρομετρία ροής. Η τιμή της DCF αντανακλά τα ROS. Για τον προσδιορισμό της GSH χρησιμοποιείται η φθορίζουσα χρωστική mercury orange (excitation 488nm, emission 580nm) η οποία συνδέεται απευθείας με τη GSH. Η ένταση φθορισμού καταγράφεται με τη χρήση του λογισμικού BD Cell Quest. Επιπλέον, καταγράφονται και οι FSC, SSC για τον προσδιορισμό του μεγέθους και της εσωτερικής πολυπλοκότητας, αντίστοιχα. Σε κάθε πειραματική διαδικασία ελέγχονται  $10^4$  κύτταρα και κάθε πείραμα διενεργείται τρεις ανεξάρτητες φορές.

### 3.3.6 Υπολογισμός ολικής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford

Για την μέτρηση των δεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης (οξείδωση λιπιδίων και πρωτεϊνών), καθώς και για την μέθοδο ανοσοαπωτύπωσης πρωτεϊνών (western blot) είναι απαραίτητη η μέτρηση της συγκέντρωσης πρωτεΐνης του εκάστοτε κυτταρικού εναιωρήματος. Η μέτρηση πραγματοποιείται με τη χρήση του αντιδραστηρίου Bradford (100mg χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250, 50ml 95% αιθανόλη, 100ml 85% (w/v) φωσφορικό οξύ, dH<sub>2</sub>O μέχρι το 1L). Συγκεκριμένα, η χρωστική συνδέεται με τα αμινοξέα των πρωτεϊνών δίνοντας ένα μπλε σύμπλοκο, με μέγιστο απορρόφησης τα 595 nm. Αναλυτικότερα σε τελικό όγκο αντίδρασης 1ml, γίνεται προσθήκη 20 μl δείγματος και 980 μl αντιδραστηρίου Bradford, και επώαση για 15 min στο σκοτάδι. Η οπτική απορρόφηση γίνεται στα 595 nm έναντι τυφλού (αντί για κυτταρικό αιώρημα περιέχει PBS). Για τον υπολογισμό της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης χρησιμοποιείται πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης, με συγκεντρώσεις από 0,125 έως και 10 mg/ml δίνοντας την εξίσωση  $y=0,3418x + 0,0384$  (Εικόνα 54)



Εικόνα 54 Πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης.

### 3.3.7 Υπολογισμός επιπέδων λιπιδικής υπεροξειδωσης (TBARS)

Με βάση τους Keles και συνεργάτες, η λιπιδική υπεροξειδωση των δειγμάτων υπολογίζεται μέσω του βιοδείκτη TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) (244). Οι οξειδωτικές βλάβες στα λιπίδια, κυρίως στα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία άκρως ενεργών και ασταθών υπεροξειδίων των λιπιδίων και ασταθών μορίων όπως είναι η μηλονική διαλδεΰδη (MDA). Η MDA συμπλοκοποιείται με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA) σε αναλογία ένα προς δύο. Το σύμπλοκο που προκύπτει είναι έγχρωμο και ανιχνεύεται στα 530nm.

Η σύσταση της αντίδρασης είναι η ακόλουθη: σε 100 µg πρωτεΐνης προστέθηκε PBS μέχρι τελικού όγκου τα 400 µl, 500 µl ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl (200 mM, pH 7,4) καθώς και 500 µl τριχλωροξικού οξέος (TCA) 35%. Ακολούθησε επώαση για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου και προσθήκη 1 ml διαλύματος θεικού νατρίου και TBA (2M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 55 mM TBA). Τα δείγματα αναδεύονται και επωάζονται για 45 min σε υδατόλουτρο (95°C). Με το πέρας της επώασης, τα δείγματα μεταφέρονται σε πάγο (~5 min). Ακολουθεί η προσθήκη 1 ml διαλύματος TCA 70% και ανάδευση. Από το υπερκείμενο, μεταφέρεται 1ml σε νέα erpendorfs τα οποία φυγοκεντρώνται (15000 g, 3 min, 4°C). Η οπτική απορρόφηση γίνεται στα 530 nm. Κάθε πείραμα ο μάρτυρας περιείχε PBS αντί κυτταρικού αιωρήματος. Κάθε δείγμα μετρείται εις τριπλούν. Οι υπολογισμοί έγιναν σύμφωνα με την ακόλουθη εξίσωση:

$$TBARS (nmol/mg \text{ πρωτεΐνης}) = [(A_d - A_0) / 0,156] * [3400 / X]$$

A<sub>d</sub>: Η οπτικής απορρόφηση του δείγματος

A<sub>0</sub>: Η οπτική απορρόφηση του τυφλού

0,156: Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης της MDA (µmol/L)

3400: ο συνολικός όγκος αντίδρασης σε µl

X: Ο όγκος (σε µl) του εκάστοτε κυτταρικού αιωρήματος ώστε η αντίδραση να έχει 100 µg πρωτεΐνης

### 3.3.8 Υπολογισμός των επιπέδων οξείδωσης των πρωτεϊνών μέσω πρωτεϊνικών καρβονυλίων

Οι πρωτεΐνες και τα συστατικά τους είναι επιρρεπή σε αλλοιώσεις που επάγονται από τις δραστικές μορφές. Οι καρβονυλικές ομάδες (αλδεΐδες και κετόνες) που απαρτίζονται από ένα άτομο άνθρακα σε διπλό δεσμό με ένα άτομο οξυγόνου ( $C = O$ ), παράγονται κατά βάση στις προσθετικές ομάδες της προλίνης (pro), της αργινίνης (arg), της λυσίνης (lys) και της θρεονίνης (thr). Είναι ένας φερέγγυος βιοδείκτης οξείδωσης των πρωτεϊνών καθώς τα καρβονύλια είναι σταθερά μόρια και η καρβονυλίωση μη αναστρέψιμη βλάβη. Η καρβονυλίωση των πρωτεϊνών επηρεάζει τη λειτουργικότητά τους. Σύμφωνα με τους Patskoukis et.al., οι καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες αντιδρούν με το DNPH (2,4-δίνιτροφαινυλδραζίνη) δημιουργώντας την έγχρωμη ένωση 2,4-δίνιτροφαινυλδραζονίου, η οποία απορροφά στα 375 nm (245).

Συγκεκριμένα, σε κυτταρικό αιώρημα 100 μg πρωτεΐνης, προστέθηκαν PBS έως τελικού όγκου 400 μl (όλα τα δείγματα είχαν το τυφλό τους), 500 μl DNPH (10 mM διαλυμένου σε HCL 2,5N) για τα δείγματα και 500 μl HCL (2.5N) για τα τυφλά. Ακολούθησε επώαση για 1 ώρα στο σκοτάδι, ενώ ανά 15 min αναδεύονταν. Φυγοκέντρηση 15000g, 5 min, 4°C. Έπειτα, το υπερκείμενο απομακρύνεται και στο ίζημα προστίθεται 1000 μl TCA 10%. Ακολουθεί ανάδευση και φυγοκέντρηση (15000 g, 5 min, 4°C). Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και έγιναν 3 βήματα πλύσης με 1 ml διαλύματος αιθανόλης-οξικού αιθυλεστέρα (σε αναλογία 1:1 v/v) και φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες με απόρριψη του υπερκειμένου. Μετά την τρίτη πλύση, στο ίζημα προστέθηκε 1 ml ουρίας (5M, pH 2,3) και τα δείγματα επώαστηκαν στους 37°C για 20 min. Τέλος, φυγοκεντρήθηκαν (15000 g, 3 min, 4°C) και καταγράφηκε η οπτική απορρόφηση στα 375 nm, σε κυψελίδα χαλαζία.

Η συγκέντρωση των καρβονυλίων υπολογίστηκε με την ακόλουθη εξίσωση:

**Πρωτεϊνικά καρβονύλια (nmol/mg πρωτεΐνης) =  $\frac{(A_d - A_o)}{0,022} * 1000 / X$  /  
συγκέντρωση πρωτεΐνης (mg/ml)**

A<sub>d</sub>: απορρόφηση δείγματος

A<sub>o</sub>: απορρόφηση τυφλού

0,022: ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH στην κυψελίδα σε nmol/ml

1000/X: ο συντελεστής αραίωσης (1000μl στην κυψελίδα/ X μl δείγματος)

### 3.3.9 Ποσοτικός προσδιορισμός έκφρασης γονιδίων με Real Time PCR

Η real-time PCR (qPCR) χρησιμοποιήθηκε το 1993 από τον Higuchi και τους συνεργάτες του και αφορά τον πολλαπλασιασμό του DNA με PCR που καταμετράτε την στιγμή που γίνεται. Το προτέρημα της μεθόδου είναι ότι καθορίζει το ποσό του αρχικού DNA στο δείγμα πριν τον πολλαπλασιασμό με PCR.

Πιο αναλυτικά, είναι μία ποσοτική αντίδραση PCR όπου ο πολλαπλασιασμός του DNA στόχου και η ποσοτικοποίηση του παραγόμενου προϊόντος γίνονται ταυτόχρονα στον ίδιο δοκιμαστικό σωλήνα, καθώς το προϊόν που παράγεται συνδέεται με φθορίζουσα χρωστική (στην παρούσα μελέτη SYBR Green) που καταγράφεται από το οπτικό σύστημα ειδικού κυκλοποιητή. Με το όργανο αυτό ανιχνεύεται η κινητική της αύξησης του DNA από την ένταση του σήματος του φθορισμού, που αντικατροπτίζει την ποσότητα του νεοσυντιθέμενου DNA. Επίσης, η qPCR μετράει τα προϊόντα καθώς συσσωρεύονται σε πραγματικό χρόνο στην εκθετική φάση της αντίδρασης. Συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια της αντίδρασης PCR, μια ουδός - σήμα φθορίζουσας χρωστικής - προσδιορίζει το όριο όπου όλα τα δείγματα μπορούν να συγκριθούν. Η ουδός στη συνέχεια υπολογίζεται ως συνάρτηση του ποσού του υπόβαθρου της φθορίζουσας χρωστικής και τελικά ο κλασματικός αριθμός των κύκλων PCR που απαιτούνται για να δώσουν ικανό σήμα φθορίζουσας χρωστικής που θα περάσει την ουδό χαρακτηρίζεται ως κατώφλι κύκλου (cycle threshold, Ct). Οι τιμές Ct εξαρτώνται καθαρά από το αρχικό ποσό του δείγματος και είναι το θεμέλιο για τον υπολογισμό των DNA αντιγράφων ή των επιπέδων έκφρασης του mRNA. Οι τιμές του Ct

καθορίζονται από τον κλασματικό αριθμό των PCR κύκλων, κατά τους οποίους το σήμα της χρωστικής είναι μεγαλύτερο από ένα ελάχιστο επίπεδο ανίχνευσης. Έπειτα με βάση τις τιμές Ct υπολογίζεται η σχετική ποσότητα κάθε δείγματος. Όσο πιο χαμηλό είναι το Ct, τόσο περισσότερα αντίγραφα DNA (και άρα του εξεταζόμενου mRNA) υπήρχαν αρχικά (246). Τα επιπέδα των mRNA απαιτούν κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων κάθε δείγματος ως προς ένα γονίδιο αναφοράς. Στην παρούσα πειραματική διαδικασία το γονίδιο αυτό ήταν της αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (GAPDH). Τα γονίδια αναφοράς έχουν σταθερά επίπεδα έκφρασης σε όλους τους κυτταρικούς τύπους και δεν αλλάζουν από τη χορήγηση εξωγενών ενώσεων (247).

Η λύση των κυττάρων και η απομόνωση του mRNA έγινε με βάση τις οδηγίες του PureLink RNA Mini Kit (Cat.nos. 12183018A, 12183025, Life technologies). Ακολούθησε πέψη του DNA με DNase και αντίστροφη μεταγραφή για την παραλαβή του cDNA.

Η ενίσχυση των τμημάτων cDNA όλων των γονιδίων-στόχων του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 (cat, sod1, txn, hmox1, nrf2, nqo1, gclc, gsr, gpx1 και gsta2) καθώς και του γονιδίου κανονικοποίησης (gapdh) έγιναν σε αντιδράσεις των 10 μl που όπου αναμίχθηκαν SYBR® Select Master Mix (2X, applied biosystems, USA), 0,25 μM από τον κάθε εκκινητή, 50 nM ROX Low και 25 ng cDNA. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν αντιστοιχούν σε πειραματικές δημοσιευμένες εργασίας (**Πίνακας 6 & Πίνακας 7**). Ο θερμοκυκλοποιητής (μx3005P system, Stratagene, UK) ρυθμίστηκε: 3 min στους 95 °C; 45 κύκλοι (15 sec στους 95 °C, 30 sec στους 55°C. Τέλος, πραγματοποιήθηκε και καμπύλη αποδιάταξης από τους 53°C έως τους 95°C για να ελεγχθεί η ειδικότητα της σύνδεσης των εκκινητών.

Πίνακας 6 Αλληλουχίες εκκινητών για C2C12

Γονίδιο	Κωδικός	(5'-3') ποντίκι
<i>cat</i>	12359	Forward: TGAGAAGCCTAAGAACGCAATTC Reverse: CCCTTCGCAGCCATGTG
<i>sod1</i>	20655	Forward: GTGATTGGGATTGCGCAGTA Reverse: TGGTTTGAGGGTAGCAGATGAGT
<i>txn</i>	22166	Forward: CCGCGGGAGACAAGCTT Reverse: GGAATGGAAGAAGGGCTTGATC
<i>hmox1</i>	15368	Forward: CACGCATATACCCGCTACCT Reverse: CCAGAGTGTTTCATTCGAGCA
<i>nrf2</i>	18024	Forward: CGAGATATACGCAGGAGAGGTAAGA Reverse: GCTCGACAATGTTCTCCAGCTT
<i>nqo1</i>	18104	Forward: TATCCTTCCGAGTCATCTCTAGCA Reverse: TCTGCAGCTTCCAGCTTCTTG
<i>gclc</i>	14629	Forward: ATCTGCCAAGGCGGCAAC Reverse: ACTCCTCTGCAGCTGGCTC
<i>gsr</i>	14782	Forward: GCTATGCAACATTCGCAGATG Reverse: AGCGGTAAACTTTTTCCCATTTG
<i>gpx1</i>	14775	Forward: GAAGAACTTGGGCCATTTGG Reverse: TCTCGCCTGGCTCCTGTTT
<i>gsta2</i>	14858	Forward: CGTCCACCTGCTGGAACCTC Reverse: GCCTTCAGCAGAGGGAAAGG
<i>gapdh</i>	14433	Forward: AACGACCCCTTCATTGAC Reverse: TCCACGACATACTCAGCAC

**Πίνακας 7 Αλληλουχίες εκκινητών για HeLa, HepG2, EA.hy926**

Γονίδιο	Κωδικός	(5'-3') άνθρωπος
<i>cat</i>	847	Forward: CCAGAAGAAAGCGGTCAAGAA Reverse: TGGATGTGGCTCCCGTAGTC
<i>sod1</i>	6647	Forward: AGGGCATCA TCAATTTTCGAG Reverse: GGCCTCAGACTACATCCAA
<i>txn</i>	7295	Forward: TTCCATCGGTCCCTTACAGC Reverse: TTGGCTCCAGAAAATTCACC
<i>hmx1</i>	3162	Forward: GGCCTGGCCTTCTTACCTT Reverse: GAGGGGCTCTGGTCCTTGGT
<i>nrf2</i>	4780	Forward: ATTGCCTGLAAGTCCTGGTCA Reverse: ACTGCTCTTTGGACATCATTTCG
<i>nqo1</i>	1728	Forward: GGGCAAGTCCATCCCAACTG Reverse: GCAAGTCAGGGAAGCCTGGA
<i>gclc</i>	2729	Forward: GAAGAAGATATTTTCCTGTCATTGAT Reverse: CCATTCATGTATTGAAGAGTGAATTT
<i>gsr</i>	2936	Forward: CCAGCTTAGGAATAACCAGCGATGG Reverse: GTCTTTTTAACCTCCTTGACCTGGGAGAAC
<i>gpx1</i>	2876	Forward: CGCTTCCAGACCATTGACATC Reverse: CGAGGTGGTATTTTCTGTAAGATCA
<i>gsta2</i>	2939	Forward: CTGCCCTTAGTCAACCTGAGG Reverse: ACAAGGTAGTCTTGTCCGTGGC
<i>gapdh</i>	2597	Forward: TGCACCACCAACTGCTTAG Reverse: GATGCAGGGATGATGTTC

### 3.3.10 Αποτίμηση επιπέδων έκφρασης πρωτεϊνών με τη μέθοδο ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών (western blot)

Ο προσδιορισμός των πρωτεϊνικών επιπέδων των γονιδίων έγινε μέσω Western blot. Πιο αναλυτικά, 30 μg πρωτεΐνης ενώθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης (Laemmli buffer 6x) και επώαστηκαν για 3 min στους 95°C. Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 8%, υπό διατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE) για να διαχωριστούν οι πρωτεΐνες, για μία ώρα στα 150 V. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης έγινε μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF με τη μέθοδο της υγρής μεταφοράς. Πιο συγκεκριμένα, το πήκτωμα τοποθετήθηκε σε κασετίνα που περιείχε τα εξής: σφουγγάρι, διηθητικό χαρτί Whatman, πήκτωμα, μεμβράνη PVDF, διηθητικό χαρτί και σφουγγάρι. Η κασετίνα τοποθετήθηκε σε συσκευή



ηλεκτροφόρησης για 2 ώρες στα 110 V. Τέλος, η μεμβράνη επωάστηκε για όλη τη νύχτα στο ψυγείο (4°C) με αποβουτυρωμένο γάλα (5% w/v) σε ρυθμιστικό διάλυμα TBST1X (Tris, NaCl, TWEEN 20), έτσι ώστε οι πρωτεΐνες του γάλακτος να μπλοκάρουν τις μη ειδικές θέσεις της μεμβράνης. Εν συνεχεία, η μεμβράνη επωάστηκε με τα αντίστοιχα αντισώματα. Πρώτο αντίσωμα (anti- $\gamma$ -GCL 1:600; anti-CAT 1:400; anti-SOD1 1:600) για 1 ώρα σε διάλυμα TBST με 5% w/v γάλα. Με το πέρας 5 πλύσεων των 5 min με TBST, η μεμβράνη εμβαπτήστηκε σε TBST με 5% γάλα για 30 min με το αντίστοιχο δεύτερο αντίσωμα (anti-rabbit 1:5000; anti-goat 1:3000). Οι μεμβράνες ξεπλύθηκαν 3 φορές με TBST για 15 min και ακολούθως εκτέθηκαν στο αντιδραστήριο χημειοφωταύγειας (ECL) για 1 min μέσα σε ειδική θήκη όπου ανιχνεύτηκαν σε θάλαμο απουσία φωτός οι ζώνες των πρωτεϊνών σε φιλμ αυτοραδιογραφίας. Η πρωτεΐνη GAPDH (αφυδρογονάση της φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης) αποτέλεσε το μόριο κανονικοποίησης. Τα σχετικά επίπεδα των ζωνών ποσοτικοποιήθηκαν με το λογισμικού Alpha Innotech.

### 3.4 In Vivo

#### 3.4.1 Εργαστηριακά ζώα και εκχύλισμα ελαιολάδου

Δώδεκα αρσενικοί ενήλικες επίμυες της φυλής Wistar, ηλικίας 3 μηνών, εκτράφηκαν κάτω από ελεγχόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες (12-ωρος κύκλος φως/σκοτάδι και θερμοκρασία  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) σε μη ατομικούς κλωβούς χωρητικότητας 3 επιμύων. Η σήμανσή τους έγινε με οικολογικό χρώμα για τρίχωμα. Οι επίμυες χωρίστηκαν σε 2 ομάδες: μία ομάδα ελέγχου ( $n=6$ ) που τρεφόταν με μια βασική διαίτα και μια ομάδα ( $n=6$ , ομάδα ελαιολάδου) που τρεφόταν με την ίδια βασική διαίτα και παράλληλα λάμβανε ημερησίως με τη βοήθεια γαστρο-οισοφαγικού καθετήρα 0,1125 ml ελαιολάδου (συγκέντρωσης πολυφαινολών ελαιολάδου: 800mg/Kg) επί 14 ημέρες.

Η επιλογή του επίμυ έγινε διότι έχει διαπιστωθεί ότι τα γονίδιά του σε ποσοστό 90% εμφανίζουν ομοιότητα αλληλουχίας με αυτά του ανθρώπου (248).

Η δόση των 0,1125 ml ελαιολάδου/ ημέρα επιλέχθηκε έτσι ώστε να εμπίπτει στην δόση που προτείνεται από τον ισχυρισμό υγείας EFSA 432/2014 όπου: ελαιολάδο το οποίο περιέχει 5 mg υδροξυτυροσόλης και παραγώγων της (π.χ. «σύμπλοκο ελαιοευρωπαϊνης και τυροσόλης) ανά 20 γραμμάρια (g) ελαιολάδου» ή 250 mg

πολυφαινολών ανά κιλό ελαιόλαδου. Προκειμένου να υπάρξουν ευεργετικές επιδράσεις η κατανάλωση αυτών των ελαιόλαδων θα πρέπει να είναι 20γρ ημερησίως.

Όσον αφορά το ελαιόλαδο θα πρέπει να γίνει σαφές ότι πρόκειται για ελαιόλαδο το οποίο έχει υποστεί επεξεργασία και πρόκειται για κλάσμα ελαιολάδου, το οποίο περιέχει τις πολικές πολυφαινόλες του ελαιολάδου (περιεκτικότητα 2-3%). Πρόκειται για μίγμα πολυφαινολών συνεπώς το μοριακό βάρος δεν υπολογίζεται χωριστά και για αυτό η δοσολογία εκφράζεται σε mg/ml, όπως γίνεται η έκφραση μιγμάτων. Η σύσταση του σε πολυφαινολικό περιεχόμενο παρακολουθείται συνεχώς μέσω χημικών αναλύσεων με τη χρήση χρωματογραφικών και φασματοφωτομετρικών τεχνικών. Το παρόν ελαιόλαδο δεν είναι τυποποιημένο (ωστόσο η μελλοντική τυποποίηση εφόσον βρεθεί ευεργετική επίδραση, θα πραγματοποιηθεί σε συνεργασία με τον παραγωγό και την Φαρμακευτική σχολή Αθηνών, η οποία μας παρέχει τις αναλύσεις). Καθώς η πολυφαινόλες (φυτοχημικές ενώσεις) αποτελούν δευτερογενής μεταβολίτες των φυτών και η σύσταση και συγκέντρωση τους επηρεάζεται από εξωγενής παράγοντες (περιβαλλοντικές, εδαφικές συνθήκες και ξενιστές/παθογόνα) δεν υπάρχει διαθέσιμος τρόπος τυποποίησης τους. Ωστόσο, στο συγκεκριμένο πειραματικό πρωτόκολλο φροντίσαμε να δημιουργήσουμε ένα στοκ με συγκεκριμένη σύσταση το οποίο έχει ελεγχθεί και θα δοθεί στα πειραματόζωα, έτσι ώστε όλα τα ζώα και καθόλη την πειραματική διαδικασία να πάρουν το ίδιο μίγμα πολυφαινολών. Μελλοντικά, σχετικά με την παραγωγή προϊόντος με ετικέτα το οποίο θα είναι διαθέσιμο στο κοινό, ο συνεχής έλεγχος και παρακολούθηση θα μπορεί να διασφαλίσει την σταθερή ποσότητα του μίγματος πολυφαινολών.

### **3.4.2 Συλλογή και προετοιμασία του αίματος και των ιστών**

Οι επίμυες υποβλήθηκαν σε γενική αναισθησία, με έκθεση σε ισοφλουράνιο. Κριτήριο για το βάθος της αναισθησίας ήταν η συστολή (μύση) της κόρης του οφθαλμού, καθώς και απλές δοκιμές αισθητικότητας όπως ο έλεγχος του

αντανακλαστικού του βλεφάρου και του αντανακλαστικού απόσυρσης, μετά από νύξη του άκρου ποδός. Στη συνέχεια ακολούθησε διάνοιξη της θωρακικής κοιλότητας, συλλογή αίματος σε σωληνάρια Vacutainer με EDTA (BD Vacutainer Systems, Plymouth, UK), μέσω καρδιακής παρακέντησης από τη δεξιά κοιλία με τη χρήση σύριγγας των 10ml (Terumo, Tokyo, Japan). Τα δείγματα αίματος φυγοκεντρήθηκαν σε ψυχόμενη φυγόκεντρο (4°C) για 10 min στα 1370g, και συλλέχθηκαν ξεχωριστά το πλάσμα και τα ερυθροκύτταρα. Ακολούθησε λύση των ερυθροκυττάρων σε αναλογία 1:1 (v/v) με απιονισμένο νερό και φυγοκέντρωση (4000g, 15min, 4°C), έτσι ώστε να γίνει συλλογή του κυτταρικού αιμολύματος (Red blood Lysate, RBCL). Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε βαθιά κατάψυξη (-80°C). Ο ανωτέρω διαχωρισμός σε πλάσμα και RBCL πραγματοποιήθηκε καθώς οι μετρήσεις της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (total antioxidant capacity, TAC), των TBARS και των CARB, γίνονται στο πλάσμα, ενώ στο RBCL η μέτρηση της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) και της ικανότητας αποικοδόμησης του υπεροξειδίου του υδρογόνου.

Επίσης, έγινε συλλογή 11 οργάνων και πιο συγκεκριμένα συλλέχθηκαν ο τετρακέφαλος μυς, η καρδιά, ο εγκέφαλος, ο πνεύμονας, ο νεφρός, το πάγκρεας, ο στόμαχος, το λεπτό έντερο, το παχύ έντερο, ο σπλήνας και το ήπαρ. Οι ιστοί εμβαπτίσθηκαν άμεσα μετά την αφαίρεση τους σε υγρό άζωτο και αποθήκευση σε βαθιά κατάψυξη (-80°C) για περαιτέρω ανάλυση. Για την ομογενοποίηση των ιστών ζυγίστηκαν 0,5 gr κάθε ιστού και προστέθηκαν 1000 μl διαλύματος PBS (138mM NaCl, 2,7mM KCl) (αναλογία 1:2 w/v) με αναστολείς πρωτεασών (Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets - Roche Diagnostics GmbH). Οι ιστοί ομογενοποιήθηκαν με τη χρήση ειδικού ομογενοποιητή και λύση μέσω υπερήχων (για 1 min, 70% amplitude, 0,7 sec cycle). Ακολούθησε φυγοκέντρωση (5.000 g, 5 min, 4°C) και συλλογή του υπερκειμένου το οποίο αποθηκεύτηκε στους -80 °C.

Η εκτροφή των επίμυων καθώς και η θανάτωση πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Φυσιολογίας του Τμήματος Κτηνιατρικής του Α.Π.Θ. υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Ιωάννη Ταϊτζόγλου.

### 3.4.3 Προσδιορισμός δεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης

Η αποτίμηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης προσδιορίστηκε μέσω 5 βιοδεικτών, αυτών που σχετίζονται με την αντιοξειδωτική ικανότητα (ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) και ικανότητα διάσπασης του υπεροξειδίου του υδρογόνου) και 2 που αποτιμούν τις οξειδωτικές βλάβες σε λιπίδια και πρωτεΐνες (TBARS, πρωτεϊνικά καρβονύλια(PC)).

#### 3.4.3.1 Προσδιορισμός επιπέδων αιμοσφαιρίνης και πρωτεϊνών

Για τον υπολογισμό του κάθε βιοδείκτη είναι απαραίτητο να γίνει προσδιορισμός των επιπέδων αιμοσφαιρίνης για το RBCL και των πρωτεϊνών για το πλάσμα και τους ιστούς, καθώς τα αποτελέσματα στο RBCL εκφράζονται ως mg αιμοσφαιρίνης (Hemoglobin, Hb) και των ιστών ως mg πρωτεΐνης. Ο προσδιορισμός των επιπέδων πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε με βάση το αντιδραστήριο Bradford, όπως προαναφέρθηκε στην παράγραφο 3.3.6 Υπολογισμός ολικής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης μέσω του αντιδραστήριου Bradford. Ο προσδιορισμός των επιπέδων αιμοσφαιρίνης έγινε με βάση τη μέθοδο hemiglobincyanide (HiCN) χρησιμοποιώντας το kit Dutch Diagnostics, Zutphen, Holland. Εν συντομία, 5μL RBCL αναμείχθηκαν με 1 ml αντιδραστήριου αιμοσφαιρίνης R1, pH 7,3. Η σύσταση του R1 είναι η ακόλουθη: εξακυανοδιδηρούχο (III) κάλιο (0,607 mmol/L), κυανιούχο κάλιο (0,767 mmol/L), δισόξινο φωσφορικό κάλιο (1,030 mmol/L) και απορρυπαντικά 0,05%. Έπειτα, τα δείγματα ανακινήθηκαν και επώαστηκαν για 10 λεπτά στο σκοτάδι. Η οπτική απορρόφηση μετρήθηκε στα 540nm, έναντι μάρτυρα ο οποίος περιείχε 1 ml R1. Η τελική συγκέντρωση Hb εκφράστηκε ως g/dl. Η συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης υπολογίστηκε από τον ακόλουθο τύπο:

$$\text{Hb} \left( \frac{\text{g}}{\text{dl}} \right) = (\text{Abs}_{\text{δείγματος}} - \text{Abs}_{\text{τυφλού}}) \times 29.4$$

### 3.4.3.2 Προσδιορισμός ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH)

Ο προσδιορισμός των επιπέδων GSH έγινε με βάση την οξειδωσή της από το διθειόδο νιτρο-βενζοϊκό οξύ (DTNB) και την επακόλουθη μετατροπή της στην οξειδωμένη της μορφή (GSSG) με την παράλληλη δημιουργία του χρωμογόνου 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκό οξύ, το οποίο έχει μέγιστη οπτική απορρόφηση τα 412 nm (249).

Ο προσδιορισμός της GSH στο RBCL περιλαμβάνει δύο βήματα καθαρισμού. Συγκεκριμένα, 500 μl RBCL αναμιγνύονται με 500 μl TCA (5%) και αφού ανακινηθούν έντονα, φυγοκεντρώνονται στα 15.000 g, 5 min, 5°C. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέα σωληνάκια όπου και έγινε εκ νέου προσθήκη 90 μl TCA (5%). Τα δείγματα αναδεύτηκαν και φυγοκεντρήθηκαν στις ίδιες συνθήκες. Τέλος, το υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκε για μέτρηση της GSH. Αντίθετα, με το RBCL οι ιστοί περιλαμβάνουν ένα βήμα καθαρισμού, όπου 100 μl ομογενοποιημένου ιστού αναμίχθηκαν με 100 μl TCA (5%) και φυγοκεντρήθηκαν (15.000 g, 5 min, 5°C). Το υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκε όπως το RBCL.

Πιο αναλυτικά, 20 μL καθαρισμένου RBCL και ιστού αναμίχθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (67 mM, pH 7,95) και διάλυμα DTNB (1 mM σε 1% κιτρικό νάτριο w/v). Τα δείγματα ανακινήθηκαν και επώαστηκαν στο σκοτάδι για 15 min. Η οπτική απορρόφηση καταγράφηκε στα 412 nm. Ο μάρτυρας περιείχε PBS στη θέση του δείγματος.

- Τα αποτελέσματα για το RBCL υπολογίστηκαν με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$\text{GSH} \left( \frac{\mu\text{mol}}{\text{g Hb}} \right) = \frac{\left[ \left( \frac{\text{Abs}_{\text{δείγματος}} - \text{Abs}_{\text{τυφλού}}}{13,6} \right) \times 262,6 \right] \times 1000}{\text{Hb} \left( \frac{\text{g}}{\text{l}} \right)}$$

Όπου:

Abs δείγματος: Η οπτική απορρόφηση του RBCL.

Abs τυφλού: Η οπτική απορρόφηση του τυφλού.

Το 13,6 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DTNB ( $M^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ). Το 262,6: είναι η αραίωση που προκύπτει από τη διαίρεση του τελικού όγκου (1010 μl) με τον όγκο του RBCL (20 μl) ( $1010/20=50,5$ ), πολλαπλασιαζόμενο με 2, για να ληφθεί η

αρχική αραιώση με την προσθήκη dH<sub>2</sub>O κατά τη διαδικασία λύσης των ερυθροκυττάρων (1:1) και τέλος πολλαπλασιαζόμενο ξανά με το 2 και το 1,3 για να υπολογιστεί η αραιώση που έγινε κατά τον καθαρισμό με τις δύο προσθήκες του TCA. Ο πολλαπλασιασμός με 1000 μετατρέπει τα mmol/l σε μmol/l.

- Τα αποτελέσματα για τους ιστούς υπολογίστηκαν με βάση τον τύπο:

$$\text{GSH} \left( \frac{\mu\text{mol}}{\text{mg πρωτεΐνης}} \right) = \frac{\left[ \left( \frac{\text{Abs}_{\text{δείγματος}} - \text{Abs}_{\text{τυφλού}}}{13,6} \right) \times 2 \times 3 \times 50,5 \right]}{\text{Πρωτεΐνη} \left( \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right)}$$

Abs δείγματος: Η οπτική απορρόφηση του δείγματος του κάθε ιστού.

Abs τυφλού: Η οπτική απορρόφηση του τυφλού.

Το 13,6 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DTNB ( $\text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ). Πολλαπλασιάζουμε με 2, που είναι η αραιώση για τον καθαρισμό του ιστού με 5% TCA (1:1 v/v) και με 3, για να υπολογιστεί η αραιώση που έγινε κατά την ομογενοποίηση. Το 50.5 είναι ο συντελεστής αραιώσης που προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1010 μL) με τον όγκο του δείγματος (20 μL) ( $1010/20=50.5$ ). Διαιρούμε με τα mg/ml πρωτεΐνης που προκύπτουν από τη Bradford για να εκφραστεί η GSH σε μmol/mg πρωτεΐνης.

### 3.4.3.3 Ικανότητα διάσπασης υπεροξειδίου του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> είναι ένα προϊόν του μεταβολισμού με μεγάλη τοξικότητα, το οποίο είναι απαραίτητο να μετατραπεί ταχέως σε άλλη, λιγότερο δραστική ένωση. Σε αυτό συμβάλλουν, τα ένζυμα καταλάση και περοξειρεδοξίνες, τα οποία καταλύουν την μετατροπή του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, σε οξυγόνο και νερό. Το πρωτόκολλο βασίστηκε στη μέθοδο που Aebi (250). Συγκεκριμένα, 4-40 μl ιστού αραιωμένου ή μη (αναλόγως τον ιστό) ή 4 μl

RBCL με αραιώση 1:10 (v/v) με dH<sub>2</sub>O αναμίχθηκαν με 2991μl ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (67 mM, pH 7,4) και τοποθετήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C για 10 min. Εν συνεχεία, προστέθηκαν 5 μl υπεροξειδίου του υδρογόνου (30%) και καταγράφηκε η μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 240 nm για 130 sec.

- Η ικανότητα διάσπασης του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στο RBCL υπολογίζεται με βάση τον ακόλουθο τύπο:

$$\text{Ρυθμός διάσπασης του H}_2\text{O}_2 \left( \frac{U}{mg Hb} \right) = \frac{\left( \frac{\Delta Abs_{\text{δείγματος}}}{min} \right)}{40} \times 750 \times 10 \times 2 \times 1000}{Hb \left( \frac{mg}{mL} \right)}$$

Όπου:

$\Delta Abs$  (min) = η μεταβολή της απορρόφησης για κάθε δείγμα ανά λεπτό

40 = Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (M<sup>-1</sup>×cm<sup>-1</sup>)

750 = Ο παράγοντας αραιώσης που προκύπτει από τη διαίρεση του τελικού όγκου της αντίδρασης (3000 μL) με τον όγκο του RBCL (4 μL)

10 = προκύπτει από την 1:10 v/v αραιώση του RBCL

2 = προκύπτει από την 1:1 λύση των ερυθροκυττάρων

Πολλαπλασιάζουμε με 1000 για τη μετατροπή mol/l σε μmol/ml

- Οι αντίστοιχοι υπολογισμοί για τους ιστούς είναι:

$$\text{Ρυθμός διάσπασης του H}_2\text{O}_2 \left( \frac{\text{U}}{\text{mg πρωτεΐνης}} \right) = \frac{\left( \frac{\Delta\text{Abs}_{\text{δείγματος}}}{\text{min}} \right) \times Y \times Z \times 3 \times 1000}{40 \text{ Πρωτεΐνη} \left( \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right)}$$

Όπου:

$\Delta\text{Abs (min)}$  = η μεταβολή της απορρόφησης για κάθε δείγμα ανά λεπτό

40 = Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (M<sup>-1</sup>×cm<sup>-1</sup>)

Y = ο παράγοντας αραίωσης του ιστού στην αντίδραση που προκύπτει από τη διαίρεση του τελικού όγκου της αντίδρασης (3000 μL) με τον όγκο του ιστού, διαφορετικό κάθε φορά αναλόγως του ιστού (4-40 μL)

Z = η αραίωση αναλόγως του ιστού (1:3 – 1:10 v/v με PBS), αν απαιτείται

3 = η αραίωση που έγινε κατά την ομογενοποίηση των ιστών

1000 = για τη μετατροπή mol/l σε μmol/ml

#### 3.4.3.4 Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC)

Η εκτίμηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (Total antioxidant capacity, TAC), βασίστηκε στο πρωτόκολλο των Janaszewska και των συνεργατών της (251). Στην συγκεκριμένη μέθοδο το πιθανό αντιοξειδωτικό φορτίο των δειγμάτων εξουδετερώνει τη ρίζα DPPH• (1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζυλ) με την επακόλουθη μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 520 nm, μετατρέποντας της στην αντίστοιχη υδραζίνη (1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη).

Αναλυτικότερα, 40 μl ιστού ή 20 μl πλάσματος αναμίχθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (10 mM, pH 7,4) και διάλυμα DPPH• (0,1 mM σε μεθανόλη). Ακολούθησε επώαση για 60 min στο σκοτάδι και φυγοκέντρηση (20000 g, 3 min, 25°C). Η μέτρηση της οπτικής απορρόφησης του υπερκειμένου έγινε στα 520 nm.

- Η έκφραση των αποτελεσμάτων στο πλάσμα έγινε σύμφωνα με τον ακόλουθο τύπο:



$$\frac{\text{nmol DPPH που εξουδετερώθηκαν}}{\text{ml πλάσματος}} = \frac{\left(\frac{\% \text{ μείωση Abs}}{100}\right) \times 50 \times 50}{1000}$$

Όπου:

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

Διαιρούμε με 100 για να μετατρέψουμε το ποσοστό σε απλό αριθμό

50 = η συγκέντρωση του DPPH στην κυψελίδα (μmol/l)

50 = η αραίωση του πλάσματος στην κυψελίδα (1000 μl/20 μl)

1000 = η μετατροπή των l του πλάσματος σε ml

- Για τους ιστούς ο τύπος διαμορφώνεται ως εξής:

$$\frac{\text{nmol DPPH που εξουδετερώθηκαν}}{\text{ml πλάσματος}} = \frac{\left(\frac{\% \text{ μείωση Abs}}{100}\right) \times 50 \times 25 \times 3 \times 5}{1000 \text{ Πρωτεΐνη } \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}}\right)}$$

Όπου:

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

Διαιρούμε με 100 για να μετατρέψουμε το ποσοστό σε απλό αριθμό

50 = η συγκέντρωση του DPPH στην κυψελίδα (μmol/l)

25 = η αραίωση του κάθε ιστού στην κυψελίδα (1000 μl/40 μl)

3 = η αραίωση που έγινε κατά την ομογενοποίηση του ιστού

5 = η αραίωση του δείγματος για τη μέθοδο

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ανά mg πρωτεΐνης / ml, οπότε διαιρούμε με τη συγκέντρωση πρωτεΐνης κάθε ιστού όπως υπολογίστηκε με τη Bradford.

### 3.4.3.5 Προσδιορισμός πρωτεϊνικής οξειδωσης μέσω πρωτεϊνικών καρβονυλίων

Η μέθοδος έχει ήδη αναλυθεί στην παράγραφο 3.3.8 Υπολογισμός των επιπέδων οξειδωσης των πρωτεϊνών μέσω πρωτεϊνικών καρβονυλίων. Η μόνη διαφορά έγκειται στην ποσότητα του RBCL και του ιστού, όπου στην προκειμένη περίπτωση είναι 50 μl δείγματος και 50 μl TCA 20%. Συνεπώς οι υπολογισμοί έχουν ως εξής:

- Για το πλάσμα:

$$CARB \left( \frac{nmol}{mg \text{ πρωτεΐνης}} \right) = \frac{\left( \frac{Abs_{\text{δείγματος}} - Abs_{\text{τυφλού}}}{0.022} \right)}{\text{Πρωτεΐνη} \left( \frac{mg}{ml} \right)} \times 20$$

Όπου:

0,022 = ο συντελεστής O συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH ( $M^{-1} \times cm^{-1}$ )

20 = ο συντελεστής αραίωσης του δείγματος στην κυψελίδα (1000 μl/50 μl πλάσμα ή ιστός).

Διαιρούμε με την αντίστοιχη τιμή πρωτεΐνης κάθε δείγματος που προέκυψε από τη μέτρηση της Bradford

- Για τους ιστούς:

$$CARB \left( \frac{nmol}{mg \text{ πρωτεΐνης}} \right) = \frac{\left( \frac{Abs_{\text{δείγματος}} - Abs_{\text{τυφλού}}}{0.022} \right)}{\text{Πρωτεΐνη} \left( \frac{mg}{ml} \right)} \times 20 \times 3$$

Όπου:

0,022 = ο συντελεστής O συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH ( $M^{-1} \times cm^{-1}$ )

20 = ο συντελεστής αραίωσης του δείγματος στην κυψελίδα (1000 μl/50 μl πλάσμα ή ιστός).

3 = η αραίωση που έγινε κατά την ομογενοποίηση του ιστού

### 3.4.3.6 Προσδιορισμός οξειδωσης λιπιδίων

Η μέθοδος έχει ήδη αναλυθεί στην παράγραφο 3.3.7 Υπολογισμός επιπέδων λιπιδικής υπεροξειδωσης (TBARS). Η μόνη διαφορά έγκειται στην ποσότητα του RBCL και του ιστού, όπου στην προκειμένη περίπτωση είναι 100 μl δείγματος. Συνεπώς οι υπολογισμοί έχουν ως εξής:

- Για το πλάσμα:

$$TBARS \left( \frac{\mu mol}{l \text{ πλάσματος}} \right) = \left( \frac{Abs_{\text{δείγματος}} - Abs_{\text{τυφλού}}}{0,156} \right) \times 31$$

Όπου:

0,156 = ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης της MDA σε μmol/l

31 = ο συντελεστής αραίωσης, που προέρχεται από τη διαίρεση του τελικού όγκου της αντίδρασης (3100 μL) με τον όγκο του πλάσματος (100 μL) (3100 / 100 = 31)

- Για τους ιστούς:

$$TBARS \left( \frac{nmol}{mg \text{ πρωτεΐνης}} \right) = \left[ \frac{\left( \frac{Abs_{\text{δείγματος}} - Abs_{\text{τυφλού}}}{0,156} \right) \times 31 \times 3}{1000} \right] \times 1000$$

*Πρωτεΐνη (mg/ml)*

Όπου:

0,156 = ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης της MDA σε μmol/l

31 = ο συντελεστής αραίωσης, που προέρχεται από τη διαίρεση του τελικού όγκου της αντίδρασης (3100  $\mu$ L) με τον όγκο του πλάσματος (100  $\mu$ L) (3100 / 100 = 31)

3 = η αραίωση που έγινε κατά την ομογενοποίηση του ιστού

Διαιρούμε με 1000 για τη μετατροπή  $\mu$ mol/l σε  $\mu$ mol/ml (γιατί η πρωτεΐνη εκφράζεται σε mg/ml) και τελικά πολλαπλασιάζουμε με 1000 για τη μετατροπή των  $\mu$ mol σε nmol.

### 3.4.3.7 Αποτίμηση επιπέδων έκφρασης γονιδίων-στόχων του Nrf2 μέσω Real-time PCR

Η μέθοδος έχει ήδη αναλυθεί στην παράγραφο 3.3.9 Ποσοτικός προσδιορισμός έκφρασης γονιδίων με Real Time PCR. Ωστόσο, στην προκειμένη περίπτωση το RNA απομονώθηκε από ιστό και όχι από κυτταρικό αιώρημα, ενώ ως γονίδιο κανονικοποίησης χρησιμοποιήθηκε η  $\beta$ -ακτίνη (actin). Τα γονίδια που ενισχύθηκαν ήταν αυτό της καταλυτικής υπομονάδας της  $\gamma$ -γλουταμυλοκουστεΐνης (gclc), της καταλάσης (cat) και της υπεροξειδικής δισμουτάσης (sod1), οι εκκινήτες των οποίων οι αλληλουχίες φαίνονται στον Πίνακα 8, ενώ οι συνθήκες του θερμοκυκλοποιητή είναι ίδιες με αυτές των κυττάρων (45 κύκλοι από 15 sec στους 95 °C, 30 sec στους 55°C, 30 sec στους 72oC).

#### Πίνακας 8 Αλληλουχίες εκκινήτων

Γονίδιο	Gene ID	Εκκινήτης (5'-3')
<i>cat</i>	24248	Forward: <i>TTCTACACTGAAGATGGTAACTG</i> Reverse: <i>GAAAGTAACCTGATGGAGAGAC</i>
<i>sod1</i>	24786	Forward: <i>AACCAGTTGTGGTGTTCAGGA</i> Reverse: <i>CTCCTGAGAGTGAGATCACA</i>
<i>gclc</i>	25283	Forward: <i>CAGAGTATGGGAGTTACATGATTGAAG</i> Reverse: <i>TGTGTTGAACTCGGACATCGTT</i>
<i>actin</i>	81822	Forward: <i>AGCCATGTACGTAGCCATCC</i> Reverse: <i>TCGGAACCGCTCATTGCCG</i>

### 3.4.3.8 Αποτίμηση επιπέδων έκφρασης πρωτεϊνών με Western Blot

Η	μέθοδος	έχει	ήδη	αναλυθεί	στην	παράγραφο
Γονίδιο	Κωδικός	(5'-3') άνθρωπος				
<i>cat</i>	847	Forward: CCAGAAGAAAGCGGTCAAGAA Reverse: TGGATGTGGCTCCCGTAGTC				
<i>sod1</i>	6647	Forward: AGGGCATCA TCAATTTTCGAG Reverse: GGCCTCAGACTACATCCAA				
<i>txn</i>	7295	Forward: TTTCCATCGGTCCTTACAGC Reverse: TTGGCTCCAGAAAATTCACC				
<i>hmox1</i>	3162	Forward: GGCCTGGCCTTCTTCACCTT Reverse: GAGGGGCTCTGGTCCTTGGT				
<i>nrf2</i>	4780	Forward: ATTGCCTGTAAGTCCTGGTCA Reverse: ACTGCTCTTTGGACATCATTTCG				
<i>nqo1</i>	1728	Forward: GGGCAAGTCCATCCCAACTG Reverse: GCAAGTCAGGGAAGCCTGGA				
<i>gclc</i>	2729	Forward: GAAGAAGATATTTTTCCTGTCATTGAT Reverse: CCATTCATGTATTGAAGAGTGAATTT				
<i>gsr</i>	2936	Forward: CCAGCTTAGGAATAACCAGCGATGG Reverse: GTCTTTTTAACCTCCTTGACCTGGGAGAAC				
<i>gpx1</i>	2876	Forward: CGCTTCCAGACCATTGACATC Reverse: CGAGGTGGTATTTTCTGTAAGATCA				
<i>gsta2</i>	2939	Forward: CTGCCCTTTAGTCAACCTGAGG Reverse: ACAAGGTAGTCTTGTCCGTGGC				
<i>gapdh</i>	2597	Forward: TGCACCACCAACTGCTTAG Reverse: GATGCAGGGATGATGTTTC				

3.3.10 Αποτίμηση επιπέδων έκφρασης πρωτεϊνών με τη μέθοδο ανοσοαπωτύπωσης πρωτεϊνών (western blot). Ο προσδιορισμός των πρωτεϊνικών επιπέδων έγινε σε 3 γονίδια τα οποία σχετίζονται με τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς, πιο συγκεκριμένα τα γ-GCL, CAT και SOD1. Για την πειραματική διαδικασία, 30 μg πρωτεΐνης από το ομογενοποίημα ιστού αναμίχθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης επώαστηκαν για 3 min στους 95°C και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση.

### 3.5 Στατιστική ανάλυση

Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το SPSS 20.0 και συγκεκριμένα η ανάλυση διακύμανσης ενός παράγοντα one-way ANOVA και η παραμετρική δοκιμή Tukeys. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε ως  $p < 0,05$  ενώ τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SEM (standard error of the means).

## **Κεφάλαιο 4 – Μέρος I Αποτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας συνολικού πολυφαινολικού εκχυλίσματος ελαιολάδου ποικιλίας του Αγίου όρους (TPF)**

### **4.1 Κύρια ευρήματα**

- Το εκχύλισμα του ελαιολάδου (TPF) περιείχε κατά μέσο όρο 4,8% πολυφαινόλες.
- Παρουσίασε ισχυρή αντιοξειδωτική και αναγωγική δράση αν και παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές με βάση τις τεχνικές DPPH, ABTS<sup>•+</sup>.
- Επέδειξε σημαντική DNA-προστατευτική δράση έναντι των ριζών υπεροξειδίου καθώς και ισχυρή αντιμεταλλαξιγόνο ικανότητα (τεστ του Ames).
- Με βάση τη μέθοδο κυτταροτοξικότητας (XTT), το TPF εμφάνισε ιστοεξειδίκευση.
- Η χορήγηση στις κυτταρικές σειρές C2C12, HeLa, HepG2 και EA.hy926, προκάλεσε σημαντική αύξηση στα επίπεδα GSH καθώς και μείωση στα ενδοκυτταρικά επίπεδα ROS (όχι σε όλες τις περιπτώσεις).
- Το TPF αύξησε τα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης της γGCLc, που συμμετέχει στην σύνθεση της GSH, και στις τέσσερις κυτταρικές σειρές (EA.hy926, C2C12, HepG2, HeLa).
- Το TPF στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις μείωσε τα επίπεδα τόσο των TBARS όσο και των πρωτεϊνικών καρβονύλιων και στις τέσσερις κυτταρικές σειρές.
- Το TPF είχε διαφορετική επίδραση στα επίπεδα έκφρασης γονιδίων που επάγονται από τον μεταγραφικό παράγοντα Nrf-2 και εμπλέκονται στην αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού, σε τέσσερις κυτταρικές σειρές (EA.hy926, HeLa, HepG2, C2C12).

## 4.2 Εισαγωγή – Σκοπός

Η Ελλάδα συγκαταλέγεται στους σημαντικότερους ελαιοπαραγωγούς παγκοσμίως, μαζί με την Ισπανία και την Ιταλία. Ωστόσο η Ελλάδα παράγει τις μεγαλύτερες ποσότητες εξαιρετικά παρθένου ελαιόλαδο συγκριτικά με τις υπόλοιπες χώρες.

Το ελαιόλαδο, ή αλλιώς υγρό χρυσάφι όπως το χαρακτήρισε ο Όμηρος, είναι το λάδι που προέρχεται από τους καρπούς της ελιάς (*Olea europaea*). Το ελαιόλαδο είναι εμπλουτισμένο σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (MUFA). Σχετικά με τα οφέλη των MUFA στην ανθρώπινη υγεία, ο Αμερικανικός Οργανισμός Τροφίμων και Ποτών (FDA, Press release) (252) αδειοδότησε ποιοτικούς ισχυρισμούς υγείας (health claims) το 2004, όσον αφορά την προστασία που προσδίδουν τα MUFA κατά του κινδύνου καρδιοαγγειακών παθήσεων. Καθολικά, τα οφέλη των λιπαρών οξέων του ελαιόλαδου συνοψίστηκαν στο πρώτο Διεθνές Συνέδριο για το Ελαιόλαδο και την υγεία το 2005 (253).

Το ελαιόλαδο ωστόσο αποτελεί κάτι περισσότερο από μια πλούσια πηγή MUFA. Τα βιοφαινολικά του συστατικά έχουν αποδειχθεί πως κατέχουν ισχυρές αντιφλεγμονώδεις και χημειοπροστατευτικές ιδιότητες (164,254). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ελεοκανθάλη, η οποία επιδεικνύει αντίστοιχη δράση με το αντιφλεγμονώδες φάρμακο ibuprofene (255). Σημειοτέον ότι δεν υπάρχουν μελέτες, που να φανερώνουν κυτταροτοξικότητα των φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου. Τα τελευταία 25 χρόνια, η κατανάλωση ελαιόλαδου παγκοσμίως αυξήθηκε κατά 30% λόγω των δύο βασικών χαρακτηριστικών του, δηλαδή των θρεπτικών και οργανοληπτικών του ιδιοτήτων (256,257).

Έχουν διεξαχθεί πολυάριθμες μελέτες παγκοσμίως σχετικά με τις επωφελείς επιδράσεις του ελαιόλαδου στην υγεία, ιδιαίτερα τις αντιοξειδωτικές επιδράσεις των μεμονωμένων βιοφαινολικών ενώσεων του. Ωστόσο, μέχρι στιγμής καμία μελέτη δεν έχει κάνει αναφορά για το συνολικό βιοφαινολικό κλάσμα του ελαιόλαδου (Total Polyphenolic Fraction, TPF), στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό κυτταρικών σειρών και οργανισμών. Πολλά στοιχεία, στην έρευνα για τη διατροφή και την υγιεινή, επισημαίνουν ότι είναι το σύνθετο μείγμα βιοφαινολών αυτό που δίνει την θρεπτική

αξία στο ελαιόλαδο, περισσότερο από κάθε ένωση μεμονομένα, και που επίσης μπορεί να δράσει συνεργιστικά προς την επίτευξη ενός αποτελέσματος για την υγεία (258).

Το ελαιόλαδο της μελέτης προέρχεται από μια ενδημική ποικιλία ελιάς που φύεται στο Άγιο Όρος, την «Κερασσελιά». Η Ιερά Μονή Ξενοφώντος καλλιεργεί και συλλέγει τον καρπό αυτής της αγιορείτικης ποικιλίας. Το Άγιο(ν) Όρος αποτελεί αυτοδιοίκητο τμήμα του Ελληνικού Κράτους, που βρίσκεται στη χερσόνησο του Άθω της Χαλκιδικής στη Μακεδονία, με πρωτεύουσα τις Καρυές και επίσημη γλώσσα την Ελληνική. Αποτελεί το μοναστικό κέντρο της Ελληνικής Ορθόδοξης Εκκλησίας, ένα κρατικό ζωντανό μουσείο και πνευματικό κέντρο της Ελλάδας. Περιλαμβάνει είκοσι Ιερές Μονές (Μεγίστης Λαύρας, Βατοπεδίου, Ιβήρων, Χιλανδαρίου, Διονυσίου, Κουτλουμουσίου, Παντοκράτορος, Ξηροποτάμου, Ζωγράφου, Δοχειαρίου, Καρακάλλου, Φιλοθέου, Σίμωνος Πέτρας, Αγίου Παύλου, Σταυρονικήτα, Ξενοφώντος, Γρηγορίου, Εσφιγμένου, Αγίου Παντελεήμονος, Κωνσταμονίτου), διάφορα μαγαζιά και υπηρεσίες. Όλες οι Ιερές Μονές απαρτίζουν θρησκευτικά πνευματικά ιδρύματα και χαρακτηρίζονται ως «Κυρίαρχες», «Βασιλικές», «Πατριαρχικές» και «Σταυροπηγιακές». Κυρίαρχες καθώς είναι αυτοδιοικήτες. Βασιλικές για το λόγο ότι η ίδρυσή και η επικύρωση τους οφείλεται σε Βυζαντινούς αυτοκράτορες. Πατριαρχικές ονομάστηκαν αργότερα όταν το Οικουμενικό Πατριαρχείο Κωνσταντινουπόλεως, ανέλαβε την πνευματική και μόνο κατόπτευση τους. Σταυροπηγιακές καθώς κατά την ίδρυσή τους τοποθετήθηκε σε αυτές σταυρός, ο οποίος προήλθε από το Οικουμενικό Πατριαρχείο (259).

Η Ιερά Πατριαρχική και Σταυροπηγιακή Μονή Ξενοφώντος είναι μία εκ των είκοσι μονών του Αγίου Όρους και κατατάσσεται δέκατη έκτη στην ιεραρχική τάξη των Αγιορείτικων μονών. Καθηγούμενος της Ιεράς Μονής είναι ο Αρχιμανδρίτης Αλέξιος Ξενοφωντινός. Η Μονή ιδρύθηκε λίγο πριν το 998. Με σιγίλλιο του Πατριάρχη Γαβριήλ Δ΄ έγινε κοινοβιακή το 1784. Είναι παραθαλάσσια, επί της δυτικής πλευράς της χερσονήσου, σε απόσταση είκοσι λεπτών από τη Μονή Δοχειαρίου και πενήντα λεπτών από τη Μονή Αγίου Παντελεήμονος. Τα εξαρτήματά της περιλαμβάνουν τη Σκήτη Ευαγγελισμού της Θεοτόκου, δύο Κελλιά, του Αγίου Τρύφωνα και του Αγίου Νεκταρίου που βρίσκονται στην γεωγραφική της περιοχή, και το αντιπροσωπείο της του Αγίου Ανδρέα στις Καρυές.

Το Άγιον Όρος ανεπίσημα χαρακτηρίζεται ως «Αυτόνομη Μοναστική Πολιτεία». Από το 1988 συγκαταλέγεται στον κατάλογο των Μνημείων Παγκόσμιας Πολιτιστικής Κληρονομιάς (<http://whc.unesco.org/en/list/454>). Το αυτόνομο



καθεστώς του Αγίου Όρους αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά διεθνώς πριν την αναγνώριση της κυριαρχίας του Ελληνικού κράτους στη Χαλκιδική, με τη Συνθήκη του Βερολίνου του 1878. Αυτή η συνθήκη αναφέρει ότι *«οι μοναχοί του Αγίου Όρους, ανεξάρτητα από τη χώρα καταγωγής τους, διατηρούν τις κτήσεις και τα πρότερα πλεονεκτήματά τους και χωρίς καμία εξαίρεση απολαύουν απόλυτη ισότητα δικαιωμάτων και πλεονεκτημάτων»*. Το ελληνικό κράτος κύρωσε με το Ν.Δ. 10/16 Σεπτεμβρίου 1926 τον καταστατικό Χάρτη του Αγίου Όρους, ο οποίος άρχισε να ισχύει το 1927 μετά τη θέση σε ισχύ του νέου Συντάγματος, οπότε και για πρώτη φορά επισημοποιήθηκε η συνταγματική προστασία του καθεστώτος αυτοδιοίκησης του Αγίου Όρους (259). Η πολιτική διοίκηση του Αγίου Όρους ανήκει στην αρμοδιότητα του Υπουργείου Εξωτερικών, σύμφωνα με το άρθρο 5 παρ. Α στ. 26 του Οργανισμού του (άρθρο πρώτο Ν. 3566/2007), και ασκείται μέσω της Διοίκησης του Αγίου Όρους, η οποία αποτελεί αυτοτελή δημόσια αρχή και οργανώνεται με το Π.Δ. 227/1998 (ΦΕΚ Α' 176/28.7.1998).

Δεν υπάρχουν επίσημα στοιχεία για το πότε διαδόθηκε ο Χριστιανισμός στον Άθω. Ωστόσο, σύμφωνα με έναν ρωσικό μύθο λέγεται πως η ίδια η Θεοτόκος εμφανίζεται στην περιοχή και οι κάτοικοι να ασπάζονται τον Χριστιανισμό, γι αυτό και το Άγιο Όρος καθιερώθηκε να ονομάζεται και *«κλήρος και περιβόλι της Παναγιάς»*. Ιστορικά, οι κυριότεροι λόγοι ανάπτυξης του μοναχισμού του Αγίου Όρους αφορούν τη διάλυση των αρχαίων πόλεων, με αποτέλεσμα ο χώρος να είναι κατάλληλος για ασκητές, την εξάπλωση των εχθρών των Βυζαντινών στις ανατολικές περιοχές, όπου και κατέστρεψαν τα παλαιότερα εκεί μοναστήρια και την οικονομική που ξέσπασε στην Κωνσταντινούπολη, εξαιτίας της οποίας αρκετοί μοναχοί αναζήτησαν νέο χώρο διαμονής. Συνεπώς, διαφένεται πως ο μοναχισμός του Αγίου Όρους χρονολογείται κάπου τον 8ο αιώνα (259).

Με βάση το άρθρο 186 του Κ.Χ.Α.Ο. *«η εις την χερσόνησον του Αγίου Όρους είσοδος των θηλέων κατά τα ανέκαθεν κρατούντα απαγορεύεται»*. Η απαγόρευση αυτή κυρώνεται και ποινικά με τη διάταξη του άρθρου 43β του Ν.Δ. της 10ης Σεπτεμβρίου 1926 *«περί κυρώσεως του Καταστατικού Χάρτου του Αγίου Όρους»*, το οποίο προστέθηκε με το Ν.Δ. 2623/1953 (ΦΕΚ Α' 268/28.9.1953) και προβλέπει ότι *«η παράβασις του άρθρου 186 του Καταστατικού Χάρτου επισύρει την ποινήν φυλακίσεως δύο μηνών μέχρις ενός έτους»*. Αυτή η οριοθέτηση έχει την πνευματική της αφετηρία στην παρθενία των μοναχών και την αφιέρωση του Όρους στη Θεοτόκο. Ονομάζεται

άβατον και ισχύει από την ίδρυση της ιδιόρρυθμης πολιτείας, αν και κατά το παρελθόν σε περιόδους ανάγκης έχει καμφθεί (260).

Το Εξαιρετικό Παρθένο Ελαιόλαδο που προέρχεται από την ποικιλία «Κερασοέλια» είναι μια μοναδική ποικιλία ελιάς που διατηρείται και εναρμονίζεται στο μικροκλίμα του Αγίου Όρους κατά τη διάρκεια των αιώνων, το οποίο δίνει ελαιόλαδο εξαιρετικής ποιότητας μέχρι σήμερα. Η οξύτητά του είναι 0,1- 0,3% και προσφέρει πληθώρα θρεπτικών ουσιών. Λόγω της πρόσφατης προσπάθειας αναζωογόνησης της εξαιρετικής φυτείας στη Μονή του Αγίου Ξενοφών, αυτή η καλλιέργεια, που η αρχή της χάνεται στα βάθη των αιώνων, αναμένεται να καταχωριθεί σύντομα στον Επίσημο Κατάλογο Ελαιών της Ελλάδας.

Ο σκοπός της ενότητας αυτής, είναι η αποτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας για πρώτη φορά ενός συνολικού βιοφαινολικού εκχυλίσματος ελαιολάδου το οποίο προέρχεται από μια ενδημική ποικιλία ελιάς που φύεται στο Άγιο Όρος, την «Κερασοελιά». Τελικός στόχος είναι η δημιουργία ενός βιολειτουργικού σκευάσματος, το οποίο θα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως συμπλήρωμα διατροφής στον άνθρωπο, αυξάνοντας την αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού, καθώς και η πιθανή εμπορική εκμετάλλευση ενός ελαιολάδου υψηλής προστιθέμενης βιολογικής αξίας.

## 4.2 Προέλευση και απομόνωση εκχυλίσματος

Στην παρούσα ενότητα το εκχύλισμα προέρχεται από ένα εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο (EVOO) ποικιλίας «Κερασοελιάς» το οποίο προμηθευτήκαμε από τη Βόρεια Ελλάδα και συγκεκριμένα το Όρος Άθως, και παρασκευάστηκε τον Ιανουάριο του 2015. Αποτελεί ένα συνολικό πολυφαινολικό κλάσμα του παραπάνω ελαιολάδου (Total Polyphenolic Fraction, TPF). Στην εργασία για χάρη συντόμευσης θα συμβολίζεται με το ακρωνύμιο TPF.

Το εκχύλισμα των πολυφαινολών (TPF) απομονώθηκε στο εργαστήριο του κύριου Λεάνδρου-Αλέξιου Σκαλτσούνη, Φαρμακευτική σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών, και έπειτα εστάλη στο εργαστήριό μας για την επικείμενη μελέτη. Η μέθοδος

που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση αναλύεται περιληπτικά στην ακόλουθη ενότητα (4.2.1 Εξαγωγή TPF από εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο (EVOO)).

#### **4.2.1 Εξαγωγή TPF από εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο (EVOO)**

Η εκχύλιση υγρού-υγρού διεξήχθη σε εργαστηριακές κλίμακες Fast Centrifugal Partition Extractor FCPR300® (Rousselet-Robatel Kromaton, Anonay, France) (χωρητικότητα στήλης 300 mL) συνδεδεμένη με παρασκευαστική αντλία LabAlliance (261,262). Η διαδικασία εκχύλισης αποτελείται από πολλούς κύκλους "εκχύλισης-ανάκτησης" (μέθοδος πολλαπλών διπλών τρόπων), χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση ένα μείγμα n-εξανίου / ελαιόλαδου σε αναλογία 3: 2 (v/v) και ως στατική φάση αιθανόλη / νερό σε αναλογία 3: 2 (v/v). Η διαδικασία ξεκινά με τη συμπλήρωση της στήλης CPE με 0,3 L της στατικής φάσης σε κατάσταση ανόδου (ascending mode) και στις 200 rpm. Στη συνέχεια, η ταχύτητα περιστροφής αυξήθηκε σε 1000 rpm και η κινητή φάση (φάση ελαίου τροφοδοσίας) αντλήθηκε στα 60 mL / min σε «αύξουσα» (ascending mode) κατάσταση. Μετά τη διέλευση 2,5 λίτρων κινητής φάσης (στάδιο εκχύλισης), ο τρόπος άντλησης μετατράπηκε σε «φθίνουσα» (descending mode) και αντλήθηκε ένας όγκος 0,3 L υδατικής φάσης εκχύλισης (με τον ίδιο ρυθμό ροής και ταχύτητα περιστροφής) προκειμένου να αντικατασταθεί η συμπυκνωμένη σε βιοφαινόλες σταθερή φάση με νέα (στάδιο ανάκτησης). Αυτός ο κύκλος «εκχύλισης-ανάκτησης» επαναλήφθηκε πέντε φορές εκχυλίνοντας συνολικά 15 L φάσης ελαίου τροφοδοσίας που αντιστοιχεί σε 6 λίτρα ελαιολάδου. Οι 6 συγκεντρωμένες στατικές φάσεις εξατμίστηκαν υπό κενό και το λαμβανόμενο ιζώδες εκχύλισμα απολιπαρώθηκε χρησιμοποιώντας το διφασικό σύστημα η-εξάνιο / ακετονιτρίλιο (1/1 v/v) και φυλάχθηκε στους 4 ° C για περαιτέρω χρήση. Τέλος, η εκχύλιση 6 L ελαιολάδου είχε ως αποτέλεσμα την ανάκτηση 6,35 g εκχυλίσματος βιοφαινολών ελαιολάδου.

#### **4.2.2. HPLC-DAD ποιοτική και ποσοτική ανάλυση.**

Η ποιοτική και ποσοτική ανάλυση διεκπεραιώθηκε στο εργαστήριο του κ.ο Λεάνδρου –Αλέξιου Σκαλτσούνη, Φαρμακευτική σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών. Η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε περιγράφεται περιληπτικά παρακάτω.

Το προφίλ του TPF και η ποσοτική ανάλυση της υδροξυτυροσόλης (HT), της τυροσόλης (T), της ελαιοκάνθης (OLEO) και της ελεαΐσινης (OLEA) πραγματοποιήθηκαν σε όργανο Thermo Finigant HPLC εξοπλισμένο με αντλία Spectra-System P4000, αποστειρωτή SpectraSystem 1000, σύστημα Spectra AS3000 αυτοματοποιημένο μπεκ ψεκασμού και ανιχνευτή UV SpectraSystem UV6000LP που παρακολουθείται στα 235, 280 και 365 nm. Τα δείγματα αναλύθηκαν σε αναλυτική στήλη Discovery HS C18 (15 cm χ 4.6 mm, μέγεθος σωματιδίων 5 μm) (Supelco) χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικές μεθόδους.

Η πρώτη (μέθοδος A) χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση των HT και T και βασίστηκε σε προηγουμένως δημοσιευμένη μέθοδο με μικρές τροποποιήσεις (262,263). Οξινομένο νερό με 0.2% οξικό οξύ (διαλύτης A) και ακετονιτρίλιο (διαλύτης B) χρησιμοποιήθηκαν ως διαλύτες στο ακόλουθο σύστημα βαθμίδωσης: 0-40 λεπτά 2-30% B, 40-45 λεπτά 30% B, 45-50 λεπτά 30 -2% B. Ο ρυθμός ροής ρυθμίστηκε σε 1 ml / λεπτό, ο όγκος έγχυσης ήταν 20 μl (από ένα διάλυμα 1 mg TPF / ml μεθανόλης (MeOH)) και η συνολική διάρκεια εκτέλεσης ήταν 50 λεπτά.

Η ανάλυση ποσοτικού προσδιορισμού των OLEA και OLEO πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τη δεύτερη μέθοδο (Μέθοδος B). Η κινητή φάση αποτελείται από νερό (διαλύτης A) και ακετονιτρίλιο (διαλύτης B) ενώ η έκλυση βαθμίδωσης αρχίζει με 80% διαλύτη A, μειούμενο σε 70% σε 20 λεπτά, παραμένοντας σταθερό για 15 λεπτά και αυξανόμενο πάλι σε 80% για τα επόμενα 5 min (συνολική διάρκεια: 40 λεπτά). Ο ρυθμός ροής ρυθμίστηκε σε 1 ml / λεπτό ενώ ο όγκος έγχυσης ήταν 20 μl (από διάλυμα 1 mg TPF / ml MeOH) (264,265).

Η ανάλυση ποσοτικού προσδιορισμού των HT και T διεξήχθη με τη χρήση της μεθόδου A. Οι καμπύλες βαθμονόμησης δημιουργήθηκαν χρησιμοποιώντας τις συγκεντρώσεις 2, 3, 20, 50 και 100 μg / mL και χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό του ποσοστού των ενώσεων στόχων σε EVOO και TPF ώστε να ελέγχεται η καθαρότητα του HT τόσο στο κλάσμα CPC όσο και στην τελική καθαρή μορφή. Οι τιμές της περιοχής κορυφής (μετρούμενες στα 280 nm) αποτελούν το μέσο όρο τριών

μετρήσεων. Χρησιμοποιήθηκε ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης με τη χρήση συριγναλδεΐδης (98% HPLC, Extrasynthese) ως εσωτερικό πρότυπο (ISTD).

Η ποσοτικοποίηση των OLEO και OLEA πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο B. Οι καμπύλες βαθμονόμησης κατασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας 10 επίπεδα συγκεντρώσεων (50,100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 και 1000 µg / mL). Το ISTD παρασκευάστηκε σε μίγμα μεθανόλης / νερού 1: 1 (v/v) σε συγκέντρωση 1 mg / mL και φυλάχθηκε στους -4 ° C. Και οι δύο ενώσεις εκκλύονται ως διπλές κορυφές και έτσι η ποσοτικοποίηση βασίστηκε στη συνολική έκταση και των δύο κορυφών (μετρούμενη στα 235 nm) σύμφωνα με τον Impellizzeri και τους συνεργάτες του (264). Στην περίπτωση των HT και T η ποσοτικοποίηση βασίστηκε στην αναλογία μεταξύ της περιοχής κορυφής της αναλυόμενης ουσίας και της περιοχής κορυφής του ISTD. Οι εξισώσεις και ο συντελεστής προσδιορισμού ( $R^2$ ) των πρότυπων καμπυλών είναι  $y = 45130x + 22444$ ,  $R^2 = 0,995$  για OLEO,  $y = 43653x - 1E + 06$ ,  $R^2 = 0,997$  για OLEA,  $y = 0.041x - 0.999$  για HT και  $y = 0.025x - 0.014$ ,  $R^2 = 0.999$  για T.

	Ελαιοκανθάλη	Ελαιασίνη	Άγλυκο ελευρωπαίνης (μονοαλδευδική μορφή)	Άγλυκο λιγκτροσίδη (μονοαλδευδική μορφή)	Άγλυκο λιγκτροσίδη (διαλδευδική μορφή)	Σύνολο παραγώγων τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης	D1 (ελαιοκανθάλη+ ελαιασίνη)
Αφιλτράριστο	160	92	10	10	110	382	252
Φιλτραρισμένο	265	62	16	8	108	459	327

Ελευθερη τυροσόλη και υδροξυτυροσόλη < 10 mg/Kg

#### 4.4 Αποτελέσματα

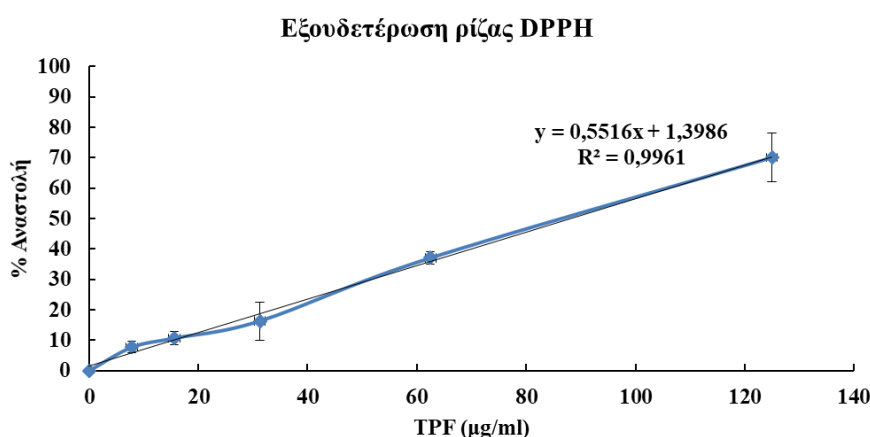
#### 4.4.1 In Vitro τεχνικές

##### 4.4.1.1 Αποτελέσματα Folin-Ciocalteu

Με την συγκεκριμένη μέθοδο εκτιμήθηκε ποσοτικά το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο του TPF. Από τα αποτελέσματα προέκυψε πως το TPF περιέχει 484 µg πολυφαινόλες / mg εκχυλίσματος.

##### 4.4.1.2 Αποτελέσματα μεθόδου ρίζας DPPH

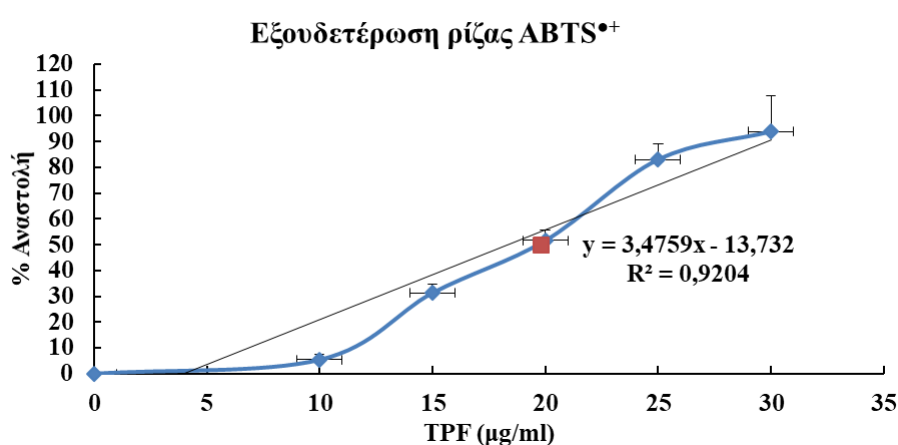
Με την φωτομετρική μέθοδο ρίζας DPPH, εξετάζουμε την ικανότητα του εκχυλίσματος να εξουδετερώνει την τεχνητή ρίζα. Συνεπώς, ελέγχουμε την αντιοξειδωτική ικανότητα του. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως IC<sub>50</sub>, που αντικατροπτίζει τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος σε µg τα οποία απαιτούνται για την εξουδετέρωση της ρίζας στο 50%. Όσο μικρότερη η τιμή IC<sub>50</sub>, τόσο πιο ισχυρό το εκχύλισμα. Η κάθε πειραματική διαδικασία έγινε τρεις ανεξάρτητες φορές, από όπου προέκυψαν 3 εξισώσεις. Το IC<sub>50</sub> αποτελεί μέσο όρο αυτών των εξισώσεων. Συνεπώς, το IC<sub>50</sub> είναι 88,1 µg/ml (Διάγραμμα 2).



**Διάγραμμα 2** Ικανότητα TPF να εξουδετερώνει την τεχνητή ρίζα DPPH.

##### 4.4.1.3 Εξουδετέρωση ρίζας ABTS<sup>•+</sup>

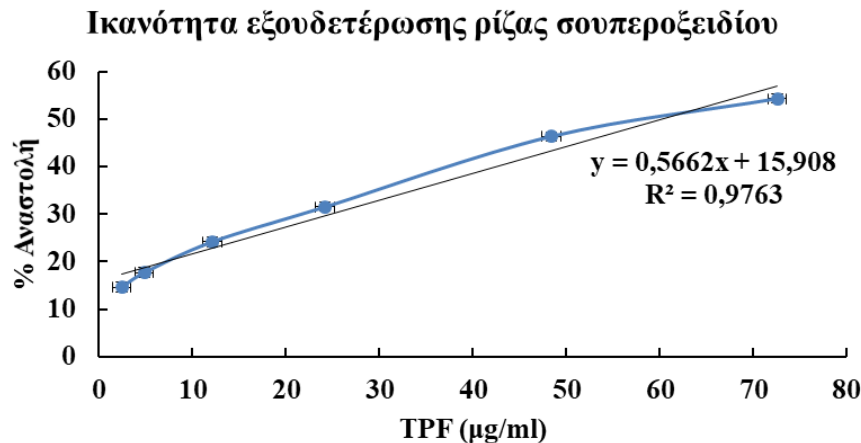
Με την φωτομετρική μέθοδο ρίζας ABTS<sup>•+</sup>, εξετάζουμε την ικανότητα του εκχυλίσματος να εξουδετερώνει την τεχνητή ρίζα. Συνεπώς, ελέγχουμε την αντιοξειδωτική ικανότητα του. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως IC50, που αντικατροπτίζει τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος σε µg τα οποία απαιτούνται για την εξουδετέρωση της ρίζας στο 50%. Όσο μικρότερη η τιμή IC50, τόσο πιο ισχυρό το εκχύλισμα. Η κάθε πειραματική διαδικασία έγινε τρεις ανεξάρτητες φορές, από όπου προέκυψαν 3 εξισώσεις. Το IC50 αποτελεί μέσο όρο αυτών των εξισώσεων. Συνεπώς, το IC50 είναι 20,2 µg/ml (Διάγραμμα 3).



**Διάγραμμα 3** Ικανότητα TPF να εξουδετερώνει την τεχνητή ρίζα ABTS<sup>•+</sup>.

#### 4.4.1.4 Ικανότητα εξουδετέρωσης ρίζας σουπεροξειδίου

Με την φωτομετρική αυτή μέθοδο εξετάζουμε την ικανότητα του εκχυλίσματος να εξουδετερώνει την ρίζα του σουπεροξειδίου, μια ρίζα που υπάρχει φυσιολογικά στον οργανισμό. Συνεπώς, ελέγχουμε την αντιοξειδωτική του ικανότητα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως IC50, που αντικατροπτίζει τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος σε µg τα οποία απαιτούνται για την εξουδετέρωση της ρίζας στο 50%. Όσο μικρότερη η τιμή IC50, τόσο πιο ισχυρό το εκχύλισμα. Η κάθε πειραματική διαδικασία έγινε τρεις ανεξάρτητες φορές, από όπου προέκυψαν 3 εξισώσεις. Το IC50 αποτελεί μέσο όρο αυτών των εξισώσεων. Συνεπώς, το IC50 είναι 60,2 µg/ml (Διάγραμμα 4).



**Διάγραμμα 4** Ικανότητα TPF να εξουδετερώνει την ρίζα σουπεροξειδίου.

#### 4.4.1.5 Ικανότητα εξουδετέρωσης ρίζας υδροξυλίου

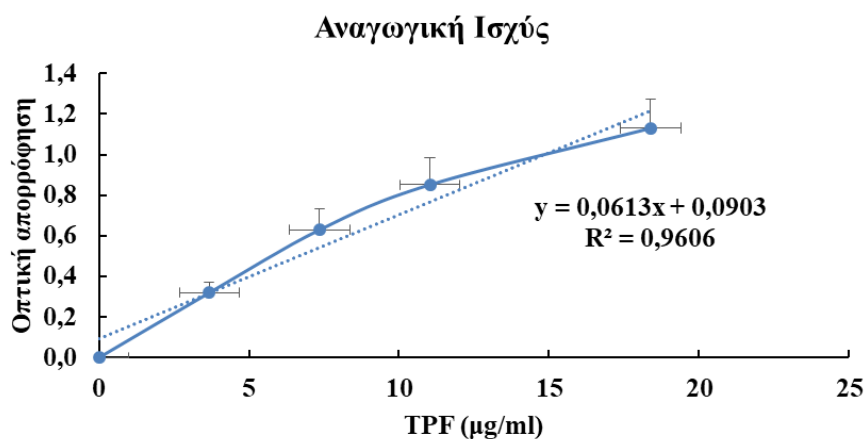
Με την φωτομετρική αυτή μέθοδο εξετάζουμε την ικανότητα του εκχυλίσματος να εξουδετερώνει την ρίζα του υδροξυλίου, μια ρίζα που υπάρχει φυσιολογικά στον οργανισμό. Συνεπώς, ελέγχουμε την αντιοξειδωτική ικανότητα του. Ωστόσο, δεν υπήρξαν αποτελέσματα για τη συγκεκριμένη μέθοδο, καθώς με βάση την βιβλιογραφία η μέθοδος δεν ενδείκνυται για μη υδατοδιαλυτά εκχυλίσματα, και τους οργανικούς διαλύτες που χρησιμοποιούνται για να αυξήσουν την διαλυτότητα αυτών (266). Οι οργανικοί διαλύτες και ειδικά το DMSO, που χρησιμοποιούμε για την αύξηση της διαλυτότητας του εκχυλίσματος TPF, εξουδετερώνει κατά 80% την ρίζα υδροξυλίου (OH•).

#### 4.4.1.6 Αποτίμηση αναγωγικής ισχύς

Η αναγωγική ικανότητα μιας ουσίας συνδέεται με την αντιοξειδωτική της δράση καθώς δείχνει ότι η ουσία δρα ως δότης ηλεκτρονίων, και άρα μπορεί να ανάγει οξειδωμένους ενδιάμεσους μεταβολίτες που σχηματίζονται από τη δράση των ελευθέρων ριζών (π.χ. κατά τη λιπιδική υπεροξείδωση). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ικανότητα του αντιοξειδωτικού να ανάγει τον  $Fe^{3+}$  σε  $Fe^{2+}$ . Όσο μεγαλύτερη είναι η οπτική απορρόφηση τόσο μεγαλύτερη είναι και η αναγωγική ισχύς των εξεταζόμενων



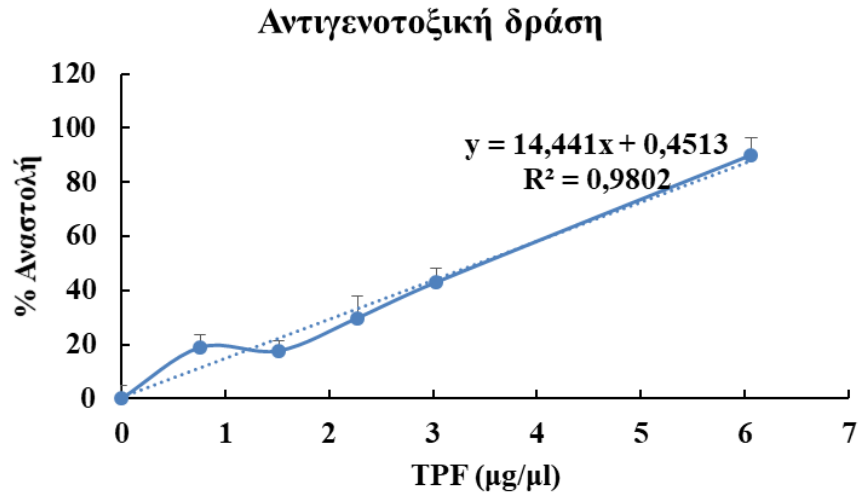
δειγμάτων. Για τον προσδιορισμό της αναγωγικής ικανότητας, υπολογίζεται το RP 0,5AU, που είναι η συγκέντρωση του εκχυλίσματος που προκαλεί οπτική απορρόφηση ίση με 0,5 στα 700 nm στο φωτόμετρο. Η κάθε πειραματική διαδικασία έγινε τρεις ανεξάρτητες φορές, από όπου προέκυψαν 3 οπτικές απορροφήσεις. Το 0,5 AU αποτελεί μέσο όρο αυτών των απορροφήσεων. Συνεπώς, η αναγωγική ισχύς του TPF είναι RP 6,7 μg/ml (Διάγραμμα 5).



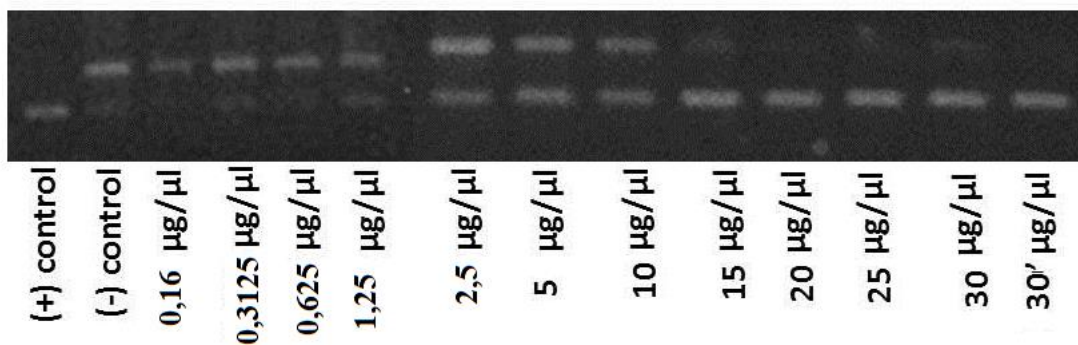
**Διάγραμμα 5 Αναγωγική ισχύς TPF.**

#### 4.4.1.7 Ικανότητα προστασίας του πλασμιδιακού DNA από μονόκλωνες θραύσεις προκαλούμενες από ρίζες περοξυλίου

Με τη συγκεκριμένη μέθοδο γίνεται αποτίμηση της αντιγενετοξικής δράσης του TPF. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως IC50, που αντικατοπτρίζει τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος σε μg τα οποία απαιτούνται για την προστασία του πλασμιδιακού DNA από θραύσεις της ρίζας περοξυλίου στο 50%. Όσο μικρότερη η τιμή IC50, τόσο πιο ισχυρό το εκχύλισμα. Η κάθε πειραματική διαδικασία έγινε τρεις ανεξάρτητες φορές, από όπου προέκυψαν 3 εξισώσεις. Το IC50 αποτελεί μέσο όρο αυτών των εξισώσεων. Συνεπώς, το IC50 είναι 3,1 μg/ml (Διάγραμμα 6). Στην Εικόνα 55 φαίνεται το χαρακτηριστικό μοτίβο από το πήκτωμα αγαρόζης έπειτα από χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο.



**Διάγραμμα 6** Ικανότητα TPF να προστατεύει το πλασμιδιακό DNA από μονόκλωνες θραύσεις προκαλλούμενες από ρίζες περοξυλίου (n=3).

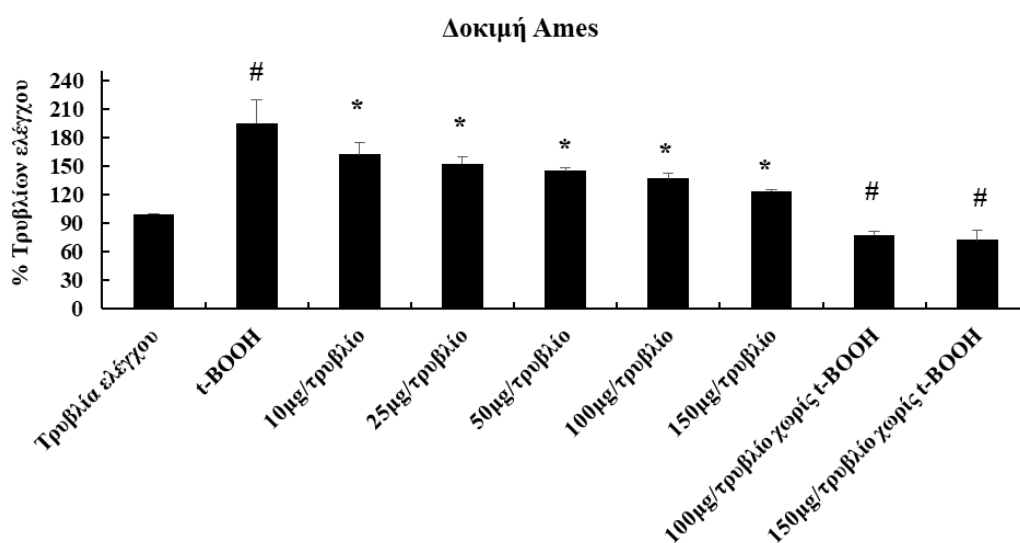


**Εικόνα 55** Εικόνα από το πήκτωμα αγαρόζης.

#### 4.4.1.8 Δομική Ames

Με τη συγκεκριμένη δοκιμή εξετάζουμε την αντιμεταλλαξιγόνο δράση του TPF, δηλαδή την ικανότητα του να προστατεύει το DNA βακτηρίων έναντι του οξειδωτικού παράγοντα παράγοντα *t*-BOOH. Στο Διάγραμμα 7, όπου απεικονίζεται ο αριθμός των παρατηρούμενων αποικιών, η χορήγηση του *t*-BOOH διπλασίασε τις παρατηρούμενες αποικίες σε σχέση με τα τρυβλία ελέγχου (απουσία *t*-BOOH). Στα υπόλοιπα τρυβλία όπου χορηγήθηκαν ταυτόχρονα το *t*-BOOH και το TPF σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις, παρατηρήθηκε δόσοεξαρτώμενη μείωση των αποικιών σε σχέση με την ομάδα θετικού μάρτυρα (*t*-BOOH). Επιπρόσθετα, στα τρυβλία όπου χορηγήθηκε

TPF χωρίς το *t*-BOOH, οι αποικίες παρουσίασαν στατιστικά σημαντική μείωση σε σχέση με τα τρυβλία ελέγχου.



**Διάγραμμα 7 Δοκιμή Ames, TPF. Όλα τα αποτελέσματα έχουν κανονικοποιηθεί ως προς τις επαναμεταλλαγμένες αποικίες των τρυβλίων ελέγχου (που δεν χορηγήθηκε ούτε TPF, ούτε *t*-BOOH) Με (#) υποδηλώνεται στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p < 0,05$ ) με τα τρυβλία ελέγχου, ενώ με (\*) υποδηλώνεται διαφορά με τα τρυβλία θετικού μάρτυρα (που έχει χορηγηθεί μόνο ο οξειδωτικός παράγοντας).**

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται και σε IC<sub>50</sub>, δηλαδή τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος σε µg/τρυβλίο που απαιτείται για να αναστείλει κατά 50% την μεταλλαξιγένεση που προκαλείται από το *tert*-BOOH. Όσο μικρότερη η τιμή IC<sub>50</sub>, τόσο πιο ισχυρό το εκχύλισμα. Η κάθε πειραματική διαδικασία έγινε τρεις ανεξάρτητες φορές. Το IC<sub>50</sub> αντιστοιχεί σε 11,03 µg TPF/τρυβλίο.

#### 4.4.1.8 Στατιστική συσχέτιση *in vitro* δοκιμών

Στον Πίνακα 9 παρουσιάζονται με αστερίσκο οι συσχετίσεις μεταξύ των *in vitro* δοκιμών. Παρατηρείται ότι το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο συσχετίζεται με την προστασία του πλασμιδιακού DNA. Συνεπώς, οι ποσότητες των πολυφαινολών επηρεάζει την αντιγενετοξική δράση του εκχυλίσματος. Μια άλλη σημαντική συσχέτιση αφορά την αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος, όπως διαφαίνεται από τις μεθόδους DPPH και ABTS<sup>•+</sup>, με την αναγωγική του ισχύ, δηλαδή σε όλες τις

περιπτώσεις ικανότητας προσφοράς ηλεκτρονίων και εξουδετέρωσης ελευθέρων ριζών.

**Πίνακας 9 Συσχετίσεις κατά Pearson *in vitro* δοκιμών με το στατιστικό πακέτο IBM SPSS Statistics 20.**

		Συσχετίσεις						
		FOLIN	DPPH	ABTS	Ρίζα σουπεροξειδίου	Αναγωγική ισχύς	Προστασία πλασμιδίου	Δοκιμή AMES
FOLIN	Pearson Correlation	1	-,033	,007	,084	-,012	,980*	,007
	Sig. (2-tailed)		,967	,993	,916	,988	,020	,993
	N	4	4	4	4	4	4	4
DPPH	Pearson Correlation	-,033	1	,999**	,911	,997**	,151	,442
	Sig. (2-tailed)	,967		,001	,089	,003	,849	,558
	N	4	4	4	4	4	4	4
ABTS	Pearson Correlation	,007	,999**	1	,907	,995**	,189	,459
	Sig. (2-tailed)	,993	,001		,093	,005	,811	,541
	N	4	4	4	4	4	4	4
Ρίζα σουπεροξειδίου	Pearson Correlation	,084	,911	,907	1	,941	,282	,049
	Sig. (2-tailed)	,916	,089	,093		,059	,718	,951
	N	4	4	4	4	4	4	4
Αναγωγική ισχύς	Pearson Correlation	-,012	,997**	,995**	,941	1	,178	,371
	Sig. (2-tailed)	,988	,003	,005	,059		,822	,629
	N	4	4	4	4	4	4	4
Προστασία πλασμιδίου	Pearson Correlation	,980*	,151	,189	,282	,178	1	,018
	Sig. (2-tailed)	,020	,849	,811	,718	,822		,982
	N	4	4	4	4	4	4	4
Δοκιμή AMES	Pearson Correlation	,007	,442	,459	,049	,371	,018	1
	Sig. (2-tailed)	,993	,558	,541	,951	,629	,982	
	N	4	4	4	4	4	4	4

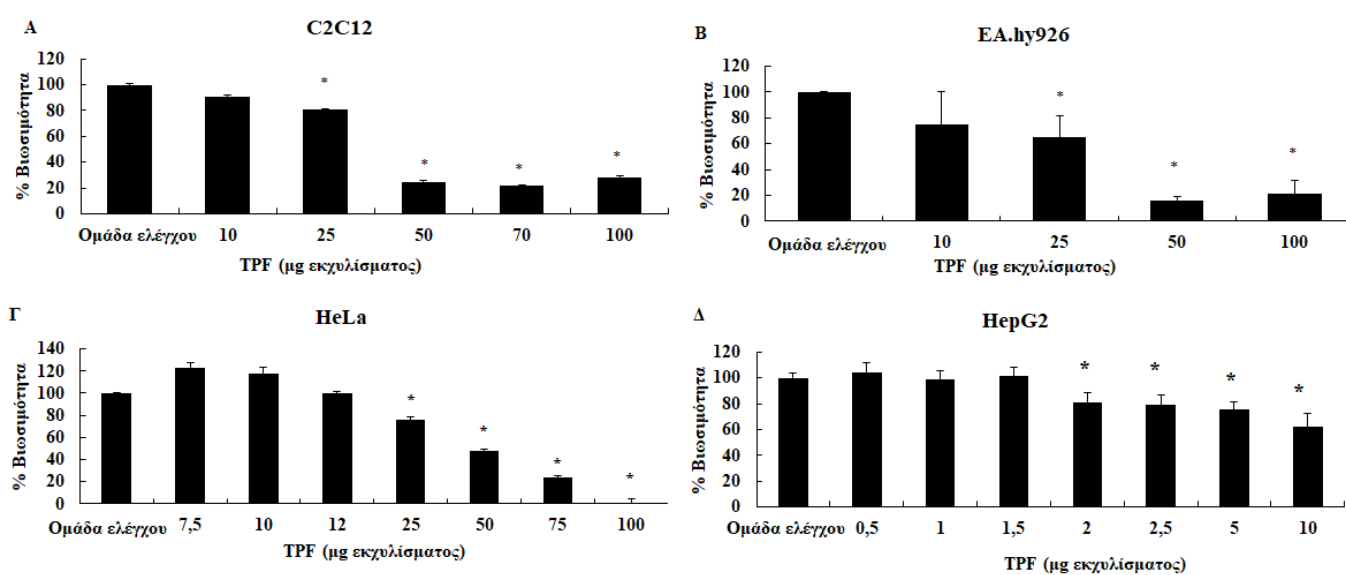
\*. Σημαντική συσχέτιση 0.05 (2-tailed).  
 \*\*. Ισχυρά σημαντική συσχέτιση 0.01 (2-tailed).

#### 4.4.2 Αποτελέσματα δοκιμών σε κυτταροκαλλιέργειες

Το TPF χορηγήθηκε σε 4 κυτταρικές σειρές. Σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα (EA.hy926), ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα ήπατος (HepG2) και τραχήλου της μήτρας (HeLa) καθώς και σε μυοβλάστες ποντικού (C2C12). Οι κυτταρικές σειρές, καθώς προσομοιάζουν συνθήκες *in vivo*, θεωρούνται απαραίτο σκαλοπάτι και χρήσιμο πειραματικό εργαλείο προκειμένου να γίνει εξαγωγή των *in vitro* δοκιμών σε ζωντανούς οργανισμούς, συνεπώς τη λήψη πιο ρεαλιστικών και ασφαλών αποτελεσμάτων.

#### 4.4.2.1 Έλεγχος κυτταροτοξικότητας

Προτού το εκχυλίσματος χορηγηθεί στις κυτταρικές σειρές, προκειμένου να γίνει έλεγχος της επίδρασής του σε δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης, είναι απαραίτητο να βρεθούν τα εύρη των μην κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων. Αυτό πραγματοποιήθηκε με βάση της οδηγίες του εμπορικού κιτ ΧΤΤ. Ως κατώτατο όριο βιωσιμότητας θεωρήθηκε το 80% των ζώντων κυττάρων συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, όπου δε χορηγήθηκε εκχύλισμα. Στο Διάγραμμα 8 παρουσιάζονται οι κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Συγκεκριμένα για τις κυτταρικές σειρές C2C12 (Διάγραμμα 8 Α), EA.hy926 (Διάγραμμα 8 Β) και HeLa (Διάγραμμα 8 Γ) συγκεντρώσεις πάνω από 25μg TPF είναι τοξικές. Ενώ για την κυτταρική σειρά HepG2 (Διάγραμμα 8 Δ) πάνω από 2 μg εκχυλίσματος είναι τοξικές. Φαίνεται ότι η κυτταρική σειρά HepG2 είναι πιο ευαίσθητη στο εκχύλισμα, υποδεικνύοντας μια ιστοειδική δράση.

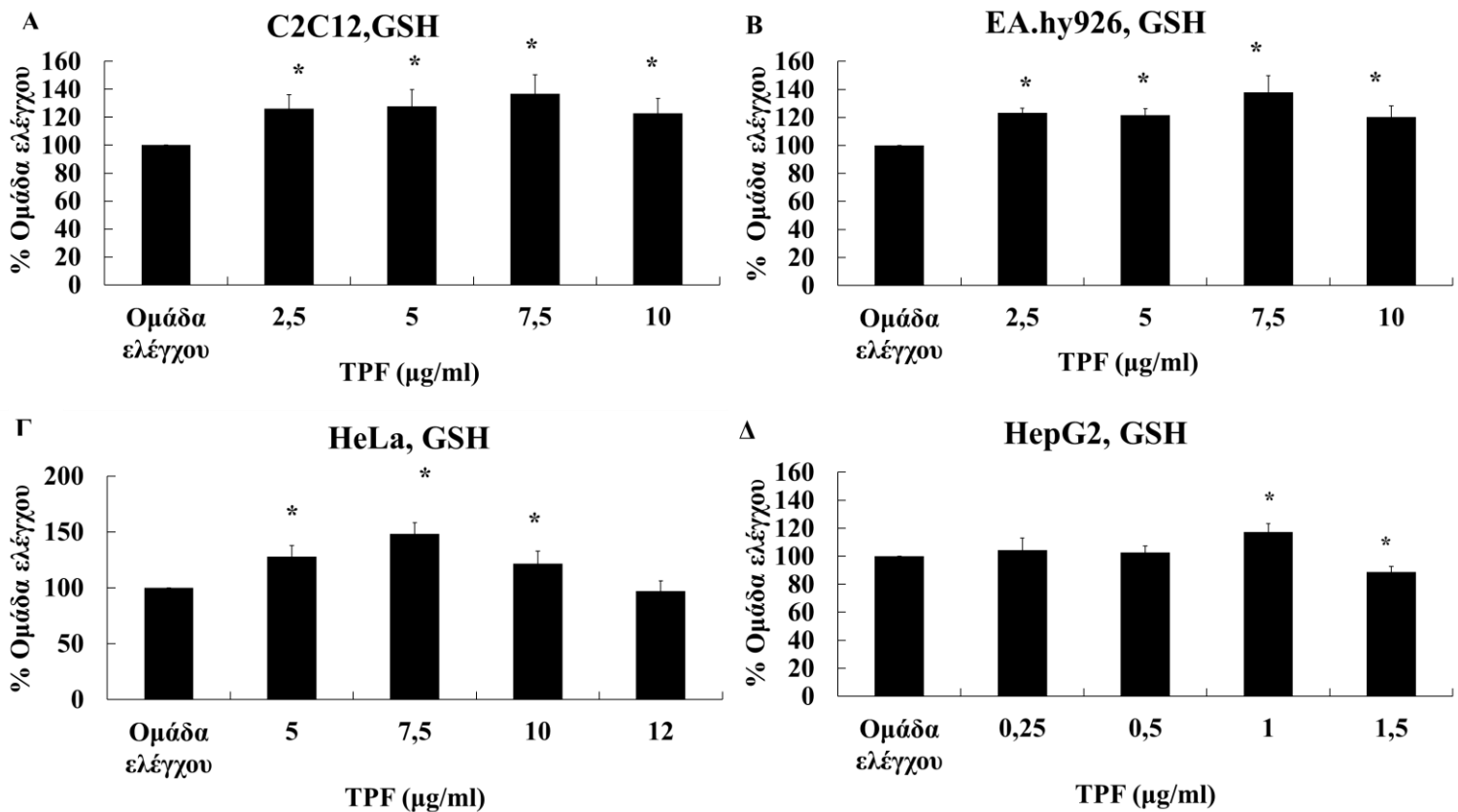


**Διάγραμμα 8** Προσδιορισμός κυτταροτοξικότητας TPF, στις κυτταρικές σειρές Α) C2C12, Β) EA.hy926, Γ) HeLa, Δ) HepG2 έπειτα από 24 ώρες χορήγησης του εκχυλίσματος, με τη μέθοδο ΧΤΤ. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς την ομάδα ελέγχου και παρουσιάζονται ως mean ± SEM, (n=6). \*p<0,05 στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. TPF; Total polyphenolic fraction.

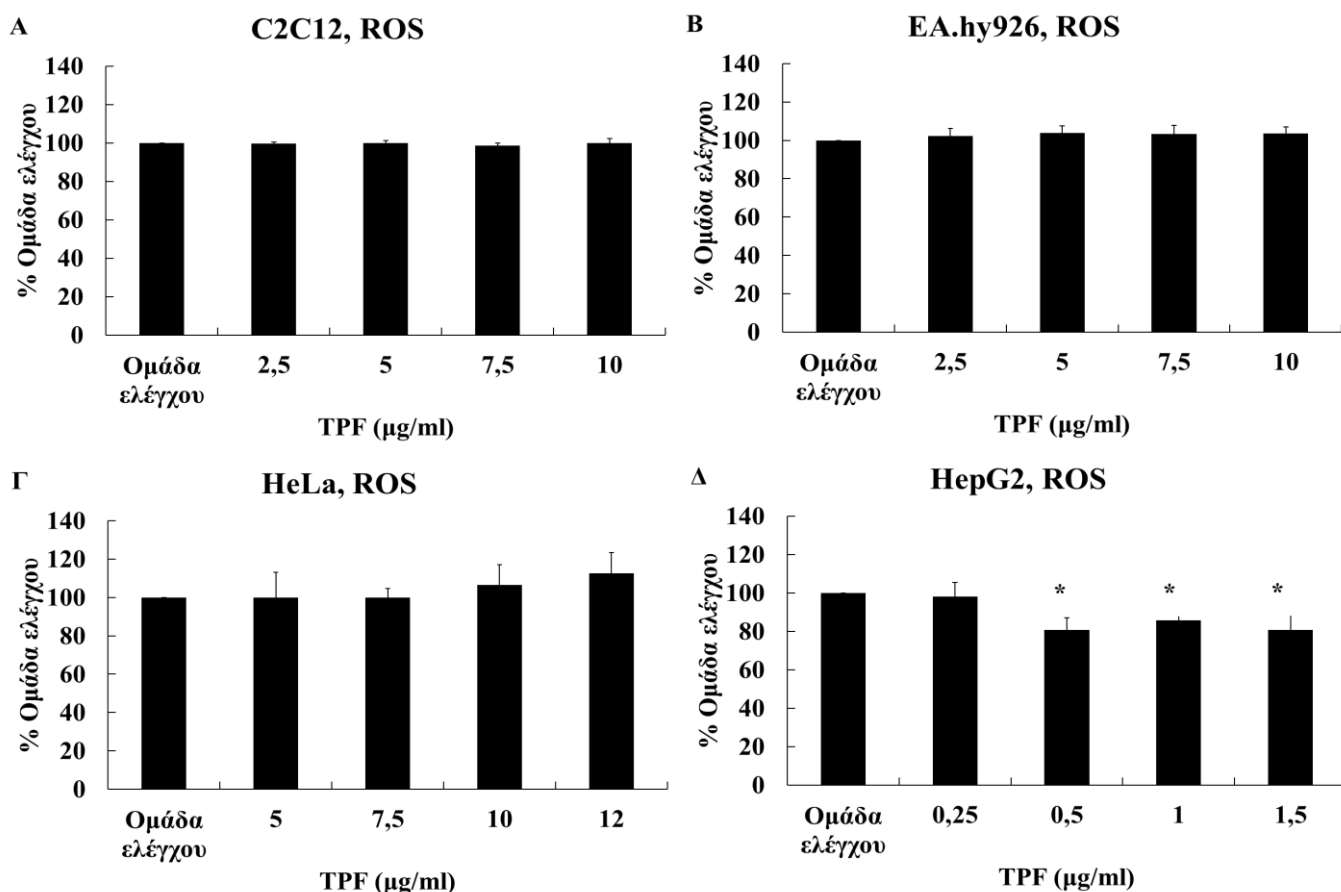
#### 4.4.2.2 Αποτίμηση επιπέδων γλουταθειόνης (GSH) και δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) με κυτταρομετρία ροής

Τα επίπεδα των ενδογενών επιπέδων GSH (Διάγραμμα 9) και ROS (Διάγραμμα 10) προσδιορίστηκαν μέσω κυτταρομετρίας ροής. Να τονιστεί ότι δε χρησιμοποιήθηκε κάποιος εξωγενής οξειδωτικός παράγοντας. Άυξηση στα επίπεδα GSH και μείωση στα επίπεδα ROS έπειτα από την χορήγηση του εκχυλίσματος δηλώνει προστατευτική δράση του εκχυλίσματος. Πιο συγκεκριμένα, το εκχύλισμα ελαιολάδου αύξησε σημαντικά τα επίπεδα GSH στην κυτταρική σειρά C2C12 κατά 23%, 28%, 37%, 23% στις συγκεντρώσεις 2,5, 5, 7,5 και 10  $\mu\text{g/ml}$  TPF, αντίστοιχα συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (Διάγραμμα 9Α). Στην κυτταρική σειρά EA.hy926 το TPF αύξησε σημαντικά τα επίπεδα GSH κατά 23%, 22%, 38% και 20% συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου στις συγκεντρώσεις 2,5, 5, 7,5 και 10  $\mu\text{g/ml}$  TPF αντίστοιχα (Διάγραμμα 9Β). Στην κυτταρική σειρά HeLa τα επίπεδα GSH έπειτα από την χορήγηση του TPF αυξήθηκαν συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου κατά 28%, 48% και 22% στα 5, 5,7 και 10  $\mu\text{g/ml}$  TPF αντίστοιχα, ενώ στη μεγαλύτερη συγκέντρωση παρατηρείται μια μείωση που δεν είναι στατιστικά σημαντική (Διάγραμμα 9Γ). Τέλος, στην κυτταρική σειρά HepG2 τα επίπεδα GSH αυξήθηκαν κατά 17% στο 1  $\mu\text{g/ml}$  εκχυλίσματος ενώ στα 1,5  $\mu\text{g/ml}$  υπήρξε σημαντική μείωση 11%, συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (Διάγραμμα 9Δ).

Τα επίπεδα ROS παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 10. Τα επίπεδα ROS μειώθηκαν σημαντικά μόνο στην κυτταρική σειρά HepG2 (Διάγραμμα 10Α), όπου μειώθηκαν κατά 19%, 14% και 19% στις συγκεντρώσεις 0,5, 1 και 1,5  $\mu\text{g/ml}$ , αντίστοιχα, συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου.



**Διάγραμμα 9 Επίδραση TPF, στα επίπεδα GSH, στις κυτταρικές σειρές A) C2C12, B) EA.hy926, Γ) HeLa, Δ) HepG2, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης του TPF, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς την ομάδα ελέγχου (δε χορηγήθηκε εκχύλισμα) και παρουσιάζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SEM, (n=3). \* $p < 0,05$  στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. GSH; Glutathione, TPF; Total polyphenolic fraction.**



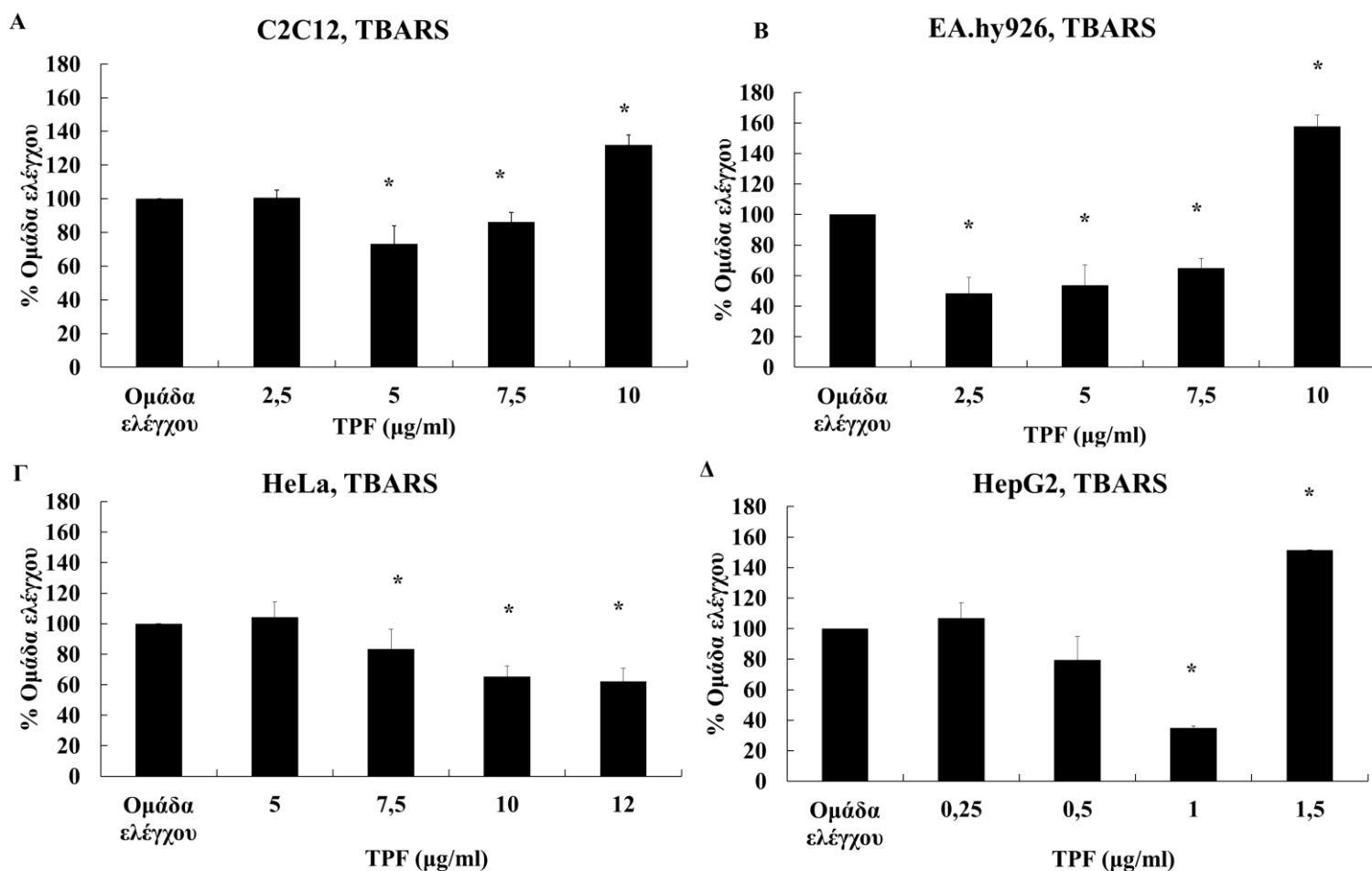
**Διάγραμμα 10** Επίδραση TPF, στα ενδογενή επίπεδα ROS, στις κυτταρικές σειρές A) C2C12, B) EA.hy926, Γ) HeLa, Δ) HepG2, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης του TPF, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς την ομάδα ελέγχου (δε χορηγήθηκε εκχύλισμα) και παρουσιάζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SEM, (n=3). \* $p < 0,05$  στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. ROS; Reactive Oxygen Species, TPF; Total polyphenolic fraction.

#### 4.4.2.3 Εκτίμηση επιπέδων λιπιδικής υπεροξειδωσης (TBARS)

Τα επίπεδα λιπιδικής υπεροξειδωσης παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 11. Μείωση της λιπιδικής υπεροξειδωσης έπειτα από τη χορήγηση του εκχυλίσματος δηλώνει προστατευτική δράση. Πιο αναλυτικά, έπειτα από την χορήγηση TPF για 24 ώρες τα επίπεδα TBARS μειώθηκαν σημαντικά στην κυτταρική σειρά C2C12 κατά 26,7% και 13,8% στις συγκεντρώσεις 5 και 7,5  $\mu\text{g/ml}$  TPF αντίστοιχα, συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Ωστόσο, στα 10  $\mu\text{g/ml}$  τα επίπεδα αυξήθηκαν κατά 31,8 % (Διάγραμμα 11A). Στα EA.hy926 υπήρξε ίδιο μοτίβο με τα C2C12 καθώς τα επίπεδα TBARS μειώθηκαν



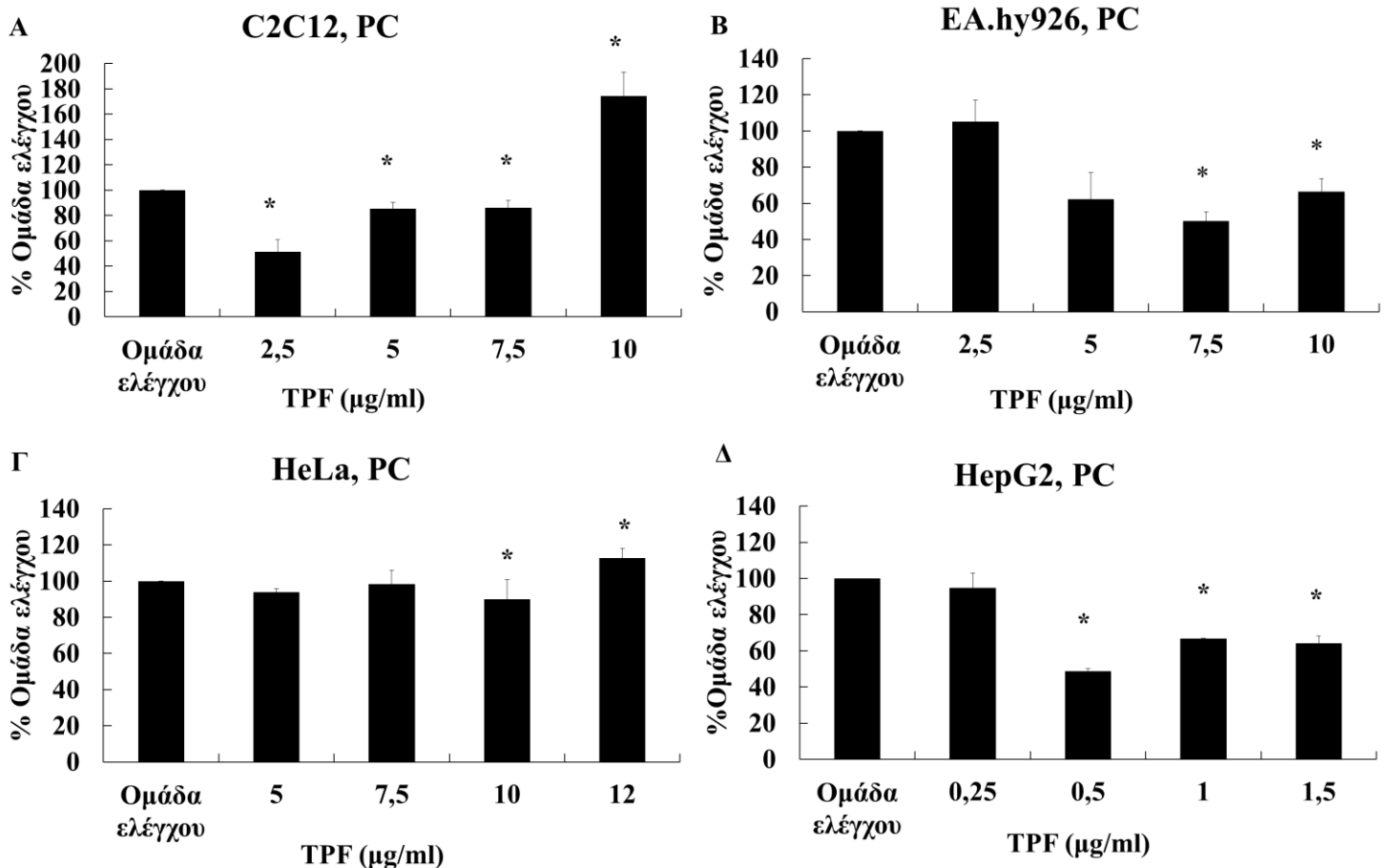
κατά 51,7%, 46,2% και 35% στα 2,5, 5 και 7,5  $\mu\text{g/ml}$  TPF αντίστοιχα, συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Ενώ στα 10  $\mu\text{g/ml}$  TPF τα επίπεδα αυξήθηκαν κατά 57,7% (Διάγραμμα 11B). Στην κυτταρική σειρά HeLa, τα επίπεδα TBARS μειώθηκαν σημαντικά κατά 16,7%, 34,8% και 37,9% στις συγκεντρώσεις 7,5, 10 και 12  $\mu\text{g/ml}$  TPF αντίστοιχα, συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (Διάγραμμα 11Γ). Στα HepG2 η λιπιδική υπεροξειδωση μειώθηκε κατά 65,2% στο 1  $\mu\text{g/ml}$ , ωστόσο στο 1,5  $\mu\text{g/ml}$  αυξήθηκε κατά 51,5% συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (Διάγραμμα 11Δ).



**Διάγραμμα 11** Επίδραση TPF, στα επίπεδα λιπιδικής υπεροξειδωσης (TBARS), στις κυτταρικές σειρές A) C2C12, B) EA.hy926, Γ) HeLa, Δ) HepG2, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης του TPF, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς την ομάδα ελέγχου (δε χορηγήθηκε εκχύλισμα) και παρουσιάζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SEM, (n=3). \* $p < 0,05$  στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. TBARS; Thiobarbituric Acid Reactive Substances. TPF; Total polyphenolic fraction.

#### 4.4.2.4 Εκτίμηση επιπέδων πρωτεϊνικής οξειδωσης (PC)

Τα επίπεδα πρωτεϊνικής οξειδωσης παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 12. Μείωση των επιπέδων PC έπειτα από τη χορήγηση του εκχυλίσματος σημαίνει προστατευτική δράση του εκχυλίσματος ελαιολάδου. Πιο αναλυτικά, τα επίπεδα PC μειώθηκαν σημαντικά κατά 48,6%, 14,8% και 13,9% στις συγκεντρώσεις 2,5, 5 και 7,5 μg/ml TPF αντίστοιχα, συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Ωστόσο, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση κατά 74,4% στα 10 μg/ml TPF, συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (Διάγραμμα 12Α). Στα EA.hy926, παρατηρήθηκε μείωση κατά 49,9% και 33,7% σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου στις συγκεντρώσεις 7,5 και 10 μg/ml TPF αντίστοιχα (Διάγραμμα 12Β). Η χορήγηση TPF μείωσε στατιστικά σημαντικά τα επίπεδα PC στα HeLa, κατά 6,1% και 10 % σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου στις συγκεντρώσεις 5 και 10 μg/ml TPF αντίστοιχα. Ωστόσο, στην μεγαλύτερη συγκέντρωση των 12 μg/ml TPF, παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση κατά 12,6 % σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (Διάγραμμα 12Γ). Τέλος, στην κυτταρική σειρά HepG2 τα επίπεδα των PC μειώθηκαν στις συγκεντρώσεις 0,5, 1 και 1,5 μg/ml κατά 51,2%, 33,3% και 35,9% αντίστοιχα, συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (Διάγραμμα 12Δ).



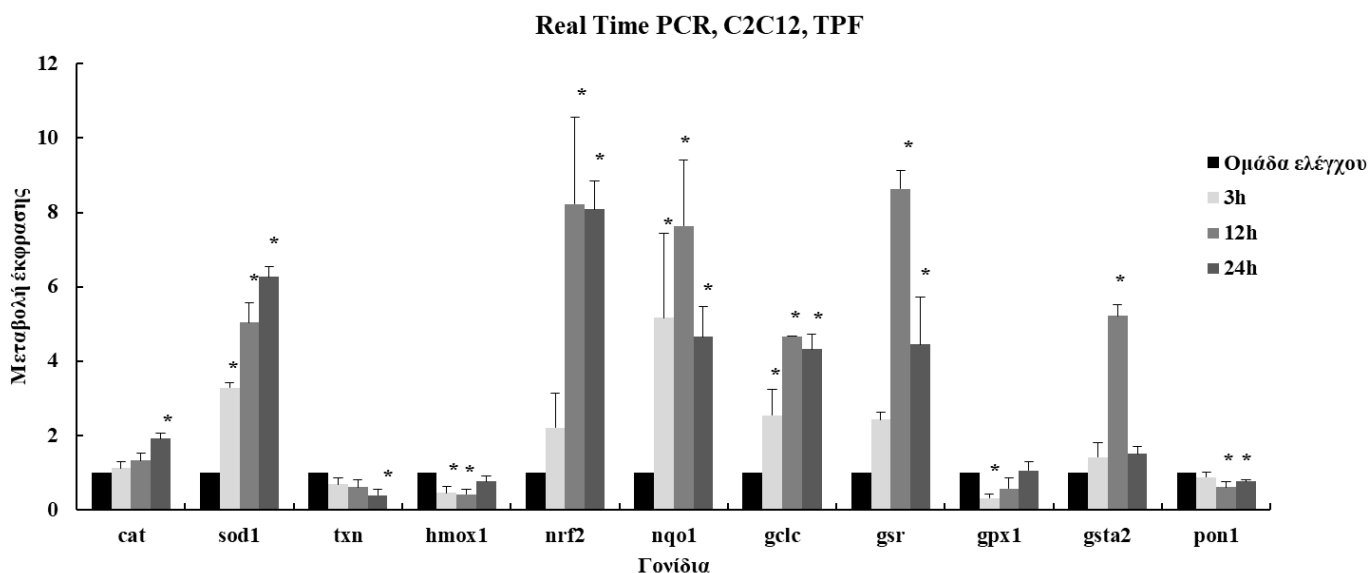
**Διάγραμμα 12** Επίδραση TPF, στα επίπεδα πρωτεϊνικής οξειδωσης (PC), στις κυτταρικές σειρές A) C2C12, B) EA.hy926, Γ) HeLa, Δ) HepG2, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης του TPF, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς την ομάδα ελέγχου (δε χορηγήθηκε εκχύλισμα) και παρουσιάζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SEM, (n=3). \* $p < 0,05$  στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. PC; Protein Carbonyls. TPF; Total polyphenolic fraction.

#### 4.4.2.5 Ποσοτική ανάλυση έκφρασης γονιδίων στόχων του μεταγραφικού παράγοντα NRF-2 σε πραγματικό χρόνο (Real time PCR)

Οι συγκεντρώσεις TPF που επιλέχθηκαν, ήταν διαφορετικές για κάθε κυτταρική σειρά. Συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν εκείνες στις οποίες παρατηρήθηκε η μέγιστη αύξηση της GSH, μέγιστη μείωση λιπιδικής (TBARS) και πρωτεϊνικής υπεροξειδωσης (PC), καθώς και μέγιστη μείωση δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS). Συνεπώς, στις κυτταρικές σειρές EA.hy926 και C2C12 χορηγήθηκε 7,5 μg/ml TPF. Για τα HeLa 10 μg/ml TPF και στα HepG2 1μg/ml TPF.

> Επίπεδα έκφρασης γονιδίων στα C2C12

Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 13 τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων στα C2C12 επηρεάστηκαν ποικιλοτρόπως σε σχέση με το χρόνο χορήγησης 7,5 µg/ml TPF. Όλες οι συγκρίσεις γίνονται με τα κύτταρα της ομάδας ελέγχου, όπου δε χορηγήθηκε εκχύλισμα. Συγκεκριμένα, η καταλάση (*cat*) αυξήθηκε 0,9-φορές στις 24 ώρες, η σουπεροξειδική δισμουτάση (*sod1*) αυξήθηκε 2,3-, 4,1- και 5,1-φορές στις 3, 12 και 24 ώρες αντίστοιχα. Η θειορεδοξίνη (*txn*) μειώθηκε κατά 0,6-φορές στις 24 ώρες. Η οξυγενάση της αίμης (*hmox1*) μειώθηκε 0,5- και 0,6-φορές στις 3 και 12 ώρες αντίστοιχα. Ο *nrf2* αυξήθηκε 7,2- και 7-φορές στις 12 και 24 ώρες αντίστοιχα. Η NADPH οξειδοαναγωγή των κινονών (*nqo1*), αυξήθηκε 4,2-, 6,6-, 3,7-φορές στις 3, 12 και 24 ώρες χορήγησης TPF, αντίστοιχα. Η καταλυτική υπομονάδα της γ-γλουταμυλοκουστεϊνικής λιγάσης (*gclc*) αυξήθηκε 1,5-, 6,6- και 3,7-φορές στις 3, 12 και 24 ώρες αντίστοιχα. Η αναγωγή της γλουταθειόνης (*gsr*) αυξήθηκε 7,6- και 3,4-φορές στις 12 και 24 ώρες αντίστοιχα. Η περοξειδάση της γλουταθειόνης 1 (*gpx1*) μειώθηκε στις 3 ώρες 0,7-φορές. Η α2 S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (*gsta2*), αυξήθηκε στις 12 ώρες κατά 4,2-φορές. Τέλος, η παροξονάση 1 (*pon1*) μειώθηκε 0,4- και 0,3 φορές στις 12 και 24 ώρες αντίστοιχα. Οι υπόλοιπες μεταβολές δεν είναι στατιστικά σημαντικές.

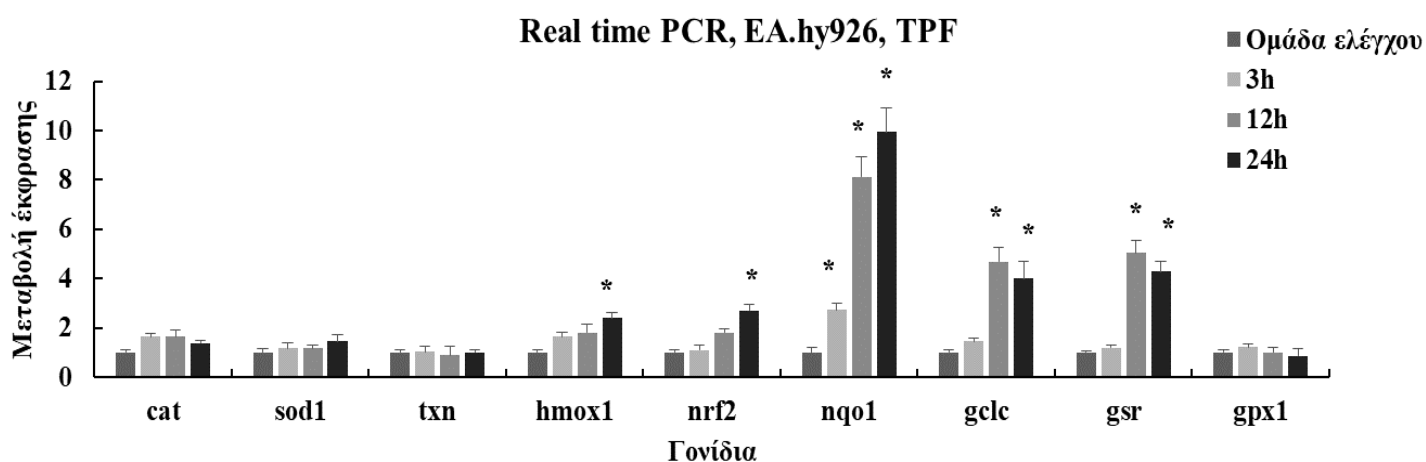


**Διάγραμμα 13** Επίδραση TPF (7,5 µg/ml) στα επίπεδα έκφρασης γονιδίων-στόχων του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 στα C2C12, σε τρεις διαφορετικές χρονικές στιγμές (3 h, 12 h, 24 h). Όλα τα αποτελέσματα έχουν κανονικοποιηθεί τόσο ως προς τα επίπεδα έκφρασης των κυττάρων της ομάδας ελέγχου (που δεν έλαβαν εκχύλισμα), όσο και ως

προς το γονίδιο κανονικοποίησης *gapdh*. Ο αστερίσκος (\*) υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p < 0,05$ ) σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης των κυττάρων της ομάδας ελέγχου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SD ( $n=3$ ). TPF; Total Polyphenolic Fraction.

> Επίπεδα έκφρασης γονιδίων στα EA.hy926

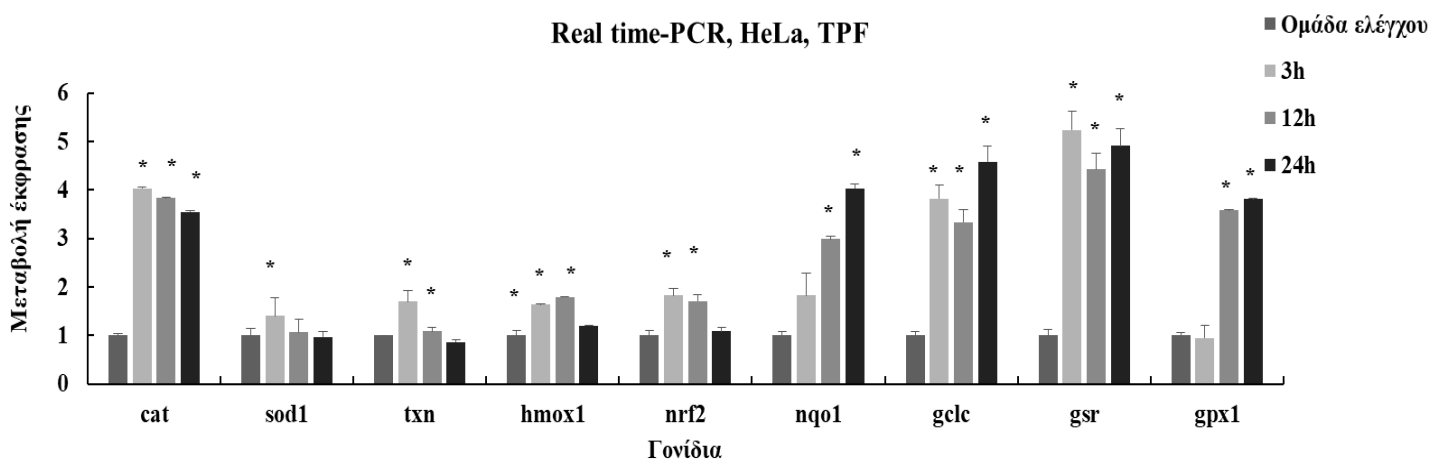
Στο Διάγραμμα 14 παρουσιάζονται τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων στα EA.hy926 σε σχέση με το χρόνο χορήγησης 7,5  $\mu\text{g/ml}$  TPF. Όλες οι συγκρίσεις γίνονται με τα κύτταρα της ομάδας ελέγχου, όπου δε χορηγήθηκε εκχύλισμα. Συγκεκριμένα, η *hmox1* αυξήθηκε 1,4-φορές στις 24 ώρες. Ο *nrf2* αυξήθηκε 1,7-φορές στις 24 ώρες. Η *nqo1*, αυξήθηκε 1,7-, 7,1- και 9-φορές στις 3, 12 και 24 ώρες χορήγησης TPF, αντίστοιχα. Η *gclc* αυξήθηκε 5,7- και 3-φορές στις 12 και 24 ώρες αντίστοιχα. Τέλος, η *gsr* αυξήθηκε 4- και 3,3-φορές στις 12 και 24 ώρες αντίστοιχα. Οι υπόλοιπες μεταβολές δεν είναι στατιστικά σημαντικές.



**Διάγραμμα 14 Επίδραση TPF (7,5  $\mu\text{g/ml}$ ) στα επίπεδα έκφρασης γονιδίων-στόχων του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 στα EA.hy926, σε τρεις διαφορετικές χρονικές στιγμές (3 h, 12 h, 24 h). Όλα τα αποτελέσματα έχουν κανονικοποιηθεί τόσο ως προς τα επίπεδα έκφρασης των κυττάρων της ομάδας ελέγχου (που δεν έλαβαν εκχύλισμα), όσο και ως προς το γονίδιο κανονικοποίησης *gapdh*. Ο αστερίσκος (\*) υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p < 0,05$ ) σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης των κυττάρων της ομάδας ελέγχου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SD ( $n=3$ ). TPF; Total Polyphenolic Fraction.**

> Επίπεδα έκφρασης γονιδίων στα HeLa

Στο Διάγραμμα 15 παρουσιάζονται τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων στα HeLa σε σχέση με το χρόνο χορήγησης 10 μg/ml TPF. Συγκεκριμένα, η *cat* αυξήθηκε 3-, 2,8- και 2,5-φορές στις 3, 12 και 24 ώρες αντίστοιχα. Η *sod1* αυξήθηκε 0,4-φορές στις 3 ώρες. Η *txn* αυξήθηκε κατά 0,7-φορές στις 3 ώρες. Η *hmox1* αυξήθηκε 1,6-, 1,8- και 1,2-φορές στις 3, 12 και 24 ώρες αντίστοιχα. Ο *nrf2* αυξήθηκε 1,8- και 1,7-φορές στις 3 και 12 ώρες αντίστοιχα. Η *nqo1*, αυξήθηκε 2- και 3-φορές στις 12 και 24 ώρες χορήγησης TPF, αντίστοιχα. Η *gclc* αυξήθηκε 2,8-, 2,3- και 3,6-φορές στις 3, 12 και 24 ώρες αντίστοιχα. Η *gsr* αυξήθηκε 4,2-, 3,4- και 3,9-φορές στις 3, 12 και 24 ώρες αντίστοιχα. Η *gpx1* αυξήθηκε στις 12 και 24 ώρες 2,6- και 2,8-φορές αντίστοιχα. Οι υπόλοιπες μεταβολές δεν είναι στατιστικά σημαντικές.

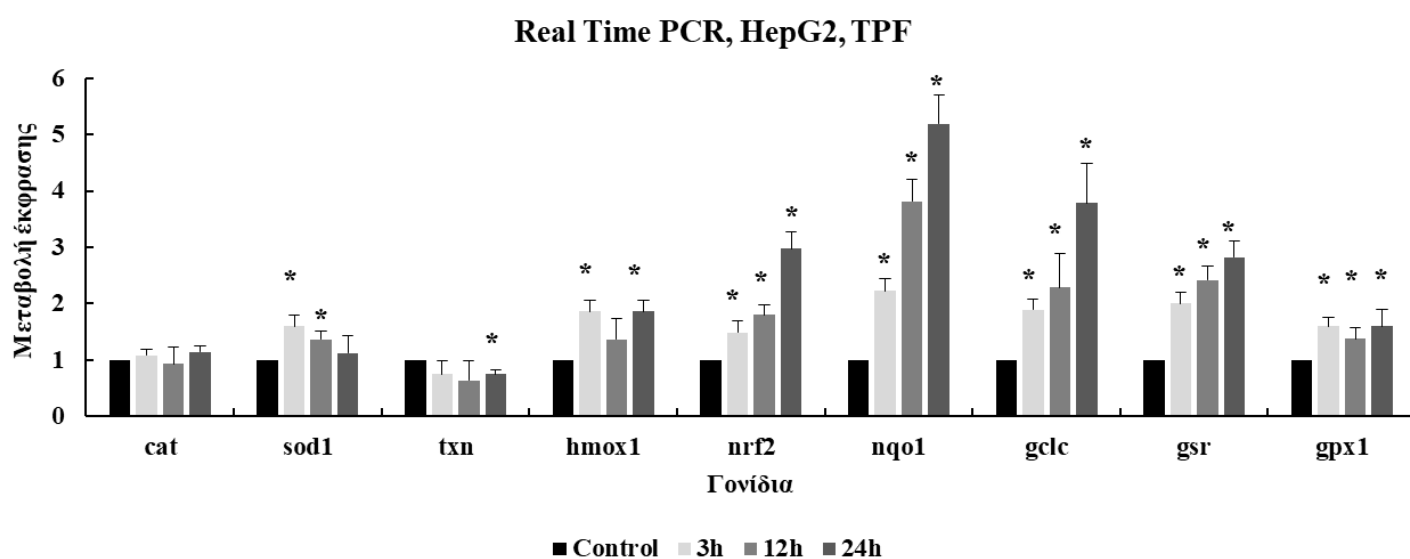


**Διάγραμμα 15 Επίδραση TPF (10 μg/ml) στα επίπεδα έκφρασης γονιδίων-στόχων του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 στα HeLa, σε τρεις διαφορετικές χρονικές στιγμές (3 h, 12 h, 24 h). Όλα τα αποτελέσματα έχουν κανονικοποιηθεί τόσο ως προς τα επίπεδα έκφρασης των κυττάρων της ομάδας ελέγχου (που δεν έλαβαν εκχύλισμα), όσο και ως προς το γονίδιο κανονικοποίησης *gardh*. Ο αστερίσκος (\*) υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p < 0,05$ ) σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης των κυττάρων της ομάδας ελέγχου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SD (n=3). TPF; Total Polyphenolic Fraction.**

> Επίπεδα έκφρασης γονιδίων στα HepG2

Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 16 τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων στα HepG2 επηρεάστηκαν ποικιλοτρόπος σε σχέση με το χρόνο χορήγησης 1 μg/ml TPF. Όλες οι συγκρίσεις γίνονται με τα κύτταρα της ομάδας ελέγχου, όπου δε χορηγήθηκε εκχύλισμα. Συγκεκριμένα, η *sod1* αυξήθηκε 0,6- και 0,4-φορές στις 3 και 12 ώρες

αντίστοιχα. Η *txn* μειώθηκε κατά 0,3-φορές στις 24 ώρες. Η *hmox1* αυξήθηκε 0,9-φορές στις 3 και 24 ώρες αντίστοιχα. Ο *nrf2* αυξήθηκε 0,5-, 0,8- και 2-φορές στις 3, 12 και 24 ώρες αντίστοιχα. Η *nqo1*, αυξήθηκε 1,2-, 2,8-, 4,2-φορές στις 3, 12 και 24 ώρες χορήγησης TPF, αντίστοιχα. Η *gclc* αυξήθηκε 0,9-, 1,3- και 2,8-φορές στις 3, 12 και 24 ώρες αντίστοιχα. Η *gsr* αυξήθηκε 1-, 1,4- και 1,8-φορές στις 3, 12 και 24 ώρες αντίστοιχα. Η *gpx1* αυξήθηκε στις 3, 12 και 24 ώρες 0,6-, 0,4- και 0,6- φορές, αντίστοιχα. Οι υπόλοιπες μεταβολές δεν είναι στατιστικά σημαντικές.



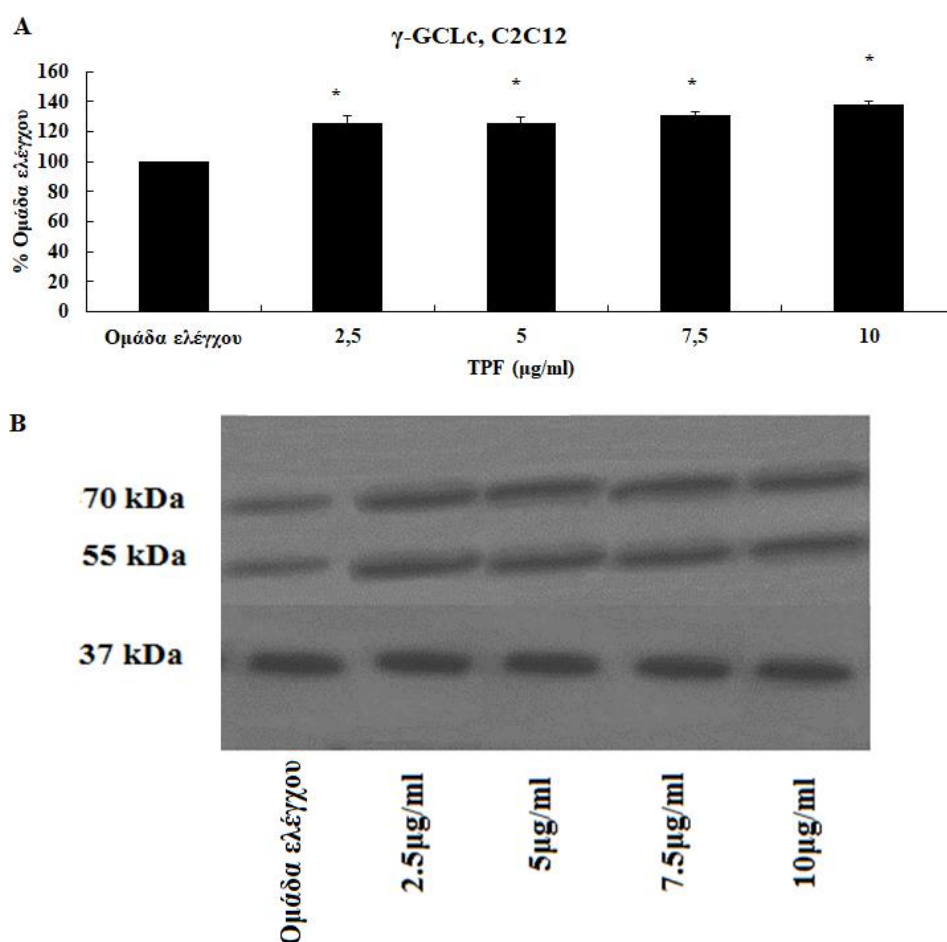
**Διάγραμμα 16** Επίδραση TPF (1 µg/ml) στα επίπεδα έκφρασης γονιδίων-στόχων του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 στα HepG2, σε τρεις διαφορετικές χρονικές στιγμές (3 h, 12 h, 24 h). Όλα τα αποτελέσματα έχουν κανονικοποιηθεί τόσο ως προς τα επίπεδα έκφρασης των κυττάρων της ομάδας ελέγχου (που δεν έλαβαν εκχύλισμα), όσο και ως προς το γονίδιο κανονικοποίησης *gadh*. Ο αστερίσκος (\*) υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p < 0,05$ ) σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης των κυττάρων της ομάδας ελέγχου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SD (n=3). TPF; Total Polyphenolic Fraction.

#### 4.4.2.6 Αποτίμηση επιπέδων πρωτεϊνικής έκφρασης με Ανοσοαπωτύπωση πρωτεϊνών (Western blot).

Μέσω Western blot ποσοτικοποιήσαμε τα πρωτεϊνικά επίπεδα της καταλυτικής υπομονάδα της γ-γλουταμυλοκυστεϊνικής λιγάσης (*gclc*) που συμμετέχει στο πρώτο στάδιο σύνθεσης της GSH.

> Επίπεδα καταλυτικής υπομονάδας της  $\gamma$ -GCLc στα C2C12

Έπειτα από 24 ώρες χορήγησης του TPF, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση ( $p < 0,05$ ) στα επίπεδα πρωτεΐνης της  $\gamma$ -GCLc κατά 25,9%, 25,6%, 31,2% και 37,9% σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (όπου δεν χορηγήθηκε TPF) στις συγκεντρώσεις 2,5, 5, 7,5, 10  $\mu\text{g/ml}$  TPF, αντίστοιχα (Διάγραμμα 17).

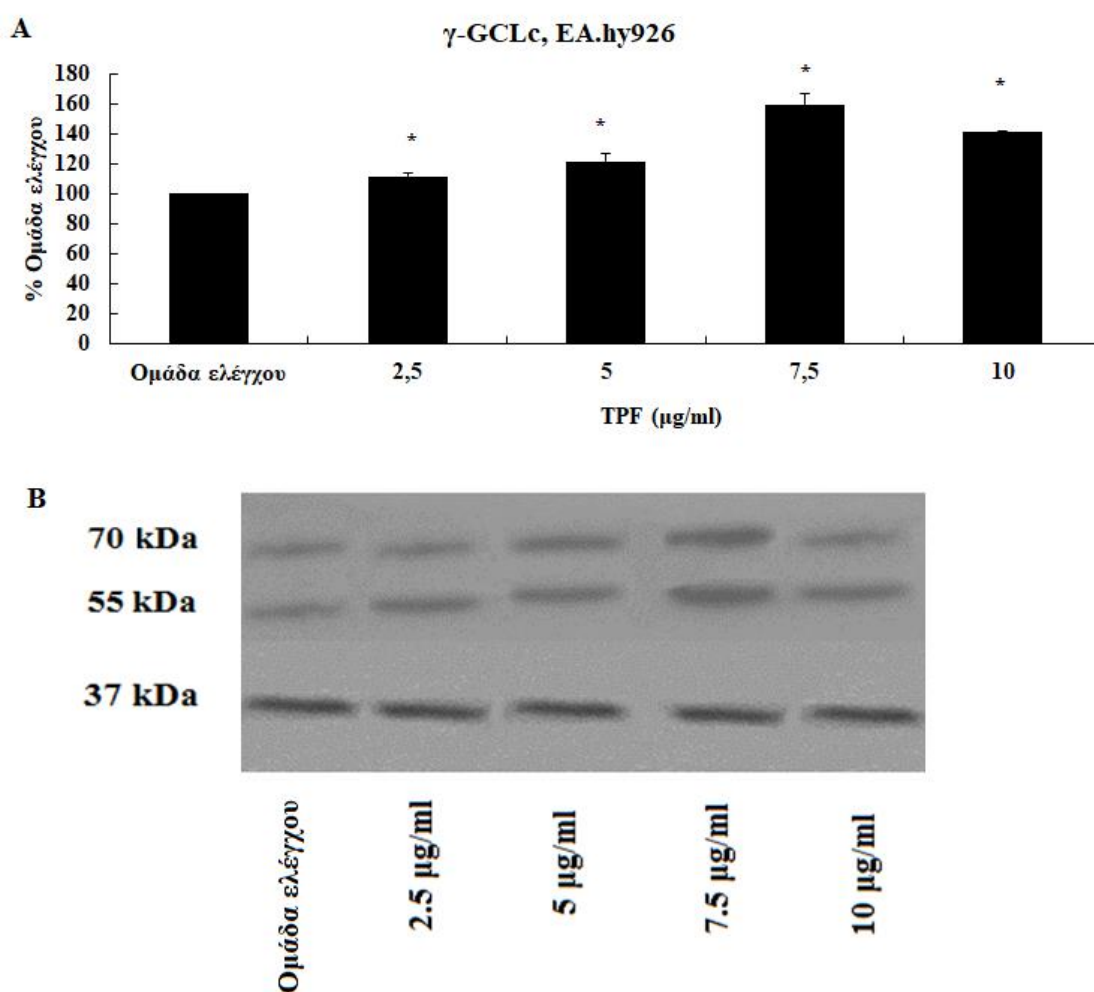


**Διάγραμμα 17** Επίδραση TPF στα πρωτεϊνικά επίπεδα της  $\gamma$ -GCLc, στην κυτταρική σειρά C2C12, έπειτα από 24 ώρες επώασης. Η ανάλυση της πρωτεϊνικής έκφρασης της  $\gamma$ -GCLc πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Western blot. A) Αποτελέσματα της ανάλυσης Western blot εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς τα κύτταρα της ομάδας ελέγχου (χωρίς προσθήκη TPF). Η έκφραση του GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως μόριο κανονικοποίησης, B) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση των πρωτεϊνών  $\gamma$ -GCLc (70, 55 kDa) και GAPDH (37 kDa). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SEM ( $n=3$ ) \* $p < 0,05$ , στατιστικώς σημαντικά σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. TPF; Total polyphenolic Fraction,  $\gamma$ -GCLc; καταλυτική υπομονάδα  $\gamma$ -γλουταμυλοκουστεϊνικής λιγάσης.



> Επίπεδα καταλυτικής υπομονάδας της  $\gamma$ -GCLc στα EA.hy926

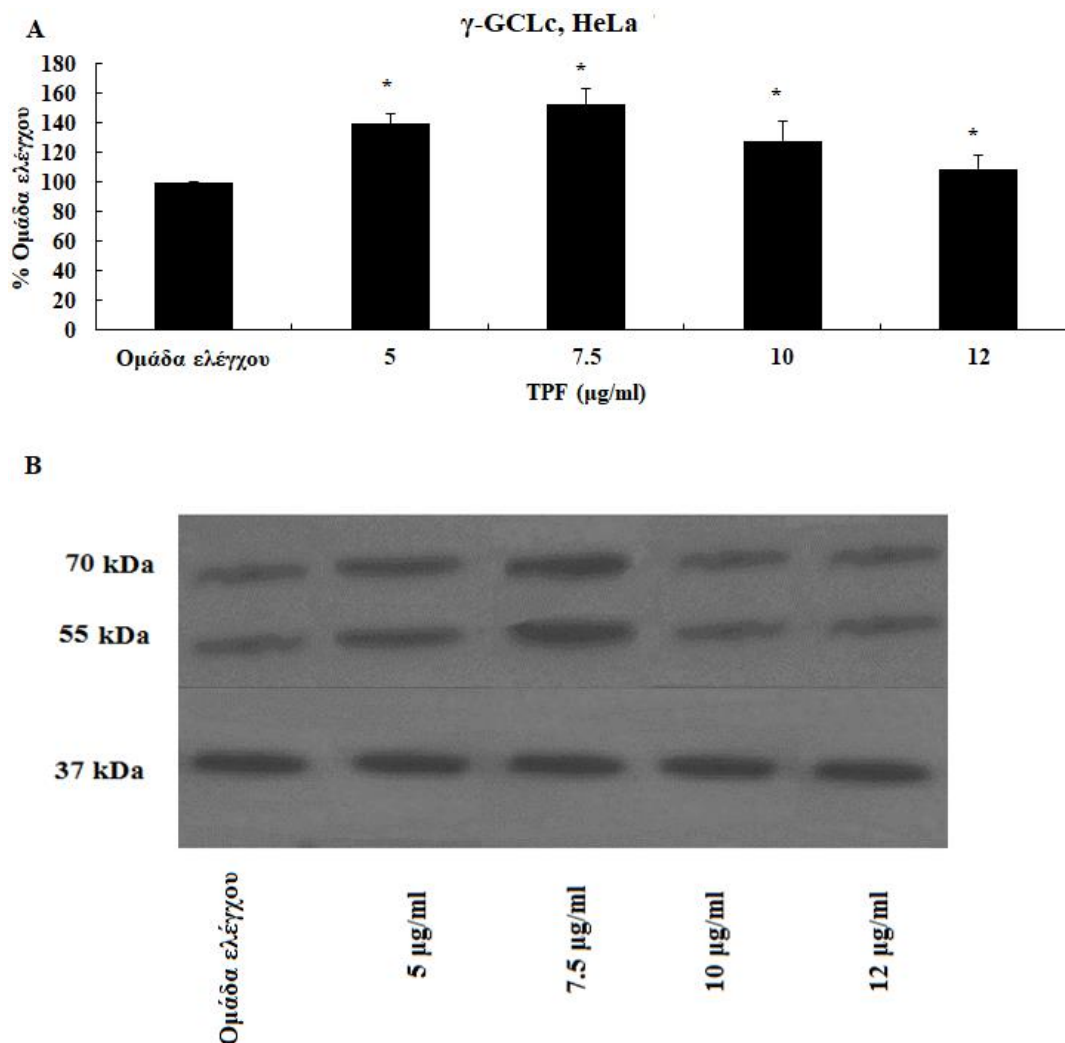
Έπειτα από 24 ώρες χορήγησης του TPF, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση ( $p < 0,05$ ) στα επίπεδα πρωτεΐνης της  $\gamma$ -GCLc κατά 11,7%, 21,3%, 59,3%, 41,3% σε σχέση με τα κύτταρα της ομάδας ελέγχου στις συγκεντρώσεις 2,5, 5, 7,5, 10  $\mu\text{g/ml}$  TPF, αντίστοιχα (Διάγραμμα 18).



**Διάγραμμα 18** Επίδραση TPF στα πρωτεϊνικά επίπεδα της  $\gamma$ -GCLc, στην κυτταρική σειρά EA.hy926, έπειτα από 24 ώρες επώασης. Η ανάλυση της πρωτεϊνικής έκφρασης της  $\gamma$ -GCLc πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Western blot. A) Αποτελέσματα της ανάλυσης Western blot εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς τα κύτταρα της ομάδας ελέγχου (χωρίς προσθήκη TPF). Η έκφραση του GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως μόριο κανονικοποίησης, B) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση των πρωτεϊνών  $\gamma$ -GCLc (70, 55 kDa) και GAPDH (37 kDa). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SEM ( $n=3$ ) \* $p < 0,05$ , στατιστικώς σημαντικά σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. TPF; Total polyphenolic Fraction,  $\gamma$ -GCLc; καταλυτική υπομονάδα  $\gamma$ -γλουταμυλοκουστεϊνικής λιγάσης.

> Επίπεδα  $\gamma$ -GCLc σε HeLa

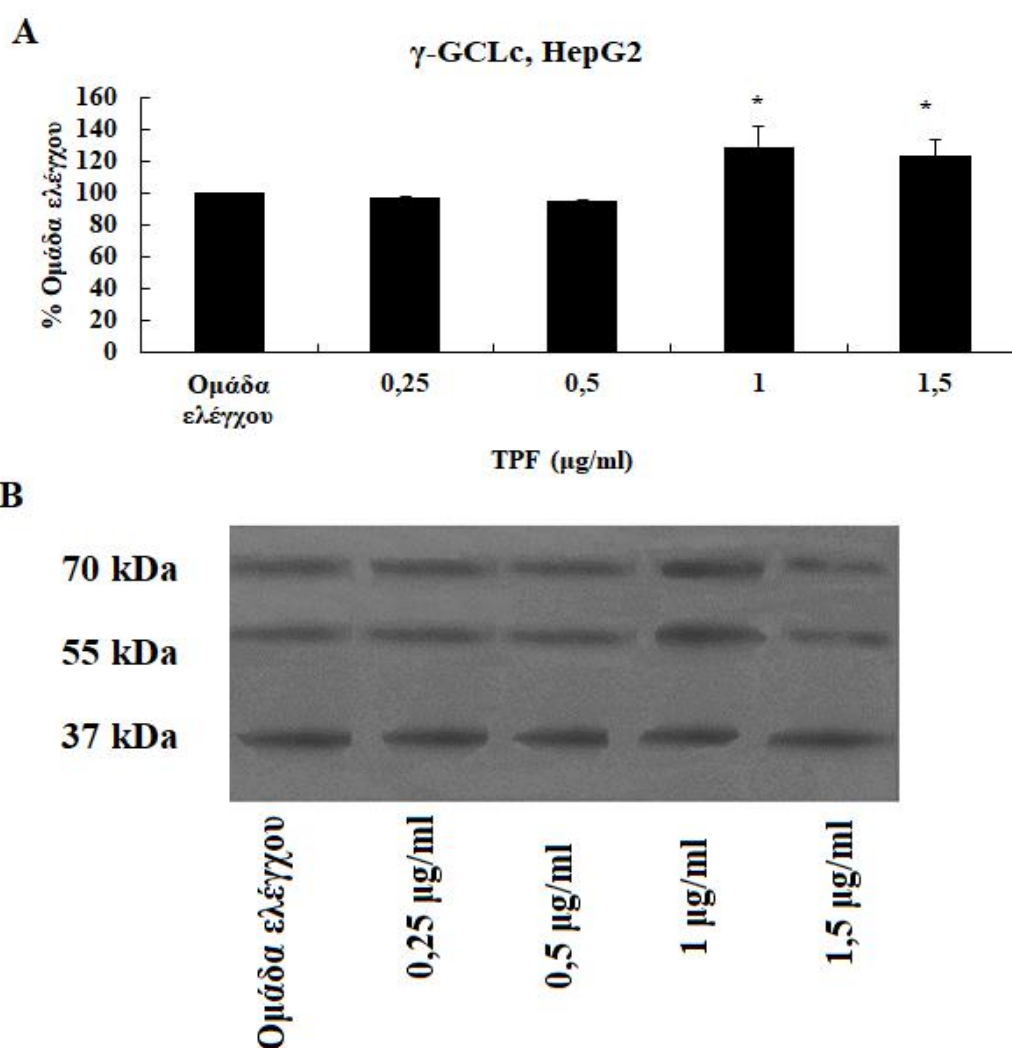
Έπειτα από 24 ώρες χορήγησης του TPF, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση ( $p < 0,05$ ) στα επίπεδα πρωτεΐνης της  $\gamma$ -GCLc κατά 39,8%, 53,2%, 28,3% και 9% σε σχέση με τα κύτταρα της ομάδας ελέγχου στις συγκεντρώσεις 5, 7,5, 10 και 12  $\mu\text{g/ml}$  TPF, αντίστοιχα (Διάγραμμα 19).



**Διάγραμμα 19** Επίδραση TPF στα πρωτεϊνικά επίπεδα της  $\gamma$ -GCLc, στην κυτταρική σειρά HeLa, έπειτα από 24 ώρες επώασης. Η ανάλυση της πρωτεϊνικής έκφρασης της  $\gamma$ -GCLc πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Western blot. A) Αποτελέσματα της ανάλυσης Western blot εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς τα κύτταρα της ομάδας ελέγχου (χωρίς προσθήκη TPF). Η έκφραση του GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως μόριο κανονικοποίησης, B) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση των πρωτεϊνών  $\gamma$ -GCLc (70, 55 kDa) και GAPDH (37 kDa). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SEM ( $n=3$ ) \* $p < 0,05$ , στατιστικώς σημαντικά σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. TPF; Total polyphenolic Fraction,  $\gamma$ -GCLc; καταλυτική υπομονάδα  $\gamma$ -γλουταμυλοκυστεϊνικής λιγάσης.

> Επίπεδα  $\gamma$ -GCLc σε HepG2

Έπειτα από 24 ώρες χορήγησης του TPF, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση ( $p < 0,05$ ) στα επίπεδα πρωτεΐνης της  $\gamma$ -GCLc κατά 29% και 8% σε σχέση με τα κύτταρα της ομάδας ελέγχου στις συγκεντρώσεις 1 και 1,5  $\mu\text{g/ml}$  TPF, αντίστοιχα (Διάγραμμα 20).



**Διάγραμμα 20** Επίδραση TPF στα πρωτεϊνικά επίπεδα της  $\gamma$ -GCLc, στην κυτταρική σειρά HepG2, έπειτα από 24 ώρες επώασης. Η ανάλυση της πρωτεϊνικής έκφρασης της  $\gamma$ -GCLc πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Western blot. A) Αποτελέσματα της ανάλυσης Western blot εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς τα κύτταρα της ομάδας ελέγχου (χωρίς προσθήκη TPF). Η έκφραση του GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως μόριο κανονικοποίησης, B) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση των πρωτεϊνών  $\gamma$ -GCLc (70, 55 kDa) και GAPDH (37 kDa). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SEM ( $n=3$ ) \* $p < 0,05$ , στατιστικώς σημαντικά σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. TPF; Total

**polyphenolic Fraction,  $\gamma$ -GCLc; καταλυτική υπομονάδα  $\gamma$ -γλουταμυλοκυστεϊνικής λιγάνσης.**

#### **4.5 Συζήτηση - Μέρος I** Αποτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας συνολικού πολυφαινολικού εκχυλίσματος ελαιολάδου ποικιλίας του Αγίου όρους (TPF)

Στην έρευνα σχετικά με τη διατροφή και την υγεία, επισημαίνεται πως το σύνθετο μείγμα διατροφικών πολυφαινολών, είναι αυτό το οποίο μπορεί να ασκήσει συνεργιστική δράση και να έχει θετικά αποτελέσματα για την υγεία (258). Έτσι, σκοπός της παρούσας ενότητας ήταν να εξετάσει τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες ενός ολικού φαινολικού κλάσματος (TPF) ελαιολάδου, από μια Ελληνική ενδημική ποικιλία *Olea europaea*, που φύεται στο Άγιον Όρος. Κατά το ξεκίνημα της διδακτορικής αυτής διατριβής τον Μάρτιο του 2016, μια έρευνα στις διεθνείς βιβλιογραφικές αναφορές αποκάλυψε πως δεν υπήρχαν διαθέσιμες μελέτες οι οποίες να διερευνούν τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες ενός σύνθετου μείγματος πολυφαινολών του ελαιολάδου. Το TPF αυτής της μελέτης είναι ένα σύνθετο μείγμα ενώσεων όπως η υδροξυτυροσόλη, η τυροσόλη, η ελαιοκανθάλη, η ολεασίνη μαζί με την ελευρωπαίνη και τα άγλυκα λιγκστροσίδια. Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες του εκτιμήθηκαν τόσο σε *in vitro* όσο και σε κυτταρικό επίπεδο, ιδιαίτερα στα κύτταρα EA.hy926, HeLa και HepG2 και σε μυοβλάστες C2C12. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν τονίζουν την ανάγκη για *in vivo* δοκιμές καθώς ενδέχεται να αποκαλύψουν ενδεχόμενες χρήσεις του TPF ως συμπλήρωμα διατροφής, το οποίο θα ενισχύει το αμυντικό σύστημα των οργανισμών έναντι στις επιβλαβείς επιδράσεις του οξειδωτικού στρες.

Μια προκαταρκτική ανάλυση της ερευνητικής ομάδας του καθηγητή Λεάνδρου Αλέξιου Σκαλτσούνη της Φαρμακευτικής σχολής Αθηνών ανάμεσα σε διάφορα εξαιρετικά παρθένα ελαιόλαδα έδειξε ότι το ελαιόλαδο που προέρχεται από την ποικιλία ελιάς που φύεται στο Άγιον Όρος είναι πλούσιο σε βιοφαινόλες. Το γεγονός αυτό σε συνδιασμό με το ότι η ποικιλία αυτή ήταν άγνωστη για τα μέχρι τότε δεδομένα αποτέλεσαν τον λόγο για το οποίον επιλέχθηκε το συγκεκριμένο ελαιόλαδο για την απομόνωση του εκχυλίσματος TPF.

Για τη διαδικασία εκχύλισης χρησιμοποιήθηκε μια μέθοδος βασισμένη στην εκχύλιση με φυγοκεντρική κατάτμηση (CPE), μία υγρή-υγρή χρωματογραφία εκχύλισης, με στόχο την απομόνωση πολλών φυσικών μεταβολιτών από φυτικά εκχυλίσματα, όπως οι πολυφαινόλες (261). Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου αυτής είναι κυρίως η ολική ανάκτηση του δείγματος, η υψηλή εκλεκτικότητα καθώς και η χαμηλή κατανάλωση διαλύτη. Αυτή η μέθοδος επιτρέπει τη χρήση μεγάλων όγκων ελαιολάδου και την ανάκτηση φαινολικών ενώσεων υψηλής προστιθέμενης αξίας (267).

Τα αποτελέσματα της ποιοτικής ανάλυσης (HPLC-DAD χρωματογραφία) αποκάλυψαν ότι το εκχύλισμα TPF περιείχε 19,4 mg/gr υδροξυτυροσόλης, 24,4 mg/gr τυροσόλης, 56,3 mg/gr ολεασίνης και 135,5 mg/gr ελαιοκανθάλης (268). Όπως υποδεικνύεται επίσης από την ποσοτική ανάλυση (Folin-Ciocalteu), το TPF περιέχει 484 μg βιοφαινόλες ανά mg εκχυλίσματος TPF. Σύμφωνα με μια συγκριτική μελέτη στην οποία εξετάστηκαν 221 εξαιρετικά παρθένα ελαιόλαδα από τέσσερις ποικιλίες ελιάς (Κορωνέικη, Τσουνατή, Αδραμιτίνη και Θρόμβολια), προερχόμενα από τέσσερα τμήματα της Ελλάδας (222), προέκυψε πως το εύρος των βιοφαινολών τους κυμαινόταν μεταξύ 30-351 mg / kg ελαιολάδου. Είναι ενδιαφέρον ότι, σύμφωνα με τον ισχυρισμό υγείας για τις πολυφαινόλες του ελαιολάδου που εγκρίθηκε από την Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA EE 432/2012), ελαιόλαδα τα οποία περιέχουν 5 mg υδροξυτυροσόλης και παραγώγων (π.χ. σύμπλεγμα ελαιοευρωπαϊνης και τυροσόλης) ανά 20 g ελαιολάδου, θεωρείται ότι προστατεύουν από την υπεροξειδωση των λιπιδίων που προκαλείται από το οξειδωτικό στρες στο αίμα. Με βάση την περιεκτικότητα του TPF σε βιοφαινόλες, το ελαιόλαδο στην παρούσα μελέτη περιέχει 4.15 mg HT και των παραγώγων του ανά 20 g.

Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις *in vitro* δοκιμές το TPF εμφάνισε ισχυρή αντιοξειδωτική και αναγωγική δράση εξουδετερώνοντας τόσο τις τεχνητές ρίζες (DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>•+</sup>) όσο και ρίζες που υπάρχουν φυσιολογικά στον οργανισμό (ρίζα σουπεροξειδίου). Ενώ εμφάνισε αντιγενετοξικές και αντιμεταλλαξιγόνες ιδιότητες, προστατεύοντας το πλασμιδιακό και βακτηριακό DNA από μεταλλαξιγόνες επιδράσεις. Όσον αφορά τις δύο μεθόδους DPPH<sup>•</sup> και ABTS<sup>•+</sup> (αντιοξειδωτική δράση) από την στατιστική ανάλυση προέκυψε πως είχαν ισχυρή θετική συσχέτιση μεταξύ τους (Βλέπε 4.4.1.8 Στατιστική συσχέτιση *in vitro* δοκιμών), γεγονός που φανερώνει πως παρά την αλλιώτικη δομή τους και οι δυο ρίζες εξουδετερώνονται από τα μόρια του TPF. Να τονιστεί επίσης πως κατά τις πειραματικές διαδικασίες, το TPF αντιδρά

στην μια τεχνική με 100  $\mu\text{M}$  DPPH $\cdot$ , ενώ στην άλλη με 1mM ABTS $^{*+}$ , το γεγονός αυτό σε συνδιασμό με το ότι το IC50 για το ABTS $^{*+}$  εμφάνισε 4 φορές μικρότερη τιμή, συνεπώς και μεγαλύτερη δραστηριότητα, υποδηλώνει πως τα αντιοξειδωτικά μόρια του TPF αλληλεπιδρούν και εξουδετερώνουν με μεγαλύτερη ευκολία τη ρίζα ABTS $^{*+}$ . Η διαφορά αυτή έγκειται στο γεγονός πως η μέθοδος ABTS $^{*+}$  ανιχνεύει τόσο υδρόφιλα όσο και λιπόφιλα μόρια ενώ η μέθοδος DPPH $\cdot$  μόνο υδρόφιλα. Επίσης, πιθανό να συμβάλλει ο διαλύτης της εκάστοτε μεθόδου καθώς στη μέθοδο DPPH $\cdot$  χρησιμοποιείται μεθανόλη ενώ στην ABTS $^{*+}$  νερό. Επιπλέον, οι δύο ρίζες έχουν διαφορετικό μοριακό μέγεθος, άρα και διαφορετική αλληλεπίδραση με τα διάφορα συστατικά, διαφορετική κινητική αντίδρασης καθώς και διαφορετικό τρόπο σχηματισμού της ρίζας. Η ρίζα DPPH $\cdot$  είναι μια σταθερή ρίζα ενώ η ρίζα του ABTS $^{*+}$  πρέπει πρώτα να σχηματιστεί και μετά να σταθεροποιηθεί (225). Οι χρησιμοποιούμενες ρίζες δεν βρίσκονται φυσιολογικά στους οργανισμούς και μπορούν να εξουδετερωθούν μέσω δύο μηχανισμών, της μεταφοράς ενός ατόμου υδρογόνου (Hydrogen Atom Transfer, HAT) ή της μεταφοράς ενός ηλεκτρονίου (Single Electron Transfer, SET). Ωστόσο, προσφέρουν ένα γρήγορο, εύκολο και απλό τρόπο αξιολόγησης της αντιοξειδωτικής δυνατότητας των εκχυλισμάτων.

Θετική συσχέτιση με τις δύο προηγούμενες τεχνικές είχε επίσης και η τεχνική που ανιχνεύει την αναγωγική ισχύ του TPF, με την οποία γίνεται επίσης εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας ενός εκχυλίσματος, με βάση την ικανότητά του να ανάγει το σίδηρο. Η πειραματική αυτή διαδικασία μπορεί να μην μελετά την άμεση εξουδετέρωση μίας ρίζας, σχετίζεται ωστόσο με την αναγωγική δράση καθώς υποδηλώνει την ικανότητα των ενώσεων ενός εκχυλίσματος να ενεργήσουν ως ηλεκτρονιοδότες. Συνεπώς, εκχυλίσματα με ισχυρή αναγωγική ισχύ μπορούν να ελαττώσουν τα οξειδωμένα παράγωγα που προκύπτουν κατά τη διαδικασία υπεροξείδωσης των λιπιδίων, ενεργώντας έτσι είτε ως πρωτογενή είτε ως δευτερογενή αντιοξειδωτικά (221,269).

Εν συνεχεία, το TPF εξετάστηκε ως προς την ικανότητά του να προστατεύει το πλασμιδιακό DNA από μονόκλωνες ρήξεις που επάγονται από το AAPH. Η ικανότητα ενός εκχυλίσματος να προστατεύει το DNA μπορεί να χαρακτηριστεί και ως αντιγενετοξική, καθώς οι μονόκλωνες ρήξεις είναι καθοριστικές για την πρόκληση μεταλλάξεων (270). Πληθώρα μελετών τονίζει την ικανότητα φυτικών εκχυλισμάτων να δρουν DNA-προστατευτικά, παρεμποδίζοντας την προκαλούμενη από ρίζες

αλλοίωση της αλληλουχίας του DNA (268,271–273). Το γεγονός αυτό μπορεί να προκληθεί από την αλληλεπίδραση μίας ρίζας με τους άνθρακες 3', 4' ή 5' της σακχαρικής ομάδας μίας αζωτούχας βάσης του DNA είναι κατ' εξοχήν υπεύθυνη για την πρόκληση ρήξεων (274). Ακολούθως, είναι πιθανό η προστατευτική δράση του TPF να βασίζεται στην παρεμπόδιση αυτής της αλληλεπίδρασης. Επιπλέον, οι ρίζες ROO• (όμοια δομικά με το AAPH) είναι κατά βάση υπαίτιες για την οξείδωση των λιπιδίων. Συνεπώς, εκχυλίσματα που τις εξουδετερώνουν εκτιμάται πως εμφανίζουν και προστατευτική δράση έναντι της λιπιδικής υπεροξείδωσης (275). Τέλος, από την στατιστική ανάλυση προέκυψε θετική συσχέτιση μεταξύ του πολυφαινολικού περιεχομένου και της DNA-προστατευτικής δράσης του TPF. Συμπερασματικά, είναι εμφανές ότι η ποσότητα πολυφαινολών είναι καίρια για την αντιγενοτοξική ικανότητα ενός εκχυλίσματος, ωστόσο αξιόλογο ρόλο εμφανίζουν και άλλοι παράγοντες, όπως η ποιοτική σύσταση που μπορεί να διαφέρει από ποικιλία σε ποικιλία.

Επιπρόσθετα, εξετάστηκε η αντιμεταλλαξιγόνος δράση του TPF σε βακτηριακά στελέχη *Salmonella typhimurium* απέναντι στο μεταλλαξιγόνο παράγοντα *t*-BOOH, μέσω της δοκιμασίας του Ames. Πιο αναλυτικά, το *t*-BOOH λόγω του μηχανισμού δράσης του (βλέπε Εικόνα 47) μετατρέπεται σε ρίζα κι έτσι τα μόρια του TPF και θα μπορούσαν να δράσουν αντιοξειδωτικά, καταπολεμώντας τις ρίζες και προστατεύοντας έτσι το DNA από οξειδωτική βλάβη και μεταλλαξιγένεση.

Συνολικά, το TPF παρουσίασε ισχυρή αντιοξειδωτική δράση έναντι πληθώρας οξειδωτικών μορίων, ενώ υπήρξε θετική συσχέτιση και μεταξύ κάποιων δοκιμασιών, υποδηλώνοντας πως αναλόγως το οξειδωτικό ανάλογο, εμφανίζεται και διαφορετική ικανότητα αλληλεπίδρασης και εξουδετέρωσής του από τις πολυφαινολικές ενώσεις. Τα αποτελέσματα αυτά φανερώνουν τη σπουδαιότητα του να εκτιμούνται συνδυαστικά εύρος βιοδεικτών για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής/προστατευτικής ικανότητας διαφόρων ενώσεων.

Εν συνεχεία, έγινε εκτίμηση της επίδρασης του TPF στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό τεσσάρων διαφορετικών κυτταρικών σειρών σε μυοβλάστες C2C12, ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926, καρκινικά κύτταρα τραχήλου της μήτρας HeLa και ηπατικά HepG2. Πριν από την εκτίμηση του TPF στους δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης, είναι απαραίτητο να γίνει έλεγχος ότι οι συγκεντρώσεις που θα χρησιμοποιηθούν δεν παρουσιάζουν κυτταροτοξικές επιδράσεις στις κυτταροκαλλιέργειες. Έτσι,

προκειμένου να χορηγηθούν μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις, η κυτταροτοξικότητα του TPF εκτιμήθηκε με τη δοκιμασία ΧΤΤ. Τα αποτελέσματα από τη δοκιμασία ΧΤΤ αποκάλυψαν ότι το TPF επέδειξε κυτταροτοξικότητα σε συγκεντρώσεις πάνω από 25,0  $\mu\text{g/ml}$  στα C2C12, EA.hy926 και HeLa (Διάγραμμα 8) και μέχρι 2,0  $\mu\text{g/ml}$  σε κύτταρα HepG2 (Διάγραμμα 8). Ως εκ τούτου, μπορούμε να υποθέσουμε ότι το εκχύλισμα TPF παρουσιάζει ιστοεξειδίκευση. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα HepG2 είναι πιο ευαίσθητα από τις υπόλοιπες τρεις κυτταρικές σειρές, καθώς η κυτταροτοξικότητα στο HepG2 εμφανίστηκε σε πολύ χαμηλότερη συγκέντρωση TPF. Οι διαφορές που προέκυψαν ανάμεσα στις παραπάνω σειρές πιθανώς οφείλονται στη διαφορετική απορρόφηση και μεταβολισμό των ξеноβιοτικών μορίων καθώς και σε διαφορετικούς μεμβρανικούς υποδοχείς (276).

Σχετικά με τη μέθοδο ΧΤΤ, αν και αποτελεί το πρώτο τυπικό βήμα για τη διερεύνηση της υποτιθέμενης κυτταροτοξικότητας μιας ένωσης, απαιτεί ταυτόχρονα ιδιαίτερη προσοχή στην ανίχνευση της δράσης των πολυφαινολών στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Πράγματι, υπάρχουν πειραματικά στοιχεία που αποδεικνύουν ότι οι πολυφαινολικές ενώσεις που υπάρχουν στα φυτικά εκχυλίσματα μπορούν να ανάγουν το άλας ΧΤΤ οδηγώντας έτσι σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα όσον αφορά την κυτταροτοξικότητα. Επιπρόσθετα, μπορεί να μεταβάλλουν τη λειτουργία των μιτοχονδρίων χωρίς απώλεια βιωσιμότητας, γεγονός που θα οδηγούσε επίσης σε ψευδώς θετικά και αρνητικά αποτελέσματα (277,278). Ωστόσο, αυτά τα πιθανά προβλήματα μπορούν να ξεπεραστούν εν μέρει εφαρμόζοντας ένα στάδιο έκπλυσης με μέσο κυτταρικής καλλιέργειας πριν από την επεξεργασία των κυττάρων με το εν λόγω φυτικό εκχύλισμα, όπως έχει ήδη δείχθει (279). Είναι επίσης ενδιαφέρον ότι έχει αναφερθεί ότι η κυτταρική βιωσιμότητα μετράται με ακρίβεια με ΧΤΤ σε συγκεντρώσεις 40  $\mu\text{M}$  (-) επιγαλλοκατεχίνης-3-γαλλικού εστέρα, η οποία είναι μια κοινή πολυφαινόλη σε διάφορα είδη φυτικών εκχυλισμάτων (277). Με βάση τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης το εκχύλισμα TPF δεν είναι κυτταροτοξικό σε συγκέντρωση μεταξύ 0,5 και 20  $\mu\text{g/ml}$  που με βάση τη σύνθεσή του μεταφράζεται σε 0,6 - 25  $\mu\text{M}$  (234,262). Ως εκ τούτου, το ΧΤΤ είναι ένας αξιόπιστος δείκτης κυτταροτοξικότητας για φυτικά εκχυλίσματα μέχρι την πολυφαινολική συγκέντρωση των 40  $\mu\text{M}$ . Αν αυτό το όριο ξεπεραστεί, τότε θα πρέπει να υιοθετηθεί ως διορθωτική τεχνική η μέτρηση με την τεχνική trypan blue (221). Το ίδιο μοτίβο ισχύει και για τα υπόλοιπα εκχυλίσματα που θα αναλυθούν στη συνέχεια της παρούσας διατριβής.



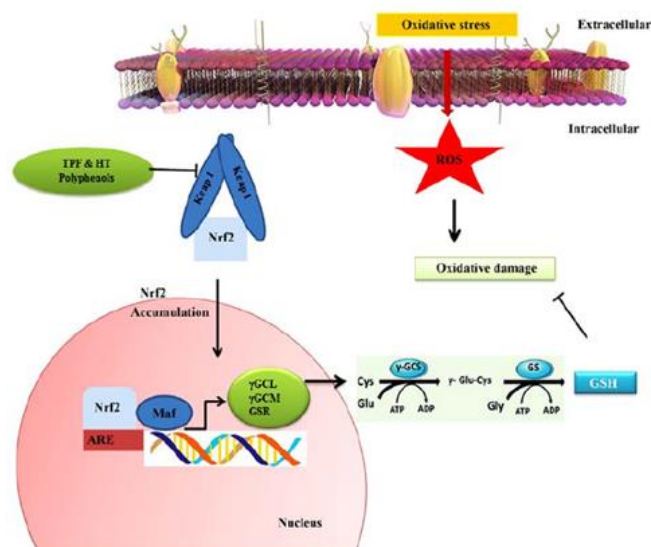
Έπειτα, οι μη-κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις χορηγήθηκαν στις κυτταρικές σειρές, για να μελετηθούν οι επιδράσεις τους στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό των κυττάρων. Αρχικά, μελετήθηκαν τα επίπεδα GSH και ROS χρησιμοποιώντας κυτταρομετρία ροής. Τα αποτελέσματα από την ανάλυση κυτταρομετρίας ροής, αποκάλυψαν ότι η χορήγηση TPF σε όλες τις κυτταρικές σειρές αύξησε σημαντικά τα επίπεδα GSH, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Ωστόσο, στην μεγαλύτερη μη κυτταροτοξική συγκέντρωση τα επίπεδα της GSH παρουσίασαν σημαντική μείωση συγκριτικά με τα κύτταρα της ομάδας ελέγχου (Διάγραμμα 9). Αυτή η παρατηρούμενη μείωση μπορεί να εξηγηθεί από μια πιθανή προ-οξειδωτική δράση των πολυφαινολών μετά την επίτευξη μιας «κρίσιμης» συγκέντρωσης (114,280–283). Οι πολυφαινόλες του ελαιολάδου ελευρωπαίνη και HT έχουν αναφερθεί ότι ασκούν προ-οξειδωτικές επιδράσεις, εξαιτίας των δραστηριοτήτων τους να ανάγουν το σίδηρο και το χαλκό. Αυτά τα ανηγμένα μέταλλα, με τη σειρά τους, μπορούν να καταλύσουν την παραγωγή  $\text{OH}\cdot$  μέσω αντίδρασης Fenton. Συμπληρωματικές μελέτες αποκάλυψαν ότι φυσικά αντιοξειδωτικά έπειτα από τη χορήγηση τους σε κύτταρα HepG2, προκάλεσαν τόσο αύξηση (242) όσο και μείωση (284) της GSH. Η αύξηση της GSH, μπορεί να ερμηνευτεί καθώς τα φυτικά συστατικά ρυθμίζουν τη σύνθεση της GSH, ενώ η μείωση από την έντονη σύζευξη των ενώσεων αυτών σε ομάδες θειόλης ανηγμένης GSH. Η προ-οξειδωτική δράση των πολυφαινολών, βάσει της οποίας παράγονται  $\text{H}_2\text{O}_2$  και DNA-αντιδρώσες ρίζες ημικινόνης, μπορεί να είναι λειτουργική ως αντικαρκινική θεραπεία. Ωστόσο, είναι σημαντικό να διαπιστωθεί η μέγιστη ασφαλής δόση των πολυφαινολών που μπορούν να χορηγηθούν (285). Συνεπώς, η ικανότητα των διαιτητικών πολυφαινολών να δρουν ως αντιοξειδωτικά / προ-οξειδωτικά στα *in vitro* και *in vivo* συστήματα εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως η συγκέντρωση και η δομή τους, το εκάστοτε βιολογικό σύστημα και το μέγεθος του οξειδωτικού στρες (286).

Η αύξηση της GSH ίσως οφείλεται στην υπερ-λειτουργία της GCL ή στην υπερλειτουργία της συνθετάσης της γλουταθειόνης και αυτό εξηγείται από την αύξηση των επιπέδων της GCL που βρέθηκε και αναλύεται παρακάτω (287). Η GCL είναι ένα ετεροδιμερές που αποτελείται από την καταλυτική υπομονάδα (GCLc) και ρυθμιστική υπομονάδα (GCLm), επίσης γονίδια στόχου του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2. Η GCL έχει τη δυνατότητα να ρυθμίζει τη σύνθεση της GSH (287). Αρκετές μελέτες δείχνουν ότι οι διαιτητικές πολυφαινόλες μπορούν να ρυθμίσουν την έκφραση

αντιοξειδωτικών γονιδίων καθώς και γονιδίων αποτοξικοποίησης, μέσω μονοπατιών που ρυθμίζουν την ενεργοποίηση των αντιοξειδωτικών στοιχείων που αναταπορύνονται στο στρες (Antioxidant Response Elements; ARE), όπως του μονοαπατιού Keap1-Nrf2 (288). Η πρωτεΐνη Keap1 (Kelch-like ECH associated protein 1) λειτουργεί ως «αισθητήρας στρες», καθώς η δομή της είναι πλούσια σε κατάλοιπα κυστεϊνών (Cys). Οι Cys περιέχουν θειόλες (-SH) οι οποίες αντιδρούν με ηλεκτρονιόφιλα μόρια. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, ο Nrf2 ουβικιτινιλιώνεται από το σύμπλοκο Keap1-Cullin3 ubiquitin E3 λιγάση στο κυτταρόπλασμα και οδηγείται στο πρωτεάσωμα 26S προς αποικοδόμηση. Όταν το κυτταρικό περιβάλλον γίνει πιο οξειδωτικό (εκτεθεί σε οξειδωτικό στρες ή ξενοβιοτικά), τότε οι Cys του Keap1 οξειδώνονται, με συνέπεια να αλλάξει η δαμόρφωση της πρωτεΐνης. Η αποικοδόμηση του Nrf2 σταματά, ο Nrf2 σταθεροποιείται και οδηγείται στον πυρήνα, όπου σχηματίζει διμερή με μικρές Maf πρωτεΐνες. Μέσα στον πυρήνα, τα διμερή Nrf2-sMaf αναγνωρίζουν αλληλουχίες DNA γνωστές ως ARE ή EpRE (electrophile response element), επάγοντας την έκφραση γονιδίων-στόχων, 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) (289). Πολλά χημικά που δρουν ως ενεργοποιητές του Nrf2 αντιδρούν με αυτά τα κατάλοιπα Cys (289). Επίσης και οι πολυφαινόλες μπορούν να αντιδράσουν με σουλφυδρυλικές ομάδες (290), που σχετίζονται στενά με την επαγωγή των ενζύμων και την αύξηση της GSH, τροποποιώντας έτσι έναν αριθμό πρωτεϊνών αισθητήρων, όπως το Keap1 (291). Επιπλέον, υπάρχουν και άλλοι τρόποι ρύθμισης του Nrf2 όπως για παράδειγμα η ουβικιτινιύωση έπειτα από φωσφορυλίωση από την GSK-3 (Glycogen synthase kinase 3) που οδηγεί σε αναγνώριση από την β-TrCP (beta-transducin repeats containing proteins) (που με τη σειρά της ενώνεται σε μια E3 λιγάση ουβικιτίνης) (292). Πρέπει να αναφερθεί ότι οι πολυφαινόλες μπορούν να επηρεάσουν την ARE-εξαρτώμενη γονιδιακή έκφραση, επίσης μέσω της ενεργοποίησης των πρωτεϊνών MAPK (ERK, JNK και p38), πιθανώς λόγω της φωσφορυλίωσης και σταθεροποίησης του Nrf2 (293). Ο Manzanares και οι συνεργάτες του (294), έδειξαν ότι μετά από μια διατροφή πλούσια σε εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο υπήρξε ενεργοποίηση του Nrf2, στο ήπαρ και τον μαστικό αδένα αρουραίων. Επιπλέον, οι βιοφαινόλες του ελαιολάδου προερχόμενες από τα λύματα ελαιουργείου, αυξάνουν τα επίπεδα της GSH τόσο στο ανθρώπινο αίμα (287), όσο και σε αίμα και ιστούς κοτόπουλων και προβάτων κρεοπαραγωγής (295,296). Ο Conas και οι συνεργάτες του, έδειξαν ότι ένα εξαιρετικά

παρθένο ελαιόλαδο πλούσιο σε βιοφαινόλες (366 mg/kg) τροποποίησε ευεργετικά την ισορροπία μεταξύ ανηγμένης (GSH) και οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG), με τις βιοφαινόλες του ελαιολάδου να ασκούν τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες ως μέρος της επαγωγής του Nrf2 (297) (Εικόνα 56).

Η GSH προστατεύει τα κύτταρα από το οξειδωτικό στρες, ως ένα βασικό αντιοξειδωτικό μόριο. Ωστόσο, η υπερβολική χρήση της GSH, μπορεί να οδηγήσει στην εξάντληση των αποθεμάτων της εντός των κυττάρων. Έτσι, η διατήρηση μιας επαρκούς ποσότητας GSH μπορεί να οφείλεται στην διέγερση της *de novo* σύνθεσης της GSH, όπου εκτελείται από το ένζυμο συνθετάση γ-γλουταμυλ κυστεΐνης (γ-GCS) που καταλύει το πρώτο στάδιο της σύνθεσής της (298). Σε πολλές μελέτες, έχει επισημανθεί ότι πολλές ουσίες, μπορούν να ρυθμίσουν την έκφραση της γ-GCS, πιθανώς μέσω του Nrf2 και του c-Jun (299). Επίσης, ερευνητικά δεδομένα έχουν αναφέρει τις επιδράσεις διαφόρων κατηγοριών πολυφαινολών επί της δραστηριότητας της γ-GCS σε κυτταρικές καλλιέργειες. Η χορήγηση διάφορων φυτικών ενώσεων σε HepG2 επάγει τη δραστηριότητα της γ-GCS, με τη συνακόλουθη αύξηση των επιπέδων GSH (298). Για παράδειγμα, η χορήγηση HT μπορεί να αυξήσει τα επίπεδα της GSH κατά περίπου 50%, μέσω ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2, ο οποίος με τη σειρά του επάγει την έκφραση των γονιδίων στόχων, όπως GCLC και GCLM, που συμμετέχουν τη σύνθεση της GSH (300). Στην παρούσα μελέτη τα επίπεδα γ-GCLC, όπως αυτά ποσοτικοποιήθηκαν με Western blot (Διάγραμμα 17, Διάγραμμα 18, Διάγραμμα 19, Διάγραμμα 20), αυξήθηκαν σημαντικά σε όλες τις συγκεντρώσεις TPF, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, σε όλες τις κυτταρικές σειρές, αύξηση η οποία συμβαδίζει με τα επίπεδα της GSH, όπως αυτά προσδιορίστηκαν φωτομετρικά (Διάγραμμα 9).



**Εικόνα 56** Πιθανός μηχανισμός δράσης των πολυφαινολών του TPF, μέσω μονοπατιού Keap1-Nrf2. Πηγή: (268).

Σε αντίθεση με την GSH, τα επίπεδα ROS δεν επηρεάστηκαν σημαντικά σε όλες τις κυτταρικές σειρές (Διάγραμμα 10). Θα πρέπει να αναφερθεί ότι τα μετρούμενα επίπεδα ROS αντιστοιχούν στα φυσικώς απαντώμενα επίπεδα σε αυτά τα κύτταρα, καθώς δεν υπήρξε καμία επεξεργασία των κυττάρων με οξειδωτικούς παράγοντες πριν από την προσθήκη του TPF. Προηγούμενες μελέτες έχουν επίσης αναφέρει ότι οι μεταβολές των επιπέδων οξειδωτικού στρες ή των αντιοξειδωτικών μηχανισμών δεν συνοδεύονται πάντα από αλλαγές στα επίπεδα ROS (236,280,301). Ωστόσο, στην κυτταρική σειρά HepG2, τα επίπεδα ROS μειώθηκαν, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Τα μειωμένα επίπεδα ROS συμφωνούν με τα αυξημένα επίπεδα GSH κατά 17% στη συγκέντρωση 1 μg/ml TPF, οπότε πιθανόν η GSH εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες, υποδεικνύοντας αύξηση της κυτταρικής άμυνας και κατά συνέπεια μείωση των επιπέδων ROS. Πρόσθετες μελέτες επιβεβαιώνουν την παρατηρούμενη μείωση των επιπέδων ROS και αποδεικνύουν ότι αυτό οφείλεται στην κύρια πολυφαινόλη του ελαιολάδου, την HT (302). Πρόσφατα αποδείχθηκε ότι τα συστατικά του ελαιολάδου προστατεύουν τα κύτταρα του ήπατος από την παραγωγή ROS (303).

Ένας ακόμα δείκτης οξειδοαναγωγικής κατάστασης που μελετήθηκε ο δείκτης λιπιδικής υπεροξειδωσίας (TBARS). Η χορήγηση TPF στις διάφορες κυτταρικές σειρές μείωσε την οξείδωση των λιπιδίων σε σύγκριση με τα κύτταρα της ομάδας ελέγχου. Ωστόσο, στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις παρατηρήθηκε και εδώ το προοξειδωτικό φαινόμενο καθώς τα επίπεδα των TBARS αυξήθηκαν (Διάγραμμα 11). Η μείωση των

επιπέδων των TBARS σημαίνει μείωση της λιπιδιακής υπεροξειδωσης και ίσως οφείλεται στη μεγάλη αύξηση της GSH και των αντιοξειδωτικών μηχανισμών της (236). Κάποια ερευνητικά δεδομένα έχουν καταδείξει ότι μερικές από τις κυριότερες πολυφαινόλες που υπήρχαν στα απόβλητα των ελαιοτριβείων (π.χ. υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη και καφεϊκό οξύ) είναι αποτελεσματικές στο να διακόψουν την υπεροξειδωση των λιπιδίων (304). Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι αρχικά, ο αντιοξειδωτικός μηχανισμός ενεργοποιήθηκε και η υπεροξειδωση λιπιδίων μειώθηκε, ενώ στην υψηλότερη συγκέντρωση του TPF προέκυψε ένα προ-οξειδωτικό φαινόμενο, με αποτέλεσμα τα επίπεδα των TBARS να αυξηθούν. Επιπροσθέτως, τα αποτελέσματα επιβεβαιώνονται από τη σταδιακή μείωση των επιπέδων GSH, καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του TPF.

Η χορήγηση του TPF μείωσε στατιστικά τα πρωτεϊνικά καρβονύλια (PC), δείκτη οξείδωσης των πρωτεϊνών, σε όλες τις κυταρικές σειρές, συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (Διάγραμμα 12). Ωστόσο, και σε αυτόν τον δείκτη παρατηρήθηκε αύξηση στα επίπεδα PC, καθώς αυξήθηκε η συγκέντρωση του TPF. Φαίνεται ότι τα προστατευτικά αποτελέσματα του TPF μπορούν να αποδοθούν στη σημαντική αύξηση στα αντίστοιχα επίπεδα της GSH (Διάγραμμα 9). Σε άλλες μελέτες, φάνηκε πως η χορήγηση ενός πολυφαινολικού εκχυλίσματος στεμφύλων, μείωσε σημαντικά τα επίπεδα των PC σε σύγκριση με το μάρτυρα, σε EA.hy926 κύτταρα, υποδεικνύοντας έτσι μείωση στην οξείδωση των πρωτεϊνών (236), καθώς και στους ιστούς προβάτων (295). Πρόσθετες μελέτες στις οποίες έγινε χορήγηση ζωοτροφών εμπλουτισμένων με πολυφαινόλες από υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων, έδειξαν μείωση των επιπέδων PC τόσο στο πλάσμα όσο και σε ιστούς χοιριδίων (305), κοτόπουλων (306), και προβάτων κρεατοπαραγωγής (296), υποδεικνύοντας ότι οι αντιοξειδωτικές ενώσεις θα μπορούσαν να παρεμποδίσουν την οξείδωση τους. Σύμφωνα με τους Kim και συνεργάτες (307), τα παραπροϊόντα της υπεροξειδωσης των λιπιδίων μπορούν να οδηγούν στην οξείδωση των πρωτεϊνών. Κατά συνέπεια, τα μειωμένα επίπεδα PC μπορεί να οφείλονται στα παρατηρούμενα μειωμένα επίπεδα των TBARS. Ωστόσο, στην υψηλότερη συγκέντρωση TPF, παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων PC σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, κυρίως στα κύτταρα HeLa και C2C12, παρατηρώντας και σε αυτήν την περίπτωση ένα προ-οξειδωτικό αποτέλεσμα όπου καθώς η συγκέντρωση του TPF αυξάνεται, προκαλείται αύξηση της οξείδωσης των πρωτεϊνών. Αυτά τα αποτελέσματα ακολουθούν το ίδιο μοτίβο με τα επίπεδα των TBARS που αναφέρθηκαν παραπάνω.

Αν και τα επίπεδα GSH είναι συνεχώς αυξημένα (σε σχέση με την ομάδα ελέγχου), στην υψηλότερη συγκέντρωση TPF, υπάρχει μια μείωση στην κυτταρική άμυνα, η οποία επιβεβαιώνεται από την αύξηση της υπεροξειδωσής των λιπιδίων και την οξειδωση των πρωτεϊνών. Πρόσθετες μελέτες έχουν δείξει ότι οι φαινολικές ενώσεις ελαιολάδου μπορούν να δράσουν όχι μόνο ως αντιοξειδωτικά αλλά και ως προ-οξειδωτικά, παράγοντας ROS. Για παράδειγμα, υψηλές δόσεις ελεουρωπαίνης βρέθηκε να παρουσιάζουν κυτταροτοξική δράση σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη, μέσω οξειδωτικού στρες (308).

Για να γίνει μια πρώτη εκτίμηση του μοριακού μηχανισμού δράσης του TPF επιλέχθηκαν 10 γονίδια που κατέχουν σημαντικό ρόλο στην αντιοξειδωτική άμυνα (και αποτελούν και στόχους του Nrf2). Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούν τα συγκεκριμένα γονίδια συνθέτουν ένα δίκτυο αντιοξειδωτικών μηχανισμών, συνεπώς οποιαδήποτε αλλαγή στα επίπεδα έκφρασής τους είναι αξιόλογος δείκτης για τη ικανότητα ενός εκχυλίσματος να επιδράσει σε αυτούς τους μηχανισμούς και συνεπώς την αντιοξειδωτική άμυνα σε κυτταρικό επίπεδο και κατ'επέκταση σε έναν οργανισμό. Για τον σκοπό αυτό, τα παραγόμενα cDNAs κάθε δείγματος μελετήθηκαν με qPCR με σκοπό την ποσοτικοποίηση της έκφρασης γονιδίων. Οι συγκεντρώσεις TPF που επιλέχθηκαν, ήταν διαφορετικές για κάθε κυτταρική σειρά. Συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν εκείνες στις οποίες παρατηρήθηκε η μέγιστη αύξηση της GSH, μείωση λιπιδικής υπεροξειδωσής (TBARS), πρωτεϊνικής υπεροξειδωσής (PC) και δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), καθώς και αύξηση γGCLc. Συνεπώς, στις κυτταρικές σειρές EA.hy926 (Διάγραμμα 14) και C2C12 (Διάγραμμα 13) χορηγήθηκε 7,5 μg/ml TPF. Για τα HeLa 10 μg/ml TPF (Διάγραμμα 15) και στα HepG2 1μg/ml TPF (Διάγραμμα 16). Η χορήγηση έγινε σε τρεις διαφορετικές χρονικές στιγμές (3 h, 12 h, 24 h) ώστε να παρατηρηθεί η επίδραση στη γονιδιακή έκφραση με το πέρας του χρόνου. Να τονιστεί πως όλοι οι προηγούμενοι δείκτες αφορούσαν την χορήγηση TPF για 24 h.

Με βάση τα αποτελέσματα της γονιδιακής έκφρασης στα C2C12 (Διάγραμμα 13) το TPF προκάλεσε αύξηση της έκφρασης των γονιδίων που εμπλέκονται με το μεταβολισμό της GSH (*gcl*, *gsr*, *gsta2*) στις περισσότερες χρονικές στιγμές που εξετάστηκαν, με μεγαλύτερη έκφραση στις 12h, με μόνη εξαίρεση το γονίδιο της *gpx1* στο οποίο παρατηρήθηκε μείωση. Η επαγωγή των παραπάνω γονιδίων μπορεί να αιτιολογήσει και την παρατηρούμενη αύξηση της GSH, κατά κύριο λόγο μέσω του αυξημένου βιοσυνθετικού ρυθμού (λόγω υπερέκφρασης του *gclc*). Τα γονίδια *nqo1*,

*sod1*, *nrf2* και *cat* επίσης υπερεκφράστηκαν σημαντικά σε σχέση με τα κύτταρα της ομάδας ελέγχου, ενώ αντίθετα μειωμένη έκφραση παρατηρήθηκε για τα γονίδια που κωδικοποιούν για *txn*, *hmox1* και *pon1*.

Εν συνεχεία, όσον αφορά τα EA.hy926 (Διάγραμμα 14) το TPF προκάλεσε και σε αυτήν την περίπτωση αύξηση στην έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με το μεταβολισμό της GSH (*gcl*, *gsr*) στην πλειονότητα των χρονικών στιγμών που εξετάστηκαν, με μεγαλύτερη έκφραση και εδώ στις 12h, με μοναδική εξαίρεση το γονίδιο της *gpx1* η έκφραση του οποίου δεν επηράστηκε. Τα γονίδια *nqo1*, *hmox1*, *nrf2* επίσης υπερεκφράστηκαν σημαντικά σε σχέση με τα κύτταρα της ομάδας ελέγχου, κυρίως στις 24h, ενώ δεν παρατηρήθηκε αλλαγή της έκφρασης για τα γονίδια που κωδικοποιούν για *txn*, *sod1* και *cat*.

Στην κυτταρική σειρά HeLa (Διάγραμμα 15), αυξήθηκαν όλα τα εξεταζόμενα γονίδια επί το πλείστον των χρονικών στιγμών, ενώ δεν παρατηρήθηκε καμία μείωση στην έκφρασή τους. Μεγαλύτερη αύξηση παρατηρείται στις 3h και έπειτα στις 12h χορήγησης TPF, ενώ για τα περισσότερα γονίδια (*sod1*, *txn*, *hmox1*, *nrf2*) δεν υπήρχε μεταβολή στην έκφρασή τους στις 24 h.

Τέλος, στην κυτταρική σειρά HepG2 (Διάγραμμα 16) παρατηρήθηκε χρονοεξαρτώμενη αύξηση σε όλα τα εξεταζόμενα γονίδια, με εξαίρεση την *cat* όπου τα επίπεδα έκφρασης της δεν μεταβλήθηκαν και την *txn* όπου στις 24 h τα επίπεδα της μειώθηκαν συγκριτικά με τα κύτταρα της ομάδας ελέγχου.

Τα αποτελέσματα συνηγορούν πως δεν είναι απίθανο τα μόρια του TPF να ενεργοποιούν τον μεταγραφικό παράγοντα Nrf2 αποδεσμεύοντας τον από την Keap1. Για να συμβεί αυτό, προϋπόθεση είναι πρώτα να δράσουν προοξειδωτικά, κάτι που απαιτεί σχετικά υψηλή συγκέντρωση. Με βάση με την ανάλυση σύστασης, το TPF περιέχει πολυφαινόλες όπως HT, ελευρωπαίνη, ελαιοκανθάλη, οι οποίες σύμφωνα και με άλλες μελέτες ενεργοποιούν τον Nrf2, καθώς οξειδώνουν τις Cys της Keap1 (οι πολυφαινόλες όταν οξειδώνονται μετατρέπονται σε κινόνες που είναι πιθανά οξειδωτικά μόρια) (284,309–311). Η αύξηση της GSH μπορεί να οφείλεται τόσο σε αυξημένο βιοσυνθετικό ρυθμό, όσο και σε αύξηση του ρυθμού ανακύκλωσης. Η βιοσύνθεση περιέχει δύο ένζυμα, την λιγάση της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης (γ-GCL) και τη συνθετάση της γλουταθειόνης (GS) ενώ η ανακύκλωση την αναγωγή (GR) και την περοξειδάση της γλουταθειόνης (GPx). Το TPF οδήγησε σε επαγωγή έκφρασης

γονιδίων που σχετίζονται με τη GSH (*gclc*, *gsr*, *gpx1*), το οποίο μπορεί να ερμηνεύσει τα αυξημένα επίπεδα της GSH όπως αυτά καταγράφηκαν μέσω κυτταρομετρίας ροής (Διάγραμμα 9), τόσο λόγω αυξημένης βιοσύνθεσης, όσο και λόγω αυξημένου ρυθμού ανακύκλωσης, αν και κατά κύριο λόγο αυξάνεται η βιοσύνθεση μέσω της  $\gamma$ -GCL, κάτι που σχετίστηκε με την ικανότητα των πολυφαινολών του ελαιολάδου κυρίως να ενεργοποιούν τον μεταγραφικό παράγοντα Nrf2. Συνεπώς, το TPF προκάλεσε επαγωγή στα επίπεδα της  $\gamma$ -GCL τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και πρωτεΐνης.

Για τα γονίδια στα οποία δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές στην έκφρασή τους, ενδεχομένως για λόγους κυτταρικής οικονομίας δεν χρειάστηκε η υπερέκφραση τους. Ενδεχόμενα η συγκέντρωση των πολυφαινολών να λειτούργησε απευθείας αντιοξειδωτικά, διαφυλάσσοντας ανέπαφα τα ενδογενή επίπεδα αυτών των γονιδίων, κάτι που έστρεψε το κύτταρο σε εφησυχασμό και για λόγους οικονομίας ελάττωσε την έκφραση αντιοξειδωτικών γονιδίων.

Θα πρέπει να τονιστεί, πως τα αποτελέσματα αυτά αφορούν τα επίπεδα μεταγραφής γονιδίων, ωστόσο είναι γνωστό πως αλλαγές στα επίπεδα των mRNA δεν μεταφράζονται αυτόματα και σε αλλαγές στην ποσότητα των αντίστοιχων πρωτεϊνών, καθώς η γονιδιακή έκφραση υπόκειται σε πολλαπλά στάδια ρύθμισης και ελέγχου με σκοπό τη διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης. Κατ' αυτό τον τρόπο, η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων μπορεί να γίνει μέσω ποσοτικοποίησης των αντίστοιχων πρωτεϊνών.

Συμπερασματικά, μέσα από ένα σύνολο δοκιμασιών έγινε προσπάθεια να αποσαφηνιστεί η δραστηριότητα ενός συνολικού πολυφαινολικού εκχυλίσματος ελαιολάδου (TPF). Με βάση τα ανώτερω αποτελέσματα το TPF παρουσίασε σημαντική αντιοξειδωτική και αντιμεταλλαξιγόνο ικανότητα σε *in vitro* δοκιμές, ενώ είχε ευεργετική επίδραση στην οξειδοαναγωγική κατάσταση τεσσάρων διαφορετικών κυτταρικών σειρών, τόσο μέσω αύξησης GSH όσο και μέσω μείωσης δεικτών οξειδωτικής βλάβης (TBARS, PC, ROS). Επιπλέον, παρατηρήθηκε επαγωγή γονιδίων που κωδικοποιούν για κυτταροπροστατευτικές πρωτεΐνες, γεγονός που έχει ενδιαφέρουσες προβολές σχετικά με τον χαρακτηρισμό του πιθανού μηχανισμού δράσης του. Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι έπειτα από τη χορήγηση του TPF στα κύτταρα παρατηρήθηκε πολύπλοκος τρόπος δράσης αναλόγως της χορηγούμενης



συγκέντρωσης. Τα αποτελέσματα αυτά αποτελούν μια βάση δεδομένων για την περαιτέρω διερεύνηση του μηχανισμού δράσης του TPF σε *in vivo* μοντέλα.

## **Κεφάλαιο 5 – Μέρος II Αποτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας καθαρών μορίων προερχόμενα από το ελαιόλαδο**

### **5.1 Κύρια ευρήματα**

- Όλα τα καθαρά μόρια εμφάνισαν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, με πιο δραστικά την ελαιασίνη και ελευρωπαίνη και στις δύο μεθόδους (DPPH, ABTS●+).
- Όλα τα καθαρά μόρια εμφάνισαν αντιγενotoξική ικανότητα ωστόσο πιο δραστικά ήταν η ελαιοκανθάλη και η ελαιασίνη.
- Έπειτα τη χορήγηση των μορίων στις κυτταρικές σειρές (C2C12, EA.hy926, HeLa, HepG2) παρατηρήθηκε ιστοειδικότητα. Η τυροσόλη ήταν λιγότερο τοξική καθώς εμφάνισε ως επι το πλείστον κυτταροτοξικότητα σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ενώ η ελαιοκανθάλη η πιο τοξική.
- Όλα τα μόρια προκάλεσαν αύξηση των επιπέδων γλουταθειόνης.
- Έντονο ήταν το προοξειδωτικό φαινόμενο όσον αφορά τα επίπεδα GSH στην κυτταρική σειρά HepG2.

## 5.2 Εισαγωγή – Σκοπός

Η μεσογειακή διατροφή και το ελαιόλαδο ως το βασικό της συστατικό είναι σχεδόν συνώνυμο με έναν υγιεινό τρόπο διατροφής και διαβίωσης στις μέρες μας. Αυτό το είδος διατροφής αναγνωρίζεται ευρέως ότι συνδέεται με πολλά ευνοϊκά αποτελέσματα, όπως η μειωμένη συχνότητα εμφάνισης διαφόρων χρόνιων παθήσεων και η παρατεταμένη μακροζωία. Ωστόσο, όσον αφορά τις ιδιότητες που προάγουν την υγεία, οι πολυφαινόλες του ελαιολάδου φαίνεται να βρίσκονται στο επίκεντρο του ερευνητικού ενδιαφέροντος. Αν και το πολυφαινολικό κλάσμα του ελαιολάδου αποτελεί ένα μικρό κλάσμα της σύνθεσης του ελαιολάδου, φαίνεται να έχει μεγάλη σημασία όσον αφορά τα οφέλη για την υγεία (312). Οι κύριες φαινολικές ενώσεις του ελαιολάδου είναι η υδροξυτυροσόλη, η τυροσόλη, η ελευρωπαίνη, η ελεοκανθάλη και ολεασίνη, οι οποίες φαίνεται να εμφανίζουν σημαντικές αντι-αθηρογενείς, καρδιοπροστατευτικές, αντικαρκινικές, νευροπροστατευτικές, αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιδιαβητικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες (195,312,313).

Οι φυσικές φαινολικές ουσίες είναι δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών, που χαρακτηρίζονται χημικά από την παρουσία ενός ή περισσότερων αρωματικών δακτυλίων με έναν ή περισσότερους υποκαταστάτες υδροξυλίου (314). Οι φυτικές πολυφαινόλες δρουν ως φυτοαλεξίνες που χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση παρασίτων και βακτηριακών λοιμώξεων. Η ελιά (*Olea europaea*) παράγει το δικό της «οπλοστάσιο» πολυφαινολών που περιλαμβάνει φλαβονόλες, λιγνάνες και γλυκοζίδια. Τα τελευταία ανήκουν στην κατηγορία των ιριδοειδών, έναν τύπο μονοτερπενίων που αποτελούνται από έναν δακτύλιο κυκλοπεντανίου συντηγμένο σε έναν ετεροκυκλικό εστέρα οξυγόνου έξι ατόμων, τα μόρια που περιέχουν σπασμένο δακτύλιο κυκλοπεντανίου είναι γνωστά ως σεκοϊριδοειδή (313).

Οι πολυφαινόλες της ελιάς βρίσκονται τόσο στο λιπιδικό κλάσμα όσο και στο κλάσμα του νερού (ως λεπτά σταγονίδια) και περιλαμβάνουν τις φαινολικές αλκοόλες, την υδροξυτυροσόλη (HT) (3,4-διϋδροξυφαινυλαιθανόλη, 3,4-DHPEA) και την τυροσόλη (T) (p-υδροξυφαινυλαιθανόλη, p-HPEA) και των σεκοριδοειδών πρόδρομων τους. Αυτά περιλαμβάνουν τον εστέρα της HT του ελενολικού οξέος (γνωστός ως ελευρωπαίνη), η κύρια υπεύθυνη πολυφαινόλη για την πικρή γεύση των φύλλων ελιάς. Το διαλδεϋδικό παράγωγο του δεκαρβοξυμεθυλλενολικού οξέος που δεσμεύεται είτε

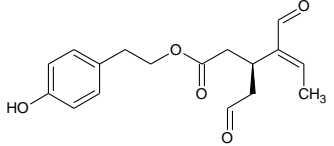
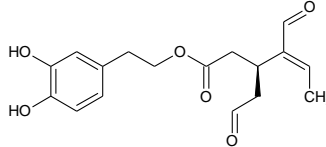
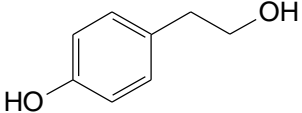
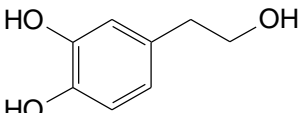
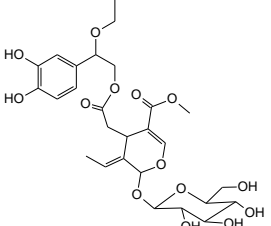
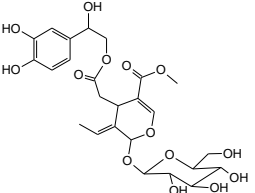
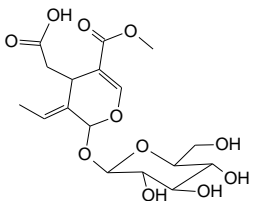
με HT (3,4-dihydroxyphenylethanol-elenolic acid dialdehyde, 3,4-διδροξυφαινυλαιθανόλη- διαλδεϋδη ελενολικού οξέος, 3,4-DHPEA-EDA, επίσης γνωστή ως ελεασίνη) ή με τυροσόλη (p-hydroxyphenylethanol-elenolic acid dialdehyde, p-υδροξυφαινυλαιθανόλης - διαλδεϋδη του ελενολικού οξέος, p-HPEA-EDA, επίσης γνωστή ως ελαιοκανθάλη). Η τελευταία είναι υπεύθυνη για την αίσθηση καψίματος κατά την κατανάλωση εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου. Οι πολυφαινόλες της ελιάς περιλαμβάνουν επίσης βερμπακοσίδια, τον καφεοϋλοραμνοσυλγλυκοζίτη της HT (caffeoylethanolramnosylglucoside of HT), ένα παράγωγο φαινολικού οξέος, τις λιγνάνες 1-ακετοξυπινορεζινόλη και πινορεζινόλη και άλλα σεκοϊριδοειδή (315).

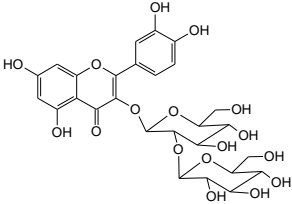
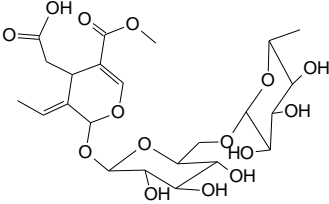
Σκοπός της συγκεκριμένης ενότητας είναι να γίνει αποτίμηση της αντιοξειδωτικής και αντιγυνοτοξικής δράσης καθαρών πολυφαινολικών μορίων του ελαιολάδου και συγκεκριμένα της υδροξυτυροσόλης, τυροσόλης, ελαιοκανθάλης, ελευρωπαίνης, ελαιασίνης, κλάσματα ελαιολάδου CP-FR4, CP-FR8, CP-FR10, CP-FR11, CP-FR14, κλάσμα ξεπικρίσματος (Oleomed dry). Καθώς και την επίδραση των κύριων πολυφαινολών στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό κυττάρων.

### 5.3 Προέλευση και απομόνωση μορίων

Τα καθαρά μόρια προήλθαν από το εργαστήριο του καθηγητή Λέανδρου-Αλέξανδρου Σκαλτσούνη της Φαρμακευτικής σχολής Αθηνών. Η απομόνωση έγινε έπειτα από την κατεργασία του TPF σε μία διεργασία διαχωρισμού δύο σταδίων. Αρχικά, το εκχύλισμα κλασματώθηκε με χρωματογραφία φυγοκεντρικής κατανομής διαχωρισμού βαθμίδωσης (CPC) και κατόπιν αναλύθηκε περαιτέρω χρησιμοποιώντας χρωματογραφία στήλης Sephadex LH-20. Η CPC εκτελέστηκε σε συσκευή FCPC1000® (Rousselet Robatel Kromaton, Annonay, France) εφοδιασμένη με προπαρασκευαστική στήλη (συνολική χωρητικότητα στήλης 1000 mL) και συνδεδεμένη με μια αντλία LabAlliance Preparative. Το σύστημα συζεύχθηκε με έναν ανιχνευτή SPECTRA SYSTEM UV 2000 (Thermo Scientific), ενώ τα κλάσματα συλλέχθηκαν από συλλέκτη κλάσματος Büchi B-684 (Flawil, Ελβετία) (Πίνακας 10).

**Πίνακας 10 Τα καθαρά μόρια και κλάσματα μορίων έπειτα από την κλασμάτωση (CPC) του TPF.**

	<b>Δομή</b>	<b>Χημικός τύπος</b>	<b>Μοριακό βάρος</b>
Ελεοκανθάλη		$C_{17}H_{20}O_5$	304
Ελαιασίνη		$C_{17}H_{20}O_6$	320
Τυροσόλη		$C_8H_{10}O_2$	138
Υδροξυτυροσόλη		$C_8H_{10}O_3$	154
CPC-Fr4 (2''-ethoxyoleuropein)		$C_{27}H_{36}O_{14}$	584
CPC-Fr8 (2''-hydroxyoleuropein)		$C_{25}H_{32}O_{14}$	556
CPC-Fr10 (Oleaside 11-methylester)		$C_{17}H_{24}O_{11}$	404

CPC-Fr11 (Quercetin 2 sophoroside)		C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>17</sub>	626
CPC-Fr14 (Oleofloside A)		C <sub>23</sub> H <sub>34</sub> O <sub>15</sub>	550
OLEOMED	Φαινολικό κλάσμα ξεπικρίσματος		

## 5.4 Αποτελέσματα

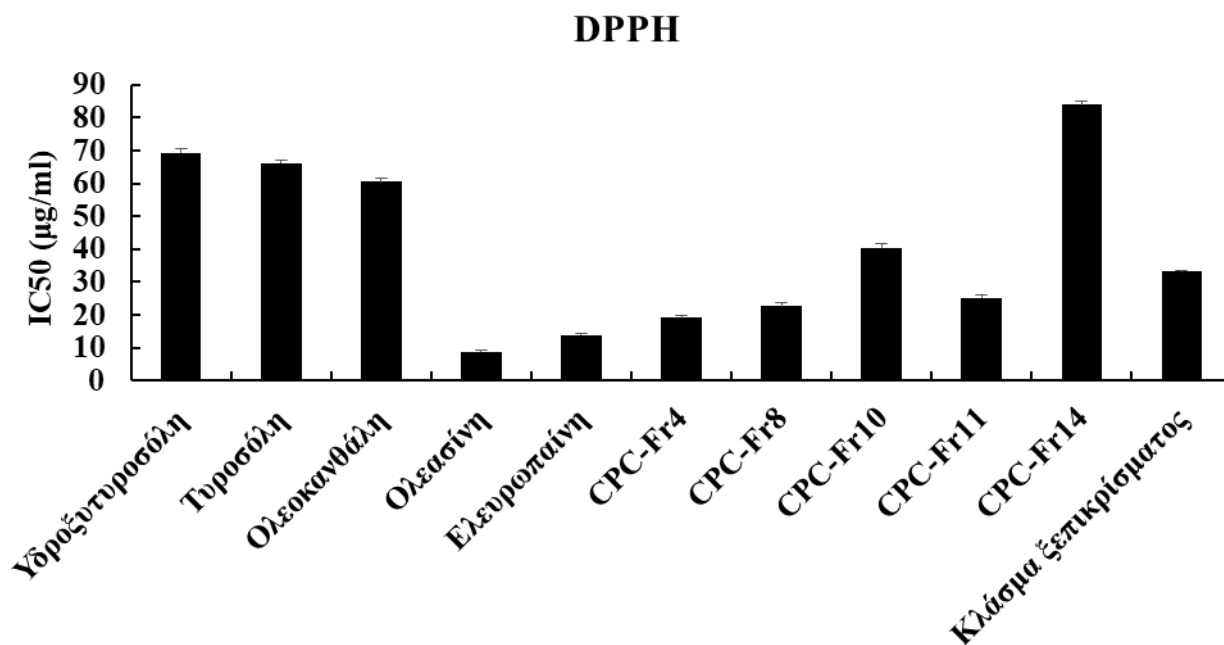
### 5.4.1 Αντιοξειδωτική δράση καθαρών μορίων και κλασμάτων του ελαιολάδου

Η αντιοξειδωτική δράση των καθαρών μορίων καθώς και των κλασμάτων του ελαιολάδου εκτιμήθηκε μέσω των τεχνικών DPPH (Διάγραμμα 21) και ABTS●+ (Διάγραμμα 22). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως IC<sub>50</sub>. Δηλαδή τη συγκέντρωση της ουσίας (μg/ml) που απαιτείται έτσι ώστε να εξουδετερωθεί το 50% της ρίζας. Όσο πιο μικρή η τιμή του IC<sub>50</sub> τόσο μεγαλύτερη η αντιοξειδωτική ικανότητα της ουσίας.

Πιο αναλυτικά, για τη μέθοδο DPPH η υδρόξυτυροσόλη εμφάνισε IC<sub>50</sub> στα 69,3 μg/ml, η τυροσόλη στα 66,1 μg/ml, η ελαιοκανθάλη στα 60,5 μg/ml, η ολεασίνη στα 8,8 μg/ml, η ελευρωπαίνη στα 13,8 μg/ml, το CPC-Fr4 στα 19,1 μg/ml, CPC-Fr8 στα 22,7 μg/ml, CPC-Fr10 40,5 μg/ml, το CPC-Fr11 στα 25,1 μg/ml, το CPC-Fr14 στα 84,0 μg/ml και τέλος το κλάσμα ξεπικρίσματος (oleomed dry) στα 33,1 μg/ml. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 21. Ο Πίνακας 11, δείχνει την στατιστική σημαντικότητα (\*p<0,005) μεταξύ των τιμών.

Για τη μέθοδο ABTS●+ η υδρόξυτυροσόλη εμφάνισε IC<sub>50</sub> στα 91,2 μg/ml, η τυροσόλη στα 96,5 μg/ml, η ελαιοκανθάλη στα 92,2 μg/ml, η ολεασίνη στα 9,2 μg/ml, η ελευρωπαίνη στα 20,9 μg/ml, το CPC-Fr4 στα 20,9 μg/ml, CPC-Fr8 στα 26,4 μg/ml, CPC-Fr10 μg/ml, το CPC-Fr11 στα 24,5 μg/ml, το CPC-Fr14 στα 81,6 μg/ml και τέλος

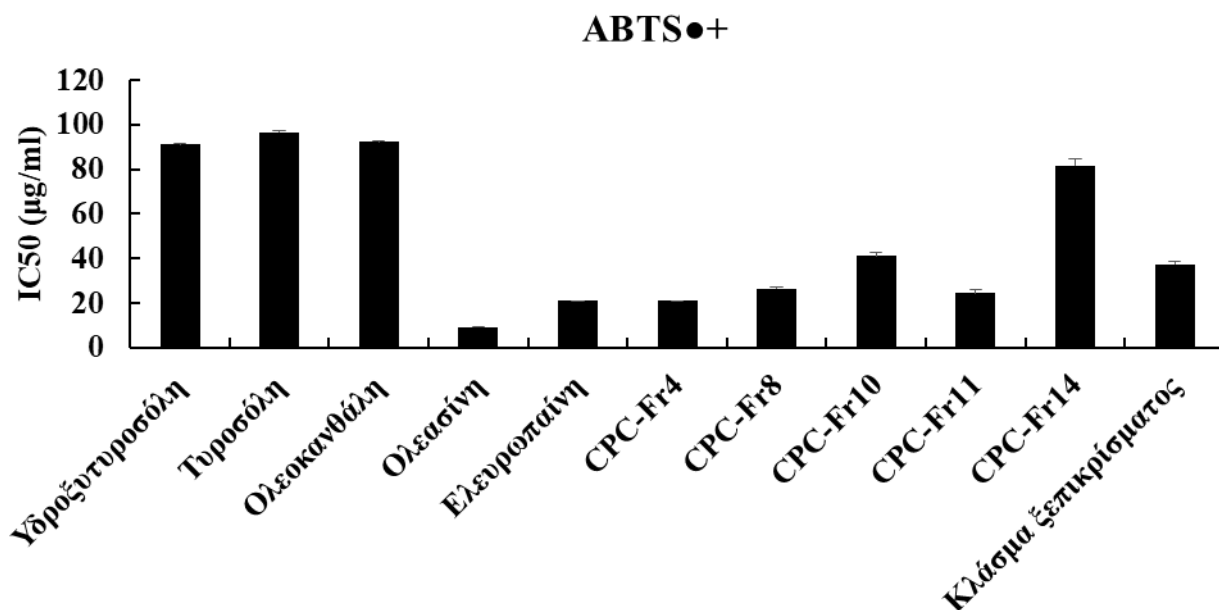
το κλάσμα ξεπικρίσματος (oleomed dry) στα 37,5 µg/ml. Ο Πίνακας 12, δείχνει την στατιστική σημαντικότητα (\* $p < 0,005$ ) μεταξύ των τιμών.



**Διάγραμμα 21** Ικανότητα εξουδετέρωσης της τεχνητής ρίζας DPPH. Τα αποτελέσματα εκφράζονται  $IC_{50} \pm SEM$  ( $n=3$ ).

**Πίνακας 11** Στατιστικές συγκρίσεις μεταξύ των  $IC_{50}$  των μορίων για τη μέθοδο DPPH. Το σύμβολο (\*) υποδεικνύει τη στατιστική σημαντικότητα με  $p < 0,005$ .

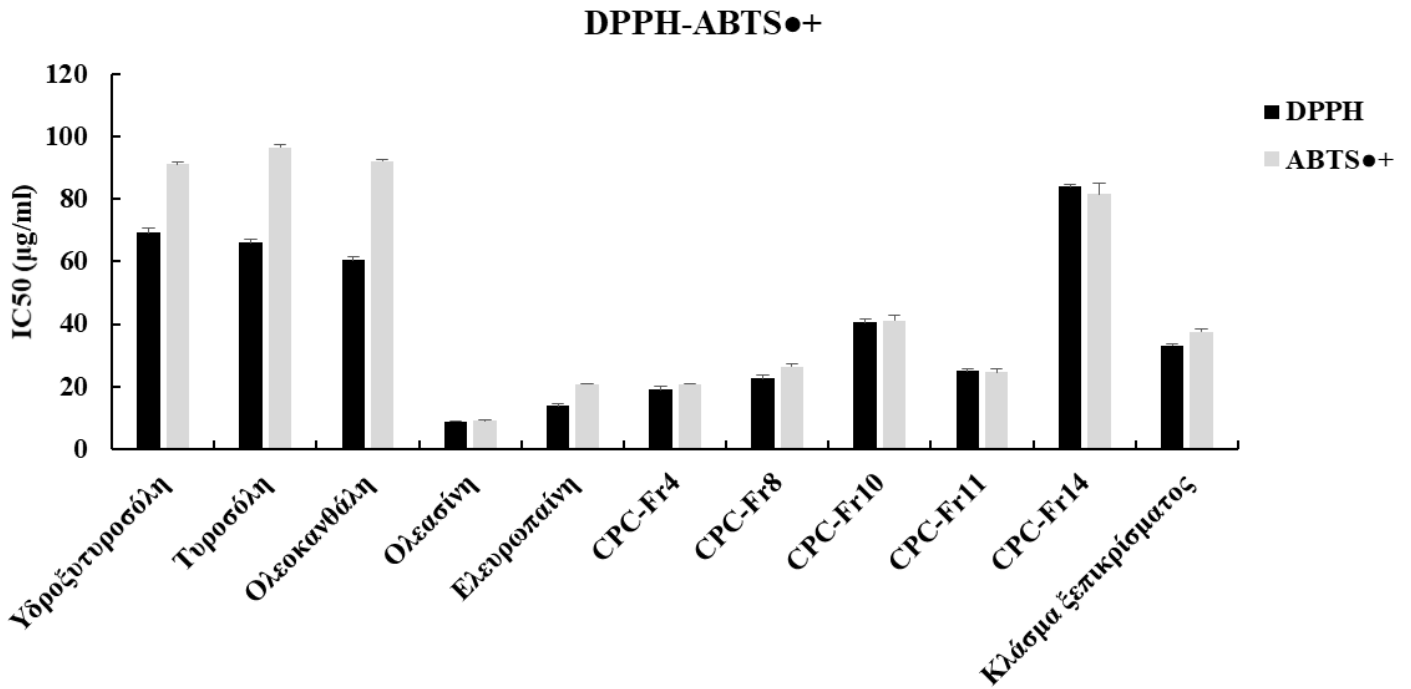
DPPH	Υδροξυτυροσόλη	Τυροσόλη	Ολεοκανθάλη	Ολεασίνη	Ελευρωπαίνη	CPC-Fr4	CPC-Fr8	CPC-Fr10	CPC-Fr11	CPC-Fr14	Κλάσμα ξεπικρίσματος
Υδροξυτυροσόλη			*	*	*	*	*	*	*	*	*
Τυροσόλη			*	*	*	*	*	*	*	*	*
Ολεοκανθάλη	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*
Ολεασίνη	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*
Ελευρωπαίνη	*	*	*	*		*	*	*	*	*	*
CPC-Fr4	*	*	*	*	*		*	*	*	*	*
CPC-Fr8	*	*	*	*	*	*		*	*	*	*
CPC-Fr10	*	*	*	*	*	*	*		*	*	*
CPC-Fr11	*	*	*	*	*	*	*	*		*	*
CPC-Fr14	*	*	*	*	*	*	*	*	*		*
Κλάσμα ξεπικρίσματος	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	



**Διάγραμμα 22** Ικανότητα εξουδετέρωσης της τεχνητής ρίζας ABTS•+. Τα αποτελέσματα εκφράζονται IC50 ± SEM (n=3).

**Πίνακας 12** Στατιστικές συγκρίσεις μεταξύ των IC50 των μορίων για τη μέθοδο ABTS•+. Το σύμβολο (\*) υποδεικνύει τη στατιστική σημαντικότητα με p<0,005.

ABTS•+	Υδροξυτυροσόλη	Τυροσόλη	Ολεοκανθάλη	Ολεασίνη	Ελευρωπαίνη	CPC-Fr4	CPC-Fr8	CPC-Fr10	CPC-Fr11	CPC-Fr14	Κλάσμα ξεπικρίσματος
Υδροξυτυροσόλη		*		*	*	*	*	*	*	*	*
Τυροσόλη	*			*	*	*	*	*	*	*	*
Ολεοκανθάλη				*	*	*	*	*	*	*	*
Ολεασίνη	*	*	*	*		*	*	*	*	*	*
Ελευρωπαίνη	*	*	*	*		*	*	*		*	*
CPC-Fr4	*	*	*	*		*		*		*	*
CPC-Fr8	*	*	*	*	*	*		*		*	*
CPC-Fr10	*	*	*	*	*	*	*		*	*	
CPC-Fr11	*	*	*	*				*		*	*
CPC-Fr14	*	*	*	*	*	*	*	*	*		*
Κλάσμα ξεπικρίσματος	*	*	*	*	*	*	*		*	*	

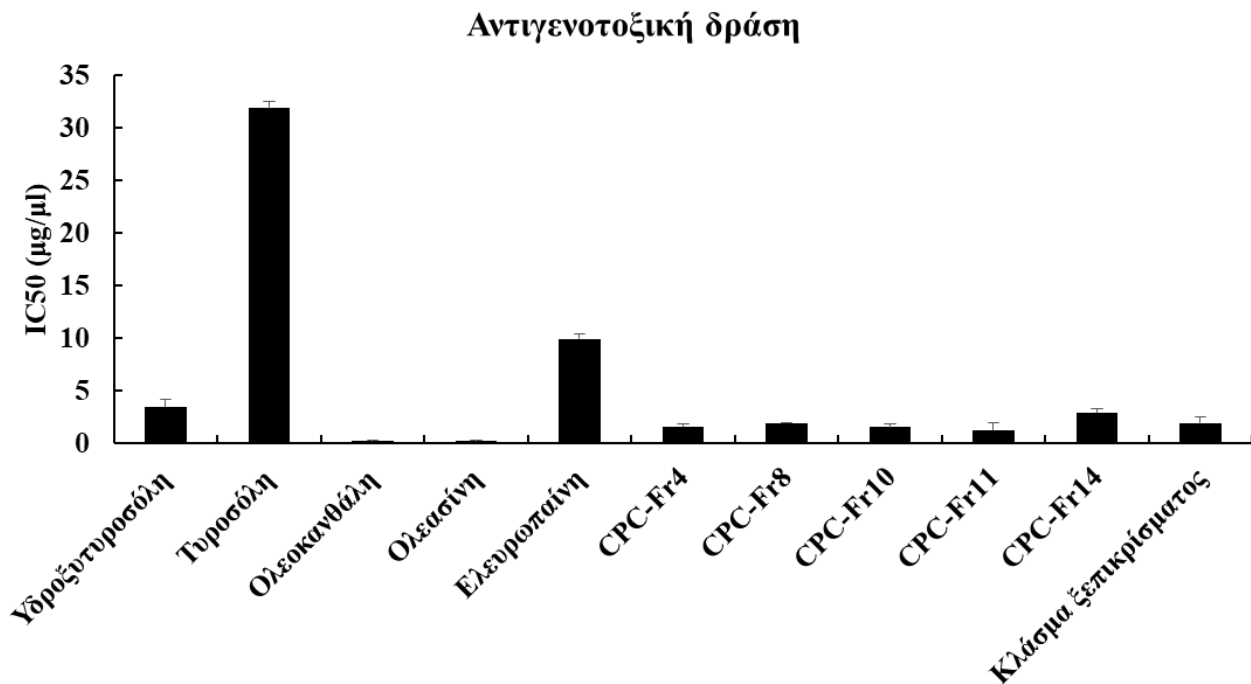


**Διάγραμμα 23** Διάγραμμα συσχέτισης των δύο μεθόδων αποτίμησης της αντιοξειδωτικής δράσης των μορίων, DPPH και ABTS●+. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως  $IC_{50} \pm SEM$  ( $n=3$ ).

#### 5.4.2 Αντιγενοτοξική δράση μορίων

Η αντιγενοτοξική δράση των μορίων εκτιμήθηκε μέσω της ικανότητάς τους να προστατεύουν τον πλασμιδιακό DNA από προκαλούμενες θραύσεις της ρίζας ROO● (Διάγραμμα 24). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως  $IC_{50}$  (µg/ml). Όσο μικρότερη η τιμή  $IC_{50}$  τόσο ισχυρότερη η αντιγενοτοξική δράση των μορίων. Ο Πίνακας 13, δείχνει την στατιστική σημαντικότητα ( $*p<0,005$ ) μεταξύ των τιμών.





**Διάγραμμα 24** Εκτίμηση της αντιγενοτοξικής ικανότητας των μορίων μέσω της ικανότητας τους να προστατεύουν τον πλασμιδιακό DNA από προκαλούμενες θραύσεις της ρίζας ROO•. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως  $IC_{50} \pm SEM$  (n=3).

**Πίνακας 13** Στατιστικές συγκρίσεις μεταξύ των  $IC_{50}$  των μορίων για τη μέθοδο εκτίμησης της αντιγενοτοξικής δράσης των μπρίων. Το σύμβολο (\*) υποδεικνύει τη στατιστική σημαντικότητα με  $p < 0,005$ .

	Υδροξυτυροσώλη	Τυροσώλη	Ολεοκανθάλη	Ολεασίνη	Ελευρωπαίνη	CPC-Fr4	CPC-Fr8	CPC-Fr10	CPC-Fr11	CPC-Fr14	Κλάσμα ξεπικρίσματος
Υδροξυτυροσώλη		*			*						
Τυροσώλη	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*
Ολεοκανθάλη		*			*	*	*	*		*	
Ολεασίνη		*			*	*	*	*	*		
Ελευρωπαίνη	*	*	*	*		*	*	*	*	*	*
CPC-Fr4		*	*	*	*					*	
CPC-Fr8		*	*	*	*					*	
CPC-Fr10		*	*	*	*					*	
CPC-Fr11		*			*						
CPC-Fr14		*	*	*	*	*	*	*			
Κλάσμα ξεπικρίσματος		*			*						

### 5.4.3 Χορήγηση καθαρών μορίων σε κυτταρικές σειρές

Τα καθαρά μόρια υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη, ελαιοκανθάλη, ελαιασίνη χορηγήθηκαν σε 4 κυτταρικές σειρές (C2C12, EA.hy926, HeLa, HepG2) έτσι ώστε να βρεθεί το εύρος των μη κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων, προκειμένου εν συνεχεία να γίνει αποτίμηση της επίδρασης τους στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό των κυττάρων (GSH, ROS) με κυτταρομετρία ροής.

#### 5.4.3.1 Έλεγχος κυτταροτοξικότητας μέσω του εμπορικού κιτ XTT.

Στον Πίνακα 14 παρουσιάζεται η συγκέντρωση όπου το κάθε μόριο εμφανίζει κυτταροτοξικότητα στην κάθε κυτταρική σειρά, έπειτα από 24 ώρες επώασης

**Πίνακας 14 Έλεγχος κυτταροτοξικότητας των καθαρών μορίων στις κυτταρικές σειρές C2C12, EA.hy926, HepG2, HeLa, έπειτα από 24h επώασης. Για κάθε μόριο παρουσιάζεται η συγκέντρωση (μg/ml) όπου εμφανίζεται κυτταροτοξικότητα. Η κάθε πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε τρεις ανεξάρτητες φορές.**

Κυτταρική σειρά	Μόριο	Κυτταροτοξικότητα (μg/ml)
<b>C2C12</b>	Υδροξυτυροσόλη	30
	Τυροσόλη	100
	Ελαιοκανθάλη	10
	Ελαιασίνη	10
<b>EA.hy926</b>	Υδροξυτυροσόλη	2,5
	Τυροσόλη	50
	Ελαιοκανθάλη	2,5
	Ελαιασίνη	10

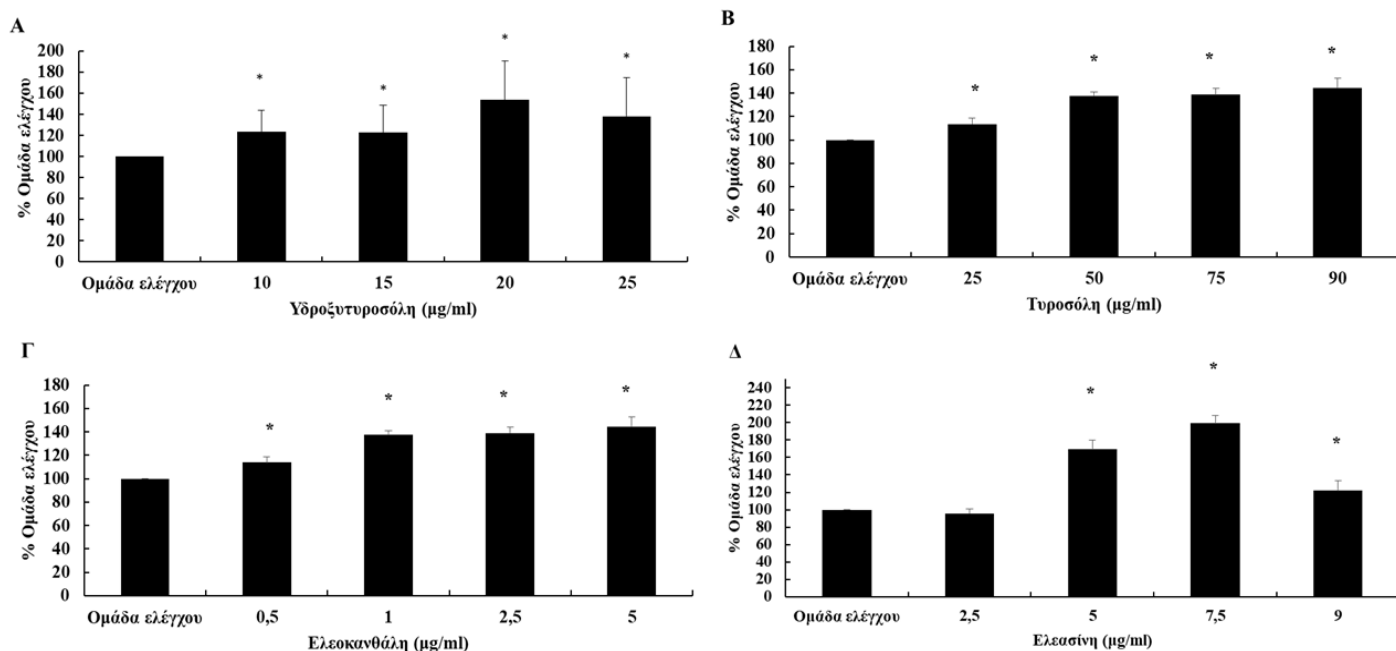
<b>HepG2</b>	Υδροξυτυροσόλη	100
	Τυροσόλη	100
	Ελαιοκανθάλη	50
	Ελαιασίνη	25
<b>HeLa</b>	Υδροξυτυροσόλη	20
	Τυροσόλη	80
	Ελοκανθάλη	30
	Ελαιασίνη	10

#### 5.4.3.2 Επίδραση των καθαρών μορίων στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό των κυτταρικών σειρών

##### > C2C12

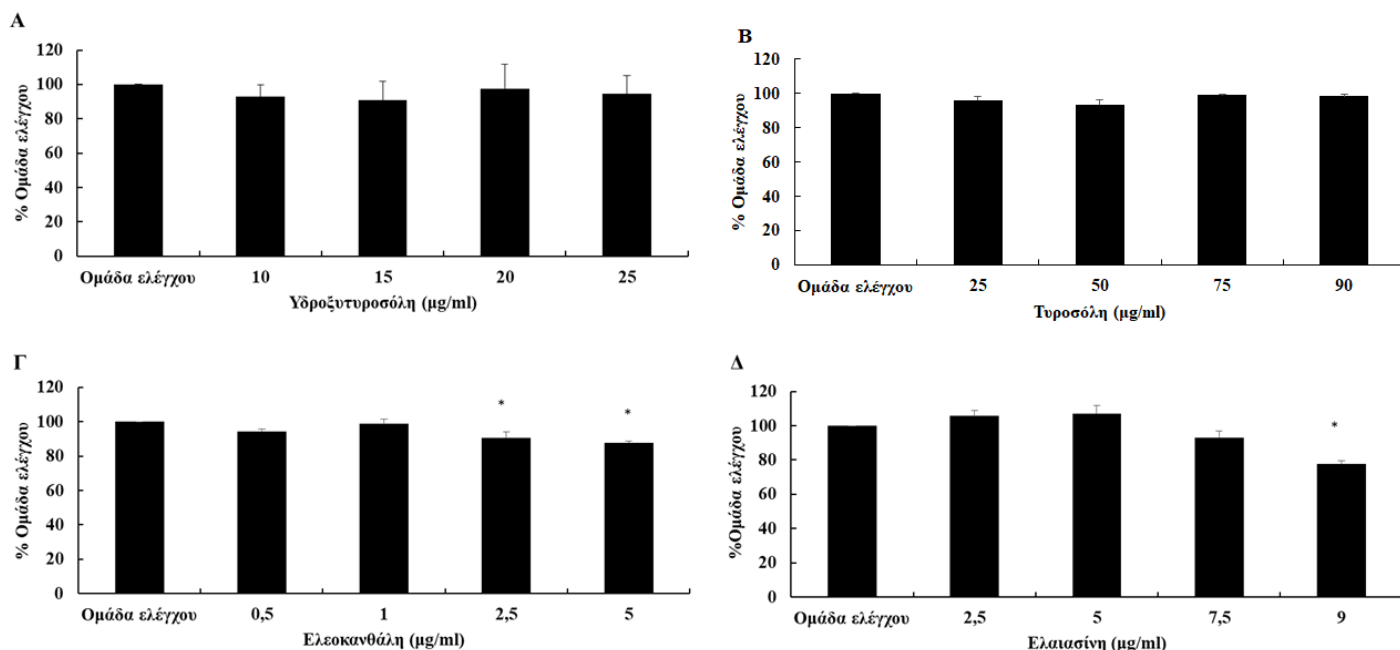
Η επίδραση των καθαρών μορίων στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό των κυτταρικών σειρών ελέγχθηκε μέσω κυτταρομετρίας ροής. Συγκεκριμένα, καταγράφηκαν τα επίπεδα GSH και ενδογενών επιπέδων ROS χωρίς τη χορήγηση εξωγενούς οξειδωτικού παράγοντα, έπειτα από 24 ώρες επώασης με τα καθαρά μόρια.

Το Διάγραμμα 25 παρουσιάζει την επίδραση των μορίων στα επίπεδα GSH στην κυτταρική σειρά C2C12. Για την υδροξυτυροσόλη παρατηρείται αύξηση της GSH κατά 24%, 23%, 54% και 38% συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου στα 10, 15, 20 και 25  $\mu\text{g/ml}$  αντίστοιχα (Διάγραμμα 25 Α). Για την τυροσόλη 14%, 37%, 39%, 44% στα 25, 50, 75 και 90  $\mu\text{g/ml}$ , αντίστοιχα (Διάγραμμα 25 Β). Για την ελαιοκανθάλη 14%, 38%, 40% και 44,3% 0,5, 1, 2,5 και 5  $\mu\text{g/ml}$ , αντίστοιχα (Διάγραμμα 25 Γ). Τέλος για την ελαιασίνη 96%, 99,% στα 5 και 7,5  $\mu\text{g/ml}$  αντίστοιχα (Διάγραμμα 25 Δ). Να τονιστεί ότι στην ελαιασίνη στην μεγαλύτερη συγκέντρωση των 9  $\mu\text{g/ml}$ , παρατηρείται μείωση των επιπέδων GSH συγκριτικά με τις δύο προηγούμενες συγκεντρώσεις, ωστόσο δεν παρατηρείται μείωση συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (22% αύξηση συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου).



**Διάγραμμα 25** Επίδραση καθαρών μορίων, στα επίπεδα GSH, στην κυτταρική σειρά C2C12 A) Υδροξυτυροσώλη, B) Τυροσώλη, Γ) Ελαοκανθάλη, Δ) Ελαιασίνη, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς την ομάδα ελέγχου (δε χορηγήθηκε εκχύλισμα) και παρουσιάζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SEM, (n=3). \* $p < 0,05$  στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. GSH; Glutathione.

Σχετικά με τα επίπεδα ROS παρατηρήθηκε μείωση μόνο έπειτα από τη χορήγηση ελαοκανθάλης και ελαιασίνης κατά 9% και 12% στα 2,5 και 5  $\mu\text{g/ml}$  και κατά 22% στα 9  $\mu\text{g/ml}$  αντίστοιχα (Διάγραμμα 26).

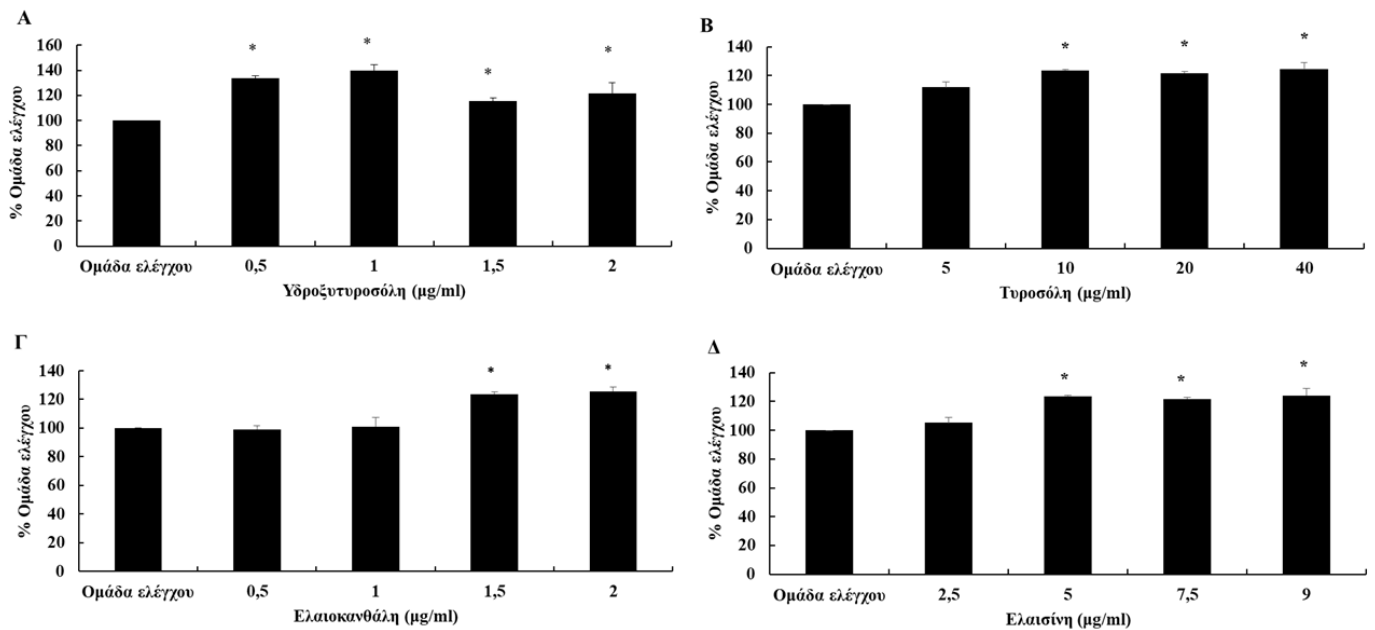


**Διάγραμμα 26** Επίδραση καθαρών μορίων, στα ενδογενή επίπεδα ROS, στην κυτταρική σειρά C2C12 A) Υδροξυτυροσόλη, B) Τυροσόλη, Γ) Ελαιοκανθάλη, Δ) Ελαιασίνη, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς την ομάδα ελέγχου (δε χορηγήθηκε εκχύλισμα) και παρουσιάζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SEM, (n=3). \*p<0,05 στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. ROS; Reactive oxygen species.

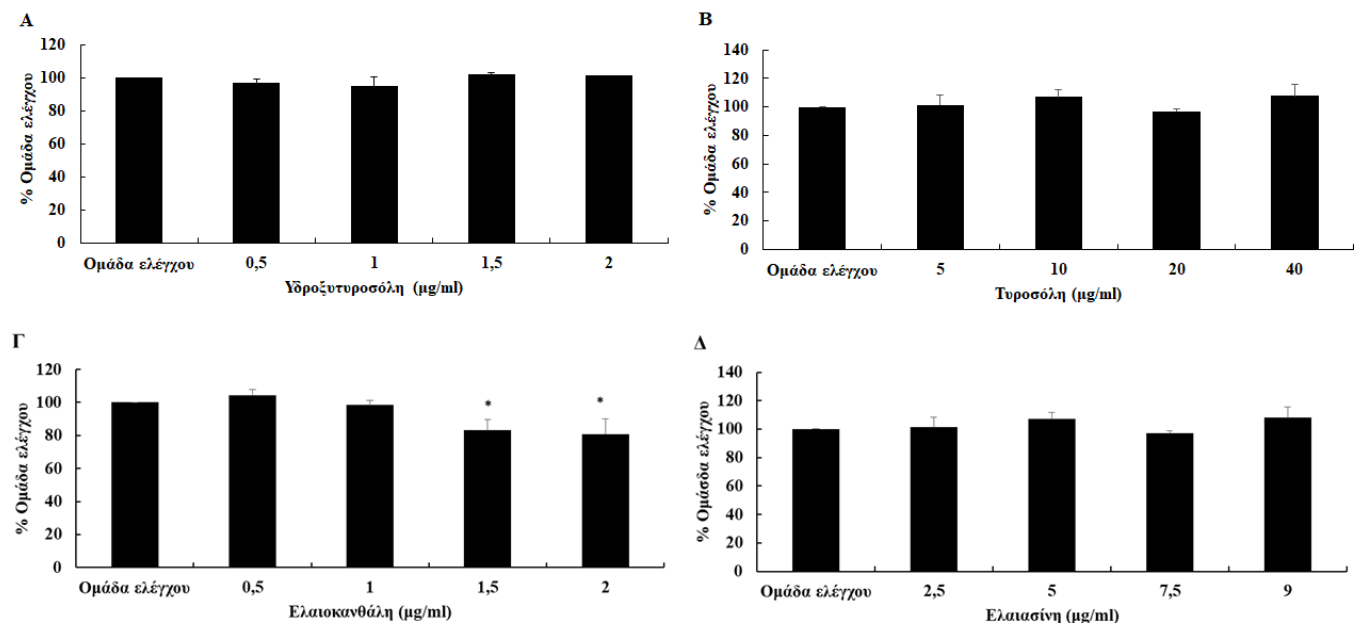
> EA.hy926

Το Διάγραμμα 27 παρουσιάζει την επίδραση των μορίων στα επίπεδα GSH στην κυτταρική σειρά EA.hy926. Για την υδροξυτυροσόλη παρατηρείται αύξηση της GSH κατά 34%, 40%, 15% και 22% συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου στα 0,5, 1, 1,5 και 2 μg/ml αντίστοιχα ( Διάγραμμα 27 A). Για την τυροσόλη αύξηση κατά 12%, 23%, 22%, 24% στα 5, 10, 20 και 40 μg/ml, αντίστοιχα (Διάγραμμα 27 B). Για την ελαιοκανθάλη αύξηση κατά 24% και 26% στα 1,5 και 2 μg/ml, αντίστοιχα (Διάγραμμα 27 Γ). Τέλος για την ελαιασίνη αύξηση κατά 23%, 24% και 25% στα 5, 7,5 και 9 μg/ml αντίστοιχα (Διάγραμμα 27 Δ).

Τα επίπεδα ROS παρουσίασαν μείωση μόνο έπειτα από τη χορήγηση 1,5 και 2 μg/ml ελαιοκανθάλης κατά 17% και 19% αντίστοιχα (Διάγραμμα 28 Γ).



**Διάγραμμα 27** Επίδραση καθαρών μορίων, στα επίπεδα GSH, στην κυτταρική σειρά EA.hy926 A) Υδροξυτυροσόλη, B) Τυροσόλη, Γ) Ελαιοκανθάλη, Δ) Ελαισίνη, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς την ομάδα ελέγχου (δε χορηγήθηκε εκχύλισμα) και παρουσιάζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SEM, (n=3). \* $p < 0,05$  στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. GSH; Glutathione



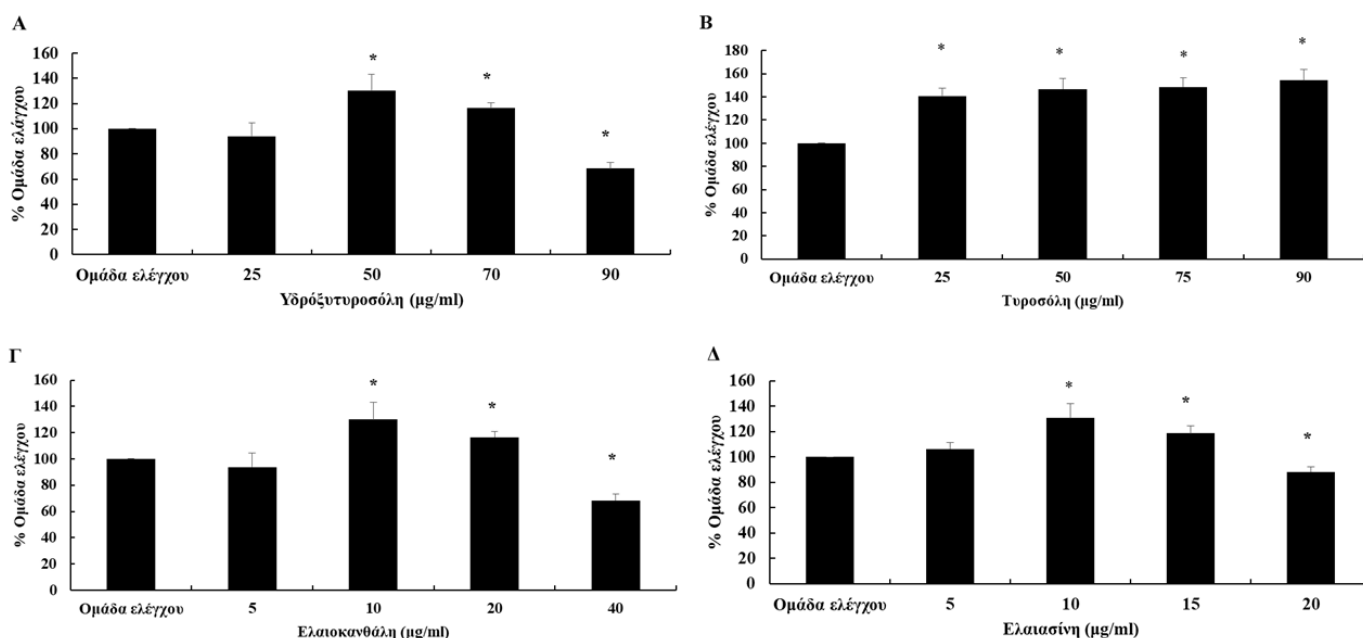
**Διάγραμμα 28** Επίδραση καθαρών μορίων, στα ενδογενή επίπεδα ROS, στην κυτταρική σειρά EA.hy926 A) Υδροξυτυροσόλη, B) Τυροσόλη, Γ) Ελαιοκανθάλη, Δ) Ελαισίνη, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς την ομάδα ελέγχου (δε χορηγήθηκε

εκχύλισμα) και παρουσιάζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SEM, (n=3). \*p<0,05 στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. ROS; Reactive oxygen species.

> HepG2

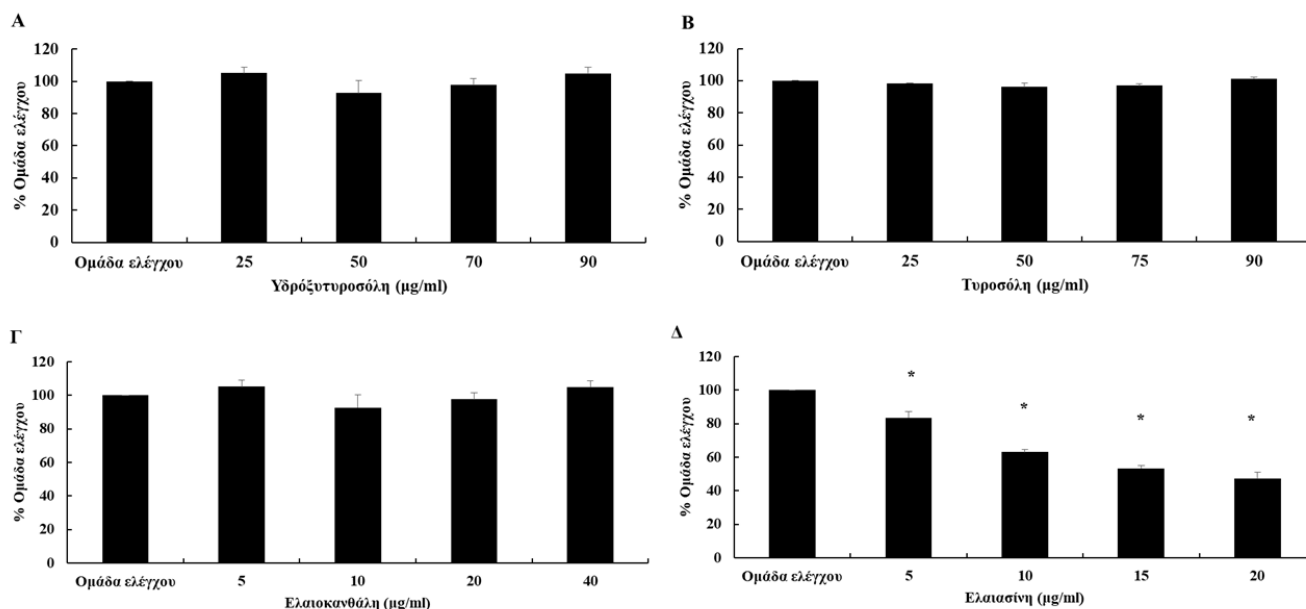
Το παρουσιάζει την επίδραση των μορίων στα επίπεδα GSH στην κυτταρική σειρά HepG2. Για την υδροξυτυροσόλη παρατηρείται αύξηση της GSH κατά 30% και 16% συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου στα 50 και 70  $\mu\text{g/ml}$  αντίστοιχα, ωστόσο στα 90  $\mu\text{g/ml}$  παρατηρήθηκε σημαντική μείωση κατά 32% (Διάγραμμα 29Α). Για την τυροσόλη αύξηση κατά 41%, 47%, 49% και 45% στα 25, 50, 75 και 90  $\mu\text{g/ml}$ , αντίστοιχα (Διάγραμμα 27 Διάγραμμα 29Β). Για την ελαιοκανθάλη αύξηση κατά 33% και 19% στα 10 και 20  $\mu\text{g/ml}$ , αντίστοιχα, ωστόσο παρατηρήθηκε μείωση κατά 30% στα 40  $\mu\text{g/ml}$  (Διάγραμμα 29Γ). Τέλος για την ελαιασίνη αύξηση κατά 31% και 19% στα 10 και 15  $\mu\text{g/ml}$  αντίστοιχα, ενώ υπήρξε και εδώ μείωση στη μεγαλύτερη συγκέντρωση των 20  $\mu\text{g/ml}$  κατά 12% (Διάγραμμα 29Δ).

Τα επίπεδα ROS παρουσίασαν μείωση μόνο έπειτα από τη χορήγηση 5, 10, 15 και 20  $\mu\text{g/ml}$  ελαιασίνης κατά 16%, 37%, 47% και 53% αντίστοιχα (Διάγραμμα 30 Γ).



**Διάγραμμα 29** Επίδραση καθαρών μορίων, στα επίπεδα GSH, στην κυτταρική σειρά HepG2 Α) Υδροξυτυροσόλη, Β) Τυροσόλη, Γ) Ελαιοκανθάλη, Δ) Ελαιασίνη, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε

εκατοστιαίο επίπεδο ως προς την ομάδα ελέγχου (δε χορηγήθηκε εκχύλισμα) και παρουσιάζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SEM, (n=3). \*p<0,05 στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. GSH; Glutathione



**Διάγραμμα 30** Επίδραση καθαρών μορίων, στα ενδογενή επίπεδα ROS, στην κυτταρική σειρά HepG2 A) Υδροξυτυροσόλη, B) Τυροσόλη, Γ) Ελαιοκανθάλη, Δ) Ελαιασίνη, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς την ομάδα ελέγχου (δε χορηγήθηκε εκχύλισμα) και παρουσιάζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SEM, (n=3). \*p<0,05 στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. ROS; Reactive oxygen species.

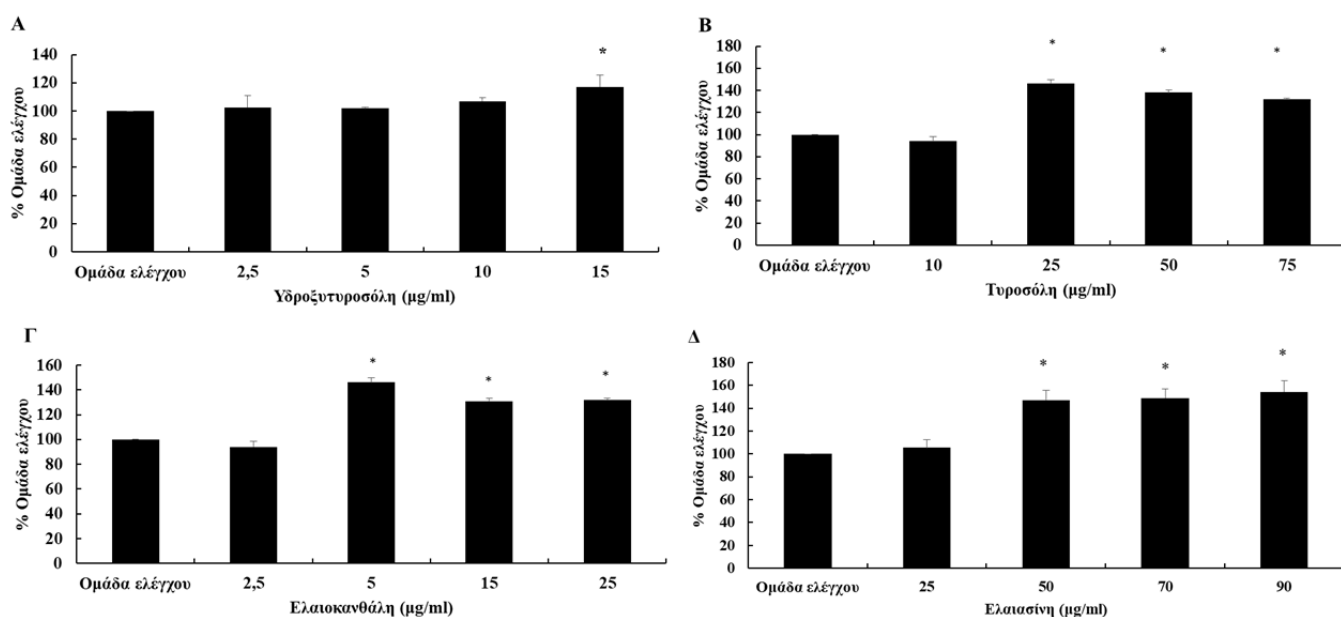
### > HeLa

Το παρουσιάζει την επίδραση των μορίων στα επίπεδα GSH στην κυτταρική σειρά HeLa. Για την υδροξυτυροσόλη παρατηρείται αύξηση της GSH κατά 17% συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου στα 15 μg/ml αντίστοιχα (Διάγραμμα 31A). Για την τυροσόλη αύξηση κατά 46%, 38%, και 32% στα 25, 50 και 75 μg/ml, αντίστοιχα (Διάγραμμα 27 Διάγραμμα 31B). Για την ελαιοκανθάλη αύξηση κατά 46% 31% και 32% στα 5, 15 και 25 μg/ml, αντίστοιχα (Διάγραμμα 31Γ). Τέλος για την ελαιασίνη αύξηση κατά 47%, 49% και 54% στα 5, 7,5 και 9 μg/ml αντίστοιχα (Διάγραμμα 31Δ).

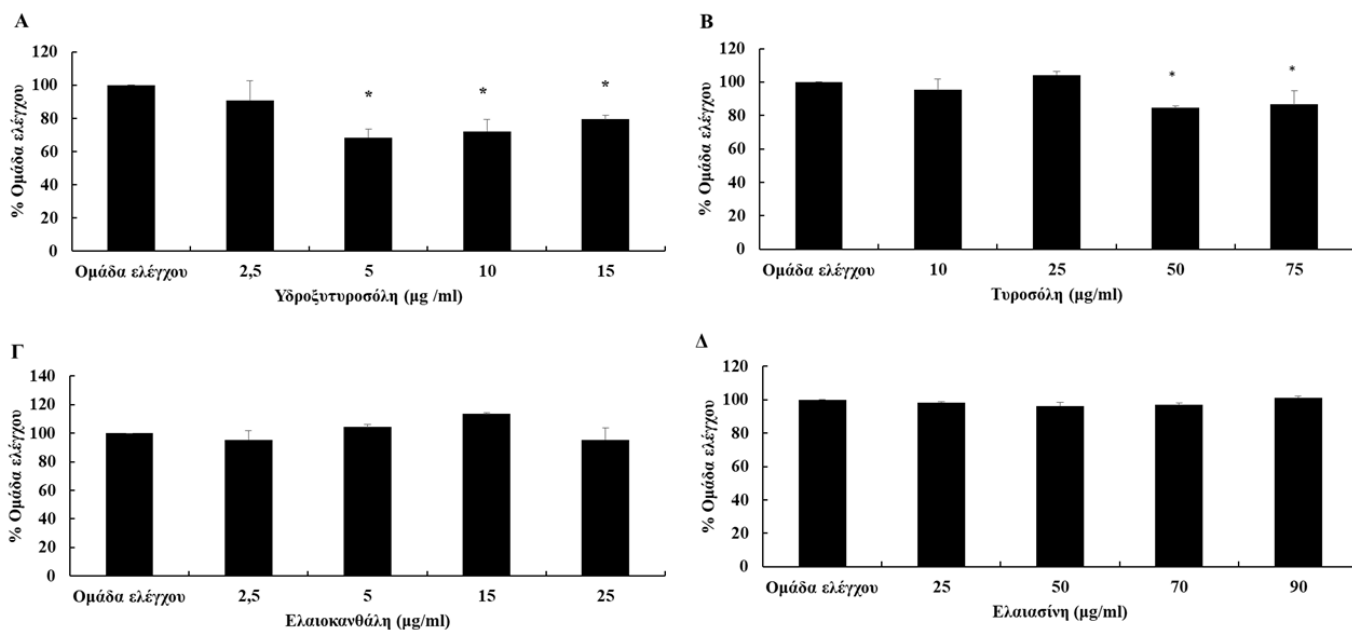
Τα επίπεδα ROS παρουσίασαν μείωση έπειτα από τη χορήγηση 5, 10 και 15 μg/ml υδροξυτυροσόλης κατά 32%, 28% και 20% αντίστοιχα (Διάγραμμα 32A). Επίσης



μείωση παρουσιάστηκε έπειτα από τη χορήγηση τυροσόλης κατά 16% και 13% στα 50 και 75  $\mu\text{g/ml}$  αντίστοιχα (Διάγραμμα 32B)



**Διάγραμμα 31 Επίδραση καθαρών μορίων, στα επίπεδα GSH, στην κυτταρική σειρά HeLa A) Υδροξυτυροσώλη, B) Τυροσώλη, Γ) Ελαιοκανθάλη, Δ) Ελαιασίνη, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς την ομάδα ελέγχου (δε χορηγήθηκε εκχύλισμα) και παρουσιάζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SEM, (n=3). \* $p < 0,05$  στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. GSH; Glutathione**



**Διάγραμμα 32** Επίδραση καθαρών μορίων, στα ενδογενή επίπεδα ROS, στην κυτταρική σειρά HeLa A) Υδροξυτυροσόλη, B) Τυροσόλη, Γ) Ελαιοκανθάλη, Δ) Ελαιασίνη, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς την ομάδα ελέγχου (δε χορηγήθηκε εκχύλισμα) και παρουσιάζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SEM, (n=3). \* $p < 0,05$  στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. ROS; Reactive oxygen species.

## 5.5 Συζήτηση

Το υδρόφιλο κλάσμα του ελαιολάδου, που γενικά υποδεικνύεται ως πολυφαινόλες, αποτελεί μόνο μια μικρή αναλογία των πολυάριθμων στοιχείων που συνιστούν το ελαιόλαδο. Παρόλα αυτά, οι πολυφαινόλες διαδραματίζουν βασικό ρόλο στις ωφέλιμες επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία που αποδίδονται στο ελαιόλαδο (316). Πράγματι, έχουν αποδειχθεί ότι κατέχουν αντιμικροβιακές, αντικαρκινικές, αντιοξειδωτικές και αντι-φλεγμονώδεις ιδιότητες, τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* (317,318). Οι φαινολικές ενώσεις είναι γνωστό ότι συμβάλλουν στις αισθητικές ιδιότητες του ελαιολάδου, καθώς αποδίδουν πικρή, πικάντικη και φρουτώδη γεύση (319). Τα ελαιόλαδα με υψηλά επίπεδα φαινολών παρουσιάζουν μεγάλη σταθερότητα λόγω της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας, γεγονός που εμποδίζει την οξείδωση και συμβάλλει στη μεγαλύτερη διάρκεια ζωής τους (320).

Η τυροσόλη (4-υδροξυφαιαιθυλική αλκοόλη) και η υδροξυτυροσόλη (3,4-διυδροξυφαιαιθυλική αλκοόλη) συνήθως αναφέρονται ως τα κύρια φαινολικά συστατικά του ελαιολάδου. Άλλες φαινολικές ενώσεις είναι το καφεϊκό οξύ, το ο-κουμαρικό οξύ, το ρ-κουμαρικό οξύ, το φερουλικό οξύ, το γαλλικό οξύ, το ομοβανιλικό οξύ, το ρ-υδροξυβενζοϊκό οξύ, το ρ-υδροξυφαιαιθυλικό οξύ, το πρωτοτεκουχικό οξύ, το σιναπικό οξύ, το συγγρνικό οξύ, οξύ. Οι αγλυκόνες της ελευρωπαΐνης και τα λιγκστροσίδια, οι εστέρες της υδροξυτυροσόλης και της τυροσόλης με ελενολικό οξύ, οι διακετόξυ και διαλδεΐδικές μορφές αυτών των άγλυκων, το ελενολικό οξύ και τα φλαβονοειδή έχουν επίσης αναφερθεί ότι υπάρχουν στο πολικό κλάσμα του ελαιολάδου (321). Ωστόσο, η πλειονότητα των φαρμακολογικών μελετών έχει επικεντρωθεί σε τέσσερις μόνο ενώσεις υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη, ελευρωπαΐνη και βερμπακοζίδη, καταγράφοντας τις αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώσεις, αντικαρκινικές, νευροπροστατευτικές και καρδιοπροστατευτικές τους ιδιότητες (220).

Μεταξύ των βιοφαινολών του ελαιολάδου, η υδροξυτυροσόλη προσελκύει ιδιαίτερη προσοχή λόγω της ισχυρής αντιοξειδωτικής της δράσης που αποδίδεται κυρίως στην ορθοδιφαιαιθυλική δομή της (322). Βρίσκεται κυρίως σε φύλλα ελιάς, σάρκα ελιάς και το ελαιόλαδο (323), αποτελώντας παράγωγο της ελευρωπαΐνης. Αξίζει να σημειωθεί ότι η υδροξυτυροσόλη μπορεί επίσης να συντεθεί ενδογενώς στο σώμα μας ως προϊόν του οξειδωτικού μεταβολισμού της ντοπαμίνης, γνωστό ως 3,4-διυδροξυφαιαιθυλαιθανόλη (DOPET) (183). Η υδροξυτυροσόλη έχει αποδειχθεί ότι ασκεί προληπτικά αποτελέσματα σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις όπως το μεταβολικό σύνδρομο, ο καρκίνος και οι νευροεκφυλιστικές νόσοι (183). Επιπρόσθετα, η τυροσόλη και οι μεταβολίτες της μπορούν επίσης να βελτιώσουν το οξειδωτικό στρες μέσω της απομάκρυνσης των ROS, της ανακύκλωσης της GSH και την αρνητική ρύθμιση έκφρασης των γονιδίων της περοξειδάσης της γλουταθειόνης 1, της καταλυτικής υπομονάδας γ-λιγάσης της γλουταθειόνης και της οξυγενάσης της αίμης 1 (324).

Στην παρούσα ενότητα επιλέχθηκαν τέσσερις κύριες πολυφαινόλες του ελαιολάδου η υδροξυτυροσόλη, η τυροσόλη, η ελαιοκανθάλη και η ελαιασίνη προκειμένου να εξεταστεί *in vitro* αλλά και σε κυτταρικό επίπεδο η αντιοξειδωτική τους ικανότητα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι εξεταζόμενες πολυφαινόλες εμφάνισαν αντιοξειδωτική και DNA προστατευτική ικανότητα, ενώ παράλληλα αύξησαν τα επίπεδα GSH στις

κυτταρικές σειρές C2C12, EA.hy926, HepG2 και HeLa, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις μείωσαν και τα ενδοκυτταρικά επίπεδα ROS.

Στην παρούσα ενότητα τα αποτελέσματα έδειξαν πως οι εξεταζόμενες πολυφαινόλες είχαν την ικανότητα να εξουδετερώνουν τις ρίζες του DPPH και ABTS•+. Αξίζει να αναφερθεί ότι η αντιοξειδωτική δράση μίας πολυφαινολικής ένωσης συνήθως αυξάνεται όσο αυξάνεται ο αριθμός των υδροξυλομάδων που υπάρχουν στο μόριο (283). Συγκεκριμένα, μόρια με τμήματα ο-διϋδροξυλίου έχουν υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα μέσω του σχηματισμού δεσμών υδρογόνου με ελεύθερες ρίζες. Επιπλέον, μια ουσία δότης ηλεκτρονίων σε θέση "όρθρο-" φαίνεται να εξασθενεί τον δεσμό O-H της πολυφαινόλης, παρέχοντας έτσι μεγαλύτερη σταθερότητα στην ρίζα φαινοξυλίου (325). Επομένως, όταν ένα αντιοξειδωτικό αντιδρά με μια ελεύθερη ρίζα, παρέχει ένα ηλεκτρόνιο και γίνεται αδύναμη, μη τοξική ελεύθερη ρίζα (326).

Με βάση τα αποτελέσματα όλα τα μόρια εμφάνισαν DNA προστατευτική δράση. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία έχει φανεί ότι η οξειδωτική βλάβη του DNA παρεμποδίζεται έπειτα από την χορήγηση εκχυλίσματος ελαιολάδου, υδροξυτυροσόλης, τυροσόλης ελευρωπαίνης και άλλων φαινολικών ενώσεων του ελαιολάδου σε μονοκύτταρα ανθρώπινου αίματος και κύτταρα HL60 (327).

Όσον αφορά την αύξηση της GSH, οι πολυφαινόλες του ελαιολάδου έχει αποδειχθεί ότι αυξάνουν την σύνθεσή της, ενεργοποιώντας τον πυρηνικό μεταγραφικό παράγοντα 2 (Nrf2), που ρυθμίζει την έκραση γονιδίων που συμμετέχουν στην αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού (300,328,329), όπως της λιγάσης γ-γλουταμυλ-κυστεΐνης (GCL), η οποία έχει την ικανότητα να ρυθμίζει τη σύνθεση της GSH (330). Επιπλέον, φαίνεται να ενεργοποιούν το μονοπάτι NK-p62 / SQSTM1, που απαιτείται για τη σύνθεση της GSH που επάγεται από τον Nrf2 (300). Ωστόσο, σε κάποιες περιπτώσεις στις μεγαλύτερες χορηγούμενες συγκεντρώσεις παρατήρηθηκε μείωση της GSH. Ως επί το πλείστον αυτή η μείωση δικαιολογείται από τα μειωμένα επίπεδα ROS υποδηλώνοντας πως η GSH «θυσιάστηκε» εξουδετερώνοντας τις ελεύθερες ρίζες, ωστόσο αυτή η μείωση μπορεί να υποδηλώνει την ύπαρξη προοξειδωτικού φαινομένου. Οι πολυφαινόλες του ελαιολάδου όπως η ελευρωπαΐνη και η υδροξυτυροσόλη έχουν αναφερθεί ότι ασκούν προ-οξειδωτικές επιδράσεις, εξαιτίας της ικανότητάς τους να ανάγουν το σίδηρο και το χαλκό. Αυτά τα ανηγμένα μέταλλα, με τη σειρά τους, μπορούν να καταλύσουν την παραγωγή OH• μέσω αντίδρασης

Fenton. Η ικανότητα των πολυφαινολών να δρουν ως αντιοξειδωτικά / προ-οξειδωτικά μόρια στα *in vitro* και *in vivo* συστήματα εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως η συγκέντρωση και η δομή τους (286).

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα έδειξαν πως οι πολυφαινόλες του ελαιολάδου έχουν αντιοξειδωτική και αντιγενετοξική ικανότητα *in vitro*, ενώ επάγουν την αύξηση της GSH σε κυτταρικό επίπεδο. Αυτά τα αποτελέσματα ακολουθούμενα από άλλα προς την ίδια κατεύθυνση θα μπορούσαν να αποτελέσουν μια σταθερή βάση για την παραγωγή λειτουργικών τροφών εμπλουτισμένων με πολυφαινόλες του ελαιολάδου, τα οποία θα παρουσιάζουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και σε *in vivo* συστήματα.

## **Κεφάλαιο 6 – Μέρος III Συσχέτιση της πολυφαινολικής σύστασης και της αντιοξειδωτικής ικανότητας διαφορετικών πολυφαινολικών εκχυλισμάτων ελαιολάδου**

### **6.1 Κύρια ευρήματα**

- > Ελαιόλαδα διαφορετικής πολυφαινολικής σύστασης εμφανίζουν διαφορετικές αντιοξειδωτικές ικανότητες.
- > Τα ελαιόλαδα με περίσσεια υδροξυτυροσόλης και παράγωγα αυτής είναι πιο δραστικά στις *in vitro* τεχνικές,
- > Ελαιόλαδα που είναι πλούσια σε τυροσόλη και παράγωγα αυτής, φαίνονται πιο δραστικά στην κυτταρική σειρά HeLa

### **6.2 Εισαγωγή- Σκοπός**

Η παγκόσμια αγορά ελαιόλαδου αυξάνεται ολοένα και περισσότερο τις τελευταίες δεκαετίες. Ωστόσο αν και η Ελλάδα συγκαταλέγεται στις τρεις πρώτες χώρες παραγωγής ελαιόλαδου, η αδυναμία ανάπτυξης του κλάδου τυποποίησης συρρίκνωσε το μερίδιο αγοράς της. Οι αιτίες που δρουν περιοριστικά στη δυναμική του κλάδου στην Ελλάδα αφορούν κυρίως διαρθρωτικές αδυναμίες σε όλα τα στάδια παραγωγής (ελαιοπαραγωγή, επεξεργασία, τυποποίηση, διανομή-προώθηση). Οι μεσοπρόθεσμες προοπτικές του κλάδου κρύβονται στην καλύτερη αξιοποίηση της ελληνικής παραγωγής. Για να υλοποιηθεί αυτό θα πρέπει να αποδειχθεί η ποιοτική υπεροχή του Ελληνικού ελαιόλαδου (331).

Το ενδιαφέρον των ερευνών έχει στραφεί γύρω από τις ευεργετικές για την υγεία, ιδιότητες των βιοφαινολών του ελαιόλαδου. Με βάση τις οδηγίες της EFSA, ελαιόλαδα με συγκριμένη βιοφαινολική σύσταση (5 mg υδροξυτυροσόλης και παράγωγα της σε 20 g ελαιόλαδου) δρουν προστατευτικά στην οξείδωση των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας, από οξειδωτικές βλάβες (332). Μεταξύ των παρθένων ελαιολάδων υπάρχει μεγάλη διαφοροποίηση όσον αφορά τη σύνθεση και τη συγκέντρωση σε φαινολικές ενώσεις, με διακύμανση μεταξύ 40 - 1000 mg/kg. Στον Πίνακα 15, ο οποίος υπάρχει στη μελέτη των Καλογερόπουλος και Τσιμίδου, 2014 (333), παρουσιάζεται το εύρος των πολυφαινολών διαφόρων Ελληνικών ελαιολάδων, από διαφορετικές ποικιλίες και περιοχές της Ελλάδας σε διάφορες χρονολογικές περιόδους.

**Πίνακας 15 Συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο Ελληνικών παρθένων ελαιολάδων. Πηγή (333)**

Origin	Cultivar	Total Phenol Content (Range) (mg/kg)
<b>2007–2008</b>		
Crete (Chania)	Koroneiki ( <i>n</i> = 26)	138–441
	Tsounati* ( <i>n</i> = 9)	173–641
Crete (Rethimnon)	Koroneiki ( <i>n</i> = 25)	65–320
	Throubolia ( <i>n</i> = 5)	118–294
Crete (Sitia)	Koroneiki ( <i>n</i> = 23)	95–351
<b>2005–2006</b>		
Crete (Heraklion)	Koroneiki ( <i>n</i> = 2)	53–92
Crete (Chania)	Koroneiki ( <i>n</i> = 6)	25–120
Peloponnisos (Lakonia)	Koroneiki ( <i>n</i> = 1)	95
Peloponnisos (Lakonia)	Tsounati ( <i>n</i> = 7)	72–208
Peloponnisos (Messinia)	Koroneiki ( <i>n</i> = 13)	37–118
Zakynthos	Koroneiki ( <i>n</i> = 12)	49–142
Lesvos	Adramytini ( <i>n</i> = 5)	31–163
<b>2004–2005</b>		
Crete (Heraklion)	Koroneiki ( <i>n</i> = 2)	130–205
Crete (Rethimnon)	Koroneiki ( <i>n</i> = 1)	83
Crete (Chania)	Tsounati ( <i>n</i> = 5)	91–216
Peloponnisos (Lakonia)	Koroneiki ( <i>n</i> = 5)	87–225
Peloponnisos (Messinia)	Koroneiki ( <i>n</i> = 16)	39–189
Zakynthos	Koroneiki ( <i>n</i> = 9)	67–145
Lesvos	Adramytini ( <i>n</i> = 8)	23–212
<b>2003–2004</b>		
Crete (Chania)	Koroneiki ( <i>n</i> = 2)	145–248
Peloponnisos (Lakonia)	Koroneiki ( <i>n</i> = 3)	40–183
Peloponnisos (Lakonia)	Tsounati ( <i>n</i> = 9)	72–225
Peloponnisos (Messinia)	Koroneiki ( <i>n</i> = 9)	82–175
<b>2002–2003</b>		
Crete (Heraklion)	Koroneiki ( <i>n</i> = 7)	77–164
Crete (Heraklion)	Tsounati ( <i>n</i> = 2)	46–86
Crete (Chania)	Koroneiki ( <i>n</i> = 2)	67–108
Crete (Chania)	Tsounati ( <i>n</i> = 2)	89–114
Peloponnisos (Lakonia)	Tsounati ( <i>n</i> = 5)	85–134

\*:“Tsounati” cultivar is also referred as “Mastoeidis” and “Athinolia” [2].

Η περιεκτικότητα των βιοφαινολών εξαρτάται από ένα σύνολο παραγόντων, όπως από την ποικιλία της ελιάς, τον χρόνο συγκομιδής, τη διαδικασία παραγωγής, τις καλλιεργητικές τεχνικές και τις περιβαλλοντικές παραμέτρους (π.χ. το υψόμετρο και το ύψος της άρδευσης), τον βαθμό ωριμότητας του καρπού κατά το μάζεμα, καθώς και τις τεχνολογικές παραμέτρους κατά την εξαγωγή του ελαιολάδου (θέρμανση, προσθήκη νερού και μάλαξη), τα συστήματα εκχύλισης τα οποία χρησιμοποιούνται για τον διαχωρισμό ελαίου από πάστες ελιάς (πίεση, συστήματα φυγοκέντρισης), το ραφινάρισμα, το χρονικό διάστημα και τον τρόπο αποθήκευσης, λόγω της αυθόρμητης οξείδωσης και της εναπόθεσης αιωρούμενων σωματιδίων (176,313).

Συγκεκριμένα, οι γενετικές παραλλαγές μεταξύ των ποικιλιών ελιάς φαίνεται να επηρεάζουν την ποσότητα των πολυφαινολών που υπάρχουν στα ελαιόλαδα και επίσης τις πολυφαινόλες που μεταφέρονται από τον ελαιόκαρπο στο παραγόμενο έλαιο. Επομένως, οι πολυφαινολικές ενώσεις παρουσιάζουν τόσο ποιοτικές όσο και ποσοτικές διακυμάνσεις μεταξύ των ποικιλιών των ελιών και των ελαιολάδων (334,335). Επιπλέον, η σύνθεση των πολυφαινολών του ελαιολάδου μεταβάλλεται κατά την επεξεργασία του καρπού, όπως τα στάδια συμπίεσης και μάλαξης, λόγω της δραστηριότητας ενζύμων (β γλυκοσιδάσες) ή της διάσπασης των ενώσεων που υπάρχουν αρχικά στους καρπούς της ελιάς. Έτσι, οι άγλυκες μορφές της ελευρωπαίνης και τα λιγκστροσίσια όπως η ολεασίνη και η ελαικανθάλη καθώς και της υδροξυτυροσόλης και τυροσόλης αυξάνονται κατά τη διαδικασία παραγωγής του ελαιολάδου (336). Συνεπώς, διαφορετικές τεχνολογικές διεργασίες έχουν διαφορετική επίδραση στην περιεκτικότητα πολυφαινολών του ελαιολάδου (337). Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι μόνο 0,3% -1,5% πολυφαινολών μεταφέρονται από τον καρπό στο ελαιόλαδο, ενώ το 40% καταλήγει στα υγρά απόβλητα ελαιουργείων (334).

Πιο αναλυτικά, κατά τη σύνθλιψη, οι κύριοι γλυκοζίτες που υπάρχουν στον καρπό υδρολύονται με δράση ενδογενών β-γλυκοσιδασών που οδηγούν στο σχηματισμό άγλυκων σεκοϊριδοειδών. Οι θραυστήρες Hammer προτιμούνται από τους θραυστήρες πέτρας για την παραγωγή ελαιολάδων με αυξημένη φαινολική περιεκτικότητα. Η επίδραση των παραμέτρων σύνθλιψης της ελιάς καταδείχθηκε σε μια μελέτη με Ελληνικές ελιές, όπου σημειώθηκαν σημαντικά υψηλότερες τιμές πολυφαινολών σε έλαια που λαμβάνονται χρησιμοποιώντας θραυστήρα Hammer που λειτουργεί στις 3000 και 2500 rpm (333). Επιπλέον, η μετέπειτα διαδικασία μάλαξης της ελιάς τροποποιεί την ποιοτική και ποσοτική σύνθεση των φαινολικών ενώσεων στο παταγώμενο ελαιόλαδο. Οι γλυκοσιδάσες που υπάρχουν στον καρπό της ελιάς και κατά συνέπεια στην πάστα έχουν ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό μορφών άγλυκων σεκοϊριδοειδών, τα οποία στη συνέχεια οξειδώνονται από τα οξειδωτικά ένζυμα των οδών πολυφαινολοξειδάσης (PPO), υπεροξειδάσης (POD) και λιποξυγενάσης (LOX). Αυτά τα ένζυμα επάγονται από την άλεση των ελιών, και είναι ενεργά κατά τη διάρκεια του σταδίου της μάλαξης. Τα ένζυμα αυτά έχουν συν-παραγόντα το οξυγόνο, επομένως η παρουσία οξυγόνου στον κεντρικό χώρο της μηχανής μάλαξης ευνοεί την οξείδωση των φαινολών μειώνοντας τη συγκέντρωσή τους στην πάστα και στο λάδι (333). Το σύστημα παραγωγής επίσης επηρεάζει το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο καθώς



και το ατομικό προφίλ των φαινολών του τελικού προϊόντος. Η σύγκριση των διφασικών και τριφασικών συστημάτων εξαγωγής αποκάλυψε ότι τα έλαια που ελήφθησαν από διφασικά συστήματα περιείχαν περισσότερες ολικές φαινόλες και μεγαλύτερη οξειδωτική σταθερότητα, ενώ παρουσιάζουν έναν ελαφρώς υψηλότερο δείκτη πικρότητας (333). Τέλος, όσον αφορά την επίδραση της διήθησης στα μεμονωμένα φαινολικά, στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί αμφιλεγόμενα αποτελέσματα. Η συνολική φαινολική περιεκτικότητα και οι φαινολικές αλκοόλες μειώνονται, ενώ τα σεκοϊριδοειδή αυξάνονται, πιθανώς λόγω της διαφορετικής εκχυλισσιμότητας διαφορετικών φαινολικών τάξεων παρουσία ή απουσία σταγονιδίων νερού που μεταβάλλει τα ποιοτικά και ποσοτικά αποτελέσματα που λαμβάνονται από την ανάλυση του ελαιολάδου (333).

Κατά τη διεργασία εκχύλισης του ελαιολάδου οι πολυφαινόλες κατανέμονται μεταξύ δύο φάσεων του ελαίου και της υδατικής (338). Η φύση των πολυφαινολικών ενώσεων είναι αμφιφιλική, συνεπώς εμφανίζουν μεγαλύτερη διαλυτότητα στην υδατική φάση σε σύγκριση με την ελαιώδη φάση (339). Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι κάθε ποικιλία μπορεί να απορροφήσει το νερό με διαφορετικό τρόπο, η επίδραση του γενετικού πλαισίου στη μεταφορά των πολυφαινολών από τον ελαιόκαρπο στο λάδι θεωρείται βασικός παράγοντας. Συνεπώς, το μέγεθος της υγρασίας των φρούτων σε κάθε ποικιλία επηρεάζει αρνητικά τη μεταφορά των πολυφαινολικών ενώσεων στο έλαιο (334). Αρκετές αναφορές έχουν δείξει ότι η ποσότητα των φαινολικών ενώσεων σε έλαια που λαμβάνονται από καλλιέργειες που έχουν υποστεί ξηρασία είναι συνήθως υψηλότερη σε σύγκριση με τις αρδευόμενες. Αυτό επιβεβαιώθηκε σε Ελληνικά λάδια. Η μειωμένη παροχή νερού οδήγησε σε αυξημένο συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο (333). Επιπλέον, οι πολυφαινολικές ενώσεις, όπως τα σεκοϊριδοειδή (π.χ. ελευρωπαίνη, λιγκστροσίδη) καθώς επίσης και οι άγλυκες φαινυλαλκοόλες (π.χ. τυροσόλη, υδροξυτυροσόλη), φλαβονοειδή, φαινυλαιθανοϊδή γλυκοζίδια (π.χ. βερμπακοσίδη και λιγνάνες) ποικίλλουν σημαντικά μεταξύ των ποικιλιών και μεταβάλλονται κατά την ανάπτυξη και ωρίμανση των καρπών (340). Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι οι πολυφαινόλες του ελαιολάδου χαρακτηρίζονται από την παρουσία υδροξυτυροσόλης και τυροσόλης. Εν τούτοις, στις περισσότερες περιπτώσεις οι υψηλότερες ποσότητες είναι τα παράγωγα αυτών όπως η ελεοκανθάλη, η ελαιασίνη, τα άγλυκα της ελευρωπαινης και τα λιγκστροσίδια. Συγκεκριμένα, είναι οι ενώσεις που περιέχουν στη βασική τους δομή τμήματα

τυροσόλης και υδρόξυτυροσόλης. Έτσι, η συνολική ποσότητα αυτών των ενώσεων θα μπορούσε να προσδιοριστεί ως ισοδύναμα μετά την υδρόλυση.

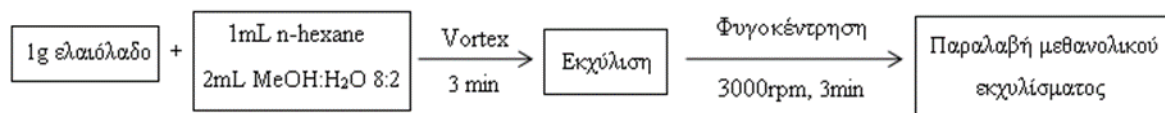
Σκοπός της μελέτης μας είναι να διαλευκανθεί η συμβολή της διαφορετικής πολυφαινολικής σύστασης Ελληνικών ελαιόλαδων διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης, στις αντιοξειδωτικές και αντιγενotoξικές ιδιότητες τους, με σημαντικές διαφορές στη σύνθεση τους όσον αφορά την υδροξυτυροσόλη (HT), την τυροσόλη (T) και τα παράγωγά τους, οι οποίες είναι πολυφαινόλες του ελαιολάδου με ύψιστη βιολογική σημασία. Επιπρόσθετα, προσπαθούμε να κάνουμε μια ολιστική *in vitro* προσέγγιση προκειμένου να λάβουμε δεδομένα, τα οποία θα είναι χρήσιμα σε επακόλουθα *in vivo* πειράματα. Απώτερος στόχος είναι να φανερώσουμε την σημαντικότητα της σύστασης με σκοπό να υιοθετηθούν καλύτερες μέθοδοι καλλιεργητικές, επεξεργασίας και παραγωγής ελαιόλαδων. Τελικός στόχος είναι η μελλοντική παραγωγή ελαιόλαδων υψηλής προστιθέμενης αξίας και βιολειτουργικών σκευασμάτων, που θα συνεισφέρουν στην πρόοδο της υγείας και την αύξηση ζήτησης και αγοράς Ελληνικών τυποποιημένων ελαιόλαδων.

### 6.3 Προέλευση και απομόνωση εκχυλισμάτων

Τα εκχυλίσματα προέρχονται από το εργαστήριο του καθηγητή Λεάνδρου-Αλέξιου Σκαλτσούνη της Φαρμακευτικής σχολής Αθηνών. Τα ελαιόλαδα που μελετήθηκαν σε αυτήν την ενότητα επιλέχθηκαν μεταξύ μιας συλλογής δειγμάτων του εργαστηρίου του κ. Σκαλτσούνη με κριτήριο την πολυφαινολική τους σύσταση. Η επιλογή περιελάμβανε ελαιόλαδα ελιάς *Olea europaea L.*, ποικιλίας Κορωνέικης, που παρήχθησαν στην Ελλάδα και συλλέχθηκαν κατά την περίοδο συγκομιδής 2016/2017 με τις κωδικές ονομασίες: OLE05, OLE17, OLE19, OLE20, OLE50 (Πίνακας 16). Η διαδικασία παραλαβής τους αναφέρεται περιληπτικά.

Για την παραλαβή του συνολικού φαινολικού περιεχομένου (TPF), τα δείγματα εκχυλίστηκαν με μέθοδο εκχύλισης την προτεινόμενη από τον IOC (International Olive Council, 2009 (341)), με μικρές τροποποιήσεις, ώστε να επιταχυνθεί και να αυτοματοποιηθεί η διαδικασία. Συγκεκριμένα, εφαρμόστηκε η τεχνική της υγρής-υγρής εκχύλισης υποβοηθούμενης από φυγοκέντρηση (Centrifugal Liquid-Liquid Extraction - CLLE). 1 g ελαιολάδου διαλύθηκε σε 1 ml n-hexane, το διάλυμα

ανακινήθηκε ελαφρώς. Στη συνέχεια προστέθηκαν 2 ml διαλύματος MeOH/H<sub>2</sub>O (8/2) και αναμείχθηκαν με το ήδη υπάρχον διάλυμα. Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε με έντονη ανάμειξη των διαλυμάτων, με τη βοήθεια vortex για 3 min. Ο διαχωρισμός των δύο φάσεων έλαβε χώρα με φυγοκέντρηση στις 3.000 στροφές/λεπτό για 3 λεπτά. Αφού συλλέχθηκε η κάτω φάση των δειγμάτων, το διαλυμένο στο n-hexane ελαιόλαδο εκχυλίστηκε άλλες δύο φορές με την ίδια διαδικασία. Οι κάτω φάσεις των τριών εκχυλίσεων (οργανικές φάσεις που περιείχαν τα πολικά συστατικά του ελαιολάδου (ολικό φαινολικό κλάσμα - TPF)) συνενώθηκαν και απολιπώθηκαν με n-hexane και εν τέλει συμπυκνώθηκαν προκειμένου να υπολογιστεί το βάρος του φαινολικού φορτίου (**Total Phenolic Fraction - TPF**) κάθε δείγματος (Εικόνα 57). Έτσι παρήχθησαν τα εκχυλίσματα TPF05, TPF17, TPF19, TPF20 και TPF50). Όλα τα εκχυλίσματα προωθήθηκαν σε όξινη υδρόλυση για τον ποσοτικό προσδιορισμό των βιοφαινολών (263). Με τη μέθοδο όξινης υδρόλυσης τα παράγωγα των ΗΤ και Τ υδρολύονται παρέχοντας ΗΤ και Τ επιτρέποντας την ποσοτικοποίησή τους. Το πολικό κλάσμα προερχόμενο από 1g ελαιολάδου, διαλύθηκε σε 1mL μεθανόλης για την πραγματοποίηση της αντίδρασης υδρόλυσης και ακολούθησε ποσοτικός προσδιορισμός τυροσόλης, υδροξυτυροσόλης με HPLC-DAD (Πίνακας 17).



**Εικόνα 57** Διαγραμματική απεικόνιση της διαδικασίας εκχύλισης.

**Πίνακας 16 Σύσταση και προέλευση πολυφαινολικών εκχυλισμάτων λαδιού.**

TPF	Εύρος πολυφαινολικών (mg)	mg HT/20g ελαιολάδου	mg T/20g ελαιολάδου	Σύνολο (HT+T)	ΠΕΡΙΟΧΗ/ΤΟΠΟΣ ΣΥΛΛΟΓΗΣ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΥ	ΠΟΙΚΙΛΙΑ	ΕΙΔΟΣ ΚΑΛΙΠΕΡΓΕΙΑΣ	ΗΜ/ΝΙΑ ΣΥΛΛΟΓΗΣ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΥ	ΗΜ/ΝΙΑ ΕΛΑΙΟΠΟΙΗΣΗΣ	ΤΡΟΠΟΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
OLE05	17,4	0,86	2,16	3,02	ΑΡΧΑΝΕΣ, ΗΡΑΚΛΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ	ΚΟΡΩΝΕΪ ΚΗ	ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ	02/11/2016	04/11/2016	ΔΙΦΑΣΙΚΟ
OLE17	9,2	2,35	1,31	3,66	ΕΛΙΑ-ΚΟΥΡΚΟΥΛΑ - ΛΑΚΩΝΙΑΣ	ΚΟΡΩΝΕΙ ΚΗ	ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΗΣ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ	05/02/2017	06/02/2017	ΤΡΙΦΑΣΙΚΟ
OLE19	9,6	2,56	1,73	4,29	ΦΟΙΝΙΚΙ - ΛΑΚΩΝΙΑΣ	ΚΟΡΩΝΕΙ ΚΗ	ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΗΣ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ	05/02/2017	06/02/2017	ΤΡΙΦΑΣΙΚΟ
OLE20	8,3	1,42	1,41	2,83	ΓΛΥΚΟΒΥΣΗ - ΛΑΚΩΝΙΑΣ	ΚΟΡΩΝΕΙ ΚΗ	ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΗΣ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ	05/02/2017	06/02/2017	ΤΡΙΦΑΣΙΚΟ
OLE50	8,1	1,08	1,12	2,2	ΛΑΣΙΘΙ-ΚΡΗΤΗ	ΚΟΡΩΝΕΙ ΚΗ	ΣΥΜΒΑΤΙΚΗ	05/02/2017	06/02/2017	ΤΡΙΦΑΣΙΚΟ

**Πίνακας 17 Συγκεντρώσεις (mg/ g ελαιολάδου) των βιοφαινολικών: υδροξυτυροσόλη (HT), τυροσόλη (T) και τα παράγωγά τους (δεσμευμένες μορφές).**

Εκχύλισμα	mg HT/ g ελαιολάδου	mg T/ g ελαιολάδου	mg παράγωγα HT/ g ελαιολάδου	mg παράγωγα T/ g ελαιολάδου
OLE05	0,043	0,108	0,095	0,270
OLE17	0,117	0,066	0,257	0,165
OLE19	0,128	0,087	0,282	0,217
OLE20	0,071	0,071	0,156	0,177
OLE50	0,054	0,056	0,119	0,140

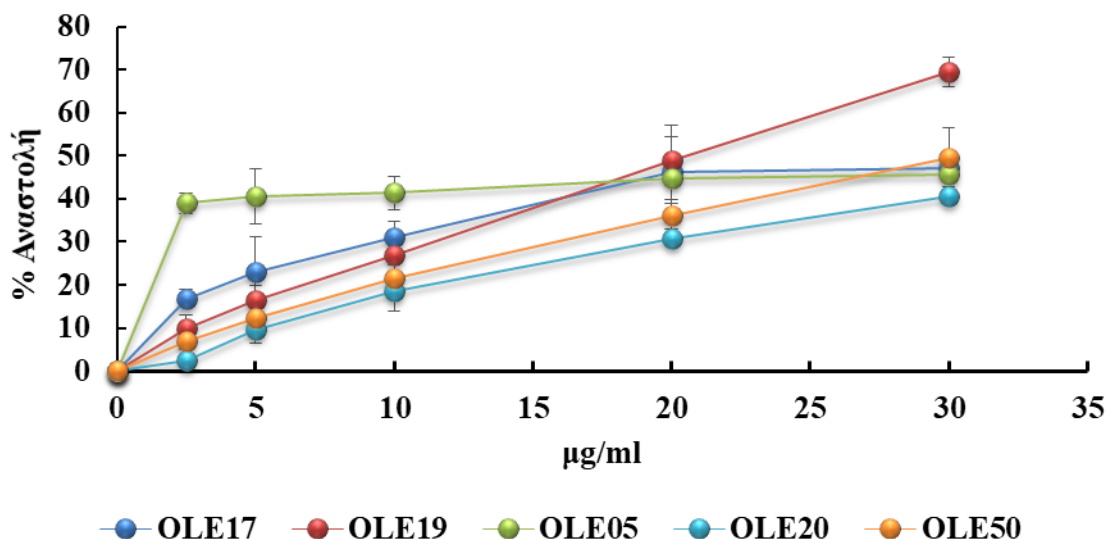
Λαμβάνοντας υπόψη τα επίπεδα συγκέντρωσης HT και T στο TPF (Πίνακας 17), είναι προφανές ότι τα υπό εξέταση ελαιόλαδα είναι επίσης πλούσια σε παράγωγα HT και T. Τα πιο αντιπροσωπευτικά είναι τα άγλυκα σεκοριδοειδή. Πρέπει να σημειωθεί ότι οι φαινολικές αλκοόλες, συμπεριλαμβανομένων των HT και T, εμφανίζονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις στα φρέσκα ελαιόλαδα, ένα φαινόμενο που αντιστρέφεται κατά την αποθήκευσή τους (342). Το τελευταίο μπορεί να σχηματιστεί με την υδρόλυση των σεκοϊριδοειδών, όπως η ελαιασίνη (3,4-DHPEA-EDA), η ελεοκανθάλη (pHPEA-EDA), ισομερή άγλυκων ελευρωπαίνης (3,4-DHPEA-EA) καθώς και άγλυκα παράγωγα ελευρωπαίνης και λιγκστροσίδης (p-HPEA-EA) που περιέχουν 3,4-DHPEA και p-HPEA στις μοριακές τους δομές (343). Επιπλέον, αυτές οι ουσίες μπορούν επίσης να προέρχονται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας μηχανικής εκχύλισης του

ελαιόλαδου μετά την υδρόλυση της ελευρωπαϊκής, της διμεθυλελευρωπαϊκής και της λιγκτροσίδης. Η διαδικασία αυτή είναι γνωστό ότι καταλύεται από ενδογενείς β-γλυκοσιδάσες (344). Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 17, τα OLE20 και OLE50 θα μπορούσαν να θεωρηθούν ίσα στα επίπεδα συγκέντρωσης των HT και T παραγώγων, σε αντίθεση με το OLE05 που είναι πλούσιο σε T και OLE17, OLE19 τα οποία είναι πλούσια σε HT.

## **6.4 Αποτελέσματα**

### **6.4.1 Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων μέσω της ρίζας ABTS<sup>•+</sup>.**

Όπως υποδεικνύεται από τα αποτελέσματα σχετικά με τη δοκιμασία ABTS<sup>•+</sup>, όλα τα εκχυλίσματα παρουσίασαν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση σε σύγκριση με τη βιταμίνη C (ουσία αναφοράς) (Πίνακας 18 & Διάγραμμα 33). Η ουσία αναφοράς μας ήταν η βιταμίνη C, η οποία σύμφωνα με τους Kim και συνεργάτες (2002) (345) χρησιμοποιείται ευρέως με αυτόν τον τρόπο για να εκτιμηθεί η αντιοξειδωτική δράση των επιθυμητών ενώσεων. Παρατηρήσαμε ότι η τιμή IC<sub>50</sub> της βιταμίνης C είναι ίση με 6,5 μg/ml ενώ οι τιμές IC<sub>50</sub> των εκχυλισμάτων μας κυμαίνονται μεταξύ 28,6 και 46,6 μg/ml. Συγκεκριμένα, οι τιμές IC<sub>50</sub> των OLE17, OLE19, OLE05, OLE20 και OLE50 βρέθηκαν ίσες με 28,6, 20,8, 46,6, 35,7 και 29,6 μg/ml, αντίστοιχα. Δεδομένου ότι τα εκχυλίσματα μας είναι ένα μείγμα ενώσεων, αντίθετα με τη βιταμίνη C που είναι καθαρή ένωση, συμπεραίνουμε ότι ασκούν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Το IC<sub>50</sub> αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση των εξεταζόμενων ενώσεων που απαιτούνται για 50% μείωση της ρίζας ABTS<sup>•+</sup>. Όσο πιο χαμηλή η τιμή IC<sub>50</sub> τόσο πιο ισχυρή αντιοξειδωτική δράση παρουσιάζει ένα εκχύλισμα. Με βάση τα αποτελέσματα τα OLE17 και OLE19 είχαν ισχυρότερη αντιοξειδωτική ισχύ σε σύγκριση με τα OLE20, OLE50 και OLE05, με το τελευταίο να είναι το ασθενέστερο εκχύλισμα.



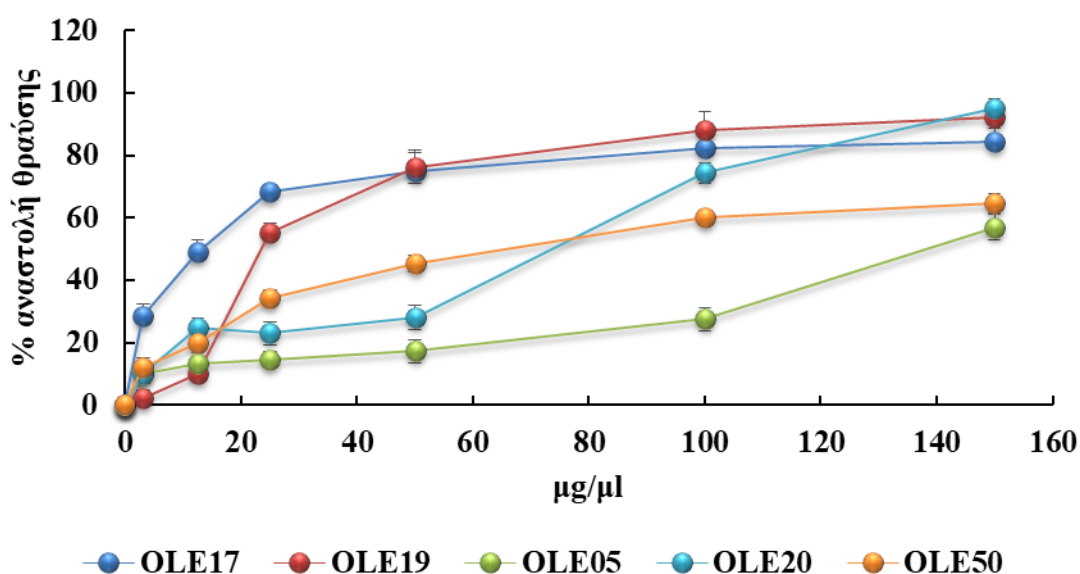
**Διάγραμμα 33** Αντιοξειδωτική ικανότητα εκχυλισμάτων ελαιολάδου που μετράται από την ικανότητά τους να εξουδετερώνουν την τεχνητή ρίζα ABTS<sup>•+</sup>. OLE17 ( $R^2 = 0,9$ ), OLE19 ( $R^2 = 1$ ) είναι πλούσια σε HT. OLE05 ( $R^2 = 0,9$ ) είναι πλούσιο σε T και OLE20 ( $R^2 = 1$ ), OLE50 ( $R^2 = 1$ ) ίση ποσότητα HT και T. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως  $\pm$  SEM,  $n = 3$ ). HT: υδροξυτυροσόλη, T: τυροσόλη.

**Πίνακας 18** Οι τιμές IC<sub>50</sub> των εκχυλισμάτων ελαιολάδου όπως υπολογίσθηκαν για τη μέθοδο ABTS<sup>•+</sup>. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ). OLE17, OLE19 είναι πλούσια σε HT ελαιόλαδα. OLE05 είναι ελαιόλαδο πλούσιο σε T και OLE20, OLE50 είναι ελαιόλαδα με ίση ποσότητα HT και T. Οι τιμές χωρίς κοινό γράμμα διαφέρουν σημαντικά ( $p < 0,05$ ). HT; Υδροξυτυροσόλη, T; Τυροσόλη.

Εκχύλισμα	IC <sub>50</sub> (μg/ml)
OLE17	28,6 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>
OLE19	20,8 $\pm$ 0,1 <sup>β</sup>
OLE05	46,6 $\pm$ 0,5 <sup>γ</sup>
OLE20	35,7 $\pm$ 0,4 <sup>δ</sup>
OLE50	29,6 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>

**6.4.2** Εκτίμηση αντιγενετοξικής ικανότητας εκχυλισμάτων μέσω της ικανότητας προστασίας του πλασμιδιακού DNA από προκαλούμενες θραύσεις μέσω της ρίζας ROO<sup>•</sup>.

Τα αποτελέσματα για τον ποσοτικό προσδιορισμό προστασίας του πλασμιδίου (Διάγραμμα 34 & Πίνακας 19) έδειξαν ότι τα OLE17 και OLE19 είχαν τις χαμηλότερες τιμές IC50 και, συνεπώς, την υψηλότερη αντιγενετοξική ικανότητα. Συγκεκριμένα, οι τιμές IC50 των OLE17 και OLE19 υπολογίστηκαν στα 1,4 και 2,3 μg/μl, αντίστοιχα. Επιπλέον, τα OLE20 και OLE50 ήταν λιγότερο ισχυρά με IC50 στα 7,4 μg/μL και 6,6 μg/μl, αντίστοιχα. Τέλος, το OLE05 με IC50 στα 13,3 μg/μl έδειξε τη χαμηλότερη ικανότητα να προστατεύει το DNA από τις επιζήμιες επιδράσεις των ριζών ROO•.



**Διάγραμμα 34 Η αντιγενετοξική ικανότητα των εξετασθέντων εκχυλισμάτων ελαιόλαδου που μετράται με την ικανότητά τους να προστατεύουν τις θραύσεις του πλασμιδιακού DNA που επάγονται από ρίζες ROO•. OLE17 ( $R^2 = 0,8$ ), OLE19 ( $R^2 = 0,8$ ) είναι πλούσια σε HT ελαιόλαδα. OLE05 ( $R^2 = 0,9$ ) είναι ελαιόλαδο πλούσιο σε T και OLE20 ( $R^2 = 0,9$ ), OLE50 ( $R^2 = 0,8$ ) είναι ελαιόλαδα με ίση ποσότητα HT και T. Όλα τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SEM (n = 3). HT: υδροξυτυροσόλη, T: τυροσόλη.**

**Πίνακας 19** Οι τιμές IC50 των εκχυλισμάτων ελαιολάδου όπως υπολογίσθηκαν με τη δοκίμασια προστασίας του πλασμιδιακού DNA. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SEM (n = 3). OLE17, OLE19 είναι πλούσια σε HT ελαιόλαδα. OLE05 είναι ελαιόλαδο πλούσιο σε T και OLE20, OLE50 είναι ελαιόλαδα με ίση ποσότητα HT και T. Οι τιμές χωρίς κοινό γράμμα διαφέρουν σημαντικά (p <0,05). HT; Υδροξυτυροσόλη, T; Τυροσόλη.

Εκχύλισμα	IC50 (μg/μl)
OLE17	1,4 $\pm$ 0,9 <sup>α</sup>
OLE19	2,3 $\pm$ 1,1 <sup>α</sup>
OLE05	13,3 $\pm$ 1,0 <sup>β</sup>
OLE20	7,4 $\pm$ 1,1 <sup>γ</sup>
OLE50	6,6 $\pm$ 1,7 <sup>γ</sup>

### 6.4.3 Χορήγηση των εκχυλισμάτων ελαιόλαδου στην κυτταρική σειρά HeLa

#### 6.4.3.1 Έλεγχος κυτταροτοξικότητας με το εμπορικό κιτ XTT

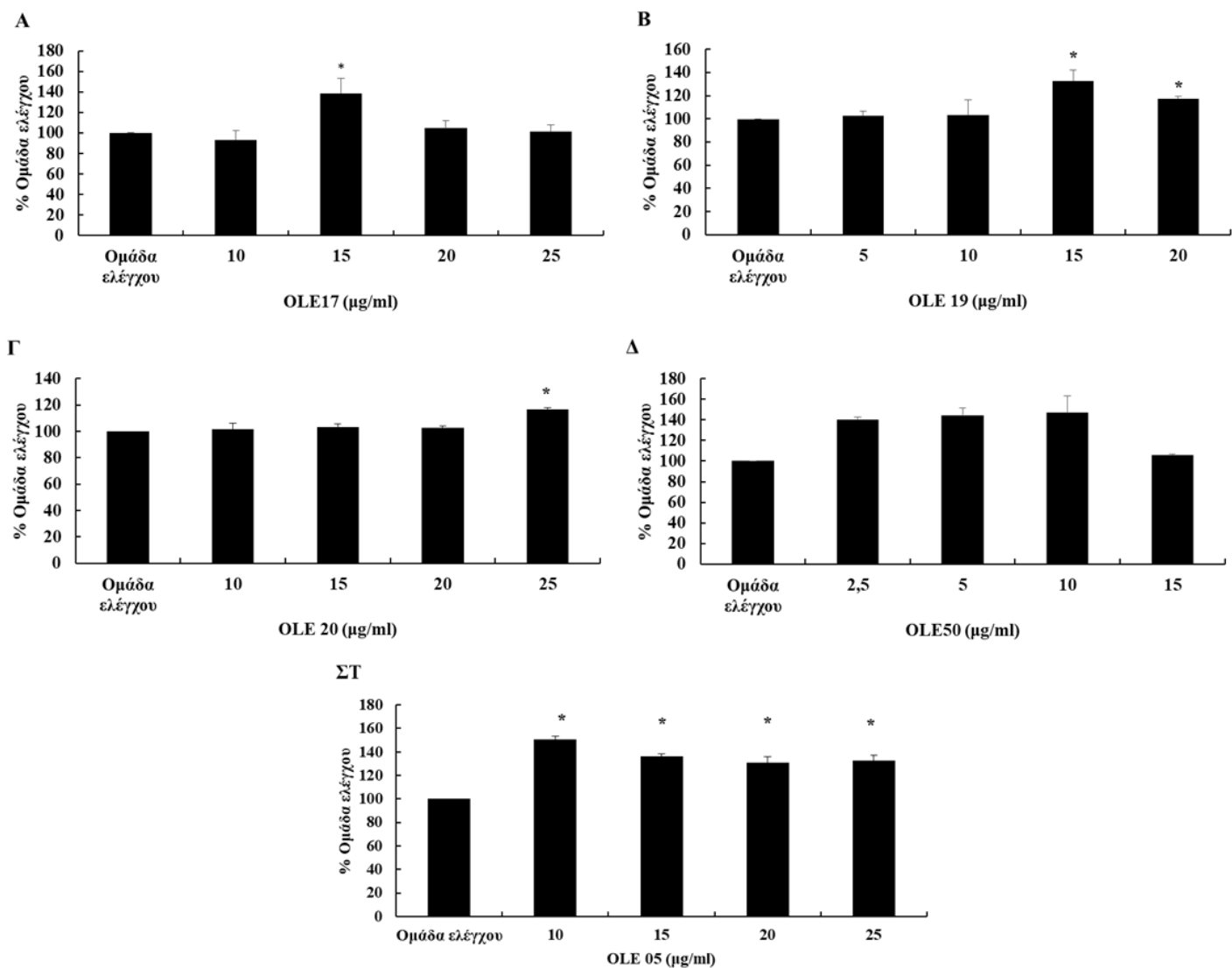
Στην ενότητα αυτή έγινε εκτίμηση της ικανότητας των εκχυλισμάτων ελαιολάδου να επηρεάζουν το οξειδοαναγωγικό δυναμικό των κυττάρων HeLa. Τα HeLa, επελέγησαν καθώς οι πολυφαινόλες παίζουν ζωτικό ρόλο, μεταξύ των χημειοπροστατευτικών παραγόντων, στην πρόληψη του καρκίνου. Αρχικά, μέσω της δοκιμασίας XTT έγινε αξιολόγηση των μη-κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα OLE19 και OLE17 επέδειξαν κυτταροτοξικότητα σε συγκεντρώσεις > 30 μg, το OLE50 στα 20 μg και τα OLE20 και OLE05 σε >50 μg εκχυλίσματος.

#### 6.4.3.2 Επίδραση εκχυλισμάτων στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό των HeLa.

Τα αποτελέσματα από την κυτταρομετρία ροής έδειξαν πως όλα τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα ελαιολάδου αύξησαν σημαντικά τα επίπεδα της GSH σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (Διάγραμμα 35). Αρχικά όσον αφορά τα πλούσια σε HT ελαιόλαδα, το OLE17 (Διάγραμμα 35 A) αύξησε τα επίπεδα της GSH στα 15 μg του εκχυλίσματος κατά 39% και το OLE19 (Διάγραμμα 35 B) αύξησε τα επίπεδα GSH κατά 33% και 18% στα 15,0 και 20,0 μg αντίστοιχα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Όσον αφορά τον πλούσιο σε T ελαιόλαδο, το OLE05 (Διάγραμμα 35 ΣΤ) αύξησε τα επίπεδα της GSH

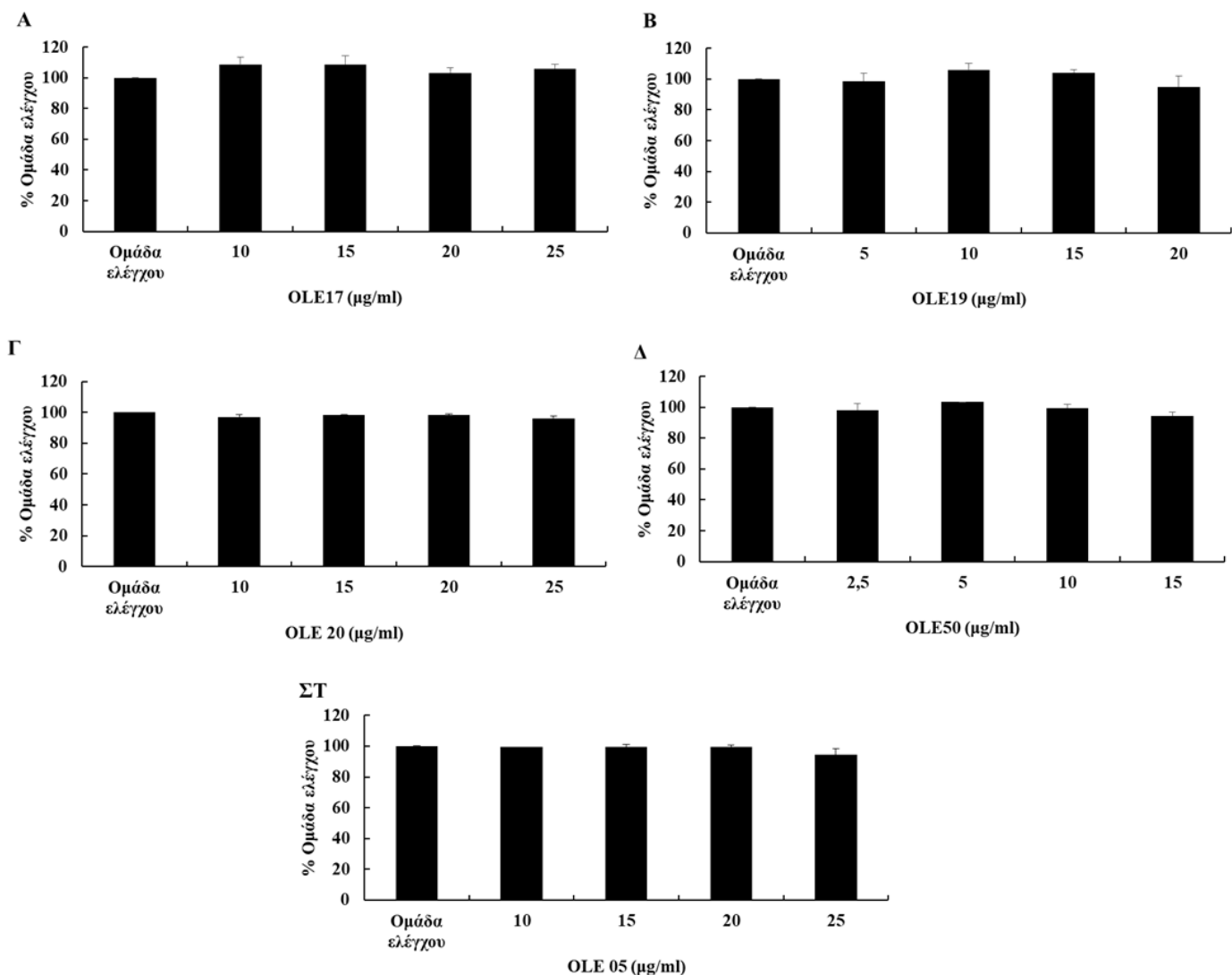


κατά 51%, 36%, 31% και 33% στα 10,0, 15,0, 20,0 και 25,0  $\mu\text{g}$ , συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, αντίστοιχα. Τέλος, τα επίπεδα GSH βρέθηκαν επίσης αυξημένα μετά από επώαση με τα ελαιόλαδα με ίση ποσότητα ΗΤ και Τ. Συγκεκριμένα, το OLE20 (Διάγραμμα 35 Γ) αύξηση κατά 17% στα 25.0  $\mu\text{g}$  και το OLE50 (Διάγραμμα 35 Δ) κατά 40%, 44% και 47% 5.0 και 10.0  $\mu\text{g}$ , αντίστοιχα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου.



**Διάγραμμα 35** Τα επίπεδα GSH κυττάρων HeLa μετά από 24 ώρες χορήγησης των εκχυλισμάτων ελαιολάδου (Α) OLE17. (Β) OLE19. (Γ) OLE20. (Δ) OLE50. (ΣΤ) OLE05. Οι μπάρες δείχνουν τα επίπεδα GSH, όπως υπολογίζεται από το λογισμικό BD Cell Quest. Όλα τα αποτελέσματα εκφράζονται ως το μέσο όρο  $\pm$  SEM των 4 πειραμάτων ( $n = 4$ ). \*  $P < 0,05$  έδειξε μια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των εκχυλισμάτων και της ομάδας ελέγχου. GSH: Glutathione.

Σε αντίθεση με την GSH, τα επίπεδα ROS δεν επηρεάστηκαν σημαντικά από κανένα εκχύλισμα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (Διάγραμμα 36). Θα πρέπει να αναφερθεί ότι τα επίπεδα ROS αντιστοιχούν στα φυσικά απαντώμενα επίπεδα στα κύτταρα HeLa, καθώς δεν υπήρξε καμία επεξεργασία των κυττάρων με οξειδωτικούς παράγοντες πριν από την προσθήκη των εκχυλισμάτων.



**Διάγραμμα 36** Τα επίπεδα ROS κυττάρων HeLa μετά από 24 ώρες χορήγησης των εκχυλισμάτων ελαιολάδου (A) OLE17. (B) OLE19. (Γ) OLE20. (Δ) OLE50. (ΣΤ) OLE05. Οι μπάρες δείχνουν τα επίπεδα ROS, όπως υπολογίζεται από το λογισμικό BD Cell Quest. Όλα τα αποτελέσματα εκφράζονται ως το μέσο όρο  $\pm$  SEM των 4 πειραμάτων ( $n = 4$ ). \*  $P < 0,05$  έδειξε μια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των εκχυλισμάτων και της ομάδας ελέγχου. ROS: Reactive oxygen species.

#### 6.4.3.3 Επίπεδα γονιδιακής έκφρασης με qPCR

Στην συγκεκριμένη ενότητα αναλύεται η επίδραση των εκχυλισμάτων ελαιολάδου στην έκφραση γονιδίων στόχου του Nrf2 σε κύτταρα HeLa μετά από τη χορήγηση τους για 3, 12 και 24 ώρες, χρησιμοποιώντας qPCR. Τα εκχυλίσματα επιλέχθηκαν για περαιτέρω ανάλυση, προκειμένου να ρίξουν φως στον μοριακό μηχανισμό δράσης των ελαιολάδων. Με βάση τη βιβλιογραφία, οι πολυφαινόλες είναι ικανές να προκαλέσουν την αποδέσμευση του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 από την Keap1 και την επακόλουθη μετατόπιση του από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα, όπου συνδεδεμένος σε αλληλουχίες ARE επάγει την έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στην αντιοξειδωτική άμυνα του κυττάρου (309). Η συγκέντρωση που επιλέχθηκε για το κάθε εκχύλισμα ήταν αυτή που προκάλεσε τη μέγιστη αύξηση στα επίπεδα GSH και αξιολογήθηκαν διαδοχικά για την επίδρασή τους επί των επιπέδων γονιδιακής έκφρασης των γονιδίων στόχων Nrf2. Συγκεκριμένα, για τα OLE17 και OLE19 χορηγήθηκαν 15 μg, για τα OLE50 και OLE05 10 μg, και το OLE20 20 μg.

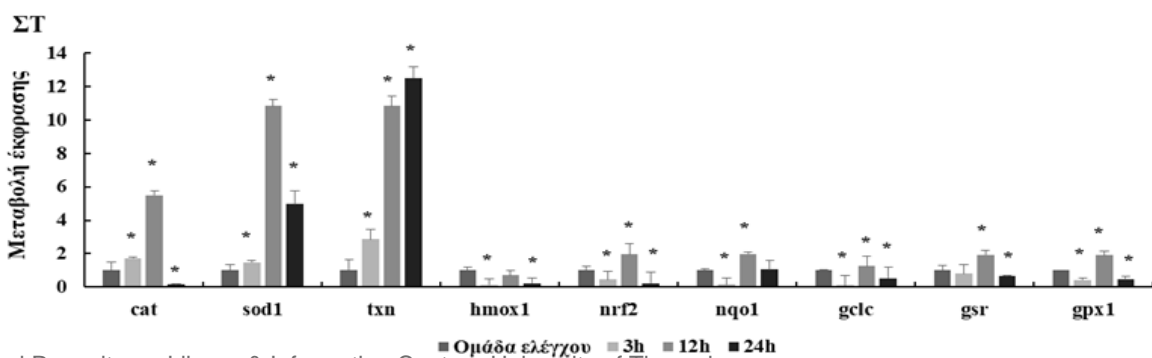
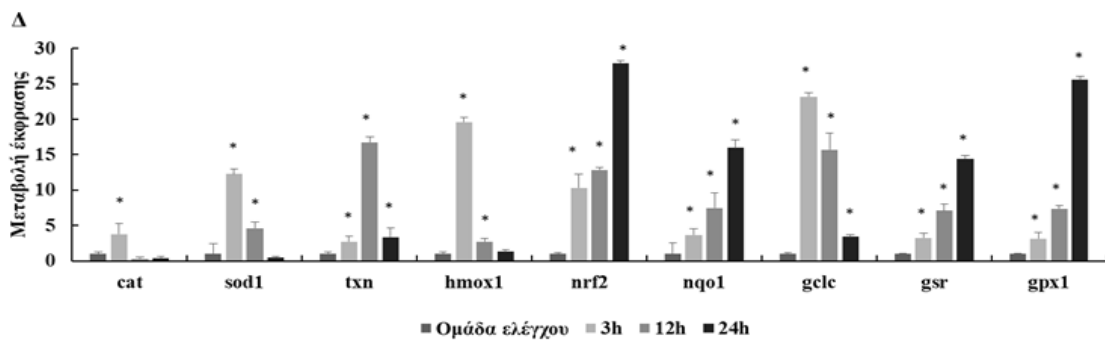
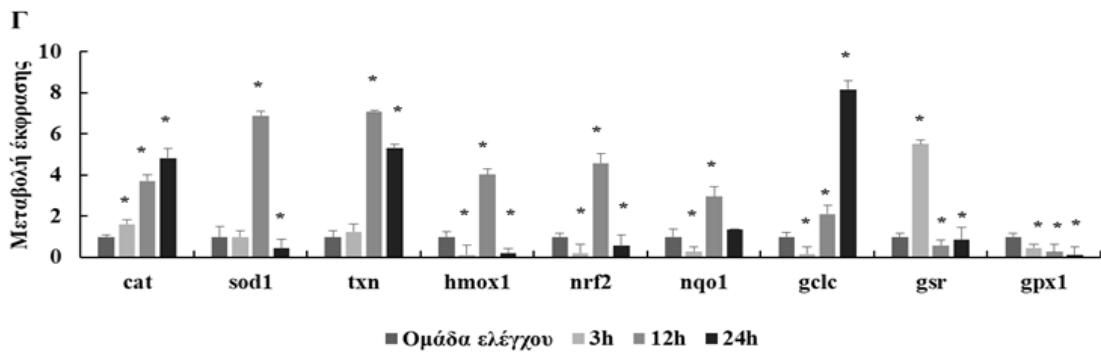
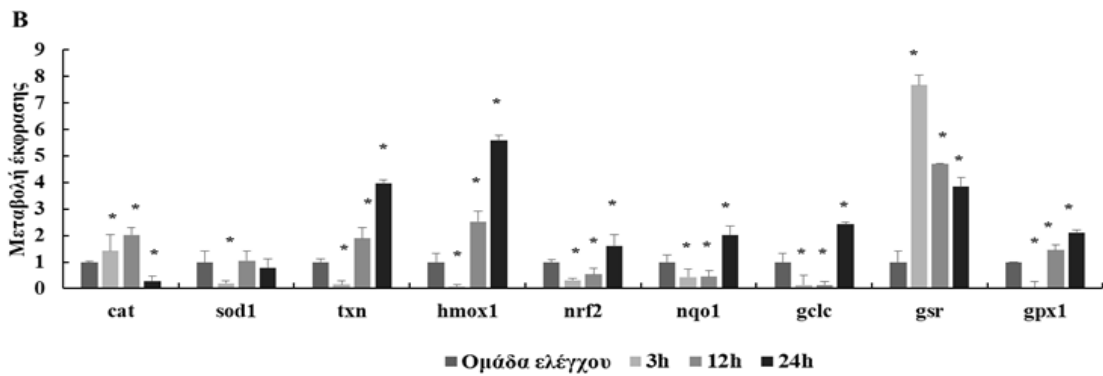
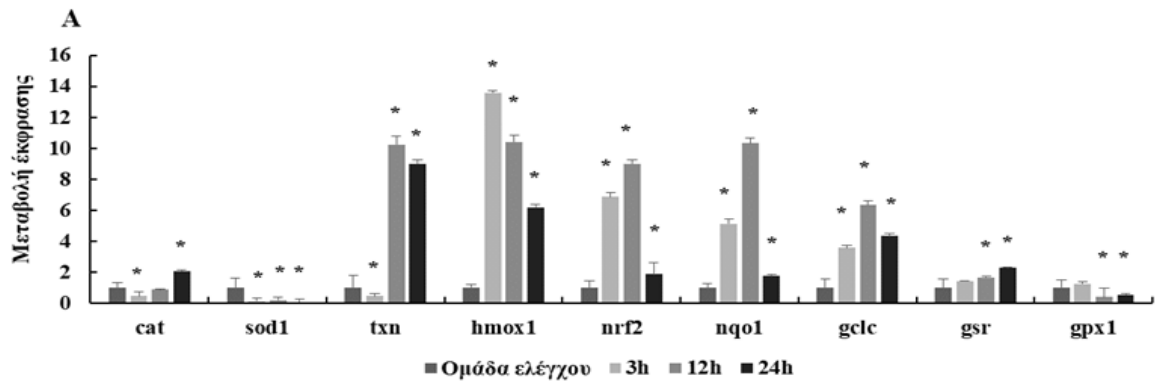
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα (Διάγραμμα 37), όλα τα εκχυλίσματα αύξησαν τα περισσότερα από τα εξεταζόμενα γονίδια σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Ακολουθώς παρουσιάζουμε το μεγαλύτερο ποσοστό αύξησης της γονιδιακής έκφρασης που υποδεικνύει το πιο ισχυρό βιολογικό αποτέλεσμα. Συγκεκριμένα, το OLE17 (Διάγραμμα 37 A) προκάλεσε την αύξηση στην έκφραση της *cat* κατά 2,06 φορές στις 24h, της *txn* κατά 10 φορές στις 12h, της *hmox1* κατά 13 φορές στις 3h, του *nrf2* κατά 9 φορές στις 12h, του *nqo1* κατά 10,3 φορές στις 12h, της *gclc* 6,3 φορές στις 12 ώρες, της *gsr* κατά 12,3 φορές στις 24 ώρες και της *gpx1* κατά 1,2 φορές στις 3 ώρες. Από την άλλη πλευρά, τα επίπεδα των *sod1* και *gpx1* μειώθηκαν μόνο στις 12 και 24 ώρες.

Μετά τη χορήγηση του OLE19 (Διάγραμμα 37 B), παρατηρήθηκε αύξηση στα επίπεδα *cat* 2 φορές στις 12 ώρες, της *sod1* κατά 1,04 φορές στις 12h, της *txn* κατά 5,6 φορές στις 24h, της *hmox1* κατά 5,6 φορές στις 24h, του *nrf2* κατά 1,6 φορές στις 24h, του *nqo1* κατά 2,02 φορές στις 24h, της *gclc* κατά 2,4 φορές στις 24h, της *gsr* κατά 7,7 φορές στις 3h και της *gpx1* κατά 2,1 φορές στις 24h. Αντίθετα, η πλειονότητα των γονιδίων βρέθηκαν μειωμένα κυρίως στις 3 ώρες.

Η χορήγηση του OLE20 (Διάγραμμα 37 Γ) προκάλεσε αύξηση στην έκφραση των γονιδίων σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου και ειδικότερα στη *cat* 4,8 φορές στις 24 ώρες, της *sod1* κατά 6,9 φορές στις 12 ώρες, της *txn* κατά 7,1 φορές στις 12 ώρες, της *hmox1* κατά 4,5 φορές στις 12 ώρες, του *nrf2* κατά 2,9 φορές στις 12h, της *nqo1* κατά 2,9 φορές στις 24h, της *gclc* κατά 8,2 φορές στις 24h, της *gsr* κατά 5,5 φορές στις 3h, ενώ σημαντική μείωση παρατηρήθηκε στα υπόλοιπα χρονικά σημεία χορήγησης.

Επιπροσθέτως, η χορήγηση του OLE50 (Διάγραμμα 37 Δ) προκάλεσε αύξηση στην έκφραση των ακόλουθων γονιδίων: *cat* 3,8 φορές στις 3 ώρες, *sod1* κατά 12,2 φορές στις 3 ώρες, *txn* κατά 16,7 φορές στις 12h, *hmox1* κατά 19,6 φορές στις 3h, *nrf2* κατά 27,9 φορές στις 24 ώρες, *nqo1* κατά 15,9 φορές στις 24 ώρες, *gclc* κατά 23,2 φορές στις 3 ώρες, *gsr* κατά 14,4 φορές στις 24 ώρες και *gpx1* κατά 25,5 φορές στις 24 ώρες.

Τέλος, το OLE05 αύξησε (Διάγραμμα 37 ΣΤ) την έκφραση της *cat* 5,5 φορές στις 12 ώρες, της *sod1* κατά 10,8 φορές στις 12h, της *txn* κατά 12,5 φορές στις 24h, του *nrf2* κατά 1,9 φορές στις 12h, της *nqo1* κατά 1,9 φορές στις 12h, της *gclc* 1,3 φορές στις 12 ώρες, της *gsr* 1,9 φορές στις 12 ώρες και της *gpx1* κατά 1,9 φορές στις 12 ώρες.



**Διάγραμμα 37** Επίδραση των εκχυλισμάτων ελαιολάδου στην ποσοτική έκφραση γονιδίων στόχου του μεγραφικού παράγοντα Nrf2 σε κύτταρα HeLa μετά από χορήγηση των εκχυλισμάτων για 3, 12 και 24 ώρες, χρησιμοποιώντας qPCR. Α) OLE17 (15μg/ml) Β) OLE19 (15μg/ml) Γ) OLE20 (25μg/ml) Δ) OLE50 (10μg/ml) ΣΤ) OLE05 (10μg/ml). Όλα τα αποτελέσματα έχουν κανονικοποιηθεί τόσο ως προς τα επίπεδα έκφρασης των κυττάρων της ομάδας ελέγχου (που δεν έλαβαν εκχύλισμα), όσο και ως προς το γονίδιο κανονικοποίησης *gapdh*. Ο αστερίσκος (\*) υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p < 0,05$ ) σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης των κυττάρων της ομάδας ελέγχου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SEM (n=3).

## 6.5 Συζήτηση

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκαν οι πιθανές αντιοξειδωτικές και αντιγενετοξικές ιδιότητες 5 πολυφαινολικών εκχυλισμάτων παρθένων Ελληνικών ελαιόλαδων. Τα εκχυλίσματα ποικίλουν ως προς την περιεκτικότητά τους σε παράγωγα HT και T, τα οποία είναι οι κύριες πολυφαινολικές ενώσεις που υπάρχουν στο ελαιόλαδο με πολλές ευεργετικές ιδιότητες για την ανθρώπινη υγεία. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που ελήφθησαν, τα εκχυλίσματα πλούσια σε HT εμφάνισαν ισχυρότερες αντιοξειδωτικές και αντιγενετοξικές ιδιότητες στις *in vitro* δοκιμές. Αντίθετα, το πλούσιο σε T εκχύλισμα ήταν το πιο αποτελεσματικό στην αύξηση των επιπέδων GSH στην κυτταρική σειρά HeLa, ενώ καμία από τις εξεταζόμενες ενώσεις δεν είχε οποιαδήποτε επίδραση στα επίπεδα ROS. Αξίζει να αναφερθεί ότι η HT και η T απελευθερώνονται μετά από την υδρόλυση της ελαιοκανθάλης και της ελαιασίνης αντίστοιχα, από ενδογενή ένζυμα κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του καρπού της ελιάς, και κατά τη μάλαξη (170). Για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων ελαιολάδου χρησιμοποιήσαμε δύο διαφορετικά μοντέλα, δηλαδή τεχνικές βασισμένες σε χημικές αντιδράσεις και σε κυτταροκαλλιέργειες. Αν και οι κυτταροκαλλιέργειες θεωρούνται ένα *in vitro* σύστημα, λόγω του γεγονότος ότι είναι μεταβολικά δραστικές, αποτελούν μια σύνδεση με *in vivo* συνθήκες (342).

Σε μελέτη όπου διεξήχθη σε Ελληνικά ελαιόλαδα από διαφορετικές περιοχές και ποικιλίες φάνηκε ότι το συνολικό περιεχόμενο σε HT και παράγωγα ήταν για την ποικιλία Κορωνάικη από την Κρήτη 8,6-330 mg/kg, από την Πελοπόννησο 3,4-132 mg/kg, την Ζάκυνθο 13,1-83 mg/kg. Για την ποικιλία Μαστοελία από την Κρήτη 14,7-432 mg/kg, την Πελοπόννησο 13,7-131 mg/kg. Για την Θρουμποελιά της Κρήτης 52,1-201 mg/kg και τέλος για την Ανδραμύτικη της Λέσβου 7,1-121 mg/kg. Τα αντίστοιχα

επίπεδα T και παραγώγων ήταν για την ποικιλία Κορωνάικη από την Κρήτη 8,9-54,5 mg/kg, από την Πελλοπόνησο 9,1-40,3 mg/kg, την Ζάκυνθο 23,8-81,2 mg/kg. Για την ποικιλία Μαστοελία από την Κρήτη 16,1- 136 mg/kg, την Πελλοπόνησο 27,1-131 mg/kg. Για την Θρουμποελιά της Κρήτης 40,3 -87,8 mg/kg και τέλος για την Ανδραμύτικη της Λέσβου 7,7-72,91 mg/kg (333) .

Σύμφωνα με την ικανότητα των εκχυλισμάτων να εξουδετερώνουν την τεχνητή ρίζα ABTS<sup>•+</sup>, όλα τα εκχυλίσματα είχαν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Ωστόσο, τα εκχυλίσματα πλούσια σε HT φαίνεται να είναι πιο ισχυρά αντιοξειδωτικά σε σύγκριση με το πλούσιο σε T, ενώ ενώσεις με κοινές δομές παρουσίασαν παρόμοια αντιοξειδωτική δράση. Αξίζει να σημειωθεί ότι η αντιοξειδωτική δράση μιας πολυφαινολικής ένωσης ενισχύεται καθώς αυξάνεται ο αριθμός των φαινολικών ομάδων που υπάρχουν στο μόριο (283). Συγκεκριμένα, μόρια με τμήματα ο-διϋδροξυλίου έχουν υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα μέσω του σχηματισμού δεσμών υδρογόνου με ελεύθερες ρίζες. Επιπλέον, μια ουσία δότης ηλεκτρονίων σε θέση "όρθο" φαίνεται να εξασθενεί τον δεσμό O-H της πολυφαινόλης, παρέχοντας έτσι μεγαλύτερη σταθερότητα στην ρίζα φαινοξυλίου (325). Επομένως, όταν ένα αντιοξειδωτικό αντιδρά με μια ελεύθερη ρίζα, παρέχει ένα ηλεκτρόνιο και γίνεται αδύναμη, μη τοξική ελεύθερη ρίζα (326). Για το σκοπό αυτό, η HT παρουσιάζει υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σύγκριση με την T που υποδεικνύει ότι η υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων πλούσιων σε HT μπορεί να οφείλεται στον υψηλότερο αριθμό ομάδων υδροξυλίου του μορίου της HT.

Η αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών του ελαιολάδου έχει εξεταστεί διεξοδικά. Συγκεκριμένα, σε μια μελέτη που διεξήχθη από την ερευνητική μας ομάδα (268), ένα πολυφαινολικό κλάσμα ελαιολάδου είχε τη δυνατότητα να εξουδετερώσει *in vitro* τόσο την ρίζα ABTS<sup>•+</sup> όσο και την ρίζα DPPH<sup>•</sup>. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι η ικανότητα του ελαιολάδου να εξουδετερώνει τη ρίζα του DPPH<sup>•</sup> συσχετίζεται με την περιεκτικότητά του σε πολυφαινόλες (346). Μια σχετική μελέτη έδειξε ότι τα επίπεδα ωριμότητας του ελαιοκάρπου μειώνουν την περιεκτικότητα των εκχυλίσματα ελαιολάδου σε πολυφαινολική περιεκτικότητα και κατά συνέπεια την αποτελεσματικότητά τους (347). Επομένως, είναι σημαντικό να ελέγχεται το επίπεδο ωρίμανσης της ελιάς ώστε να επιτυγχάνεται ο βέλτιστος χρόνος συγκομιδής (347).

Ομοίως με το αντιοξειδωτικό δυναμικό, τα εκχυλίσματα απεικονίζουν το ίδιο μοτίβο στην δοκιμασία προστασίας του πλασμιδιακού DNA. Συγκεκριμένα, τα OLE17 και OLE19, δηλαδή τα εκχυλίσματα με την υψηλότερη συγκέντρωση HT και παραγώγων της, εμφάνισαν τις χαμηλότερες τιμές IC50, εξου και η ισχυρότερη αντιγενοτοξική δραστηριότητα μεταξύ των άλλων δειγμάτων. Τα προαναφερθέντα δεδομένα συμφωνούν με μελέτη που διεξήχθη σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα μαστού (MCF10A), σύμφωνα με τα οποία η HT έχει μεγαλύτερη προστατευτική επίδραση στην οξείδωση του DNA από την T (348). Επίσης, η HT εμφάνισε σημαντικά υψηλότερη προστατευτική ικανότητα έναντι βλάβης του DNA που προκαλείται από το υπεροξειδίο του υδρογόνου σε σύγκριση με την T σε μονοκύτταρα ανθρώπινου αίματος (PBMC) και σε προμυελοκυτταρικά λευχαιμικά κύτταρα (HL60) (349). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι η HT, αλλά όχι η T, η οποία στερείται της υδροξυλομάδας στη θέση 3 είναι ικανή να προστατεύσει τα κύτταρα Jurkat, μία αθανатоποιημένη κυτταρική σειρά ανθρώπινων T λεμφοκυττάρων, από την επαγόμενη από υπεροξειδίο του υδρογόνου DNA βλάβη, υποδεικνύοντας ότι η παρουσία αρωματικών δακτυλίων με τμήματα ορθοδιϋδροξυλίου, συμβάλλουν στην αυξημένη δραστηριότητα (350).

Τα επίπεδα GSH μετρήθηκαν χρησιμοποιώντας κυτταρομετρία ροής, έπειτα από 24 ώρες επώασης των κυττάρων HeLa με τα εκχυλίσματα ελαιολάδου. Η GSH είναι ένα από τα σημαντικότερα ενδοκυτταρικά αντιοξειδωτικά μόρια που προστατεύει τα κύτταρα από οξειδωτική βλάβη. Η GSH διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στις οδούς σηματοδότησης, στις διαδικασίες αποτοξικοποίησης ορισμένων αντιβιοτικών και βαρέων μετάλλων, στο αντιοξειδωτικό σύστημα, καθώς και στις μεταβολικές οδούς των περισσότερων αερόβιων κυττάρων, λόγω των αναγωγικών ιδιοτήτων της (351,352). Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, τα εκχυλίσματα πλούσια σε HT επέδειξαν τη μέγιστη αύξηση των επιπέδων GSH στα 15 μg εκχυλίσματος σε ένα εύρος 35-40%, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Από την άλλη πλευρά, τα πλούσια σε T εκχυλίσματα απεικονίζουν τη μέγιστη αύξηση των επιπέδων GSH στα 10 μg κατά 50%. Επίσης, στα 15 μg η GSH αυξήθηκε περίπου 40%. Επιπλέον, το OLE17 δεν είχε κάποιο αποτέλεσμα στα επίπεδα GSH στα 20 μg. Το OLE19 αύξησε τα επίπεδα GSH κατά 18% σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, ενώ το OLE05 κατά 31%. Πολλές μελέτες έχουν αναφέρει ότι τόσο η HT όσο και η T ρυθμίζουν το μονοπάτι Keap1 / Nrf2, το οποίο είναι υπεύθυνο για την έκφραση των ενζύμων που εμπλέκονται στη σύνθεση της GSH, όπως της γ-GCL (353–356). Πειράματα σε αρουραίους ταυτοποίησαν την T ως



πρόδρομο μόριο της HT υποδηλώνοντας ότι η αρχική σύνθεση των χορηγούμενων εκχυλισμάτων θα μπορούσε να μεταβληθεί μετά τη μετατροπή ενός μορίου σε άλλους μεταβολίτες (183). Επιπλέον, βρέθηκε ότι η T μετατρέπεται σε HT σε μικροσώματα ανθρώπινου ήπατος (HLM) μέσω των ενζυμικών ενεργειών του CYP2A6 και του CYP2D6 (357). Έχει επίσης αναφερθεί ότι στα κύτταρα J774 A.1 (μονοπύρηνια μακροφάγο ποντικού BALB / c), η T έχει την ικανότητα να συσσωρεύεται ενδοκυτταρικά με την πάροδο του χρόνου μέχρις ότου φθάσει σε υψηλές συγκεντρώσεις και επομένως παρουσιάζει σημαντικά προστατευτικά και αντιοξειδωτικά αποτελέσματα. Σε αντίθεση με την T, τα επίπεδα της HT στα κύτταρα μειώθηκαν πολύ γρήγορα χρονικά (358). Περαιτέρω, όταν η HT χορηγήθηκε σε κύτταρα Jurkat για διάφορα χρονικά σημεία, παρατηρήθηκε προστατευτική επίδραση μετά από επώαση 5 λεπτών, η οποία βαθμιαία μειώθηκε καθώς ο χρόνος επώασης παρατάθηκε μέχρι 2 ώρες. Αυτά τα ευρήματα δείχνουν πιθανώς την μεταβολική απενεργοποίηση της HT (350). Επομένως, ο κυτταρικός μεταβολισμός φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά τη δραστηριότητα των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων. Θα πρέπει να αναφερθεί ότι η κυτταρική σειρά HeLa, ως καρκινικά κύτταρα, είναι εξαιρετικά μεταβολικά δραστήρια. Όσον αφορά τα επίπεδα ROS, σε αντίθεση με την GSH, παρέμειναν αναλλοίωτα. Προηγούμενες μελέτες έχουν επίσης αναφέρει ότι οι μεταβολές των επιπέδων οξειδωτικού στρες ή των αντιοξειδωτικών μηχανισμών δεν συνοδεύονται πάντα από αλλαγές στα επίπεδα ROS (234,236,262).

Η ικανότητα των φαινολικών ενώσεων να αλληλεπιδράσουν με την έκφραση των γονιδίων στα βιολογικά συστήματα (π.χ. Nrf2, πυρηνικός παράγοντας-κB, MAP κινάση και PI3 κινάση / Akt) είναι ένας από τους μηχανισμούς που εξηγούν εν μέρει τις συμβολές τους στην υγεία (309). Ένα ευρύ φάσμα φυτικών εκχυλισμάτων έχει εξετασθεί τόσο σε μοντέλα *in vivo* όσο και *in vitro* για την εκτίμηση διαφορετικών φαινολικών ενώσεων ως ενεργοποιητές του κυτταρικού μονοπατιού του Nrf2, που παίζει κύριο ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων που εμπλέκονται στο σύστημα αντιοξειδωτικής προστασίας των κυττάρων (309,359). Στην παρούσα μελέτη εστιάζουμε στις φαινολικές ενώσεις του ελαιολάδου και την ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με τον Nrf2. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, τα εξετασθέντα εκχυλίσματα είχαν την ικανότητα να ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων στόχων του Nrf2 με τη μεγαλύτερη αύξηση, στην πλειονότητα των γονιδίων, να παρατηρείται στις 12 ώρες χορήγησης τους. Οι κύριες φαινολικές ενώσεις του ελαιολάδου HT, T, και

εύρωπαίνη έχει ήδη δηχθεί από άλλες μελέτες, ότι μπορούν να ασκήσουν τα ευεργετικά τους αποτελέσματα διεγείροντας την μετατόπιση του Nrf2 από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα, εξαλείφοντας έτσι το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από ROS και RNS (309).

Ωστόσο, οι προαναφερθείσες εφαρμογές περιγράφουν μόνο το *in vitro* αντιοξειδωτικό δυναμικό των φυτικών ενώσεων. Λαμβάνοντας υπόψη την πολυπλοκότητα των διαδικασιών οξείδωσης, δεν υπάρχει μια μοναδική προσέγγιση που να περιγράφει πλήρως το αντιοξειδωτικό προφίλ μιας ουσίας. Έτσι, ο συνδυασμός διαφορετικών μεθόδων και συστημάτων, προκειμένου να αποκαλυφθεί ολιστικά η αντιοξειδωτική ικανότητα μιας ουσίας στο πλαίσιο της οξειδοαναγωγικής βιολογίας, είναι υποχρεωτική. Προς αυτή την κατεύθυνση, είναι ζωτικής σημασίας να καταδειχθούν οι επιδράσεις ενός εκχυλίσματος σε περιβάλλον κυτταροκαλλιέργειας, τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε καρκινικές κυτταρικές σειρές. Οι πολυφαινόλες μεταβολίζονται σε περιβάλλον κυττάρων (147). Συνεπώς, τα πολυφαινολικά εκχυλίσματα σε συνδυασμό με τους μεταβολίτες τους μπορούν να συμβάλλουν στην ενίσχυση του αντιοξειδωτικού δυναμικού, διατηρώντας έτσι την ακεραιότητα και λειτουργία των κυττάρων.

Τα αποτελέσματά μας επισημαίνουν την αναγκαιότητα του συνδιασμού των *in vitro* δοκιμών και των κυτταροκαλλιεργειών. Συγκεκριμένα, τα εκχυλίσματα είχαν την ικανότητα να εξουδετερώνουν τη ρίζα ABTS<sup>•+</sup> *in vitro*, παρόλο που δεν υπάρχουν στατιστικές μεταβολές σε επίπεδα ROS στην εξεταζόμενη κυτταρική σειρά. Στις *in vitro* δοκιμές, οι αντιοξειδωτικές ενώσεις αλληλεπιδρούν άμεσα με τη ρίζα ABTS<sup>•+</sup>, ωστόσο στο κυτταρικό περιβάλλον, το οποίο είναι ένα ζωντανό σύστημα, υπάρχουν πολλά διαφορετικά είδη δραστικών ριζών, όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου, οι ρίζες υδροξυλίου και το ανιόν σουπεροξειδίου (360). Επίσης, το αναγωγικό δυναμικό των εκχυλισμάτων διαφέρει μεταξύ των δύο μοντέλων. Συγκεκριμένα τα εκχυλίσματα είχαν τη δυνατότητα να δώσουν ένα ηλεκτρόνιο και έτσι να εξουδετερώσουν τη ρίζα ABTS<sup>•+</sup> σε διαφορετικές συγκεντρώσεις σε σύγκριση με την ικανότητά τους να αυξάνουν τα επίπεδα GSH στα κύτταρα. Συγκεκριμένα, οι συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων στις οποίες παρουσιάστηκε IC50 στις *in vitro* δοκιμές, ήταν τοξικές στην κυτταρική σειρά με τα επίπεδα GSH να αυξάνονται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις.

Περίπου το 80-90% του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου του ελαιόλαδου υπάρχει με τη μορφή σεκοροειδών. Στο γαστρικό περιβάλλον, τα σεκοϊριδοειδή υδρολύονται, έτσι οι ελεύθερες πολυφαινόλες είναι διαθέσιμες για απορρόφηση με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Επομένως, οι πολυφαινόλες, όπως η HT και η T, υφίστανται ένα εκτεταμένο μεταβολισμό πρώτης διόδου. Κατά συνέπεια, η συγκέντρωση των HT και T στα βιολογικά υγρά μπορεί να είναι διαφορετική σε σύγκριση με τους μεταβολίτες τους, οι οποίοι μπορεί να ασκούν διαφορετικό βιολογικό ρόλο (324).

Επιπλέον, στην παρούσα μελέτη αξιολογήσαμε το αντιοξειδωτικό δυναμικό του ολικού πολυφαινολικού κλάσματος από τα διάφορα εκχυλίσματα ελαιολάδου. Σε μια άλλη μελέτη, η σύγκριση μεταξύ των αντιοξειδωτικών ικανοτήτων τόσο του ολικού πολυφαινολικού εκχυλίσματος όσο και ορισμένων απλών απομονομένων πολυφαινολών αποκάλυψε ότι το ολικό πολυφαινολικό εκχύλισμα είχε ισχυρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σύγκριση με κάθε ένωση ξεχωριστά. Αυτό δείχνει τη συνεργιστική ή συμπληρωματική επίδραση των πολυφαινολών στα μίγματα (361).

Εν κατακλείδι, τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν ότι και τα πέντε εξεταζόμενα εκχυλίσματα ελαιολάδου επέδειξαν ισχυρή αντιοξειδωτική δραστηριότητα, καθώς και προστατευτική δράση κατά της βλάβης του DNA που επάγεται από ελεύθερες ρίζες *in vitro*. Συγκεκριμένα, τα ευρήματά μας επισημαίνουν ότι τα πλούσια σε HT εκχυλίσματα είναι ισχυρότεροι αντιοξειδωτικοί και αντιγενετοξικοί παράγοντες σε σύγκριση με τα εκχυλίσματα πλούσια σε T. Αυτό, ωστόσο, δεν συμβαίνει στο μοντέλο που βασίζεται στα κύτταρα HeLa, αφού τα εκχυλίσματα πλούσια σε T ήταν πιο αποτελεσματικά στην αύξηση των επιπέδων GSH σε σύγκριση με τα πλούσια σε HT, υπογραμμίζοντας ότι ο μεταβολισμός των κυττάρων είναι ικανός να μεταβάλλει τη δραστηριότητα από οποιαδήποτε χορηγούμενη ένωση. Δεδομένου ότι παράγοντες όπως η παραγωγή και η αποθήκευση των φυτών είναι σημαντικοί καθοριστικοί παράγοντες της σύνθεσης των παραγόμενων εκχυλισμάτων, προτείνουμε να υιοθετηθούν συγκεκριμένες συνθήκες προκειμένου να επιτευχθεί η μέγιστη βιολογική τους δραστηριότητα. Αυτά τα αποτελέσματα ακολουθούμενα από άλλα προς την ίδια κατεύθυνση θα μπορούσαν να αποτελέσουν μια σταθερή βάση για την παραγωγή λειτουργικών τροφών εμπλουτισμένων με εκχυλίσματα ελαιολάδου, τα οποία θα παρουσιάζουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση *in vivo*.

## Κεφάλαιο 7 – Μέρος IV Αποτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας πολυφαινολικών εκχυλισμάτων ανθέων ελιάς

### 7.1 Κύρια ευρήματα

- > Όσον αφορά την αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων ανθέων ελιάς, το εκχύλισμα αγριελιάς (AGRI) κατείχε την χαμηλότερη τιμή IC50 και στις δύο μεθόδους (DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>•+</sup>) υποδεικνύοντας ότι είναι το πιο ισχυρό μεταξύ των εξετασθέντων εκχυλισμάτων (EKPA, KTKT, ANTK).
- > Τα αποτελέσματα από την δοκιμασία προστασίας του πλασμιδίου, έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα AGRI, ANKT και EKPA είχαν στατιστικά σημαντική μεγαλύτερη ικανότητα να προστατεύουν από τις θραύσεις του DNA σε σύγκριση με το εκχύλισμα KTKT. Ωστόσο, το AGRI παρουσίασε επίσης τη χαμηλότερη τιμή IC50 σε αυτή τη δοκιμασία.
- > Με βάση τις μεθόδους ποσοτικής ανάλυσης των πολυφαινολών, φαίνεται ότι το KTKT διαθέτει την μικρότερη ποσότητα. Ωστόσο εμφανίζει ισχυρή αντιοξειδωτική και αντιμεταλλαξιγόνο δράση συγκριτικά με τα υπόλοιπα εκχυλίσματα. Συνεπώς, η ποιοτική χημική πολυφαινολική σύνθεση παίζει σημαντικό ρόλο στη δραστηριότητα των φυτικών εκχυλισμάτων.
- > Τέλος, όλα τα εκχυλίσματα βελτίωσαν την κατάσταση οξειδοαναγωγής σε κυτταρικό επίπεδο όπως υποδεικνύεται από την αύξηση των τιμών GSH και τα μειωμένα επίπεδα ROS.

### 7.2 Εισαγωγή- Σκοπός

Η καλλιέργεια ελιάς αποτελεί κοινή καλλιεργητική πρακτική για τον άνθρωπο από το 6000 π.Χ. Τα προϊόντα της χρησιμοποιούνται ευρέως από κατοίκους των χωρών της λεκάνης της Μεσογείου για τρόφιμα, θρησκευτικές και ιατρικές εφαρμογές (151). Το ελαιόδενδρο (*Olea europaea*.L) είναι ένα από τα πιο εκτεταμένα καλλιεργούμενα είδη

παγκοσμίως, καλύπτοντας γη 10 εκατομμυρίων εκταρίων (199). Εκτός από τις ελιές και το ελαιόλαδο και άλλα μέρη της ελιάς, όπως τα άνθη και τα φύλλα, έχουν επίσης προσελκύσει την προσοχή των ερευνητών, καθώς φαίνεται να έχουν πολλές ευεργετικές ιδιότητες για την υγεία. Συγκεκριμένα, τα φύλλα ελιάς, τα οποία αποτελούν το 10% του συνολικού βάρους της ελιάς, έχουν χρησιμοποιηθεί έναντι διαφόρων ασθενειών, αφού έχει αναφερθεί ότι έχουν αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές δράσεις, αγγειοδιασταλτικά και υπογλυκαιμικά αποτελέσματα (362,363). Επιπλέον, τα εκχυλίσματα που προέρχονται από φύλλα ελιάς έχουν χρησιμοποιηθεί ως τρόφιμα, πρόσθετα τροφίμων και λειτουργικά συστατικά τροφίμων, καθώς είναι πλούσια σε πολυφαινόλες (363).

Οι πολυφαινολικές ενώσεις είναι δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών που συμβάλλουν στην πικρή γεύση, τη στυπτικότητα, το χρώμα, τη γεύση, την οσμή, την επικονίαση των λουλουδιών και την οξειδωτική σταθερότητα, καθώς και την προστασία από διάφορα παθογόνα και την υπεριώδη ακτινοβολία (144). Επιπλέον, οι πολυφαινόλες και τα τρόφιμα που εμπλουτίζονται σε αυτές ανήκουν στο κύριο πεδίο της ερευνητικής δραστηριότητας παγκοσμίως λόγω των υποτιθέμενων επωφελών επιπτώσεών τους στην ανθρώπινη υγεία όσον αφορά τις αντικαρκινικές, αντιδιαβητικές και αντιαθηρογόνες ιδιότητές τους (144).

Το λουλούδι είναι ένα μέρος του φυτού που περιέχει μια μεγάλη ποικιλία από φυσικά αντιοξειδωτικά, όπως φαινολικά οξέα, ανθοκυανίνες, φλαβονοειδή και πολλές άλλες φαινολικές ενώσεις. Έχει αποδειχθεί ότι το άγλυκο της ελευρωπαίνης (1,16-3,75 g/kg), η υδροξυτυροσόλη (HT) (0,17-1,58 g/kg) και η ελαισίνη (0,14-1,33 g/kg) είναι οι κύριες πολυφαινόλες που βρίσκονται στα εκχυλίσματα προερχόμενα από τα άνθη ελιάς κατά τη διάρκεια διάφορων αναπτυξιακών φάσεων (π.χ. στάδιο πράσινου μπουμπουκιού, στάδιο λευκού μπουμπουκιού, πρόσφατο άνοιγμα λουλουδιού, στάδιο αφύσικης ανθήρας και στο στάδιο της αφαίρεσης των ανθών και των πετάλων) (205). Τα άνθη ελιάς δεν έχουν ακόμη διερευνηθεί πλήρως για τις πιθανές φαρμακευτικές τους χρήσεις. Πρέπει να αναφερθεί ότι ένα ώριμο δέντρο ελαιοκάρπου (*Olea europaea*. L) παράγει περίπου 500.000 άνθη αλλά μόνο το 1-2% από αυτά δίνουν φρούτα που φτάνουν σε ωριμότητα (204). Κάθε ταξιανθία περιέχει 15-30 λουλούδια, ανάλογα με την ποικιλία (199). Ωστόσο, το ποσοστό των φρούτων φαίνεται να είναι ανεξάρτητο από την ποσότητα των λουλουδιών και τον αριθμό των ταξιανθιών (204). Συγκεκριμένα, η ανάπτυξη φρούτων που προκύπτει από το 1% του συνολικού

πληθυσμού λουλουδιών αρκεί για την παραγωγή μιας καλής εμπορικής καλλιέργειας (204,207).

Η διατροφή, οι αναπτυξιακοί παράγοντες, καθώς και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης της θερμοκρασίας και του φωτός, έχουν αντίκτυπο στην πρόκληση και την διαφοροποίηση της ελιάς. Συγκεκριμένα, η βέλτιστη θερμοκρασία για καλύτερη άνθηση φαίνεται να είναι 10-13 °C για μια περίοδο 9-10 εβδομάδων. Ωστόσο, η ευαισθησία στο φως φαίνεται να εξαρτάται από τις ποικιλίες, έτσι ορισμένες ποικιλίες απαιτούν λιγότερο φως για τη μετατροπή των μπουμπουκιών σε λουλούδια (200). Επιπλέον, τα θρεπτικά συστατικά εξαρτώνται από το φορτίο των φρούτων, με αποτέλεσμα οι συγκεντρώσεις νατρίου και καλίου να μειώνονται όταν το φορτίο των φρούτων είναι υψηλό, ενώ αντίθετα τα επίπεδα ασβεστίου αυξάνονται. Τέλος, τα υψηλά επίπεδα χλωρογενικών οξέων επάγουν τον μετασχηματισμό των οφθαλμών στο λουλούδι (200).

Η παραγωγή ελαιολάδου είναι μια φυσιολογική διαδικασία, ωστόσο είναι σαφές ότι συνοδεύεται από μια εκτεταμένη αύξηση της ποσότητας παραπροϊόντων ελαιολάδου, τα οποία θεωρούνται ως απόβλητα που προκαλούν περιβαλλοντικά προβλήματα (364). Συνεπώς, είναι επιτακτική ανάγκη να αναπτυχθούν νέοι τρόποι χρήσης αυτών των παραπροϊόντων για την προστασία του περιβάλλοντος (364). Το ελαιόλαδο, τα φρούτα και τα φύλλα έχουν μια πολύ γνωστή χημική σύνθεση και έχουν μελετηθεί εκτενώς για τις βιολογικές τους δραστηριότητες. Ωστόσο, έχει δοθεί λιγότερη προσοχή στα άνθη της ελιάς και ιδιαίτερα εκείνα που προέρχονται από τις άγριες ποικιλίες ελιάς για τις οποίες αναμένεται υψηλότερη φαινολική περιεκτικότητα. Αν και η παραγωγή της ελιάς γίνεται σε μεγάλη κλίμακα, πρέπει να τονιστεί ότι μόνο μια μικρή ποσότητα ανθέων παράγει ώριμο καρπό. Συγκεκριμένα, μετά την πτώση των πετάλων παραμένει το 25% των ωοθηκών, αλλά μόνο το 2% των θα δώσει ώριμο καρπό (204).

Ως εκ τούτου, στόχος μας ήταν να αξιολογήσουμε τις βιολογικές επιδράσεις τεσσάρων πολυφαινολικών εκχυλισμάτων ανθέων ελιάς (3 από τις ποικιλίες ελιάς Λιανολιά και Κορωνέικη και μία από ποικιλία άγριας ελιάς), με τη χρήση *in vitro* τεχνικών και κυτταροκαλλιεργειών. Λόγω των δυσκολιών στην παραγωγή μεμονομένων φαινολικών ενώσεων και δεδομένου ότι τα εκχυλίσματα από μίγματα ενώσεων συνήθως εμφανίζουν ισχυρότερες αντιοξειδωτικές ιδιότητες σε σύγκριση με μεμονωμένα μόρια, το ενδιαφέρον μας επικεντρώθηκε στη χρήση εκχυλισμάτων

φυτικών μιγμάτων παρά σε μεμονωμένες ενώσεις. Κατ' ακολουθίαν η παρούσα μελέτη έγινε με σκοπό να διαλευκανθεί η αξία της πολυφαινολικής περιεκτικότητας των ανθέων της ελιάς και να τονιστούν οι αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες, ώστε να συλλέγονται και να εκμεταλλεύονται όλα τα άνθη της ελιάς τα οποία δεν δίνουν καρπό και εναποτίθενται στο έδαφος. Μελλοντικά ο απώτερος σκοπός είναι η δημιουργία βιολειτουργικών, φαρμακευτικών ή καλλυντικών σκευασμάτων καθώς και συμπληρωμάτων διατροφής.

### **7.3 Προέλευση και απομόνωση εκχυλισμάτων**

Τα εκχυλίσματα προέρχονται από το εργαστήριο του καθηγητή Λεάνδρου-Αλέξιου Σκαλτσούνη, του τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Πρόκειται για 3 πολυφαινολικά εκχυλίσματα ανθέων ελιάς και 1 πολυφαινολικό εκχύλισμα ανθέων αγριελιάς με τις κωδικές ονομασίες ΕΚΡΑ (Κορωνέικη), ΑΝΚΤ (Λιανολιά Κέρκυρας), ΚΤΚΤ (Λιανολιά Κέρκυρας) και ΑΓΡΙ (αγριελιά) αντίστοιχα. Τα δείγματα ΕΚΡΑ συλλέχθηκαν στις 13/5/17, τα δείγματα ΑΝΚΤ στις 14-15/5/17, τα δείγματα ΚΤΚΤ στις 5-7/5/17 και τα δείγματα ΑΝΚΤ στις 13-14/5/17. Όλα τα δείγματα συλλέχθηκαν κάτω από πολύ καλές συνθήκες (ζεστός και ξηρός καιρός). Η ξήρανση των δειγμάτων έγινε για 20 μέρες σε ξηρό, σκοτεινό, καλά αεριζόμενο δωμάτιο.

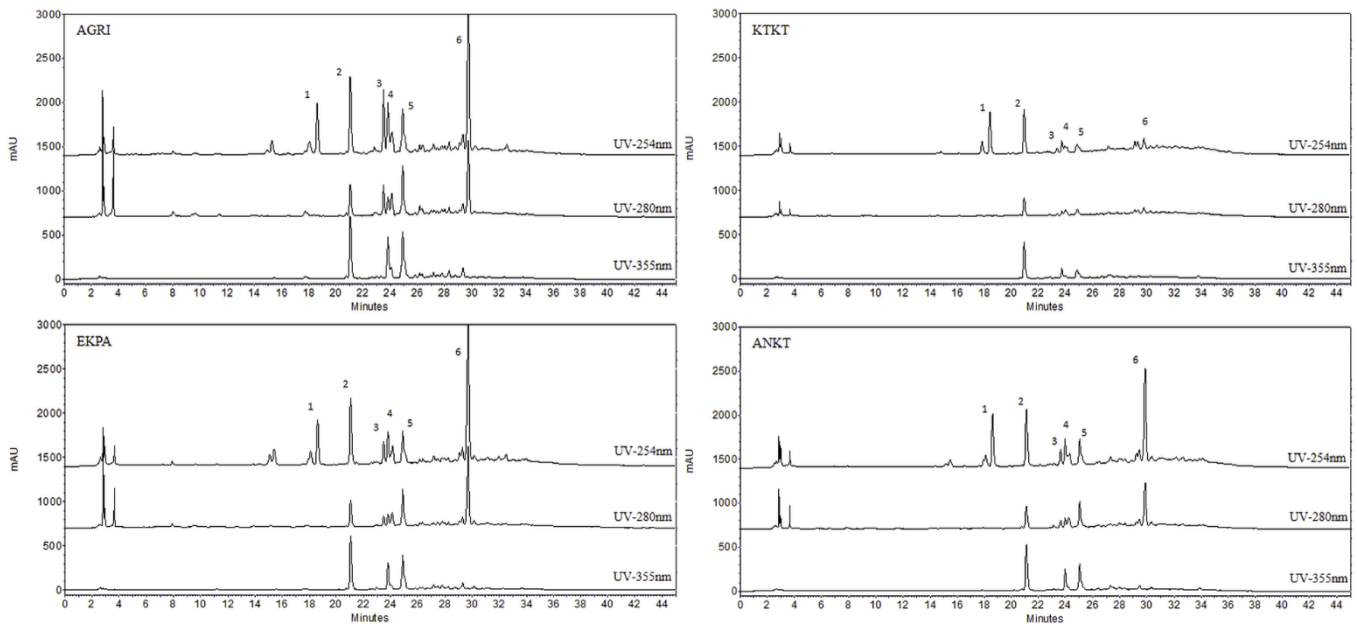
Οι εκχυλίσεις των ανθέων έγιναν σε λουτρό υπερήχων (Branson 2510) με μίγμα διαλυτών αιθανόλης/νερού σε αναλογία 50:50 και λυοφιλοποιήθηκαν σε συσκευή CHRIST ALPHA 1/5 έως ότου απομακρυνθεί όλη η ποσότητα του ύδατος με εξάχνωση. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ποιοτική ανάλυση με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) καθώς και συγκριτική μελέτη όλων των δειγμάτων ανθέων ελαιόδένδρων.

## 7.4 Αποτελέσματα

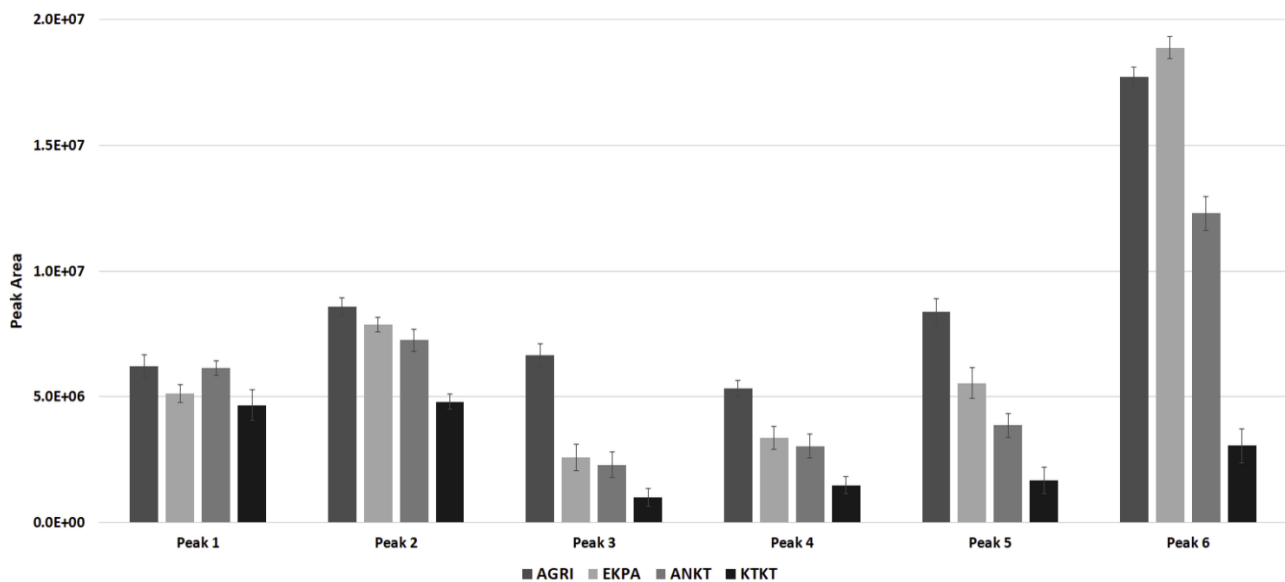
### 7.4.1 HPLC ανάλυση

Η ποιοτική ανάλυση HPLC των υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων των ανθέων ελιάς αποκάλυψε ότι οι κύριες ενώσεις ανήκουν σε δύο χημικές κατηγορίες, σεκοϊριδοειδή παράγωγα και παράγωγα φλαβονοειδών (**Διάγραμμα 38**). Από αυτούς, οι κυριότεροι εκπρόσωποι κάθε κατηγορίας είναι η κερκετίνη-3-Ο-σοφοροσίδη, η 3-Ο-σοφοριζική κερκετίνη (κορυφή 2, **Διάγραμμα 38**) και η ελευροπαΐνη (κορυφή 6, **Διάγραμμα 38**). Η μελέτη σύγκρισης των εκχυλισμάτων έδειξε μεγάλη ομοιότητα της χημικής σύνθεσης των δειγμάτων AGRI, ΕΚΡΑ και ΑΝΚΤ καθώς παρατηρήθηκαν μόνο μικρές διαφορές στις ποσότητες των κύριων ενώσεων. Από την άλλη πλευρά, το δείγμα ΚΤΚΤ φάνηκε να είναι φτωχότερο όσον αφορά τη χημική σύνθεση, ενώ οι κύριες ενώσεις, η κερκετίνη-3-Ο-σοφοροσίδη και η ελευρωπαΐνη υπήρχαν σε μικρές ποσότητες. Η σχετική ανάλυση ποσοτικού προσδιορισμού αποκάλυψε ότι όλα τα εκχυλίσματα περιέχουν παρόμοια συγκέντρωση της ένωσης 1 (κορυφή 1) σε αντίθεση με άλλες ενώσεις όπου παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές μεταξύ των διαφόρων εκχυλισμάτων (**Διάγραμμα 39**). Όσον αφορά την κερκετίνη-3-Ο-σοφοροσίδη, το ΑΓΡΙ εκχύλισμα περιέχει την υψηλότερη ποσότητα όμοια με τα εκχυλίσματα ΕΚΡΑ και ΑΚΚΤ ενώ το ΚΤΚΤ περιέχει σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα από τα άλλα τρία εκχυλίσματα. Από την άλλη πλευρά, η ελευρωπαΐνη βρέθηκε σε μεγαλύτερες ποσότητες στο εκχύλισμα ΕΚΡΑ ακολουθούμενο από το εκχύλισμα ΑΓΡΙ (παρόμοια συγκέντρωση) και ΑΝΚΤ ενώ το ΚΤΚΤ περιέχει μικρή ποσότητα ελευρωπαΐνης (**Διάγραμμα 39**).





**Διάγραμμα 38** Χρωματογραφήματα HPLC των υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων ανθέων ελιάς (AGRI, KTCT, EKPA και ANKT) στα 254 nm (άνω γραμμή), 280 nm (μεσαία γραμμή) και 365 nm (κάτω γραμμή). Ενώσεις: 1, παράγωγο σεκοϊριδοειδούς. 2, κερκετίνη-3-Ο-σοφοροσίδη. 3, παράγωγο σεκοϊριδοειδούς. 4, ρουτίνη. 5, παράγωγο φλαβονοειδούς. 6, ελευρωπαΐνη. HPLC; υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης.



**Διάγραμμα 39** Σχετική ανάλυση ποσοτικοποίησης των κυριότερων συστατικών των εκχυλισμάτων ανθέων ελιάς με χρήση HPLC στα 254 nm. Κορυφή 1, παράγωγο σεκοϊριδοειδούς. Κορυφή 2, κερκετίνη-3-Ο-σοφοροσίδη. Κορυφή 3, παράγωγο σεκοϊριδοειδούς. Κορυφή 4, ρουτίνη. Κορυφή 5, παράγωγο φλαβονοειδούς. Peak 6, ελευρωπαΐνη. HPLC; υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης.

#### 7.4.2 Εκτίμηση αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλισμάτων

Όπως υποδεικνύεται από τα αποτελέσματα που αφορούν τις δοκιμασίες DPPH• και ABTS•+, όλα τα εκχυλίσματα παρουσίασαν αντιοξειδωτική δράση. Συγκεκριμένα, όσον αφορά την δοκιμασία DPPH • οι τιμές IC<sub>50</sub> των AGRI, KTKT, EKPA και ANKT ήταν ίσες με 40,5, 73,3, 50,8 και 73,3 μg/ml εκχυλίσματος αντίστοιχα (Πίνακας 20). Η στατιστική ανάλυση αποκάλυψε ότι το AGRI άσκησε ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση σε σύγκριση με το KTKT ( $p = 0,002$ ) και το ANKT ( $p = 0,002$ ). Αντίθετα, το EKPA ήταν πιο ισχυρό από το KTKT ( $p = 0,003$ ) και το ANKT ( $p = 0,003$ ).

Επιπλέον, όπως εκτιμήθηκε με την μέθοδο ABTS•+, τα εκχυλίσματα AGRI, KTKT, EKPA και ANKT εμφάνισαν τιμές IC<sub>50</sub> ίσες προς 9,3, 15,8, 32,9 και 23,1 μg/ml εκχυλίσματος αντίστοιχα (Πίνακας 20). Από τα αποτελέσματα που ελήφθησαν φαίνεται ότι όλα τα εκχυλίσματα παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p = 0,0001$ ). Οι τιμές IC<sub>50</sub> αντιπροσωπεύουν την συγκέντρωση των εκχυλισμάτων που απαιτούνται για 50% εξουδετέρωση των δύο ριζών. Δεδομένου ότι όσο χαμηλότερη είναι η τιμή IC<sub>50</sub> τόσο ισχυρότερη είναι αντιοξειδωτική τους δράση, τα αποτελέσματα μας αποκάλυψαν ότι και στις δύο δοκιμασίες το AGRI άσκησε την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δραστηριότητα, σε σύγκριση με τα υπόλοιπα τρία (δηλ. KTKT, EKPA και ANKT).

Το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο υπολογίστηκε μέσω του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalte και εκφράζεται σε mg γαλακτικού οξέος/g εκχυλίσματος. Οι εκτιμώμενες τιμές κυμαίνονταν από 50,3 έως 81,0 mg γαλλικού οξέος / g εκχυλίσματος (Πίνακας 20), παρουσιάζοντας σημαντική διαφορά στην πολυφαινολική σύσταση των εκχυλισμάτων. Το εκχύλισμα AGRI παρουσίασε την υψηλότερη περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες (81,0), ακολουθούμενο από το εκχυλίσματα EKPA (76,2) και το ANKT (66,1) ενώ το KTKT παρουσίασε τη χαμηλότερη τιμή (50,9). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι υπολογισμένες τιμές του πολυφαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων είναι σύμφωνες με την αντίστοιχη αντιοξειδωτική τους ικανότητα όπως αυτή υπολογίστηκε μέσω της μεθόδου του DPPH.

**Πίνακας 20** Οι τιμές IC<sub>50</sub> των εκχυλισμάτων στις δοκιμασίες DPPH• και ABTS•+ και το συνολικό πολυφαινόλικό τους περιεχόμενο (εκφράζεται σε mg ισοδυνάμου γαλικού οξέος (GA) ανά g εκχυλίσματος). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι ± SEM (n = 3)\*.

Εκχυλίσματα	DPPH•	ABTS•+	Συνολικό πολυφαινόλικό περιεχόμενο
	IC <sub>50</sub> (μg/ml)		mgGA/g εκχυλίσματος
<b>AGRI</b>	40,5 ± 2,7 <sup>α</sup>	9,3 ± 0,8 <sup>α</sup>	81,0
<b>ΚΤΚΤ</b>	73,3 ± 1,3 <sup>β</sup>	15,8 ± 0,2 <sup>β</sup>	50,9
<b>ΕΚΡΑ</b>	50,8 ± 2,2 <sup>α</sup>	32,9 ± 0,2 <sup>γ</sup>	76,2
<b>ΑΝΚΤ</b>	73,3 ± 1,5 <sup>β</sup>	23,1 ± 0,2 <sup>δ</sup>	66,1

\*α-δ Τιμές χωρίς κοινό γράμμα διαφέρουν σημαντικά ( $p < 0,05$ ).

#### 7.4.3 Εκτίμηση αντιγενοτοξικής και αντιμεταλλαξιγόνου δραστηριότητας των εκχυλισμάτων όπως εκτιμήθηκε με τον προσδιορισμό προστασίας του πλασμιδιακού DNA και τη δοκιμή Ames.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την δοκιμασία προστασίας του πλασμιδίου αποκάλυψαν ότι τα AGRI ( $p = 0,003$ ), ΕΚΡΑ ( $p = 0,019$ ) και ΑΝΚΤ ( $p = 0,005$ ) έχουν την ίδια αντιγενοτοξική δραστηριότητα σε σύγκριση με το ΚΤΚΤ (Πίνακας 21). Συγκεκριμένα, οι τιμές IC<sub>50</sub> των AGRI, ΚΤΚΤ, ΕΚΡΑ και ΑΝΚΤ υπολογίστηκαν στα 1,7, 8,2, 2,9 και 2,2 μg /μl, αντίστοιχα. Το ίδιο μοτίβο παρατηρήθηκε επίσης και στη δοκιμασία του Ames. Ειδικότερα, οι τιμές IC<sub>50</sub> των AGRI, ΚΤΚΤ, ΕΚΡΑ και ΑΝΚΤ υπολογίστηκαν στα 3,3, 4,1, 3,1 και 2,8 μg εκχυλίσματος/τρυβλίο, αντίστοιχα (Πίνακας 21). Έτσι, το AGRI ( $p = 0,043$ ), το ΕΚΡΑ ( $p = 0,011$ ) και το ΑΝΚΤ ( $p = 0,002$ ) έχουν την ίδια αντιμεταλλαξιγόνο ικανότητα σε σύγκριση με το ΚΤΚΤ.

**Πίνακας 21** Αντιγεντοτοξική και αντιμεταλλαξιγόνος δραστηριότητα των εξετασθέντων εκχυλισμάτων, όπως αξιολογείται με τη δοκιμασία προστασίας πλασμιδίου και τη δοκιμασία Ames, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  SEM (n = 3)\*.

Εκχυλίσματα	Προστασία πλασμιδίου	Δοκιμή Ames
	IC <sub>50</sub> (μg/μl)	IC <sub>50</sub> μg εκχυλίσματος/τρυβλίο
<b>AGRI</b>	1,7 $\pm$ 0,3 <sup>α</sup>	3,3 $\pm$ 0,3 <sup>α</sup>
<b>ΚΤΚΤ</b>	8,2 $\pm$ 9,6 <sup>β</sup>	4,1 $\pm$ 0,1 <sup>β</sup>
<b>ΕΚΡΑ</b>	2,9 $\pm$ 9,6 <sup>α</sup>	3,1 $\pm$ 0,2 <sup>α</sup>
<b>ΑΝΚΤ</b>	2,2 $\pm$ 2,2 <sup>α</sup>	2,8 $\pm$ 0,2 <sup>α</sup>

\* α-β τιμές χωρίς κοινό γράμμα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ( $p < 0,05$ ).

### 7.4.3 Χορήγηση των εκχυλισμάτων ανθέων ελιάς σε κυτταρικές σειρές

Τα 4 εκχυλίσματα ανθέων ελιάς χορηγήθηκαν σε τέσσερις διαφορετικές κυτταρικές σειρές (C2C12, EA.hy925, HeLa, HepG2), προκειμένου να γίνει αποτίμηση της επίδρασης τους στο οξειδοαναγωγικό αναγωγικό των κυττάρων.

*7.4.3.1 Συγκεντρώσεις όπου τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα παρουσίασαν κυτταροτοξικότητα όπως εκτιμήθηκε με τη δοκιμασία XTT.*

Πριν από την εξέταση της επίδρασης των εκχυλισμάτων ανθέων ελιάς στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό των κυττάρων, έγινε έλεγχος του εύρους των μη κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων. Το εύρος των συγκεντρώσεων που χορηγήθηκαν στα κύτταρα για κάθε εκχύλισμα ήταν μεταξύ 1,0 και 100,0 μg εκχυλίσματος. Τα αποτελέσματα από τη δοκιμασία XTT έδειξαν ότι το AGRI ήταν περισσότερο κυτταροτοξικό στις κυτταρικές σειρές EA.hy926 και HepG2, που παρουσίασαν κυτταροτοξικότητα στα 10 μg εκχυλίσματος. Επιπλέον, το ANKT επέδειξε κυτταροτοξικότητα στα 25 μg στους μνοβλάστες C2C12. Τέλος, το επίπεδο κυτταροτοξικότητας παρατηρήθηκε στα 25 μg για το ΕΚΡΑ στα κύτταρα HeLa (Πίνακας 22). Τα αποτελέσματα αποκάλυψαν πως τα εκχυλίσματα παρουσιάζουν ιστοειδικότητα. Επιπλέον, τα EA.hy926 φαίνεται να είναι η πλέον ευαίσθητη

κυτταρική σειρά σε σύγκριση με τις υπόλοιπες κυτταρικές σειρές, καθώς η πλειοψηφία των εκχυλισμάτων προκάλεσε κυτταροτοξικότητα σε χαμηλές συγκεντρώσεις.

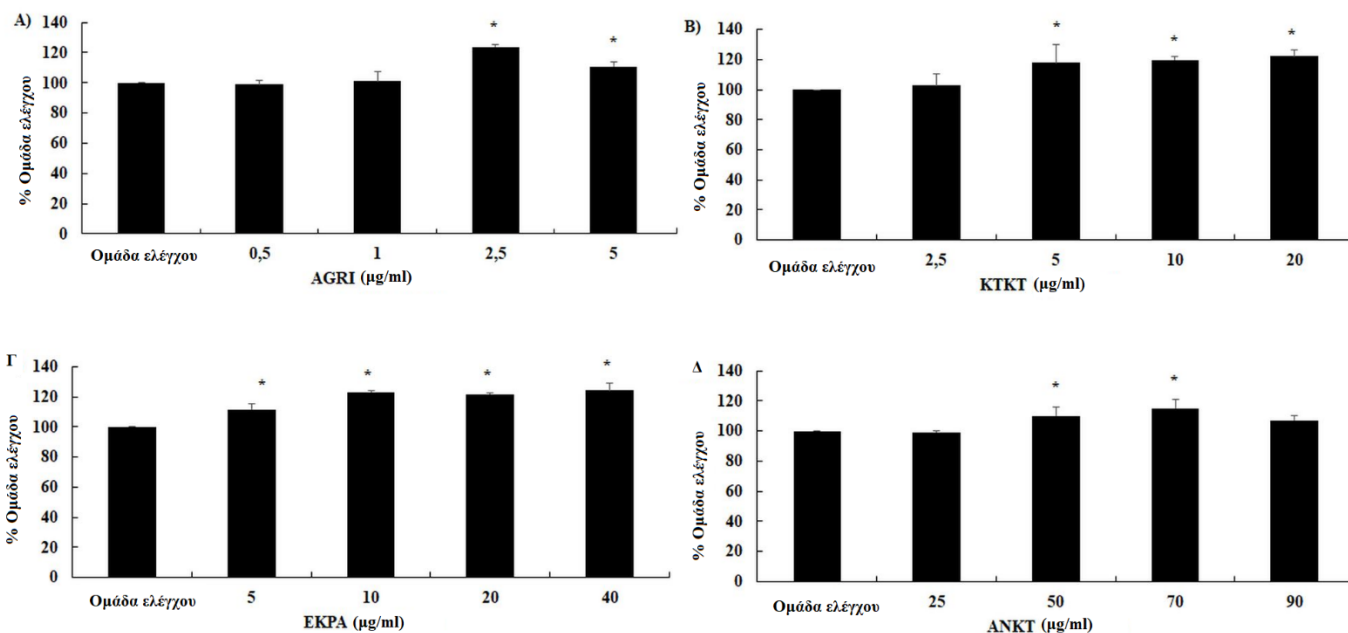
**Πίνακας 22** Στον πίνακα παρουσιάζεται η συγκέντρωση στην οποία εμφανίστηκε κυτταροτοξικότητα, έπειτα από 24 ώρες επώασης, όπως υπολογίστηκε με τη μέθοδο ΧΤΤ.

Κυτταρική σειρά	Εκχύλισμα	Κυτταροτοξικότητα (µg/ml)
<b>EA.hy926</b>	AGRI	10
	KTKT	25
	EKPA	50
	ANKT	100
<b>C2C12</b>	AGRI	70
	KTKT	60
	EKPA	100
	ANKT	25
<b>HeLa</b>	AGRI	50
	KTKT	100
	EKPA	25
	ANKT	100
<b>HepG2</b>	AGRI	10
	KTKT	100
	EKPA	25
	ANKT	100

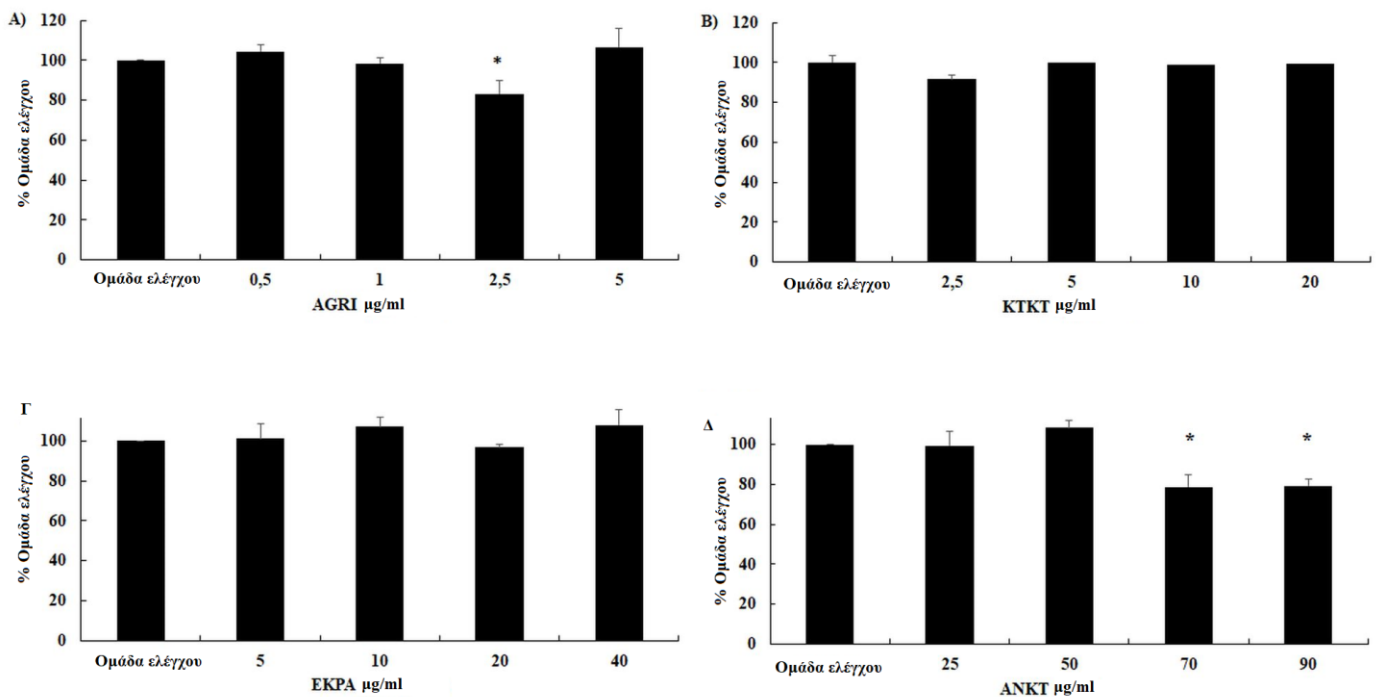
#### 7.4.3.2 Επίπεδα GSH και ROS σε κύτταρα EA.hy926 με κυτταρομετρία ροής

Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από την κυτταρομετρία ροής αποκάλυψαν ότι όλα τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα αύξησαν σημαντικά τα επίπεδα GSH σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου στις τέσσερις κυτταρικές σειρές. Ωστόσο, τα αντίστοιχα επίπεδα ROS δεν συνοδεύονταν ομοιόμορφα από στατιστικές μεταβολές. Συγκεκριμένα, το AGRI

αύξησε τα επίπεδα GSH των κυττάρων EA.hy926 κατά 24% και 11% στα 2,5 και 5  $\mu\text{g}$  εκχυλίσματος, αντίστοιχα, συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (Διάγραμμα 40 A). Τα επίπεδα ROS μειώθηκαν κατά 17% στα 2,5  $\mu\text{g}$  AGRI, συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (Διάγραμμα 41 Διάγραμμα 40 A). Το εκχύλισμα KTKT αύξησε επίσης τα επίπεδα GSH κατά 18, 20 και 23% στα 5, 10 και 20  $\mu\text{g}$  εκχυλίσματος (Διάγραμμα 40 B), αντίστοιχα, ενώ δεν υπήρξε μεταβολή στα επίπεδα ROS (Διάγραμμα 41 Διάγραμμα 40 B). Επιπλέον, τα επίπεδα GSH που οφείλονται στο εκχύλισμα EKPA αυξήθηκαν κατά 12, 24, 22 και 25% στα 5, 10, 20 και 40  $\mu\text{g}$  εκχυλίσματος (Διάγραμμα 40 Γ), χωρίς μεταβολές στα επίπεδα ROS (Διάγραμμα 41 Γ). Τέλος, το ANKT αύξησε τα επίπεδα της GSH κατά 11 και 16% στα 50 και 70  $\mu\text{g}$  εκχυλίσματος, αντίστοιχα (Διάγραμμα 40 Δ) με ταυτόχρονη μείωση στα επίπεδα ROS κατά 21% στα 70 και 90  $\mu\text{g}$  (Διάγραμμα 41 Δ).



**Διάγραμμα 40** Επίδραση εκχυλισμάτων ανθέων ελιάς, στα επίπεδα GSH, στην κυτταρική σειρά EA.hy926 A) AGRI, B) KTKT, Γ) EKPA, Δ) ANKT, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης τους, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς την ομάδα ελέγχου (δε χορηγήθηκε εκχύλισμα) και παρουσιάζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SEM, (n=3). \* $p < 0,05$  στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. GSH; Glutathione.

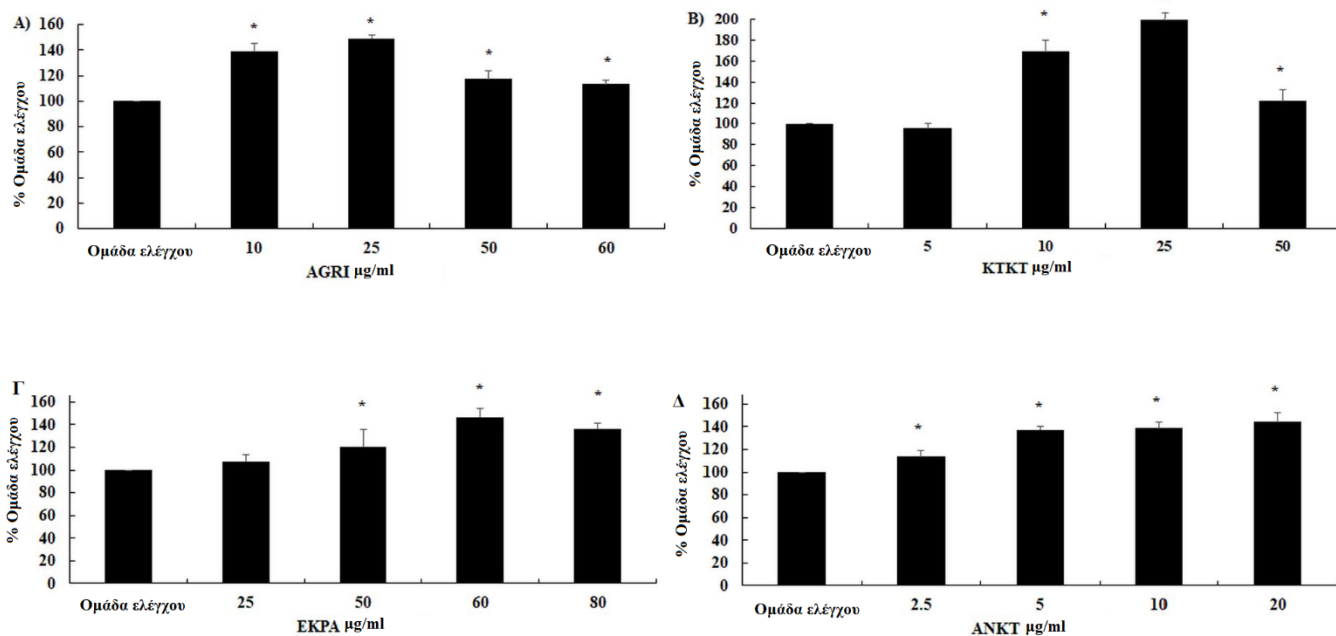


**Διάγραμμα 41** Επίδραση εκχυλισμάτων ανθέων ελιάς, στα επίπεδα ROS, στην κυτταρική σειρά EA.hy926 A) AGRI, B) KTKT, Γ) EKPA, Δ) ANKT, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης τους, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς την ομάδα ελέγχου (δε χορηγήθηκε εκχύλισμα) και παρουσιάζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SEM, (n=3). \* $p < 0,05$  στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. ROS; Reactive oxygen species.

#### 7.4.3.3 Επίπεδα GSH και ROS σε κύτταρα C2C12

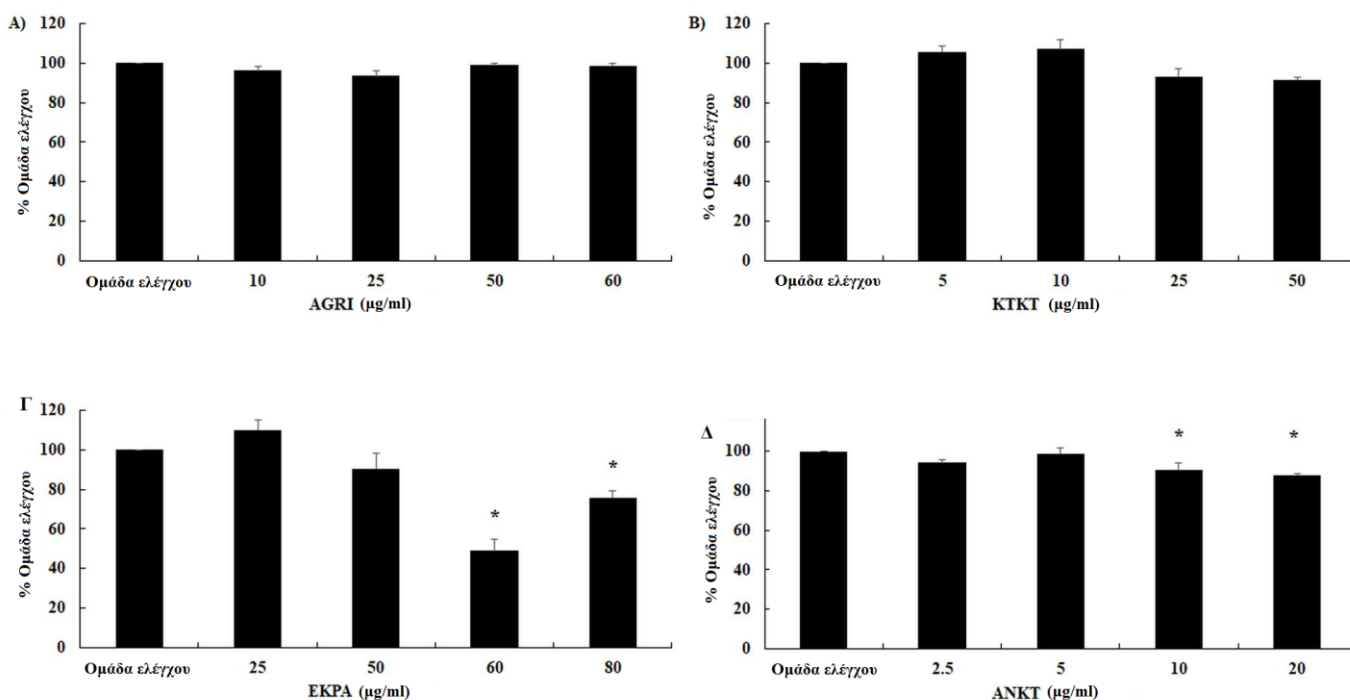
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη κυτταρομετρία ροής στα C2C12, τα επίπεδα της GSH αυξήθηκαν μετά από 24 ώρες επώασης με το AGRI κατά 40, 50, 18 και 13% στα 10, 25, 50 και 60 μg εκχυλίσματος, αντίστοιχα, συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (Διάγραμμα 42 A), ενώ τα επίπεδα ROS παρέμειναν ανεπηρέαστα (Διάγραμμα 43 A). Επιπλέον, το KTKT αύξησε τα επίπεδα GSH κατά 70, 99 και 22% στα 10, 25 και 50 μg εκχυλίσματος, αντίστοιχα, συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (Διάγραμμα 42 B) χωρίς να έχει επίδραση στα επίπεδα ROS (Διάγραμμα 43 B). Επιπλέον, το EKPA αύξησε την GSH κατά 21, 46 και 37% στα 50, 60 και 80 μg εκχυλίσματος αντίστοιχα (Διάγραμμα 42 Γ) με ταυτόχρονη μείωση στα επίπεδα ROS κατά 51 και 24% στα 60 και 80 μg EKPA, αντίστοιχα, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (Διάγραμμα 43 Γ). Τέλος, το ANKT αύξησε επίσης τα επίπεδα GSH κατά 14, 38, 39 και 44% στα 2,5, 5, 10 και 20 μg εκχυλίσματος, αντίστοιχα, συγκριτικά με την

ομάδα ελέγχου (Διάγραμμα 42 Δ) μειώνοντας επίσης τα επίπεδα ROS κατά 10 και 12% στα 10 και 20  $\mu\text{g}$  εκχυλίσματος, αντίστοιχα (Διάγραμμα 43 Δ).



**Διάγραμμα 42** Επίδραση εκχυλισμάτων ανθέων ελιάς, στα επίπεδα GSH, στην κυτταρική σειρά C2C12 Α) AGRI, Β) KTKT, Γ) EKPA, Δ) ANKT, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης τους, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς την ομάδα ελέγχου (δε χορηγήθηκε εκχύλισμα) και παρουσιάζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SEM, (n=3). \* $p < 0,05$  στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. GSH; Glutathione.



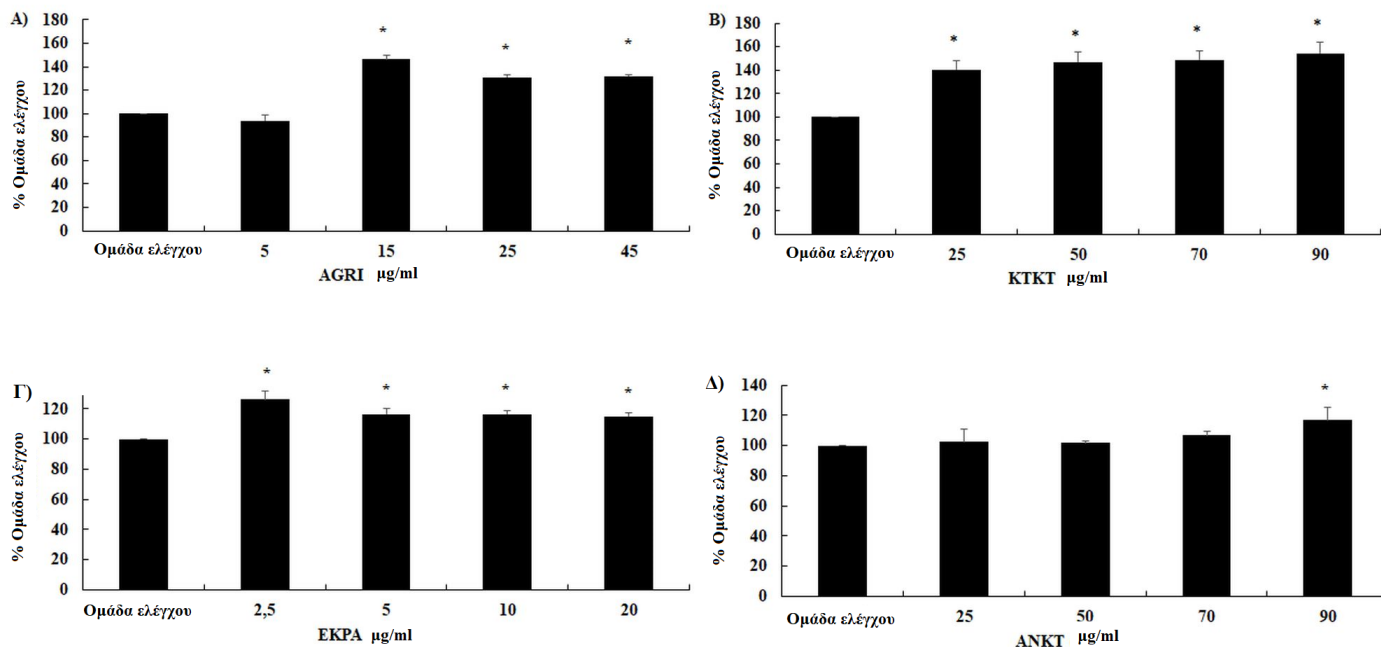


**Διάγραμμα 43** Επίδραση εκχυλισμάτων ανθέων ελιάς, στα επίπεδα ROS, στην κυτταρική σειρά C2C12 A) AGRI, B) KTKT, Γ) EKPA, Δ) ANKT, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης τους, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς την ομάδα ελέγχου (δε χορηγήθηκε εκχύλισμα) και παρουσιάζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SEM, (n=3). \* $p < 0,05$  στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. ROS; Reactive oxygen species

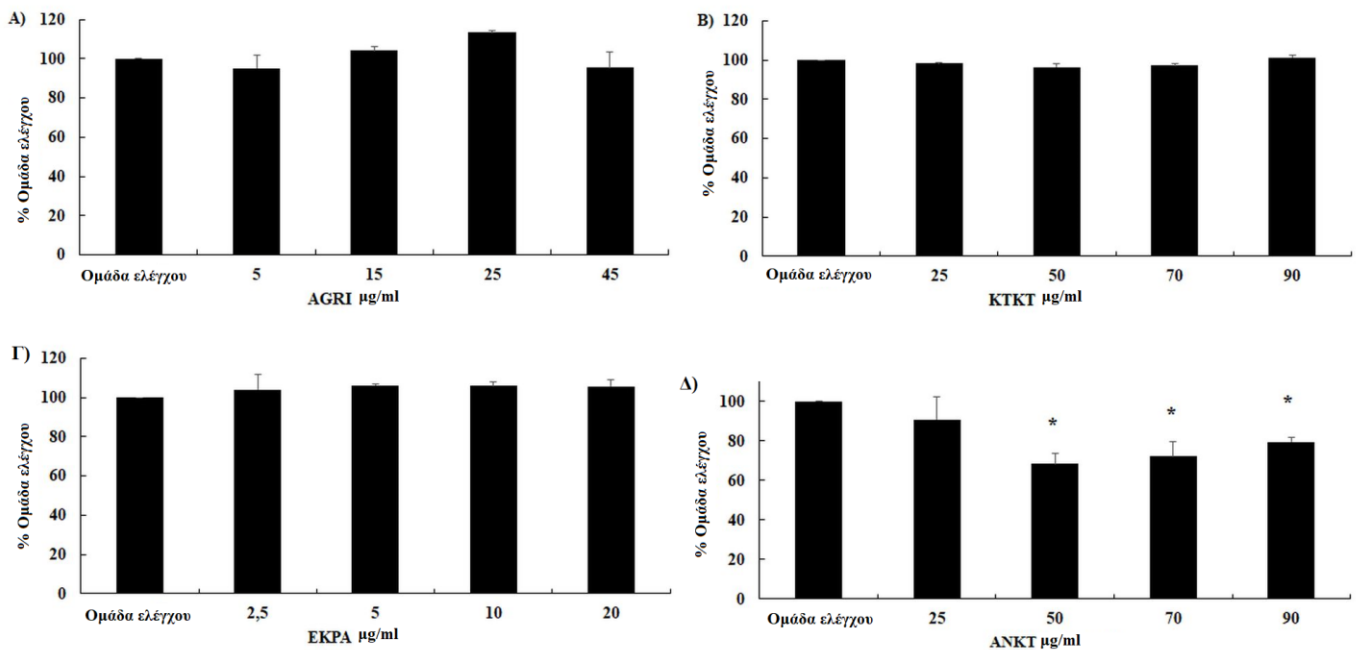
#### 7.4.3.4 Επίπεδα GSH και ROS σε κύτταρα HeLa

Μετά τη χορήγηση του AGRI στα HeLa, τα επίπεδα GSH αυξήθηκαν κατά 46, 31 και 32% στα 15, 25 και 45 μg εκχυλίσματος σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, αντίστοιχα (Διάγραμμα 44 A), ενώ τα επίπεδα ROS παρέμειναν σχετικά ανεπηρέαστα (Διάγραμμα 45 A). Επιπλέον, το KTKT αύξησε την GSH κατά 41, 47, 49 και 55% σε 25, 50, 70 και 90 μg εκχυλίσματος, αντίστοιχα (Διάγραμμα 44 B). Αντίθετα, τα επίπεδα ROS δεν μεταβλήθηκαν (Διάγραμμα 45 B). Μία ήπια αύξηση στα επίπεδα της GSH παρατηρήθηκε επίσης μετά από χορήγηση του EKPA για 24 ώρες, κατά 27, 17, 17 και 15% σε 2,5, 5, 10 και 20 μg εκχυλίσματος αντίστοιχα (Διάγραμμα 44 Γ) χωρίς αποτελέσματα επί των επιπέδων ROS (Διάγραμμα 45 Γ). Επιπλέον, η χορήγηση ANKT αύξησε την GSH κατά 17% στα 90 μg εκχυλίσματος σε σύγκριση με την ομάδα

ελέγχου (Διάγραμμα 44 Δ). Αντίθετα, τα επίπεδα ROS μειώθηκαν κατά 32, 28 και 20% στα 50, 70 και 90 μg ANKT, αντίστοιχα (Διάγραμμα 45 Δ).



**Διάγραμμα 44** Επίδραση εκχυλισμάτων ανθέων ελιάς, στα επίπεδα GSH, στην κυτταρική σειρά HeLa A) AGRI, B) KTKT, Γ) EKPA, Δ) ANKT, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης τους, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς την ομάδα ελέγχου (δε χορηγήθηκε εκχύλισμα) και παρουσιάζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SEM, (n=3). \*p<0,05 στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. GSH; Glutathione

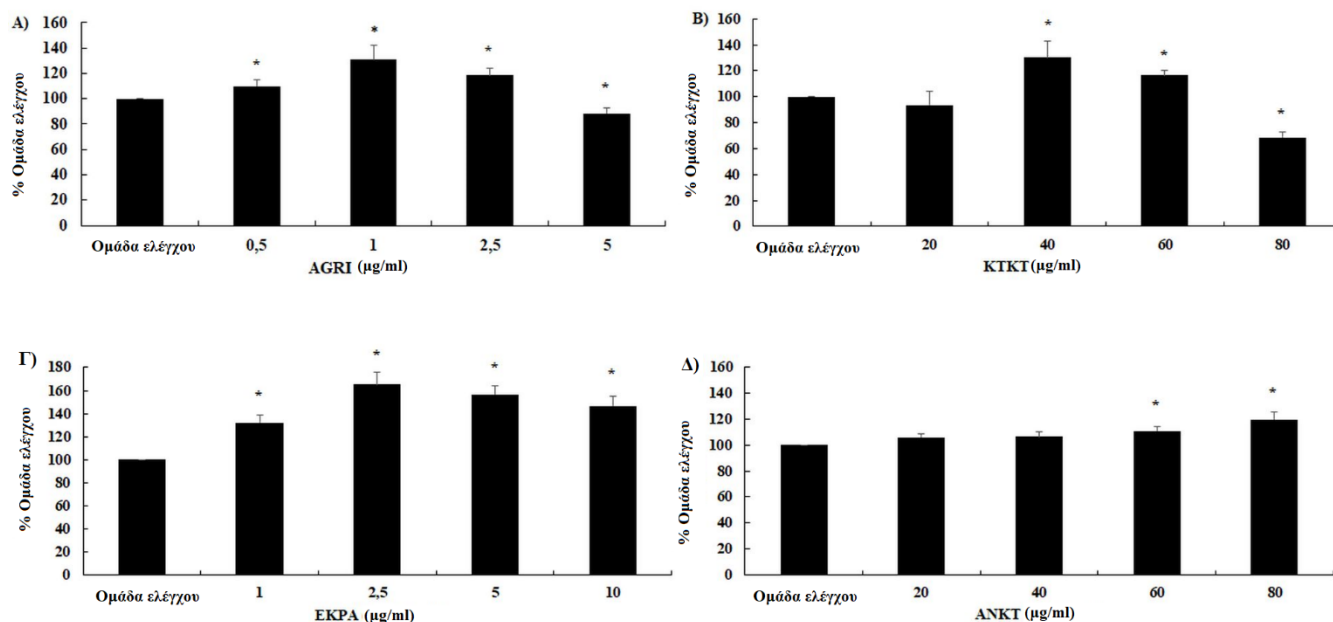


**Διάγραμμα 45** Επίδραση εκχυλισμάτων ανθέων ελιάς, στα επίπεδα ROS, στην κυτταρική σειρά HeLa A) AGRI, B) KTKT, Γ) EKPA, Δ) ANKT, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης τους, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς την ομάδα ελέγχου (δε χορηγήθηκε εκχύλισμα) και παρουσιάζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SEM, (n=3). \* $p < 0,05$  στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. ROS; Reactive oxygen species

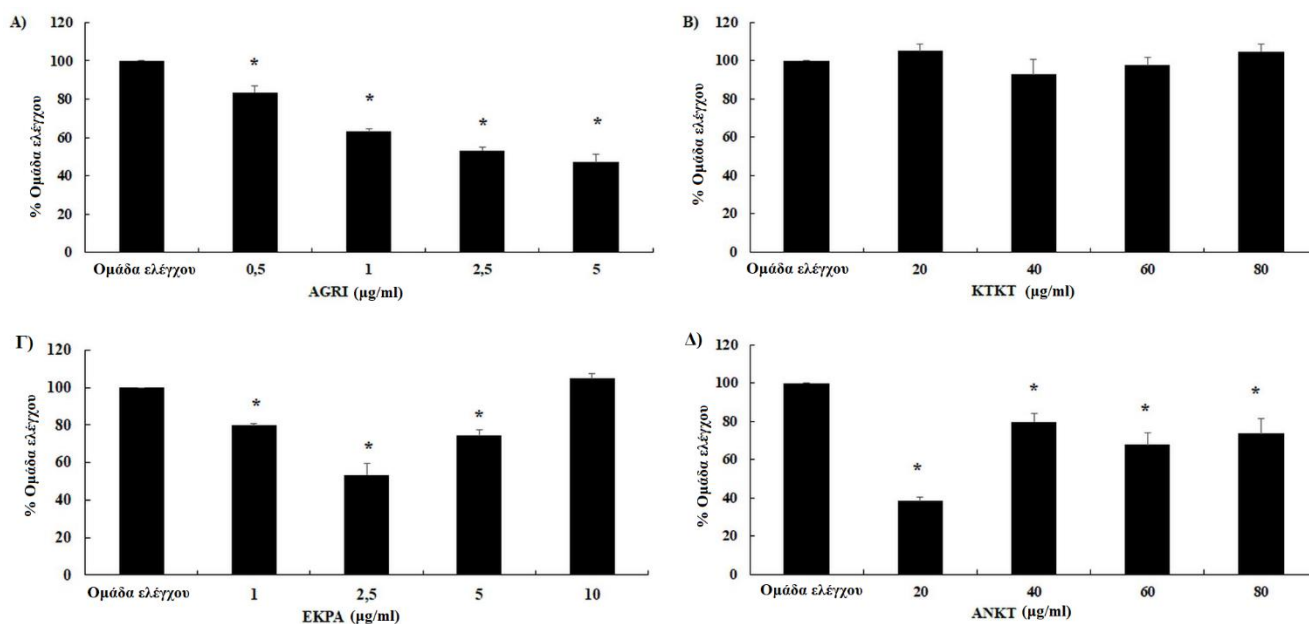
#### 7.4.3.5 Επίπεδα GSH και ROS σε κύτταρα HepG2

Τέλος, σε σχέση με τις επιδράσεις στα κύτταρα HepG2, το AGRI αύξησε τα επίπεδα GSH κατά 10, 31 και 19% στα 0,5, 1 και 2,5 μg εκχυλίσματος σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, αντίστοιχα. Παρ'όλα αυτά, στα 5 μg AGRI, τα επίπεδα της GSH μειώθηκαν κατά 12% πράγμα που δείχνει ένα προ-οξειδωτικό αποτέλεσμα (Διάγραμμα 46 A). Επιπλέον, τα επίπεδα ROS μειώθηκαν κατά 16, 37, 47 και 53% μετά τη χορήγηση 0,5, 1, 2,5 και 5 μg AGRI, αντίστοιχα (Διάγραμμα 47 A). Επιπλέον, τα επίπεδα GSH αυξήθηκαν κατά 31 και 17% στα 40 και 60 μg KTKT, αντίστοιχα. Ωστόσο, στα 80 μg των επιπέδων KTKT GSH μειώθηκαν κατά 32%, υποδεικνύοντας επίσης ένα προ-οξειδωτικό αποτέλεσμα (Διάγραμμα 46 B). Σε αντίθεση με την GSH, τα επίπεδα ROS δεν επηρεάστηκαν σημαντικά (Διάγραμμα 47 B). Επιπλέον, το EKPA αύξησε τα επίπεδα GSH σε όλες τις συγκεντρώσεις. Λεπτομερώς, μετά τη χορήγηση 1, 2,5, 5 και 10 μg EKPA, η GSH αυξήθηκε κατά 32, 65, 57 και 46% συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, αντίστοιχα (Διάγραμμα 46 Γ). Η χορήγηση του EKPA συνοδεύτηκε

από μείωση των ROS κατά 20, 47 και 26% σε 1, 2,5 και 5  $\mu\text{g}$  εκχυλίσματος, αντίστοιχα (Διάγραμμα 47 Γ). Επιπλέον, το ANKT αύξησε τα επίπεδα της GSH κατά 11 και 20% στα 60 και 80  $\mu\text{g}$  εκχυλίσματος, αντίστοιχα (Διάγραμμα 46 Δ), ενώ τα επίπεδα ROS μειώθηκαν κατά 62, 20, 32 και 26% στα 20, 40, 60 και 80  $\mu\text{g}$  ANKT σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, αντίστοιχα (Διάγραμμα 47 Δ).



**Διάγραμμα 46** Επίδραση εκχυλισμάτων ανθέων ελιάς, στα επίπεδα GSH, στην κυτταρική σειρά HepG2 A) AGRI, B) KTKT, Γ) EKPA, Δ) ANKT, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης τους, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς την ομάδα ελέγχου (δε χορηγήθηκε εκχύλισμα) και παρουσιάζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SEM, (n=3). \* $p < 0,05$  στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. GSH; Glutathion.



**Διάγραμμα 47** Επίδραση εκχυλισμάτων ανθέων ελιάς, στα επίπεδα ROS, στην κυτταρική σειρά HepG2 A) AGRI, B) KTKT, Γ) EKPA, Δ) ANKT, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης τους, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς την ομάδα ελέγχου (δε χορηγήθηκε εκχύλισμα) και παρουσιάζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SEM, (n=3). \* $p < 0,05$  στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. ROS; Reactive oxygen species

## 7.5 Συζήτηση

Στην παρούσα μελέτη, αξιολογήσαμε τις αντιοξειδωτικές, αντιμεταλλαξιγόνες και αντιγеноτοξικές ιδιότητες τεσσάρων πολυφαινολικών εκχυλισμάτων ανθέων ελιάς (EKPA, AGRI, ANKT, KTKT) τόσο *in vitro* όσο και σε 4 διαφορετικές κυτταρικές σειρές (C2C12, EA.hy926, HeLa, HepG2). Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι όλα τα εξετασθέντα εκχυλίσματα ασκούν ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα όπως αξιολογείται με την εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών (DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>•+</sup>). Επιπλέον, έδειξαν αντιμεταλλαξιγόνο και αντιγеноτοξική δράση ενώ επίσης είχαν την ικανότητα να αυξάνουν τα ενδογενή επίπεδα GSH με ταυτόχρονη μείωση στα ενδογενή επίπεδα ROS. Αξίζει να σημειωθεί ότι μόνο το 1-2% των ανθέων της ελιάς δίνουν ένα ώριμο καρπό, ενώ το υπόλοιπο πέφτει στο έδαφος χωρίς κανένα όφελος. Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία και επιβεβαιώνεται από την ποιοτική ανάλυση HPLC (Διάγραμμα 38) ότι τα άνθη ελιάς περιέχουν μεγάλο αριθμό βιοδραστικών ενώσεων που μπορεί να

ωφελήσουν την ανθρώπινη υγεία (206). Έτσι, η πιθανή εκμετάλλευση των ανθών ελιάς λόγω του βιοδραστικού τους ρόλου θα μπορούσε να προσφέρει μεγάλη οικονομική στήριξη στους παραγωγούς. Επιπλέον, θεωρούνται πηγές φυσικών φαρμακευτικών προϊόντων ελαχιστοποιώντας την ανάγκη βιομηχανικής παραγωγής χημικών ενώσεων.

Όλα τα εκχυλίσματα παρουσίασαν αντιοξειδωτική δράση, η οποία συσχετίζεται μεταξύ του πολυφαινολικού περιεχομένου και της εξουδετέρωσης των ριζών DPPH και ABTS<sup>•+</sup> (Πίνακας 20). Οι τιμές IC<sub>50</sub> των εκχυλισμάτων ανθέων ελιάς κυμαίνονται από 40,5 έως 73,6 μg εκχυλίσματος για την δοκιμή DPPH και μεταξύ 9,3 και 32,9 μg εκχυλίσματος για τη δοκιμασία ABTS<sup>•+</sup>. Το AGRI κατείχε την χαμηλότερη τιμή IC<sub>50</sub> και στις δύο μεθόδους υποδεικνύοντας ότι είναι το πιο ισχυρό μεταξύ των εξετασθέντων εκχυλισμάτων. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στην υψηλή συγκέντρωση φαινολών και κυρίως σε ελευρωπαϊνή και γλυκοζίδια φλαβονοειδών (κερκετίνη-3-O-σοφοροσίδη). Σε παρόμοιες μελέτες, τα εκχυλίσματα ανθέων ελιάς παρουσίασαν ισχυρό αντιοξειδωτικό δυναμικό όπως εκτιμήθηκε με τις τεχνικές DPPH<sup>•</sup> και ABTS<sup>•+</sup> (205,364). Οι χαμηλότερες τιμές IC<sub>50</sub> παρατηρήθηκαν στα δείγματα που συλλέχθηκαν στο τελευταίο αναπτυξιακό στάδιο του άνθους (Αύγουστος), έτσι φαίνεται ότι η αντιοξειδωτική δράση αυξήθηκε σύμφωνα με το αναπτυξιακό στάδιο (205). Επιπλέον, η ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH<sup>•</sup> από εκχυλίσματα διαφόρων τμημάτων ελιάς βρέθηκε να είναι υψηλότερη από αυτή του συνθετικού αντιοξειδωτικού βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο (BHT) [89,2% αναστολή της ρίζας DPPH (365)], υποδηλώνοντας την ύπαρξη συγκεκριμένων βιοδραστικών ενώσεων. Συγκεκριμένα, το ποσοστό αναστολής της ελεύθερης ρίζας DPPH<sup>•</sup> ήταν μεταξύ 93,8 - 95,2% για τα φύλλα ελιάς και 95,4 - 96,1% για τους καρπούς (366,367). Επιπλέον, το ποσοστό αναστολής της ελεύθερης ρίζας ABTS<sup>•+</sup> κυμάνθηκε μεταξύ 91,97 - 92,42% για τους μίσχους, 58,38 - 74,55% για τους καρπούς, ενώ η ίδια ικανότητα εξουδετέρωσης παρατηρήθηκε στα φύλλα. Αν και τα εκχυλίσματα από φύλλα ελιάς είχαν την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σύγκριση με τους μίσχους και τους καρπούς (366). Επιπλέον, οι προηγούμενες μελέτες μας έδειξαν ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα βιοφαινολικών εκχυλισμάτων που προέρχονται από διαφορετικά ελαιόλαδα απεικονίζουν τιμές IC<sub>50</sub> μεταξύ 9,3 - 49,5 μg/ml που υποδεικνύουν τη σημασία της διαφορετικής βιοφαινολικής σύνθεσης στη δραστηριότητα των εκχυλισμάτων να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες (268,368). Τα προαναφερθέντα στοιχεία υποδεικνύουν την ετερογένεια των βιοδραστικών ενώσεων μεταξύ των ελαιόδενδρων

και συνεπώς τη μεταβλητότητα των αντιοξειδωτικών τους ικανοτήτων (366). Η αντιοξειδωτική δραστηριότητα και η ποσότητα των συνολικών φαινολών που υπάρχουν στα εκχυλίσματα υποδεικνύουν ότι η ικανότητα τους να εξουδετερώνουν τις ρίζες, μπορεί να αποδοθεί στις υδροξυλιωμένες φαινολικές ενώσεις και ειδικότερα στον αριθμό των υδροξυλ- υποκαταστατών στον αρωματικό δακτύλιο, τη φύση των υποκαταστατών στην παρα- ή ορθο- διαμόρφωση (369), καθώς και στη διαθεσιμότητα των φαινολικών υδρογόνων (370). Αυτές οι ενώσεις αντιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες που σχηματίζονται μέσω της διαδικασίας αυτοξειδωσης, δημιουργώντας μια νεογέννητη ρίζα, η οποία σταθεροποιείται από την επίδραση συντονισμού του αρωματικού πυρήνα. Επιπλέον, η συνέργεια μεταξύ των αντιοξειδωτικών στο μείγμα καθιστά την αντιοξειδωτική ικανότητα εξαρτώμενη τόσο από τη συγκέντρωση όσο και από την αλληλεπίδραση μεταξύ των αντιοξειδωτικών και της δομής (205).

Τα αποτελέσματα από την δοκιμασία προστασίας του πλασμιδίου, η οποία αξιολόγησε την προστατευτική επίδραση των εκχυλισμάτων έναντι των μονοκλωνικών θραυσμάτων DNA που επάγονται με  $ROO^{\bullet}$ , έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα AGRI, ANKT και ΕΚΡΑ είχαν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη ικανότητα να προστατεύουν από τις θραύσεις του DNA σε σύγκριση με το εκχύλισμα ΚΤΚΤ, με  $IC_{50}$  στα 1,7, 2,1 και 2,9  $\mu\text{g}/\text{ml}$  αντίστοιχα, ενώ το ΚΤΚΤ εμφάνισε  $IC_{50}$  στα 8,2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Το AGRI παρουσίασε επίσης τη χαμηλότερη τιμή  $IC_{50}$  σε αυτή τη δοκιμασία. Σε σύγκριση με άλλες μελέτες, τα πολυφαινολικά εκχυλίσματα που προέρχονται από ελαιόλαδα είχαν την ικανότητα να προστατεύουν το DNA από βλάβες σε συγκεντρώσεις από 0,1 έως 8,2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  όπως εκτιμήθηκε με την ίδια πειραματική διαδικασία (368). Επιπλέον, η αντιγενοτοξική ικανότητα των πολυφαινολών του καφέ επέδειξε τιμές  $IC_{50}$  μεταξύ 51,03 - 132,29  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (371). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, τα πολυφαινολικά εκχυλίσματα ελαιολάδου και ελιάς έχουν ισχυρές αντικαρκινικές ιδιότητες. Συγκεκριμένα, τα εκχυλίσματα άγριων ελιών οδηγούν στη μείωση των βιοδεικτών καρκινώματος του ήπατος (372). Ενώ, τα εκχυλίσματα φύλλων ελιάς αναστέλλουν την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση των καρκινικών κυττάρων λευχαιμίας (373). Έχει επίσης αποδειχθεί ότι οι πολυφαινόλες της ελιάς μειώνουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, τη διεισδυτικότητα και την ανάπτυξη όγκων σε κυτταρικά μοντέλα καρκίνου του μαστού (374). Επιπλέον, πολυφαινολικά εκχυλίσματα ελαιολάδου με διαφορετική πολυφαινολική σύνθεση σε παράγωγα ΗΤ και Τ, είχαν την ικανότητα να προστατεύουν τις βλάβες του DNA που προκλήθηκαν από την  $ROO^{\bullet}$ , όπου τα πλούσια

σε HT είχαν μεγαλύτερη αντιγενοτοξική δραστηριότητα (368). Σύμφωνα με τα συμπεράσματά μας, πολυάριθμες μελέτες ανέφεραν ότι το ελαιόλαδο και τα υποπροϊόντα που προέρχονται από την παραγωγή του έχουν αντιοξειδωτικές και αντικαρκινικές ιδιότητες (268,362–364,375–378). Για παράδειγμα, τα εκχυλίσματα άγριων φύλλων προωθούν την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου (377). Επιπλέον, η καθημερινή κατανάλωση ελαιολάδου φάνηκε να προοθεί τη σταθερότητα του DNA παρέχοντας προστασία έναντι των επιβλαβών επιδράσεων του οξειδωτικού στρες (378). Τα εκχυλίσματα από διάφορα μέρη ελαιόδεντρων, συμπεριλαμβανομένων των λουλουδιών, έχουν επιδήξει μεγάλες αντιοξειδωτικές, αντιβακτηριακές και αντιαλλεργικές ικανότητες (364). Αξίζει να σημειωθεί ότι η σύνθεση των εκχυλισμάτων των φύλλων ελιάς είναι παρόμοια με εκείνη του ελαιολάδου (362) και των εκχυλισμάτων λουλουδιών που περιέχουν πολυφαινόλες όπως την HT, την T και την ελευρωπαίνη (205,373).

Τα αποτελέσματα από τη δοκιμή μεταλλαξιγένεσης (δοκιμασία Ames) έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα AGRI, EKRA και ANKT έχουν παρόμοια ικανότητα να προστατεύουν το βακτηριακό DNA από μεταλλάξεις με IC50 στα 3 μg/τρυβλίο ενώ το KTKT απεικονίζει IC50 στα 4 μg /τρυβλίο. Τα αποτελέσματα μπορούν να εξηγηθούν με βάση τον χρόνο συγκομιδής των ελιών. Αν και τα άνθη ελιάς KTKT και ANKT ανήκουν στην ίδια ποικιλία (Λιανοελιά) από την ίδια περιοχή, η διαφορά στο χρόνο συλλογής (5-6 / 5 και 14-15/5, αντίστοιχα) οδήγησε σε σημαντική διαφοροποίηση της χημικής περιεκτικότητας των υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων (Διάγραμμα 38) και συνεπώς, σε διαφορετική βιολογική δραστηριότητα. Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με άλλες σχετικές μελέτες, σύμφωνα με τις οποίες οι πολυφαινόλες από φυσικά εκχυλίσματα φυτών, όπως ο καφές (371), το ρόδι (379) και οι ελιές (380), είναι αυτές που διαθέτουν τις αντιμεταλλαξιγόνες ικανότητες.

Σύμφωνα με τη συσχέτιση Spearman, βρέθηκε μια στατιστικά σημαντική ( $p < 0,05$ ) συσχέτιση μεταξύ της Folin-Ciocalteu και της DPPH δοκιμής. Δηλαδή, της πολυφαινολικής περιεκτικότητας και της ικανότητας εξουδετέρωσης της ρίζας. Επιπλέον, οι διαφορές στις δραστηριότητες των εκχυλισμάτων μπορεί να οφείλονται στη χημική τους σύνθεση, όπως εκτιμάται από τη σχετική ανάλυση ποσοτικοποίησης (Διάγραμμα 39). Φαίνεται ότι το KTKT διαθέτει μικρότερη ποσότητα κερκετίνης- 3-O-σοφοροσιδής, ελευρωπαίνης, σεκοροϊδοειδή παράγωγα, ρουτίνη και φλαβονοειδή παράγωγα. Επίσης, με βάση τη Folin Ciocalteu φαίνεται πως το KTKT περιέχει το



χαμηλότερο πολυφαινολικό περιεχόμενο, υποδηλώνοντας ότι θα πρέπει να είναι το λιγότερο ισχυρό εκχυλίσμα. Συγκεκριμένα, το ΚΤΚΤ παρουσιάζει τις υψηλότερες τιμές IC50 στις δοκιμασίες του DPPH, της προστασίας πλασμιδίου και του Ames, σε σύγκριση με τα υπόλοιπα εκχυλίσματα, γεγονός που υποδεικνύει τη σημασία της χημικής πολυφαινολικής σύνθεσης στη δραστηριότητα των φυτικών εκχυλισμάτων. Τέτοιες σημαντικές διαφορές στις συγκεντρώσεις των πολυφαινολών πιθανώς αντανακλούν τη μεταβολική συμπεριφορά του ελαιόδεντρου κατά τη διάρκεια του σταδίου ανάπτυξης με βάση τον γονότυπο και τις περιβαλλοντικές συνθήκες (381).

Όσον αφορά τις επιδράσεις των εξετασθέντων εκχυλισμάτων στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των κυττάρων, τα εκχυλίσματα αύξησαν τα επίπεδα GSH σε όλες τις εξεταζόμενες κυτταρικές σειρές σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε μερικές περιπτώσεις (π.χ. χορήγηση AGRI σε κύτταρα HepG2) όταν η συγκέντρωση του εκχυλίσματος ξεπέρασε μια τιμή κατώφλι, τα ενδογενή επίπεδα της GSH μειώθηκαν υποδεικνύοντας ένα προ-οξειδωτικό φαινόμενο. Το προ-οξειδωτικό αποτέλεσμα που προκαλείται από τις πολυφαινόλες εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως η χημική τους φύση, η συγκέντρωσή τους και οι μικροπεριβαλλοντικές συνθήκες (π.χ. ο κυτταρικός τύπος, η οξειδοαναγωγή κατάσταση και η τιμή pH) (268,382). Πολυφαινολικά εκχυλίσματα ελαιολάδου έχει φανεί πως αυξάνουν τα επίπεδα της GSH μέσω του μονοπατιού Nrf2 (234,268,368). Επιπλέον, οι πολυφαινόλες καφέ επέδειξαν σημαντική αύξηση της GSH τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* όπως εκτιμήθηκε σε κυτταρικές σειρές C2C12 και EA.hy296 (383) και σε διαφορετικούς ιστούς αρουραίων Wistar (133), αντίστοιχα, επιδεικνύοντας ενεργό ρόλο για τον μεταγραφικό παράγοντα Nrf2.

Όσον αφορά τη χημική σύνθεση, η ανάλυση HPLC αποκάλυψε την παρουσία κοινών δευτερογενών μεταβολιτών σε όλα τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα. Τα εκχυλίσματα AGRI, EKPA και ANKT είχαν παρόμοιο μοτίβο απορρόφησης σε όλα τα δοκιμασθέντα μήκη κύματος (δηλαδή, 254, 280 και 355 nm) με μέγιστη απορρόφηση στα 254 nm και χρόνο κατακράτησης, 15-35 λεπτά. Οι τρεις κύριες ενώσεις που βρίσκονται σε αυτά τα εκχυλίσματα είναι η κερκετίνη-3-Ο-σοφοροσίδη (χρόνος κατακράτησης 21,5 λεπτά), ρουτίνη (χρόνος κατακράτησης 23,75 λεπτά) και ελευρωπαίνη (χρόνος κατακράτησης 30,0 λεπτά). Αντιθέτως, για το εκχύλισμα ΚΤΚΤ, το οποίο συλλέχθηκε νωρίτερα σε σύγκριση με τα υπόλοιπα δείγματα, απεικονίστηκαν χαμηλές τιμές απορρόφησης στα 254 nm ενώ βρέθηκε μόνο ίχνος ελευρωπαίνης. Σε

μια μελέτη επικεντρωμένη στα άνθη ελιάς της ποικιλίας «Chemlali» της Τυνησίας, φάνηκε ότι τα επίπεδα της ελευρωπαϊνης αυξήθηκαν με μια συνακόλουθη αύξηση της περιόδου ωρίμανσης των λουλουδιών (206).

Βάσει των αποτελεσμάτων μας, όλα τα εξετασθέντα εκχυλίσματα ανθέων ελιάς παρουσίασαν ισχυρές αντιοξειδωτικές, αντιμεταλλαξιγόνες και αντιγενοτοξικές ιδιότητες. Επιπλέον, βελτίωσαν την κατάσταση οξειδοαναγωγής σε κυτταρικό επίπεδο όπως υποδεικνύεται από την αύξηση των τιμών GSH και τα μειωμένα επίπεδα ROS. Τα άνθη της ελιάς θεωρούνται υποπροϊόντα της παραγωγής ελαιολάδου. Λαμβάνοντας υπόψη ότι κατά την καλλιέργεια ελαιοδένδρων παράγεται σημαντική ποσότητα ελαιοκάρπου, το βάρος της περιβαλλοντικής ρύπανσης είναι υψηλό. Δεδομένων των αισιόδοξων ευρημάτων που παρουσιάζουμε σε αυτή τη μελέτη, πιστεύουμε ότι, αν και απαιτούνται περαιτέρω σχετικές *in vivo* μελέτες, τα εκχυλίσματα που προέρχονται από τα άνθη θα μπορούσαν να έχουν προστιθέμενη αξία και να χρησιμοποιηθούν ως αντιοξειδωτικά ή ως τρόφιμα, πρόσθετα τροφίμων/λειτουργικά συστατικά τροφίμων.

## Κεφάλαιο 8 – Μέρος V *In vivo*

### 8.1 Κύρια ευρήματα

- > Η χορήγηση ελαιολάδου βελτίωσε το οξειδοαναγωγικό δυναμικό στο αίμα, στον εγκέφαλο, στους μυς και στο λεπτό έντερο αρουραίων
- > Αντίθετα προκάλεσε οξειδωτικό στρες στον σπλήνα, στο πάγκρεας, στο ήπαρ και στην καρδιά
- > Δεν παρατηρήθηκαν διακριτά αποτελέσματα στον πνεύμονα, το κόλον και τα νεφρά.
- > Το ελαιόλαδο ασκεί ιστο-ειδική δράση όταν χορηγείται *in vivo*
- > Τα αρνητικά αποτελέσματά του πιθανότατα είναι προσαρμογές σύμφωνα με το σενάριο έκθεσης σε ξеноβιοτικά που προσομοιάζει την πραγματικότητα (real life exposure scenario)

## 8.2 Εισαγωγή- Σκοπός

Ο ευνοϊκός χαρακτήρας της κατανάλωσης ελαιόλαδου είναι σήμερα ευρέως αναγνωρισμένος. Για το σκοπό αυτό, η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA) [κανονισμός (ΕΕ) 432/2012 της Επιτροπής] (332) ενέκρινε δύο σχετικούς ισχυρισμούς για την υγεία. Σύμφωνα με αυτούς, συνιστάται η χρήση του ελαιόλαδου για την αντικατάσταση των κορεσμένων λιπών προκειμένου να διατηρηθούν τα φυσιολογικά επίπεδα χοληστερόλης στο αίμα. Επιπλέον, η EFSA προτείνει ότι το ελαιόλαδο προστατεύει τα λιπίδια του αίματος από το οξειδωτικό στρες προφανώς λόγω των πολυφαινόλων που υπάρχουν σε μια συνηθισμένη καθημερινή πρόσληψη 20 g. Ο ισχυρισμός αυτός αναφέρεται μόνο σε ελαιόλαδα που περιέχει 5 mg HT και παραγώγων (π.χ., σύμπλοκο ελευρωπαίνης και T) ανά 20 gr. Επιπλέον, η ευρωπαϊκή μελέτη EUROLIVE (The effect of olive oil consumption on oxidative damage in European populations) έθεσε το 2006, αποδείξεις για τον προστατευτικό ρόλο των φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου (174,384).

Οι πολυφαινόλες, αν και είναι γνωστές ως ισχυροί αντιοξειδωτικοί παράγοντες *in vitro*, μπορούν επίσης να δράσουν ως επιβλαβείς, προ-οξειδωτικοί παράγοντες *in vivo* (385). Επομένως, ο αντίκτυπος των πλούσιων σε βιοφαινόλες διατροφικών πλάνων στην ανθρώπινη υγεία εξακολουθεί να αποτελεί θέμα συζήτησης (386). Για παράδειγμα, οι βιοφαινόλες μπορούν να βοηθήσουν στη διατήρηση της ακεραιότητας του γαστρεντερικού σωλήνα που κινδυνεύει από την επιβλαβή δράση των δραστικών ειδών που σχηματίζονται μέσα στο στομάχι και τα έντερα από τα συστατικά της διατροφής (385). Ωστόσο, η κατανάλωση μεγάλων ποσοτήτων βιοφαινόλων μέσω της διατροφής ή των συμπληρωμάτων διατροφής δεν ενθαρρύνεται ακόμη (386). Αξίζει να σημειωθεί ότι πολλές μελέτες απέτυχαν να αποδείξουν ότι η χορήγηση αντιοξειδωτικών προστατεύει από τις επιζήμιες επιδράσεις των δραστικών ειδών (12,90,386–388). Πράγματι, υψηλές ποσότητες α-τοκοφερόλης είναι αναποτελεσματικές όσον αφορά τη μείωση των επιπέδων υπεροξειδωσης των λιπιδίων στους ανθρώπους (91,389). Επιπλέον, οι Vissers και συνεργάτες (390), επεσήμαναν ότι η κατανάλωση ελαιόλαδου από ανθρώπους εθελοντές ελαχιστοποίησε την τάση της οξείδωσης των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL), ωστόσο ελαιόλαδα χωρίς αντιοξειδωτική δράση είχαν το ίδιο αποτέλεσμα.

Η απουσία κλινικών αποτελεσμάτων όσον αφορά τη χρήση αντιοξειδωτικών ως πιθανών ευεργετικών παραγόντων για την ανθρώπινη υγεία αποτελεί το σημαντικότερο εμπόδιο. Έχει αναφερθεί ότι τα αντιοξειδωτικά μπορεί να διαταράξουν την ομοιοστασία των κυττάρων που σχετίζεται με τη διαταραχή της οξειδοαναγωγικής κατάστασης και τα σηματοδοτικά μονοπάτια, ο έλεγχος των οποίων διέπεται από δραστικά είδη (86). Αυτό αξίζει τη θέσπιση μιας συστηματικής και ολιστικής στρατηγικής για τη χορήγηση αντιοξειδωτικών, ανάλογα με τη φύση και τον τύπο της στοχευόμενης ασθένειας (391). Τα αντιοξειδωτικά έχουν αναφερθεί ότι είναι ωφέλιμα ως στρατηγική θεραπείας για τον καρκίνο, αλλά ταυτόχρονα έχουν ενοχοποιηθεί με επιβλαβείς επιδράσεις, όπως την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων (392). Για παράδειγμα, η Ν-ακετυλοκυστεΐνη (NAC), ένα πρόδρομο μόριο της GSH και η βιταμίνη Ε οδηγούν στην αύξηση των επιπέδων GSH, προάγοντας την εξέλιξη του όγκου μειώνοντας τα επίπεδα ROS. Καθώς τα μειωμένα επίπεδα ROS με τη σειρά τους μειώνουν τα επίπεδα έκφρασης του p53 (άξονας ROS-p53). Επιπλέον, η χορήγηση των ίδιων αντιοξειδωτικών σε ασθενείς με διαβήτη τύπου 2 είχε ελάχιστη ή καθόλου επίδραση στα αυξημένα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα και σε άλλους βιοδείκτες οξειδωτικού στρες, όπως η GSH, ο λόγος GSH / GSSG, τα TBARS και τα ισοπροστανία F2a των ούρων. Αντίθετα, έχει προταθεί ότι οι υψηλές δόσεις NAC στην πραγματικότητα θα μπορούσαν να είναι επιζήμιες με το να προκαλούν την αύξηση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα (393).

Έχουν γίνει πολλές δοκιμές *in vitro* με σκοπό τον έλεγχο των πιθανών αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων των μορίων που προέρχονται από τα φυτά, και στις περισσότερες περιπτώσεις έχει αποδειχθεί ότι είναι ισχυρά αντιοξειδωτικά. Ωστόσο, πριν από την επικύρωση αυτών των αποτελεσμάτων *in vivo* για να μελετηθεί η πιθανή θεραπευτική τους αποτελεσματικότητα, πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι τα αντιοξειδωτικά των φυτών περνούν από διάφορες φυσιολογικές διεργασίες όταν χορηγούνται σε ζωντανούς οργανισμούς, όπως ο μεταβολισμός. Επομένως, τα ευρήματα των *in vitro* μελετών αξιολόγησης του αντιοξειδωτικού δυναμικού μιας ένωσης δεν συνοδεύονται πάντα από ένα βιολογικό αποτέλεσμα. Συνεπώς, τα *in vitro* αποτελέσματα είναι συνήθως ακατάλληλα να προεκτείνονται σε οργανισμούς χωρίς να διεξάγεται επαρκής αριθμός *in vivo* πειραμάτων (394).

Πρέπει να τονιστεί εδώ ότι το νέο πρότυπο που έχει διαμορφωθεί τώρα στον τομέα της τοξικολογίας αναφέρεται στο λεγόμενο σενάριο έκθεσης σε ξеноβιοτικά που

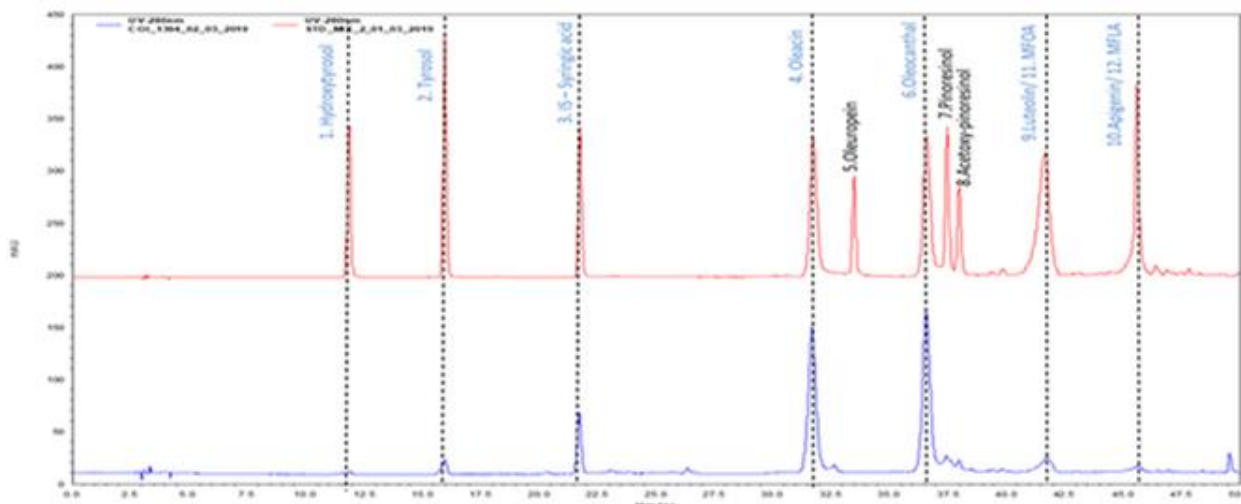
προσομοιάζει την πραγματικότητα (395,396). Σύμφωνα με αυτό, οι συνέπειες των συνηθισμένων ξενοβιοτικών όταν οι άνθρωποι εκτίθενται μακροπρόθεσμα, ακόμα και σε δόσεις αρκετά κάτω από το NOAEL (no-adverse-effects-level), είναι επιβλαβείς στο αίμα και τους ιστούς, καθώς προκαλούν τοξικότητα και οξειδωτικό στρες (397,398). Εντούτοις, είναι ενδιαφέρον να εξετασθεί η επίδραση του ελαιολάδου, όταν χορηγείται σε ένα σύντομο χρονικό διάστημα (acute-like mode), στο οξειδωτικού στρες κάτω από αυτό το τοξικολογικό πρίσμα. Με βάση τα παραπάνω, τα οφέλη του ελαιολάδου στην υγεία δεν έχουν πλήρως αποκαλυφθεί. Στην πραγματικότητα, είμαστε μόνο στην αρχή της κατανόησης των αμέτρητων τρόπων με τους οποίους το ελαιόλαδο μπορεί να βελτιώσει την ανθρώπινη υγεία και τον τρόπο ζωής. Αξίζει να σημειωθεί ότι στην βιβλιογραφία δεν υπάρχουν πειράματα που να διερευνούν την επίδραση των φαινολικών ενώσεων του ελαιολάδου στη λειτουργία συγκεκριμένων οργάνων (π.χ. σπλήνας, πάγκρεας, εγκέφαλος ή καρδιά) (189). Επιπλέον, οι μοριακοί μηχανισμοί για την ενίσχυση της αντιοξειδωτικής άμυνας του αίματος και ιστών λόγω της κατανάλωσης διατροφής πλούσιας σε ελαιόλαδο, είναι ακόμα υπό έρευνα. Έτσι, ο κύριος στόχος αυτής της μελέτης ήταν να αξιολογηθεί ο πιθανός θετικός ή αρνητικός ρόλος της χορήγησης ελαιολάδου εμπλουτισμένου με πολυφαινόλες, στην οξειδοαναγωγική κατάσταση αίματος και ιστών αρουραίων, λαμβάνοντας υπόψη τη μεγάλη συζήτηση σχετικά με τις διαφορούμενες επιπτώσεις των αντιοξειδωτικών στην ανθρώπινη υγεία. Επιπλέον, υποθέσαμε ότι η επίδραση του ελαιολάδου θα είναι ιστοειδική, πράγμα που σημαίνει ότι το ελαιόλαδο μπορεί να είναι επιβλαβές για ορισμένους ιστούς και ωφέλιμο για κάποιους άλλους. Τέλος, σκοπός μας είναι να εκτιμήσουμε εάν τα παρατηρούμενα αποτελέσματα αποδίδονται σε μία ή περισσότερες συγκεκριμένες φαινολικές ενώσεις ή στο συνεργικό αποτέλεσμα του συνολικού φαινολικού κλάσματος μαζί με τα υπόλοιπα συστατικά του ελαιολάδου. Για τον σκοπό αυτό, μετά από μια σειρά *in vitro* δοκιμών, επιλέχθηκε ένα ελαιόλαδο με περιεκτικότητα βιοφαινολών στα 800 mg/kg ελαιολάδου και χορηγήθηκε για 14 ημέρες σε αρσενικούς αρουραίους Wistar, σε δόση που αντιστοιχεί σε 20 gr ελαιολάδου / ανά ημέρα για τον άνθρωπο.

### 8.3 Προέλευση και απομόνωση εκχυλισμάτων

Το υπό μελέτη ελαιόλαδο (κωδική ονομασία OLE\_1394) έχει παραχθεί σε μύλο δύο φάσεων. Οι καρποί συλλέχθηκαν κατά την περίοδο συγκομιδής 2017-2018 από την περιοχή Αρκαδίας της Ελλάδας. Το ελαιόδεντρο ήταν της ποικιλίας "Καλαμών" και η καλλιεργητική πρακτική ήταν οργανική. Το εκχύλισμα του ελαιολάδου προέρχεται από το εργαστήριο του καθηγητή Λεάνδρου-Αλέξιου Σκαλτσούνη της Φαρμακευτικής σχολής Αθηνών.

#### 8.3.1 Ανάλυση βιοφαινολών ελαιολάδου

Σε δοκιμαστικό σωλήνα των 10 ml, προστέθηκαν 2 γρ. ελαιολάδου και 1 ml διαλύματος εσωτερικού προτύπου (IS) (συριγκικό οξύ) και αναδεύτηκαν για 30 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 5 ml μεθανόλης / νερού (80:20, v/v) και υποβλήθηκαν σε ανάδευση για 1 λεπτό. Το μίγμα τοποθετήθηκε σε υπερηχητικό λουτρό για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε για 25 λεπτά. Μέρος της υπερκείμενης φάσης, διηθήθηκε και υποβλήθηκε σε ανάλυση HPLC-DAD. Η μέθοδος HPLC-DAD που πραγματοποιήθηκε προτείνεται από το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιολάδου (IOC) 2009 - COI/T.20/Doc No.29 (399). Συγκεκριμένα, ο διαχωρισμός επιτεύχθηκε σε στήλη Spherisorb Discovery HS C18 αντίστροφης φάσης (250 x 4.6 mm, 5 μm, Supelco) χρησιμοποιώντας κινητή φάση αποτελούμενη από 0.2% υδατικό ορθοφωσφορικό οξύ (A) και μεθανόλη / ακετονιτρίλιο (50:50 v / v) (B), με ρυθμό ροής 1 ml/ λεπτό και θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η εφαρμοζόμενη έκλυση βαθμίδωσης ήταν ως ακολούθως: 0 λεπτά, 96% A και 4% B. 40 λεπτά, 50% A και 50% B. 45 λεπτά, 40% A και 60% B. 60 λεπτά, 0% A και 100% B. 70 λεπτά, 0% A και 100% B. 72 λεπτά, 96% A και 4% B. 82 min, 96% A και 4% B. Ο όγκος έγχυσης ρυθμίστηκε στα 20 μl. Τα χρωματογραφήματα παρακολούθηθηκαν στα 280 nm (Διάγραμμα 48).



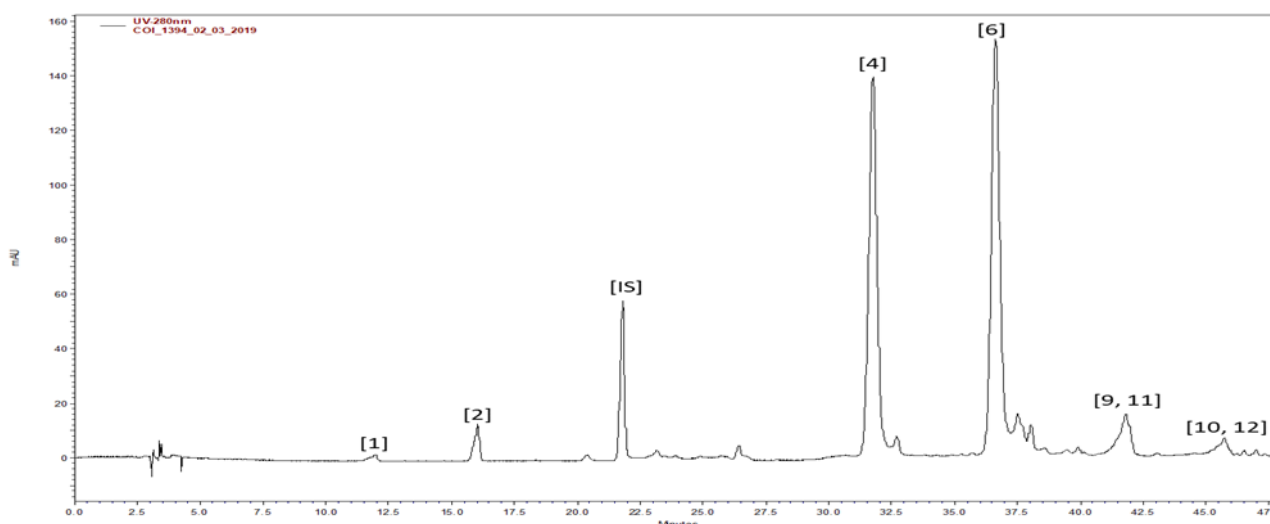
**Διάγραμμα 48** Το χρωματογράφημα RP-HPLC-DAD του δείγματος OLE\_1394 ελαιολάδου που αναλύθηκε στα 280 nm (μπλε γραμμή) και το χρωματογράφημα του διαλύματος αναφοράς στα 280 nm (κόκκινη γραμμή) (1: Υδροξυτυροσόλη, 2: Τυροσόλη, 3:Συριγγικό οξύ, 4: Ελεασίνη, 5: Ελευρωπαίνη, 6: Ελεοκανθάλη, 7: Πινορεζινόλη, 8: Ακετοξυπινορεζινόλη, 9: Λουτεολίνη, 10: Απιγενίνη, 11: MFOA (μονο-αλδεϋδική μορφή άγλυκου ελευρωπαίνης), 12: MFLA (μονο-αλδεϋδική μορφή άγλυκου λιγκστροσίδης).

### 8.3.2 Ποιοτικός προσδιορισμός βιοφαινολών

Για τον ποιοτικό προσδιορισμό των βιοφαινολών, παρασκευάστηκε και αναλύθηκε ένα αναλυτικό πρότυπο διάλυμα εργασίας αποτελούμενο από τις κυριότερες βιοφαινόλες, που αναφέρονται στον ισχυρισμό υγείας της EFSA. Ορισμένες από αυτές ήταν εμπορικά διαθέσιμα όπως η τυροσόλη, συριγγικό οξύ, πινορεζινόλη, υδροξυτυροσόλη, λουτεολίνη, απιγενίνη, ελαιοκανθάλη, ελεασίνη ενώ τα άλλα απομονώθηκαν από το ελαιόλαδο σε βαθμούς υψηλής καθαρότητας όπως η ακετοξυπινορεζινόλη, μονο-αλδεϋδική μορφή άγλυκου ελευρωπαίνης (MFOA) και μονο-αλδεϋδική μορφή άγλυκου λιγκστροσίδης (MFLA). Ο ποιοτικός προσδιορισμός των κύριων βιοφαινολών διεξήχθη συγκρίνοντας τον χρόνο κατακράτησης και τα φάσματα υπερύφους των αναλυτών που ανιχνεύθηκαν με αυτά των αντίστοιχων ενώσεων αναφοράς (Πίνακας 23 & Διάγραμμα 49).

**Πίνακας 23** Ενώσεις αναφοράς. Ο χρόνος κατακράτησης (RT, min) και το μήκος κύματος (UV, nm) της μέγιστης απορρόφησης κάθε αναλυόμενης ουσίας.

	ΕΝΩΣΕΙΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ	RT(MIN)	UV(NM)
<b>1</b>	Υδροξυτυροόλη	11.88	210-279
<b>2</b>	Τυροσόλη	15.96	220-275
<b>3</b>	Συριγκικό οξύ (I.S.)	21.81	217-275
<b>4</b>	Ελαιασίνη	31.77	227-280
<b>5</b>	Ελευρωπαϊνή	33.52	233-280
<b>6</b>	Ελαιοκανθάλη	36.52	226-276
<b>7</b>	Πινореζινόλη	37.51	228-279
<b>8</b>	Ακετοξυπινореζινόλη	38.03	229-279
<b>9</b>	Λουτεολίνη	41.74	349
<b>10</b>	Απιγενίνη	45.66	217-266-337
<b>11</b>	MFOA	41.72	230-280
<b>12</b>	MFOLA	45.66	227-280



**Διάγραμμα 49** RP-HPLC-DAD χρωματογραφήματος του αναλυθέντος δείγματος OLE\_1394 στα 280 nm. Οι προσδιορισθείσες ενώσεις επισημαίνονται.



### 8.3.3 Ποσοτικός προσδιορισμός βιοφαινολών

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των βιοφαινολών ακολουθήθηκε η μέθοδος που περιγράφεται στη μέθοδο COI / T.20 / Doc No.29. Συγκεκριμένα, η περιεκτικότητα σε βιοφαινόλες (λιγνάνες, φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα, σεκοϊριδοειδή, οξειδωμένες μορφές ελευρωπαίνης και άγλυκα λιγκστροσίδια), εκφρασμένη σε mg τυροσόλης / kg ελαιολάδου, εκτιμήθηκε μετρώντας το άθροισμα των περιοχών των σχετικών χρωματογραφικών κορυφών και του σχετικού συντελεστή απόκρισης των εξωτερικών πρότυπων διαλυμάτων τυροσόλης και συριγγικού οξέος (RRF συριγγικό οξύ / τυροσόλη) (Πίνακας 24). Τα επίπεδα συγκέντρωσης των κυριότερων βιοφαινολών έχουν επίσης προσδιοριστεί χρησιμοποιώντας τη μέθοδο regression analysis (Πίνακας 25).

**Πίνακας 24 Ποσοτικός προσδιορισμός των φαινολικών συστατικών**

Εκχύλισμα	RRF*	Προσδιορισμός πολυφαινολών (mg T/Kg ελαιολάδου)	
OLE_1394	4,88		580

RRF\*: Σχετικός παράγοντας απόκρισης (*Relative Response Factor*) για την έκφραση του αποτελέσματος ως τυροσόλη.

**Πίνακας 25 Ποσοτικός προσδιορισμός των κυριότερων βιοφαινολών.**

Εκχύλισμα	Υδροξυτυροσόλη	Τυροσόλη	Ελεασίνη	Ελεοκανθάλη
	(mg/Kg)	(mg/Kg)	(mg/Kg)	(mg/Kg)
OLE_1394	2,79	10,36	316	590

## 8.4 Ζώα μελέτης

Ο χειρισμός και η στέγαση των ζώων έγιναν στην κτηνιατρική σχολή του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, στο εργαστήριο του καθηγητή Ιωάννη Ταιτζόγλου.

Έντεκα αρσενικοί αρουραίοι Wistar (ηλικίας 3 μηνών,  $318,5 \pm 18,4$  g) στεγάστηκαν σε κλωβούς χωρητικότητας 3 ζώων, με 12h κύκλο φωτός/σκότους, ελεγχόμενη θερμοκρασία ( $22^\circ \pm 2^\circ$  C) και υγρασία (50%). Το πείραμα διεξήχθη στο εργαστήριο Κλινικής Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης σύμφωνα με τη Διακήρυξη του Ελσίνκι και τα εθνικά πρότυπα (Κωδικός Άδειας: EL-54-BIOexp-04). Το πειραματικό πρωτόκολλο εγκρίθηκε από τις αρχές της Εθνικής Κτηνιατρικής Διοίκησης [Άδεια Αρ. 438329 (1842)]. Όλα τα ζώα υποβλήθηκαν σε θεραπεία σύμφωνα με τις κατευθυντήριες αρχές της οδηγίας 89/609 / ΕΟΚ του Συμβουλίου της Ευρωπαϊκής Κοινότητας για την περίθαλψη και τη χρήση εργαστηριακών ζώων.

### 8.4.1 Πειραματικός σχεδιασμός

Τα ζώα χωρίστηκαν τυχαία σε 2 ομάδες. Η ομάδα ελέγχου ( $n = 6$ ), στην οποία οι αρουραίοι τρέφονταν με τυποποιημένη εμπορική τροφή αρουραίων (που περιείχε καλαμπόκι, αλεύρι σόγιας, κριθάρι, πίτουρο, μελάσα) που αγοράστηκε από τη Viozois. Την ομάδα ελαιολάδου ( $n = 5$ ) όπου οι αρουραίοι τράφηκαν με την πρότυπη εμπορική τροφή συν το ελαιόλαδο (800 mg βιοφαινόλες / kg). Το ελαιόλαδο χορηγήθηκε μέσω κατάλληλου γαστρεντερικού καθετήρα. Η δόση ήταν 0,112 ml / αρουραίος / ημέρα, η οποία αντιστοιχεί σε κατανάλωση 20 gr ελαιολάδου / ημέρα στον άνθρωπο, σύμφωνα με την EFSA, για 14 συνεχόμενες ημέρες. Η κατάσταση και η υγεία των ζώων παρατηρήθηκαν καθημερινά και το σωματικό τους βάρος μετρήθηκε στις ημέρες 1, 7 και 14. Εικοσιτέσσερις ώρες μετά την τελευταία χορήγηση οι αρουραίοι αναισθητοποιήθηκαν με ισοφλουράνιο (IsoFlo®, Abbot) και δείγματα αίματος συλλέχθηκαν με καρδιακή παρακέντηση. Κατόπιν, το στομάχι, το λεπτό και το παχύ έντερο, το ήπαρ, το πάγκρεας, ο σπλήνας, ο νεφρός, ο πνεύμονας, η καρδιά, ο τετρακέφαλος μυς και ο εγκέφαλος συλλέχθηκαν για περαιτέρω ανάλυση.

## 8.5 Αποτελέσματα

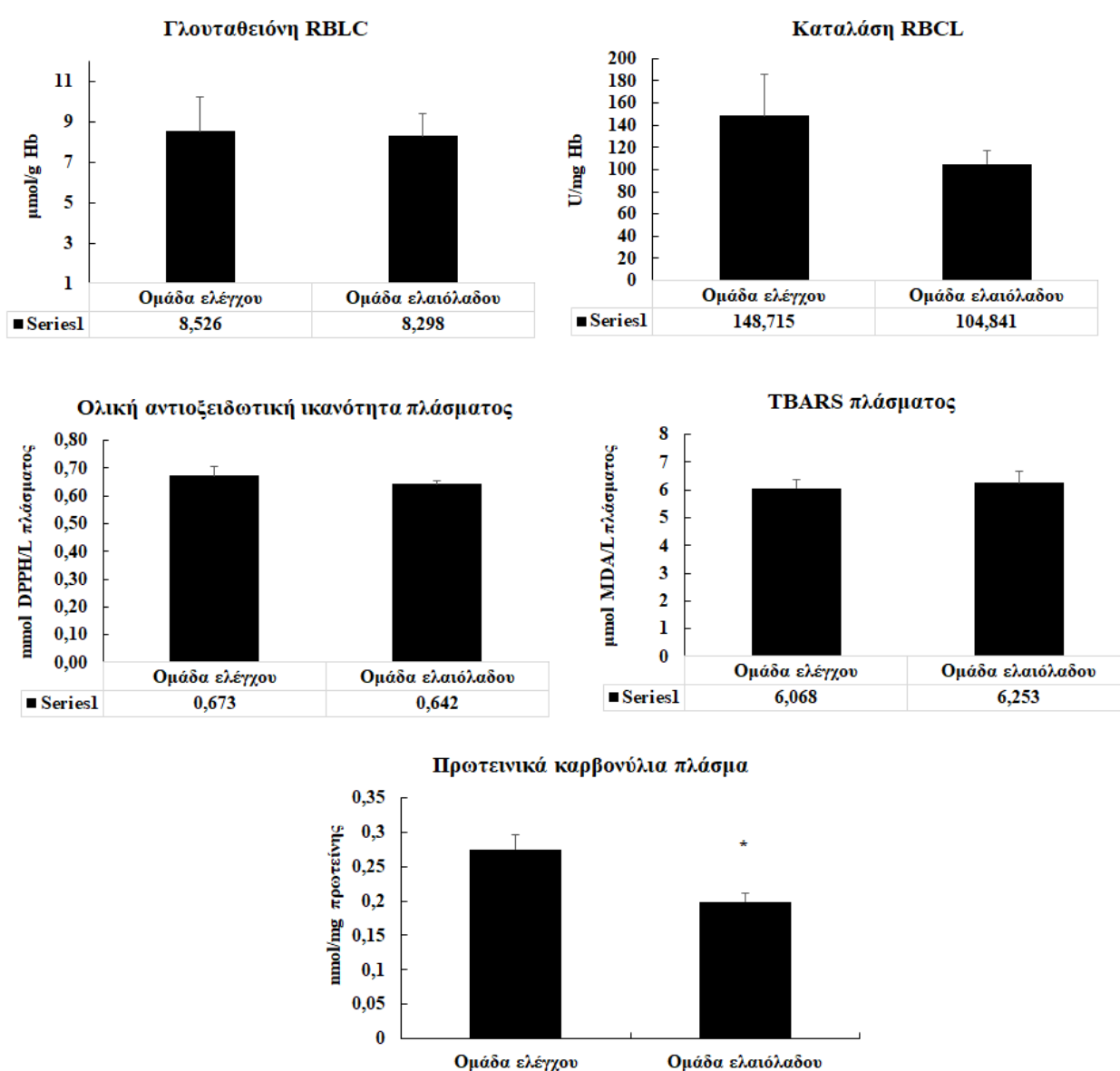
### 8.5.1 Βιοδείκτες οξειδοαναγωγής

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που ελήφθησαν, η χορήγηση ελαιολάδου σε αρουραίους προκάλεσε αντιφατικά αποτελέσματα όσον αφορά τους βιοδείκτες οξειδοαναγωγής που μελετήθηκαν. Συνολικά, η οξειδοαναγωγική κατάσταση του αίματος, του εγκεφάλου, των μυών και του λεπτού εντέρου επηρεάστηκε ευεργετικά, ωστόσο παρατηρήθηκαν επιβλαβείς επιδράσεις στον σπλήνα, στο πάγκρεας, στην καρδιά και στο ήπαρ. Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκαν διακριτά αποτελέσματα στον πνεύμονα, το παχύ έντερο και τους νεφρούς, ενώ δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση της χορήγησης ελαιολάδου στον στόμαχο. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων οξείδωσης πρωτεϊνών στην ομάδα που έλαβε ελαιόλαδο σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου στο αίμα (**Διάγραμμα 50**) και το λεπτό έντερο (**Διάγραμμα 55**), κατά 27,6% και 57,7% αντίστοιχα. Επιπλέον, τα επίπεδα λιπιδικής υπεροξειδωσης (**Διάγραμμα 54**) μειώθηκαν κατά 52,3% στον εγκέφαλο και τα επίπεδα GSH αυξήθηκαν κατά 41,1% στους (**Διάγραμμα 51**).

Αναφορικά με τις επιβλαβείς επιδράσεις του ελαιολάδου που παρατηρήσαμε, φαίνεται ότι ο σπλήνας είναι το πιο επηρεασμένο όργανο, καθώς παρατηρήθηκε μείωση της GSH κατά 8% (**Διάγραμμα 51**), του ρυθμού διάσπασης του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> κατά 17,1% (**Διάγραμμα 52**) και της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) κατά 10,4% (**Διάγραμμα 53**), ενώ υπήρξε αύξηση στα επίπεδα οξείδωσης πρωτεϊνών (PC) κατά 67,4% (**Διάγραμμα 55**). Επιπλέον, στο πάγκρεας υπήρξε αυξημένη υπεροξειδωση λιπιδίων (**Διάγραμμα 54**) και πρωτεϊνών (**Διάγραμμα 55**) μετά από τη χορήγηση ελαιολάδου κατά 65,8% και 8,0%, αντίστοιχα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Εντωμεταξύ, τα επίπεδα GSH του ήπατος (**Διάγραμμα 51**) μειώθηκαν κατά 12,8%, ενώ η υπεροξειδωση των λιπιδίων στην καρδιά αυξήθηκε κατά 20,7% (**Διάγραμμα 54**).

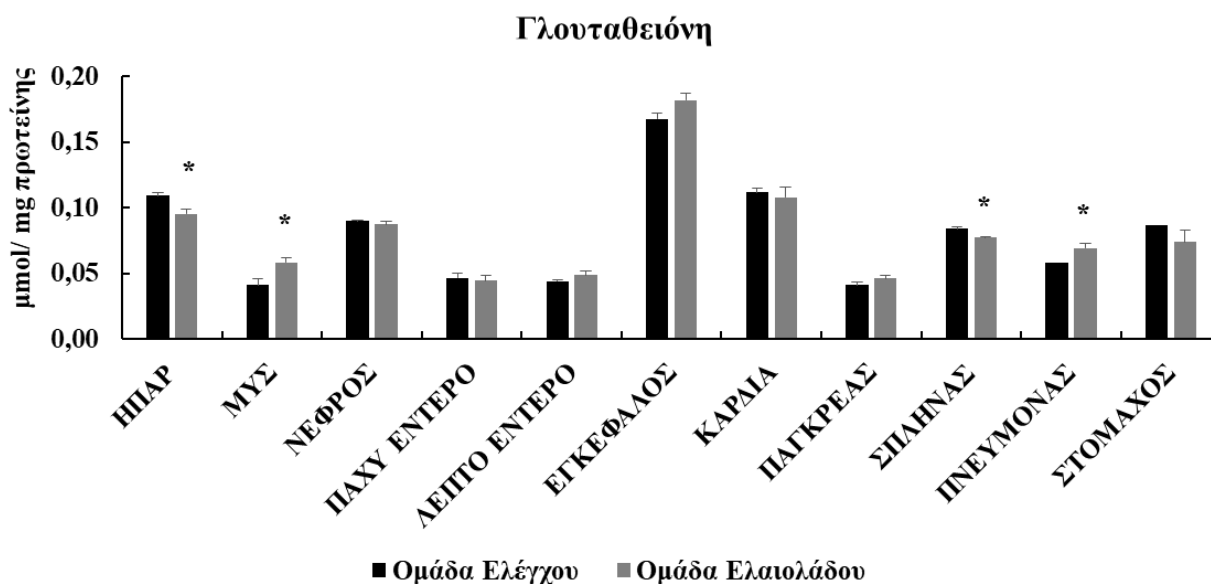
Επιπλέον, τα ευρήματά μας στον πνεύμονα, το παχύ έντερο και τα νεφρά δεν ήταν διακριτά. Πιο αναλυτικά, τα επίπεδα της GSH στον πνεύμονα (**Διάγραμμα 51**) αυξήθηκαν κατά 18,8%. Φαίνεται ότι η αύξηση της GSH προστάτευσε τις πρωτεΐνες από την οξείδωση (**Διάγραμμα 55**), αφού τα επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων

μειώθηκαν κατά 39,3%, ωστόσο απέτυχε να προστατεύσει την οξειδωση των λιπιδίων του πνεύμονα (Διάγραμμα 54), μετα επίπεδα TBARS να είναι υψηλότερα κατά 32,8%. Τέλος, στο παχύ έντερο και στους νεφρούς, ο ρυθμός διάσπασης του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Διάγραμμα 52) μειώθηκε κατά 22,3% και 11,3%, αντίστοιχα και η TAC (Διάγραμμα 53) κατά 23,8% και 16,6% αντίστοιχα. Είναι ενδιαφέρον ότι αυτά τα αποτελέσματα συνοδεύονταν από μείωση των επιπέδων υπεροξειδωσης των λιπιδίων (18,5%) στο παχύ έντερο και των PC (Διάγραμμα 55) (15,6%) στους νεφρούς. Τέλος, οι μετρημένοι οξειδοαναγωγικοί βιοδείκτες στο στομάχι δεν επηρεάστηκαν στατιστικά σημαντικά.

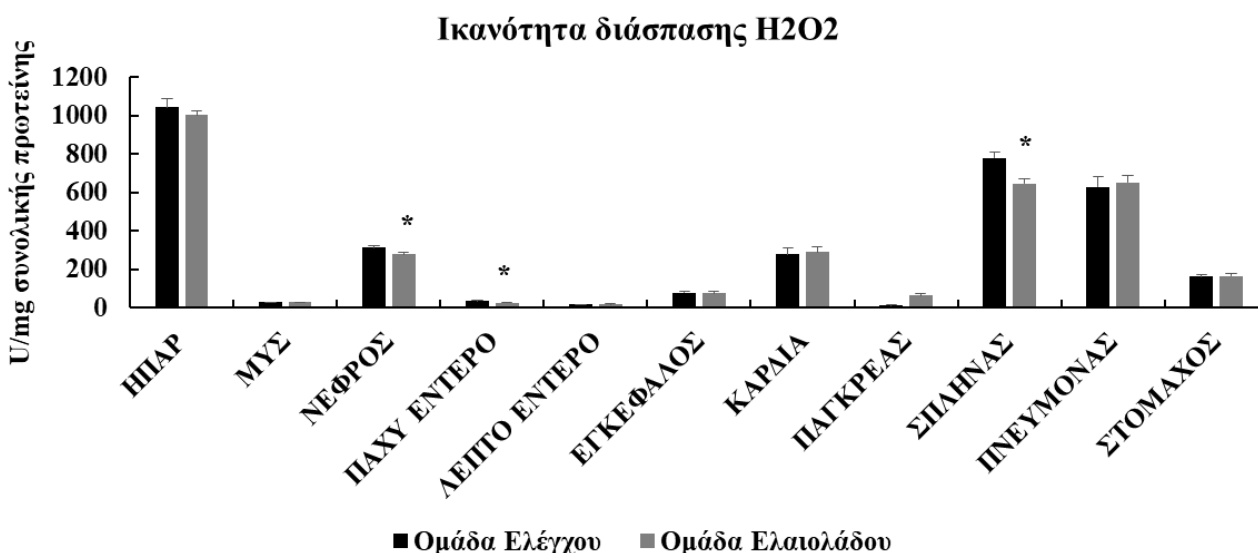


**Διάγραμμα 50 Τα αποτελέσματα χορήγησης ελαιόλαδου στους βιοδείκτες οξειδοαναγωγής του αίματος. (A) GSH σε RBCL, (B) Καταλάση σε RBCL. (C) TAC στο**

πλάσμα, (Δ) TBARS στο πλάσμα, (E) CARB στο πλάσμα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SEM (n=3). \* (p < 0,05): στατιστικά σημαντικό συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. GSH: ανηγμένη γλουταθειόνη. TAC: ολική αντιοξειδωτική ικανότητα. TBARS: ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ. RBCL: προϊόν λύσης ερυθρών αιμοσφαιρίων.

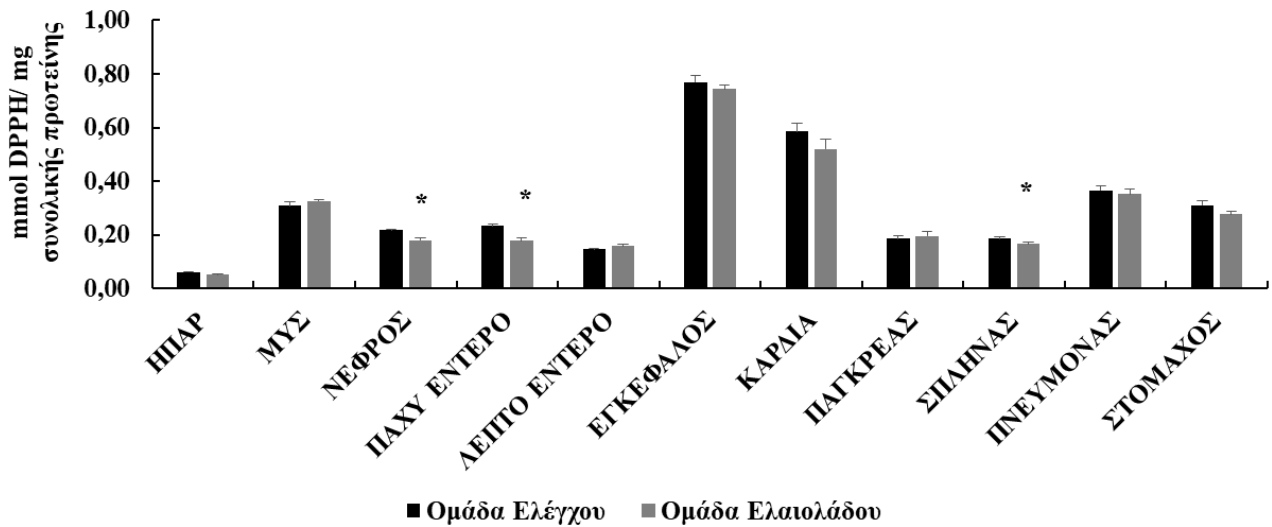


**Διάγραμμα 51** Επίδραση της χορήγησης ελαιολάδου στα επίπεδα GSH (ανηγμένη γλουταθειόνη) των ιστών αρουραίου. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  SEM (n=3). \*: Στατιστικά σημαντική μεταβολή συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου.



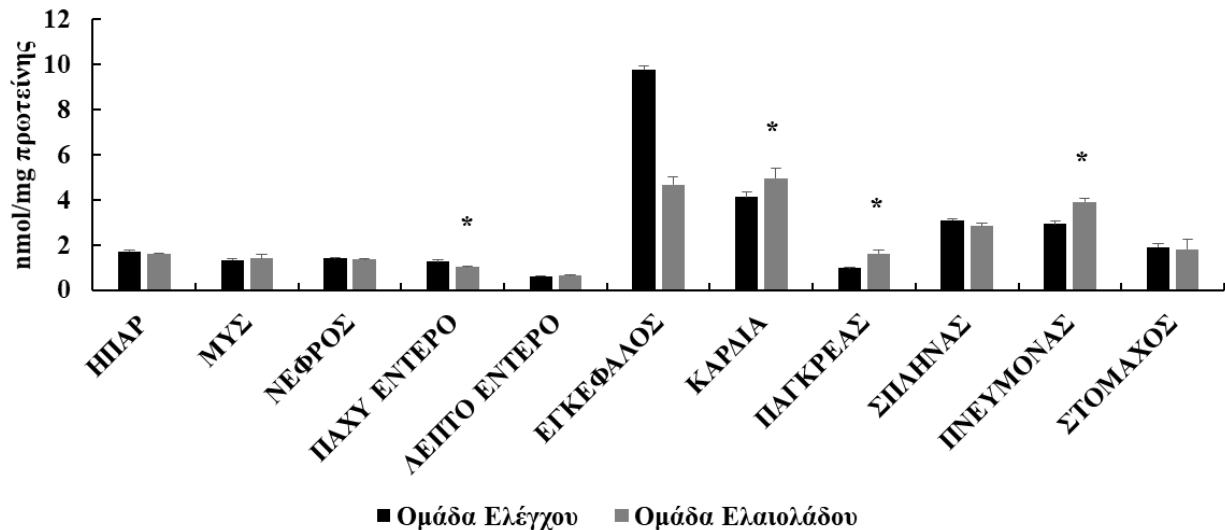
**Διάγραμμα 52** Επίδραση της χορήγησης ελαιολάδου στα επίπεδα διάσπασης του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> των ιστών αρουραίου. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  SEM (n=3). \*: Στατιστικά σημαντική μεταβολή συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου.

### Συνολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα

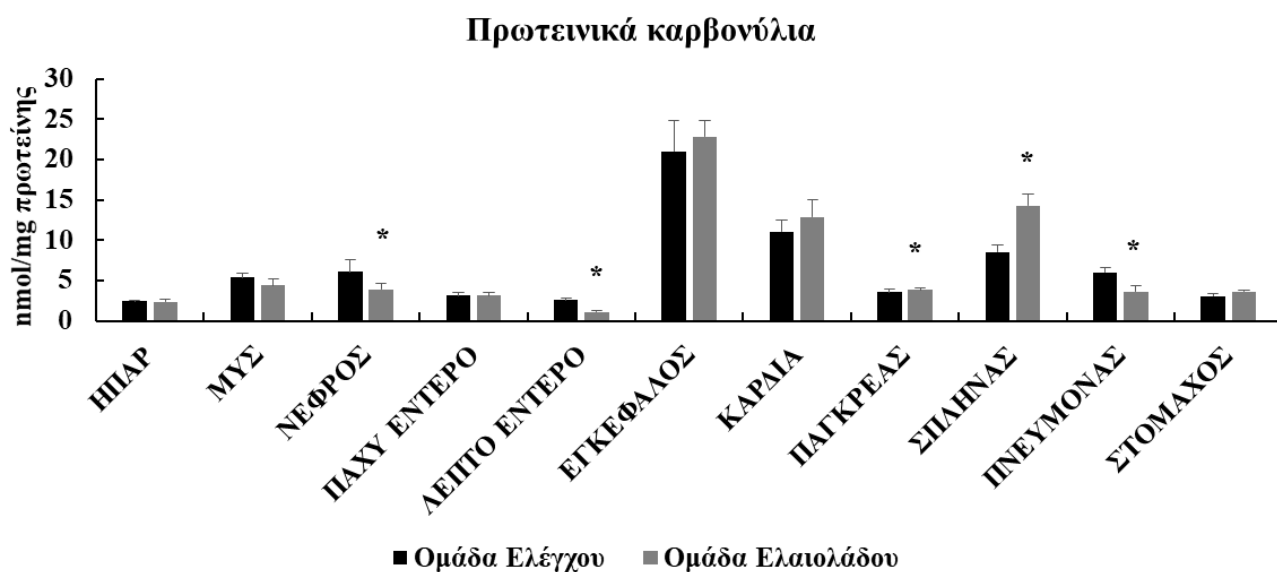


Διάγραμμα 53 Επίδραση της χορήγησης ελαιολάδου στα επίπεδα ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας των ιστών αρουραίου. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  SEM (n=3). \*: Στατιστικά σημαντική μεταβολή συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου.

### Λιπιδική Υπεροξειδωση



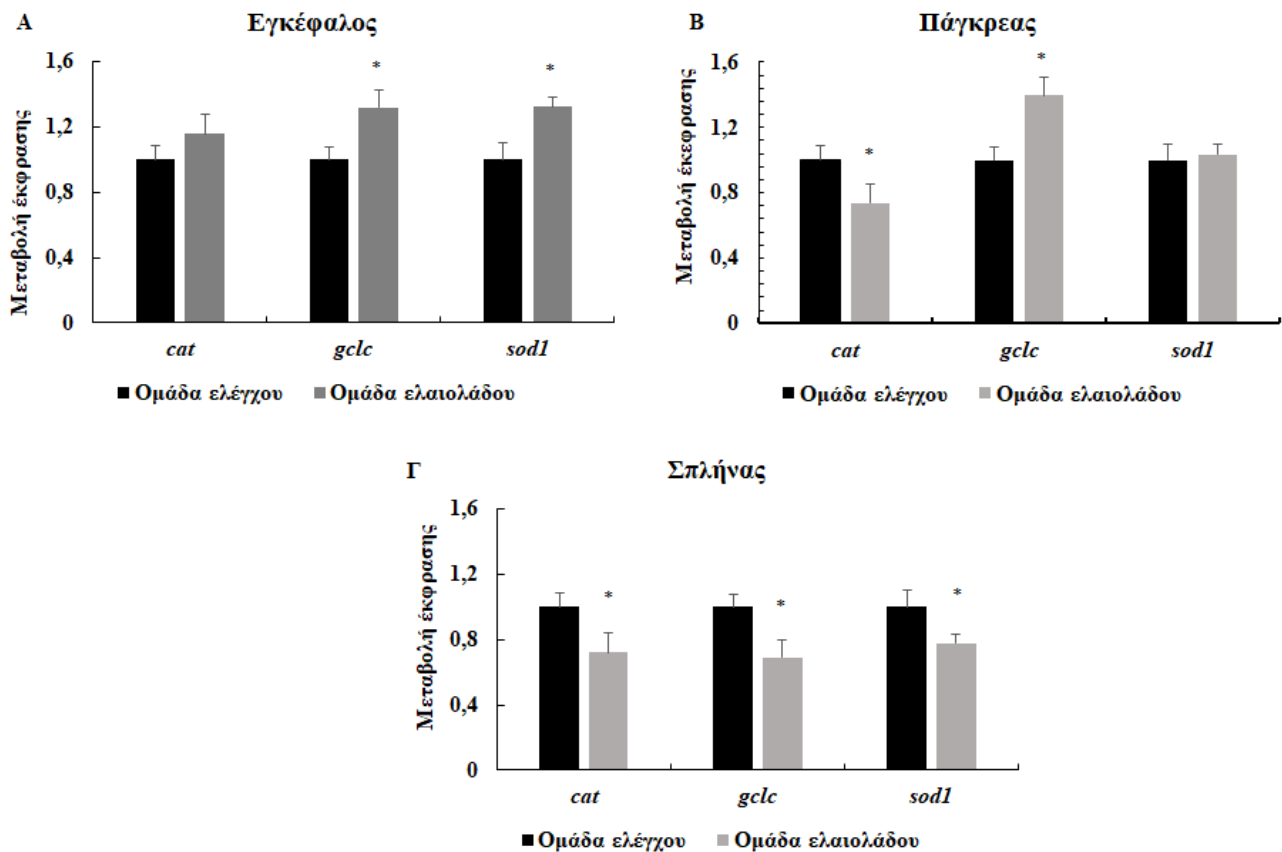
Διάγραμμα 54 Επίδραση της χορήγησης ελαιολάδου στα επίπεδα λιπιδικής υπεροξειδωσης των ιστών αρουραίου. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  SEM (n=3). \*: Στατιστικά σημαντική μεταβολή συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου.



**Διάγραμμα 55** Επίδραση της χορήγησης ελαιολάδου στα επίπεδα πρωτεϊνικής οξειδωσης των ιστών αρουραίου. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  SEM (n=3). \*: Στατιστικά σημαντική μεταβολή συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου.

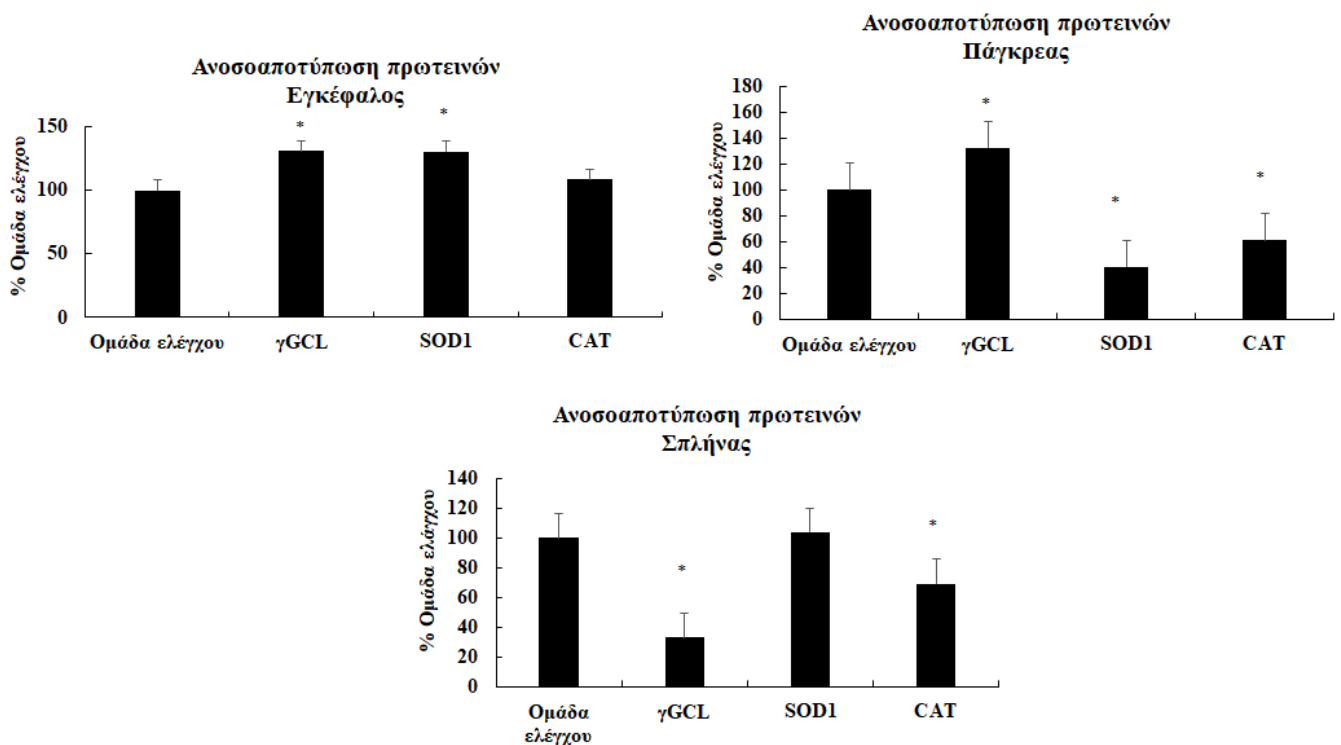
### 8.5.2 Έκφραση γονιδίων (qPCR) και πρωτεϊνών (Western blot)

Σύμφωνα με τα ευρήματά μας, τα επίπεδα mRNA της λιγάσης της γ-γλουταμυλ κυστεΐνης (*gclc*) αυξήθηκαν στον εγκέφαλο και στο πάγκρεας 1,32- και 1,4 φορές, ενώ μειώθηκαν στον σπλήνα 0,69 φορές. Τα επίπεδα της δισμουτάσης του υπεροξειδίου (*sod*) αυξήθηκαν στατιστικά σημαντικά μόνο στον εγκέφαλο (1,16 φορές) ενώ μειώθηκαν στον σπλήνα (0,78 φορές). Τα επίπεδα της καταλάσης (*cat*) μειώθηκαν τόσο στον σπλήνα όσο και στο πάγκρεας κατά 0,72 και 0,74 φορές, αντίστοιχα (Διάγραμμα 56). Αντίστοιχα, η έκφραση των επιπέδων πρωτεΐνης έδειξε πως τα επίπεδα λιγάσης γ-γλουταμυλ κυστεΐνης αυξήθηκαν στον εγκέφαλο και στο πάγκρεας κατά 31,10% και 32,36% σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, αντίστοιχα, ενώ μειώθηκαν στον σπλήνα κατά 66,43%. Η υπεροξειδική δισμουτάση αυξήθηκε στον εγκέφαλο (30,79%), αλλά μειώθηκε στο πάγκρεας (59,53%). Τέλος, η καταλάση μειώθηκε τόσο στον σπλήνα όσο και στο πάγκρεας κατά 30% (Διάγραμμα 57).



**Διάγραμμα 56** Τα αποτελέσματα της χορήγησης ελαιολάδου στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που σχετίζονται με τους ενδογενείς αντιοξειδωτικούς αμυντικούς μηχανισμούς σε επιλεγμένους ιστούς αρουραίων Α) Εγκεφάλου, Β) Πάγκρεας, Γ) Σπλήνα. \*: Στατιστικά σημαντική συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  SEM (n=3) μετά την κανονικοποίηση με το γονίδιο ακτίνης. *gclc*: λιγάση γ-γλουταμυλοκουστεΐνης (καταλυτική υπομονάδα), *cat*: καταλάση; *sod1*: δισμουτάση υπεροξειδίου.





**Διάγραμμα 57** Επίδραση της χορήγησης ελαιολάδου στα επίπεδα πρωτεϊνών των αντιοξειδωτικών ενζύμων σε επιλεγμένους ιστούς αρουραίων Α) Εγκεφάλου, Β) Πάγκρεας, Γ) Σπλήνα. \* ( $p < 0,05$ ): στατιστικά σημαντικό συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως εκατοστιαία μεταβολή των επιπέδων της αντίστοιχης πρωτεΐνης στην ομάδα ελέγχου  $\pm$  SEM ( $n=3$ ) μετά την κανονικοποίηση με την πρωτεΐνη GAPDH.  $\gamma$ -GCLC: λιγάση  $\gamma$ -γλουταμυλ κυστεΐνης (καταλυτική υπομονάδα). CAT: καταλάση; SOD1: δισμουτάση υπεροξειδίου 1.

## 8.6 Συζήτηση

Στην παρούσα μελέτη αναφέρουμε ότι η χορήγηση, ενός δείγματος ελαιολάδου πλούσιου σε βιοφαινόλες, σε αρουραίους επί δύο εβδομάδες σε μία δόση που αντιστοιχεί στην σχετική υγιεινή αξίωση της EFSA, ασκεί αμφιλεγόμενη δράση στην κατάσταση οξειδοαναγωγής του αίματος και των ιστών. Συγκεκριμένα, ήταν ευεργετικό για το αίμα, τον εγκέφαλο, τους μυς και το λεπτό έντερο, ωστόσο προκάλεσε οξειδωτικό στρες στον σπλήνα, το πάγκρεας, το ήπαρ και την καρδιά, ενώ δεν παρατηρήθηκαν διακριτά αποτελέσματα στον πνεύμονα, το παχύ έντερο και τους νεφρούς. Αυτά τα αποτελέσματα αντικατοπτρίστηκαν όχι μόνο μέσω της βλάβης των επιπέδων των αντιοξειδωτικών βιοδεικτών, όπως της GSH και της TAC, αλλά και μέσω

της αύξησης των συγκεντρώσεων των βιοδεικτών που υποδεικνύουν την οξειδωση μακρομορίων όπως των λιπιδίων και των πρωτεϊνών, δηλαδή τα TBARS και τα PC αντίστοιχα. Προηγούμενες μελέτες της ομάδας μας έχουν συσχετίσει τις βιοφαινόλες του ελαιολάδου με ισχυρή *in vitro* αντιοξειδωτική δράση. Ωστόσο, τα ίδια εκχυλίσματα σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, προκάλεσαν τη μείωση της GSH σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές, υποδηλώνοντας μία προ-οξειδωτική δράση (234,268,368). Αξίζει να σημειωθεί, πως οι πειραματικές μελέτες που μελετούν τις επιδράσεις του ελαιολάδου στην οξειδοαναγωγική κατάσταση *in vivo*, δεν έχουν αναλύσει σε βάθος το συνολικό μοριακό μηχανισμό της αλληλεπίδρασης μεταξύ της περιεκτικότητας του ελαιολάδου σε βιοφαινόλες και των ζωικών ή ανθρώπινων ιστών, προκειμένου να παράσχουν μια συνολική εικόνα. Έτσι, στην τρέχουσα μελέτη, το ελαιόλαδο που χορηγήθηκε, επιλέχθηκε μετά από προηγούμενα πειράματα διαλογής της ερευνητικής μας ομάδας (368). Συνεπώς, με το *in vivo* πείραμα που περιγράφεται εδώ, προσπαθήσαμε να ρίξουμε φως στο κατά πόσο οι *in vitro* παρατηρήσεις αντιστοιχούν στην πραγματικότητα σε *in vivo* συστήματ, καθώς πολλά υποσχόμενα ευεργετικά αποτελέσματα φυτικών εκχυλισμάτων *in vitro* συχνά δεν συσχετίζονται με *in vivo* αποτελέσματα (133).

Το πρώτο ζήτημα που πρέπει να αποσαφηνιστεί προκειμένου να εκτιμηθεί η βιολογική ανταπόκριση μετά τη χορήγηση του ελαιολάδου, είναι το εύρος της κατανομής και βιοσυσώρευσης των βιοφαινολών του στο σώμα. Σύμφωνα με τους Serra και συνεργάτες (2012) (189), οι βιοφαινόλες του ελαιολάδου απορροφώνται, μεταβολίζονται και διανέμονται μέσω της ροής του αίματος σε όλα τα όργανα του σώματος του αρουραίου, ακόμη και διαμέσου του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Τα θεϊκά σύμπλοκα των φαινυλαλκοολών (κυρίως HT και T) ήταν οι κυριότεροι μεταβολίτες που ποσοτικοποιήθηκαν στο πλάσμα και τους ιστούς, ενώ επίσης βρέθηκαν ελεύθερες μορφές ορισμένων βιοφαινολών, όπως παράγωγα ελευρωπαίνης στο πλάσμα και στον εγκέφαλο, λουτεολίνη στους νεφρούς, τους όρχεις, τον εγκέφαλο και την καρδιά, HT στο πλάσμα, τους νεφρούς και τους όρχεις, υποδεικνύοντας τον τρόπο με τον οποίο το ελαιόλαδο ασκεί τη βιολογική του δράση σε συγκεκριμένα όργανα (189). Όσον αφορά των άνθρωπο, οι Romero και συνεργάτες (2007) διερεύνησαν τη σταθερότητα και τη διάχυση των πολυφαινολών ελιάς και ελαιολάδου υπό προσομοιωμένες συνθήκες γαστρικού οξέος (400). Έδειξαν ότι οι περισσότερες πολυφαινόλες ελιάς και ελαιολάδου, είναι σταθερές σε όξινες συνθήκες στους 37 ° C

για έως και 4 ώρες. Επιπλέον, ανιχνεύονται σεκοϊριδοειδείς μεταβολίτες σε ανθρώπινα ούρα 2-6 ώρες μετά την κατάποση εξαιρετικού παρθένου ελαιολάδου. Ωστόσο από ότι γνωρίζουμε, δεν υπάρχει μελέτη που να διερευνά τη βιοδιαθεσιμότητα και τη διαπερατότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού του ανθρώπου.

Για το σκοπό αυτό, πολυάριθμες μελέτες έχουν καταδείξει τις ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία των βιοφαινολών του ελαιολάδου (401). Συγκεκριμένα, η χορήγηση ελαιολάδου σε αρουραίους προσέφερε προστασία έναντι της τοξικότητας του καδμίου (402), της TCDD (403), της φλουοξετίνης (404), του 2,4-διχλωροφαινοξυοξικού οξέος (405), της αλουμινίου και του ακρυλαμιδίου (406) και της παρακεταμόλης (407) στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό του πλάσματος και στο ήπαρ, όπως αξιολογήθηκε με τους βιοδείκτες της CAT, SOD, GPX, GR, NQO1, HO1, MDA και πρωτεϊνικών καρβονυλίων, αλλά και φλεγμονωδών βιοδεικτών (π.χ. TXB2 και LTB4). Επίσης, η χορήγηση εξαιρετικά παρθένου ελαιόλαδου σε αρουραίους μείωσε σημαντικά τους φλεγμονώδεις δείκτες με ταυτόχρονη αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας στον ορό (408). Επιπλέον, μελέτες σε ανθρώπους έδειξαν ότι η παρατεταμένη κατανάλωση εξαιρετικά παρθένου ελαιόλαδου με υψηλή και μέτρια περιεκτικότητα σε βιοφαινόλες, ήταν πιο αποτελεσματική στην προστασία της LDL από την οξείδωση και στην αύξηση των επιπέδων HDL σε σύγκριση με άλλους τύπους ελαιόλαδων, προτείνοντας έναν δοσοεξαρτώμενο μηχανισμό προστασίας έναντι του οξειδωτικού στρες (409,410). Επιπρόσθετα, το ελαιόλαδο έχει βρεθεί πως προστατεύει το DNA ενάντια οξειδωτικής βλάβης με αποτέλεσμα την ελάττωση του καρκίνου (411).

Ωστόσο, η τρέχουσα εργασία είναι η πρώτη που διερευνά τις αλλοιώσεις της οξειδοαναγωγικής κατάστασης στην πλειονότητα των ιστών και όχι μόνο στο αίμα ή το ήπαρ και επίσης στην ενδογενή οξειδοαναγωγική κατάσταση των αρουραίων χωρίς οποιαδήποτε χορήγηση κάποιας τοξικής ένωσης. Είναι ενδιαφέρον ότι τα αποτελέσματά μας για πρώτη φορά δείχνουν μια αρνητική σχέση μεταξύ των βιοφαινολών του ελαιολάδου και του καθεστώτος οξειδοαναγωγής, ιδιαίτερα του σπλήνα, του παγκρέατος, της καρδιάς και του ήπατος, όπου παρατηρήθηκε μείωση στα επίπεδα GSH και TAC με ταυτόχρονη αύξηση των επιπέδων οξείδωσης των λιπιδίων και των πρωτεϊνών. Οι Faine και συνεργάτες (2004) (412), έδειξαν ότι η χορήγηση ελαιολάδου μείωσε την δραστηριότητα της καταλάσης και της GSH-Px στο μυοκάρδιο. Ενώ η δραστηριότητα της GSH-Px έχει συσχετιστεί αντίστροφα με την υπεροξείδωση των λιπιδίων. Επιπλέον, σε μια άλλη μελέτη (413), το παράγωγο μεταβολισμού της

HT, HT-sulphate, ανιχνεύθηκε στον σπλήνα σε χαμηλές συγκεντρώσεις μετά την κατανάλωση ελαιολάδου και παρέμεινε εκεί για μεγάλο χρονικό διάστημα, γεγονός που μπορεί να συνιστά τη διαφορετική αντιοξειδωτική αποτελεσματικότητα του ελαιολάδου στον σπλήνα σε σύγκριση με τα άλλα όργανα. Επιπλέον, οι βιοφαινόλες του ελαιολάδου μπορούν να ασκήσουν άμεση αντιοξειδωτική δράση καθώς και να διαμορφώσουν ένζυμα αποτοξίνωσης (414).

Παρόλο που οι μοριακοί μηχανισμοί για την ενίσχυση της αντιοξειδωτικής άμυνας αίματος και ιστών λόγω της κατανάλωσης διατροφής πλούσιας σε ελαιόλαδο εξακολουθούν να υπόκεινται σε έρευνα, πρόσφατα στοιχεία έδειξαν ότι τα βιοφαινολικά συστατικά που υπάρχουν στο ελαιόλαδο εμπλέκονται στη διαμόρφωση του μονοπατιού Nrf2. Η ενεργοποίηση αυτής της οδού προωθεί την έκφραση γινιδίων που κωδικοποιούν για αντιοξειδωτικά ένζυμα (368,415). Προηγούμενες μελέτες της ερευνητικής μας ομάδας έχουν καταδείξει ότι οι πολυφαινολικές ενώσεις πολυφαινολικών εκχυλισμάτων ελαιολάδων, αυξάνουν τα επίπεδα τόσο της GSH όσο και των επιπέδων mRNA και πρωτεΐνης της καταλυτικής υπομονάδας  $\gamma$ -GCL ( $\gamma$ -GCLc) σε μυοβλάστες, ενδοθηλιακά, καρκινικά κύτταρα ήπατος και τραχήλου της μήτρας. Συνεπώς, τα μεταβληθέντα επίπεδα έκφρασης μπορούν να αποδοθούν στην ενεργοποίηση του Nrf2 (234,368). Αν και τα αυξημένα επίπεδα  $\gamma$ GCLc που παρατηρούνται εδώ στον εγκέφαλο και στο πάγκρεας δεν συνοδεύονται από την έκφραση άλλων αντιοξειδωτικών ενζύμων, η αύξηση μπορεί να αποδοθεί είτε σε υψηλότερο ποσοστό ανακύκλωσης ενζύμων όπως η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) και η αναγωγή της γλουταθειόνης, ή σε υψηλότερο βιοσυνθετικό ρυθμό που επάγεται από τη λιγάση της  $\gamma$ -γλουταμυλ κυστεΐνης ( $\gamma$ -GCL) και της συνθετάσης της γλουταθειόνης (GS). Ως εκ τούτου, έχουμε υποθέσει ότι οι τρέχουσες παρατηρήσεις σχετικά με την GSH θα μπορούσαν να αποδοθούν σε αυξημένο βιοσυνθετικό ρυθμό. Οι διαφορές της βιοδιαθεσιμότητας, της κατανομής, της συγκέντρωσης και του χρόνου διεύθυνσης των βιοφαινολών και των μεταβολιτών του ελαιολάδου στα διαφορετικά όργανα του ίδιου ζώου μπορεί να αντιπροσωπεύουν τη διαφορετική του αντιοξειδωτική δράση (413). Πράγματι, μελέτες του εργαστηρίου μας έχουν αναφέρει ιστό-ειδικές αντιοξειδωτικές επιδράσεις των βιοφαινολών του καφέ σε αρουραίους και των υγρών αποβήτων ελαιοτριβείου σε πρόβατα (133,416), χρησιμοποιώντας τον ίδιο πειραματικό σχεδιασμό. Αντίθετα, η χορήγηση ενός πλούσιου πολυφαινολικού εκχυλίσματος στεμφύλων με ισχυρή *in vitro* αντιοξειδωτική ικανότητα, προκάλεσε οξειδωτικό στρες

σε κατάσταση ηρεμίας και μετά από άσκηση όταν χορηγήθηκε *in vivo* σε αρουραίους, ωστόσο η επίδοση της άσκησης δεν επηρεάστηκε. Αυτά τα ευρήματα δείχνουν ότι τα πολυφαινολικά εκχυλίσματα δεν συμπεριφέρονται με τον ίδιο τρόπο *in vitro* και *in vivo* (417). Επιπλέον, η οδός χορήγησης (π.χ. από το στόμα, ενδοφλέβια, ενδοπεριτοναϊκά) επηρεάζει την ταχύτητα και την έκταση της απορρόφησης και επομένως την αναμενόμενη βιολογική δράση (418). Έτσι, ένας σημαντικός περιορισμός για την μη αναμενόμενη χρήση των αντιοξειδωτικών είναι η απουσία τυποποιημένης οδού χορήγησης, οι μη βέλτιστες δοσολογίες και η βιοδιαθεσιμότητά τους σε στοχευόμενα κυτταρικά διαμερίσματα, όπου η παραγωγή ROS είναι εκτεταμένη (391).

Οι βιοφαινόλες ως επί το πλείστον διερευνώνται για τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες, αλλά μπορούν επίσης να δράσουν και προ-οξειδωτικά επάγοντας οξειδωτικό στρες. Αυτό παρατηρείται κυρίως όταν τα αντιοξειδωτικά μόρια χορηγούνται μεμονωμένα και όχι ως μέρος της διατροφής. Η φαινολική ρίζα, η οποία δημιουργείται μετά την εξουδετέρωση των δραστικών μορφών, μπορεί να οξειδώσει την GSH δημιουργώντας μια ρίζα θειωλίου (RS·), η οποία όταν αντιδρά με την GSH παράγει τη ρίζα δισουλφιδίου (GSSG·). Η τελευταία ανάγει το O<sub>2</sub>, παράγοντας έτσι O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Επιπλέον, η φαινολική ρίζα ανάγει τον Fe<sup>3+</sup> σε Fe<sup>2+</sup>, το οποίο με τη σειρά του παράγει OH· μέσω αντίδρασης Fenton (91). Έτσι, "ένα προστατευτικό αποτέλεσμα της διατροφής δεν είναι ισοδύναμο με προστατευτικό αποτέλεσμα των αντιοξειδωτικών στη διατροφή" (90). Το 1995, οι Levander και συνεργάτες (419), εισήγαγαν έναν νέο όρο, το «διατροφικό οξειδωτικό στρες» (dietary oxidative stress). Ο όρος αυτός περιγράφει τη διαταραχή της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης των κυττάρων που προκαλείται αποκλειστικά από τη διατροφή, μέσω της υπερβολικής πρόσληψης οξειδωτικού φορτίου ή της διαταραγμένης διαθεσιμότητας αντιοξειδωτικών. Η χρήση του όρου «διατροφικό οξειδωτικό στρες» επιβεβαιώνει τον υπερβολικό ρόλο που έχει δοθεί στη διατροφή από τους επιστήμονες, αλλά φαινομενικά παρακολουθεί τους κανόνες της οξειδοαναγωγικής βιολογίας (385). Ομοίως, η αύξηση των αντιοξειδωτικών ενζύμων ή η αυξημένη πρόσληψη αντιοξειδωτικών ενώσεων ως διαιτητικών συστατικών ή ως συμπληρωμάτων διατροφής δεν είναι συνώνυμη με μια ενισχυμένη άμυνα του οργανισμού κατά των βλαβερών επιδράσεων των δραστικών ειδών (385). Εκτός από τον όρο «διατροφικό οξειδωτικό στρες», οι επιστήμονες θέτουν επίσης τον όρο «αντιοξειδωτικό στρες», το οποίο περιγράφει το προοξειδωτικό φαινόμενο που προκύπτει από τα υψηλά επίπεδα αντιοξειδωτικών ενώσεων (420). Το οξειδωτικό

στρες δεν είναι απαραίτητα μια ανεπιθύμητη κατάσταση, καθώς τα αποτελέσματά του μπορεί να είναι ευεργετικά για πολλές φυσιολογικές διεργασίες στα κύτταρα. Αντίθετα, υπάρχουν δυνητικά βλαβερές συνέπειες από το «αντιοξειδωτικό στρες», κυρίως στις περιπτώσεις υπερκατανάλωσης αντιοξειδωτικών. Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να εξουδετερώσουν τα ROS και να μειώσουν το οξειδωτικό στρες. Ωστόσο, αυτό δεν είναι πάντοτε ευεργετικό για την εμφάνιση ή πρόοδο κάποιων νοσημάτων (π.χ. καρκίνο) ή για την καθυστέρηση της γήρανσης (420). Πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν ότι τα αντιοξειδωτικά συμπληρώματα δεν προσφέρουν επαρκή προστασία από το οξειδωτικό στρες και από τις βλάβες που προκαλεί, αλλά ούτε συμβάλλουν ουσιαστικά στην αύξηση του προσδόκιμου ζωής. Επιπλέον, η θεραπεία με αντιοξειδωτικά δεν εμφάνισε καμία θετική επίδραση, ενώ μπορεί ακόμη και να αυξήσει τη θνησιμότητα (421–425). Με βάση τα παραπάνω, οι κλινικές δοκιμές, απέτυχαν να αποδώσουν ευεργετικά αποτελέσματα στη λήψη αντιοξειδωτικών. Οι Schulz και συνεργάτες, διαπίστωσαν ότι τα αντιοξειδωτικά που λαμβάνονται μέσω διατροφής διαταρράσουν την προσαρμοστική απάντηση του οργανισμού στα ROS που ονομάζεται "μιτοόρμηση" (426). Υπό ορισμένες συνθήκες, μελέτες τόσο σε *in vitro* όσο και *in vivo* συστήματα έδειξαν ότι οι βιταμίνες C και E, η SOD, η GSH και η β-καροτίνη προκάλεσαν «αντιοξειδωτικό στρες» επιπλέον του προοξειδωτικού στρες (420).

Δεν παρατηρήθηκαν διακριτά ή καθόλου αποτελέσματα στον πνεύμονα, το παχύ έντερο, τα νεφρά και το στομάχι. Αξίζει να αναφερθεί ότι ο μηχανισμός κυτταρικής ομοιοστασίας ρυθμίζει τις πιθανές αλλοιώσεις του αντιοξειδωτικού μηχανισμού. Έτσι, η χορήγηση εξωγενών αντιοξειδωτικών πιθανώς μετριάζει τον συνθετικό ρυθμό ή ακόμα και την δραστηριότητα ενδογενών αντιοξειδωτικών, έτσι ώστε το συνολικό "αντιοξειδωτικό δυναμικό των κυττάρων" να παραμένει αμετάβλητο, ένα φαινόμενο που περιγράφεται από τους Cutler και συνεργάτες (2003), ως "μοντέλο αντιστάθμισης οξειδωτικού στρες" (the oxidative stress compensation model). Αυτό το μοντέλο προσπαθεί να εξηγήσει γιατί τα αντιοξειδωτικά που λαμβάνονται μέσω της διατροφής αποτυγχάνουν να μειώσουν τα επίπεδα οξειδωτικού στρες και να αυξήσουν τη μακροζωία (427). Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι τα κύτταρα βρίσκονται υπό αυστηρό ομοιοστατικό έλεγχο από ένα πολύπλοκο αντιοξειδωτικό δίκτυο (π.χ. μόρια, ένζυμα, ανακύκλωση ενδογενών αντιοξειδωτικών). Επομένως, εάν ένα εξωγενές αντιοξειδωτικό επηρεάζει τον ενδογενή αντιοξειδωτικό μηχανισμό, μια

αντισταθμιστική αλλαγή στα επίπεδα άλλων αντιοξειδωτικών μπορεί να οδηγήσει σε αναλλοίωτη συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα (420).

Σύμφωνα με τη χημική σύνθεση του χορηγούμενου ελαιολάδου της μελέτης, η ελαιοκάνθαλη είναι παρούσα σε υψηλή συγκέντρωση σε ποσότητα ίση με 590 mg/ kg. Η ελαιοκάνθαλη, ένα θεμελιώδες συστατικό του ελαιολάδου, έχει συνδεθεί με πολυάριθμες επωφελείς επιδράσεις για την ανθρώπινη υγεία (428). Πράγματι, έχει αναφερθεί ότι αναστέλλει τις δραστηριότητες της κυκλοοξυγενάσης 1 και 2, ασκώντας έτσι ισχυρές αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες ενώ, φαίνεται είναι πιο ισχυρή από την ιβουπροφαίνη (255). Επιπλέον, η ελαιοκάνθαλη είναι επίσης γνωστή για την αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή της δράση (428,429), ενώ έχει αποδειχθεί ότι δρα και ως αντικαρκινικός παράγοντας (430). Παρ' όλα αυτά, η μελέτη αυτή θέτει ένα σημαντικό ζήτημα σχετικά με τη βέλτιστη συγκέντρωση ελαιοκάνθαλης στο ελαιόλαδο. Είναι πιθανό οι ανεπιθύμητες ενέργειες της χορήγησης του ελαιολάδου που παρατηρούνται σε συγκεκριμένους ιστούς να σχετίζονται με τα επίπεδα συγκέντρωσης της ελαιοκάνθαλης ή / και άλλων πολυφαινολών. Αυτή η παρατήρηση φαίνεται να έρχεται σε αντίθεση με την κοινή αντίληψη ότι όσο υψηλότερη είναι η πολυφαινολική περιεκτικότητα του ελαιολάδου, τόσο μεγαλύτερα τα ωφέλη για την ανθρώπινη υγεία. Για τον σκοπό αυτό, τα αποτελέσματά μας διατυπώνουν έναν σκεπτικισμό όσον αφορά τις ποσότητες των συστατικών του ελαιολάδου που εν τέλη δεν θα είναι επιβλαβείς για το οξειδοαναγωγικό προφίλ του αίματος και των ιστών.

Αξίζει να σημειωθεί εδώ ότι η πλειοψηφία των μελετών στη βιβλιογραφία εξετάζει τις προστατευτικές επιδράσεις των πολυφαινολών έναντι του οξειδωτικού στρες, ωστόσο μόνο λίγες από αυτές διερευνούν την υποτιθέμενη τοξική τους δράση. Από τα διαθέσιμα δεδομένα φαίνεται ότι η οξεία από του στόματος χορήγηση προανθοκυανιδίνης σταφυλιού ή εκχυλίσματος πουνιγαλίνης σε αρουραίους ή ποντίκια δεν προκαλεί τοξικότητα (411). Ωστόσο, όταν στη διατροφή τους προστέθηκαν μεγάλες δόσεις για μεγάλο χρονικό διάστημα, παρατηρήθηκε νεφροπάθεια. Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν αισθητό κίνδυνο στα κανονικά επίπεδα διατροφής (431). Παρόλο που το ελαιόλαδο είναι ένα ασφαλές προϊόν, που σημαίνει ότι πρακτικά δεν αναμένονται δυσμενείς επιδράσεις μετά τη χορήγηση του *in vivo*, στην παρούσα μελέτη αναφέρουμε ότι η οξεία κατανάλωση ελαιολάδου από αρουραίους προκάλεσε οξειδωτικό στρες σε ορισμένους ιστούς, πράγμα που σημαίνει ότι αυτοί οι συγκεκριμένοι ιστοί δεν εμφάνισαν χρήσιμες προσαρμογές μετά από την

αντιοξειδωτική αγωγή. Αν και, όπως το υπαγορεύει το "σενάριο έκθεσης σε πραγματικό χρόνο", οι άνθρωποι καταναλώνουν ελαιόλαδο καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους, πράγμα που σημαίνει ότι αυτή είναι μια χρόνια πρακτική γι' αυτούς. Βάσει της σχετικής βιβλιογραφίας, πιστεύουμε ότι μετά από μακροχρόνια χορήγηση του ελαιολάδου της υψηλής πολυφαινολικής του περιεκτικότητας, πιθανώς να απαλείψει αυτές τις επιζήμιες επιδράσεις και να ενισχύσει το αμυντικό σύστημα των ιστών. Αυτό το σενάριο εμφανίζεται επίσης σε μια μελέτη της ομάδας μας, όπου τροφή εμπλουτισμένη με υγρά απόβλητα ελαιολάδου (πλούσιας πολυφαινολικής σύστασης) είχε θετικές επιδράσεις στην κατάσταση οξειδοαναγωγής των μυών, της καρδιάς και του ήπατος μετά από μακροχρόνια έκθεση σε σύγκριση με τη βραχυχρόνια έκθεση (296). Πρέπει επίσης να τονιστεί ότι η αντίθετη παρατήρηση αναφέρεται σε πρόσφατο άρθρο (397). Είναι ενδιαφέρον ότι η χρόνια χορήγηση ενός μείγματος ξενοβιοτικών προκάλεσε ευεργετικά αποτελέσματα στον αντιοξειδωτικό μηχανισμό των ιστών αρουραίων μόνο μετά από βραχυχρόνια έκθεση, ενώ η μακροχρόνια έκθεση έτεινε τοξικότητα (397). Φαίνεται λοιπόν ότι η οξεία χορήγηση μίας υποθετικά ευεργετικής ένωσης (όπως το ελαιόλαδο) οδηγεί σε εξασθένιση της αντιοξειδωτικής άμυνας, αλλά η χρόνια θεραπεία μπορεί να οδηγήσει σε ευεργετικό αποτέλεσμα. Τέλος, πρέπει να επισημανθεί ότι τα επίπεδα έκθεσης εξαρτώνται από τον χρόνο παρουσίας των πολυφαινολών (431). Οι προαναφερθείσες μελέτες δείχνουν σαφώς ότι η μακροχρόνια έκθεση σε μια δόση ξενοβιοτικών που είναι φαινομενικά αβλαβής προκαλεί τοξικότητα και διαταράσσει την οξειδοαναγωγική ισορροπία στα ζώα (397). Αντίθετα, όταν η έκθεση είναι βραχυπρόθεσμα, ο αντίκτυπος είναι ευεργετικός, καθώς συμβαίνουν προσαρμογές οξειδοαναγωγής (397,398). Κάτω από αυτό το πλαίσιο, τα αρνητικά αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν στην παρούσα μελέτη μετά από χορήγηση ελαιολάδου (δηλαδή μόνο για 14 ημέρες) σε συγκεκριμένους ιστούς θεωρούνται πιθανώς ως προσαρμοστικές αποκρίσεις. Το αντιοξειδωτικό δυναμικό αυτών των ιστών αναμένεται να ενισχυθεί όταν το ελαιόλαδο, το οποίο δεν είναι ξενοβιοτικό αλλά ένα βρώσιμο έλαιο, χορηγηθεί μακροπρόθεσμα. Επομένως, ορισμένοι ιστοί επωφελούνται άμεσα από την αδιαμφισβήτητη θετική δράση του ελαιολάδου, ενώ άλλοι χρειάζονται περισσότερο χρόνο για να ξεπεράσουν το πρώτο λεγόμενο σοκ της χορήγησης ώστε τελικά να αναπτύξουν χρήσιμες οξειδοαναγωγικές προσαρμογές.



Συμπερασματικά, αυτή είναι η πρώτη μελέτη που αναφέρει φαινομενικά ανεπιθύμητες ενέργειες μετά από τη χορήγηση ελαιολάδου σε συγκεκριμένα όργανα, αναφορικά με την οξειδοαναγωγική τους κατάσταση, παρά τα πολυάριθμα οφέλη για την υγεία των βιοφαινολών του. Ωστόσο, σύμφωνα με το "σενάριο έκθεσης σε πραγματικό χρόνο" που αναλύθηκε παραπάνω, πιστεύεται ότι ο αρνητικός ρόλος του ελαιολάδου στην οξειδοαναγωγική κατάσταση ορισμένων ιστών είναι στην πραγματικότητα μια προσαρμοστική απάντηση που αναμένεται να ενισχύσει το οξειδοαναγωγικό τους προφίλ μετά από μακροχρόνια χορήγηση, όπως έχει έχει επίσης αναφερθεί προηγουμένως. Η νέα ιδέα της τοξικολογίας (δηλαδή η μακροχρόνια αγωγή με χαμηλή δόση έκθεσης) εφαρμόζεται εδώ καθώς έχει επίσης βρεθεί ότι βραχυχρόνια χορήγηση χημικών ουσιών προκαλεί χρήσιμες προσαρμογές. Επομένως, φαίνεται ότι η συμβολή των αντιοξειδωτικών διατροφής στην προστασία από το οξειδωτικό στρες είναι ένα φαινόμενο πολλαπλών παραγόντων και ο χρόνος έκθεσης είναι αποφασιστικός παράγοντας. Ως εκ τούτου, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για την αξιολόγηση των χρόνιων επιδράσεων της χορήγησης ελαιολάδου, μια κατάσταση που μοιάζει με το "σενάριο έκθεσης σε πραγματικό χρόνο".

## Κεφάλαιο 9 Σύνοψη

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή έγινε μια προσπάθεια έτσι ώστε να αποδοθεί στο ελαιόλαδο ένα «δακτυλικό αποτύπωμα» όσον αφορά τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των βιοφαινολικών συστατικών του, με *in vitro* δοκιμές, με τη χρήση κυτταροκαλλιιεργειών (φυσιολογικές και καρκινικές κυτταρικές σειρές) αλλά και *in vivo* δοκιμών. Εξετάσθηκαν εκχυλίσματα (μίγματα) ελαιολάδου με διαφορετική πολυφαινολική σύσταση, καθώς και οι κύριες πολυφαινόλες ως καθαρές απομονωμένες ενώσεις. Επιπλέον, έγινε έλεγχος της αντιοξειδωτικής ικανότητας πολυφαινολικών εκχυλισμάτων ανθέων ελιάς, τα οποία αποτελούν το λιγότερο μελετημένο τμήμα του ελαιόδεντρου. Τέλος, έγινε οξεία χορήγηση (σύντομο χρονικό διάστημα- 14 ημέρες) σε αρουραίους Wistar, ενός ελαιολάδου εμπλουτισμένου με πολυφαινόλες, με σκοπό να διαλευκανθεί ο μηχανισμός δράσης του σε *in vivo* σύστημα (432).

Τις τελευταίες δεκαετίες, τα επιστημονικά ευρήματα που τονίζουν τις ωφέλιμες συνέπειες για την υγεία των φυτικών προερχόμενων ενώσεων (δηλαδή φυτικά εκχυλίσματα πλούσια σε πολυφαινόλες) έχουν αυξηθεί σημαντικά. Η αξιολόγηση των ιδιοτήτων τέτοιων ενώσεων στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό είναι μια κοινή πρακτική για την αξιολόγηση της δυναμικής τους στην ενίσχυση της αντιοξειδωτικής και αντιγενετοξικής άμυνας των ιστών, ολόκληρων οργανισμών ή στην καλή έκβαση μιας ασθένειας που σχετίζεται με τις ελεύθερες ρίζες. Η ερευνητική μας ομάδα (Veskoukis και συνεργάτες, 2019) προτείνει ένα σύνολο μετρήσεων βιοδεικτών για τη μέτρηση των αντιοξειδωτικών, αντιμεταλλαξιγόνων και αντιγενετοξικών ικανοτήτων των φυτικών ενώσεων σε τρία επίπεδα (221). Με βάση αυτό το μοτίβο μετρήσεων διαμορφώθηκε και ο πειραματικός σχεδιασμός της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Το επίπεδο 1 αφορά τον χαρακτηρισμό των προερχόμενων από φυτά ενώσεων *in vitro* με την ανίχνευση της αντιοξειδωτικής και αναγωγικής τους ικανότητας, καθώς και των αντιγενετοξικών και αντιμεταλλαξιγόνων ιδιοτήτων τους. Στο επίπεδο 2, οι εξεταζόμενοι παράγοντες θα πρέπει να χορηγούνται σε διάφορες κυτταρικές σειρές προκειμένου να εξεταστούν για την επίδραση τους στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό των κυττάρων. Αν και οι κυτταρικές σειρές θεωρούνται ως *in vitro* σύστημα, είναι αδιαμφισβήτητο ότι είναι μια προσομοίωση σε ένα *in vivo* περιβάλλον και επομένως μια σύνδεση με *in vivo* συνθήκες. Το επίπεδο 3, αφορά τη χορήγηση φυτικών ενώσεων *in vivo*, σε πειραματόζωα ή ανθρώπους είτε ατομικά είτε ως συμπληρώματα διατροφής. Οι βιοδείκτες για την οξειδωτική βλάβη, την αντιοξειδωτική ικανότητα και το αναγωγικό/οξειδωτικό δυναμικό που αναλύονται στην παρούσα εργασία, φαίνεται να είναι κατάλληλοι προκειμένου να αποκαλυφθεί ολιστικά η βιολογική δράση φυτικών πολυφαινολικών ενώσεων στο πλαίσιο της οξειδοαναγωγικής βιολογίας και της τοξικολογίας.

Τα αποτελέσματα μας έδειξαν πως όλα τα πολυφαινολικά εκχυλίσματα (ελαιολάδων και ανθέων ελιάς) καθώς και οι καθαρές πολυφαινόλες του ελαιολάδου (HT, T, ελαιοκανθάλη, ελαιασίνη), είχαν ισχυρές αντιοξειδωτικές, αντιγενετοξικές και αντιμεταλλιγόνες ιδιότητες στις *in vitro* τεχνικές (επίπεδο 1). Όσον αφορά τις κυτταρικές σειρές όλες οι εξεταζόμενες ουσίες είχαν την ικανότητα να προκαλέσουν την αύξηση της GSH, ενός από τα πιο σημαντικά ενδοκυτταρικά αντιοξειδωτικά μόρια του οργανισμού. Ωστόσο, σε κάποιες περιπτώσεις έγινε αντιληπτό και το προ-οξειδωτικό φαινόμενο, καθώς στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις παρατηρήθηκε

αισθητή μείωση των επιπέδων GSH (επίπεδο 2). Τέλος, το πιο πλούσιο σε πολυφαινόλες ελαιόλαδο (εμπίπτει στον ισχυρισμό υγείας της EFSA) χορηγήθηκε για σύντομο χρονικό διάστημα σε αρουραίους, σε δοσολογία που αντιστοιχεί στην προτεινόμενη ημερήσια κατανάλωση στον άνθρωπο όπως έχει θεσπιστεί από την EFSA. Τα αποτελέσματα ήταν αντιφατικά και νεοφανή, καθώς για πρώτη φορά εκτός από τη θετική δράση του ελαιολάδου στο αίμα και κάποιος ιστούς, παρατηρήθηκε και αρνητική δράση σε κάποιους ιστούς (πχ σπήνας, πάγκρεας). Το γεγονός αυτό εγείρει ερωτήματα σχετικά με την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα των φυτικών εκχυλισμάτων, όσων αφορά την οξειδοαναγωγική ισορροπία, καθώς και προβληματισμούς σχετικά με την κατάλληλη χορηγούμενη δοσολογία, το χρονικό διάστημα χορήγησης και τέλος την καταλληλότητα τους για τη χρήση ως θεραπεία σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Ωστόσο, διαφαίνεται έντονα ότι οι *in vitro* δοκιμές δεν συνδέονται πάντα με ένα θετικό *in vivo* αποτέλεσμα.

Οι Holst και Williamson (433), πρότειναν ότι οι *in vitro* μελέτες αξιολόγησης των φυτικών εκχυλισμάτων θα πρέπει να καθοδηγούνται από τα *in vivo* αποτελέσματα και όχι αντίστροφα (*not vice versa*). Επιπλέον, πρότειναν ότι «μόλις αποδειχθεί πως ένα φυτοχημικό προϊόν ασκεί *in vivo* δραστηριότητα, οι μηχανισμοί του μπορούν να δοκιμαστούν *in vitro*, έτσι ώστε να αποφευχθούν λάθη όταν δοκιμάζονται τα *in vitro* αποτελέσματα σε *in vivo* μοντέλα». Εκτιμάται ότι οι προτεινόμενες μελέτες εκτίμησης της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας θα ήταν πιο κατάλληλες για τη διερεύνηση της αντιοξειδωτικής δράσης των φλαβονοειδών και των λιγνάνων, καθώς αυτά τα φυτοχημικά προϊόντα γενικά μεταβολίζονται σε χαμηλού μοριακού βάρους ενώσεις μέσα στο σώμα. Σε αυτή τη στρατηγική, υπάρχει ανάγκη να προσδιοριστεί πρώτα ο κύριος στόχος της παθοφυσιολογίας των ασθενειών που συνδέονται με τις ελεύθερες ρίζες, όπως η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, η οποία αποτελεί υποκείμενη αιτία πολλών εκφυλιστικών ασθενειών. Καθώς, εκχυλίσματα φυτών με υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα όπως εκτιμήθηκε *in vitro*, δεν είχαν θεραπευτική χρήση υπό *in vivo* συνθήκες λόγω απορρόφησης, διανομής, μεταβολισμού, αποθήκευσης και απέκκρισης (394). Στη συνέχεια, τα φυτικά εκχυλίσματα ή τα αντιοξειδωτικά θα πρέπει να υποβάλλονται σε διαλογή για χαμηλού μοριακού βάρους αντιοξειδωτικά που θα μπορούσαν να έχουν ισχυρή δραστηριότητα δέσμευσης ριζών *in vitro* αλλά ταυτόχρονα και να είναι ικανά *in vivo* (π.χ. να διασχίζουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό) (394).

Παρά τις πολυάριθμες δημοσιεύσεις σχετικά με την ικανότητα των αντιοξειδωτικών που προσλαμβάνονται μέσω της τροφής να προσφέρουν υδρογόνα, θεωρείται τώρα ότι αυτή η λειτουργία είναι απίθανο να είναι η μοναδική αιτιολογία για τις επιδράσεις τους στα *in vivo* μοντέλα (433). Πρώτον, η *in vivo* οξειδοαναγωγική κατάσταση είναι κάτω από αυστηρό ομοιοστατικό έλεγχο από ένα πολύπλοκο αντιοξειδωτικό δίκτυο (μόρια, ένζυμα, ανακύκλωση ενδογενών αντιοξειδωτικών), το οποίο προάγει την προστασία των κυττάρων μέσω πρόληψης, εξουδετέρωσης και επιδιόρθωσης. Ο ρόλος των αντιοξειδωτικών των τροφίμων στις διαδικασίες αυτές είναι ακόμη άγνωστος (434). Επιπλέον, οι συγκεντρώσεις των αντιοξειδωτικών της τροφής που έχουν ανιχνευθεί *in vivo*, στο πλάσμα και στα όργανα είναι μία ή περισσότερες τάξεις μεγέθους μικρότερες από αυτές που καταγράφηκαν για τα ενδογενή αντιοξειδωτικά όπως η GSH και η αλβουμίνη (εύρος mmolar ή nmolar). Αν και, για να επιτευχθεί προστασία έναντι της  $\text{OH}^\bullet$ , είναι υποχρεωτικές υψηλές συγκεντρώσεις αντιοξειδωτικών μορίων (~millimolar). Έτσι, δεν είναι ρεαλιστικό για τα αντιοξειδωτικά των τροφίμων να αποδίδουν ένα ευεργετικό αποτέλεσμα *in vivo* καθώς ανταγωνίζονται με τα ενδογενή αντιοξειδωτικά, τα οποία καταγράφονται σε πολύ υψηλότερες συγκεντρώσεις (434). Παρόλα αυτά, η κυτταρική έκβαση των αντιοξειδωτικών των τροφίμων μπορεί να αποδοθεί στην αλληλεπίδραση τους με κομβικές πρωτεΐνες στις οδούς σηματοδότησης (434).

Όσον αφορά τα θρεπτικά συστατικά, συμπεριλαμβανομένων των μικροθρεπτικών συστατικών, η ομοιοστατική ρύθμιση της συγκέντρωσής τους μπορεί να επηρεάσει το αποτέλεσμα μιας διαιτητικής παρέμβασης. Ο μηχανισμός ομοίωσης στους μεμονωμένους ιστούς περιπλέκει περαιτέρω την ερμηνεία των βιοδεικτών που μετρώνται σε εύκολα προσβάσιμα σωματικά υγρά, για παράδειγμα το αίμα. Η επίδραση των φυτοχημικών στην υγεία χρειάζεται προσεκτικό χειρισμό για να αποφευχθούν οι παγίδες που παρατηρούνται, όπως με τις αντιοξειδωτικές βιταμίνες (433). Συνιστούμε λοιπόν τη χρήση μελετών διατροφικής παρέμβασης, την αποφυγή μεγάλων δόσεων *in vivo* και *in vitro* και τη συνεχή ανάπτυξης επικυρωμένων βιοδεικτών για κλινικές μελέτες.

Παρόλο που το παράδοξο αυτό φαίνεται να δημιουργεί σκεπτικισμό εναντίον της χρήσης αντιοξειδωτικών, μπορεί να προσφέρει νέες κατευθυντήριες γραμμές στην αντιοξειδωτική χορήγηση. Συγκεκριμένα, τα αντιοξειδωτικά μπορούν να γίνουν πιο αποτελεσματικά και λιγότερο επιβλαβή όταν χορηγούνται στα κατάλληλα χρονικά

σημεία και στις κατάλληλες συγκεντρώσεις (385). Εν κατακλείδι, οι επιδράσεις των πολυφαινολών στην κατάσταση οξειδοαναγωγής *in vivo* δεν μπορούν απλώς να υποβληθούν σε παρεκβολή από τις δραστηριότητές τους *in vitro*. Η *in vitro* αντιοξειδωτική δράση ενός φυτικού εκχυλίσματος φαίνεται να διαφέρει από την *in vivo* επίδραση του. Υπάρχει επίσης μια κοινή πτυχή ότι η συμβολή των διατροφικών αντιοξειδωτικών στην προστασία από το οξειδωτικό στρες ή ακόμα και από τις σχετιζόμενες με αυτό ασθένειες (καρκίνος, διαβήτης, καρδιαγγειακά νοσήματα) είναι μια πολυπαραγοντική περίπτωση. Απαιτείται λοιπόν συνεχή προσπάθεια των επιστημόνων να προβλέψουν τις *in vivo* επιδράσεις των αντιοξειδωτικών ενώσεων χρησιμοποιώντας *in vitro* μοντέλα, το οποίο βασίζεται στην ανάγκη της οξειδοαναγωγικής βιολογίας για καλύτερη κατανόηση/μετάφραση της πραγματικής σημασίας των πειραματικών ενδείξεων που εφαρμόζονται *in vitro*. Πρόκειται για ένα πολύ δύσκολο έργο το οποίο απαιτεί πολύ προσοχή προκειμένου να επιτευχθούν πραγματικά και όχι υπερεκτιμημένα, απλοποιημένα ή ψευδή αποτελέσματα.

## Βιβλιογραφία

1. Phaniendra A, Jestadi DB and Periyasamy L: Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian J Clin Biochem*, 2015.
2. Gomberg M: AN INSTANCE OF TRIVALENT CARBON: TRIPHENYLMETHYL. *J Am Chem Soc* 22: 757–771, 1900.
3. Gerschman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P and Fenn WO: Oxygen poisoning and X-irradiation: A mechanism in common. *Science* (80- ), 1954.
4. Commoner B, Townsend J and Pake GE: Free radicals in biological materials. *Nature*, 1954.
5. McCord JM and Fridovich I: Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 244: 6049–6055, 1969.
6. Loschen G and Flohé L: Respiratory chain linked H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in pigeon heart mitochondria. *FEBS Lett*, 2002.
7. NOHL H and HEGNER D: Do Mitochondria Produce Oxygen Radicals in vivo? *Eur J Biochem*, 1978.
8. Mittal CK and Murad F: Activation of guanylate cyclase by superoxide dismutase and hydroxyl radical: a physiological regulator of guanosine 3',5'-monophosphate formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1977.
9. Halliwell B and Gutteridge JMC: Free radicals in biology and medicine, second edition. *Free Radic Biol Med*, 1991.
10. Dröge W: Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev*, 2002.
11. Phaniendra A, Jestadi DB and Periyasamy L: Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian J Clin Biochem* 30: 11–26, 2015.
12. Halliwell, B., & Gutteridge JMC: Free radicals in biology and medicine. Oxford Oxford Univ Press, 1999.
13. Young IS and Woodside J V: Antioxidants in health and disease Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol* 54: 176–186, 2001.
14. Pham-Huy LA, He H and Pham-Huy C: Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci* 4: 89–96, 2008.
15. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M and Telser J: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 44–84, 2007.
16. Nordberg J and Arnér ESJ: Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med*, 2001.
17. Kohen R and Nyska A: Oxidation of biological systems: Oxidative stress

- phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol*, 2002.
18. Fridovich I: Superoxide anion radical ( $O_2^{\cdot-}$ ), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem*, 1997.
  19. Kuppusamy P and Zweier JL: Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. Evidence for hydroxyl radical generation. *J Biol Chem*, 1989.
  20. Brash AR: Functions, Catalysis, and Acquisition of Substrate\*. *J Biol Chem*, 1999.
  21. Fitzpatrick FA: Cyclooxygenase enzymes: regulation and function. *Curr Pharm Des* 10: 577–588, 2004.
  22. Panday A, Sahoo MK, Osorio D and Batra S: NADPH oxidases: An overview from structure to innate immunity-associated pathologies. *Cell Mol Immunol*, 2015.
  23. Bielski BHJ and Cabelli DE: Highlights of Current research involving superoxide and perhydroxyl radicals in aqueous solutions. *Int J Radiat Biol*, 1991.
  24. Bedwell S, Dean RT and Jessup W: The action of defined oxygen-centred free radicals on human low-density lipoprotein. *Biochem J*, 2015.
  25. Halliwell B and Gutteridge JMC: Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods Enzymol* 186: 1–85, 1990.
  26. Winterbourn CC: Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicol Lett*, 1995.
  27. Kehler JP: The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*, 2000.
  28. de Grey ADNJ:  $HO_2^{\cdot}$ : The Forgotten Radical. *DNA Cell Biol*, 2002.
  29. Whiteside TL: The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene*, 2008.
  30. Halliwell B, Clement MV and Long LH: Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett*, 2000.
  31. Finkel T and Holbrook NJ: Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 2000.
  32. Starkov AA: The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2008.
  33. Cooper G: *A Molecular Approach*. 2nd ed. Sunderland (MA): Sinauer Associates, 2000.
  34. Schrader M and Fahimi HD: Peroxisomes and oxidative stress. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*, 2006.
  35. Gross E, Sevier CS, Heldman N, *et al.*: Generating disulfides enzymatically: Reaction products and electron acceptors of the endoplasmic reticulum thiol oxidase Ero1p. *Proc Natl Acad Sci*, 2006.

36. Barja G: The flux of free radical attack through mitochondrial DNA is related to aging rate. *Aging Clin Exp Res*, 2014.
37. Hiraku Y, Kawanishi S, Ichinose T and Murata M: The role of iNOS-mediated DNA damage in infection- and asbestos-induced carcinogenesis. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2010.
38. Yermilov V, Rubio J and Ohshima H: Formation of 8-nitroguanine in DNA treated with peroxynitrite in vitro and its rapid removal from DNA by depurination. *FEBS Lett*, 1995.
39. Loeb LA and Preston BD: Mutagenesis by Apurinic/Apyrimidinic Sites. *Annu Rev Genet*, 2003.
40. Abe T, Tohgi H, Isobe C, Murata T and Sato C: Remarkable increase in the concentration of 8-hydroxyguanosine in cerebrospinal fluid from patients with Alzheimer's disease. *J Neurosci Res*, 2002.
41. Broedbaek K, Poulsen HE, Weimann A, Kom GD, Schwedhelm E, Nielsen P and Böger RH: Urinary excretion of biomarkers of oxidatively damaged DNA and RNA in hereditary hemochromatosis. *Free Radic Biol Med*, 2009.
42. Tateyama M, Takeda a, Onodera Y, *et al.*: Oxidative stress and predominant Abeta42(43) deposition in myopathies with rimmed vacuoles. *Acta Neuropathol*, 2003.
43. Guéraud F, Atalay M, Bresgen N, *et al.*: Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. *Free Radic Res*, 2010.
44. Marnett LJ: Lipid peroxidation - DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen*, 1999.
45. Dean RT, Fu S, Stocker R and Davies MJ: Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J*, 1997.
46. Butterfield DA, Koppal T, Howard B, *et al.*: Structural and functional changes in proteins induced by free radical-mediated oxidative stress and protective action of the antioxidants N-tert-butyl- $\alpha$ -phenylnitron and vitamin E. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1998.
47. Squier TC: Oxidative stress and protein aggregation during biological aging. *Exp Gerontol*, 2001.
48. Chevion M, Berenshtein E and Stadtman ER: Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage. *Free Radic Res*, 2000.
49. Tuppo EE and Forman LJ: Free radical oxidative damage and Alzheimer's disease. *J Am Osteopath Assoc* 101: S11-5, 2001.
50. Kumar H, Lim HW, More SV, Kim BW, Koppula S, Kim IS and Choi DK: The role of free radicals in the aging brain and Parkinson's disease: Convergence and parallelism. *Int J Mol Sci*, 2012.
51. Tidball JG and Wehling-Henricks M: The role of free radicals in the pathophysiology of muscular dystrophy. *J Appl Physiol*, 2006.



52. Hadjigogos K: The role of free radicals in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Panminerva Med*, 2003.
53. Kalam S, Gul MZ, Singh R and Ankati S: Free Radicals: Implications in Etiology of Chronic Diseases and Their Amelioration through Nutraceuticals. *Pharmacologia*, 2015.
54. Knight JA: Free radicals: Their history and current status in aging and disease. *Ann Clin Lab Sci*, 1998.
55. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M and Telser J: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007.
56. Pacher P, Beckman JS and Liaudet L: Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiol Rev*, 2007.
57. Genestra M: Oxy radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cell Signal*, 2007.
58. Halliwell B: Biochemistry of oxidative stress: Figure 1. *Biochem Soc Trans*, 2007.
59. Selye H: A syndrome produced by noxious agents. *Nature*, 1936.
60. Sies H: Oxidative stress: introductory remarks. (Sies H (ed.)). Academic Press, London, 1985.
61. Sies H: On the history of oxidative stress: Concept and some aspects of current development. *Curr Opin Toxicol*, 2018.
62. Chance B, Sies H and Boveris A: Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*, 1979.
63. Ore S: Oxidative Stress Relaxation of Natural Rubber Vulcanized with Di-Tertiary-Butyl Peroxide. *Rubber Chem Technol*, 2011.
64. Niki E: Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects. *Free Radic Biol Med*, 2009.
65. Paniker N V., Srivastava SK and Beutler E: Glutathione metabolism of the red cells effect of glutathione reductase deficiency on the stimulation of hexose monophosphate shunt under oxidative stress. *BBA - Gen Subj*, 1970.
66. Kappus H and Sies H: Toxic drug effects associated with oxygen metabolism: Redox cycling and lipid peroxidation. *Experientia*, 1981.
67. Bolton JL, Trush MA, Penning TM, Dryhurst G and Monks TJ: Role of quinones in toxicology. *Chem Res Toxicol*, 2000.
68. Kirkpatrick DL and Powis G: Clinically Evaluated Cancer Drugs Inhibiting Redox Signaling. *Antioxid Redox Signal*, 2016.
69. Wondrak GT: Redox-Directed Cancer Therapeutics: Molecular Mechanisms and Opportunities. *Antioxid Redox Signal*, 2009.
70. Estevam EC, Nasim MJ, Faulstich L, Hakenesch M, Burkholz T and Jacob C: A historical perspective on oxidative stress and intracellular redox control. In:

- Studies on Experimental Toxicology and Pharmacology, 2015.
71. Sies H and Jones D: Oxidative Stress. In: Encyclopedia of Stress. pp45–48, 2007.
  72. Sies H: Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol* 4: 180–183, 2015.
  73. Lushchak VI: Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact*, 2014.
  74. Niki E: Oxidative stress and antioxidants: Distress or eustress? *Arch Biochem Biophys*, 2016.
  75. Bus JS: “The dose makes the poison”: Key implications for mode of action (mechanistic) research in a 21st century toxicology paradigm. *Curr Opin Toxicol*, 2017.
  76. Jones DP and Sies H: The Redox Code. *Antioxid Redox Signal*, 2015.
  77. Nguyen T, Nioi P and Pickett CB: The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J Biol Chem* 284: 13291–5, 2009.
  78. Schreck R, Albermann K and Baeuerle PA: Nuclear factor kb: An oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free Radic Res*, 1992.
  79. Calabrese EJ, Bachmann KA, Bailer AJ, *et al.*: Biological stress response terminology: Integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose-response framework. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2007.
  80. Valle G, Stanislao M, Facciorusso A, Carmignani M and Volpe AR: Mithridates VI Eupator, father of the empirical toxicology. *Clin Toxicol*, 2009.
  81. Willcox JK, Ash SL and Catignani GL: Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2004.
  82. Frei B: Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: Mechanisms of action. *Am J Med*, 1994.
  83. Frei B: Natural antioxidants in human health and disease. Academic Press, 2012.
  84. Jukes TH: Historical perspective, Antioxidants, Nutrition and Evolution. *Prev Med (Baltim)* 21: 270–276, 1992.
  85. Kumar S: The Importance Of Antioxidant And Their Role In Pharmaceutical Science - A Review. *Asian J Res Chem Pharm Sci*, 2014.
  86. Dröge W: Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 2002.
  87. Mistry J and Kennedy JF: Antioxidants in food: practical applications. *Carbohydr Polym*, 2003.
  88. Halliwell B: Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* 18: 685–716, 2001.

89. Matés JM, Pérez-Gómez C and De Castro IN: Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem*, 1999.
90. Halliwell B: The antioxidant paradox: less paradoxical now? *Br J Clin Pharmacol* 75: 637–644, 2013.
91. Halliwell B and Gutteridge JMC: FrHalliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine*. *Free Radical Biology and Medicine*. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(91\)90055-8](https://doi.org/10.1016/0891-5849(91)90055-8)ee Radicals in Biology and Medicine., 2007.
92. Kaikkonen J, Porkkala-Sarataho E, Morrow JD, *et al.*: Supplementation with vitamin E but not with vitamin C lowers lipid peroxidation in vivo in mildly hypercholesterolemic men. *Free Radic Res*, 2001.
93. Hercberg S, Galan P, Preziosi P, *et al.*: The SU.VI.MAX study: A randomized, placebo-controlled trial of the health effects of antioxidant vitamins and minerals. *Arch Intern Med*, 2004.
94. Fang JC, Kinlay S, Beltrame J, *et al.*: Effect of vitamins C and E on progression of transplant-associated arteriosclerosis: A randomised trial. *Lancet*, 2002.
95. Dietrich M, Jacques PF, Traber MG, Cross CE, Hu Y and Block G: Does  $\gamma$ -Tocopherol Play a Role in the Primary Prevention of Heart Disease and Cancer? A Review. *J Am Coll Nutr*, 2006.
96. Neuhouser ML, Patterson RE, Thornquist MD, Omenn GS, King IB and Goodman GE: Fruits and vegetables are associated with lower lung cancer risk only in the placebo arm of the  $\beta$ -Carotene and Retinol Efficacy Trial (CARET). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2003.
97. Chirico S, Smith C, Marchant C, Mitchinson MJ and Halliwell B: Lipid peroxidation in hyperlipidaemic patients. A study of plasma using an HPLC-based thiobarbituric acid test. *Free Radic Res*, 1993.
98. Roberts LJ, Oates JA, Linton MF, *et al.*: The relationship between dose of vitamin E and suppression of oxidative stress in humans. *Free Radic Biol Med*, 2007.
99. Morrow JD: Quantification of isoprostanes as indices of oxidant stress and the risk of atherosclerosis in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005.
100. Cangemi R, Loffredo L, Carnevale R, *et al.*: Early decrease of oxidative stress by atorvastatin in hypercholesterolaemic patients: Effect on circulating vitamin E. *Eur Heart J*, 2008.
101. Keaney JF, Larson MG, Vasan RS, *et al.*: Obesity and systemic oxidative stress: Clinical correlates of oxidative stress in the Framingham study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003.
102. Devries MC, Hamadeh MJ, Glover AW, Raha S, Samjoo IA and Tarnopolsky MA: Endurance training without weight loss lowers systemic, but not muscle, oxidative stress with no effect on inflammation in lean and obese women. *Free Radic Biol Med*, 2008.
103. Halliwell B: The wanderings of a free radical. *Free Radic Biol Med* 46: 531–

- 542, 2009.
104. Obied HK: Biography of biophenols: past, present and future. *Funct Foods Heal Dis*, 2018.
  105. HARMAN D: Prolongation of the normal life span by radiation protection chemicals. *J Gerontol*, 1957.
  106. Temple NJ: Antioxidants and disease: More questions than answers. *Nutr Res*, 2000.
  107. HARMAN D: The Biologic Clock: The Mitochondria? *J Am Geriatr Soc*, 1972.
  108. Sies H and Cadenas E: Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1985.
  109. Haslam E: Plant polyphenols: vegetable tannins revisited: CUP Archive., 1989.
  110. Robards K, Prenzler PD, Tucker G, Swatsitang P and Glover W: Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem*, 1999.
  111. Robards K: Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. *J Chromatogr A*, 2003.
  112. Ryan D, Robards K, Prenzler P and Antolovich M: Applications of mass spectrometry to plant phenols. *TrAC - Trends Anal Chem*, 1999.
  113. Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C and Pouysegu L: Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew Chem Int Ed Engl* 50: 586–621, 2011.
  114. Sakihama Y, Cohen MF, Grace SC and Yamasaki H: Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology* 177: 67–80, 2002.
  115. Kondratyuk TP and Pezzuto JM: Natural product polyphenols of relevance to human health. *Pharm Biol*, 2004.
  116. Spencer JPE, Abd El Mohsen MM, Minihane A-M and Mathers JC: Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research. *Br J Nutr* 99: 12–22, 2008.
  117. Groot H and Rauen U: Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Fundam Clin Pharmacol*, 2009.
  118. Woodward KA, Draijer R, Thijssen DHJ and Low DA: Polyphenols and Microvascular Function in Humans: A Systematic Review. *Curr Pharm Des*, 2018.
  119. Dixon RA and Paiva NL: Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *Plant Cell*, 2007.
  120. Alscher RG, Donahue JL and Cramer CL: Reactive oxygen species and antioxidants: Relationships in green cells. *Physiol Plant*, 1997.
  121. Rich PR and Bonner WD: The sites of superoxide anion generation in higher plant mitochondria. *Arch Biochem Biophys*, 1978.

122. Scalbert A, Manach C, Morand C, Rémésy C and Jimenez L: Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr* 45: 287–306, 2005.
123. Arts ICW and Hollman PCH: Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr*, 2005.
124. Clifford MN: Chlorogenic acids and other cinnamates - Nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *J Sci Food Agric*, 2000.
125. Scalbert A and Williamson G: Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* 130: 2073S–85S, 2000.
126. Mennen LI, Walker R, Bennetau-Pelissero C and Scalbert A: Risks and safety of polyphenol consumption. *Am J Clin Nutr* 81, 2005.
127. D'Archivio M, Filesi C, Di Benedetto R, Gargiulo R, Giovannini C and Masella R: Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanita*, 2007.
128. Day AJ and Williamson G: Biomarkers for exposure to dietary flavonoids: a review of the current evidence for identification of quercetin glycosides in plasma. *Br J Nutr*, 2008.
129. Setchell KDR, Faughnan MS, Avades T, *et al.*: Comparing the pharmacokinetics of daidzein and genistein with the use of <sup>13</sup>C-labeled tracers in premenopausal women. *Am J Clin Nutr*, 2003.
130. Gee JM, DuPont MS, Day AJ, Plumb GW, Williamson G and Johnson IT: Intestinal Transport of Quercetin Glycosides in Rats Involves Both Deglycosylation and Interaction with the Hexose Transport Pathway. *J Nutr*, 2018.
131. Crespy V, Morand C, Besson C, Manach C, Demigne C and Remesy C: Quercetin, but not its glycosides, is absorbed from the rat stomach. *J Agric Food Chem*, 2002.
132. Passamonti S, Vrhovsek U, Vanzo A and Mattivi F: Fast access of some grape pigments to the brain. *J Agric Food Chem*, 2005.
133. Priftis A, Soursou V, Makiou A-S, *et al.*: A lightly roasted coffee extract improves blood and tissue redox status in rats through enhancement of GSH biosynthesis. *Food Chem Toxicol* 125: 305–312, 2019.
134. Visioli F, de la Lastra CA, Andres-Lacueva C, *et al.*: Polyphenols and human health: A prospectus. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2011.
135. Dangles O, Dufour C, Manach C, Morand C and Remesy C: Binding of flavonoids to plasma proteins. *Methods Enzymol*, 2001.
136. Galvano F, La Fauci L, Graziani G, *et al.*: Phenolic compounds and antioxidant activity of Italian extra virgin olive oil Monti Iblei. *J Med Food* 10: 650–656, 2007.
137. Dufour C, Loonis M and Dangles O: Inhibition of the peroxidation of linoleic acid by the flavonoid quercetin within their complex with human serum albumin. *Free Radic Biol Med*, 2007.

138. Rodriguez-Mateos A, Vauzour D, Krueger CG, *et al.*: Bioavailability, bioactivity and impact on health of dietary flavonoids and related compounds: an update. *Arch Toxicol*, 2014.
139. Wink M: Compartmentation of Secondary Metabolites and Xenobiotics in Plant Vacuoles. *Adv Bot Res*, 1997.
140. de Simón BF, Pérez-Ilzarbe J, Hernández T, Gómez-Cordovés C and Estrella I: Importance of Phenolic Compounds for the Characterization of Fruit Juices. *J Agric Food Chem*, 1992.
141. Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C and Jimenez L: Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition* 79: 727–747, 2004.
142. Parr AJ and Bolwell GP: Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *J Sci Food Agric* 80: 985–1012, 2000.
143. Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C and Jimenez L: Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition* 79: 727–747, 2004.
144. Pandey KB and Rizvi SI: Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev* 2: 270–278, 2009.
145. Obied HK, Allen MS, Bedgood DR, Prenzler PD, Robards K and Stockmann R: Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. *J Agric Food Chem*, 2005.
146. Visioli F and Hagen TM: Nutritional strategies for healthy cardiovascular aging: Focus on micronutrients. *Pharmacol Res*, 2007.
147. Halliwell B: Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Arch Biochem Biophys*, 2008.
148. Halliwell B: Free radicals and antioxidants - Quo vadis? *Trends Pharmacol Sci*, 2011.
149. Bartosz G: Total antioxidant capacity., 2006.
150. Halliwell B: Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Arch Biochem Biophys* 476: 107–112, 2008.
151. Riley FR: Olive oil production on bronze age crete: Nutritional properties, processing methods and storage life of Minoan olive oil. *Oxford J Archaeol*, 2002.
152. Πρακτικά Αρχαιολογικής Εταιρείας., 1906.
153. Kapellakis IE, Tsagarakis KP and Crowther JC: Olive oil history, production and by-product management. *Rev Environ Sci Biotechnol*, 2008.
154. Σιγγελάκης Χ: Ελαιόδεντρο: Ελληνικές και ξένες ποικιλίες. βη. Ελαιουργική, 1982.

155. Loukas M and Krimbas CB: History of olive cultivars based on their genetic distances. *J Horticult Sci*, 2016.
156. Boskou D: Characteristics of the Olive Tree and Olive Fruit. In: *Olive Oil: Chemistry and Technology: Second Edition*, 2006.
157. Fedeli E: Lipids of olives. *Prog Chem Fats Other Lipids*, 1977.
158. Μπαλατσούρας Γ: Σύγχρονη Ελαιολογία (Το ελαιόδεντρο-Το ελαιόλαδο-Η επιτραπέζια ελιά). Τόμος δεύτ. Αφοί Φραγκούδη Ο.Ε. (Εκδ.), 1997.
159. Kiritsakis A and Markakis P: Olive Oil: A Review. *Adv Food Res*, 1988.
160. Visioli F, Bellomo G, Montedoro GF and Galli C: Low density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents. *Atherosclerosis*, 1995.
161. Tuck KL and Hayball PJ: Major phenolic compounds in olive oil: Metabolism and health effects. *J Nutr Biochem* 13: 636–644, 2002.
162. Boskov D: Olive oil chemistry and technology. AOCS Press, USA, pp115–117, 1996.
163. Gutfinger T: Polyphenols in olive oils. *J Am Oil Chem Soc*, 1981.
164. Owen RW, Mier W, Giacosa A, Hull WE, Spiegelhalter B and Bartsch H: Phenolic compounds and squalene in olive oils: The concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food Chem Toxicol*, 2000.
165. Visioli F and Galli C: Olive Oil Phenols and Their Potential Effects on Human Health. *J Agric Food Chem*, 1998.
166. Amiot MJ, Fleuriet A and Macheix JJ: Accumulation of oleuropein derivatives during olive maturation. *Phytochemistry*, 1989.
167. Ryan D, Antolovich M, Prenzler P, Robards K and Lavee S: Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L. *Sci Horticult* (Amsterdam), 2002.
168. Gómez-Rico A, Fregapane G and Salvador MD: Effect of cultivar and ripening on minor components in Spanish olive fruits and their corresponding virgin olive oils. *Food Res Int*, 2008.
169. Damtoft, S. Franzyk, H. Jensen SR: The international journal of plant biochemistry biosynthesis of secoiridoid glucosides in oleaceae. *Phytochemistry*: 1291–1299, 1993.
170. Bendini A, Cerretani L, Carrasco-Pancorbo A, Gómez-Caravaca AM, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A and Lercker G: Phenolic molecules in virgin olive oils: A survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade. *Molecules* 12: 1679–1719, 2007.
171. Cinquanta L, Esti M and Notte E La: Evolution of phenolic compounds in virgin olive oil during storage. *J Am Oil Chem Soc*, 1997.
172. Nan JN, Ververis K, Bollu S, Rodd AL, Swarup O and Karagiannis TC: Biological effects of the olive polyphenol, hydroxytyrosol: An extra view from

- genome-wide transcriptome analysis. *Hell J Nucl Med* 17 Suppl 1: 62–69, 2014.
173. Covas M-I, de la Torre K, Farré-Albaladejo M, *et al.*: Postprandial LDL phenolic content and LDL oxidation are modulated by olive oil phenolic compounds in humans. *Free Radic Biol Med* 40: 608–616, 2006.
  174. Covas M-I, Nyyssonen K, Poulsen HE, *et al.*: The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors: a randomized trial. *Ann Intern Med* 145: 333–341, 2006.
  175. Medina E, de Castro A, Romero C and Brenes M: Comparison of the concentrations of phenolic compounds in olive oils and other plant oils: correlation with antimicrobial activity. *J Agric Food Chem* 54: 4954–4961, 2006.
  176. Servili M, Selvaggini R, Esposto S, Taticchi A, Montedoro GF and Morozzi G: Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: Agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *J Chromatogr A* 1054: 113–127, 2004.
  177. Bianco A *et al.*: Analysis by HPLC-MS/MS of biophenolic components in olives and oils. *Anal Lett*: 1033–1051, 2001.
  178. Panche AN, Diwan AD and Chandra SR: Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci*, 2016.
  179. Obied HK, Prenzler PD, Ryan D, Servili M, Taticchi A, Esposto S and Robards K: Biosynthesis and biotransformations of phenol-conjugated oleosidic secoiridoids from *Olea europaea* L. *Nat Prod Rep* 25: 1167–1179, 2008.
  180. Cinquanta L, Esti M and La Notte E: Evolution of phenolic compounds in virgin olive oil during storage. *JAOCS, J Am Oil Chem Soc*, 1997.
  181. Vissers MN, Zock PL and Katan MB: Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenols in humans: a review. *Eur J Clin Nutr* 58: 955–965, 2004.
  182. Soler, Aranzazu Pomero, Maria P. Macia, Alba Saha, Shikha Furniss, Caroline S.M. Kroon, Paul A. Motilna Ma: Digestion stability and evaluation of the metabolism and transport of olive oil phenols in the human small-intestinal epithelial Caco-2/TC7 cell line. *Food Chem* 119: 703–714, 2010.
  183. Rodriguez-Morato J, Boronat A, Kotronoulas A, *et al.*: Metabolic disposition and biological significance of simple phenols of dietary origin: hydroxytyrosol and tyrosol. *Drug Metab Rev* 48: 218–236, 2016.
  184. Visioli F, Galli C, Bornet F, Mattei A, Patelli R, Galli G and Caruso D: Olive oil phenolics are dose-dependently absorbed in humans. *FEBS Lett* 468: 159–160, 2000.
  185. Visioli F, Caruso D, Plasmati E, *et al.*: Hydroxytyrosol, as a component of olive mill waste water, is dose-dependently absorbed and increases the antioxidant capacity of rat plasma. *Free Radic Res*, 2001.
  186. Vissers MN, Zock PL, Roodenburg AJC, Leenen R and Katan MB: Olive oil phenols are absorbed in humans. *J Nutr* 132: 409–17, 2002.



187. Casas EM, Albadalejo MF, Planells MIC, Colomer MF, Raventós RML and De la Torre Fornell R: Tyrosol bioavailability in humans after ingestion of virgin olive oil. *Clin Chem* 47: 341–343, 2001.
188. Visioli F, Galli C, Plasmati E, Viappiani S, Hernandez A, Colombo C and Sala A: Olive phenol hydroxytyrosol prevents passive smoking-induced oxidative stress. *Circulation*, 2000.
189. Serra A, Rubio L, Borrás X, Macià A, Romero M-P and Motilva M-J: Distribution of olive oil phenolic compounds in rat tissues after administration of a phenolic extract from olive cake. *Mol Nutr Food Res* 56: 486–496, 2012.
190. García-Villalba R, Carrasco-Pancorbo A, Nevedomskaya E, Mayboroda OA, Deelder AM, Segura-Carretero A and Fernández-Gutiérrez A: Exploratory analysis of human urine by LC-ESI-TOF MS after high intake of olive oil: Understanding the metabolism of polyphenols. *Anal Bioanal Chem*, 2010.
191. de la Torre R: Bioavailability of olive oil phenolic compounds in humans. *Inflammopharmacology* 16: 245–247, 2008.
192. Selma M V, Espín JC and Tomás-Barberán FA: Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. *J Agric Food Chem*, 2009.
193. Corona G, Spencer J and Dessì M: Extra virgin olive oil phenolics: Absorption, metabolism, and biological activities in the GI tract. *Toxicol Ind Health*, 2009.
194. Catalán Ú, López de las Hazas MC, Rubió L, *et al.*: Protective effect of hydroxytyrosol and its predominant plasmatic human metabolites against endothelial dysfunction in human aortic endothelial cells. *Mol Nutr Food Res*, 2015.
195. Parkinson L and Cicerale S: The Health Benefiting Mechanisms of Virgin Olive Oil Phenolic Compounds. *Molecules* 21, 2016.
196. Cicerale S, Lucas L and Keast R: Biological activities of phenolic compounds present in virgin olive oil. *Int J Mol Sci*, 2010.
197. Lewandowska U, Fichna J and Gorlach S: Enhancement of anticancer potential of polyphenols by covalent modifications. *Biochem Pharmacol*, 2016.
198. Gorzynik-Debicka M, Przychodzen P, Cappello F, *et al.*: Potential health benefits of olive oil and plant polyphenols. *Int J Mol Sci*, 2018.
199. Bouknana D, Hammouti B, Jodeh S, Sbaa M and Lgaz H: Extracts of olive inflorescence flower pre-anthesis, at anthesis and grain pollen as eco-friendly corrosion inhibitor for steel in 1M HCl medium. *Anal Bioanal Electrochem*, 2018.
200. Fabbri A and Benelli C: Flower bud induction and differentiation in olive. *J Horticult Sci Biotechnol*, 2000.
201. Αιβαλάκης, Γ. Καραμπουρνιώτης, Γ. Φασσέας Κ: Γενική Βοτανική, η μορφολογία, η ανατομία και η φυσιολογία των ανώτερων φυτών. Έμβρυο.
202. Θέρσιος Ι: Ελαιοκομία. ΓΑΡΤΑΓΑΝΗ, 2005.
203. Raven, Peter Evert, Ray F. Eichhorn SE: Βιολογία των φυτών. Utopia.

204. Lavee S, Rallo L, Rapoport HF and Troncoso A: The floral biology of the olive: Effect of flower number, type and distribution on fruitset. *Sci Hortic* (Amsterdam), 1996.
205. Rekik O, Ben Mansour A and Bouaziz M: Evaluation of phenolic composition and antioxidant activity changes in olive flowers during development using HPLC/DAD and LC-MS/MS. *Electrophoresis* 39: 1663–1672, 2018.
206. Abaza L, Taamalli A, Arraez-Roman D, Segura-Carretero A, Fernandez-Gutierrerez A, Zarrouk M and Youssef N Ben: Changes in phenolic composition in olive tree parts according to development stage. *Food Res Int* 100: 454–461, 2017.
207. Griggs, W.H., Hartman, H.T., Bradley, M.V., Iwakiri, B.T. and Whistler JE: Olive polination in Claifornia. *Calif Agric Exp Sta Bull* 869: 50 pp, 1975.
208. Barreiro-Hurle J, Gracia A and de-Magistris T: The effects of multiple health and nutrition labels on consumer food choices. *J Agric Econ*, 2010.
209. Kiesel K, McCluskey JJ and Villas-Boas SB: *Nutritional Labeling and Consumer Choices.*, 2011.
210. Heber D: An integrative view of obesity. In: *American Journal of Clinical Nutrition*, 2010.
211. Centre for Disease Control and Prevention: *Chronic Disease Overview*. Online Publ, 2015.
212. Gurib-Fakim A: Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol Aspects Med* 27: 1–93, 2006.
213. Harvey AL: Natural products in drug discovery. *Drug Discov Today*, 2008.
214. Firn RD and Jones CG: The evolution of secondary metabolism - A unifying model. *Mol Microbiol*, 2000.
215. Iwu, M.M Wootton J: *Ethnomedicine and Drug Discovery, Volume 1*. Elsevier Science, 2002.
216. Mondello L: Nutraceuticals and separations. *Anal Bioanal Chem*, 2013.
217. Besancon, P. Debosque SDF: *Mediterranean diet and health: current news and prospects*. John Libbey Eurotext Limited, London,UK, 2001.
218. Keys A: *Mediterranean diet and public health: Personal reflections*. *Am J Clin Nutr*, 1995.
219. Renaud S and de Lorgeril M: Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*, 1992.
220. Obied HK, Prenzler PD, Omar SH, *et al.*: Pharmacology of olive biophenols. *Adv Mol Toxicol* 6: 195–242, 2012.
221. Veskoukis A, Kerasioti E, Priftis A, Kouka P, Spanidis Y, Makri S and Kouretas D: A battery of translational biomarkers for the assessment of the in vitro and in vivo antioxidant action of plant polyphenolic compounds: The biomarker issue. *Curr Opin Toxicol*, 2019.

222. Singleton VL, Orthofer R and Lamuela-Raventós RM: Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol* 299: 152–178, 1998.
223. Brand-Williams W, Cuvelier ME and Berset C: Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci Technol* 28: 25–30, 1995.
224. Liang N and Kitts DD: Antioxidant property of coffee components: Assessment of methods that define mechanism of action. *Molecules*, 2014.
225. Cano A, Hernández-Ruiz J, García-Cánovas F, Acosta M and Arnao MB: An end-point method for estimation of the total antioxidant activity in plant material. *Phytochem Anal* 9: 196–202, 1998.
226. Boligon AA: *Technical Evaluation of Antioxidant Activity*. Med Chem (Los Angeles), 2014.
227. Yen GC and Duh P Der: Scavenging Effect of Methanolic Extracts of Peanut Hulls on Free-Radical and Active-Oxygen Species. *J Agric Food Chem* 42: 629–632, 1994.
228. Halliwell B, Gutteridge JMC and Aruoma OI: The deoxyribose method: A simple “test-tube” assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal Biochem*, 1987.
229. Gülçin I, Küfrevioğlu ÖI, Oktay M and Büyükokuroğlu ME: Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.). *J Ethnopharmacol*, 2004.
230. Chang ST, Wu JH, Wang SY, Kang PL, Yang NS and Shyur LF: Antioxidant activity of extracts from acacia confusa Bark and Heartwood. *J Agric Food Chem*, 2001.
231. Mortelmans K and Zeiger E: The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutat Res* 455: 29–60, 2000.
232. Hix S, Kadiiska MB, Mason RP and Augusto O: In vivo metabolism of tert-Butyl hydroperoxide to methyl radicals. EPR spin-trapping and DNA methylation studies. *Chem Res Toxicol*, 2000.
233. Emeis, J.J.; Edgell C-JS: Fibrinolytic properties of a human endothelial hybrid cell line (Ea.hy 926). *Blood*, 1988.
234. Kouka P, Chatzieffraimidi G-A, Raftis G, *et al.*: Antioxidant effects of an olive oil total polyphenolic fraction from a Greek *Olea europaea* variety in different cell cultures. *Phytomedicine* 47: 135–142, 2018.
235. Yaffe D and Saxel O: Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature* 270: 725–727, 1977.
236. Goutzourelas N, Stagos D, Demertzis N, *et al.*: Effects of polyphenolic grape extract on the oxidative status of muscle and endothelial cells. *Hum Exp Toxicol* 33: 1099–1112, 2014.
237. Rahbari R, Sheahan T, Modes V, Collier P, Macfarlane C and Badge RM: A novel L1 retrotransposon marker for HeLa cell line identification.

- Biotechniques, 2009.
238. Sharpe TL: The Immortal Life of Henrietta Lacks. , Rebecca Skloot . Qual Soc Work, 2013.
  239. Truog RD, Kesselheim AS and Joffe S: Paying patients for their tissue: The legacy of Henrietta Lacks. *Science* (80- ), 2012.
  240. Verma R and Hansch C: Chemical Toxicity on HeLa Cells. *Curr Med Chem*, 2006.
  241. Mersch-Sundermann V, Knasmuller S, Wu X-J, Darroudi F and Kassie F: Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. *Toxicology* 198: 329–340, 2004.
  242. Alia M, Ramos S, Mateos R, Granado-Serrano AB, Bravo L and Goya L: Quercetin protects human hepatoma HepG2 against oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide. *Toxicol Appl Pharmacol* 212: 110–118, 2006.
  243. Tutino V, Caruso MG, Messa C, Perri E and Notarnicola M: Antiproliferative, antioxidant and anti-inflammatory effects of hydroxytyrosol on human hepatoma HepG2 and Hep3B cell lines. *Anticancer Res* 32: 5371–5377, 2012.
  244. Keles MS, Taysi S, Sen N, Aksoy H and Akcay F: Effect of corticosteroid therapy on serum and CSF malondialdehyde and antioxidant proteins in multiple sclerosis. *Can J Neurol Sci* 28: 141–143, 2001.
  245. Patsoukis N, Zervoudakis G, Panagopoulos NT, Georgiou CD, Angelatou F and Matsokis NA: Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylenetetrazol-induced epileptic seizure. *Neurosci Lett* 357: 83–86, 2004.
  246. Ponchel F, Toomes C, Bransfield K, *et al.*: Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: An alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnol*, 2003.
  247. Huggett J, Dheda K, Bustin S and Zumla A: Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun* 6: 279–84, 2005.
  248. Mullins LJ and Mullins JJ: Insights from the rat genome sequence. *Genome Biol*, 2004.
  249. Reddy YN, Murthy S, Krishna DR PM: Role of free radicals and antioxidants in tuberculosis patients. *Indian J Tuberc*, 2004.
  250. Aebi H: Catalase in Vitro. *Methods Enzymol*, 1984.
  251. Janaszewska A and Bartosz G: Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. *Scand J Clin Lab Invest* 62: 231–236, 2002.
  252. FDA. Press release P04-100, 2004.
  253. Perez-Jimenez F *et. a.*: International conference on the health effect of virgin oil. In: *Eur J Clin invest* 35: 421-424, 2005.

254. Perona JS, Cabello-Moruno R and Ruiz-Gutierrez V: The role of virgin olive oil components in the modulation of endothelial function. *J Nutr Biochem* 17: 429–445, 2006.
255. Beauchamp GK, Keast RSJ, Morel D, *et al.*: Phytochemistry: ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. *Nature* 437: 45–46, 2005.
256. Montaño A, Hernández M, Garrido I, Llerena JL and Espinosa F: Fatty acid and phenolic compound concentrations in eight different monovarietal virgin olive oils from extremadura and the relationship with oxidative stability. *Int J Mol Sci* 17, 2016.
257. Keys A, Menotti A, Karvonen MJ, *et al.*: The diet and 15-year death rate in the seven countries study. *Am J Epidemiol* 124: 903–915, 1986.
258. Fini L, Hotchkiss E, Fogliano V, *et al.*: Chemopreventive properties of pinoresinol-rich olive oil involve a selective activation of the ATM-p53 cascade in colon cancer cell lines. *Carcinogenesis* 29: 139–146, 2008.
259. Καδάς Σ: Το Άγιον Όρος. Τα μοναστήρια και οι θησαυροί τους. Εκδοτική Αθηνών, Αθήνα, 1994.
260. Ντάβος Π: Άθως-Άβατον Αγίου Όρους. Θρησκευτική και Ηθική Εγκυκλοπαίδεια, 1962.
261. Angelis A, Hamzaoui M, Aligiannis N, *et al.*: An integrated process for the recovery of high added-value compounds from olive oil using solid support free liquid-liquid extraction and chromatography techniques. *J Chromatogr A* 1491: 126–136, 2017.
262. Kouka P, Priftis A, Stagos D, *et al.*: Assessment of the antioxidant activity of an olive oil total polyphenolic fraction and hydroxytyrosol from a Greek *Olea europea* variety in endothelial cells and myoblasts. *Int J Mol Med* 40: 703–712, 2017.
263. Mastralexi A, Nenadis N and Tsimidou MZ: Addressing analytical requirements to support health claims on “olive oil polyphenols” (EC Regulation 432/2012). *J Agric Food Chem* 62: 2459–2461, 2014.
264. Impellizzeri J and Lin J: A simple high-performance liquid chromatography method for the determination of throat-burning oleocanthal with probated antiinflammatory activity in extra virgin olive oils. *J Agric Food Chem* 54: 3204–3208, 2006.
265. Vougiopoulou K, Lemus C, Halabalaki M, *et al.*: One-step semisynthesis of oleacein and the determination as a 5-lipoxygenase inhibitor. *J Nat Prod* 77: 441–445, 2014.
266. Brizzolari A, Campisi GM, Santaniello E, Razzaghi-Asl N, Saso L and Foti MC: Effect of organic co-solvents in the evaluation of the hydroxyl radical scavenging activity by the 2-deoxyribose degradation assay: The paradigmatic case of alpha-lipoic acid. *Biophys Chem* 220: 1–6, 2017.
267. Angelis A, Hamzaoui M, Aligiannis N, *et al.*: An integrated process for the recovery of high added-value compounds from olive oil using solid support free liquid-liquid extraction and chromatography techniques. *J Chromatogr A* 1491:

- 126–136, 2017.
268. Kouka P, Priftis A, Stagos D, *et al.*: Assessment of the antioxidant activity of an olive oil total polyphenolic fraction and hydroxytyrosol from a Greek *Olea europea* variety in endothelial cells and myoblasts. *Int J Mol Med* 40: 703–712, 2017.
  269. In vitro models for antioxidant activity evaluation and some medicinal plants possessing antioxidant properties: An overview. *African J Microbiol Res*, 2009.
  270. Klaunig JE, Kamendulis LM and Hocevar BA: Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicol Pathol*, 2010.
  271. Spanou C, Stagos D, Tousias L, Angelis A, Aligiannis N, Skaltsounis AL and Kouretas D: Assessment of antioxidant activity of extracts from unique Greek varieties of Leguminosae plants using in vitro assays. *Anticancer Res*, 2007.
  272. Stagos D, Portesis N, Spanou C, *et al.*: Correlation of total polyphenolic content with antioxidant and antibacterial activity of 24 extracts from Greek domestic Lamiaceae species. *Food Chem Toxicol* 50: 4115–4124, 2012.
  273. Spanou C, Bourou G, Dervishi A, *et al.*: Antioxidant and chemopreventive properties of polyphenols compounds derived from Greek legume plant extracts. *J Agric Food Chem*, 2008.
  274. Cadet J, Delatour T, Douki T, Gasparutto D, Pouget JP, Ravanat JL and Sauvaigo S: Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen*, 1999.
  275. Mylonas C and Kouretas D: Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo* 13: 295–309, 1999.
  276. Garcia-Canton C, Minet E, Anadon A and Meredith C: Metabolic characterization of cell systems used in in vitro toxicology testing: lung cell system BEAS-2B as a working example. *Toxicol In Vitro* 27: 1719–1727, 2013.
  277. Wang P, Henning SM and Heber D: Limitations of MTT and MTS-based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols. *PLoS One*, 2010.
  278. Wang YJ, Zhou SM, Xu G and Gao YQ: Interference of phenylethanoid glycosides from *Cistanche tubulosa* with the MTT assay. *Molecules*, 2015.
  279. Bruggisser R, Von Daeniken K, Jundt G, Schaffner W and Tullberg-Reinert H: Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. *Planta Med*, 2002.
  280. Priftis A, Stagos D, Konstantinopoulos K, *et al.*: Comparison of antioxidant activity between green and roasted coffee beans using molecular methods. *Mol Med Rep* 12, 2015.
  281. Procházková D, Boušová I and Wilhelmová N: Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* 82: 513–523, 2011.
  282. Lambert JD and Elias RJ: The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: a role in cancer prevention. *Arch Biochem Biophys* 501: 65–72,

- 2010.
283. Fukumoto LR and Mazza G: Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J Agric Food Chem* 48: 3597–3604, 2000.
  284. Martin MA, Ramos S, Granado-Serrano AB, Rodriguez-Ramiro I, Trujillo M, Bravo L and Goya L: Hydroxytyrosol induces antioxidant/detoxicant enzymes and Nrf2 translocation via extracellular regulated kinases and phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B pathways in HepG2 cells. *Mol Nutr Food Res* 54: 956–966, 2010.
  285. Galati G, Lin A, Sultan AM and O'Brien PJ: Cellular and in vivo hepatotoxicity caused by green tea phenolic acids and catechins. *Free Radic Biol Med* 40: 570–580, 2006.
  286. Maurya DK and Devasagayam TPA: Antioxidant and prooxidant nature of hydroxycinnamic acid derivatives ferulic and caffeic acids. *Food Chem Toxicol* 48: 3369–3373, 2010.
  287. Visioli F, Wolfram R, Richard D, Abdullah MICB and Crea R: Olive phenolics increase glutathione levels in healthy volunteers. *J Agric Food Chem* 57: 1793–1796, 2009.
  288. Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C and Giovannini C: Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem* 16: 577–586, 2005.
  289. Suzuki M, Otsuki A, Keleku-Lukwete N and Yamamoto M: Overview of redox regulation by Keap1–Nrf2 system in toxicology and cancer. *Curr Opin Toxicol* 1: 29–36, 2016.
  290. Dinkova-Kostova a T, Massiah M a, Bozak RE, Hicks RJ and Talalay P: Potency of Michael reaction acceptors as inducers of enzymes that protect against carcinogenesis depends on their reactivity with sulfhydryl groups. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 3404–9, 2001.
  291. Levenon A-L, Landar A, Ramachandran A, *et al.*: Cellular mechanisms of redox cell signalling: role of cysteine modification in controlling antioxidant defences in response to electrophilic lipid oxidation products. *Biochem J* 378: 373–82, 2004.
  292. Harder B, Jiang T, Wu T, *et al.*: Molecular mechanisms of Nrf2 regulation and how these influence chemical modulation for disease intervention. *Biochem Soc Trans* 43: 680–6, 2015.
  293. Yu R, Tan TH and Kong a N: Butylated hydroxyanisole and its metabolite tert-butylhydroquinone differentially regulate mitogen-activated protein kinases. The role of oxidative stress in the activation of mitogen-activated protein kinases by phenolic antioxidants. *J Biol Chem* 272: 28962–28970, 1997.
  294. Manzanares MA, Solanas M, Moral R, Escrich R, Vela E, Costa I and Escrich E: Dietary extra-virgin olive oil and corn oil differentially modulate the mRNA expression of xenobiotic-metabolizing enzymes in the liver and in the mammary gland in a rat chemically induced breast cancer model. *Eur J Cancer Prev* 24:

- 215–222, 2015.
295. Kafantaris I, Kotsampasi B, Christodoulou V, *et al.*: Grape pomace improves antioxidant capacity and faecal microflora of lambs. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*, 2016.
  296. Makri S, Kafantaris I, Savva S, *et al.*: Novel feed including olive oil mill wastewater bioactive compounds enhanced the redox status of lambs. *In Vivo (Brooklyn)*, 2018.
  297. Covas MI, Nyyssonen K, Poulsen HE, *et al.*: The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors: a randomized trial. *Ann Intern Med* 145: 333–341, 2006.
  298. Scharf G, Prustomersky S, Knasmuller S, Schulte-Hermann R and Huber WW: Enhancement of glutathione and g-glutamylcysteine synthetase, the rate limiting enzyme of glutathione synthesis, by chemoprotective plant-derived food and beverage components in the human hepatoma cell line HepG2. *Nutr Cancer* 45: 74–83, 2003.
  299. Jeyapaul J and Jaiswal AK: Nrf2 and c-Jun regulation of antioxidant response element (ARE)-mediated expression and induction of gamma-glutamylcysteine synthetase heavy subunit gene. *Biochem Pharmacol* 59: 1433–1439, 2000.
  300. Zou X, Feng Z, Li Y, *et al.*: Stimulation of GSH synthesis to prevent oxidative stress-induced apoptosis by hydroxytyrosol in human retinal pigment epithelial cells: activation of Nrf2 and JNK-p62/SQSTM1 pathways. *J Nutr Biochem* 23: 994–1006, 2012.
  301. Kerasioti E, Stagos D, Priftis A, Aivazidis S, Tsatsakis AM, Hayes AW and Kouretas D: Antioxidant effects of whey protein on muscle C2C12 cells. *Food Chem* 155: 271–278, 2014.
  302. Serreli G, Incani A, Atzeri A, *et al.*: Antioxidant Effect of Natural Table Olives Phenolic Extract Against Oxidative Stress and Membrane Damage in Enterocyte-Like Cells. *J Food Sci*, 2017.
  303. Goya L, Mateos R and Bravo L: Effect of the olive oil phenol hydroxytyrosol on human hepatoma HepG2 cells. Protection against oxidative stress induced by tert-butylhydroperoxide. *Eur J Nutr* 46: 70–78, 2007.
  304. Cardinali A, Pati S, Minervini F, D'Antuono I, Linsalata V and Lattanzio V: Verbascoside, isoverbascoside, and their derivatives recovered from olive mill wastewater as possible food antioxidants. *J Agric Food Chem* 60: 1822–1829, 2012.
  305. Gerasopoulos K, Stagos D, Kokkas S, Petrotos K, Kantas D, Goulas P and Kouretas D: Feed supplemented with byproducts from olive oil mill wastewater processing increases antioxidant capacity in broiler chickens. *Food Chem Toxicol* 82: 42–49, 2015.
  306. Gerasopoulos K, Stagos D, Petrotos K, Kokkas S, Kantas D, Goulas P and Kouretas D: Feed supplemented with polyphenolic byproduct from olive mill wastewater processing improves the redox status in blood and tissues of piglets. *Food Chem Toxicol* 86: 319–327, 2015.



307. Kim JG, Sabbagh F, Santanam N, Wilcox JN, Medford RM and Parthasarathy S: Generation of a polyclonal antibody against lipid peroxide-modified proteins. *Free Radic Biol Med* 23: 251–259, 1997.
308. Acquaviva R, Di Giacomo C, Sorrenti V, *et al.*: Antiproliferative effect of oleuropein in prostate cell lines. *Int J Oncol* 41: 31–38, 2012.
309. Martinez-Huelamo M, Rodriguez-Morato J, Boronat A and de la Torre R: Modulation of Nrf2 by Olive Oil and Wine Polyphenols and Neuroprotection. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 6, 2017.
310. Scapagnini G, Vasto S, Abraham NG, Caruso C, Zella D and Fabio G: Modulation of Nrf2/ARE pathway by food polyphenols: a nutritional neuroprotective strategy for cognitive and neurodegenerative disorders. *Mol Neurobiol* 44: 192–201, 2011.
311. Bayram B, Ozcelik B, Grimm S, *et al.*: A diet rich in olive oil phenolics reduces oxidative stress in the heart of SAMP8 mice by induction of Nrf2-dependent gene expression. *Rejuvenation Res* 15: 71–81, 2012.
312. Marković AK, Torić J, Barbarić M and Brala CJ: Hydroxytyrosol, tyrosol and derivatives and their potential effects on human health. *Molecules*, 2019.
313. Rigacci S and Stefani M: Nutraceutical Properties of Olive Oil Polyphenols. An Itinerary from Cultured Cells through Animal Models to Humans. *Int J Mol Sci* 17, 2016.
314. Stefani M and Rigacci S: Beneficial properties of natural phenols: Highlight on protection against pathological conditions associated with amyloid aggregation. *BioFactors*, 2014.
315. Dinda B, Debnath S and Banik R: Naturally occurring iridoids and secoiridoids. An updated review, part 4. *Chem Pharm Bull*, 2011.
316. Serreli G and Deiana M: Biological relevance of extra virgin olive oil polyphenols metabolites. *Antioxidants*, 2018.
317. Cicerale S, Lucas LJ and Keast RSJ: Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory phenolic activities in extra virgin olive oil. *Curr Opin Biotechnol* 23: 129–135, 2012.
318. Incani A, Serra G, Atzeri A, *et al.*: Extra virgin olive oil phenolic extracts counteract the pro-oxidant effect of dietary oxidized lipids in human intestinal cells. *Food Chem Toxicol* 90: 171–180, 2016.
319. Visioli F and Galli C: Biological properties of olive oil phytochemicals. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2002.
320. Fitó M, De La Torre R and Covas MI: Olive oil and oxidative stress. *Mol Nutr Food Res*, 2007.
321. Tsimidou, M. , Blekas, G., Boskou D: OLIVE OIL. In: *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*. Academic Press, pp4252–4260, 2003.
322. Schaffer S, Podstawa M, Visioli F, Bogani P, Muller WE and Eckert GP: Hydroxytyrosol-rich olive mill wastewater extract protects brain cells in vitro

- and ex vivo. *J Agric Food Chem* 55: 5043–5049, 2007.
323. Rietjens SJ, Bast A and Haenen GRMM: New insights into controversies on the antioxidant potential of the olive oil antioxidant hydroxytyrosol. *J Agric Food Chem* 55: 7609–7614, 2007.
  324. Muriana FJG, Montserrat-de la Paz S, Lucas R, *et al.*: Tyrosol and its metabolites as antioxidative and anti-inflammatory molecules in human endothelial cells. *Food Funct* 8: 2905–2914, 2017.
  325. Servili M, Esposto S, Fabiani R, *et al.*: Phenolic compounds in olive oil: antioxidant, health and organoleptic activities according to their chemical structure. *Inflammopharmacology* 17: 76–84, 2009.
  326. Samaniego Sanchez C, Troncoso Gonzalez AM, Garcia-Parrilla MC, Quesada Granados JJ, Lopez Garcia de la Serrana H and Lopez Martinez MC: Different radical scavenging tests in virgin olive oil and their relation to the total phenol content. *Anal Chim Acta* 593: 103–107, 2007.
  327. Fabiani R, Rosignoli P, De Bartolomeo A, Fuccelli R, Servili M, Montedoro GF and Morozzi G: Oxidative DNA damage is prevented by extracts of olive oil, hydroxytyrosol, and other olive phenolic compounds in human blood mononuclear cells and HL60 cells. *J Nutr* 138: 1411–1416, 2008.
  328. Moi P, Chant K, Asunis I, Cao A, Kant YW and Kan YW: Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the  $\beta$ -globin locus control region. *Genetics* 91: 9926–9930, 1994.
  329. Li W and Kong AN: Molecular mechanisms of Nrf2-mediated antioxidant response. *Mol Carcinog* 48: 91–104, 2009.
  330. Kobayashi M and Yamamoto M: Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. *Adv Enzyme Regul* 46: 113–140, 2006.
  331. Ελλάδας ET: Κλαδική μελέτη : Ελαιόλαδο (Μάιος 2015)., 2015.
  332. EFSA (2011) Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive and protection of LDL particles from oxidative damage (ID 1333, 1638, 1639, 1696, 2865), “maintenance of normal blood HDL-cholesterol concentrations” (ID).
  333. Kalogeropoulos N and Tsimidou MZ: Antioxidants in Greek Virgin Olive Oils. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 3: 387–413, 2014.
  334. Talhaoui N, Gomez-Caravaca AM, Leon L, De la Rosa R, Fernandez-Gutierrez A and Segura-Carretero A: From Olive Fruits to Olive Oil: Phenolic Compound Transfer in Six Different Olive Cultivars Grown under the Same Agronomical Conditions. *Int J Mol Sci* 17: 337, 2016.
  335. Quintero-Florez A, Pereira-Caro G, Sanchez-Quezada C, Moreno-Rojas JM, Gaforio JJ, Jimenez A and Beltran G: Effect of olive cultivar on bioaccessibility and antioxidant activity of phenolic fraction of virgin olive oil. *Eur J Nutr* 57: 1925–1946, 2018.

336. Kanakis P, Termentzi A, Michel T, Gikas E, Halabalaki M and Skaltsounis A-L: From olive drupes to olive oil. An HPLC-orbitrap-based qualitative and quantitative exploration of olive key metabolites. *Planta Med* 79: 1576–1587, 2013.
337. Jerman Klen T and Mozetič Vodopivec B: The fate of olive fruit phenols during commercial olive oil processing: Traditional press versus continuous two- and three-phase centrifuge. *LWT - Food Sci Technol* 49: 267–274, 2012.
338. Rodis PS, Karathanos VT and Mantzavinou A: Partitioning of olive oil antioxidants between oil and water phases. *J Agric Food Chem* 50: 596–601, 2002.
339. Benito M, Lasa JM, Gracia P, Oria R, Abenoza M, Varona L and Sánchez-Gimeno AC: Olive oil quality and ripening in super-high-density Arbequina orchard. *J Sci Food Agric* 93: 2207–2220, 2013.
340. Alagna F, Mariotti R, Panara F, *et al.*: Olive phenolic compounds: metabolic and transcriptional profiling during fruit development. *BMC Plant Biol* 12, 2012.
341. Oil IOC: Olive Oil extraction., 2009.
342. Montedoro G, Servili M, Baldioli M and Miniati E: Simple and Hydrolyzable Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil. 2. Initial Characterization of the Hydrolyzable Fraction. *J Agric Food Chem*, 1992.
343. Brenes M, García A, García P and Garrido A: Acid hydrolysis of secoiridoid aglycons during storage of virgin olive oil. *J Agric Food Chem*, 2001.
344. Servili M, Selvaggini R, Taticchi A, Baldioli M and Montedoro GF: The use of biotechnology means during oil mechanical extraction process: Relationship with sensory and nutritional parameters of virgin olive oil quality. In: *Acta Horticulturae*, 2002.
345. Kim DO, Lee KW, Lee HJ and Lee CY: Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *J Agric Food Chem*, 2002.
346. Haman N, Longo E, Schiraldi A and Scampicchio M: Radical scavenging activity of lipophilic antioxidants and extra-virgin olive oil by isothermal calorimetry. *Thermochim Acta*, 2017.
347. Abdallah M, Marzocco S, Adesso S, Zarrouk M and Guerfel M: Olive oil polyphenols extracts inhibit inflammatory markers in J774A.1 murine macrophages and scavenge free radicals. *Acta Histochem* 120: 1–10, 2018.
348. Warleta F, Quesada CS, Campos M, Allouche Y, Beltrán G and Gaforio JJ: Hydroxytyrosol protects against oxidative DNA damage in human breast cells. *Nutrients* 3: 839–857, 2011.
349. Fabiani R, Rosignoli P, De Bartolomeo A, Fuccelli R, Servili M, Montedoro GF and Morozzi G: Oxidative DNA Damage Is Prevented by Extracts of Olive Oil, Hydroxytyrosol, and Other Olive Phenolic Compounds in Human Blood Mononuclear Cells and HL60 Cells. *J Nutr*, 2008.
350. Nouis L, Doulias P-T, Aligiannis N, Bazios D, Agalias A, Galaris D and Mitakou S: DNA protecting and genotoxic effects of olive oil related

- components in cells exposed to hydrogen peroxide. *Free Radic Res* 39: 787–795, 2005.
351. Zitka O, Skalickova S, Gumulec J, *et al.*: Redox status expressed as GSH:GSSG ratio as a marker for oxidative stress in paediatric tumour patients. *Oncol Lett*, 2012.
  352. Aquilano K, Baldelli S and Ciriolo MR: Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. *Front Pharmacol* 5: 196, 2014.
  353. Angeloni C, Malaguti M, Barbalace MC and Hrelia S: Bioactivity of olive oil phenols in neuroprotection. *Int J Mol Sci* 18, 2017.
  354. Rafehi H, Ververis K and Karagiannis TC: Mechanisms of action of phenolic compounds in olive. *J Diet Suppl* 9: 96–109, 2012.
  355. Oliveras-Ferraros C, Fernandez-Arroyo S, Vazquez-Martin A, *et al.*: Crude phenolic extracts from extra virgin olive oil circumvent de novo breast cancer resistance to HER1/HER2-targeting drugs by inducing GADD45-sensed cellular stress, G2/M arrest and hyperacetylation of Histone H3. *Int J Oncol* 38: 1533–1547, 2011.
  356. Wang W-C, Xia Y-M, Yang B, Su X-N, Chen J-K, Li W and Jiang T: Protective Effects of Tyrosol against LPS-Induced Acute Lung Injury via Inhibiting NF-kappaB and AP-1 Activation and Activating the HO-1/Nrf2 Pathways. *Biol Pharm Bull* 40: 583–593, 2017.
  357. Rodriguez-Morato J, Robledo P, Tanner J-A, *et al.*: CYP2D6 and CYP2A6 biotransform dietary tyrosol into hydroxytyrosol. *Food Chem* 217: 716–725, 2017.
  358. Di Benedetto R, Vari R, Scazzocchio B, *et al.*: Tyrosol, the major extra virgin olive oil compound, restored intracellular antioxidant defences in spite of its weak antioxidative effectiveness. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 17: 535–545, 2007.
  359. Spencer JPE: The interactions of flavonoids within neuronal signalling pathways. *Genes Nutr*, 2007.
  360. Lobo V, Patil a, Phatak a and Chandra N: Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev* 4: 118–26, 2010.
  361. Bubonja-Sonje M, Giacometti J and Abram M: Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols. *Food Chem* 127: 1821–1827, 2011.
  362. De Leonardis A, Aretini A, Alfano G, MacCiola V and Ranalli G: Isolation of a hydroxytyrosol-rich extract from olive leaves (*Olea Europaea* L.) and evaluation of its antioxidant properties and bioactivity. *Eur Food Res Technol*, 2008.
  363. Lafka T-I, Lazou A, Sinanoglou V and Lazos E: Phenolic Extracts from Wild Olive Leaves and Their Potential as Edible Oils Antioxidants. *Foods* 2: 18–31, 2013.
  364. Kishikawa A, Ashour A, Zhu Q, Yasuda M, Ishikawa H and Shimizu K: 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. *Phytother Res* 29: 877–886, 2015.
365. Ceylan Y, Usta K, Usta A, Maltas E and Yildiz S: Evaluation of antioxidant activity, phytochemicals and ESR Analysis of *Lavandula Stoechas*. In: *Acta Physica Polonica A*, 2015.
  366. Brahmi F, Mechri B, Dhibi M and Hammami M: Variation in antioxidant activity and phenolic content in different organs of two Tunisian cultivars of *Olea europaea* L. *Acta Physiol Plant*, 2014.
  367. Moudache M, Colon M, Nerin C and Zaidi F: Phenolic content and antioxidant activity of olive by-products and antioxidant film containing olive leaf extract. *Food Chem* 212: 521–527, 2016.
  368. Kouka Paraskevi, Tsakiri Grigoria, Tzortzi Dimitra, Dimopoulou Sofia, Sarikaki Georgia, Stathopoulos Panagiotis, Veskoukis Aristidis S., Halabalaki Maria SA-L: The Polyphenolic Composition of Extracts Derived from Different Greek Extra Virgin Olive Oils Is Correlated with Their Antioxidant Potency. *Oxid Med Cell Longev* 2019: 13, 2019.
  369. Cheng Z, Ren J, Li Y, Chang W and Chen Z: Study on the multiple mechanisms underlying the reaction between hydroxyl radical and phenolic compounds by qualitative structure and activity relationship. *Bioorg Med Chem* 10: 4067–4073, 2002.
  370. Wright JS, Johnson ER and DiLabio GA: Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *J Am Chem Soc* 123: 1173–1183, 2001.
  371. Priftis A, Mitsiou D, Halabalaki M, Ntasi G, Stagos D, Skaltsounis LA and Kouretas D: Roasting has a distinct effect on the antimutagenic activity of coffee varieties. *Mutat Res* 829–830: 33–42, 2018.
  372. Amereh Z, Hatami N, Shirazi FH, *et al.*: Cancer chemoprevention by oleaster (*Elaeagnus angustifoli* L.) fruit extract in a model of hepatocellular carcinoma induced by diethylnitrosamine in rats. *EXCLI J* 16: 1046–1056, 2017.
  373. ABAZA L, TALORETE TPN, YAMADA P, KURITA Y, ZARROUK M and ISODA H: Induction of Growth Inhibition and Differentiation of Human Leukemia HL-60 Cells by a Tunisian Gerboui Olive Leaf Extract. *Biosci Biotechnol Biochem* 71: 1306–1312, 2007.
  374. Akl MR, Ayoub NM, Mohyeldin MM, Busnena BA, Foudah AI, Liu Y-Y and Sayed KAE: Olive phenolics as c-Met inhibitors: (-)-Oleocanthal attenuates cell proliferation, invasiveness, and tumor growth in breast cancer models. *PLoS One* 9: e97622, 2014.
  375. Pampaloni B, Mavilia C, Fabbri S, *et al.*: In vitro effects of extracts of extra virgin olive oil on human colon cancer cells. *Nutr Cancer* 66: 1228–1236, 2014.
  376. El-Kholy TA, Hilal MA, Al-Abadi HA, Serafi AS, Al-Ghamdi AK, Sobhy HM and Richardson JRC: The effect of extra virgin olive oil and soybean on dna, cytogenicity and some antioxidant enzymes in rats. *Nutrients* 6: 2376–2386, 2014.

377. Zeriouh W, Nani A, Belarbi M, *et al.*: 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: 1–19, 2017.
378. Salvini S, Sera F, Caruso D, *et al.*: Daily consumption of a high-phenol extra-virgin olive oil reduces oxidative DNA damage in postmenopausal women. *Br J Nutr* 95: 742–751, 2006.
379. Cano-Lamadrid M, Marhuenda-Egea FC, Hernandez F, Rosas-Burgos EC, Burgos-Hernandez A and Carbonell-Barrachina AA: Biological Activity of Conventional and Organic Pomegranate Juices: Antioxidant and Antimutagenic Potential. *Plant Foods Hum Nutr* 71: 375–380, 2016.
380. Kirkland D, Edwards J, Woehrl T and Beilstein P: Investigations into the genotoxic potential of olive extracts. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 777: 17–28, 2015.
381. Leopoldini M, Russo N and Toscano M: The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chem*, 2011.
382. Leon-Gonzalez AJ, Auger C and Schini-Kerth VB: Pro-oxidant activity of polyphenols and its implication on cancer chemoprevention and chemotherapy. *Biochem Pharmacol* 98: 371–380, 2015.
383. Priftis A, Goutzourelas N, Halabalaki M, *et al.*: Effect of polyphenols from coffee and grape on gene expression in myoblasts. *Mech Ageing Dev* 172: 115–122, 2018.
384. Prieme H, Loft S, Klarlund M, Gronbaek K, Tonnesen P and Poulsen HE: Effect of smoking cessation on oxidative DNA modification estimated by 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine excretion. *Carcinogenesis* 19: 347–351, 1998.
385. Veskokoukis AS, Tsatsakis AM and Kouretas D: Dietary oxidative stress and antioxidant defense with an emphasis on plant extract administration. *Cell Stress Chaperones*, 2012.
386. Halliwell B: Dietary polyphenols: good, bad, or indifferent for your health? *Cardiovasc Res* 73: 341–347, 2007.
387. Halliwell B: Polyphenols: Antioxidant treats for healthy living or covert toxins? *J Sci Food Agric*, 2006.
388. Halliwell B: Establishing the Significance and Optimal Intake of Dietary Antioxidants: The Biomarker Concept. *Nutr Rev*, 2009.
389. Meagher EA, Barry OP, Lawson JA, Rokach J and FitzGerald GA: Effects of vitamin E on lipid peroxidation in healthy persons. *J Am Med Assoc*, 2001.
390. Vissers M, Zock P, Leenen R, Roodenburg A, Van Putte K and Katan M: Effect of consumption of phenols from olives and extra virgin olive oil on LDL oxidizability in healthy humans. *Free Radic Res*, 2001.
391. Sarangarajan R, Meera S, Rukkumani R, Sankar P and Anuradha G: Antioxidants: Friend or foe? *Asian Pac J Trop Med*, 2017.

392. Goodman M, Bostick RM, Kucuk O and Jones DP: Clinical trials of antioxidants as cancer prevention agents: Past, present, and future. *Free Radic Biol Med*, 2011.
393. Szkudlinska MA, Von Frankenberg AD and Utzschneider KM: The antioxidant N-Acetylcysteine does not improve glucose tolerance or  $\beta$ -cell function in type 2 diabetes. *J Diabetes Complications*, 2016.
394. Kasote DM, Katyare SS, Hegde M V. and Bae H: Significance of antioxidant potential of plants and its relevance to therapeutic applications. *Int J Biol Sci*, 2015.
395. Tsatsakis AM, Kouretas D, Tzatzarakis MN, *et al.*: Simulating real-life exposures to uncover possible risks to human health: A proposed consensus for a novel methodological approach. *Hum Exp Toxicol*, 2017.
396. Tsatsakis A, Goumenou M, Liesivuori J, Dekant W and Hernández AF: Toxicology for real-life risk simulation – Editorial preface to this special issue. *Toxicol Lett*, 2019.
397. Fountoucidou P, Veskoukis AS, Kerasioti E, *et al.*: A mixture of routinely encountered xenobiotics induces both redox adaptations and perturbations in blood and tissues of rats after a long-term low-dose exposure regimen: The time and dose issue. *Toxicol Lett*, 2019.
398. Docea AO, Goumenou M, Calina D, *et al.*: Adverse and hormetic effects in rats exposed for 12 months to low dose mixture of 13 chemicals: RLLRS part III. *Toxicol Lett*, 2019.
399. IOOC: COI/T.20/Doc No 29 - Determination of Biophenols in Olive Oils By HPLC. *Int Olive Counc*, 2009.
400. Romero C, Medina E, Vargas J, Brenes M and De Castro A: In vitro activity of olive oil polyphenols against helicobacter pylori. *J Agric Food Chem*, 2007.
401. Cicerale S, Conlan XA, Sinclair AJ and Keast RSJ: Chemistry and health of olive oil phenolics. *Crit Rev Food Sci Nutr* 49: 218–236, 2009.
402. Amamou F, Nemmiche S, Meziane R kaouthar, Didi A, Yazit SM and Chabane-Sari D: Protective effect of olive oil and colocynth oil against cadmium-induced oxidative stress in the liver of Wistar rats. *Food Chem Toxicol*, 2015.
403. Kalaiselvan I, Samuthirapandi M, Govindaraju A, Sheeja Malar D and Kasi PD: Olive oil and its phenolic compounds (hydroxytyrosol and tyrosol) ameliorated TCDD-induced hepatotoxicity in rats via inhibition of oxidative stress and apoptosis. *Pharm Biol* 54: 338–346, 2016.
404. Elgebaly HA, Mosa NM, Allach M, El-Massry KF, El-Ghorab AH, Al Hroob AM and Mahmoud AM: Olive oil and leaf extract prevent fluoxetine-induced hepatotoxicity by attenuating oxidative stress, inflammation and apoptosis. *Biomed Pharmacother* 98: 446–453, 2018.
405. Nakbi A, Tayeb W, Dabbou S, *et al.*: Hypolipidimic and antioxidant activities of virgin olive oil and its fractions in 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-treated rats. *Nutrition* 28: 81–91, 2012.

406. Ghorbel I, Khemakhem M, Boudawara O, *et al.*: Effects of dietary extra virgin olive oil and its fractions on antioxidant status and DNA damage in the heart of rats co-exposed to aluminum and acrylamide. *Food Funct* 6: 3098–3108, 2015.
407. Khayyat LI: Protective effects of extra virgin olive oil against paracetamol-induced liver toxicity in Wistar albino rats. *EurAsian J Biosci*, 2016.
408. Bogani P, Galli C, Villa M and Visioli F: Postprandial anti-inflammatory and antioxidant effects of extra virgin olive oil. *Atherosclerosis* 190: 181–186, 2007.
409. Marrugat J, Covas MI, Fitó M, *et al.*: Effects of differing phenolic content in dietary olive oil on lipids and LDL oxidation: A randomized controlled trial. *Eur J Nutr*, 2004.
410. Tsartsou E, Proutsos N, Castanas E and Kampa M: Network meta-analysis of metabolic effects of olive-oil in humans shows the importance of olive oil consumption with moderate polyphenol levels as part of the mediterranean diet. *Front Nutr*, 2019.
411. Machowetz A, Poulsen HE, Gruendel S, *et al.*: Effect of olive oils on biomarkers of oxidative DNA stress in Northern and Southern Europeans. *FASEB J*, 2007.
412. Faine LA, Diniz YS, Galhardi CM, *et al.*: Synergistic action of olive oil supplementation and dietary restriction on serum lipids and cardiac antioxidant defences. *Can J Physiol Pharmacol*, 2004.
413. Merra E, Calzaretto G, Bobba A, Storelli MM and Casalino E: Antioxidant role of hydroxytyrosol on oxidative stress in cadmium-intoxicated rats: Different effect in spleen and testes. *Drug Chem Toxicol*, 2014.
414. Ferrari CKB and Torres EAFS: Biochemical pharmacology of functional foods and prevention of chronic diseases of aging. *Biomed Pharmacother*, 2003.
415. Yubero-Serrano EM, Lopez-Moreno J, Gomez-Delgado F and Lopez-Miranda J: Extra virgin olive oil: More than a healthy fat. *Eur J Clin Nutr*, 2018.
416. Kerasioti E, Terzopoulou Z, Komini O, *et al.*: Tissue specific effects of feeds supplemented with grape pomace or olive oil mill wastewater on detoxification enzymes in sheep. *Toxicol Reports*, 2017.
417. Veskoukis AS, Kyparos A, Nikolaidis MG, *et al.*: The antioxidant effects of a polyphenol-rich grape pomace extract in vitro do not correspond in vivo using exercise as an oxidant stimulus. *Oxid Med Cell Longev* 2012: 185867, 2012.
418. Tuck KL, Freeman MP, Hayball PJ, Stretch GL and Stupans I: The in vivo fate of hydroxytyrosol and tyrosol, antioxidant phenolic constituents of olive oil, after intravenous and oral dosing of labeled compounds to rats. *J Nutr* 131: 1993–1996, 2001.
419. Levander OA, Fontela R, Morris VC and Ager AL: Protection against Murine Cerebral Malaria by Dietary-Induced Oxidative Stress. *J Parasitol*, 1995.
420. Poljsak B and Milisav I: The neglected significance of “antioxidative stress.” *Oxid Med Cell Longev*, 2012.
421. Bjelakovic G, Nikolova D, Simonetti RG and Gluud C: Antioxidant supplements



- for prevention of gastrointestinal cancers: A systematic review and meta-analysis. *Lancet*, 2004.
422. Miller ER, Pastor-barriuso R, Dalal D, Riemersma RA, Appel L. and Guallar E: Review Meta-Analysis : High-Dosage Vitamin E Supplementation May Increase. *Ann Intern Med*, 2005.
  423. Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, Simonetti RG and Gluud C: Antioxidant supplements for prevention of mortality in healthy participants and patients with various diseases. *Sao Paulo Med J*, 2015.
  424. Bardia A, Tleyjeh IM, Cerhan JR, Sood AK, Limburg PJ, Erwin PJ and Montori VM: Efficacy of antioxidant supplementation in reducing primary cancer incidence and mortality: Systematic review and meta-analysis. *Mayo Clin Proc*, 2008.
  425. Myung SK, Kim Y, Ju W, Choi HJ and Bae WK: Effects of antioxidant supplements on cancer prevention: Meta-analysis of randomized controlled trials. *Ann Oncol*, 2009.
  426. Schulz TJ, Zarse K, Voigt A, Urban N, Birringer M and Ristow M: Glucose Restriction Extends *Caenorhabditis elegans* Life Span by Inducing Mitochondrial Respiration and Increasing Oxidative Stress. *Cell Metab*, 2007.
  427. Cutler R and Mattson M: Measuring oxidative stress and interpreting its relevance in humans. In: *Critical Reviews of Oxidative Stress and Aging e Advances in Basic Science, Diagnostic and Intervention*, 2003.
  428. Pang KL and Chin KY: The biological activities of oleocanthal from a molecular perspective. *Nutrients*, 2018.
  429. Medina E, De Castro A, Romero C and Brenes M: Comparison of the concentrations of phenolic compounds in olive oils and other plant oils: Correlation with antimicrobial activity. *J Agric Food Chem*, 2006.
  430. Fogli S, Arena C, Carpi S, *et al.*: Cytotoxic Activity of Oleocanthal Isolated from Virgin Olive Oil on Human Melanoma Cells. *Nutr Cancer*, 2016.
  431. Mennen LI, Walker R, Bennetau-Pelissero C and Scalbert A: Risks and safety of polyphenol consumption. *Am J Clin Nutr*, 2005.
  432. Kouka P, Tekos F, Papoutsaki Z, *et al.*: Olive oil induces both beneficial and harmful alterations on rat redox status depending on the tissue: the real life exposure scenario. *Toxicol Reports*, 2020.
  433. Holst B and Williamson G: Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. *Curr Opin Biotechnol* 19: 73–82, 2008.
  434. Sies H: Total Antioxidant Capacity: Appraisal of a Concept. *J Nutr*, 2007.