



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας
και Βιοτεχνολογίας

«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»

Καραμπέρη Βικτώρια

«Η μελέτη της βιολογικής δράσης εκχυλισμάτων από φύλλα ελιάς
και ξεπικρίσματος ελαιόκαρπου σε ενδοθηλιακά κύτταρα»

Λάρισα 2022

«Η μελέτη της βιολογικής δράσης εκχυλισμάτων από φύλλα ελιάς και ξεπικρίσματος ελαιόκαρπου σε ενδοθηλιακά κύτταρα»

"The study of the biological activity of olive leaf and olive debittering extracts in endothelial cells"

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

Αριστείδης Βεσκούκης: Επίκουρος Καθηγητής στην Οξειδοαναγωγική Βιολογία της Διατροφής και της Άσκησης, Τμήμα Διαιτολογίας και Διατροφολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Μαρία Χαλαμπαλάκη: Αναπληρώτρια καθηγήτρια του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Δημητρίου Κουρέτα. Θα ήθελα λοιπόν να του εκφράσω τις ευχαριστίες μου για την ανάθεση του θέματος, το ενδιαφέρον του αλλά και την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω την πτυχιακή μου εργασία στο εργαστήριό του, η οποία μου προσέφερε σημαντικές εμπειρίες και γνώσεις.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες, θα ήθελα να απευθύνω στην μεταδιδακτορική ερευνήτρια Μαρία Κούρτη για την πολύτιμη βοήθεια, κατανόηση και στήριξη που μου προσέφερε στο εργαστήριο καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας καθώς και για τις συμβουλές της και τις γνώσεις που μου παρείχε κατά τη συγγραφή της εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Βεσκούκη Αριστείδη και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα Χαλαμπαλάκη Μαρία που δέχτηκαν να συμμετέχουν στην τριμελή επιτροπή και να προσφέρουν τις πολύτιμες συμβουλές τους.

Το μεγαλύτερο ευχαριστώ θέλω να το εκφράσω στην οικογένεια μου, η οποία ήταν ο υποκινητής και υποστηρικτής αυτής της προσπάθειάς μου. Ακόμη ευχαριστώ όλους τους φίλους μου για την απεριόριστη συμπαράσταση που μου πρόσφεραν.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ.....	3
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	8
ABSTRACT.....	9
I. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	11
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ	11
1.1. Ελεύθερες ρίζες.....	11
1.2. Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS).....	12
1.2.1. Δημιουργία Ελευθέρων Ριζών	12
1.2.2 Μιτοχόνδρια	13
1.2.3 Υπεροξυσώματα.....	14
1.2.4 Ενδοπλασματικό δίκτυο.....	15
1.3 Στόχοι των ελεύθερων ριζών	16
1.3.1 Νουκλεϊκά οξέα.....	17
1.3.2 Πρωτεΐνες.....	19
1.3.3 Λιπίδια.....	19
1.4 Οξειδωτικό Στρες.....	20
1.5 Αντιοξειδωτικά	21
1.6 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί.....	22
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ.....	23
2.1 Γενικά.....	23
2.2 Δομή και Κατηγορίες πολυφαινολών	23
2.3 Βιοσύνθεση φυτοφαινολών.....	26
2.4 Βιολογική δράση πολυφαινολών	27
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΕΛΙΑ	30
3.1 Ιστορία	30
3.2 Χρήσεις φύλλων ελιάς στην αρχαιότητα	31
3.3 Μορφολογία ελιάς	31
3.3.1 Φύλλα ελιάς.....	31
3.3.2 Καρπός	32
3.4 Ποικιλίες ελιάς	33
3.5. Καλλιέργεια ελιάς.....	35
3.6. Βιομηχανική επεξεργασία ελιάς	37
3.6.1 Διαδικασία παραγωγής βρώσιμων ελιών.....	37

3.6.1.1 Φυσικές επιτραπέζιες ελιές ή Ελληνικός τύπος (Natural or Greek type).....	38
3.6.1.2 Ισπανικός τύπος (Spanish type)	39
3.6.1.3 Καλιφορνέζικος τύπος (California type)	41
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΥΠΟΠΡΟΪΟΝΤΑ ΕΛΙΑΣ	44
4.2 Τα φύλλα ελιάς ως υποπροϊόντα καλλιέργειας και επεξεργασίας.....	44
4.2.1 Φαινολικές ενώσεις στα φύλλα ελιάς	45
4.2.1.1 Φαινολικά οξέα	46
4.2.1.2 Φαινολικές αλκοόλες	46
4.2.1.3 Φλαβονοειδή	47
4.2.1.4 Σεκοϊριδοειδή.....	48
4.2.2 Παράγοντες που επηρεάζουν την σύσταση φαινολικών ουσιών στα φύλλα ελιάς.....	49
4.2.3 Βιολογική δράση πολυφαινολών φύλλων ελιάς	50
4.2.3.1 Αντιοξειδωτική δράση	50
4.2.3.2 Αντικαρκινική Δράση	51
4.2.3.3 Αντιμικροβιακή δράση	52
4.3 Ξεπίκριμα ελιάς	52
II ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	55
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	55
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	56
6.1 Εκχυλίσματα.....	56
6.2 Κυτταροκαλλιέργειες.....	57
6.2.1 Κυτταρική σειρά.....	57
6.3 Συνθήκες καλλιέργειας	57
6.4 Προσδιορισμός της κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο ΧΤΤ	58
6.5 Υπολογισμός ολικής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford	60
6.6 Υπολογισμός επιπέδων λιπιδικής υπεροξειδωσης (Thiobarbituric Acid Reactive Substances, TBARS)	61
6.7 Δοκιμασία COMET	62
6.8 Στατιστική ανάλυση	64
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	65
7.1 Εκτίμηση της κυτταροτοξικότητας.....	65
7.2 Εκτίμηση επιπέδων λιπιδικής υπεροξειδωσης (Thiobarbituric Acid Reactive Substances, TBARS)	66
7.3 Εκτίμηση της προστατευτικής δράσης των εκχυλισμάτων από βλάβες στο DNA με τη δοκιμασία COMET.....	67
7.4 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της δοκιμασίας COMET	72
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	74

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τις τελευταίες δεκαετίες, ολοένα και περισσότερα επιστημονικά ευρήματα αναδεικνύουν τις ωφέλιμες δράσεις των φυτικών εκχυλισμάτων που είναι πλούσια σε φαινόλες. Αυτός είναι και ο λόγος, που πολλοί ερευνητές επικεντρώνονται στο φαινολικό περιεχόμενο εκχυλισμάτων ελιάς, βάσει του οποίου έχουν αποδοθεί σημαντικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες, οι οποίες είναι ικανές να συμβάλλουν στην πρόληψη διαφόρων ασθενειών. Ωστόσο, το φαινολικό περιεχόμενο του υγρού ξεπικρίσματος ελαιόκαρπου αλλά και οι βιολογικές δράσεις του δεν είναι καλά μελετημένα, ώστε να αποτελέσουν αξιοποιήσιμη πηγή βιοδραστικών ουσιών.

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της βιολογικής δράσης τριών εκχυλισμάτων υποπροϊόντων ελιάς, ένα εκχύλισμα φύλλων ελιάς, (PO_53) και δύο εκχυλίσματα ξεπικρίσματος ελαιόκαρπου της ποικιλίας Καλαμών (PO_50, PO_51) σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα (EA.hy 926). Ειδικότερα, μελετήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων μέσω του δείκτη λιπιδικής υπεροξειδωσης (Thiobarbituric Acid Reactive Substances, TBARS), καθώς και η προστατευτική τους ικανότητα έναντι βλαβών του DNA ενδοθηλιακών κυττάρων υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες, με την δοκιμασία COMET. Παράλληλα, ο απώτερος σκοπός της εργασίας ήταν η αξιολόγηση της χρήσης των συγκεκριμένων εκχυλισμάτων ως φυσικά συντηρητικά στον χώρο της βιομηχανίας των τροφίμων.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, και τα τρία εκχυλίσματα προστάτευσαν τα ενδοθηλιακά κύτταρα έναντι της οξειδωτικής βλάβης του DNA, ωστόσο μόνο το PO_51 (40 µg/mL) προκάλεσε ταυτόχρονα μείωση στο δείκτη λιπιδικής υπεροξειδωσης. Συγκριτικά, το εκχύλισμα που παρουσίασε προστατευτική δράση στην πιο μικρή συγκέντρωση, άρα ήταν το πιο βιοδραστικό, ήταν το εκχύλισμα φύλλων ελιάς (PO_53). Τέλος, η παρούσα εργασία ανέδειξε τα εκχυλίσματα ξεπικρίσματος ελαιόκαρπου Καλαμών (PO_50, PO_51) ως σημαντική πηγή βιοδραστικών ουσιών, διότι όπως φαίνεται προσφέρουν αντιοξειδωτική και προστατευτική δράση από βλάβες του DNA σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, γεγονός που σηματοδοτεί σημαντικά οφέλη για την υγεία του ανθρώπου.

Λέξεις – Κλειδιά: εκχύλισμα φύλλων ελιάς, εκχύλισμα ξεπικρίσματος, οξειδωτικός παράγοντας, βλάβη του DNA, ενδοθηλιακά κύτταρα

ABSTRACT

In recent decades, more and more scientific findings highlight the beneficial effects of plant extracts rich in polyphenols. This is the reason why many researchers focus on the polyphenolic content of olive extracts, on the basis of which important antioxidant properties have been attributed, which are capable of contributing to the prevention of various diseases. However, the polyphenolic content of the liquid olive debittering fruit and its biological actions are not well studied, so that they can be a useful source of bioactive substances.

The aim of this work was to study the biological activity of three extracts of olive by-products, an extract of olive leaves, (PO_53) and two olive debittering extracts of olive fruit of the Kalamon variety (PO_50, PO_51) on human endothelial cells (EA. hy 926). In particular, the antioxidant capacity of the extracts was studied through the lipid peroxidation index (Thiobarbituric Acid Reactive Substances, TBARS), as well as their protective capacity against endothelial cell DNA damage under conditions of oxidative stress, with the COMET assay. At the same time, the ultimate goal of the work was to evaluate the use of the specific extracts as natural preservatives in the food industry.

According to the results, all three extracts protected endothelial cells against oxidative DNA damage, however only PO_51 (40 µg/mL) simultaneously caused a decrease in lipid peroxidation index. In comparison, the extract that showed a protective effect at the lowest concentration, thus being the most bioactive, was the olive leaf extract (PO_53). Finally, the present work highlighted the extracts of the Kalamon olive fruit (PO_50, PO_51) as an important source of bioactive substances, because it seems to offer antioxidant and protective action against DNA damage in conditions of oxidative stress, which indicates important benefits for human health.

Keywords: olive leaf extract, olive debittering extract, oxidant, DNA damage, endothelial cell line

I. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ

1.1. Ελεύθερες ρίζες

Ως ελεύθερη ρίζα ορίζεται ένα μόριο ή ένα άτομο, που περιέχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στιβάδα σθένους και μπορεί να προκύψει είτε με την προσθήκη, είτε με την απώλεια ενός ηλεκτρονίου (1) (Εικόνα 1). Αντίθετα, στην μη ελεύθερη ρίζα η εξωτερική στιβάδα των μορίων ή των ατόμων καλύπτεται από ζεύγη ηλεκτρονίων με αντίθετη στροφορμή (2). Τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια είναι ικανά να καταλαμβάνουν μόνα τους ένα ατομικό ή μοριακό τροχιακό με κύριο χαρακτηριστικό τους να θεωρούνται ιδιαίτερα ασταθή μόρια, όπου έχουν την τάση να αντιδρούν εύκολα με άλλα μόρια και να τα οξειδώνουν. Συνεπώς, ο περιττός αριθμός ηλεκτρονίων κάνει μια ελεύθερη ρίζα ασταθή, βραχύβια και ιδιαίτερα αντιδραστική. Πρόκειται για πολύ δραστικές μορφές, οι οποίες οδηγούν σε μια αλυσιδωτή αντίδραση, που σηματοδοτεί δυσμενείς επιπτώσεις σε διάφορα βιολογικά μακρομόρια, με άμεση επίδραση στις λειτουργίες του κυττάρου και κατ' επέκταση του οργανισμού (3). Οι σημαντικότερες ελεύθερες ρίζες είναι αυτές που διαθέτουν κεντρικό άτομο το οξυγόνο (Reactive Oxygen Species, ROS), το άζωτο (Reactive Nitrogen Species, RNS), το θείο (Reactive Sulfur Species, RSS) και τον άνθρακα (Reactive Carbon Species, RCS) (4).



Εικόνα 1: Παράδειγμα σχηματισμού ελεύθερης ρίζας (5)

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

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) είναι ενεργές χημικές ουσίες που σχηματίζονται από το οξυγόνο (O_2). Εντός του κυττάρου, οι ROS αποτελούν υποπροϊόντα του φυσιολογικού μεταβολισμού και συμβάλλουν στην κυτταρική σηματοδότηση (cell signalling) και στην ομοιόσταση (6). Όπως παρατηρούμε στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1), υπάρχουν ελεύθερες ρίζες (π.χ. ρίζα υδροξυλίου) αλλά και μη ρίζες (π.χ. υπεροξειδίο του υδρογόνου).

Πίνακας 1: Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (ROS) (7)

Ελεύθερη ρίζα	Σύμβολο	Χρόνος ημιζωής (s)
Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS)		
Ρίζες		
Ανιόν Σουπεροξειδίου	$O_2^{\cdot -}$	10^{-6} s
Ρίζα Υδροξυλίου	OH^{\cdot}	10^{-10} s
Ρίζα Αλκοξειδίου	RO^{\cdot}	10^{-6} s
Ρίζα Περοξυλίου	ROO^{\cdot}	17 s
Μη ρίζες		
Υπεροξειδίο του υδρογόνου	H_2O_2	Σταθερό
Μονήρες οξυγόνο	1O_2	10^{-6} s
Όζον	O_3	s
Οργανικό περοξειδίο	$ROOH$	Σταθερό
Υποχλωριώδες Οξύ	$HOCl$	Σταθερό (λεπτά)
Υποβρωμιώδες Οξύ	$HOBr$	Σταθερό (λεπτά)

1.2.1. Δημιουργία Ελευθέρων Ριζών

Γενικά, οι ελεύθερες ρίζες στον οργανισμό μας προέρχονται είτε μέσω ενδογενούς σχηματισμού είτε εξωγενούς (8). Οι ενδογενείς πηγές σχετίζονται με διάφορα κυτταρικά οργανίδια όπως τα μιτοχόνδρια, τα υπεροξυσώματα, το ενδοπλασματικό δίκτυο, όπου η κατανάλωση οξυγόνου χαρακτηρίζεται ως ιδιαίτερα υψηλή.

Αντίθετα, οι εξωγενείς πηγές σχετίζονται με την ρύπανση του αέρα και του νερού, με την χρήση συντηρητικών στα τρόφιμα, με την υπεριώδη ακτινοβολία, με την υψηλή θερμοκρασία, με την κατανάλωση αλκοόλ, με το κάπνισμα, με τα χημικά φάρμακα όπως είναι (παρακεταμόλη, δοξορουμπικίνη, αιθανόλη).

Επιπλέον, σχετίζεται με διάφορους τρόπους μαγειρέματος, όπως είναι καπνιστό κρέας ή ψήσιμο στα κάρβουνα, με μέταλλα όπως το κάδμιο (Cd), ο υδράργυρος (Hg), ο μόλυβδος (Pb) και βαρέα μέταλλα όπως ο σίδηρος (Fe), ο χαλκός (Cu), το κοβάλτιο (Co) και το χρώμιο (Cr) (7) (Εικόνα 2).

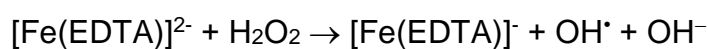


Εικόνα 2: Πηγές που συμβάλλουν στην παραγωγή ελευθέρων ριζών (9)

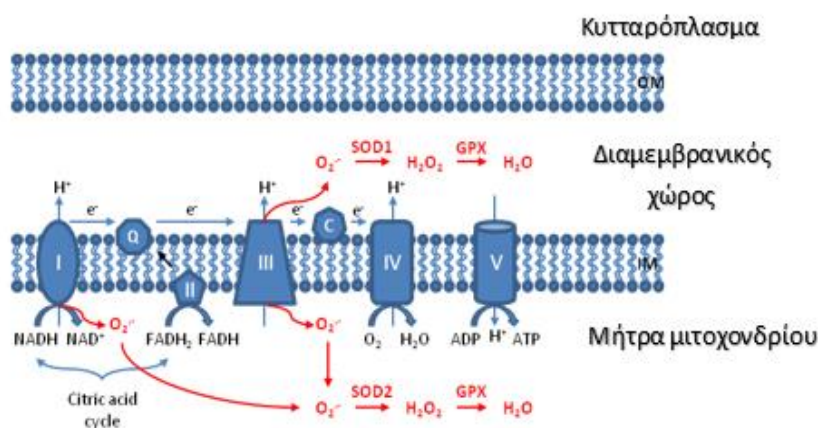
1.2.2 Μιτοχόνδρια

Τα μιτοχόνδρια αποτελούν πηγή για την μεγαλύτερη παραγωγή ελεύθερων ριζών, που επιτυγχάνεται μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (Εικόνα 3). Τα ηλεκτρόνια του NADH και FADH₂ μεταφέρονται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, η οποία αποτελείται από 3 συμπλέγματα πρωτεϊνών ενσωματωμένων στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Πρόκειται για το σύμπλεγμα NADH δεϋδρογονάσης, το σύμπλεγμα αναγωγάσης κυτοχρώματος c και το σύμπλεγμα οξειδάσης κυτοχρώματος c. Τα άλλα δύο συμπλέγματα είναι ελεύθερα διαχεόμενα μόρια [ουβικινόνη (Q), κυτόχρωμα c] και ο ρόλος τους είναι να μεταφέρουν ηλεκτρόνια από το ένα σύμπλεγμα στο άλλο. Το μοριακό οξυγόνο είναι αυτό που αποτελεί τον τελικό αποδέκτη των ηλεκτρονίων, το οποίο στην συνέχεια ανάγεται πλήρως προς νερό. Συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια της αερόβιας λειτουργίας το 1-5% του μοριακού οξυγόνου ανάγεται με τη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου προκαλώντας το σχηματισμό της ρίζας του ανιόν υπεροξειδίου (O₂^{•-}) (10). Το ανιόν που δημιουργείται έχει μικρή δραστηριότητα αλλά μετατρέπεται εύκολα σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂) μέσω της υπεροξειδικής δισμουτάσης

(SOD). Η αναγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) σε νερό εξασφαλίζεται μέσω της καταλάσης και της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx). Παρουσία όμως μετάλλων μετάπτωσης όπως ο σίδηρος (Fe) και ο χαλκός (Cu), το υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) μέσω της αντίδρασης Fenton, ανάγεται σε δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) όπως είναι οι ρίζες του υδροξυλίου.



Ακόμη, το υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) ανάγεται και σε ρίζα ανιόν σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$) και σε μη ρίζα όπως είναι το μονήρες οξυγόνο (1O_2) (11). Ταυτόχρονα, η ενέργεια που δημιουργείται κατά τη μετακίνηση των πρωτονίων αποθηκεύεται στην ATP μέσω της συνθετάσης του ATP.



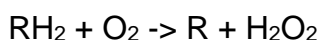
Εικόνα 3: Παραγωγή ελεύθερων ριζών στα μιτοχόνδρια (12)

1.2.3 Υπεροξυσώματα

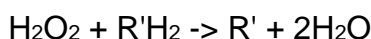
Τα υπεροξυσώματα είναι οργανίδια που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα σχεδόν όλων των ευκαρυωτικών κυττάρων (13). Συχνά, παρατηρείται η χρήση του μοριακού οξυγόνου σαν υπόστρωμα για τη δημιουργία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2), από το οποίο τα συγκεκριμένα οργανίδια έχουν πάρει την ονομασία. Ιδιαίτερα σημαντικός είναι ο ρόλος τους στον μεταβολισμό των λιπιδίων και στη μετατροπή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS). Μία σημαντική λειτουργία ενός υπεροξυσώματος είναι ο καταβολισμός των λιπαρών οξέων πολύ μακράς αλυσίδας μέσω της β-οξειδωσης.

Στα ζωικά κύτταρα τα λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας μετατρέπονται σε λιπαρά οξέα μέσης αλυσίδας, τα οποία μεταφέρονται στα μιτοχόνδρια, όπου και σταδιακά διασπώνται σε διοξείδιο του άνθρακα και νερό. Ωστόσο, στις ζύμες

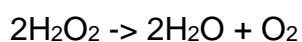
και στα φυτικά κύτταρα, η διαδικασία αυτή επιτελείται αποκλειστικά στα υπεροξυσώματα (14). Επίσης, τα υπεροξυσώματα διαθέτουν οξειδωτικά ένζυμα, όπως για παράδειγμα η οξειδάση των D-αμινοξέων και η οξειδάση του ουρικού οξέος (15). Παράλληλα, μερικά ένζυμα των υπεροξυσωμάτων χρησιμοποιώντας μοριακό οξυγόνο, αφαιρούν άτομα υδρογόνου από συγκεκριμένα οργανικά υποστρώματα (R), μέσω μιας οξειδωτικής αντίδρασης παράγοντας έτσι υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2):



Η καταλάση, ακόμη ένα ένζυμο των υπεροξυσωμάτων, χρησιμοποιεί το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) για την οξείδωση άλλων υποστρωμάτων όπως φαινόλες, φορμικό οξύ, φορμαλδεΐδη και αλκοόλες, μέσω της αντίδρασης υπεροξειδωσις:



Στα ηπατικά και νεφρικά κύτταρα η αντίδραση αυτή είναι σημαντική, καθώς τα υπεροξυσώματα αποτοξινώνουν διάφορες τοξικές ουσίες που εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος. Επιπροσθέτως, η περίσσεια ποσότητα υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) που συσσωρεύεται στο κύτταρο, μετατρέπεται μέσω της καταλάσης σε H_2O με την παρακάτω χημική αντίδραση:



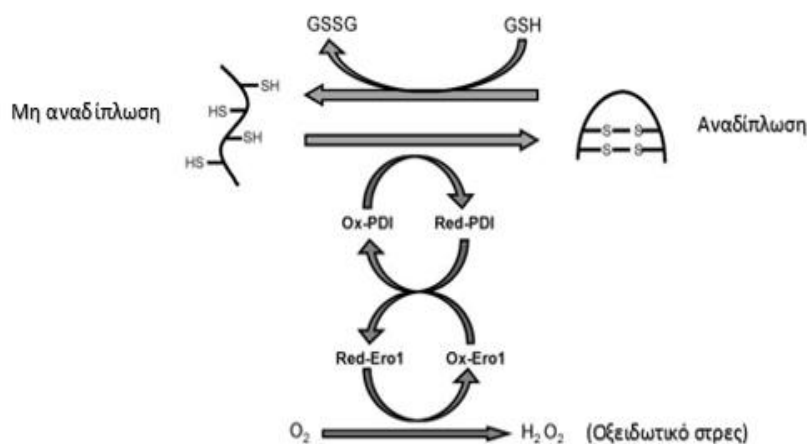
Τέλος, έχει αποδειχθεί ότι τα υπεροξυσώματα συμμετέχουν στη δημιουργία ανιόν σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) και ριζών μονοξειδίου του αζώτου (NO) (16).

1.2.4 Ενδοπλασματικό δίκτυο

Τα ένζυμα του ενδοπλασματικού δικτύου όπως για παράδειγμα, τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450, η οξειδάση των διαμινών, η λιποξυγενάση συμβάλλουν και αυτά εξίσου στο σχηματισμό των ελεύθερων ριζών. Ένα από τα σημαντικότερα ένζυμα που συμμετέχει σε αυτήν τη διαδικασία είναι η οξειδάση των θειολών που συμβάλλει στον σχηματισμό του υπεροξειδίου υδρογόνου (H_2O_2) (17). Συγκεκριμένα, κατά την αναδίπλωση της οξειδωτικής πρωτεΐνης στο ενδοπλασματικό δίκτυο, οι ομάδες θειόλης στις κυστεΐνες των πεπτιδίων του υποστρώματος οξειδώνονται και σχηματίζουν δισουλφιδικούς δεσμούς με το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) να παράγεται ως υποπροϊόν (Εικόνα 4) (18). Η οξειδωτική αναδίπλωση πρωτεΐνης των ευκαρυωτικών κυττάρων λαμβάνει χώρα στο ενδοπλασματικό δίκτυο, η οποία μεσολαβείτε

από την δισουλφιδική ισομεράση πρωτεΐνης [protein disulfide isomerase, (PDI)] και την οξειδοοικοδομική [ER oxidoreductin 1, (Ero1)]. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) παράγονται ως υποπροϊόν της αναδίπλωσης της οξειδωτικής πρωτεΐνης. Οι ακατάλληλα συζευγμένοι δισουλφιδικοί δεσμοί που σχηματίζονται κατά την αναδίπλωση των πρωτεϊνών μπορούν να μειωθούν σε βάρος της γλουταθειόνης, η οποία είναι ένα απαραίτητο αντιοξειδωτικό στο ενδοπλασματικό δίκτυο.

Σε συνθήκες στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο, ο απορυθμισμένος σχηματισμός δισουλφιδικού δεσμού και η θραύση μπορεί να οδηγήσει σε συσσώρευση δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) και να προκαλέσει οξειδωτικό στρες. Επιπλέον, ορισμένα συστατικά της μη σωστά αναδιπλωμένης πρωτεϊνικής απόκρισης όπως η ομόλογη πρωτεΐνη C/EBP (Homologous Protein, CHOP) μπορούν να συμβάλλουν στο οξειδωτικό στρες (18).



Εικόνα 4: Οξειδωτική αναδίπλωση πρωτεΐνης στο ενδοπλασματικό δίκτυο (18)

1.3 Στόχοι των ελεύθερων ριζών

Στην περίπτωση που διαταράσσεται η ισορροπία μεταξύ των αντιοξειδωτικών και των οξειδωτικών μορίων, οι ελεύθερες ρίζες συσσωρεύονται προκαλώντας βλάβη. Τα κυτταρικά μακρομόρια που στοχεύουν είναι τα νουκλεϊκά οξέα, στα οποία είναι ικανές να οδηγήσουν ακόμη και σε μεταλλάξεις, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια. Οι βλάβες αφορούν ιστούς και μπορούν να προκαλέσουν ασθένειες όπως σακχαρώδη διαβήτη, νευροεκφυλιστικές ασθένειες (π.χ. πάρκινσον, Alzheimer), διάφορες μορφές

καρκίνου, καρδιαγγειακές παθήσεις, καταρράκτης, ρευματοειδή αρθρίτιδα και άσθμα (19).

1.3.1 Νουκλεϊκά οξέα

Το δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA) αποτελεί ένα κρίσιμο στόχο των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), οι οποίες είναι από τις κύριες αιτίες πρόκλησης οξειδωτικών βλαβών στα νουκλεϊκά οξέα. Συγκεκριμένα, είναι ικανές να προκαλέσουν χημικές τροποποιήσεις στο DNA, μέσω θραύσης ενός κλώνου ή τροποποιήσεων στις βάσεις που το αποτελούν (20).

Το μιτοχονδριακό DNA είναι πιο ευάλωτο στις οξειδωτικές βλάβες των ελεύθερων ριζών συγκριτικά με το πυρηνικό DNA (22). Αυτήν η ευαισθησία δικαιολογείται με το γεγονός ότι το μιτοχονδριακό DNA είναι πυκνό λόγω της έλλειψης ιστονών και ιντρονίων και σε συνδυασμό ότι βρίσκεται σε άμεση απόσταση από το σημείο δημιουργίας των ελεύθερων ριζών. Επιπρόσθετα, τα μιτοχόνδρια υστερούν σε μηχανισμούς επιδιόρθωσης βλαβών του γενετικού υλικού, σε αντίθεση με το πυρηνικό DNA.

Στο πυρηνικό DNA οι επιδιορθώσεις γίνονται με ένζυμα με κύριο μηχανισμό την αποκοπή βάσης (Base -Excision Repair, BER), απομακρύνοντας τις τροποποιημένες βάσεις που προκαλούνται ενδογενώς, καθώς και με έναν ακόμη μηχανισμό την αποκοπή νουκλεοτιδίου (Nucleotide - Excision Repair, NER) που είναι σε θέση να επιδιορθώσει περιοχές καταστροφής έως και 30 ζεύγη βάσεων που προκαλούνται κυρίως από εξωγενείς παράγοντες (23). Επίσης, το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂) που παράγεται κατά τη διάρκεια της οξείδωσης των αμινών και καταλύεται από την μονοαμινοξειδάση της εξωτερικής μεμβράνης, φαίνεται να είναι ένας κεντρικός μεταβολίτης που συμβάλλει στην οξειδωτική βλάβη του μιτοχονδριακού DNA (24). Ειδικότερα, τα επίπεδα της 8-υδροξυ δεοξυγουανοσίνης (8-OHdG) είναι υψηλότερα στο μιτοχονδριακό DNA από ό, τι στο πυρηνικό DNA (25) γεγονός που την καθιστά αξιόπιστο βιοδείκτη της οξειδωτικής βλάβης του DNA που εμπλέκεται στη μεταλλαξιγένεση, την καρκινογένεση και τη γήρανση.

Το επίπεδο βλάβης του DNA αυξάνεται με την ηλικία καθώς έχει αποδειχτεί ότι σε γερασμένους νευρώνες εμφανίζεται ένας αυξανόμενος αριθμός μονόκλωνων και δίκλωνων θραυσμάτων DNA (26). Ακόμη, η

οξειδωτική βλάβη του DNA μπορεί να προκαλέσει μεταλλάξεις τόσο στο μιτοχονδριακό DNA όσο και στο πυρηνικό DNA (27).

Όσον αφορά την έναρξη της οξείδωσης, μπορεί να προκληθεί είτε α) με την αντίδραση του DNA με ελεύθερες ρίζες, όπως το μονήρες οξυγόνο ($^1\text{O}_2$) μέσω περικυκλικών αντιδράσεων, είτε β) με την αφαίρεση ενός ατόμου υδρογόνου από μια δεοξυριβόζη, ώστε να σχηματιστεί ελεύθερη ρίζα, είτε γ) με την απώλεια ενός ηλεκτρονίου από μία αρωματική βάση ώστε να σχηματιστεί ενδιάμεση κατιοντική ρίζα.

Σημαντικό ρόλο στις βλάβες του DNA παίζει η ρίζα υδροξυλίου (OH^\bullet), η οποία αντιδρά άμεσα με όλα τα συστατικά του DNA, όπως οι βάσεις πουρίνης και πυριμιδίνης καθώς και με τα σάκχαρα δεοξυριβόζης, προκαλώντας τόσο μονόκλωνες όσο και δίκλωνες θραύσεις στο DNA. Επίσης, η ρίζα υδροξυλίου (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). Επίσης, μια ελεύθερη ρίζα που παράγεται στα φαγοκύτταρα και έχει φυσιολογική λειτουργία σαν νευροδιαβιβαστής είναι το μονοξειδίο του αζώτου (NO^\bullet). Παρόλο που ούτε η ρίζα του μονοξειδίου του αζώτου (NO^\bullet) ούτε η ρίζα του ανιόντος σουπεροξειδίου ($\text{O}_2^{\bullet-}$) είναι ιδιαίτερα δραστική, το προϊόν της μεταξύ τους αντίδρασης, είναι ικανό να συμβάλλει στην δημιουργία ριζών υδροξυλίου (OH^\bullet) και να οδηγήσει σε οξείδωση του DNA ή να παράγει προϊόντα νίτρωσης των πρωτεϊνών και απαμίνωσης του DNA (28).

Το ριβοζονουκλεϊκό οξύ (RNA) είναι πιο ευαίσθητο στις οξειδωτικές βλάβες, λόγω της μονόκλωνης φύσης του, της έλλειψης ενεργού επιδιορθωτικού μηχανισμού και της μικρότερης πρωτεϊνικής προστασίας συγκριτικά με το DNA. Η 7, 8-διυδρο-8-οξο-γουανοσίνη (8-οξοG) είναι το πιο μελετημένο προϊόν βλάβης του RNA, όπου τα επίπεδά του είναι αυξημένα σε αρκετές παθολογικές καταστάσεις όπως η νόσος του Alzheimer (29), η αιμοχρωμάτωση (30) και οι μυοπάθειες (31).

Για τη μελέτη της καταστροφής του DNA από διάφορους οξειδωτικούς παράγοντες χρησιμοποιούνται διάφορες τεχνικές, όπως είναι η δοκιμασία

COMET. Η συγκεκριμένη δοκιμασία είναι μια ευέλικτη, απλή και προσαρμόσιμη μέθοδος για τη μέτρηση της βλάβης του DNA και την επιδιόρθωση σε επίπεδο μεμονωμένου κυττάρου. Βασίζεται στην ικανότητα των αρνητικά φορτισμένων θραυσμάτων DNA να έλκονται μέσω γέλης αγαρόζης ως απόκριση σε ένα ηλεκτρικό πεδίο και να εμφανίζονται με την μορφή που προσομοιάζει έναν “κομήτη” (32).

1.3.2 Πρωτεΐνες

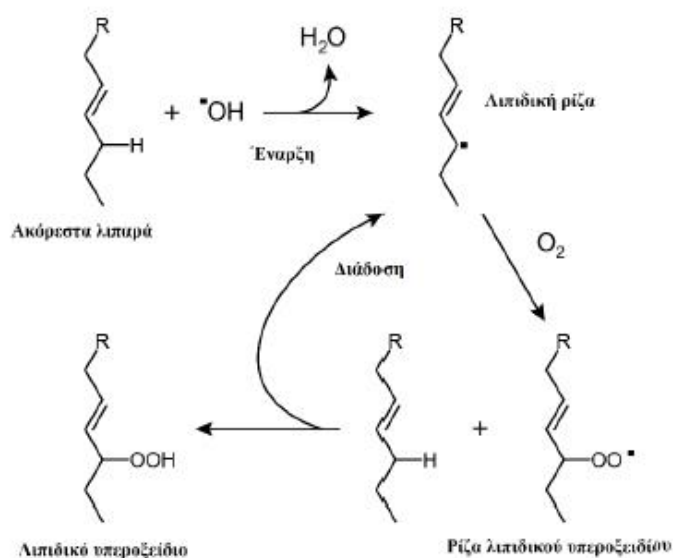
Αντίστοιχα, στις πρωτεΐνες οι ελεύθερες ρίζες είναι υπεύθυνες για δομικές μεταβολές και για την απώλεια ενζυμικής δραστηριότητας (33). Η οξειδωση των πρωτεϊνών μπορεί να προκληθεί από ρίζες ανιόντος σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$), ρίζες υδροξυλίου (OH^{\bullet}), καθώς επίσης και από τα μη ριζικά είδη όπως, υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2), όζον (O_3), και μονήρες οξυγόνο (1O_2). Τα αμινοξέα που είναι πιο ευάλωτα σε οξειδωτικές τροποποιήσεις είναι τα θειούχα αμινοξέα, όπως η μεθειονίνη και η κυστεΐνη (34).

Οι οξειδωτικές βλάβες που προκαλούν οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) στα αμινοξέα των πρωτεϊνών, όπως τη λυσίνη, την προλίνη, τη θρεονίνη και την αργινίνη, έχει ως αποτέλεσμα να παράγουν καρβονύλια. Για τον λόγο αυτό, η παρουσία καρβονυλικών ομάδων στις πρωτεΐνες έχει θεωρηθεί ως δείκτης της οξειδωτικής βλάβης των πρωτεϊνών (35). Ωστόσο, υπάρχουν και άλλοι ειδικοί δείκτες οξειδώσεως πρωτεϊνών όπως, η Ο-τυροσίνη, όπου είναι δείκτης για τη ρίζα υδροξυλίου (OH^{\bullet}) και η 3-νιτροτυροσίνη, όπου είναι δείκτης για ελεύθερες ρίζες του αζώτου (RNS). Τέλος, αυξημένα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων παρατηρούνται σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις όπως ενδεικτικά είναι η νόσος του Αλτσχάιμερ (36), η νόσος του Πάρκινσον (37), η μυϊκή δυστροφία (38) και η ρευματοειδής αρθρίτιδα (39).

1.3.3 Λιπίδια

Τα λιπίδια των μεμβρανών, κυρίως τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα των φωσφολιπιδίων, είναι κι αυτά ευάλωτα στην δράση των ελεύθερων ριζών. Η υπεροξειδωση των λιπιδίων οδηγεί στην απώλεια της λειτουργικότητας της μεμβράνης, καθώς προκαλεί μειωμένη ρευστότητα και απενεργοποίηση μεμβρανικών ενζύμων και υποδοχέων (40). Η οξειδωση προκαλείται, όταν οποιαδήποτε ελεύθερη ρίζα εντοπίζει ένα λιπαρό οξύ (LH) και του αφαιρεί

υδρογόνο από τις ομάδες μεθυλενίου (CH₂), με αποτέλεσμα τον σχηματισμό μιας λιπιδικής ρίζας (L•). Η λιπιδική ρίζα μπορεί να αντιδράσει με το μοριακό οξυγόνο για να σχηματίσει μία λιπιδική υπεροξειδική ρίζα (LOO•) (Εικόνα 5). Η συγκεκριμένη ρίζα υφίσταται αναδιάταξη μέσω αντίδρασης κυκλοποίησης για να πραγματοποιηθεί ο σχηματισμός των ενδοπεροξειδίων, τα οποία τελικά οδηγούν στον σχηματισμό της μηλονικής αλδεΐδης (MDA) και της 4-υδροξυλενενάλης (4-HNA). Τα συγκεκριμένα προϊόντα που προκύπτουν αποτελούν δείκτες υπεροξείδωσης λιπιδίων που προκαλούν βλάβη στο DNA και στις πρωτεΐνες (41). Η λιπιδική υπεροξειδική ρίζα (LOO•) είναι ικανή να μεταφέρει περαιτέρω τη διαδικασία υπεροξείδωσης με την αφαίρεση ατόμων υδρογόνου από άλλα λιπιδικά μόρια.

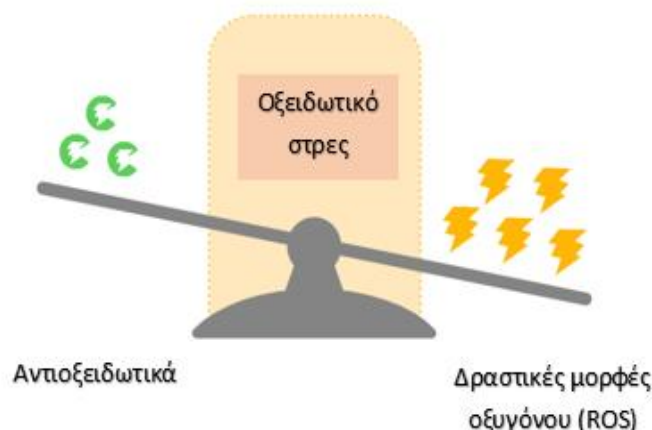


Εικόνα 5: Μετατροπή λιπιδίων σε ρίζες (42)

1.4 Οξειδωτικό Στρες

Η διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ του σχηματισμού και της απομάκρυνσης δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) πρέπει να υφίσταται σε κάθε βιολογικό σύστημα. Ωστόσο, όταν δημιουργηθεί μια δυσαναλογία μεταξύ των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) και του αντιοξειδωτικού μηχανισμού του οργανισμού σε βάρους του δεύτερου, τότε παρουσιάζεται το φαινόμενο του οξειδωτικού στρες (43) (Εικόνα 6). Το συγκεκριμένο φαινόμενο, έχει ως αποτέλεσμα να δημιουργεί μια άνιση σχέση προ-οξειδωτικής και αντιοξειδωτικής ισορροπίας, η οποία προκαλεί μια σειρά δομικών και

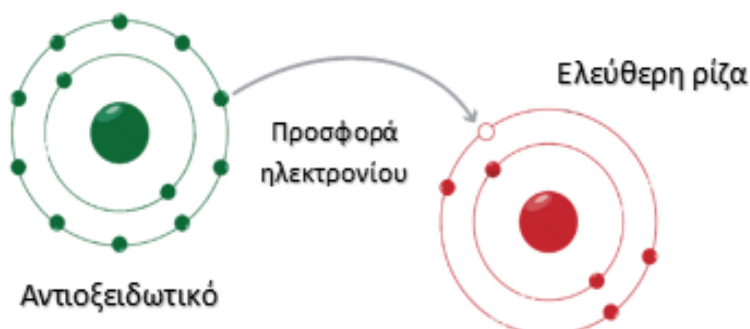
λειτουργικών κυτταρικών αλλαγών που είναι ικανές να οδηγήσουν το κύτταρο σε απόπτωση ή σε νέκρωση (44). Γενικά, το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκληθεί είτε από μειωμένη δράση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών, που ίσως να οφείλονται σε τοξικούς και παθολογικούς παράγοντες, είτε από αυξημένη παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) (45).



Εικόνα 6: Δημιουργία οξειδωτικού στρες (46)

1.5 Αντιοξειδωτικά

Ως αντιοξειδωτική ορίζεται κάθε ουσία που σε χαμηλές συγκεντρώσεις είναι ικανή να καθυστερεί σημαντικά ή να αποτρέπει την οξείδωση ενός υποστρώματος (47). Ακόμη, τα αντιοξειδωτικά έχουν την ικανότητα να προσφέρουν στις ελεύθερες ρίζες το ηλεκτρόνιο ή το μόριο υδρογόνου που τους λείπει, και με αυτόν τον τρόπο είτε να εμποδίζουν τη δράση τους, είτε να συμβάλλουν στην ενεργοποίηση των ενδογενών αμυντικών συστημάτων του οργανισμού (Εικόνα 7).



Εικόνα 7: Δράση μιας αντιοξειδωτικής ουσίας (48)

1.6 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Γενικά, ο ρόλος των αντιοξειδωτικών είναι να εξουδετερώνουν την περίσσεια των ελεύθερων ριζών, να παρέχουν προστασία στα κύτταρα από τις τοξικές τους επιδράσεις καθώς και να συμβάλλουν στην πρόληψη των ασθενειών (49). Τα κύτταρα για να αντισταθμίσουν το οξειδωτικό στρες διαθέτουν μηχανισμούς οι οποίοι είτε σχηματίζονται φυσικά (ενδογενή αντιοξειδωτικά), είτε προέρχονται εξωτερικά μέσω της τροφής (εξωγενή αντιοξειδωτικά). Ειδικότερα, τα ενδογενή αντιοξειδωτικά διακρίνονται σε ενζυμικά και μη ενζυμικά, με τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά να υποδιαιρούνται σε μεταβολικά και θρεπτικά.

Τα αντιοξειδωτικά ένζυμα είναι η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση (CAT), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) και η αναγωγή της γλουταθειόνης (GSR).

Μερικά από τα μεταβολικά αντιοξειδωτικά, που ανήκουν στα ενδογενή αντιοξειδωτικά, καθώς παράγονται από το μεταβολισμό στον οργανισμό μας είναι το λιποϊκό οξύ, η γλουταθειόνη, η ουβικινόνη (συνένζυμο Q10), η μελατονίνη, το ουρικό οξύ, η χολερυθρίνη, οι χηλικές πρωτεΐνες μετάλλων, η τρανσφερίνη κ.α. Ενώ, τα θρεπτικά αντιοξειδωτικά, που ανήκουν στα εξωγενή αντιοξειδωτικά, είναι ενώσεις που δεν μπορούν να παραχθούν στο σώμα και τις προσλαμβάνουμε μέσω τροφίμων ή και συμπληρωμάτων όπως η βιταμίνη E, η βιταμίνη C, τα καροτενοειδή, τα ιχνοστοιχεία (σελήνιο, μαγγάνιο, ψευδάργυρος), τα φλαβονοειδή, τα ωμέγα-3 και 6 λιπαρά οξέα (50).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

2.1 Γενικά

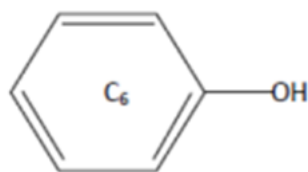
Οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν τη μεγαλύτερη ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών, με κύρια παρουσία στα φυτά. Ο όρος "πολυφαινόλες" είναι ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος όρος για την περιγραφή των φυτικών φαινολικών ενώσεων. Ωστόσο, ο συγκεκριμένος όρος επαναπροσδιορίστηκε ως δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών που προέρχονται από την πρόδρομη ένωση του σικιμικού οξέος. Η συγκεκριμένη ένωση προκύπτει από τα μονοπάτια φαινυπροπανοειδών και/ή των πολυκετιδικών, που χαρακτηρίζονται από περισσότερους από έναν φαινολικούς δακτυλίους και στερούνται οποιασδήποτε λειτουργικής ομάδας αζώτου στην βασική τους δομή (51).

Αντίστοιχα, ο όρος βιοφαινόλες που χρησιμοποιήθηκε μετέπειτα αποτελεί μια πληρέστερη και χημικά ακριβή έκφραση για να προσδιορίσει τις φυτικές φαινόλες από τις απλές φαινόλες μέχρι και τα πολύπλοκα πολυμερή μόρια (51). Ως εκ τούτου, ως βιοφαινόλες ορίζονται οι φαινολικές ενώσεις που απομονώνονται από φυτικούς ιστούς ή προϊόντα και διαθέτουν βιολογικές ή/και φαρμακολογικές ιδιότητες. Η προέλευσή τους είναι από τα μονοπάτια του σικιμικού - φαινυλοπροπανοειδών και/ή πολυκετιδίων, συμπεριλαμβανομένων των παραγώγων τους, των συζευγμάτων τους, των προϊόντων αποδόμησης και των μεταβολιτών τους. Επομένως, οι βιοφαινόλες γίνονται ένας όρος "ομπρέλα" που αντιπροσωπεύει όλα τα φαινολικά μόρια που έχουν φυσική προέλευση (52).

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι, η μεσογειακή διατροφή είναι γνωστή για τα οφέλη που προσφέρει στον οργανισμό, ιδιαίτερα λόγω της μεγάλης ποσότητας φαινολικών συστατικών που υπάρχουν στα φρούτα, στα φυτά, στα λαχανικά καθώς και στο ελαιόλαδο. Ειδικά, τα τελευταία χρόνια οι φαινολικές ενώσεις έχουν βρεθεί στο επίκεντρο του ερευνητικού ενδιαφέροντος εξαιτίας των ποικίλων εφαρμογών τους στην ανθρώπινη ζωή.

2.2 Δομή και Κατηγορίες πολυφαινολών

Οι φαινολικές ενώσεις χαρακτηρίζονται από τουλάχιστον έναν αρωματικό δακτύλιο (C6) που φέρει μία ή περισσότερες ομάδες υδροξυλίου (Εικόνα 8).



Εικόνα 8: Δομή φαινόλης

Πάνω από 8.000 φαινολικές ενώσεις έχουν ταυτοποιηθεί σε διάφορα φυτικά είδη. Όλες οι φυτικές φαινολικές ενώσεις προκύπτουν από ένα κοινό ενδιάμεσο, την φαινυλαανίνη ή το πρόδρομο μόριο του σικιμικού οξέος. Εμφανίζονται σε συζευγμένες μορφές, με ένα ή περισσότερες ομάδες σακχάρων συνδεδεμένα είτε σε ομάδες υδροξυλίου του βασικού σκελετού είτε άμεσα συνδεδεμένα σε αρωματικό άνθρακα. Οπότε, μπορούν να προκύψουν C-O ή C-C μονοσακχαρίτες ή πολυσακχαρίτες. Ακόμη, συχνή είναι η σύνδεση και με άλλες ενώσεις, όπως τα φαινολικά οξέα, αμίνες, λιπίδια και άλλες φαινόλες (53).

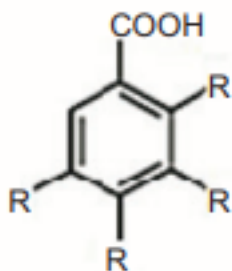
Ως κύριες κατηγορίες αναφέρονται τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή, τα στιλβένια και τα λιγνάνια (54). Οι κύριες διατροφικές πηγές τους είναι το κόκκινο κρασί, τα φρούτα, τα λαχανικά, η μαύρη σοκολάτα, το ελαιόλαδο, το τσάι και οι ξηροί καρποί (55) (Εικόνα 9).



Εικόνα 9: Κατηγορίες φαινολικών ενώσεων και οι διατροφικές πηγές τους

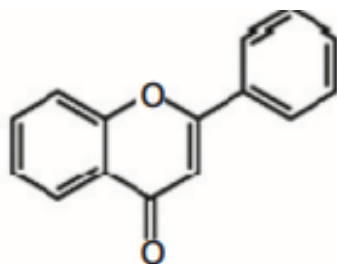
Συγκεκριμένα, τα φαινολικά οξέα (Εικόνα 10) υποδιαιρούνται περαιτέρω σε υδροξυβενζοϊκά και υδροξυκιναμικά οξέα. Αφορούν περίπου το 1/3 των βιοφαινολικών ενώσεων στη διατροφή μας και απαντώνται σε όλες τις φυτικές

τροφές. Ωστόσο, είναι ιδιαίτερα άφθονα σε φρούτα με όξινη γεύση. Μερικά κοινά φαινολικά οξέα είναι το καφεϊκό οξύ, το γαλλικό οξύ και το φερουλικό οξύ.



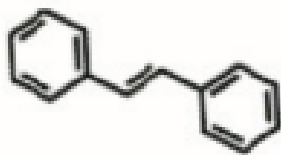
Εικόνα 10: Φαινολικό οξύ

Τα φλαβονοειδή είναι οι επικρατέστερες 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 ετεροκυκλικό δακτύλιο. Ο πρώτος αρωματικός δακτύλιος συνήθως προκύπτει από ένα μόριο ρεσορκινόλης και ο δεύτερος δακτύλιος προέρχεται από το μονοπάτι του σικιμικού (Εικόνα 11). Έχουν εντοπιστεί πάνω από 4.000 είδη φλαβονοειδών πολλά από τα οποία ευθύνονται για τους χρωματισμούς των λουλουδιών, των φρούτων και των φύλλων (56). Ακόμη, τα φλαβονοειδή χωρίζονται σε υποομάδες όπως είναι οι ανθοκυανίνες, φλαβόνες, φλαβονόνες, διϋδροφλαβονόλες, χαλκόνες, φλαβονόλες, φλαβάνες, προανθοκυανίνες και ισοφλαβονοειδή.



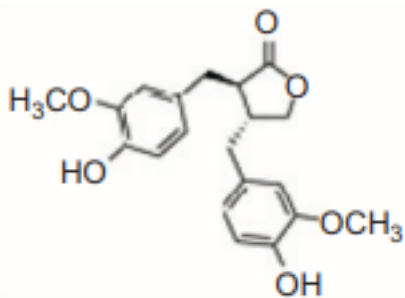
Εικόνα 11: Φλαβονοειδή

Τα στιλβένια με πιο χαρακτηριστικό τη ρεσβερατρόλη, περιέχουν δύο φαινυλ-ομάδες που συνδέονται με μια γέφυρα αιθυλενίου (Εικόνα 12). Στα φυτά δρουν ως αντιμυκητιακές ενώσεις και φυτοαλεξίνες που συντίθενται μόνο ως αντίδραση σε λοίμωξη ή σε τραυματισμό.



Εικόνα 12: Στιλβένια

Τέλος, τα λιγνάνια είναι δι-φαινολικές ενώσεις που περιέχουν τη δομή 2,3-διβενζυλοβουτανίου, το οποίο σχηματίζεται με διμερισμό δύο ομάδων κινναμωμικού οξέος (57) (Εικόνα 13).



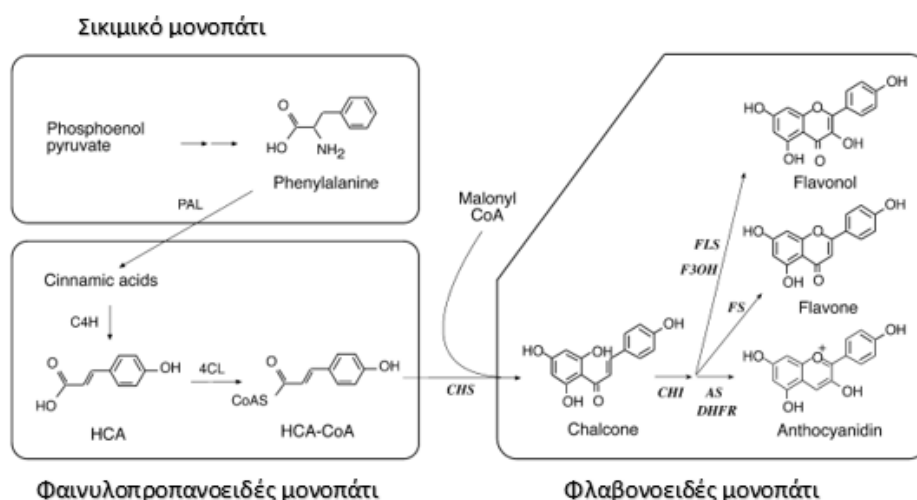
Εικόνα 13: Λιγνάνια

2.3 Βιοσύνθεση φυτοφαινολών

Τα υδροξυκινναμικά οξέα (Hydroxycinnamic Acids, HCAs) και τα φλαβονοειδή έχουν τους βασικούς σκελετούς άνθρακα C6-C3 και C6-C3-C6, αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, τα HCAs και τα φλαβονοειδή παράγονται από την φαινυλαλανίνη, μέσω της οδού του σικιμικού, της γενικής οδού φαινυλοπροπανοειδών και της ειδικής οδού των φλαβονοειδών.

Σύμφωνα με το διάγραμμα της βιοσυνθετικής οδού φυτοφαινολών (Εικόνα 14) παρατηρούμε το εξής: Τα HCAs και τα φλαβονοειδή προέρχονται από το κινναμικό οξύ, το οποίο σχηματίζεται από φαινυλαλανίνη μέσω της αμμωνιακής λυάσης της φαινυλαλανίνης (Phenylalanine Ammonia Lyase, PAL). Αντίστοιχα, το κινναμικό οξύ τροποποιείται σε HCAs από την κινναμωμική-4-υδροξυλάση (C4H) και την ο-μεθυλτρανσφεράση. Το ένζυμο 4-κουμαρικό CoA λιγάση (4CL) καταλύει το σχηματισμό του υδροξυκινναμικό CoA (HCA-CoA) και τα ενεργοποιημένα μόρια χρησιμοποιούνται για τη βιοσύνθεση των φλαβονοειδών και της λιγνίνης. Η σύνθεση των φλαβονοειδών ξεκινά με τη συμπύκνωση του HCAs-CoA και τριών μορίων μηλονικού CoA, τα οποία καταλύονται από τη συνθάση της χαλκόνης (CHS). Συγκεκριμένα, η χαλκόνη μετατρέπεται

περαιτέρω σε άλλες υποομάδες φλαβονοειδών, μεταξύ των φλαβονών, φλαβονόλης και ανθοκυανίνης μέσω της ισομεράσης της χαλκόνης (Chalcone Isomerase, CHI), της 3-υδροξυλάσης φλαβανόνης (Flavonone 3-hydroxylase, F3OH), της συνθετάσης της ισοφλαβόνης (Isoflavone Synthetase, ISF), της συνθάσης φλαβόνου (Flavonoid Synthase, FS), της συνθάσης φλαβονόλης (Flavonol Synthase, FLS), της διϋδροφολικής αναγωγάσης (Dihydrofolate Reductase, DHFR) και τέλος μέσω της συνθάσης της ανθοκυανίνης (Anthocyanin Synthase, AS) (57).



Εικόνα 14: Βιοσυνθετική οδός φυτοφαινολών (57)

Γενικά, τα φλαβονοειδή συσσωρεύονται στα επιδερμικά κύτταρα των φυτικών οργάνων όπως λουλούδια, φύλλα, ρίζες, σπόροι και φρούτα. Εντοπίζονται σε γλυκοσιδικές μορφές (γλυκοσίδες) και μη γλυκοσιδικές μορφές (άγλυκα). Όσον αφορά τον υποκυτταρικό εντοπισμό των γλυκοσιδών περιορίζεται κυρίως σε υδρόφιλες περιοχές, όπως τα κενοτόπια και οι αποπλάστες. Ωστόσο, έχουν βρεθεί σε χλωροπλάστες και ετιοπλάστες. Αντίθετα, οι άγλυκες μορφές έχει αναφερθεί ότι εντοπίζονται σε λιπόφιλες περιοχές όπως αδένες ελαίων και κηρώδη στρώματα (57).

2.4 Βιολογική δράση πολυφαινολών

Η συσσώρευση φαινολών στα φυτά μπορεί να είναι αποτέλεσμα της επίδρασης τόσο αβιοτικών όσο και βιοτικών παραγόντων, που έχουν ως αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή ελεύθερων ριζών εντός των κυττάρων.

Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, οι παραγόμενες φαινόλες στα φυτά να δρουν προστατευτικά έναντι του στρες που προκαλείται. Ενδεικτικά παραδείγματα στρεσογόνων παραγόντων είναι η υπεριώδης ακτινοβολία, η υψηλή ηλιοφάνεια, οι χαμηλές θερμοκρασίες, οι τραυματισμοί, τα χαμηλά θρεπτικά συστατικά και οι παθογόνοι μικροοργανισμοί (58).

Η πηγή προέλευσης των φαινολών στον άνθρωπο είναι η διατροφή, με την κατανάλωση τροφίμων και ποτών που είναι πλούσια σε φαινόλες, προσδίδοντας έτσι την αντιοξειδωτική δράση. Πολλές είναι οι επιδημιολογικές μελέτες που έχουν αναδείξει την πολύτιμη σημασία της διατροφής σε φαινόλες για την αντιμετώπιση χρόνιων ασθενειών (59). Η συγκεκριμένη αντιοξειδωτική ικανότητα μπορεί να δικαιολογηθεί είτε από την παρουσία αναγωγικών βιοφαινολών, είτε από την επίδρασή τους στην απορρόφηση των προοξειδωτικών συστατικών των τροφίμων, όπως αυτού του σιδήρου (Fe) (60). Ακόμη, υπάρχουν μελέτες οι οποίες έχουν δείξει ότι ορισμένες φαινολικές ενώσεις μπορούν να διασχίσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και να ασκήσουν βιολογικές επιδράσεις στο ΚΝΣ (61).

Παράλληλα, έχουν πραγματοποιηθεί περαιτέρω μελέτες που αναδεικνύουν την δράση των φαινολικών ενώσεων ως προς την προστασία του DNA. Για παράδειγμα σε μια μελέτη, χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα από το φυτό *Rosa canina* που είναι πλούσιο σε φαινολικές ενώσεις. Αποδείχθηκε ότι, είχε ισχυρή δράση έναντι των ελεύθερων ριζών, ανέστειλε τη βλάβη του DNA που προκαλείται από τις δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και βελτίωσε την οξειδοαναγωγική κατάσταση στα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα μειώνοντας τα επίπεδα των ROS και αυξάνοντας τα επίπεδα της γλουταθειόνης (GSH) (62). Αντίστοιχα, έχει αποδειχθεί η προστατευτική δράση των πολυφαινολών του τσαγιού έναντι του οξειδωτικού στρες και της βλάβης του DNA. Ως εκ τούτου, η έρευνα υποστήριξε την υπόθεση ότι το τσάι που είναι πλούσιο σε φαινολικές ενώσεις μπορεί να αποτρέψει αποτελεσματικά τη νευροτοξικότητα και τη νευροεκφυλιστική νόσο που προκαλείται από την μεθαμφεταμίνη (63).

Βάσει ερευνών, για να επιτευχθεί η καλύτερη βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών γίνεται ενθυλάκωση ενός εκχυλίσματος πλούσιο σε φαινολικές ενώσεις με μαλτοδεξτρίνη. Για παράδειγμα, σε μια μελέτη έγινε ενθυλάκωση ενός πολυφαινολικού εκχυλίσματος από υγρά απόβλητα ελαιολιβερού με μαλτοδεξτρίνη και πρωτεΐνη ορού γάλακτος (64). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι

και οι δύο ενθουλακώσεις ήταν αποτελεσματικές ως προς την αντιοξειδωτική δράση, ωστόσο τα δείγματα που ήταν ενθουλακωμένα με την πρωτεΐνη ορού γάλακτος έδειξαν καλύτερη αντιοξειδωτική δράση σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (εντός του εύρους θερμοκρασίας που χρησιμοποιήθηκε 100 – 160 °C). Ωστόσο, γενικά τα ενθουλακωμένα εκχυλίσματα από υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου παρέχουν προστασία από τη βλάβη του DNA που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες (64).

Επιπλέον, οι φαινολικές ενώσεις από εκχυλίσματα ελαιολάδου με διαφορετική πολυφαινολική σύνθεση και συγκεκριμένα όσον αφορά την υδροξυτυροσόλη (HT) και την τυροσόλη (T) έχει αποδειχθεί, ότι έχουν την ικανότητα να προστατεύουν τις βλάβες του DNA που προκαλούνται από την ρίζα υπεροξειδίου ($ROO\cdot$) (65).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΕΛΙΑ

3.1 Ιστορία

Η ελιά (*Olea europaea*) είναι ένα από τα παλαιότερα, δημοφιλή και καλλιεργήσιμα δέντρα στο κόσμο που αναπτύσσεται κυρίως στο εύκρατο κλίμα των χωρών της λεκάνης της Μεσογείου, συμπεριλαμβανομένης και της Ελλάδας. Δύο από τις πιο αντιπροσωπευτικές τροφές της παραδοσιακής μεσογειακής διατροφής είναι το ελαιόλαδο και οι επιτραπέζιες ελιές (65). Η Ελλάδα είναι η τρίτη ελαιοπαραγωγός χώρα στην Ευρώπη με ποσοστό που αγγίζει το 13% μετά την Ιταλία με 15% και την Ισπανία με 66% (66).

Από τους αρχαίους χρόνους η καλλιέργεια της ελιάς συνέβαλε στην οικονομία, στην υγεία και στην διατροφή των κατοίκων της Μεσογείου. Η εμφάνιση της ελιάς χρονολογείται για πάνω από 5000 χρόνια και η προέλευσή της είναι η περιοχή που τότε αναφερόταν Αρχαία Περσία και Μεσοποταμία, καθώς στην συνέχεια εξαπλώθηκε στις περιοχές της Συρίας και της Παλαιστίνης (67). Έπειτα, οι τότε κάτοικοι εκείνης τη περιοχής ασχολήθηκαν και ανέπτυξαν την καλλιέργεια της ελιάς όπου στην πορεία τη μετέφεραν στη Βόρεια Αφρική. Ωστόσο, υπάρχει μια θεωρία που υποστηρίζει ότι το ελαιόδεντρο ήρθε από την Αφρική καθώς οι αρχαίοι Αιγύπτιοι ήταν αυτοί που το καλλιεργούσαν (67). Στην συνέχεια, λέγεται ότι αυτοί που ήταν υπεύθυνοι για τη διάδοση του ελαιόδεντρου και στα άλλα μέρη της λεκάνης της Μεσογείου ήταν οι Φοίνικες μέσω του θαλάσσιου εμπορίου.

Στα ελληνικά νησιά, τη Λιβύη και τη Καρχηδόνα έφτασε τον 28^ο αιώνα π.Χ., (68), καθώς στην Ελλάδα και συγκεκριμένα στο νησί της Κρήτης, η καλλιέργεια της ελιάς εντοπίζεται περίπου το 3000 π.Χ. Είναι γνωστό ότι, για περισσότερα από 2000 χρόνια, η ελιά παρουσιάζεται στην ιστορία και στους μύθους ως σύμβολο ειρήνης, γονιμότητας και χαράς. Για αυτόν ακριβώς τον λόγο, οι πρωταθλητές των Ολυμπιακών Αγώνων στέφονταν με ένα στεφάνι που ήταν κατασκευασμένο από κλαδιά ελιάς.

Γενικά, σε όλη την ιστορία του πολιτισμού η ελιά υπήρξε αναμφισβήτητα μια σημαντική διατροφική και φαρμακευτική πηγή, καθώς μάλιστα το 1854 έγινε η πρώτη επίσημη αναφορά φαρμακευτικής χρήσης της, η οποία ανέφερε πως το εκχύλισμα από τα φύλλα ελιάς ήταν αποτελεσματικά στην θεραπεία έναντι του πυρετού και της ελονοσίας (69).

3.2 Χρήσεις φύλλων ελιάς στην αρχαιότητα

Από την αρχαιότητα ακόμη η χρήση των φύλλων της ελιάς στην ανθρώπινη ζωή ήταν αρκετά διαδεδομένη. Για παράδειγμα, οι Αιγύπτιοι τα χρησιμοποιούσαν για την ταρίχευση των Φαραώ ως ισχυρό μικροβιοκτόνο, οι λαοί της Μεσογείου θεωρούσαν το χυμό από τα φύλλα της ελιάς ως φυσικό γιατρικό, ενώ στις αρχές του 18ου αιώνα τα φύλλα ελιάς πολτοποιούνταν και αναμιγνύονταν με υγρά για την αντιμετώπιση του πυρετού και της ελονοσίας (69). Άλλοι λαοί τα χρησιμοποιούσαν για τη σταθεροποίηση των επιπέδων σακχάρου, ενώ έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως ως φάρμακο για πολλές χιλιάδες χρόνια στην ευρωπαϊκή Μεσόγειο. Ακόμη, τα φύλλα ελιάς λαμβάνονταν από το στόμα για το στομάχι και ασθένειες του εντέρου, καθώς επίσης χρησιμοποιούνταν και ως καθαριστικό στο στόμα. Ακόμη, το αφέψημα των ξηρών φύλλων λαμβάνονταν για την θεραπεία των λοιμώξεων του αναπνευστικού και του ουροποιητικού συστήματος (70).

3.3 Μορφολογία ελιάς

Πρόκειται για ένα αειθαλές, καρποφόρο δέντρο που μπορεί να είναι είτε ορθόκλαδο, είτε πλαγιόκλαδο και φέρει κορμούς με τρεις ή περισσότερους βραχίονες και αυτοί με τη σειρά τους φέρουν βλαστούς, στους οποίους εμφανίζονται τα φύλλα, τα άνθη και οι καρποί (71) (Εικόνα 15).



Εικόνα 15: Ελαιόδεντρο

3.3.1 Φύλλα ελιάς

Τα φύλλα της ελιάς είναι στενόμακρα σαν λόγχες και λεπτά. Το χρώμα τους είναι βαθύ πράσινο στην επάνω πλευρά και ανοικτό γκριζο στην κάτω,

ενώ παρατηρείται αλλαγή σχήματος ανάλογα με την ποικιλία από στενόμακρα σε λογχοειδή (Εικόνα 16). Η διάρκεια ζωή τους είναι 2-3 χρόνια και η πτώση τους συνήθως γίνεται την άνοιξη. Η επάνω επιφάνεια καλύπτεται με χυτίνη ενώ η κάτω επιφάνεια φέρει τρίχες που την προστατεύουν από την αφυδάτωση. Επίσης, η ιδιαιτερότητα της κατασκευής των φύλλων της ελιάς της προσφέρει τη δυνατότητα να ευδοκιμεί σε ξηρές και θερμές συνθήκες. Στις συνθήκες αυτές μπορεί να πραγματοποιηθεί πτώση των φύλλων και καρπού, να εμφανιστούν συμπτώματα έντονου μαρασμού, αλλά το δένδρο να μην ξεραθεί (71).



Εικόνα 16: Φύλλα ελιάς και καρπός

3.3.2 Καρπός

Οι καρποί της ελιάς έχουν διαφορετικές διαστάσεις και σχήματα ανάλογα με την ποικιλία (Εικόνα 18). Κατά την διάρκεια της ωρίμανσης ο καρπός διαφοροποιείται, δηλαδή το χρώμα του από πράσινο γίνεται καφέ - κόκκινο και καταλήγει σε μαύρο. Στο εσωτερικό του έχει τον πυρήνα που είναι πολύ σκληρός και προστατεύει ένα μόνο σπέρμα. Η στυφή γεύση του καρπού οφείλεται στις ταννίνες καθώς όταν έρθουν σε επαφή με το σίδηρο προσδίνουν αυτό το χαρακτηριστικό μελανό χρώμα. Τέλος, το ποσοστό του λαδιού στον καρπό της ελιάς αυξάνει προοδευτικά από τον Αύγουστο μέχρι και τον Ιανουάριο, εκτός από ορισμένες ποικιλίες και περιοχές που μπορεί μερικώς να παραταθεί (71).



Εικόνα 18: Κορωνέικη ποικιλία (αριστερά) και Κονσερβολιά (Αμφίσσης) ποικιλία (δεξιά)

3.4 Ποικιλίες ελιάς

Οι ποικιλίες της ελιάς χωρίζονται ανάλογα με το μέγεθος του καρπού και συγκεκριμένα σε μικρόκαρπες (1.2 – 2.6 gr), μεσόκαρπες (2.7 - 4.2 gr) και μεγαλόκαρπες (4.3 – 10.5 gr) (71). Ακόμη, χωρίζονται με βάση την χρήση τους, δηλαδή σε εκείνες που προορίζονται για ελαιοποίηση (ελαιόλαδο) και σε εκείνες που προορίζονται για επιτραπέζιες (ή κονσερβοποίηση ή αλλιώς οι βρώσιμες). Συγκεκριμένα, οι ποικιλίες που έχουν μεγάλο καρπό (μεγαλόκαρπες) συνήθως έχουν μέτρια γεύση αλλά μεγάλη εμπορική αξία. Αντίθετα, οι ποικιλίες μεσαίου μεγέθους (μεσόκαρπες) είναι πιο εύγευστες ωστόσο έχουν κι εκείνες σημαντική εμπορική αξία.

Όσον αφορά τον παραγωγό, ιδιαίτερη σημασία έχουν κάποια κριτήρια για τις ποικιλίες της ελιάς. Όπως για παράδειγμα, η παραγωγικότητά τους, δηλαδή η απόδοσή τους σε λάδι, σε τι βαθμό είναι σταθερή η ποικιλία στην καρποφορία της, εάν είναι πρώιμη ή όψιμη (συνήθως προτιμάται η πρώιμη), και η ανθεκτικότητα του δένδρου σε ασθένειες. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2) παρατηρούμε διάφορα χαρακτηριστικά από διάφορες ποικιλίες ελιών, καθώς και μια εικόνα (Εικόνα 19) που απεικονίζει συνοπτικά τις ποικιλίες της ελιάς αλλά και σε ποιες περιοχές ευδοκιμούν (71).

Πίνακας 2: Χαρακτηριστικά ποικιλιών ελιάς στην Ελλάδα

Ποικιλία	Περιοχή	Αντοχή στην ξηρασία	Αντοχή στο ψύχος	Μέγεθος καρπού

Κορωνέικη (Κρητικιά)	Νότια Ελλάδα και νησιά	Αντοχή	Μέτρια	Μικρόκαρπες
Λιανολιά	Βορειοδυτική Ελλάδα	Μέτρια	Αντοχή	Μικρόκαρπες
Μαστοειδής (Τσουνάτη)	Λακωνία, Αρκαδία	Μέτρια	Αντοχή	Μικρόκαρπες
Θρουμπολιά	Θάσος, Χίος, Αττική, Κυκλάδες, Εύβοια, Δωδεκάνησα, Κρήτη, Σάμος	Δεν αντέχει	Αντοχή	Μεσόκαρπες
Κονσερβολι ά (Αμφίσησης)	Αιτωλοακαρνανία, Φωκίδα, Άρτα, Φθιώτιδα, Μαγνησία, Λάρισα, Αχαΐα	Αντοχή	Αντοχή	Μεγαλόκαρπες
Καρυδολιά (Χαλκιδικής)	Χαλκιδική, Φθιώτιδα, Αττική, Εύβοια	Μέτρια	Αντοχή	Μεγαλόκαρπες
Καλαμών	Μεσσηνία, Αιτωλοακαρνανία, Λακωνία, Φθιώτιδα	Δεν αντέχει	Αντοχή	Μεγαλόκαρπες
Κολυμπάδα	Αττική, Κυκλάδες, Μεσσηνία, Εύβοια	Αντοχή	Δεν αντέχει	Μεγαλόκαρπες



Εικόνα 19: Ποικιλίες ελιάς στην Ελλάδα

Γνωστό είναι ότι, όλες οι ποικιλίες των ελιών είναι πλούσιες σε πολυφαινόλες. Ωστόσο, αξιοσημείωτο παράδειγμα είναι πως το ελαιόλαδο που λαμβάνεται από την ποικιλία Κορωνέικη είναι πλούσιο σε πολυφαινόλες που προσφέρουν υψηλή σταθερότητα και εξαιρετικά οφέλη για την υγεία, μοναδική γεύση και άρωμα καθώς και μεγάλη διάρκεια ζωής σε σύγκριση με άλλες ποικιλίες (72). Παράλληλα, βάση μιας μελέτης που πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία από τις ποικιλίες ελιών Καλαμών, Κορωνέικη, Κονσερβολιά (Αμφίσσης) και Μαστοειδής (Τσουνάτη) παρατηρήθηκε ότι, προσδίδουν αντιοξειδωτική δράση με κύρια την ποικιλία Μαστοειδής (Τσουνάτη). Ακόμη, υψηλότερη συγκέντρωση τυροσόλης και ελαιοευρωπαΐνης παρουσίασε η ποικιλία Καλαμών (73).

3.5. Καλλιέργεια ελιάς

Η ζώνη καλλιέργειας της ελιάς χαρακτηρίζεται από την υποτροπική και την εύκρατη. Σε χαμηλότερα πλάτη και συγκεκριμένα κοντά στον Ισημερινό, η ελιά αναπτύσσεται μόνο βλαστικά. Σημαντικός παράγοντας, αλλά και ο πιο καθοριστικός, για την καλλιέργεια της ελιάς είναι η θερμοκρασία. Οι περιοχές

στις οποίες αναπτύσσεται χαρακτηρίζονται από μέση ετήσια θερμοκρασία 15°C - 20°C. Η μέγιστη θερμοκρασία μπορεί να αγγίξει τους 40°C χωρίς να προκαλέσει επιζήμιες καταστροφές στο δέντρο και η μέση ελάχιστη θερμοκρασία δεν πρέπει να πέσει κάτω από τους -7°C. Ωστόσο, στην περίπτωση σταδιακής πτώσης της θερμοκρασίας η ελιά μπορεί να αντέξει για μικρό χρονικό διάστημα μέχρι και τους -10°C (74).

Όσον αφορά την βλάστηση, η θερμοκρασία πρέπει να κυμαίνεται περίπου στους 11°C. Οι ιδανικές θερμοκρασίες κατά τη διάρκεια της άνθησης θα πρέπει να είναι 18°C με 20°C και κατά την καρπόδεση 20°C με 22°C. Συνεπώς, η ελιά απαιτεί ευνοϊκές θερμοκρασίες την άνοιξη και το καλοκαίρι για να είναι ικανή αναπτύξει νέα βλάστηση ώστε να γίνει η καρπόδεση και στην συνέχεια η ωρίμανση του καρπού. Ωστόσο, οι υψηλές θερμοκρασίες και οι ξηροί άνεμοι επιβραδύνουν τη βλάστηση, επιδρούν στο σχηματισμό των ανθών, την ωρίμανση καθώς και την ανάπτυξη του καρπού (74).

Η υψηλή υγρασία στην ατμόσφαιρα ευνοεί την εμφάνιση ασθενειών, ενώ κατά την διάρκεια της ανθοφορίας φαίνεται να ελαττώνει σημαντικά τη καρπόδεση. Ακόμη, οι ομίχλες όταν συνοδεύονται με υψηλές θερμοκρασίες παρεμποδίζουν την γονιμοποίηση και την καρπόδεση, καθώς ευνοούν τις προσβολές από μύκητες και έντομα. Από την άλλη, οι ισχυροί άνεμοι προκαλούν ζημιές στην ελιά καθώς οι θερμοί άνεμοι του καλοκαιριού προκαλούν πτώση των καρπών (74).

Γενικά, για τον τύπο εδάφους, η ελιά φυτρώνει στις περισσότερες κατηγορίες εδαφών. Εξάριση αποτελούν τα εδάφη που κατακρατούν υγρασία ή τα εδάφη με $6.5 < pH < 8.5$ καθώς τα πολύ όξινα εδάφη δεν είναι ιδανικά. Συγκεκριμένα, ευδοκιμεί σε εδάφη με καλή περιεκτικότητα σε ασβέστιο καθώς και καλή εξασφάλιση αποθεμάτων νερού.

Η ελιά αν και θεωρείται σχετικά ανθεκτική στη ξηρασία, υπό αρδεύμενες συνθήκες φαίνεται ότι η ποιότητα των προϊόντων είναι καλύτερη καθώς και η παραγωγή υψηλότερη (74). Δηλαδή, έχει θετική επίδραση στην άνθιση, βελτιώνει την καρπόδεση και ενισχύει την ανάπτυξη των καρπών. Κατά την διάρκεια των μηνών Ιανουάριο και Φεβρουάριο, η ελιά έχει ιδιαίτερα υψηλές απαιτήσεις σε νερό καθώς τότε πραγματοποιείται η διαφοροποίηση των ανθοφόρων οφθαλμών. Επιπλέον, αυξημένες είναι οι ανάγκες τους μήνες Απρίλιο - Μάιο, όπου λαμβάνει χώρα η άνθιση και η καρπόδεση της ελιάς και

τον μήνα Ιούνιο όπου πραγματοποιείται η σκλήρυνση του πυρήνα. Τέλος, κατά τους θερμούς μήνες η άρδευση της ελιάς περιορίζει την συρρίκνωση του καρπού που μερικές φορές μπορεί να οδηγήσει σε πτώση αυτού.

3.6. Βιομηχανική επεξεργασία ελιάς

Η βιομηχανική επεξεργασία της ελιάς οδηγεί στην παραγωγή α) ελαιολάδου και επιτραπέζιων ελιών, που είναι τα κύρια εμπορεύσιμα προϊόντα ελαιοτριβείου (75) καθώς και στην παραγωγή β) υποπροϊόντων όπου, αποτελούνται από τα φύλλα και τα κλαδιά της ελιάς, τα υγρά και τα στερεά απόβλητα καθώς και το υγρό από το ξεπίκρισμα των βρώσιμων ελιών. Τα συγκεκριμένα υποπροϊόντα θα αναλυθούν εκτενέστερα στο Κεφάλαιο 4.

Οι βιοδραστικές ιδιότητες των προϊόντων και υποπροϊόντων της ελιάς που βασίζονται στις φαινολικές ενώσεις, εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τις συνθήκες επεξεργασίας (75).

3.6.1 Διαδικασία παραγωγής βρώσιμων ελιών

Οι επιτραπέζιες ελιές είναι μια σημαντική τροφή που έχει υποστεί ζύμωση και αποτελεί μέρος του βασικού κλάδου παραγωγής τροφίμων καθώς παράγεται από την ελιά (*Olea europaea*), ένα είδος που καλλιεργείται με επιτυχία σε όλες τις μεσογειακές χώρες. Συγκεκριμένα, ο ελαιόκαρπος που έχει έντονη πικρή και στυφή γεύση, η οποία προέρχεται από την φαινολική ένωση της ελαιοευρωπαϊνης, υπόκειται σε μια σειρά από μετασχηματισμούς μέσω ζύμωσης, που τον καθιστούν βρώσιμο, σταθερό και ασφαλή (76). Οι περισσότερες διεργασίες ζύμωσης επιτραπέζιων ελιών επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από την ποικιλία, την μικροχλωρίδα (77) και από παράγοντες της διεργασίας, όπως την θερμοκρασία ζύμωσης και την συγκέντρωση αλατιού στην άλμη (78). Είναι ευρέως αποδεκτό ότι η κύρια μικροχλωρίδα που είναι υπεύθυνη για τις ζυμώσεις της επιτραπέζιας ελιάς είναι τα μέλη των βακτηρίων γαλακτικού οξέος [*Lactic Acid Bacteria*, (LAB)] και συγκεκριμένα ο *Lactobacillus* spp. και οι ζυμομύκητες (79).

Το πρώτο βήμα επεξεργασίας του ελαιόκαρπου προς κατανάλωση είναι το ξεπίκρισμα. Διάφορες μέθοδοι χρησιμοποιούνται παγκοσμίως για το ξεπίκρισμα των ελιών, ωστόσο οι πιο διαδεδομένες είναι οι Φυσικές

επιτραπέζιες ελιές ή Ελληνικός τύπος (Natural or Greek type), ο Ισπανικός τύπος (Spanish type) και ο Καλιφορνέζικος τύπος (California type) (80).

3.6.1.1 Φυσικές επιτραπέζιες ελιές ή Ελληνικός τύπος (Natural or Greek type)

Στις μεσογειακές χώρες βάση του ελληνικού τύπου, χρησιμοποιούνται ελαιόκαρποι κοντά στην πλήρη ωρίμανση, δηλαδή μωβ - μαύρου χρώματος. Οι ελαιόκαρποι πλένονται και τοποθετούνται σε διάλυμα άλμης (8–10% w/v NaCl) (81), όπου κατά την επεξεργασία με βάση την άλμη, οι φαινολικές ενώσεις που προσδίδουν την πικρή γεύση στην ελιά απομακρύνονται με διάχυση από τον καρπό. Συγκεκριμένα, η υδρόλυση επιτυγχάνεται με την ενζυμική δράση, της β-γλυκοσιδάσης και της εστεράσης από τη μικροχλωρίδα που υπάρχει στην άλμη ή στην επιφάνεια του ελαιόκαρπου. Ωστόσο, ενώ οι φαινολικές ενώσεις διαχέονται έξω από τον ελαιόκαρπο, το αλάτι από την άλμη διαχέεται μέσα, αλλάζοντας τα χημικά και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος (82).

Γενικά, η ελαιοευρωπαϊνή, ο λιγκστροσίδης και οι σχετικές πικρές φαινολικές ενώσεις μπορούν να μειωθούν στις επιτραπέζιες ελιές μέσω πολλών διαφορετικών μηχανισμών. Ισχυρά οξέα ή βάσεις μπορούν να δεισδύσουν απευθείας στη σάρκα της ελιάς, όπου τα ελεύθερα ιόντα H⁺ και OH⁻ καταλύουν την υδρόλυση της ελαιοευρωπαϊνής και του λιγκστροσίδη στην εστερική ομάδα που συνδέει την υδροξυτυροσόλη / τυροσόλη. Αυτή η αντίδραση υδρόλυσης παράγει τα μη πικρά προϊόντα όπου είναι, ο ελαιοσιδικός μεθυλεστέρας και η υδροξυτυροσόλη / τυροσόλη (83).

Η ζύμωση προκαλείται από την μικροχλωρίδα που υπάρχει στους ελαιόκαρπους, και πρόκειται για ζωντανές καλλιέργειες βακτηρίων γαλακτικού οξέος με προβιοτικά οφέλη για την ανθρώπινη υγεία (84). Αυτή η μέθοδος διαρκεί 6 - 12 μήνες και μόλις οι ελαιόκαρποι αποκτήσουν το οργανοληπτικό προφίλ που επιθυμεί ο παραγωγός, εκτίθενται για λίγο σε οξυγόνο για να αποκτήσουν την απόχρωση του σκούρου χρώματος μέσω οξειδωσης (85). Η έκθεση αυτήν γίνεται για να διορθωθούν οι απώλειες χρώματος λόγω της διάχυσης των ανθοκυανινών στην άλμη κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.

Όσον αφορά την γεύση του ελαιόκαρπου, επηρεάζεται έντονα από τα προϊόντα ζύμωσης, συμπεριλαμβανομένων των οξέων (π.χ. γαλακτικό, οξικό και προπιονικό οξύ) και των αλκοολών (2-βουτανόλη και αιθανόλη) (86). Οι

φυσικές επιτραπέζιες ελιές συσκευάζονται σε κονσέρβες ή βάζα σε φρέσκο διάλυμα άλμης, ξύδι ή ελαιόλαδο. Συχνά, αυτά τα διαλύματα συσκευασίας αρωματίζονται με την προσθήκη μάραθου, σκόρδου, ρίγανης και άλλων μπαχαρικών (85). Ακόμη, το τελικό pH των ελαιόκαρπων είναι συχνά αρκετά χαμηλό (~pH 4,0), ώστε να μην χρειάζεται να αποστειρωθούν, αν και μπορεί να πραγματοποιηθεί και παστερίωση.

Οι ελαιόκαρποι που επεξεργάζονται με τον Ελληνικό τύπο καταναλώνονται σχεδόν παγκοσμίως. Ορισμένες ελληνικές ποικιλίες που επεξεργάζονται με τον συγκεκριμένο τύπο είναι η Καλαμών (86) και η Κονσερβολιά (Αμφίσσης). Τα πλεονεκτήματα της χρήσης του Ελληνικού τύπου επεξεργασίας είναι τα υψηλότερα επίπεδα φαινολικών ενώσεων που διαθέτουν οι ελαιόκαρποι σε σύγκριση με εκείνους που επεξεργάζονται με τον Ισπανικό τύπο (87). Επιπλέον, τα λύματα του συγκεκριμένου τύπου αγγίζουν το 0.9–1.9 m³/t ελιάς σε σύγκριση με τους τύπους επεξεργασίας του Ισπανικού ή του Καλιφορνέζικου (88), συμβάλλοντας έτσι στην μείωση του περιβαλλοντικού αποτυπώματος.

3.6.1.2 Ισπανικός τύπος (Spanish type)

Ο Ισπανικός τύπος (γνωστός και ως τύπος Σεβίλλης) χρησιμοποιεί ελαιόκαρπους που συλλέγονται στο στάδιο ωρίμανσης πράσινου χρώματος, αντιπροσωπεύοντας περίπου το 60% των επιτραπέζιων ελιών που παράγονται παγκοσμίως (89). Οι ελιές αυτές αρχικά βυθίζονται σε υδροξείδιο του νατρίου (NaOH) για 8-10 ώρες για να υδρολύσουν την ελαιοευρωπαϊνή, όπου γίνεται διείσδυση περίπου στα δύο τρίτα έως τα τρία τέταρτα της σάρκας, αφήνοντας μια μικρή περιοχή γύρω από τον ελαιόκαρπο ανεπηρέαστη (90). Κατά τη διάρκεια της αρχικής επεξεργασίας με NaOH, η συγκέντρωση της ελαιοευρωπαϊνης μειώνεται γρήγορα (91). Συγκεκριμένα, το διάλυμα του NaOH διεισδύει στη σάρκα της ελιάς προκαλώντας υδρόληση της ελαιοευρωπαϊνης και του λιγκστροσίδη, παράγοντας μη πικρά προϊόντα υδρόλυσης, όπως την υδροξυτυροσόλη και την τυροσόλη. Παράλληλα, η σάρκα της ελιάς περιέχει ενδογενή ένζυμα, συμπεριλαμβανομένης της β-γλυκοσιδάσης και της εστεράσης που μπορούν να υδρολύσουν την ελαιοευρωπαϊνή στον εστερικό δεσμό μεταξύ γλυκόζης και του τμήματος ελενολικού οξέος ή μεταξύ του τμήματος ελενολικού οξέος και

υδροξυτυροσόλης / τυροσόλης (92). Επίσης, τα ενδογενή ένζυμα υδρολύουν τις φαινολικές ενώσεις μέσα στον καρπό όταν η ελιά είναι ακόμα στο δέντρο ως απόκριση στην ωρίμανση και η υδρόλυση συνεχίζεται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης / επεξεργασίας εκτός κι εάν απενεργοποιηθεί από τη θερμότητα (93).

Στην συνέχεια, οι ελιές ξεπλένονται με νερό (pH 7.0) για να αφαιρεθεί η περίσσεια του υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) και να μειωθεί το pH καθώς έπειτα ζυμώνονται σε άλμη που μπορεί να κυμαίνεται σε συγκέντρωση περίπου 4-5% w/v NaCl (94). Η ζύμωση μπορεί να διαρκέσει από 1-7 μήνες ανάλογα με την ποικιλία της ελιάς (90). Η πλύση με νερό είναι ένα πολύ σημαντικό στάδιο καθώς το NaOH αλλάζει τη σύνθεση των πολυσακχαριτών (95) και δρα ανασταλτικά μαζί με την ελαιοευρωπαϊνή και τις άλλες φαινολικές ενώσεις στην ανάπτυξη επιθυμητών βακτηριακών πληθυσμών.

Όσον αφορά την γεύση των ελαιόκαρπων, επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από την παρουσία οργανικών οξέων (π.χ. γαλακτικού, οξικού και προπιονικού) και αλκοολών που σχηματίζονται κατά τη ζύμωση (86). Οι κύριες φαινολικές ενώσεις στην άλμη κατά τον Ισπανικό τύπο είναι η υδροξυτυροσόλη, ο γλυκοσίδης του ελενολικού οξέος και η τυροσόλη (91). Το τελικό προϊόν κονσερβοποιείται σε άλμη ή σε διάλυμα οξέος που μπορεί να περιέχει πρόσθετους αρωματικούς παράγοντες, με το τελικό pH να είναι συχνά αρκετά χαμηλό (pH~4.0) ώστε να μην χρειάζεται να αποστειρωθούν, αν και μπορεί να πραγματοποιηθεί και παστερίωση.

Οι ελαιόκαρποι που επεξεργάζονται με αυτήν τη μέθοδο συχνά καταστρέφονται και το εσωτερικό αντικαθίσταται με μια φέτα αμυγδάλου, ή σκόρδου, καθώς τοποθετούνται σε κονσέρβες ή γυάλινα βάζα με άλμη (5–7% NaCl). Οι κοινές ποικιλίες ελιάς του Ισπανικού τύπου περιλαμβάνουν τις Manzanilla, Hojiblanca, Gordal, Cerignola και Belice (96).

Ο Ισπανικός τύπος επεξεργασίας είναι σημαντικά ταχύτερος από τον Ελληνικό τύπο (1–7 μήνες έναντι 6–12 μηνών), και το τελικό προϊόν είναι σταθερό στην υφή και στο πράσινο χρώμα. Ακόμη, όπως ο Ελληνικός τύπος, έτσι και ο Ισπανικός διαθέτει ζωντανά στελέχη προβιοτικών ευεργετικά για την ανθρώπινη υγεία. Τέλος, τα λύματα σε σύγκριση με του Ελληνικού τύπου είναι αρκετά περισσότερα και συγκεκριμένα 3.9– 7.5 m³/τόνο ελιάς (97).

3.6.1.3 Καλιφορνέζικος τύπος (*California type*)

Βάση του Καλιφορνέζικου τύπου, οι ελαιόκαρποι συλλέγονται στο στάδιο ωρίμανσης του πράσινου ή κίτρινου χρώματος και αποθηκεύονται σε άλμη για 3-12 μήνες. Κατά την αποθήκευση με άλμη, η ζύμωση μπορεί να συμβεί μέσω της ανάπτυξης ζυμομυκήτων και βακτηρίων γαλακτικού οξέος και η περιεκτικότητα σε φαινολικές ουσίες των ελιών μπορεί να μειωθεί μέσω παθητικής διάχυσης. Η ζύμωση δεν είναι απαραίτητη για τη δημιουργία αυτών των ελιών, καθώς η κύρια δράση γίνεται με τη χρήση υδροξειδίου του νατρίου NaOH (98). Συγκεκριμένα, οι ελαιόκαρποι επεξεργάζονται με υδροξείδιο του νατρίου (NaOH) για αρκετές ώρες, 3-4 φορές (99), καθώς κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας το NaOH διεισδύει στην σάρκα της ελιάς υδrolύοντας τα φαινολικά συστατικά του ελαιόκαρπου με αποτέλεσμα να χάνεται η πικρή γεύση (ξεπίκρισμα).

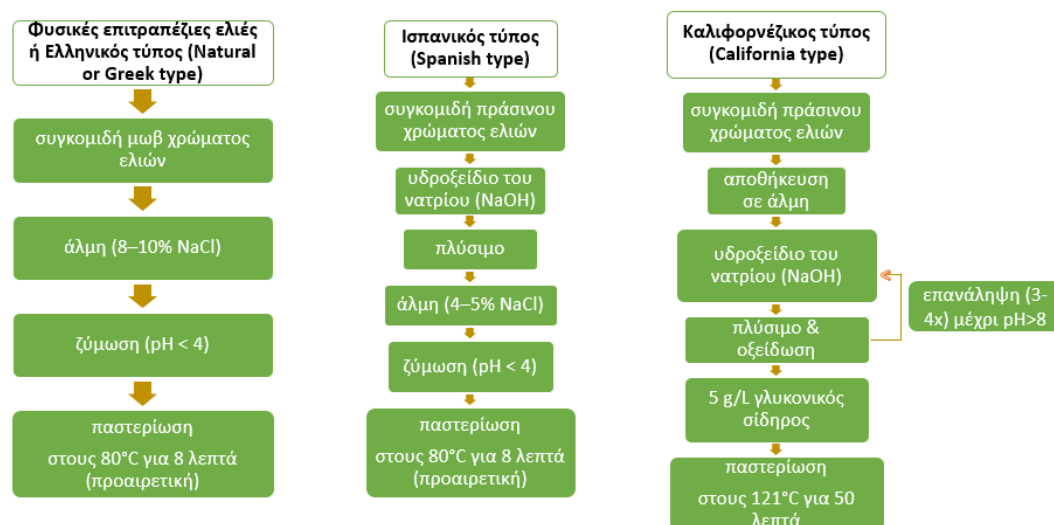
Μετά την επεξεργασία με NaOH, οι ελαιόκαρποι βυθίζονται σε νερό και οξειδώνονται με έγχυση πεπιεσμένου αέρα, δηλαδή το οξυγόνο διοχετεύεται μέσα από το νερό (85). Κατά τη διάρκεια της οξειδωσης, οι ελιές σκουραίνουν και γίνονται καφέ καθώς πολυμερίζονται οι φαινολικές ενώσεις (κυρίως υδροξυτυροσόλη) στην σάρκα του ελαιόκαρπου (100). Στην συνέχεια, οι καφέ χρώματος οξειδωμένοι ελαιόκαρποι χρωματίζονται με την προσθήκη γλυκονικού σιδήρου, ο οποίος συμπλέκεται με την ένωση της υδροξυτυροσόλης (86) και προσδίδει στον καρπό μαύρο χρώμα.

Το τελικό προϊόν συσκευάζεται σε κονσέρβες ή γυάλινα βάζα με άλμη ή όξινο διάλυμα με pH το οποίο κυμαίνεται μεταξύ του 5.8 και 7.9. Σύμφωνα με τους κανονισμούς του Food and Drug Administration (FDA), οι ελιές του Καλιφορνέζικου τύπου πρέπει να αποστειρώνονται στους 115.6°C για 60 λεπτά ή στους 121.1°C για 50 λεπτά για να αποτραπεί η ανάπτυξη παθογόνων βακτηρίων (98). Η γεύση αλλά και η υφή διαφέρει αρκετά σε σύγκριση με του Ελληνικού και Ισπανικού τύπου. Όσον αφορά τα φαινολικά επίπεδα, ο Καλιφορνέζικος τύπος παράγει επιτραπέζιες ελιές με χαμηλότερα επίπεδα φαινολικών ενώσεων και τα λύματα του αγγίζουν το 8.0 m³/τόνο ελιάς (101).

Παρακάτω παρουσιάζεται πίνακας (Πίνακας 3) που συγκρίνει τις παραμέτρους επεξεργασίας των τριών τύπων και διάγραμμα που απεικονίζει τα στάδια επεξεργασίας ανά τύπο (Εικόνα 20) .

Πίνακας 3: Σύγκριση παραμέτρων επεξεργασίας Φυσικές επιτραπέζιες ελιές ή Ελληνικός τύπος (Natural or Greek type), ο Ισπανικός τύπος (Spanish type) και ο Καλιφορνέζικος τύπος (California type).

Παράμετροι	Φυσικές επιτραπέζιες ελιές ή Ελληνικός τύπος (Natural or Greek type)	Ισπανικός τύπος (Spanish type)	Καλιφορνέζικος τύπος (California type)
Νωπός ελαιόκαρπος	μωβ – μαύρου χρώματος	πράσινου χρώματος	πράσινου – κίτρινου χρώματος
Μηχανισμός ξεπικρίσματος	Διάχυση	Βασική υδρόλυση + διάχυση	Βασική υδρόλυση
Χρόνος ξεπικρίσματος	6 – 12 μήνες	1 – 7 μήνες	1 εβδομάδα
Τελικό χρώμα ελαιόκαρπου	Μωβ ή σκούρο καφέ	Πράσινο ή ανοιχτό κίτρινο	Μαύρο (τεχνητό)
Λύματα ανά τόνο ελιάς	0.9 – 1.9 m ³ /t	3.9 – 7.5 m ³ /t	8.0 m ³ /t



Εικόνα 20: Διάγραμμα μεθόδων επεξεργασίας: Φυσικές επιτραπέζιες ελιές ή Ελληνικός τύπος (Natural or Greek type), ο Ισπανικός τύπος (Spanish type) και ο Καλιφορνέζικος τύπος (California type).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΥΠΟΠΡΟΪΟΝΤΑ ΕΛΙΑΣ

4.1 Υποπροϊόντα από την καλλιέργεια και την βιομηχανική επεξεργασία της ελιάς

Ετησίως λαμβάνεται ένας αρκετά μεγάλος αριθμός υποπροϊόντων, που προέρχονται τόσο από την καλλιέργεια της ελιάς όσο και από τη βιομηχανική επεξεργασία της ελιάς, εκ των οποίων τα περισσότερα από αυτά δεν έχουν πρακτική εφαρμογή (65). Συγκεκριμένα, τα υποπροϊόντα που προέρχονται από την καλλιέργεια είναι τα φύλλα ελιάς, τα κλαδιά καθώς και οι ελαιόκαρποι. Αντίστοιχα, από την βιομηχανική επεξεργασία της ελιάς τα υποπροϊόντα που προκύπτουν είναι τα φύλλα ελιάς, τα κλαδιά, τα υγρά απόβλητα (λύματα ελαιοτριβείου), τα στερεά απόβλητα (ελαιοπυρήνας) καθώς και το υγρό από το ξεπίκρισμα του ελαιόκαρπου. Ωστόσο, όπως ήδη έχει αναφερθεί τα εμπορεύσιμα προϊόντα είναι το ελαιόλαδο και οι επιτραπέζιες ελιές (75) (Εικόνα 22).



Εικόνα 22: Πηγές προέλευσης υποπροϊόντων ελιάς

4.2 Τα φύλλα ελιάς ως υποπροϊόντα καλλιέργειας και επεξεργασίας

Αρχικά, τα φύλλα της ελιάς συλλέγονται τόσο κατά το κλάδεμα των ελαιόδεντρων, όσο και κατά την συγκομιδή και τον καθαρισμό των ελαιόκαρπων πριν από την εξαγωγή λαδιού στη μονάδα επεξεργασίας, όπου αντιπροσωπεύουν το 10% του βάρους των ελιών (102). Πιο συγκεκριμένα, μεγάλη συσσώρευση φύλλων ελιάς παρατηρείται κατά το κλάδεμα των δέντρων σε αγροκτήματα (103). Βάση μελετών, έχει υπολογιστεί ότι το κλάδεμα παράγει

25 κιλά υποπροϊόντα (κλαδιά και φύλλα) ανά δέντρο ετησίως. Ένα τυπικό κλάδεμα ελιάς περιλαμβάνει φύλλα (περίπου 25% κατά βάρος), λεπτά κλαδιά (περίπου 50% κατά βάρος) και χοντρά κλαδιά ή ξύλο (περίπου 25% κατά βάρος) (104). Όμως, οι συγκεκριμένες αναλογίες μπορεί να διαφέρουν ανάλογα με τις συνθήκες καλλιέργειας, την ηλικία του δέντρου αλλά και την παραγωγή και πρακτική κλαδέματος.

Η “μοίρα” των φύλλων της ελιάς είναι συνήθως να καίγονται ή να αλέθονται μαζί με τα υπόλοιπα υποπροϊόντα κλαδέματος της ελιάς. Αυτό έχει ως συνέπεια να σηματοδοτεί ένα δυσμενές περιβαλλοντικό αποτύπωμα, καθώς και μια σπατάλη του πόρου. Το γεγονός αυτό προκάλεσε ιδιαίτερα το ενδιαφέρον στον επιστημονικό χώρο. Έτσι, τα φύλλα ελιάς που αποτελούν ένα άφθονο φυτικό υλικό ήταν η πηγή ερευνών που ανέδειξε την πλούσια σύστασή τους σε φαινολικές ενώσεις (105).

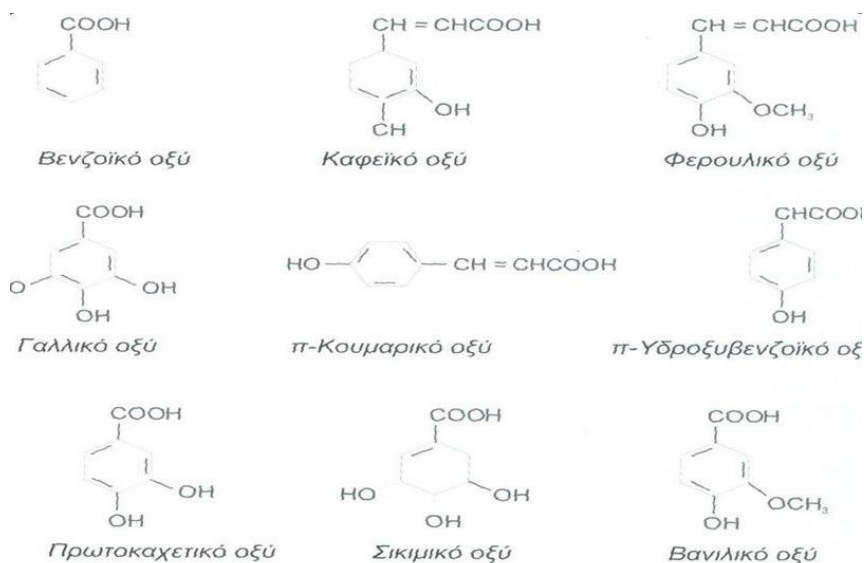
Η σημαντική ανάδειξη της ωφέλιμης επίδρασης εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς στην υγεία των καταναλωτών, σε συνδυασμό με το ότι παρατείνουν και τη διάρκεια ζωής των προϊόντων διατροφής (106) έχει κινήσει το ενδιαφέρον στη βιομηχανία, όπως στις φαρμακευτικές εταιρείες και των τροφίμων. Επομένως, σήμερα είμαστε αρκετά εξοικειωμένοι με τα εμπορικά προϊόντα φύλλων ελιάς που είναι διαθέσιμα σε μορφή φαρμακευτικών σκευασμάτων, συμπληρωμάτων διατροφής, σε μορφή δισκίων, φακέλων τσαγιού ακόμη και εκχυλισμάτων.

4.2.1 Φαινολικές ενώσεις στα φύλλα ελιάς

Οι σημαντικότερες κατηγορίες φαινολικών ενώσεων στα φύλλα της ελιάς είναι τα φαινολικά οξέα, οι φαινολικές αλκοόλες [η υδροξυτυροσόλη (3,4-διϋδροξυφαίνυλο αιθανόλη), η τυροσόλη (4-υδροξυφαίνυλο αιθανόλη)], τα φλαβονοειδή (7-Ο γλυκοσίδα λουτεολίνης, ρουτίνη, γονιδίνη 7-Ο- γλυκοσίδα, 4-Ο- γλυκοσίδα λουτεολίνης), ο βερμπασκοσίδης που είναι παράγωγο του καφεϊκού οξέος και τα σεκοϊριδοειδή (ελαιοευρωπαϊνή). Ωστόσο, τα δύο σημαντικότερα φαινολικά παράγωγα είναι η ελαιοευρωπαϊνή και η υδροξυτυροσόλη, καθώς είναι ευρέως γνωστά ως τα κυριότερα συστατικά στα φύλλα ελιάς (107).

4.2.1.1 Φαινολικά οξέα

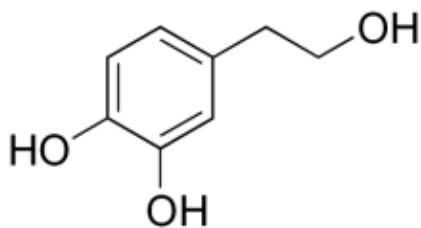
Με τον όρο φαινολικά οξέα προσδιορίζονται οι φαινόλες που φέρουν ένα καρβοξύλιο και τα παράγωγά τους (σικιμικό οξύ, βανιλικό οξύ, γαλλικό οξύ, καφεϊκό οξύ, φερουλικό οξύ, βενζοϊκό οξύ, ο-κουμαρικό οξύ, πρωτοκατεχικό οξύ, p-υδροξυβενζοϊκό οξύ) (Εικόνα 23). Σχετίζονται κυρίως με τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των φυτών (γεύση, άρωμα) και με τις αντιοξειδωτικές ιδιότητές τους (108). Συμμετέχουν στις λειτουργικές διαδικασίες του φυτού όπως της φωτοσύνθεσης και της θρέψης, σε ενζυμικές αντιδράσεις καθώς αποτελούν και δομικό υλικό των λιγνάνιων. Μέσα στο φυτό, η συγκέντρωσή τους ποικίλει ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες που βρίσκεται αλλά και το στάδιο ανάπτυξης του φυτού. Συναντώνται σε μορφή εστέρων, αιθέρων ή γλυκοσίδων και μόνο ένα μικρό ποσοστό σε ελεύθερη μορφή.



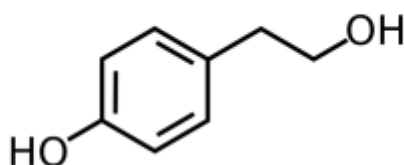
Εικόνα 23: Χημικές δομές φαινολικών οξέων και παράγωγων αυτών

4.2.1.2 Φαινολικές αλκοόλες

Οι φαινολικές αλκοόλες χαρακτηρίζονται από μία ομάδα υδροξυλίου ενωμένη με μία φαινόλη. Στην ομάδα αυτή ανήκουν η υδροξυτυροσόλη και η τυροσόλη.



Εικόνα 24: Υδροξυτυροσόλη

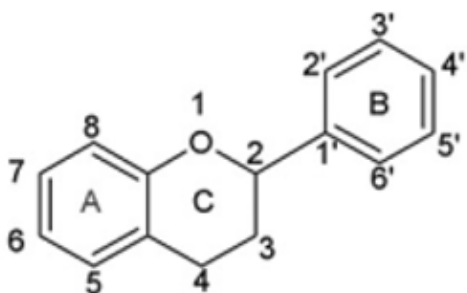


Εικόνα 25: Τυροσόλη

Η υδροξυτυροσόλη και η τυροσόλη είναι φαινολικά φυτοχημικά που βρίσκονται στα φύλλα της ελιάς και στον καρπό της, και θεωρούνται τα πιο φυσικά αντιοξειδωτικά συστατικά που βρίσκονται σε αυτήν. Η υδροξυτυροσόλη είναι υπεύθυνη για την έντονη γεύση και άρωμα του λαδιού αφού αποτελεί πρόδρομο της ελαιοευρωπαΐνης. Ακόμη, η χημική δομή της όπως φαίνεται στην (Εικόνα 24) διαφέρει από την τυροσόλη (Εικόνα 25) κατά μία επιπλέον υδροξυλομάδα (OH) στο δακτύλιο βενζολίου της. Το χαρακτηριστικό αυτό αυξάνει την αντιοξειδωτική της δράση αλλά και την αποτελεσματικότητά της υπό συνθήκες στρες. Οι ενώσεις αυτές χαρακτηρίζονται και για τις αντιμικροβιακές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητές τους (109).

4.2.1.3 Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι η πιο καλά μελετημένη κατηγορία φαινολικών ενώσεων. Περιλαμβάνει περισσότερες από 6000 ενώσεις και βρίσκονται σε αφθονία σε φρούτα, λαχανικά και ορισμένα ποτά. Τα φλαβονοειδή είναι φυσικές χρωστικές που σχηματίζουν ένα σκελετό που περιλαμβάνει δύο αρωματικούς δακτύλιους A και B (Εικόνα 26), οι οποίοι είναι συνδεδεμένοι μεταξύ τους με ένα ετεροκυκλικό δακτύλιο διαφορετικού βαθμού οξείδωσης.



Εικόνα 26: Βασική δομή ανθρακικού σκελετού των φλαβονοειδών

Είναι επίσης γνωστό ότι είναι ισχυροί αναστολείς διάφορων ενζύμων, όπως η οξειδάση της ξανθίνης, η κυκλοοξυγενάση, η λιποξυγενάση και η 3-κινάση φωσφοϊνοσιτίδης (110). Τα πιο γνωστά φλαβονοειδή που βρίσκονται στα φύλλα ελιάς είναι η λουτεολίνη, η ρουτίνη, η απιγενίνη καθώς και οι 7-Ο- και 4-Ο-γλυκοζίτες της λουτεολίνης (110). Τέλος, μπορεί να είναι είτε προσχηματισμένα κατά τη φυσιολογική ανάπτυξη των φυτών είτε μερικές φορές επάγονται λόγω μόλυνσης ή έκθεσης σε αντίξοες συνθήκες όπως είναι η υπεριώδης ακτινοβολία.

4.2.1.4 Σεκοϊριδοειδή

Η δομή των σεκοϊροειδών αποτελείται από την παρουσία του ελενολικού οξέος ή παραγώγων του, καθώς η συγκεκριμένη ομάδα είναι από τις επικρατέστερες ενώσεις στα φύλλα της ελιάς. Τα κύρια σεκοϊριδοειδή είναι η ολαιασεΐνη (διαλδεΰδική μορφή του 4 αποκαρβοξυλιωμένου άγλυκου της ελαιοευρωπαΐνης), η ολαιοκανθάλη (διαλδεΰδική μορφή του 4 αποκαρβοξυλιωμένου άγλυκου του λιγκστροσίδη), ο λιγκστροσίδης (εστέρας της τυροσόλης και του ελενολικού οξέος συνδεδεμένο με μία μονάδα γλυκόζης) και το ελενολικό οξύ. Σημειώνεται ότι, η ελαιοευρωπαΐνη δεν είναι πάντοτε το κύριο συστατικό καθώς άλλα συστατικά πλεονεκτούν ποσοτικά στο ελαιόλαδο για παράδειγμα όπως η διαλδεΰδική μορφή του αγλύκου της ολευρωπείνης (ολεασεΐνη) και του λιγστρισίδη (ολεοκανθάλη) η υδροξυτυροσόλη και ορισμένα άλλα φλαβονοειδή (111). Επιπρόσθετα, η ελαιοευρωπαΐνη διαθέτει και αυτήν ευεργετικές ιδιότητες τόσο για το φυτικό ιστό όσο και για τον ανθρώπινο οργανισμό.

4.2.2 Παράγοντες που επηρεάζουν την σύσταση φαινολικών ουσιών στα φύλλα ελιάς

Η περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις στα φύλλα ελιάς τόσο σε ποιοτικό όσο και σε ποσοτικό επίπεδο επηρεάζεται έντονα από διάφορους παράγοντες, με αποτέλεσμα αυτό να οδηγεί σε διαφορετική φαινολική σύσταση (112). Παραδείγματα αυτών είναι η ποικιλία της ελιάς, η γεωγραφική προέλευση, το κλίμα, η άρδευση, το έδαφος, οι διαδικασίες καλλιέργειας, η περίοδος συγκομιδής, οι μέθοδοι ξήρανσης και εκχύλισης καθώς και οι συνθήκες αποθήκευσης αλλά και θερμοκρασίας (113). Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα που αφορούσαν την γεωγραφική προέλευση, αποδείχθηκε ότι τα φύλλα ελιάς που καλλιεργήθηκαν στο βόρειο τμήμα της Τυνησίας περιείχαν υψηλότερη ολική περιεκτικότητα σε φαινολικές ουσίες και υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση συγκριτικά με τα φύλλα ελιάς από τη νότια Τυνησία, υποδηλώνοντας σημαντική επίδραση της περιοχής στην περιεκτικότητά τους σε αντιοξειδωτικά (114). Παράλληλα, η μελέτη που διεξήχθη από τους Bilgin και Sahin (115) έδειξε ότι τα συνολικά επίπεδα φαινολών στα φύλλα ελιάς μειώθηκαν καθώς μειώνεται το γεωγραφικό υψόμετρο. Η κύρια αιτία αυτής της συμπεριφοράς θα μπορούσε να σχετίζεται με τις κλιματικές συνθήκες που αλλάζουν ανάλογα με τη γεωγραφική ζώνη. Πράγματι, οι φαινολικές ενώσεις τείνουν να μειώνονται στα φύλλα των δέντρων που καλλιεργούνται σε θυελλώδη αέρα και ειδικά κοντά στο επίπεδο της θάλασσας και τείνουν να αυξάνονται σε μεγάλο υψόμετρο με χερσαίο και μεσογειακό κλίμα, όπου οι ετήσιες διαφορές θερμοκρασίας είναι πολύ υψηλές.

Παράλληλα, ευρέως έχει μελετηθεί η επίδραση των πολυφαινολών στα φύλλα ελιάς όσον αφορά τον χρόνο δειγματοληψίας. Στην πραγματικότητα, έχει αναφερθεί μια αύξηση της περιεκτικότητας σε φλαβονοειδή (4'-Ο-γλυκοσίδης της λουτεολίνης) την περίοδο της άνοιξης (116), το οποίο θα μπορούσε να συσχετιστεί με τη γενική αύξηση των βιολογικών δραστηριοτήτων κατά την ανανέωση του βλαστικού κύκλου των φύλλων. Επιπλέον, καθοριστικός παράγοντας της συγκέντρωσης ελαιοευρωπαΐνης στα φύλλα ελιάς φαίνεται να είναι η περίοδος δειγματοληψίας, με τον χειμώνα να είναι η περίοδος κατά την οποία παρουσιάστηκε το μέγιστο ποσοστό, καθώς προσφέρει προστασία

έναντι της οξειδωτικής βλάβης που προκαλείται από το ψύχος (117). Επίσης, μια μείωση των συγκεντρώσεων βερμπασκοσίδη και υδροξυτυροσόλη εντοπίστηκε σε φύλλα που η συγκομιδή τους πραγματοποιήθηκε τον μήνα Ιούλιο. Ενδιαφέρον είναι ότι το επίπεδο φαινολών ενώσεων που εξετάστηκαν σε φύλλα ελιάς έξι ποικιλιών που καλλιεργήθηκαν υπό τις ίδιες συνθήκες βρέθηκαν στις υψηλότερες τιμές τους χειμερινούς μήνες (104). Η συγκεκριμένη αύξηση των φαινολικών ενώσεων κατά τους χειμερινούς μήνες θα μπορούσε να σχετίζεται με την αύξηση δραστηριότητας της αμμωνιακής λυάσης της φαινυλαλανίνης (Phenylalanine Ammonia Lyase, PAL). Αυτό το ένζυμο είναι υπεύθυνο για το μονοπάτι του φαινυλοπροπανοειδούς και φαίνεται ότι το κρύο επηρεάζει τη δραστηριότητά του (118). Επιπρόσθετα, σε ένα πείραμα που πραγματοποιήθηκε (119) μια σύγκριση των περιεχομένων σε φλαβονοειδή των φύλλων της ελιάς μεταξύ ελαιόδεντρων που καλλιεργούνται σε θερμοκήπιο και σε υπαίθριο αγρό, έδειξε τη συμμετοχή της λουτεολίνης και της 7-O-γλυκοσίδης της λουτεολίνης στην προστασία από την υπεριώδη ακτινοβολία. Η αύξηση αυτών των φλαβονοειδών ήταν υψηλότερη σε υπαίθρια χωράφια παρά στο θερμοκήπιο, καθώς τα φύλλα ελιάς σε πλήρη ηλιακή ακτινοβολία είχαν σημαντικά μεγαλύτερη συγκέντρωση ελαιοευρωπαΐνης και φλαβονοειδών συγκριτικά με τα φύλλα ελιάς που ήταν σε σκιερό μέρος.

4.2.3 Βιολογική δράση πολυφαινολών φύλλων ελιάς

Ιδιαίτερα αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι πολυάριθμες έρευνες που αφορούν εκχυλίσματα φύλλων ελιάς έχουν αναδείξει την αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή (120), την αντυπερτασική (121), και την αντικαρκινική δράση (122). Ως εκ τούτου, τα πιο αποτελεσματικά προϊόντα φύλλων ελιάς στην αγορά σήμερα παρασκευάζονται απευθείας από φρέσκα φύλλα που παρέχουν όλο το φάσμα των φυσικών βιοφαινολών, συμβάλλοντας έτσι στην προστασία της υγείας(123).

4.2.3.1 Αντιοξειδωτική δράση

Όπως ήδη έχει αναφερθεί, αντιοξειδωτική δράση μιας ουσίας αποτελεί η ικανότητά της να περιορίζει την δράση οξειδωτικών παραγόντων. Μια καλή πηγή αντιοξειδωτικών μέσων είναι τα φύλλα ελιάς. Ο μηχανισμός δράσης τους είναι ο εξής: Αρχικά, παρεμβαίνουν στις αλυσιδωτές αντιδράσεις διάδοσης των

ελευθέρων ριζών, σχηματίζοντας μία σταθερή φαινολική ρίζα και απενεργοποιώντας τις αρχικές ρίζες. Παράλληλα, δεσμεύουν τα μεταλλικά ιόντα τα οποία είναι εκκινητές της οξειδωσης, δημιουργώντας ένα χημικό σύμπλοκο, (124) καθώς συμβάλλουν στην αναγέννηση κι άλλων αντιοξειδωτικών, απαραίτητων για τον ανθρώπινο οργανισμό, όπως για παράδειγμα την α-τοκοφερόλη (Βιταμίνη Ε). Ακόμη, ένα παράδειγμα που αποδεικνύει ότι τα φύλλα ελιάς διαθέτουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, σε σύγκριση με τα υπόλοιπα τμήματα του ελαιόδεντρου είναι η υψηλότερη περιεκτικότητα σε ελαιοευρωπαΐνη, καθώς τα επίπεδά της στο ελαιόλαδο είναι μεταξύ 0,005% και 0,12%, στον ελαιοπυρήνα 0,87% και στα φύλλα ελιάς μεταξύ 1% και 14% (125). Παράλληλα, τα εκχυλίσματα φύλλων ελιάς παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση από τις βιταμίνες C και E, λόγω της πληθώρα φλαβονοειδών που διαθέτουν. Τέλος, μια μελέτη αφορούσε την αλλαγή της αντιοξειδωτικής ικανότητας βάση της ωρίμανσης των φύλλων και απέδειξε ότι τα ώριμα φύλλα έχουν περισσότερη αντιοξειδωτική δράση από τα νεαρά φύλλα (126).

4.2.3.2 Αντικαρκινική δράση

Σύμφωνα με έρευνες, τα φύλλα της ελιάς παρουσιάζουν ισχυρή αντικαρκινική δράση, καθώς πολλοί είναι οι επιστήμονες που υποστηρίζουν ότι η Μεσογειακή διατροφή παρέχει προστασία στον ανθρώπινο οργανισμό έναντι ορισμένων τύπων καρκίνου (127). Αρχικά, οι πολυφαινόλες των φύλλων ελιάς έχουν αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και προστατεύουν το DNA από βλάβες που προκαλούν οι ελεύθερες ρίζες (127). Επίσης, η δομή τους είναι παρόμοια με τα οιστρογόνα και για αυτό το λόγο πιστεύεται ότι μειώνουν το πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη των καρκινικών όγκων που σχετίζονται με τις ορμόνες αυτές (127). Συγκεκριμένα, η ελαιοευρωπαΐνη διαθέτει τη δυνατότητα να αναγνωρίζει τα φυσιολογικά από τα καρκινικά κύτταρα προκαλώντας έτσι απόπτωση μόνο των καρκινικών κυττάρων. Βάση μιας μελέτης, το εκχύλισμα φύλλων ελιάς παρουσίασε επαγωγή της απόπτωσης σε λευχαιμικά κύτταρα (128). Επιπλέον, ακατέργαστο εκχύλισμα φύλλων ελιάς που περιέχει κυρίως ελαιοευρωπαΐνη έχει βρεθεί ότι αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του αδενοκαρκινώματος του μαστού και της ουροδόχου κύστης στον ανθρώπινο οργανισμό (107). Τέλος έχουν αποδειχθεί, ότι οι φαινολικές ενώσεις

συμμετέχουν στην αναστολή του πολλαπλασιασμού καρκινικών κυττάρων του παγκρέατος (129) και του προστάτη (130).

4.2.3.3 Αντιμικροβιακή δράση

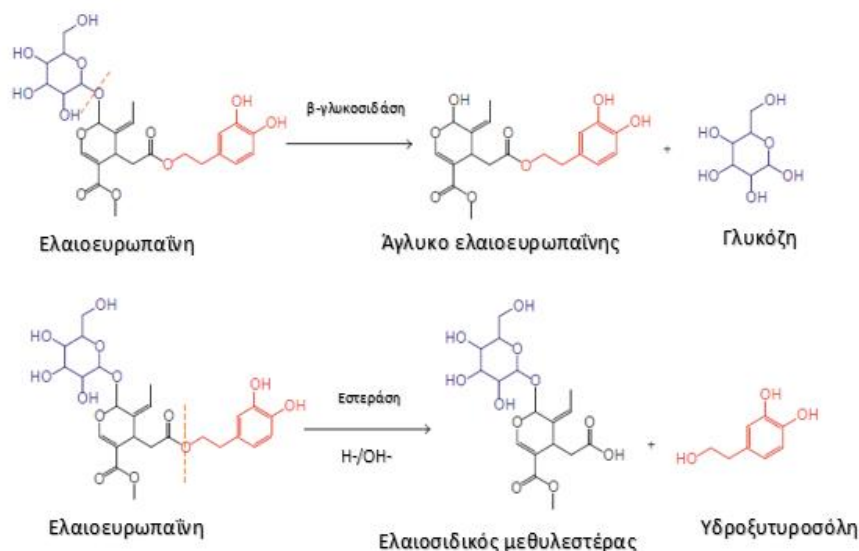
Υποστηρίζεται ότι τα φύλλα ελιάς είναι ικανά να συμβάλλουν στη θεραπεία ενός ευρέος φάσματος μολυσματικών ασθενειών που προκαλούνται από βακτήρια, ιούς, και μύκητες (131). Για παράδειγμα, τα εκχυλίσματα φύλλων ελιάς χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία βακτηριακών λοιμώξεων όπως βρογχίτιδα και αμυγδαλίτιδα, μυκητιάσεις που εμφανίζονται σε κοιλικές λοιμώξεις και ιογενείς λοιμώξεις όπως επιχείλιος έρπης (132). Ειδικά, σε μια *in vitro* μελέτη, η τυροσόλη βρέθηκε να είναι η καλύτερη αντιμυκητιακή ένωση, ακολουθούμενη από την κατεχίνη και την ελαιοευρωπαϊνή (126). Ωστόσο, η ελαιοευρωπαϊνή έχει αποδειχθεί βάσει της αντιμικροβιακής της δράσης ότι αναστέλλει τη δημιουργία σπορίων του *Bacillus cereus* (133) καθώς επίσης δρα έναντι της *Salmonella enteritidis*. Επιπλέον, αποδείχθηκε ότι τα φύλλα της ελιάς ήταν ιδιαίτερα αποτελεσματικά κατά των *Klebsiella* και *Pseudomonas*, δύο βακτηριακών γενών που χαρακτηρίζονται από την έντονη αντοχή τους (134) καθώς είχαν αντιμικροβιακή δράση κατά του *Escherichia coli* και του *Candida albicans*. Ακόμη, έχουν αντιμικροβιακή δράση έναντι τροφιμογενών παθογόνων όπως *Staphylococcus aureus* και *L. monocytogenes* (135). Για παράδειγμα, έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μείωση των βακτηρίων στις γαρίδες και στα βιολογικά φυλλώδη χόρτα (136). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι βελτιώνουν την ποιότητα και τη διάρκεια ζωής των προϊόντων κρέατος (137).

4.3 Ξεπίκρισμα ελιάς

Οι επιτραπέζιες ελιές περιέχουν μια σειρά από βιολογικά ενεργές φαινολικές ενώσεις. Η κυρίαρχη φαινολική ένωση στον καρπό της ελιάς είναι η ελαιοευρωπαϊνή. Αυτή η φαινολική ένωση είναι αρκετά πικρή και πρέπει να απομακρυνθεί για να γίνει ο καρπός της ελιάς πιο εύγευστος. Αυτό επιτυγχάνεται γενικά μέσω ωρίμανσης με αλάτι ή αλκαλικής υδρόλυσης. Τα κύρια προϊόντα υδρόλυσης της ελαιοευρωπαϊνής περιλαμβάνουν την υδροξυτυροσόλη και την τυροσόλη (138).

Κατά την επεξεργασία του ξεπικρίσματος, οι ενώσεις που συμβάλλουν στο πράσινο χρώμα του ελαιόκαρπου μειώνονται (δηλαδή, οι χλωροφύλλες και τα

καροτενοειδή) και οι ενώσεις που συμβάλλουν στο μωβ χρώμα αυξάνονται (δηλαδή, οι ανθοκυανίνες) (139). Καθώς οι ελαιόκαρποι μεταβαίνουν από το πράσινο στο μωβ χρώμα, το κυτταρικό τοίχωμα του καρπού αρχίζει να σπάει, με αποτέλεσμα να μαλακώνει και να απελευθερώνει ενδογενή ένζυμα, όπως β-γλυκοσιδάσες και εστεράσες (87). Τα ενδογενή ένζυμα εντός του καρπού της ελιάς υδρολύουν την ελαιοευρωπαΐνη σε παράγωγες ενώσεις (δηλαδή, άγλυκο ελαιοευρωπαΐνης, υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη, ελαιοσιδικός μεθυλεστέρας ελενολικό οξύ κ.α.) που μπορούν στη συνέχεια υδρολύονται περαιτέρω (140) (Εικόνα 28). Ωστόσο, τόσο οι ζύμες όσο και τα βακτήρια γαλακτικού οξέος μπορεί να διαθέτουν εξωγενή τα ένζυμα β-γλυκοσιδάσες και εστεράσες που μπορούν να υδρολύσουν την ελαιοευρωπαΐνη και άλλες φαινολικές ενώσεις που διαχέονται έξω από τον ελαιόκαρπο, δηλαδή στην άλμη (87).



Εικόνα 27: Μηχανισμός υδρόλυσης της ελαιοευρωπαΐνης στον καρπό του ελαιόκαρπου

Όσον αφορά το ερευνητικό κομμάτι, μεγάλος είναι ο αριθμός των μελετών που έχει δημοσιευθεί σχετικά με την φαινολική σύνθεση του ελαιόκαρπου και των φύλλων του, του ελαιολάδου καθώς και των λυμάτων ελαιοτριβείου. Παρ' όλ' αυτά, δεν υπάρχουν αρκετά δεδομένα που να αφορούν την απομόνωση και την ταυτοποίηση φαινολικών ενώσεων, καθώς και την βιολογική τους δράση από το υγρό ξεπικρίσματος των ελαιόκαρπων. Η ανάκτηση αυτών των φαινολικών ενώσεων, ιδιαίτερα της υδροξυτυροσόλης από το συγκεκριμένο

υγρό, κινεί το ενδιαφέρον, καθώς διαθέτει πολλές υποσχόμενες βιοδραστικές ιδιότητες .

Από τα λίγα στοιχεία που υπάρχουν, μια έρευνα που πραγματοποιήθηκε είχε ως στόχο να διερευνήσει την αντιοξειδωτική ικανότητα της άλμης των επιτραπέζιων ελιών σε διαφορετικά στάδια ωρίμανσης (μαύρη, μωβ και πράσινη). Συγκεκριμένα, ανέδειξε ότι η άλμη που χρησιμοποιήθηκε στο στάδιο της ωρίμανσης όπου η ελιά ήταν μωβ χρώματος περιείχε την υψηλότερη συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων καθώς παρουσίασε υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση σε σύγκριση με την άλμη που χρησιμοποιήθηκε στο στάδιο ωρίμανσης όπου η ελιά είχε πράσινο και μαύρο χρώμα (141). Ακόμη μια μελέτη ανέδειξε ότι, μεταξύ των άλμew που χρησιμοποιήθηκαν για ελαιόκαρπους του πράσινου χρώματος ωρίμανσης και μαύρου χρώματος ωρίμανσης, η κύρια φαινολική ένωση που εντοπίστηκε ήταν η υδροξυτυροσόλη με ποσοστό που κυμαινόταν μεταξύ 64% και 82%, αντίστοιχα (142). Ταυτόχρονα, τα λύματα που προκύπτουν από το ξεπίκρισμα των ελαιόκαρπων, περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις υδροξυτυροσόλης, καθώς αυτή η ένωση αποτελεί το κύριο προϊόν υδρόλυσης της ελαιοευρωπαϊνης (142). Παράλληλα, σημαντική αύξηση της περιεκτικότητας σε τυροσόλη παρατηρήθηκε και στις δύο άλμες μετά το στάδιο της ζύμωσης, λόγω της υδρόλυσης του γλυκοζίτη της τυροσόλης καθώς και της διάχυσης της τυροσόλης από τη σάρκα του ελαιόκαρπου στην άλμη. Τέλος, άλλες φαινολικές ενώσεις που εντοπίστηκαν στις άλμες ήταν το π-κουμαρικό οξύ, το π-υδροξυβενζοϊκό οξύ και το καφεϊκό οξύ (142).

II ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της βιολογικής δράσης εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς από το Δελφικό ελαιώνα, και ξεπικρίσματος ελαιόκαρπου της ποικιλίας Καλαμών σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα. Ειδικότερα, για το σκοπό αυτό έγινε αποτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω του δείκτη λιπιδικής υπεροξειδωσης (Thiobarbituric Acid Reactive Substances, TBARS). Επιπλέον, μελετήθηκε η ικανότητα προστασίας του DNA των κυττάρων, παρουσία των εκχυλισμάτων, από βλάβες στο DNA προκαλούμενες από οξειδωτικό παράγοντα (H_2O_2), με τη δοκιμασία COMET. Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε ήταν ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα (EA.hy926). Απώτερος σκοπός της παρούσας εργασίας, ήταν να διαπιστωθεί κατά πόσο τα εκχυλίσματα φύλλων ελιάς και ξεπικρίσματος ελαιόκαρπου μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη βιομηχανία τροφίμων ως φυσικά συντηρητικά, λόγω των ισχυρών αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων τους, και σε ποια συγκέντρωση ώστε να βελτιώσουν τα θρεπτικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

6.1 Εκχυλίσματα

Τα εκχυλίσματα φύλλων ελιάς προέρχονται από δείγματα του ελαιώνα των Δελφών που ανήκει στον νομό Φωκίδας. Τα εκχυλίσματα ξεπικρίσματος ελαιόκαρπου Καλαμών προέρχονται από δείγματα από τον ίδιο παραγωγό αλλά έχουν συλλεχθεί σε δύο διαφορετικές χρονικές περιόδους. Το ξεπίκρισμα των ελαιόκαρπων έχει γίνει σύμφωνα με τον Ελληνικό τύπο, όπου το υγρό ξεπικρίσματος είναι άλμη. Πρόκειται για τρία πολυφαινολικά εκχυλίσματα υποπροϊόντων ελιάς με κωδικό ονομασίας:

- PO_50 [εκχύλισμα ξεπικρίσματος ελαιόκαρπου Καλαμών] με σύσταση 80 mg υδροξυτυροσόλη (HT) και 30 mg τυροσόλη (T) / g εκχυλίσματος, βερμπασκοσίδης],
- PO_51 [εκχύλισμα ξεπικρίσματος ελαιόκαρπου Καλαμών] με σύσταση 68 mg υδροξυτυροσόλη (HT) και 25 mg τυροσόλη (T) / g εκχυλίσματος, βερμπασκοσίδης]] και
- PO_53 [εκχύλισμα φύλλων ελιάς με σύσταση 147 mg υδροξυτυροσόλη (HT) / g εκχυλίσματος, πλούσιο σε σεκολογανοσίδη)].

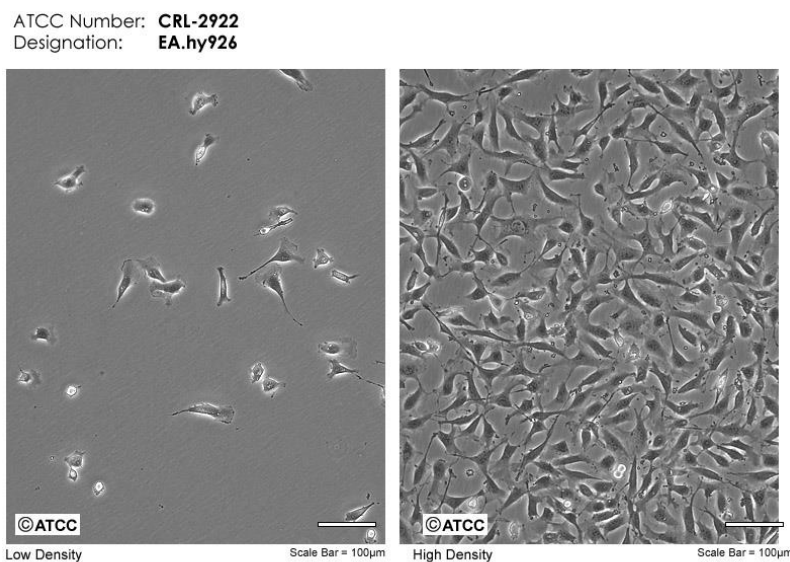
Η παρασκευή των εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε στον Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, του τμήματος Φαρμακευτικής του ΕΚΠΑ ως εξής: το υδατικό εκχύλισμα συμπυκνώνεται μέχρι το περιεχόμενό του σε ολικά στερεά κυμανθεί από 10-15%. Στη συνέχεια, στο συμπυκνωμένο εκχύλισμα προστίθεται μαλτοδεξτρίνη D.E.-12 σε ποσοστό 25-100% επί των ολικών στερεών και ακολουθεί ένα επιπλέον στάδιο επεξεργασίας του που είναι η παραγωγή ξηρής σκόνης εκχυλίσματος με τη διεργασία του αεριοψεκασμού (Spray dryer). Στη συγκεκριμένη διεργασία το εκχύλισμα ψεκάζεται εντός της συσκευής με πίεση 2 bar, θερμοκρασία 150-170°C και ρυθμό 4 Lt/μέρα. Σε αυτό το στάδιο δίδεται μεγάλη έμφαση στον έλεγχο της θερμοκρασίας εξόδου ώστε αυτή να μην πέσει κάτω από τους 80°C διότι, σε αντίθετη περίπτωση, η σκόνη που προκύπτει έχει μεγάλη περιεχόμενη υγρασία με αποτέλεσμα η υφή της να μην είναι κατάλληλη. Η θερμοκρασία ψεκασμού μπορεί να είναι υψηλή αλλά δεν είναι προβληματική για την καταστροφή των δραστικών συστατικών, διότι η θέρμανση λαμβάνει χώρα για πολύ μικρό χρονικό διάστημα (2 με 3 δευτερόλεπτα), χρόνος που δεν είναι

αρκετός για την καταστροφή τους. Τέλος, η σκόνη συλλέγεται σε ειδικό δοχείο συλλογής και είναι έτοιμη προς χρήση.

6.2 Κυτταροκαλλιέργειες

6.2.1 Κυτταρική σειρά

Στην εκπόνηση αυτή της διπλωματικής εργασίας εξετάστηκε η κυτταρική σειρά EA.hy926 (αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα ανθρώπου). Τα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα (EA.hy926) (Εικόνα 29) αποτελούν μια υβριδική σειρά που προέκυψε από την σύντηξη, των ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων ομφαλικής φλέβας (HUVECs) και των ανθρώπινων επιθηλιακών κυττάρων από πνευμονικό καρκίνωμα (A549). Τα EA.hy926, εμφανίζουν λειτουργικά χαρακτηριστικά διαφοροποιημένων ενδοθηλιακών κυττάρων καθώς αποτελούν το εσώτερο μέρος όλων των αγγείων και η επίδραση των ελεύθερων ριζών σε αυτά διαδραματίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο για την εμφάνιση καρδιαγγειακών παθήσεων (143). Επίσης, χρησιμοποιούνται ως ένα *ex vivo* μοντέλο για τον έλεγχο διάφορων φυσιολογικών και παθολογικών διεργασιών, κυρίως στο πεδίο της αγγειογένεσης.



Εικόνα 28: Ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα (EA.hy926) ⁽¹⁴⁴⁾

6.3 Συνθήκες καλλιέργειας

Τα κύτταρα καλλιεργούνταν σε φλάσκες εμβαδού 25 cm², με θρεπτικό υλικό 1g/L γλυκόζη Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), το οποίο

εμπεριείχε ορό εμβρύου βοοειδών (FBS, 10% v/v) και 100 U/ml διάλυμα στρεπτομυκίνης/πενικιλίνης, σε κλίβανο με θερμοκρασία 37°C και συγκέντρωση 5% CO₂. Τα κύτταρα καλλιεργούνταν έως το 70% της επιφάνειας και έπειτα ανακαλλιεργούνταν μέσω της διαδικασίας της θρυψινοποίησης (split). Για τη θρυψινοποίηση χρησιμοποιείται το ένζυμο θρυψίνη (0,25%) στους 37°C. Έπειτα με τη προσθήκη πλήρους θρεπτικού μέσου ώστε να τερματιστεί η δράση του ενζύμου, τα κύτταρα μεταφέρονταν σε νέες φλάσκες με νέο θρεπτικό υλικό. Οι συνθήκες που κυριαρχούν είναι πλήρως ασηπτικές, καθώς όλες οι διεργασίες εκτελούνται σε θάλαμο ρεύματος αέρα καθέτου συνεχούς νηματικής ροής.

6.4 Προσδιορισμός της κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο ΧΤΤ

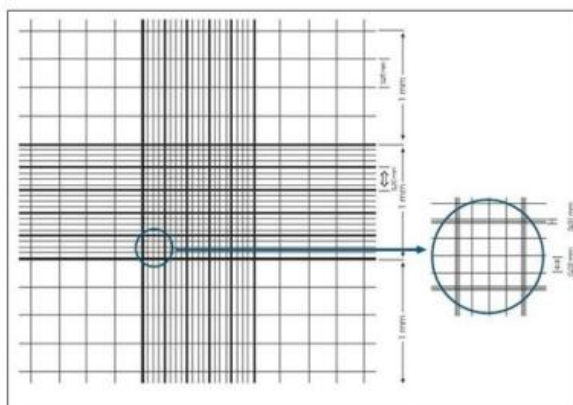
Προκειμένου να προσδιοριστούν οι μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων, οι οποίες θα χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια των πειραμάτων, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ΧΤΤ (R&D Systems). Συγκεκριμένα, η μέθοδος αυτή είναι μία χρωματομετρική δοκιμή που ανιχνεύει ποσοτικά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την βιωσιμότητα (Εικόνα 30). Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στον μεταβολισμό του τετραμμωνιακού άλατος ΧΤΤ προς στην αντίστοιχη φορμαζάνη από τις μιτοχονδριακές αφυδρογονάσες των ζωντανών κυττάρων. Η φορμαζάνη διαθέτει πορτοκαλί χρώμα και η απορρόφησή της είναι στα 450 nm. Η τοξική συγκέντρωση του εκχυλίσματος μειώνει τη βιωσιμότητα των κυττάρων και συνεπώς την παρατηρούμενη απορρόφηση.



Εικόνα 29: Μετατροπή του ΧΤΤ στην αντίστοιχη φορμαζάνη

Αρχικά, μετρήθηκαν τα κύτταρα μετά από θρυψινοποίηση σε αντικειμενοφόρο πλάκα Neubauer, (Εικόνα 31), και υπολογίστηκε ο αριθμός των κυττάρων ανά mL ως εξής: τοποθετήθηκαν 10μL κυτταρικού εναιωρήματος ανάμεσα από την καλυπτρίδα και την πλάκα Neubauer και έγινε η καταμέτρηση

των κυττάρων στα τέσσερα γωνιακά τετράγωνα, οπότε προέκυψε ο μέσος όρος των κυττάρων. Έπειτα, πολλαπλασιάζουμε τον μέσο όρο με τον συντελεστή αραιώσης (εάν έχει γίνει αραιώση) και στη συνέχεια με 10^4 ($MO \cdot \text{συντ. αραιώσης} \cdot 10^4$ κύτταρα/mL). Προκειμένου να επιστρώσουμε ισότιμα 10.000 κύτταρα σε κάθε πηγαδάκι, φτιάξαμε ένα εναιώρημα κυττάρων 100.000 κύτταρα/mL και από αυτό τοποθετήθηκαν 100 μL σε κάθε ένα πηγαδάκι της 96-well πλάκας ξεχωριστά.



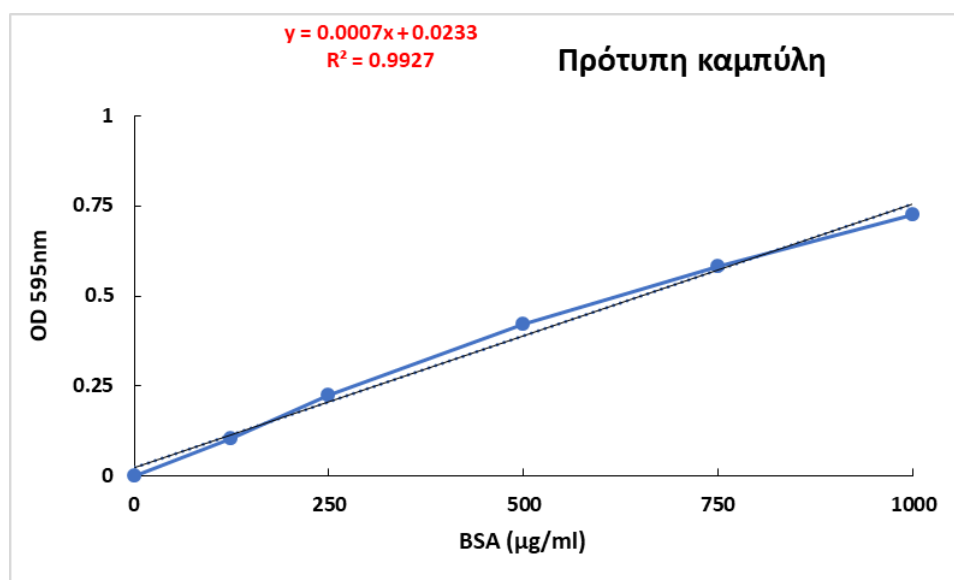
Εικόνα 30: Αντικειμενοφόρος πλάκα Neubauer

Την επόμενη ημέρα, μπήκε η επώαση σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS, καθώς το FBS αλληλεπιδρά με τις βιοφαινόλες και επηρεάζει τη δραστηριότητά τους. Χρησιμοποιήθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων και ακολούθησε επώαση για 24 ώρες. Με την λήξη της 24ωρης επώασης προστέθηκε το αντιδραστήριο XTT για 4 ώρες στους 37°C . Με το πέρας της επώασης, η πλάκα φωτομετρήθηκε στα 450 nm και 630 nm σε ELISA plate reader. Η ποσοτικοποίηση έγινε μέσω του λογισμικού GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, San Diego, California, USA). 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 τρία ανεξάρτητα πειράματα, όπου το κάθε δείγμα μελετήθηκε εις τριπλούν.

Η % βιωσιμότητα των κυττάρων (μετά την αφαίρεση των τυφλών) προκύπτει από τον συγκεκριμένο τύπο, όπου Abs = οπτική απορρόφηση:
 $\% \text{ Βιωσιμότητα} = [(Abs \text{ μάρτυρα} - Abs \text{ δείγματος}) / Abs \text{ μάρτυρα}] \times 100\%$

6.5 Υπολογισμός ολικής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford

Για την μέτρηση του δείκτη οξειδοαναγωγικής κατάστασης (οξειδωση λιπιδίων), 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, dH₂O μέχρι το 1L). Συγκεκριμένα, η χρωστική συνδέεται με τα αμινοξέα των πρωτεϊνών δίνοντας ένα σύμπλοκο μπλε χρώματος, 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 λεπτά σε σκοτάδι. Η οπτική απορρόφηση μετρήθηκε στα 595 nm έναντι τυφλού (αντί για κυτταρικό αιώρημα περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα PBS). Τέλος, για τον υπολογισμό της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης χρησιμοποιήθηκε πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης, με συγκεντρώσεις από 0.125 έως και 1 mg/ml δίνοντας την εξίσωση $y = 0.0007x + 0.0233$ (Εικόνα 32).



Εικόνα 31: Πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης

6.6 Υπολογισμός επιπέδων λιπιδικής υπεροξειδωσης (Thiobarbituric Acid Reactive Substances, TBARS)

Η λιπιδική υπεροξειδωση των δειγμάτων υπολογίζεται μέσω του βιοδείκτη TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) (145). Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στο ότι το οξειδωτικό στρες στο κυτταρικό περιβάλλον έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό άκρως ενεργών και ασταθών υπεροξειδίων των λιπιδίων από τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Προϊόν της διάσπασης αυτών των ασταθών μορίων είναι η μηλονική διαλδεΰδη (MDA), η οποία μπορεί να προσδιοριστεί μέσω της αντίδρασής της με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA). Επομένως, τα TBARS εκφράζονται σαν ισοδύναμα της μηλονικής διαλδεΰδης (MDA), η οποία σχηματίζει μια ένωση με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA) με αναλογία μηλονικής διαλδεΰδης (MDA) προς θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA) ένα προς δύο. Η μέτρηση της μηλονικής διαλδεΰδης (MDA) είναι μια φωτομετρική μέθοδος για τον προσδιορισμό του βαθμού υπεροξειδωσης των λιπιδίων. Καθώς το σύμπλοκο που προκύπτει είναι έγχρωμο και ανιχνεύεται στα 530 nm.

Η πειραματική διαδικασία είναι η εξής: Αρχικά σε 100 µg πρωτεΐνης προστίθεται 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%. Ακολουθεί επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και προσθήκη 1 ml διαλύματος θειικού νατρίου (Na₂SO₄) και TBA (2M Na₂SO₄, 55 mM TBA). Τα δείγματα αναδεύονται και επωάζονται για 45 λεπτά σε υδατόλουτρο (95°C). Με το πέρας της επώασης, τα δείγματα μεταφέρονται σε πάγο ~5 λεπτά. Ακολουθεί η προσθήκη 1 ml διαλύματος TCA 70% και ανάδευση. Από το υπερκείμενο, μεταφέρεται 1ml σε νέα erpendorfs τα οποία φυγοκεντρούνται (15000 g, 3 min, 25°C). Η οπτική απορρόφηση γίνεται στα 530 nm. Σε κάθε πείραμα ο μάρτυρας περιέχει PBS αντί κυτταρικού αιωρήματος. Κάθε δείγμα μετρείται εις διπλούν και πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα σε κάθε εκχύλισμα. Οι υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν με την ακόλουθη εξίσωση:

$TBARS \text{ (nmol/mg πρωτεΐνης)} = [(A\delta - A0)/0.156] * [3400/X]$, όπου

Aδ: Η οπτική απορρόφηση του δείγματος

A0: 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 ml) του εκάστοτε κυτταρικού αιωρήματος ώστε η αντίδραση να έχει 100 μg πρωτεΐνης

6.7 Δοκιμασία COMET

Η δοκιμασία COMET είναι μια εύχρηστη, γρήγορη, ευαίσθητη και σχετικά απλή τεχνική ηλεκτροφόρησης που μετρά τη βλάβη του DNA σε επίπεδο μεμονωμένων ευκαρυωτικών κυττάρων. Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην ικανότητα μετακίνησης θραυσμάτων DNA υπό την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου εκτός του κυττάρου σχηματίζοντας την "ουρά του κομήτη", ενώ το άθικτο DNA λόγω του μεγάλου μεγέθους δεν μετακινείται με αποτέλεσμα να σχηματίζεται η "κεφαλή του κομήτη" (146). Έχουν αναπτυχθεί δύο τύποι της μεθόδου: υπό ουδέτερες και αλκαλικές συνθήκες. Η πλέον χρησιμοποιούμενη είναι η αλκαλική Comet καθώς είναι πιο ευαίσθητη στην ανίχνευση θραυσμάτων διπλής και μονής έλικας DNA και των θέσεων ασταθών στα αλκάλια (146).

Η πειραματική διαδικασία ξεκινά με την προετοιμασία των επικαλυμμένων πλακιδίων με αγαρόζη. Συγκεκριμένα, παρασκευάζεται 1% w/v NMA (Normal Melting Agarose) σε dH₂O σε ποτήρι ζέσεως υπό θέρμανση έως ότου λιώσει τελείως η αγαρόζη και προκύψει ένα διαυγές διάλυμα. Στη συνέχεια, βυθίζονται οι αντικειμενοφόρες πλάκες στο ποτήρι ζέσεως με την αγαρόζη, για να δημιουργηθεί ένα λεπτό στρώμα και αφήνονται να σταθεροποιηθεί για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.

Για την προετοιμασία των κυττάρων οι συνθήκες επώασης που ακολουθήθηκαν ήταν οι εξής: Επιστρώθηκαν 200.000 κύτταρα/θέση σε πλάκα 6 θέσεων σε πλήρες θρεπτικό υλικό. Την επόμενη ημέρα, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκε η κατάλληλη συγκέντρωση του εκχυλίσματος σε πλήρες θρεπτικό υλικό, σε δύο πηγαδάκια, και ακολούθησε επώαση για 24 ώρες. Μία ώρα πριν τη λήξη της επώασης, στο ένα πηγαδάκι με το εκχύλισμα προστέθηκε παράγοντας πρόκλησης οξειδωτικού στρες, που ήταν 250μM H₂O₂. Το άλλο πηγαδάκι με το εκχύλισμα χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της επίδρασης του εκχυλίσματος από μόνο του στο DNA των κυττάρων. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα μόνο με θρεπτικό, ως αρνητικός μάρτυρας, κύτταρα που επώαστηκαν για 1 ώρα μόνο με 250μM H₂O₂, ως θετικός μάρτυρας. Μετά το τέλος της επώασης, έγινε θρυψινοποίηση, προσθήκη πλήρους θρεπτικού υλικού σε κάθε πηγαδάκι, συλλογή των

κυττάρων σε errendorf και στην συνέχεια μέτρηση με πλάκα Neubauer. Μετά από φυγοκέντρηση 1200rpm/ 5 min, ακολούθησε επαναιώρηση των κυττάρων σε PBS, ίδια φυγοκέντρηση και επαναιώρηση σε PBS συγκεκριμένου όγκου ώστε στα 20μl να περιέχονται 20.000 κύτταρα. Σε errendorf τοποθετείται 0.5% w/v LMA (Low Melting Agarose), η οποία έχει φτιαχτεί σε PBS και διατηρείται στους 37° C. Στην συνέχεια, για να υπάρχουν συνολικά 20.000 κύτταρα αναμιγνύεται 80 μL από 0.5% LMA και 20 μL εναιώρημα κυττάρων. Σημειώνεται ότι, πρώτα γίνεται τοποθέτηση αγαρόζης και μετά των κυττάρων και ανάμιξη. Αφού έγινε η ανάμιξη, το δείγμα τοποθετήθηκε πάνω στο επικαλυμμένο πλακίδιο, τοποθετήθηκε καλυπτρίδα (μικρή τετράγωνη) και διατήρηση για 30 λεπτά στους 4 °C.

Έπειτα, για την λύση των κυττάρων, οι καλυπτρίδες αφαιρέθηκαν και τα πλακίδια τοποθετήθηκαν σε κρύο διάλυμα λύσης (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris – HCl pH 10.0., 1% Triton X-100) και επώαστηκαν στους 4°C για 2 ώρες. Ακολούθησε πλύση με κρύο απιονισμένο νερό για 5 λεπτά στους 4°C και επώαση με το διάλυμα ηλεκτροφόρησης για 20 λεπτά στους 4°C.

Το διάλυμα ηλεκτροφόρησης παρασκευάζεται την ίδια ημέρα και η σύστασή του είναι 300mM NaOH, 1 mM EDTA, με pH >13 για τον εντοπισμό όλων των βλαβών του DNA, απλής αλυσίδας, διπλής αλυσίδας και αλκαλικών σημείων στο DNA. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται για 20 λεπτά σε 25 V και 300 mA. Με την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, ακολούθησε ουδετεροποίηση όπου τα πλακίδια στεγνώνονται σε χαρτί και τοποθετούνται στο Neutralization Buffer (0.4 Tris – HCl με pH 7.5) για 2 φορές, για 15 λεπτά τη φορά, έπειτα ξέπλυμα σε dH₂O για 5 λεπτά και τέλος σκούπισμα με χαρτί. Στην συνέχεια, για την χρώση χρησιμοποιείται η χρωστική φθορισμού SYBR Green I με αραιώση 1:10.000 σε TE buffer(10 mM Tris – HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5). Τοποθετήθηκαν 50 μL χρωστικής σε κάθε πλακίδιο και τοποθετήθηκε καλυπτρίδα. Τέλος, τα πλακίδια είτε παρατηρούνται την ίδια μέρα στο μικροσκόπιο φθορισμού (DM2000 LED, Leica) με μεγέθυνση 40X, είτε τοποθετούνται σε ειδικές θήκες στους 4°C για παρατήρηση την επόμενη μέρα. Οι εικόνες αναλύθηκαν με το λογισμικό CaspLab - Comet Assay Software, από το οποίο υπολογίζονται οι παράμετροι: % DNA Tail, Tail Length (pixels) και Tail Moment το οποίο προκύπτει από τον τύπο TailLength x TailDNA%. Η παράμετρος Tail Moment εκφράζει την ποσότητα του κατεστραμμένου DNA

στην ουρά του κομήτη. Τα αποτελέσματα προέκυψαν από συνολικά 100 κύτταρα σε κάθε συνθήκη, από δύο ανεξάρτητα πειράματα..

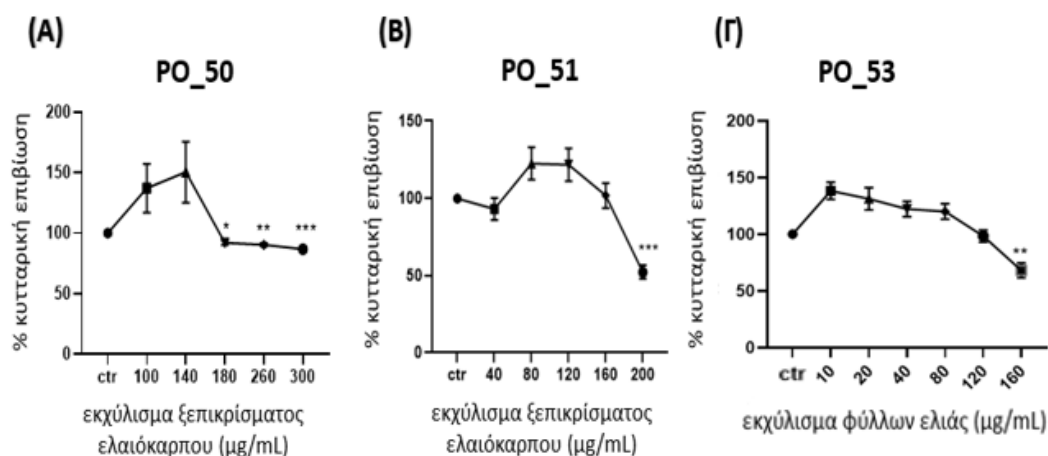
6.8 Στατιστική ανάλυση

Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων των ΧΤΤ και Comet χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση διακύμανσης ενός παράγοντα one-way ANOVA. και για τον δείκτη TBARS ανάλυση Welch's t-test Το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν το GraphPad Prism software 8.0.1. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε ως $p < 0.05$ ενώ τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SEM (standard error of the means).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

7.1 Εκτίμηση της κυτταροτοξικότητας

Αρχικά, διερευνήθηκαν τα εύρη των μη κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων προκειμένου να χρησιμοποιηθούν στα επόμενα πειράματα εκτίμησης της προστατευτικής τους δράσης. Αυτό επιτεύχθηκε με τη μέθοδο ΧΤΤ, όπου τα κύτταρα επωάστηκαν υπό αυξανόμενων συγκεντρώσεων των εκχυλισμάτων σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό για 24 ώρες. Η συγκέντρωση στην οποία παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της βιωσιμότητας, θεωρήθηκε ως κυτταροτοξική και δεν χρησιμοποιήθηκε στις επόμενες μεθόδους. Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 33) παρουσιάζονται τα ποσοστά επιβίωσης συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου.



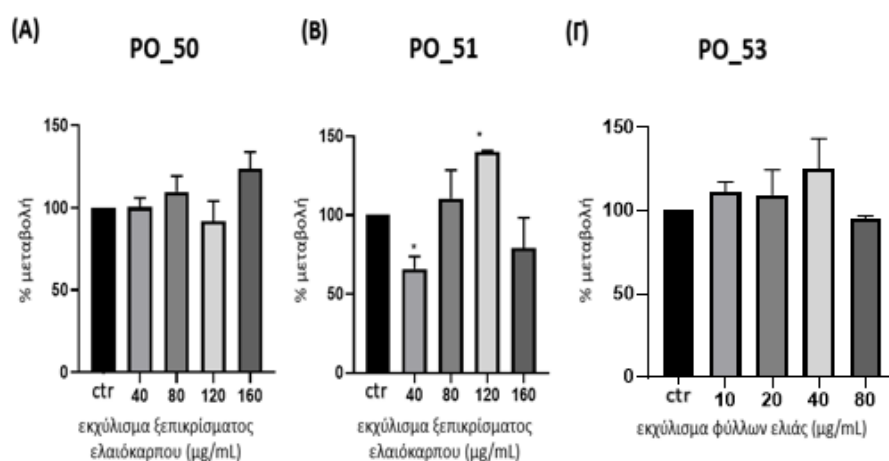
Εικόνα 32: Προσδιορισμός της κυτταροτοξικότητας στην κυτταρική σειρά EA.hy926 παρουσία των εκχυλισμάτων A) PO_50, B) PO_51, Γ) PO_53 έπειτα από 24 ώρες χορήγησής τους, με τη μέθοδο ΧΤΤ. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς την ομάδα ελέγχου (δεν χορηγήθηκε εκχύλισμα) και παρουσιάζονται ως mean ± SEM. Οι τιμές προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα, όπου το κάθε δείγμα μελετήθηκε εις τριπλούν. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου.

Συγκεκριμένα, για το εκχύλισμα PO_50 παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της επιβίωσης κατά 8% στη συγκέντρωση 180 μg/mL,

φθάνοντας το 14% στη συγκέντρωση 300 µg/mL (Εικόνα 33 Α). Για το εκχύλισμα PO_51 (Εικόνα 33 Β) η συγκέντρωση 200 µg/mL προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση της κυτταρικής επιβίωσης κατά 50%, ενώ δεν παρατηρήθηκε τοξικότητα στις συγκεντρώσεις από 160 µg/mL και κάτω. Τέλος, οι συγκεντρώσεις για το εκχύλισμα PO_53 (Εικόνα 33 Γ) πάνω από 160 µg/mL είναι τοξικές, όπου και προκάλεσε αναστολή της κυτταρικής επιβίωσης κατά 32%. Επομένως, για την διεκπεραίωση των πειραμάτων οι συγκεντρώσεις των τριών εκχυλισμάτων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 40-160 µg/mL για τα εκχυλίσματα ξεπικρίσματος ελαιόκαρπου Καλαμών (PO_50, PO_51) και 10-80 µg/mL για το εκχύλισμα φύλλων ελιάς (PO_53).

7.2 Εκτίμηση επιπέδων λιπιδικής υπεροξειδωσης (Thiobarbituric Acid Reactive Substances, TBARS)

Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων στα κύτταρα, χορηγήθηκαν οι παραπάνω μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις για κάθε εκχύλισμα για 24 ώρες, σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό. Τα επίπεδα της λιπιδικής υπεροξειδωσης παρουσιάζονται στην Εικόνα 34, όπου ο προσδιορισμός τους έγινε φασματοφωτομετρικά. Η μείωση της λιπιδικής υπεροξειδωσης υποδηλώνει προστατευτική δράση, ενώ η αύξησή της υποδηλώνει μη προστατευτική δράση.



Εικόνα 33: Επίδραση των εκχυλισμάτων Α) PO_50, Β) PO_51, Γ) PO_53 στα επίπεδα λιπιδικής υπεροξειδωσης (Thiobarbituric Acid Reactive Substances, TBARS) στην κυτταρική σειρά EA.hy926, έπειτα από 24 ώρες χορήγησής τους. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς την ομάδα ελέγχου (δεν χορηγήθηκε

εκχύλισμα) και παρουσιάζονται ως mean \pm SEM, *p < 0.05 στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου.

Για το εκχύλισμα PO_50 (Εικόνα 34 Α) για τις συγκεντρώσεις 40, 80, 120 και 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$, καθώς και για το εκχύλισμα PO_53 (Εικόνα 34 Γ) για τις συγκεντρώσεις 10, 20, 40 και 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$, δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Ωστόσο, στο εκχύλισμα PO_51 παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων TBARS κατά 34% στην συγκέντρωση 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ενώ αντίθετα παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων TBARS κατά 40% στην συγκέντρωση 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (Εικόνα 34 Β).

7.3 Εκτίμηση της προστατευτικής δράσης των εκχυλισμάτων από βλάβες στο DNA με τη δοκιμασία COMET

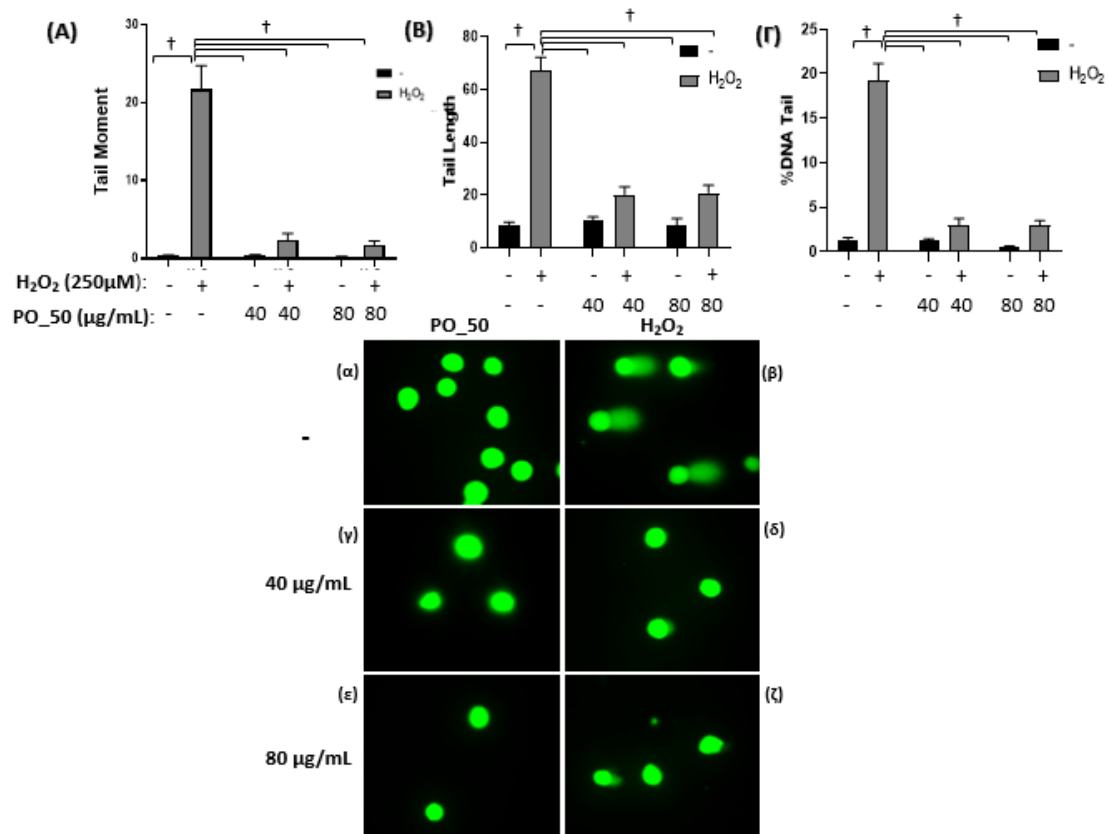
Το φαινόμενο του οξειδωτικού στρες εμφανίζεται όταν αυξάνεται ο σχηματισμός ελεύθερων ριζών ή όταν η αντιοξειδωτική ικανότητα ενός κυττάρου μειώνεται, οδηγώντας σε βλάβη του DNA (45). Η δοκιμασία COMET είναι μια ευαίσθητη μέθοδος για τη μέτρηση της βλάβης του DNA στα κύτταρα (147), όπου η παράμετρος Tail Moment υποδεικνύει το ποσοστό του κατεστραμμένου DNA στην ουρά του κομήτη (Tail Moment=Tail Length X %DNA Tail). Αναλυτικότερα, με βάση τα αποτελέσματα της επίδρασης των εκχυλισμάτων στα επίπεδα λιπιδικής υπεροξειδωσης, επιλέχθηκαν οι κατάλληλες συγκεντρώσεις και ακολούθησε προ-επώαση για 24 ώρες. Μια ώρα πριν τη λήξη της 24ωρης επώασης, τα κύτταρα επωάστηκαν με ή χωρίς 250 μM H₂O₂, ως οξειδωτικός παράγοντας. Κύτταρα που επωάστηκαν με 250 μM H₂O₂ μόνο για μία ώρα αποτέλεσαν το θετικό μάρτυρα ενώ κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό αποτέλεσαν τον αρνητικό μάρτυρα. Για την εκτίμηση της προστατευτικής δράσης των εκχυλισμάτων, χρησιμοποιήθηκαν τρεις παράμετροι: Tail Moment, Tail Length, % DNA Tail όπως προέκυψαν μετά από επεξεργασία των εικόνων με το λογισμικό CaspLab.

Αρχικά, για το εκχύλισμα PO_50 από ξεπίκρισμα ελαιοκάρπου Καλαμών, μελετήθηκαν οι συγκεντρώσεις 40 και 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ με και χωρίς την παρουσία οξειδωτικού παράγοντα (H₂O₂). Όπως παρατηρείται, (Εικόνα 35 Α, Β, Γ) η

παρουσία του H_2O_2 επέφερε καταστροφή του DNA των κυττάρων, και αποδεικνύεται από την στατιστικά σημαντική αύξηση και των τριών παραμέτρων, σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Η καταστροφή του DNA στη συνθήκη αυτή φαίνεται και από τις ουρές του κομήτη στα κύτταρα [Εικόνα 35 (β)] σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου [Εικόνα 35 (α)]. Αντίθετα, όσον αφορά τις δυο συγκεντρώσεις (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ και 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) από μόνες τους δεν δημιούργησαν στρεσογόνο περιβάλλον στα κύτταρα και ούτε προκάλεσαν την καταστροφή του DNA τους, καθώς όπως διαπιστώθηκε οι πυρήνες των κυττάρων είναι πανομοιότυποι [Εικόνα 35 (γ, ε)] με αυτούς της ομάδας ελέγχου [Εικόνα 35 (α)].

Ωστόσο, όταν τα κύτταρα προ-επωάστηκαν με 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ εκχυλίσματος PO_50, παρουσία του οξειδωτικού παράγοντα (H_2O_2), τα κύτταρα δεν παρουσίασαν την εικόνα κομήτη και όπως αποδεικνύεται και από τις τρεις παραμέτρους τόσο το μήκος της ουράς όσο και το κατεστραμμένο DNA σε αυτή, μειώνονται δραματικά (Εικόνα 35 Α, Β, Γ). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και για τη συγκέντρωση 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Βάση αυτών των αποτελεσμάτων, οι συγκεκριμένες συγκεντρώσεις (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ και 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) του εκχυλίσματος PO_50 είναι ικανές να προστατεύσουν τα κύτταρα από βλάβες στο DNA προκαλούμενες από οξειδωτικό στρες.

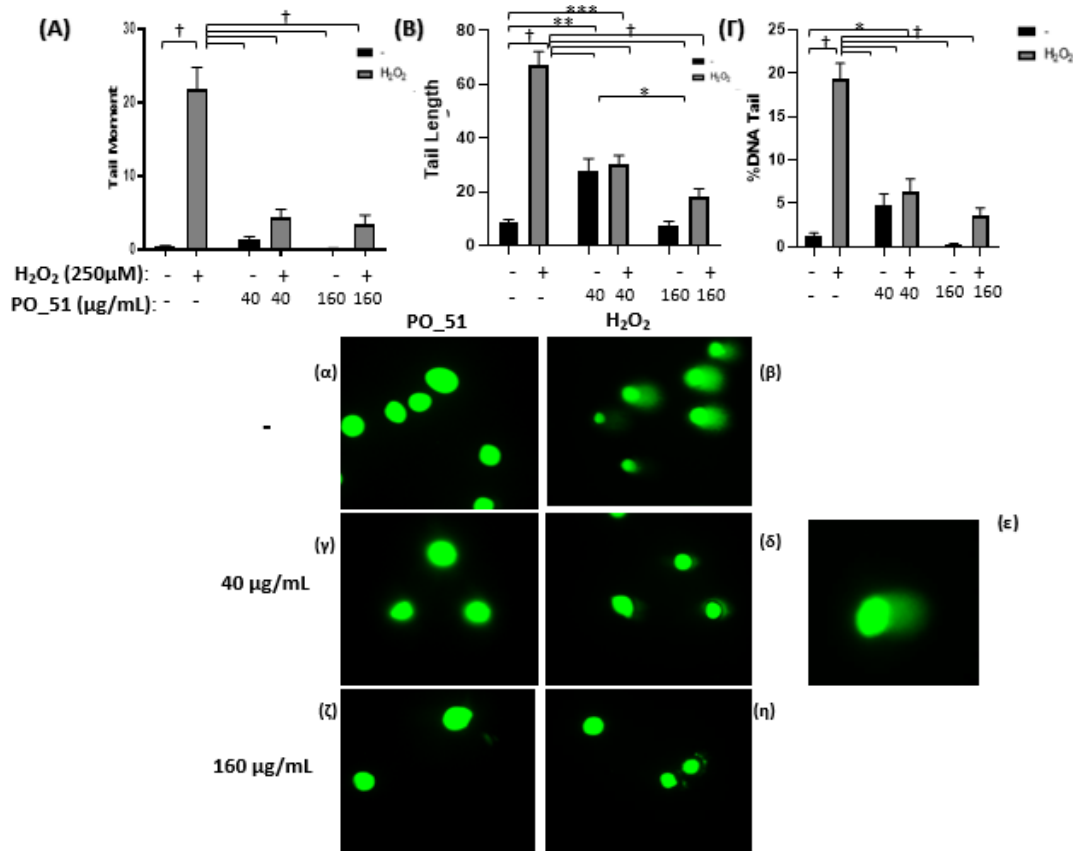


Εικόνα 34: Επίδραση του εκχυλίσματος PO₅₀ με και χωρίς την προσθήκη οξειδωτικού παράγοντα (H₂O₂) στην καταστροφή του DNA στην κυτταρική σειρά EA.hy926, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης του εκχυλίσματος και μία ώρα πριν τη λήξη της επώασης προσθήκη του H₂O₂, μέσω της δοκιμασίας COMET. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς την ομάδα ελέγχου (δεν χορηγήθηκε H₂O₂, παρά μόνο θρεπτικό υλικό) και παρουσιάζονται ως mean ± SEM, (n=100 κύτταρα). †p < 0.0001 στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Για κάθε συνθήκη μετρήθηκαν 100 κύτταρα.

Για το εκχύλισμα PO₅₁, διερευνήθηκε η προστατευτική δράση έναντι βλαβών του DNA για συγκεντρώσεις 40 μg/mL και 160 μg/mL, όπου παρουσιάζεται στην εικόνα 36 (Εικόνα 36 A, B, Γ) μαζί με τις τρεις παραμέτρους που μελετήθηκαν (Tail Moment, Tail Length, % DNA Tail). Όπως παρατηρείται, και στις τρεις παραμέτρους (Εικόνα 36 A, B, Γ) η δράση του H₂O₂ από μόνο του, είχε ως αποτέλεσμα να καταστρέψει το DNA των κυττάρων, και ενδεικτικά κατεστραμμένα κύτταρα παρουσιάζονται [Εικόνα 36 (β)], όπου γύρω από τον πυρήνα των κυττάρων έχουν δημιουργηθεί κομήτες σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου [Εικόνα 36 (α)] όπου οι πυρήνες των κυττάρων είναι άθικτοι. Αντίθετα,

όσον αφορά τις δυο συγκεντρώσεις (40 µg/mL και 160 µg/mL) από μόνες τους φαίνεται να μην προκαλούν στατιστικά σημαντική καταστροφή του DNA των κυττάρων (Εικόνα 36 Α, Γ) και οι πυρήνες είναι άθικτοι [Εικόνα 36 (γ, ζ)]. Ωστόσο, στη συγκέντρωση 40 µg/mL του εκχυλίσματος PO_51, στην οποία είχε παρατηρηθεί μείωση του δείκτη TBARS, ένας μικρός αριθμός κυττάρων (15%) εμφάνισαν διακριτούς κομήτες [Εικόνα 36 (ε)]. Πάντως, και οι δύο συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος παρουσίασαν προστατευτική δράση έναντι βλαβών του DNA, καθώς παρουσία του οξειδωτικού παράγοντα (H₂O₂) όσα κύτταρα είχαν την εικόνα κομήτη εμφάνιζαν μικρότερου μήκους ουρά σε σύγκριση με το H₂O₂ [Εικόνα 36 (δ, η)], και όπως φαίνεται μειώθηκαν σημαντικά και οι τρεις παράμετροι (Εικόνα 36 Α, Β, Γ).

Βάση αυτών των αποτελεσμάτων, είναι αντιληπτό ότι, οι συγκεκριμένες συγκεντρώσεις (40 µg/mL και 160 µg/mL) του εκχυλίσματος PO_51 είναι ικανές να προστατεύσουν τα κύτταρα από το οξειδωτικό στρες και κατά συνέπεια να αποτρέψουν βλάβη του DNA τους.



Εικόνα 35: Επίδραση του εκχυλίσματος P0_51 με και χωρίς την προσθήκη οξειδωτικού παράγοντα (H₂O₂) στην καταστροφή του DNA στην κυτταρική σειρά

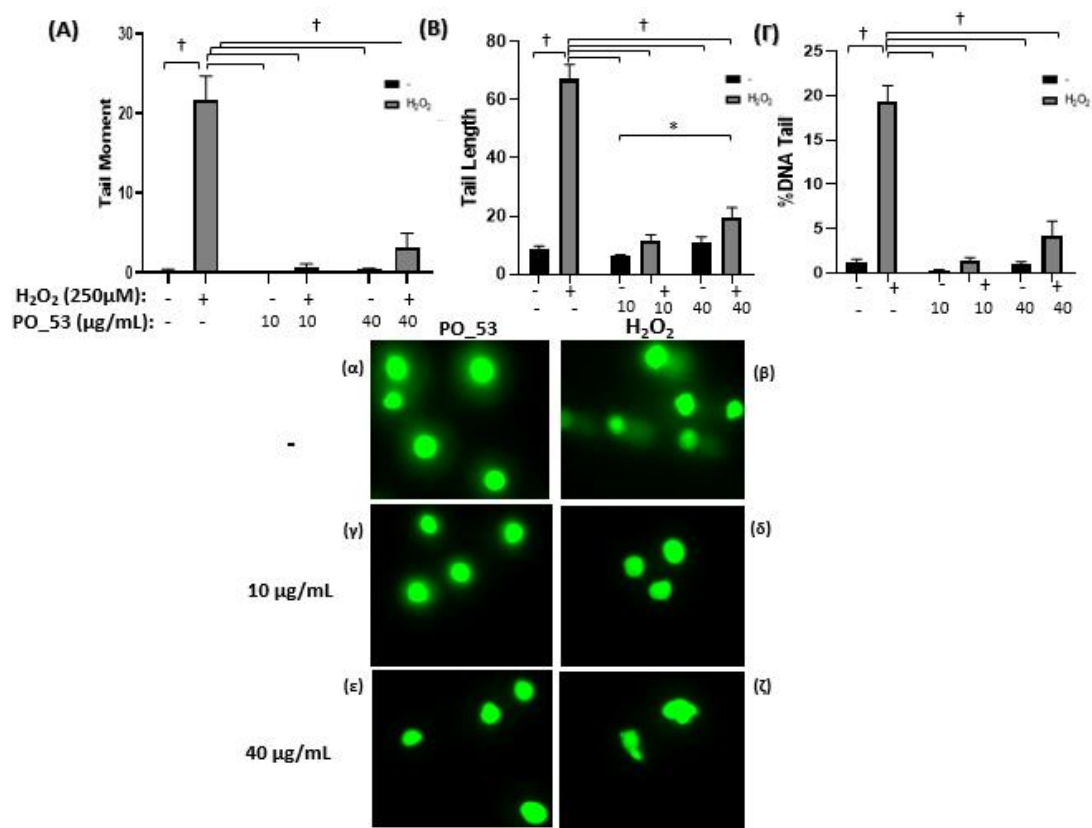
EA.hy926 έπειτα από 24 ώρες χορήγησης του εκχυλίσματος και μία ώρα πριν τη λήξη της επώασης προσθήκη του H₂O₂, μέσω της δοκιμασίας COMET. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς την ομάδα ελέγχου (δεν χορηγήθηκε H₂O₂, παρά μόνο θρεπτικό υλικό) και παρουσιάζονται ως mean ± SEM, (n=100 κύτταρα). *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, †p < 0.0001 στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου.

Τέλος, τα αποτελέσματα για το εκχύλισμα PO_53, το οποίο προέρχεται από φύλλα ελιάς, παρουσιάζονται στην Εικόνα 37 μαζί με τις τρεις παραμέτρους που μελετήθηκαν (Tail Moment, Tail Length, % DNA Tail) [Εικόνα 37 A, B, Γ] στις συγκεντρώσεις 10 µg/mL και 40 µg/mL. Όπως παρατηρείται, και στις τρεις παραμέτρους (Εικόνα 37 A, B, Γ) η δράση του H₂O₂ από μόνο του επέφερε καταστροφή των κυττάρων, σε σύγκριση πάντοτε με την ομάδα ελέγχου [Εικόνα 37 (α)]. Αντίθετα, όσον αφορά τις δυο συγκεντρώσεις (10 µg/mL και 40 µg/mL) από μόνες τους δεν παρουσίασαν καμία καταστροφή των κυττάρων, όπως διαπιστώνεται και στην [Εικόνα 37 (γ, ε)], καθώς οι πυρήνες των κυττάρων είναι άθικτοι όπως και της ομάδας ελέγχου [Εικόνα 37 (α)].

Παράλληλα, όταν τα κύτταρα προ-επωάστηκαν με 10 µg/mL του εκχυλίσματος PO_53, και στη συνέχεια για 1 ώρα με τον οξειδωτικό παράγοντα (H₂O₂), τα κύτταρα είχαν όμοια εικόνα με αυτή του αρνητικού μάρτυρα [Εικόνα 37 α], που σημαίνει ότι η συγκεκριμένη ποσότητα εκχυλίσματος είναι ικανή να προστατεύσει το DNA των κυττάρων υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες. Το εύρημα αυτό υποστηρίζεται και από την μεταβολή των τριών παραμέτρων (Εικόνα 37 A, B, Γ), όπου παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση τόσο στο μήκος της ουράς (Εικόνα 37 B) όσο και στο κατεστραμμένο DNA σε αυτή (Εικόνα 37 A, Γ). Ωστόσο, στη μεγαλύτερη συγκέντρωση 40 µg/mL που επωάστηκε μαζί με τον οξειδωτικό παράγοντα (H₂O₂), παρατηρήθηκε ότι παρά το γεγονός ότι τα κύτταρα δεν εμφάνιζαν την εικόνα κομήτη, οι πυρήνες τους ήταν ιδιαίτερα αλλοιωμένοι μορφολογικά.

Βάση αυτών των αποτελεσμάτων, είναι αντιληπτό ότι, η συγκέντρωση 10 µg/mL του εκχυλίσματος PO_53 παρουσία οξειδωτικού παράγοντα (H₂O₂) είναι ικανή να προστατεύσει τα κύτταρα από το οξειδωτικό στρες και κατά συνέπεια να αποτρέψει βλάβη στο DNA τους. Ωστόσο, στη μεγαλύτερη συγκέντρωση 40 µg/mL, παρά το γεγονός ότι δεν παρατηρήθηκαν κομήτες, τα κύτταρα φαίνονται

στρεσαρισμένα λόγω της μη φυσιολογικής μορφολογίας των πυρήνων τους [Εικόνα 37 (ζ)].



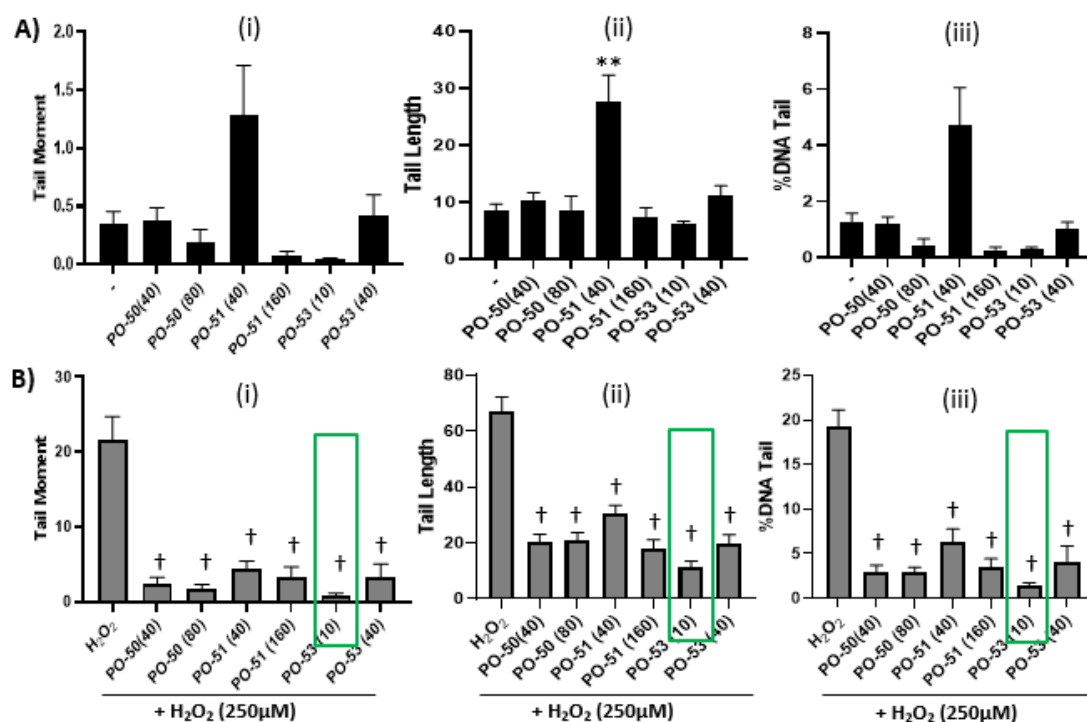
Εικόνα 36: Επίδραση του εκχυλίσματος PO₅₃ με και χωρίς την προσθήκη οξειδωτικού παράγοντα (H₂O₂) στην καταστροφή του DNA στην κυτταρική σειρά EA.hy926 έπειτα από 24 ώρες χορήγησης του εκχυλίσματος και μία ώρα πριν τη λήξη της επώασης προσθήκη του H₂O₂, μέσω της δοκιμασίας COMET. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς την ομάδα ελέγχου (δεν χορηγήθηκε H₂O₂, παρά μόνο θρεπτικό υλικό) και παρουσιάζονται ως mean ± SEM, (n=100 κύτταρα). *p < 0.05, †p < 0.0001 στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου.

7.4 Συγκεντρικά αποτελέσματα της δοκιμασίας COMET

Στην Εικόνα 38 παρουσιάζονται συγκεντρικά τα αποτελέσματα της δοκιμασίας COMET. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 38A, τα εκχυλίσματα από μόνα τους δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική επίδραση στο DNA, όπως φαίνεται με τις τρεις παραμέτρους που μελετήθηκαν [Εικόνα 38 A (i), (ii), (iii)]. Ωστόσο, η συγκέντρωση 40 μg/mL του εκχυλίσματος PO₅₁, παρουσίασε στατιστικά σημαντική αύξηση της παραμέτρου Tail Length [Εικόνα 38 A (ii)],

χωρίς όμως αυτό να συνοδεύεται από στατιστικά σημαντική αύξηση του κατεστραμμένου DNA σε αυτή [Εικόνα 38 A (i), (iii)].

Στην Εικόνα 38 B, παρουσιάζεται η μεγάλη αναστολή της καταστροφής του DNA προκαλούμενης από το H₂O₂, παρουσία των εκχυλισμάτων, σε σύγκριση με τον θετικό μάρτυρα (H₂O₂). Συγκριτικά, η συγκέντρωση που έχει την ισχυρότερη προστατευτική δράση ανάμεσα στα τρία εκχυλίσματα είναι τα 10 μg/mL του εκχυλίσματος PO_53 [Εικόνα 38 B (i), (ii), (iii)].



Εικόνα 37: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της δοκιμασίας COMET, όπου A) τα εκχυλίσματα PO_50, PO_51, PO_53 μόνα τους με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις (μg/mL) τους, την ομάδα ελέγχου και τις τρεις παραμέτρους που μελετήθηκαν, [Tail Moment (i), Tail Length (ii), % DNA Tail (iii)]. Αντίστοιχα, όπου B) τα εκχυλίσματα PO_50, PO_51, PO_53 με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις υπό την προσθήκη οξειδωτικού παράγοντα (H₂O₂) και τις τρεις παραμέτρους που μελετήθηκαν, [Tail Moment (i), Tail Length (ii), % DNA Tail (iii)]. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς την ομάδα ελέγχου (δεν χορηγήθηκε H₂O₂, παρά μόνο θρεπτικό υλικό) και παρουσιάζονται ως mean ± SEM, (n=100 κύτταρα). **p < 0.01, †p < 0.0001 στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία έγινε αποτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας τριών εκχυλισμάτων υποπροϊόντων ελιάς σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα. Επιπλέον, μελετήθηκε η προστατευτική τους ικανότητα έναντι βλαβών του DNA των κυττάρων προκαλούμενες από οξειδωτικό παράγοντα. Απώτερος σκοπός της παρούσας εργασίας, μετά την αξιολόγηση των βιολογικών αποτελεσμάτων, ήταν να διαπιστωθεί κατά πόσο τα συγκεκριμένα εκχυλίσματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη βιομηχανία τροφίμων ως φυσικά συντηρητικά, λόγω των ισχυρών αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων τους, και σε ποια συγκέντρωση ώστε να βελτιώσουν τα θρεπτικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος.

Αναλυτικότερα, τα εκχυλίσματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ένα εκχύλισμα φύλλων ελιάς (PO_53) και δύο εκχυλίσματα ξεπικρίσματος ελαιόκαρπου της ποικιλίας Καλαμών (PO_50, PO_51), όπου η περιεκτικότητα τους σε υδροξυτυροσόλη (HT) και τυροσόλη (T) είναι διαφορετική. Είναι γνωστό από την βιβλιογραφία ότι, η υδροξυτυροσόλη και η τυροσόλη είναι από τις επικρατέστερες φαινολικές ενώσεις στα φύλλα της ελιάς (148). Παράλληλα, τα εκχυλίσματα φύλλων ελιάς έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον των ερευνητών, καθώς φαίνεται ότι σχετίζονται με ισχυρές βιολογικές δράσεις κυρίως λόγω της υψηλής περιεκτικότητας πολυφαινολών που διαθέτουν (107). Όσον αφορά τα εκχυλίσματα ξεπικρίσματος ελαιόκαρπων, δεν υπάρχουν αρκετά βιβλιογραφικά δεδομένα για την βιολογική τους δράση, ωστόσο βάση της συγκεκριμένης μελέτης παρουσιάζει ενδιαφέρον η αντιοξειδωτική και προστατευτική τους δράση έναντι βλαβών του DNA.

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των υπό εξέταση εκχυλισμάτων αξιολογήθηκε μέσω του δείκτη λιπιδικής υπεροξειδωσης (Thiobarbituric Acid Reactive Substances, TBARS) σε κυτταρικό επίπεδο, όπου η κυτταρική σειρά ήταν ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα (EA.hy926). Τα συγκεκριμένα κύτταρα EA.hy926 επιλέχθηκαν καθώς προσομοιάζουν τα κύτταρα που συγκροτούν το ενδότερο τμήμα των αγγείων και οι ελεύθερες ρίζες παίζουν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων (143). Επιπλέον, η προστατευτική ικανότητα των συγκεκριμένων εκχυλισμάτων σε βλάβες του DNA των κυττάρων προκαλούμενες από οξειδωτικό παράγοντα (H₂O₂),

αξιολογήθηκε μέσω της δοκιμασίας COMET. Ωστόσο, για την διεκπεραίωση των πειραμάτων, με σκοπό να μη χρησιμοποιηθούν κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων, η κυτταροτοξικότητά τους εκτιμήθηκε με την μέθοδο ΧΤΤ.

Τα αποτελέσματα για την εκτίμηση των επιπέδων λιπιδικής υπεροξειδωσης (Thiobarbituric Acid Reactive Substances, TBARS), για το εκχύλισμα ξεπικρίσματος ελαιόκαρπου Καλαμών (PO_50) δεν έδειξαν κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά, όπως και για το εκχύλισμα φύλλων ελιάς (PO_53). Ωστόσο, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων TBARS κατά 34% στην συγκέντρωση 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ του εκχυλίσματος ξεπικρίσματος ελαιόκαρπου (PO_51) και στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων TBARS κατά 40% στην συγκέντρωση 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Επομένως συμπεραίνουμε ότι, στην συγκέντρωση 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ του εκχυλίσματος ξεπικρίσματος ελαιόκαρπου (PO_51) ενεργοποιήθηκε ο αντιοξειδωτικός μηχανισμός και προκάλεσε μείωση των επιπέδων TBARS με αποτέλεσμα να σηματοδοτεί προστατευτική δράση στα κύτταρα. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το αποτέλεσμα αυτό, δηλαδή της μείωσης των TBARS στη μικρότερη συγκέντρωση (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$), της αύξησή τους στα 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ενώ στη μέγιστη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε (160 $\mu\text{g}/\text{mL}$) επανέρχονται σε φυσιολογικά επίπεδα, όμοια με της ομάδας ελέγχου.

Αντίστοιχες, μελέτες της αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων ξεπικρίσματος ελιάς δεν υπάρχουν μέχρι στιγμής στη βιβλιογραφία. Ωστόσο, στην ίδια κυτταρική σειρά έχει δειχθεί η αντιοξειδωτική ικανότητα εκχυλίσματος ελαιόλαδου, όπου παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων TBARS στην χαμηλότερη συγκέντρωση (143). Ακόμη, επιστημονικά ευρήματα αναφέρουν ότι μερικές από τις κύριες πολυφαινόλες που υπήρχαν στα απόβλητα των ελαιοτριβείων, όπως για παράδειγμα υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη και καφεϊκό οξύ, που περιέχονται και στα δικά μας εκχυλίσματα ξεπικρίσματος, είναι αποτελεσματικές στο να συμβάλλουν στην διακοπή της υπεροξειδωσης των λιπιδίων (149). Αντίθετα, η αύξηση της λιπιδικής υπεροξειδωσης που παρατηρήθηκε στην συγκέντρωση 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$, σηματοδοτεί συνθήκες οξειδωτικού στρες για το κύτταρο. Βάση αυτής της παρατήρησης, υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα που υποστηρίζουν ότι οι φαινολικές ενώσεις του ελαιόλαδου εκτός από τον αντιοξειδωτικό τους ρόλο, είναι ικανές να δράσουν

και ως προ-οξειδωτικά, παράγοντας δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) (130). Επιπλέον, αυτό το πρότυπο μεταβολής στο εκχύλισμα PO_51 θα μπορούσε να συνδεθεί με το φαινόμενο της όρμησης, κατά το οποίο η σχέση δόσης - απόκρισης σε στρεσογόνους παράγοντες, χαρακτηρίζεται από διέγερση σε χαμηλή δόση και αναστολή σε υψηλή δόση. Η σχέση αυτή είναι μη γραμμική με βέλτιστη δράση σε χαμηλή δόση (150).

Παρά το γεγονός ότι τα εκχυλίσματα PO_50 και PO_51 προέρχονται και τα δύο από ξεπικρίσματα ελαιόκαρπων Καλαμών, του ίδιου παραγωγού αλλά έχουν συλλεχθεί διαφορετικούς μήνες, μια πιθανή εξήγηση για την διαφορετική τους δράση είναι η διαφορετική σύσταση σε πολυφαινολικές ενώσεις. Όπως έχει αναφερθεί στην Εισαγωγή, ο χρόνος συλλογής των ελαιόκαρπων επηρεάζει την περιεκτικότητά τους σε πολυφαινόλες, λόγω των καιρικών συνθηκών, του διαφορετικού επιπέδου ωρίμανσης των καρπών. Οπότε, πιθανόν αυτό να συνδέεται με την βιοδραστικότητα των εκχυλισμάτων. Ωστόσο, δεν υπάρχουν αντίστοιχες μελέτες σε εκχυλίσματα ξεπικρίσματος ελαιόκαρπου. Υπάρχουν μελέτες που αναφέρονται στους τρόπους ξεπικρίσματος ελαιόκαρπων (151) αλλά και στην περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες κατά την διάρκεια του ξεπικρίσματος (152), οι οποίες προσδιορίζονται με μεθόδους, όπως για παράδειγμα η μέθοδος της Υγρής Χρωματογραφίας Υπερυψηλής Απόδοσης (Ultra High Performance Liquid Chromatography, UHPLC) και η μέθοδος Φασματομετρία Μάζας (Mass spectrometry, MS). Παρόμοιες μελέτες που να διερευνούν με άλλες μεθόδους τα εκχυλίσματα ξεπικρίσματος ελαιόκαρπων και την συμβολή τους στην αντιοξειδωτική δράση σε κύτταρα δεν υπάρχουν. Ωστόσο, υπάρχει έρευνα που έχει μελετήσει *in vitro* με την μέθοδο DPPH και έχει αναδείξει την αντιοξειδωτική δράση των άλμεων από ελαιόκαρπους (141).

Όσον αφορά το εκχύλισμα φύλλων ελιάς, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά στα TBARS. Ωστόσο, βάση μιας μελέτης που πραγματοποιήθηκε *in vivo*, χορηγήθηκε εκχύλισμα φύλλων ελιάς πλούσιο σε ελαιοευρωπαΐνη μέσω στόματος σε αρουραίους Wistar όπου η διατροφή τους ήταν πλούσια σε χοληστερόλη και αποδείχθηκε ότι υπήρξε μείωση των επιπέδων TBARS στο ήπαρ, την καρδιά, τα νεφρά, την αορτή κατά 15.97%, 14.8%, 12.85% και 22.19% αντίστοιχα (153) γεγονός που οφείλεται στον σημαντικό ρόλο της

ελαιοευρωπαϊνης ως αντιοξειδωτικό δρώντας ανασταλτικά στην δράση των ελεύθερων ριζών. Ωστόσο, τα αποτελέσματά μας δεν έδειξαν κάποια σημαντική επίδραση στα επίπεδα λιπιδικής υπεροξειδωσης, πιθανόν λόγω της κυτταρικής σειράς που χρησιμοποιήθηκε (EA.hy926). Αξίζει να σημειωθεί γενικά ότι, η αντίδραση των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων μπορεί να διαφέρει σε ένα *in vitro* και *in vivo* σύστημα. Για παράδειγμα, η χορήγηση ενός εκχυλίσματος στέμφυλων πλούσιο σε πολυφαινόλες παρουσίασε ισχυρή *in vitro* αντιοξειδωτική ικανότητα, ενώ όταν χορηγήθηκε σε αρουραίους, προκάλεσε οξειδωτικό στρες σε κατάσταση ηρεμίας και μετά από άσκηση, χωρίς η επίδοση της άσκησης να επηρεαστεί (154). Άλλη πιθανή εξήγηση μπορεί να αποτελεί η ενθυλάκωση των τριών εκχυλισμάτων με μαλτοδεξτρίνη, η οποία μπορεί να επηρεάζει τη βιολογική τους δράση, με αποτέλεσμα να μην παρατηρούνται έντονες μεταβολές στον δείκτη TBARS.

Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα, μελέτες σε ερυθροκύτταρα με εκχυλίσματα φύλλων ελιάς έδειξαν ότι δεν επηρεάστηκαν τα επίπεδα των TBARS σε σύγκριση με το μάρτυρα, όπως και στη δική μας μελέτη, ενώ παρουσίασαν προστατευτική δράση παρουσία οξειδωτικού παράγοντα, καθώς μειώθηκε σημαντικά ο δείκτης των TBARS (155).

Λόγω της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς, υπάρχουν μελέτες που έχουν αποδείξει τη συμβολή εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς στη συντήρηση τροφίμων. Συγκεκριμένα, μια μελέτη βασίστηκε στην κατασκευή ενός πολυστρωματικού πλαστικού με μεμβράνες πολυαιθυλενίου για την συσκευασία τροφίμων, όπου περιείχε τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις (2%, 5%, 10% και 15%) εκχυλίσματος φύλλων ελιάς και εφαρμόστηκε σε φρέσκο κιμά χοιρινού κρέατος (156). Οι μεμβράνες με 15% και 10% εκχυλίσματος φύλλων ελιάς έδειξαν την καλύτερη αντιοξειδωτική δράση με μειωμένα επίπεδα TBARS, συμβάλλοντας έτσι στην παράταση της διάρκειας ζωής του φρέσκου κιμά χοιρινού κρέατος για δύο ημέρες, αποτρέποντας την οξείδωσή του (156). Όπως παρατηρούμε και εδώ υπήρξε σημαντική μείωση των επιπέδων TBARS που σηματοδοτεί αντιοξειδωτική ικανότητα και προστασία. Πρόσθετες μελέτες, αναφέρουν επίσης ότι, εκχυλίσματα φύλλων ελιάς μπορούν να παρατείνουν τη διάρκεια ζωής σε μπιφτέκι σολομού (157), να βελτιώσουν την θρεπτική αξία των επιτραπέζιων ελιών (158) καθώς και να μειώσουν την οξείδωση των λιπιδίων σε ψητά σνακ (159).

Όσον αφορά τη προστασία έναντι βλαβών του DNA, τα αποτελέσματα της δοκιμασίας COMET έδειξαν προστατευτική δράση και για τα δύο εκχυλίσματα ελαιόκαρπου ποικιλίας Καλαμών. Συγκεκριμένα, το εκχύλισμα ξεπικρίσματος ελαιόκαρπου (PO_50), προστάτευσε από βλάβες του DNA ήδη από τη συγκέντρωση 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, όπου παρουσία του οξειδωτικού παράγοντα (H_2O_2), μείωσε κατά πολύ τις παραμέτρους-δείκτες καταστροφής του DNA (Tail Moment, Tail Length, % DNA Tail). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και για τη συγκέντρωση 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Τα ευρήματα αυτά δείχνουν, ότι παρά το γεγονός ότι στις ίδιες συγκεντρώσεις δεν υπήρξε κάποια επίδραση στον δείκτη λιπιδικής υπεροξειδωσης, τα εκχυλίσματα έχουν την ικανότητα να προστατεύσουν από βλάβες στο DNA, προκαλούμενες από οξειδωτικό στρες, πιθανόν επάγοντας διαφορετικούς ενδοκυττάριους προστατευτικούς μηχανισμούς. Αντίστοιχα, αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και για το δεύτερο εκχύλισμα ξεπικρίσματος ελαιόκαρπου (PO_51), όπου φάνηκε η προστατευτική του δράση ήδη από τα 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, στην οποία παρατηρήθηκε επιπλέον μείωση της λιπιδικής υπεροξειδωσης. Ωστόσο, το ενδιαφέρον είναι ότι, σε αυτή τη χαμηλότερη συγκέντρωση που παρατηρήθηκε ταυτόχρονα μείωση των TBARS, κάποια λίγα κύτταρα (15%) εμφάνισαν μορφή κομήτη, σε αντίθεση με την μεγαλύτερη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε (160 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Αυτό το γεγονός μπορεί να συνδεθεί και με το φαινόμενο της όρμησης, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Τα παραπάνω αποτελέσματα, αναδεικνύουν για πρώτη φορά τη προστατευτική δράση εκχυλισμάτων ξεπικρίσματος ελιάς στο DNA ανθρώπινων κυττάρων, καθώς δεν υπάρχουν άλλες παρόμοιες μελέτες.

Προστατευτική δράση έναντι βλαβών στο DNA των ενδοθηλιακών κυττάρων παρουσία οξειδωτικού παράγοντα, παρατηρήθηκε και για το εκχύλισμα φύλλων ελιάς (PO_53). Ήδη στη συγκέντρωση 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ παρουσία του οξειδωτικού παράγοντα (H_2O_2), παρατηρήθηκε δραματική μείωση του κατεστραμμένου DNA, όπως φάνηκε και από τους τρεις δείκτες (Tail Moment, Tail Length, %DNA Tail). Ωστόσο, στη συγκέντρωση 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ που επωάστηκε μαζί με τον οξειδωτικό παράγοντα (H_2O_2), παρατηρήθηκε ότι οι πυρήνες των κυττάρων ήταν ιδιαίτερα αλλοιωμένοι, υποδηλώνοντας ότι τα κύτταρα βρέθηκαν κάτω υπό συνθήκες στρες. Παρόμοια αποτελέσματα με τα δικά μας παρουσίασε και μια άλλη μελέτη (161), όπου ένας από τους στόχους της ήταν να διερευνήσει το αντιοξειδωτικό και αντιγονιδιοτοξικό δυναμικό του

τυποποιημένου εκχυλίσματος ξηρών φύλλων ελιάς έναντι της βλάβης του DNA που προκαλείται από το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2), σε ανθρώπινα λευκοκύτταρα περιφερικού αίματος χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία COMET. Συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η υψηλότερη συγκέντρωση του τυποποιημένου εκχυλίσματος ξηρών φύλλων ελιάς (1 mg/mL) παρουσίασε τη χαμηλότερη προστατευτική επίδραση στα λευκοκύτταρα, σε σύγκριση με την μικρότερη συγκέντρωση του εκχυλίσματος (0.5 mg/mL) όπου έδειξε προστατευτική δράση. Επιπλέον, άλλη μελέτη, έδειξε την προστατευτική δράση εκχυλίσματος ξηρών φύλλων ελιάς (0.125, 0.5 και 1 mg/mL) έναντι της τοξικότητας της αδρεναλίνης στο DNA στην μικρότερη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε (162). Επίσης, μια άλλη έρευνα απέδειξε ότι, τρία εκχυλίσματα πλούσια σε πολυφαινόλες που προέρχονται από παρθένο ελαιόλαδο, ελιά και φύλλα ελιάς παρουσίασαν προστασία έναντι της καταστροφής του DNA των μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερειακού αίματος (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC) μέσω της δοκιμασίας COMET σε ένα χαμηλό εύρος συγκεντρώσεων (0.1-1.0 μ M) (163).

Όπως έχει δειχθεί σε προηγούμενη μελέτη, οι φαινολικές ενώσεις, ελαιευρωπαΐνη και υδροξυτυροσόλη, που υπάρχουν στο ελαιόλαδο και στα φύλλα ελιάς παρουσίασαν προστατευτική δράση έναντι βλαβών του DNA παρουσία οξειδωτικού παράγοντα (164). Όπως αποδεικνύεται και από την συγκεκριμένη μελέτη παρατηρούμε την φαινολική ένωση, υδροξυτυροσόλη, ότι συμβάλλει στην προστασία έναντι της οξειδωτικής καταστροφής του DNA των κυττάρων. Καθώς η υδροξυτυροσόλη αποτελεί την κύρια πολυφαινόλη των τριών εκχυλισμάτων της παρούσας έρευνας, είναι πιθανό η προστατευτική δράση σε οξειδωτικές βλάβες του DNA των κυττάρων να οφείλεται σε αυτή την ένωση.

Εν κατακλείδι, μπορούμε να συμπεράνουμε πως και τα τρία εκχυλίσματα υποπροϊόντων ελιάς, δηλαδή ένα εκχύλισμα φύλλων ελιάς (PO_53) και δύο εκχυλίσματα ξεπικρίσματος ελαιόκαρπου της ποικιλίας Καλαμών (PO_50, PO_51) σε επίπεδο κυττάρων φαίνεται να προστατεύουν τα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα (EA.hy 926) από το οξειδωτικό στρες. Ωστόσο, το εκχύλισμα που δείχνει προστατευτική δράση στο DNA στη μικρότερη συγκέντρωση είναι το εκχύλισμα φύλλων ελιάς (PO_53) σε συγκέντρωση 10 μ g/mL. Επιπλέον, για πρώτη φορά η παρούσα μελέτη αναδεικνύει την

βιοδραστικότητα εκχυλισμάτων ξεπικρίσματος ελαιόκαρπου σε κύτταρα, τα οποία έχουν σημαντική προστατευτική δράση έναντι βλαβών του DNA σε συνθήκες οξειδωτικού στρες. Η προστατευτική αυτή δράση φάνηκε ήδη από τη συγκέντρωση 40μg/mL και για τα δύο εκχυλίσματα ξεπικρίσματος ελαιόκαρπου της ποικιλίας Καλαμών (PO_50, PO_51), στην οποία παρατηρήθηκε μείωση του δείκτη TBARS στο εκχύλισμα PO_51. Επομένως, τα συγκεκριμένα υποπροϊόντα ελιάς, τα φύλλα της ελιάς και το υγρό από το ξεπίκρισμα των ελαιόκαρπων, αναδεικνύονται ως πηγές βιοδραστικών μορίων που πρέπει να αξιοποιούνται και να μην απορρίπτονται, καθώς φαίνεται ότι εκτός της αντιοξειδωτικής τους δράσης εμφανίζουν και προστατευτική δράση από τις βλάβες στο DNA. Ιδιότητες ιδιαίτερα ωφέλιμες για την υγεία των ανθρώπων είτε ως πρόσθετα ή συντηρητικά στον κλάδο των τροφίμων (165) είτε αλλού.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Stohs, S. J. The role of free radicals in toxicity and disease. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* **6**, 205–228 (1995).
2. Veterinary, S. T.-J. of the H. & 2001, undefined. Oxygen free radicals and veterinary medicine. *ejournals.epublishing.ekt.gr*.
3. Lobo, V., Patil, A., Phatak, A. & Chandra, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn. Rev.* **4**, 118 (2010).
4. Pani, G., Galeotti, T. & Chiarugi, P. Metastasis: cancer cell's escape from oxidative stress. *Cancer Metastasis Rev.* **2010** **29**, 351–378 (2010).
5. Antioxidants and Free Radicals | Liver Doctor.
<https://www.liverdoctor.com/antioxidants-free-radicals/>.
6. Devasagayam, T. P. A. *et al.* Free radicals and antioxidants in human health: Current status and future prospects. *Journal of Association of Physicians of India* vol. 52 794–804 (2004).
7. Phaniendra, A., Jestadi, D. B. & Periyasamy, L. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian J. Clin. Biochem.* **30**, 11–26 (2015).
8. Valko, M. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Elsevier* **39**, 44–84 (2007).
9. What are free radicals, anyway? - Solésence. <https://solesence.com/what-are-free-radicals-anyway/>.
10. Chance, B., Sies, H. & Boveris, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* **59**, 527–605 (1979).
11. Nephrology, N. Π.-Ε. Ν.-Η. & 2014, undefined. Οξειδωτικό στρες και ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημα Ι. Δραστικές ρίζες οξυγόνου-Oxidative stress and the endogenous antioxidant system. I. Reactive oxygen. *ene.gr*.
12. Mitochondrial ROS - Wikiwand.
https://www.wikiwand.com/en/Mitochondrial_ROS.
13. Islinger, M., Voelkl, A., Fahimi, H. D. & Schrader, M. The peroxisome: an update on mysteries 2.0. *Histochem. Cell Biol.* **150**, 443–471 (2018).
14. Schrader, M., Kamoshita, M. & Islinger, M. Organelle interplay—peroxisome interactions in health and disease. *J. Inherit. Metab. Dis.* **43**, 71–89 (2020).
15. Luis, A., Sandalio, L., Palma, J., ... P. B.-F. R. B. and & 1992, undefined. Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implications. *Elsevier*.
16. Corpas, F. J., Barroso, J. B. & Del Río, L. A. Peroxisomes as a source of

- reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends Plant Sci.* **6**, 145–150 (2001).
17. Gross, E. *et al.* Generating disulfides enzymatically: Reaction products and electron acceptors of the endoplasmic reticulum thiol oxidase Ero1p. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 299–304 (2006).
 18. Cao, S. S. & Kaufman, R. J. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in cell fate decision and human disease. *Antioxidants Redox Signal.* **21**, 396–413 (2014).
 19. Singh, A., Kukreti, R., Saso, L. & Kukreti, S. Oxidative stress: A key modulator in neurodegenerative diseases. *Molecules* **24**, (2019).
 20. O’neill, P., biology, E. F.-A. in radiation & 1993, undefined. Primary free radical processes in DNA. *Elsevier*.
 22. Lagouge, M., medicine, N. L.-J. of internal & 2013, undefined. The role of mitochondrial DNA mutations and free radicals in disease and ageing. *Wiley Online Libr.* **273**, 529–543 (2013).
 23. Difference Between Base Excision Repair and Nucleotide Excision Repair | Compare the Difference Between Similar Terms.
<https://www.differencebetween.com/difference-between-base-excision-repair-and-vs-nucleotide-excision-repair/>.
 24. Cadenas, E., medicine, K. D.-F. radical biology and & 2000, undefined. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Elsevier*.
 25. Barja, G. The flux of free radical attack through mitochondrial DNA is related to aging rate. *Aging Clin. Exp. Res.* **12**, 342–355 (2000).
 26. Lu, T. *et al.* Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain. *Nat.* 2004 4296994 **429**, 883–891 (2004).
 27. Dorszewska, J. Cell biology of normal brain aging: Synaptic plasticity-cell death. *Aging Clin. Exp. Res.* **25**, 25–34 (2013).
 28. deRojas-Walker, T., Tamir, S., Ji, H., Wishnok, J. S. & Tannenbaum, S. R. Nitric Oxide Induces Oxidative Damage in Addition to Deamination in Macrophage DNA. *Chem. Res. Toxicol.* **8**, 473–477 (1995).
 29. Abe, T., Tohgi, H., Isobe, C., Murata, T. & Sato, C. Remarkable increase in the concentration of 8-hydroxyguanosine in cerebrospinal fluid from patients with Alzheimer’s disease. *J. Neurosci. Res.* **70**, 447–450 (2002).
 30. Broedbaek, K. *et al.* Urinary excretion of biomarkers of oxidatively damaged DNA and RNA in hereditary hemochromatosis. *Elsevier* (2009)
doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.08.004.
 31. Tateyama, M. *et al.* Oxidative stress and predominant A β 42(43) deposition in

- myopathies with rimmed vacuoles. *Acta Neuropathol.* **105**, 581–585 (2003).
32. Costa, S. & Paulo Teixeira, J. Comet Assay. *Encycl. Toxicol. Third Ed.* 1020–1023 (2014) doi:10.1016/B978-0-12-386454-3.01072-1.
 33. transactions, B. H.-B. society & 2007, undefined. Biochemistry of oxidative stress. *Citeseer*.
 34. Dean, R. T., Fu, S., Stocker, R. & Davies, M. J. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem. J.* **324**, 1–18 (1997).
 35. Chevion, M., Berenshtein, E., research, E. S.-F. radical & 2000, undefined. Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage. *euopepmc.org*.
 36. Tuppo, E., Medicine, L. F.-J. of O. & 2001, undefined. Free radical oxidative damage and Alzheimer’s disease. *degruyter.com*.
 37. Kumar, H. *et al.* The role of free radicals in the aging brain and Parkinson’s disease: convergence and parallelism. *mdpi.com* **13**, 10478–10504 (2012).
 38. Tidball, J. G. & Wehling-Henricks, M. The role of free radicals in the pathophysiology of muscular dystrophy. *J. Appl. Physiol.* **102**, 1677–1686 (2007).
 39. medica, K. H.-P. & 2003, undefined. The role of free radicals in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *euopepmc.org*.
 40. Guéraud, F. *et al.* Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. *Free Radic. Res.* **44**, 1098–1124 (2010).
 41. Molecular, L. M.-M. R. and & 1999, undefined. Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. *Elsevier*.
 42. Fat becomes Free Radicals and green tea antioxidants neutralize free radicals - Mauna Kea Tea. <https://maunakeatea.com/fat-becomes-free-radicals-and-green-tea-antioxidants-neutralize-free-radicals/>.
 43. Pisoschi, A. M. & Pop, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur. J. Med. Chem.* **97**, 55–74 (2015).
 44. Espinosa-Diez, C. *et al.* Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biol.* **6**, 183–197 (2015).
 45. Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S. & Kalayci, O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ. J.* **5**, 9–19 (2012).
 46. Oxidative stress explained! - Nutrex. <https://www.nutrex.eu/insights/oxidative-stress-explained/>.
 47. Francenia Santos-Sánchez, N., Salas-Coronado, R., Villanueva-Cañongo, C. & Hernández-Carlos, B. Antioxidant Compounds and Their Antioxidant Mechanism. *Antioxidants* (2019) doi:10.5772/INTECHOPEN.85270.

48. Free Radicals Vs. Antioxidants and How They Impact Your Immune System. <https://kangensingapore.com/antioxidants-vs-free-radicals/>.
49. Flora, S. J. S. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2**, 191–206 (2009).
50. Bouayed, J., cellular, T. B.-O. medicine and & 2010, undefined. Exogenous antioxidants—double-edged swords in cellular redox state: health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *downloads.hindawi.com*.
51. Chiacchio, U., Gumina, G., Rescifina, A., Tetrahedron, R. R.- & 1996, undefined. Modified dideoxynucleosides: Synthesis of 2'-N-alkyl-3'-hydroxyalkyl-1', 2'-isoxazolidinyl thymidine and 5-fluorouridine derivatives. *Elsevier*.
52. Obied, H. K. Biography of biophenols: Past, present and future. *Funct. Foods Heal. Dis.* **3**, 230–241 (2013).
53. Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C. & Pouységu, L. Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **50**, 586–621 (2011).
54. Cutrim, C. S. & Cortez, M. A. S. A review on polyphenols: Classification, beneficial effects and their application in dairy products. *Int. J. Dairy Technol.* **71**, 564–578 (2018).
55. Woodward, K. A., Draijer, R., Thijssen, D. H. J. & Low, D. A. Polyphenols and Microvascular Function in Humans: A Systematic Review. *Curr. Pharm. Des.* **24**, 203–226 (2018).
56. De Groot, H. & Rauen, U. Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **12**, 249–255 (1998).
57. Sakihama, Y., Cohen, M. F., Grace, S. C. & Yamasaki, H. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: Phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology* **177**, 67–80 (2002).
58. Dixon, R. A. & Paiva, N. L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* **7**, 1085–1097 (1995).
59. Nutrients, W. K.- & 2019, undefined. Dietary polyphenols—important non-nutrients in the prevention of chronic noncommunicable diseases. A systematic review. *mdpi.com* **11**, (2019).
60. Mennen, L. I., Walker, R., Bennetau-Pelissero, C. & Scalbert, A. Risks and safety of polyphenol consumption. *Am. J. Clin. Nutr.* **81**, (2005).

61. Smith, A., Giunta, B., Bickford, P., ... M. F.-I. journal of & 2010, undefined. Nanolipidic particles improve the bioavailability and α -secretase inducing ability of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) for the treatment of Alzheimer's disease. *Elsevier*.
62. Kerasioti, E. *et al.* Polyphenolic composition of *Rosa canina*, *Rosa sempervivens* and *Pyrocantha coccinea* extracts and assessment of their antioxidant activity in human endothelial. *mdpi.com*
doi:10.3390/antiox8040092.
63. Ru, Q. *et al.* Tea Polyphenols Attenuate Methamphetamine-Induced Neuronal Damage in PC12 Cells by Alleviating Oxidative Stress and Promoting DNA Repair. *Front. Physiol.* **10**, (2019).
64. Kreatsouli, K., Fousteri, Z., Zampakas, K., Antioxidants, E. K.- & 2019, undefined. A polyphenolic extract from olive mill wastewaters encapsulated in whey protein and maltodextrin exerts antioxidant activity in endothelial cells. *mdpi.com*.
65. Kouka, P., Tsakiri, G., Tzortzi, D., ... S. D.-... M. and C. & 2019, undefined. The polyphenolic composition of extracts derived from different greek extra virgin olive oils is correlated with their antioxidant potency. *hindawi.com*.
66. Olive oil | European Commission. <https://ec.europa.eu/info/food-farming-fisheries/plants-and-plant-products/plant-products/olive-oil>.
67. Loukas, M. & Krimbas, C. B. History of olive cultivars based on their genetic distances. *J. Hortic. Sci.* **58**, 121–127 (1983).
68. Kapellakis, I., Tsagarakis, K., Environmental, J. C.-R. in & 2008, undefined. Olive oil history, production and by-product management. *Springer* **7**, 11–13 (2017).
69. Darsanaki, R. K., Aliabadi, M. A., Rokhi, M. L., Nourbakhsh, M. & Raeisi, G. Antimicrobial activity of olive leaf aqueous extract. *researchgate.net* **2012**, 4189–4191 (2012).
70. Delgado-Pertö, M., Äez, Â., Go Âmez-Cabrera, A. & Garrido, A. Predicting the nutritive value of the olive leaf (*Olea europaea*): digestibility and chemical composition and in vitro studies. *Elsevier*.
71. Οδηγός του παραγωγικού Ελαιώνα. <https://myoliveplant.gr/>.
72. Steinfeld, B. *et al.* The Role of Lean Process Improvement in Implementation of Evidence-Based Practices in Behavioral Health Care. *J. Behav. Heal. Serv. Res.* **42**, 504–518 (2015).
73. Varikou, K. *et al.* Olive cultivar differences in fruit phenolic compounds and size define host preference of *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae). *Int. J.*

- Pest Manag.* (2021) doi:10.1080/09670874.2021.2015009.
74. Ποντίκης, Κ.Α., 2003, «Ειδική Δενδρ... - Μελετητής Google.
https://scholar.google.com/scholar?hl=el&as_sdt=0%2C5&q=Ποντίκης%2C+Κ.Α.%2C+2003%2C+«Ειδική+Δενδροκομία%3A+Μηλεοειδή»%2C+Τόμος+Γ%2C+Εκδόσεις+Σταμούλη%2C+Αθήνα&btnG=.
 75. Markhali, S., Ferreira, J. A., Richards, T., Kikas, T. & Marchetti, J. M. Effect of processing on phenolic composition of olive oil products and olive mill by-products and possibilities for enhancement of sustainable processes. *mdpi.com* **9**, (2021).
 76. Cocolin, L. *et al.* NaOH-Debittering Induces Changes in Bacterial Ecology during Table Olives Fermentation. *PLoS One* **8**, (2013).
 77. Nychas, G. J. E., Panagou, E. Z., Parker, M. L., Waldron, K. W. & Tassou, C. C. Microbial colonization of naturally black olives during fermentation and associated biochemical activities in the cover brine. *Lett. Appl. Microbiol.* **34**, 173–177 (2002).
 78. Tassou, C., Panagou, E., Microbiology, K. K.-F. & 2002, undefined. Microbiological and physicochemical changes of naturally black olives fermented at different temperatures and NaCl levels in the brines. *Elsevier*.
 79. Arroyo-López, F. N. *et al.* Yeasts in table olive processing: Desirable or spoilage microorganisms? *Int. J. Food Microbiol.* **160**, 42–49 (2012).
 80. Johnson, R. L. & Mitchell, A. E. Reducing Phenolics Related to Bitterness in Table Olives. *J. Food Qual.* **2018**, (2018).
 81. Piga, A., Gambella, F., ... V. V.-I. J. of F. & 2001, undefined. Response of three Sardinian olive cultivars to Greek-style processing. *academia.edu*.
 82. Maldonado, M., Zuritz, C., engineering, M. A.-J. of food & 2008, undefined. Diffusion of glucose and sodium chloride in green olives during curing as affected by lye treatment. *Elsevier*.
 83. Martiny, T. R., Raghavan, V., De Moraes, C. C., Da Rosa, G. S. & Dotto, G. L. Optimization of green extraction for the recovery of bioactive compounds from Brazilian olive crops and evaluation of its potential as a natural preservative. *J. Environ. Chem. Eng.* **9**, 105130 (2021).
 84. Psani, M. & Kotzekidou, P. Technological characteristics of yeast strains and their potential as starter adjuncts in Greek-style black olive fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 1329–1336 (2006).
 85. Rejano, L., Montaña, A., Casado, F., ... A. S.-O. and olive oil in & 2010, undefined. Table olives: varieties and variations. *Elsevier*.
 86. Sabatini, N., chemistry, V. M.-F. & 2008, undefined. Volatile compounds in

- table olives (*Olea Europaea* L., Nocellara del Belice cultivar). *Elsevier*
doi:10.1016/j.foodchem.2007.10.008.
87. Marsilio, V. *et al.* Use of a lactic acid bacteria starter culture during green olive (*Olea europaea* L cv Ascolana tenera) processing. *Wiley Online Libr.* **85**, 1084–1090 (2005).
 88. Parinos, C., Stalikas, C., ... T. G.-J. of hazardous & 2007, undefined. Chemical and physicochemical profile of wastewaters produced from the different stages of Spanish-style green olives processing. *Elsevier*.
 89. Home - International Olive Council. <https://www.internationaloliveoil.org/>.
 90. Ambra, R. *et al.* Phenolics fate in table olives (*Olea europaea* L. cv. Nocellara del Belice) debittered using the Spanish and Castelvetro methods. *Elsevier*.
 91. Brenes, M., and, A. de C.-J. of the S. of F. & 1998, undefined. Transformation of oleuropein and its hydrolysis products during Spanish-style green olive processing. *Wiley Online Libr.*
 92. Romero-Segura, C., Sanz, C. & Perez, A. G. Purification and characterization of an olive fruit β -glucosidase involved in the biosynthesis of virgin olive oil phenolics. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 7983–7988 (2009).
 93. Ramírez, E. *et al.* Oleuropein hydrolysis in natural green olives: Importance of the endogenous enzymes. *Elsevier* (2016)
doi:10.1016/j.foodchem.2016.03.061.
 94. Arroyo-López, F., microbiology, J. B.-G.-... & 2012, undefined. Formation of lactic acid bacteria–yeasts communities on the olive surface during Spanish-style Manzanilla fermentations. *Elsevier*.
 95. Jiménez, A., Guillén, R., Fernández-Bolaños, J. & Heredia, A. Factors Affecting the ‘Spanish Green Olive’ Process: Their Influence on Final Texture and Industrial Losses. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 4065–4070 (1997).
 96. Triterpenic acids in table olives. *Elsevier*.
 97. Bellis, P. De, Valerio, F., Sisto, A., ... S. L.-I. journal of & 2010, undefined. Probiotic table olives: microbial populations adhering on olive surface in fermentation sets inoculated with the probiotic strain *Lactobacillus paracasei* IMPC2. 1 in an. *Elsevier*.
 98. Charoenprasert, S. Mechanism of formation and mitigation of acrylamide in California-style black ripe olives. (2014).
 99. Ciafardini, G., Zullo, B. A. & Cioccia, G. Effect of lipase-producing yeast on the oily fraction of microbiologically debittered table olives. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **107**, 851–856 (2005).
 100. Segovia-Bravo, K., Jarén-Galán, M., Chemistry, P. G.-G.-F. & 2009,

- undefined. Browning reactions in olives: mechanism and polyphenols involved. *Elsevier*.
101. Benítez, F. J., Acero, J. L., González, T. & García, J. Application of ozone and advanced oxidation processes to the treatment of lye-wastewaters from the table olives industry. *Ozone Sci. Eng.* **24**, 105–116 (2002).
 102. Herrero, M. *et al.* New possibilities for the valorization of olive oil by-products. *J. Chromatogr. A* **1218**, 7511–7520 (2011).
 103. Botsoglou, E., Govaris, A., Christaki, E., Chemistry, N. B.-F. & 2010, undefined. Effect of dietary olive leaves and/or α -tocopheryl acetate supplementation on microbial growth and lipid oxidation of turkey breast fillets during refrigerated storage. *Elsevier*.
 104. Talhaoui, N., Taamalli, A., ... A. G.-C.-F. R. & 2015, undefined. Phenolic compounds in olive leaves: Analytical determination, biotic and abiotic influence, and health benefits. *Elsevier*.
 105. Difonzo, G. *et al.* The challenge of exploiting polyphenols from olive leaves: addition to foods to improve their shelf-life and nutritional value. *J. Sci. Food Agric.* **101**, 3099–3116 (2021).
 106. Bouaziz, M. *et al.* Effect of storage on refined and husk olive oils composition: Stabilization by addition of natural antioxidants from Chemlali olive leaves. *Elsevier*.
 107. Exarchou, V. *et al.* Phytochemicals in olive-leaf extracts and their antiproliferative activity against cancer and endothelial cells. *Wiley Online Libr.* **53**, 600–608 (2009).
 108. Bendini, A. *et al.* 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. *mdpi.com* **12**, 1679–1719 (2007).
 109. Covas, M. I. *et al.* The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors: A randomized trial. *Ann. Intern. Med.* **145**, 333–341 (2006).
 110. Panche, A. N., Diwan, A. D. & Chandra, S. R. Flavonoids: An overview. *J. Nutr. Sci.* **5**, (2016).
 111. Ryan, D., Prenzler, P. D., Lavee, S., Antolovich, M. & Robards, K. Quantitative changes in phenolic content during physiological development of the olive (*Olea europaea*) cultivar Hardy's Mammoth. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 2532–2538 (2003).
 112. García-Vico, L., García-Rodríguez, R., Sanz, C. & Pérez, A. G. Biochemical aspects of olive freezing-damage: Impact on the phenolic and volatile profiles of virgin olive oil. *LWT - Food Sci. Technol.* **86**, 240–246 (2017).

113. Gómez-Caravaca, A. M., Maggio, R. M. & Cerretani, L. Chemometric applications to assess quality and critical parameters of virgin and extra-virgin olive oil. A review. *Anal. Chim. Acta* **913**, 1–21 (2016).
114. Brahmi, F., Mechri, B., Dhibi, M. & Hammami, M. Variation in antioxidant activity and phenolic content in different organs of two Tunisian cultivars of *Olea europaea* L. *Acta Physiol. Plant.* **36**, 169–178 (2014).
115. Bilgin, M. & Şahin, S. Effects of geographical origin and extraction methods on total phenolic yield of olive tree (*Olea europaea*) leaves. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **44**, 8–12 (2013).
116. Heimler, D., Cimato, A., Alessandri, S., ... G. S.-A. & 1996, undefined. Seasonal trend of flavonoids in olive (*Olea europaea* L.) leaves. *researchgate.net*.
117. Fabbri, A., Galaverna, G., 791, T. G.-S. on O. G. & 2004, undefined. Polyphenol composition of olive leaves with regard to cultivar, time of collection and shoot type. *actahort.org*.
118. Hura, K., Rapacz, M., Hura, T., Żur, I. & Filek, M. The effect of cold on the response of *Brassica napus* callus tissue to the secondary metabolites of *Leptosphaeria maculans*. *Acta Physiol. Plant.* **37**, (2015).
119. Heimler, D., ... A. C. O. L. (" O. E. L. . as & 2002, undefined. Flavonoids from Olive Leaves (' *Olea Europaea*' L.) as Affected by Light. *torrossa.com*.
120. Borjan, D., Leitgeb, M., Knez, Ž., Molecules, M. H.- & 2020, undefined. Microbiological and antioxidant activity of phenolic compounds in olive leaf extract. *mdpi.com* **25**, (2020).
121. Susalit, E. *et al.* Olive (*Olea europaea*) leaf extract effective in patients with stage-1 hypertension: comparison with Captopril. *Elsevier* (2010) doi:10.1016/j.phymed.2010.08.016.
122. Boss, A., Bishop, K. S., Marlow, G., Barnett, M. P. G. & Ferguson, L. R. Evidence to support the anti-cancer effect of olive leaf extract and future directions. *mdpi.com* **8**, (2016).
123. Pereira, A. P. *et al.* Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves. *mdpi.com* **12**, 1153–1162 (2007).
124. Mira, L. *et al.* Interactions of flavonoids with iron and copper ions: A mechanism for their antioxidant activity. *Free Radic. Res.* **36**, 1199–1208 (2002).
125. Japón-Luján, R., Luque-Rodríguez, J. M. & Luque De Castro, M. D. Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. *J. Chromatogr. A* **1108**, 76–82 (2006).

126. Şahin, S., and, M. B.-J. of the S. of F. & 2018, undefined. Olive tree (*Olea europaea* L.) leaf as a waste by-product of table olive and olive oil industry: a review. *Wiley Online Libr.* **98**, 1271–1279 (2017).
127. Antoniou, C. & Hull, J. The Anti-cancer Effect of *Olea europaea* L. Products: a Review. *Curr. Nutr. Rep.* (2021) doi:10.1007/S13668-021-00350-8.
128. Fares, R., Bazzi, S., Baydoun, S. E. & Abdel-Massih, R. M. The Antioxidant and Anti-proliferative Activity of the Lebanese *Olea europaea* Extract. *Plant Foods Hum. Nutr.* **66**, 58–63 (2011).
129. Goldsmith, C., Vuong, Q., Molecules, E. S.- & 2015, undefined. Phytochemical properties and anti-proliferative activity of *Olea europaea* L. leaf extracts against pancreatic cancer cells. *mdpi.com*.
130. Acquaviva, R., ... C. D. G.-I. & 2012, undefined. Antiproliferative effect of oleuropein in prostate cell lines. *spandidos-publications.com* **41**, 31–38 (2012).
131. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Elsevier*.
132. Sudjana, A. N. *et al.* Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. *Elsevier* **33**, 461–463 (2009).
133. Tassou, C., Nychas, G. & Board, R. Effect of phenolic compounds and oleuropein on the germination of *Bacillus cereus* T spores. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **13**, 231–237 (1991).
134. Erbay, Z. & Icier, F. The importance and potential uses of olive leaves. *Food Rev. Int.* **26**, 319–334 (2010).
135. Techathuvanan, C., Jurado, F. R. & Davidson, P. M. Efficacy of commercial natural antimicrobials alone and in combinations against pathogenic and spoilage microorganisms. *meridian.allenpress.com* (2014) doi:10.4315/0362-028X.JFP-13-288.
136. Moore, K., Patel, J., ... D. J.-J. of F. & 2011, undefined. Antimicrobial Activity of Apple, Hibiscus, Olive, and Hydrogen Peroxide Formulations against *Salmonella enterica* on Organic Leafy Greens. *meridian.allenpress.com* (2011) doi:10.4315/0362-028X.JFP-11-174.
137. Liu, Y., McKeever, L. C. & Malik, N. S. A. Assessment of the antimicrobial activity of olive leaf extract against foodborne bacterial pathogens. *Front. Microbiol.* **8**, (2017).
138. Charoenprasert, S., Food, A. M.-J. of A. and & 2012, undefined. Factors influencing phenolic compounds in table olives (*Olea europaea*). *ACS Publ.* **60**, 7081–7095 (2012).
139. Roca, M., food, M. M.-M.-J. of agricultural and & 2001, undefined. Changes in

- chloroplast pigments of olive varieties during fruit ripening. *ACS Publ.* **49**, 832–839 (2001).
140. Soler-Rivas, C., Agriculture, J. E.-... of F. and & 2000, undefined. Oleuropein and related compounds. *Wiley Online Libr.*
 141. Belaqziz, M. *et al.* Assessment of the antioxidant and antibacterial activities of different olive processing wastewaters. *PLoS One* **12**, (2017).
 142. Kiai, H., Raiti, J., El Abbassi, A. & Hafidi, A. Chemical Profiles of Moroccan Picholine Olives and Its Brines during Spontaneous Fermentation. *Int. J. Fruit Sci.* 1–16 (2020) doi:10.1080/15538362.2020.1785986.
 143. Kouka, P., Chatzieffraimidi, G., Raftis, G., Phytomedicine, D. S.- & 2018, undefined. Antioxidant effects of an olive oil total polyphenolic fraction from a Greek *Olea europaea* variety in different cell cultures. *Elsevier.*
 144. ATCC: The Global Bioresource Center | ATCC. <https://www.atcc.org/>.
 145. Keles, M., Taysi, S., Sen, N., ... H. A.-C. journal of & 2001, undefined. Effect of corticosteroid therapy on serum and CSF malondialdehyde and antioxidant proteins in multiple sclerosis. *cambridge.org* **28**, 141–143 (2001).
 146. Collins, A. R. *et al.* The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* **23**, 143–151 (2008).
 147. Liao, W., McNutt, M., Methods, W. Z.- & 2009, undefined. The comet assay: a sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Elsevier.*
 148. Granados-Principal, S., ... J. Q.-N. & 2010, undefined. Hydroxytyrosol: from laboratory investigations to future clinical trials. *academic.oup.com.*
 149. Cardinali, A. *et al.* Verbascoside, isoverbascoside, and their derivatives recovered from olive mill wastewater as possible food antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 1822–1829 (2012).
 150. Calabrese, E. J. Hormesis: a revolution in toxicology, risk assessment and medicine. *EMBO Rep.* **5 Spec No**, S37–S40 (2004).
 151. Rincón-Llorente, B., De la Lama-Calvente, D., Fernández-Rodríguez, M. J. & Borja-Padilla, R. Table olive wastewater: Problem, treatments and future strategy. A review. *Front. Microbiol.* **9**, 1641 (2018).
 152. Melliou, E., Zweigenbaum, J. A. & Mitchell, A. E. Ultrahigh-pressure liquid chromatography triple-quadrupole tandem mass spectrometry quantitation of polyphenols and secoiridoids in california-style black ripe olives and dry salt-cured olives. *J. Agric. Food Chem.* **63**, 2400–2405 (2015).
 153. Jemai, H. *et al.* Hypolipidemic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves. *Elsevier.*
 154. Veskoukis, A., Kyparos, A., ... M. N.-... medicine and cellular & 2012,

- undefined. The antioxidant effects of a polyphenol-rich grape pomace extract in vitro do not correspond in vivo using exercise as an oxidant stimulus. *hindawi.com*.
155. Lins, P., Pugine, S., Scatolini, A., Heliyon, M. de M.- & 2018, undefined. In vitro antioxidant activity of olive leaf extract (*Olea europaea* L.) and its protective effect on oxidative damage in human erythrocytes. *Elsevier*.
 156. Moudache, M., Nerín, C., Colon, M., chemistry, F. Z.-F. & 2017, undefined. Antioxidant effect of an innovative active plastic film containing olive leaves extract on fresh pork meat and its evaluation by Raman spectroscopy. *Elsevier*.
 157. Khemakhem, I. *et al.* Olive leaf extracts for shelf life extension of salmon burgers. *journals.sagepub.com* **25**, 91–100 (2019).
 158. Caponio, F., Difonzo, G., Calasso, M., ... L. C.-F. R. & 2019, undefined. Effects of olive leaf extract addition on fermentative and oxidative processes of table olives and their nutritional properties. *Elsevier*.
 159. Difonzo, G., Pasqualone, A., Silletti, R., ... L. C.-F. R. & 2018, undefined. Use of olive leaf extract to reduce lipid oxidation of baked snacks. *Elsevier*.
 161. Topalović, D. Ž., ... L. Ž.-... medicine and cellular & 2015, undefined. Dry olive leaf extract counteracts L-thyroxine-induced genotoxicity in human peripheral blood leukocytes in vitro. *hindawi.com*.
 162. Čabarkapa, A. *et al.* Protective effect of dry olive leaf extract in adrenaline induced DNA damage evaluated using in vitro comet assay with human peripheral leukocytes. *Elsevier*.
 163. Fuccelli, R., Rosignoli, P., Servili, M., ... G. V.-F. and C. & 2018, undefined. Genotoxicity of heterocyclic amines (HCAs) on freshly isolated human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and prevention by phenolic extracts. *Elsevier*.
 164. Zorić, N., Kopjar, N., ... J. V. R.-A. & 2021, undefined. Protective effects of olive oil phenolics oleuropein and hydroxytyrosol against hydrogen peroxide-induced DNA damage in human peripheral lymphocytes. *hrcak.srce.hr* doi:10.2478/acph-2021-0003.
 165. Espeso, J. *et al.* Olive Leaf Waste Management. *Front. Sustain. Food Syst.* **5**, (2021).