



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**



## **ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**

# **ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ**

**ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ**

**ΤΣΑΚΙΡΗ ΓΡΗΓΟΡΙΑ  
ΛΑΡΙΣΑ 2018**

***“Συσχέτιση σύστασης και αντιοξειδωτικής δράσης σε πολυφαινολικά εκχυλίσματα ελληνικών ελαιολάδων”***

Τσακίρη Γρηγορία

Επιβλέπων καθηγητής: Κουρέτας Δημήτριος  
Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών

***“Correlation of composition and antioxidant activity in polyphenolic extracts of Greek olive oils”***

Tsakiri Grigoria

Supervisor Professor: Kouretas Dimitrios  
Laboratory of animal physiology

## ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

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

**Αμούτζιας Γρηγόριος :** Επίκουρος Καθηγητής Βιοπληροφορικής στη Γενωμική, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

## Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Δημήτρη Κουρέτα, Καθηγητή Τοξικολογίας και Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, για την ανάθεση της διπλωματικής μου εργασίας και για την ευκαιρία που μου πρόσφερε να ασχοληθώ με ένα ενδιαφέρον θέμα, αποκτώντας νέες και πολύτιμες γνώσεις.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στην υποψήφια διδάκτορα Παρασκευή Κούκα για την αμέριστη βοήθεια και καθοδήγηση της τόσο κατά την διάρκεια των πειραμάτων, όσο και κατά την συγγραφή της παρούσας εργασίας.

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω όλη την ομάδα του εργαστηρίου για το φιλικό κλίμα συνεργασίας και τη βοήθεια, που μου προσέφεραν όποτε τη χρειαζόμουν.

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

## Περίληψη

Το ελαιόλαδο εδώ και αιώνες κατέχει εξέχουσα θέση στη διατροφή των μεσογειακών λαών, προσφέροντας πολυάριθμα πλεονεκτήματα στην ανθρώπινη υγεία και ευεξία. Πολλές είναι οι μελέτες, που έχουν πραγματοποιηθεί, ανά τον κόσμο, για την αξιολόγηση των ευεργετικών αυτών ιδιοτήτων του ελαιολάδου. Στην συγκεκριμένη μελέτη εξετάστηκε η αντιοξειδωτική δράση δύο πολυφαινολικών εκχυλισμάτων ελληνικού παρθένου ελαιολάδου, που προήλθε από την ενδημική ποικιλία ελιάς κορωνέικη, η οποία αποτελεί την πιο σημαντική ελαιοποιήσιμη ποικιλία ελιάς στην Ελλάδα και χρησιμοποιείται αποκλειστικά για την παραγωγή λαδιού εξαιρετικής ποιότητας. Πιο συγκεκριμένα τα δύο εκχυλίσματα περιείχαν διαφορετικές ποσότητες από δύο κυρίαρχα είδη πολυφαινολών του ελαιολάδου, την υδροξυτυροσόλη και την τυροσόλη. Λόγω αυτής της διαφορετικής πολυφαινολικής σύστασης των δύο εκχυλισμάτων, έγινε προσπάθεια συσχέτισης της με την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων.

Από τα αποτελέσματα φάνηκε πως το εκχύλισμα με περίσσεια υδροξυτυροσόλης εμφάνισε ισχυρότερη ικανότητα στην εξουδετέρωση ελευθέρων ριζών. Το γεγονός αυτό πιθανώς να οφείλεται στην διαφορετική της δομή και πιο συγκεκριμένα στην επιπλέον υδροξυλομάδα, που διαθέτει. Επίσης πραγματοποιήθηκε εκτίμηση της προστατευτικής δράσης των εκχυλισμάτων απέναντι στην επαγόμενη από ρίζες ROO• πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA, όπου το ίδιο εκχύλισμα εμφάνισε ισχυρότερη DNA προστατευτική δράση, επιβεβαιώνοντας την παραπάνω παρατήρηση. Τέλος τα πολυφαινολικά εκχυλίσματα μελετήθηκαν και σε κυτταρικό επίπεδο και συγκεκριμένα σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα τραχήλου της μήτρας (HeLa). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα και τα δύο εκχύλιστα εμφάνισαν ικανότητα προστατευτική για τα κύτταρα έναντι οξειδωτικής βλάβης, βελτιώνοντας τους δείκτες οξειδωτικού στρες και συγκεκριμένα αυξάνοντας την γλουταθειόνη (GSH) στα κύτταρα, με το εκχύλισμα με περίσσεια υδροξυτυροσόλης έναντι της τυροσόλης, να εμφανίζει την μεγαλύτερη αύξηση. Η αύξηση της GSH πιθανόν να προήλθε από την ικανότητα των εκχυλισμάτων να επηρεάζουν τα επίπεδα έκφρασης διαφόρων αντιοξειδωτικών ενζύμων.

## Abstract

Olive oil has a prominent place in the diet of people, who live in the Mediterranean region, for many centuries, offering numerous benefits to human health and well-being. There are many studies that have been carried out around the world to evaluate these beneficial properties of olive oil. This study examined the antioxidant effect of two polyphenolic extracts of Greek virgin olive oil, derived from the endemic olive variety Koroneiki, which is the most important olive oil variety in Greece and used exclusively for the production of excellent quality of oil. In particular, the two extracts consists of different amounts of two predominant types of olive oil polyphenols, hydroxytyrosol and tyrosol. The purpose of this study was an attempt to corellate the antioxidant activity with the different polyphenolic composition of two polyphenolic olive oil extracts.

The results showed that the extract with the excess amount of hydroxytyrosol had a stronger ability to scavenge free radicals. This is probably due to the different structure of hydrotyrosol and, more specifically, to the extra hydroxyl group it has. Also, an evaluation of the protective effect of the extracts against the induction of single-stranded DNA fragments, by ROO• radicals, was performed, in which the same extract showed a stronger DNA-protective effect, confirming the observation above. The polyphenolic extracts were also studied at cellular level and specifically in human cervical cancer cells (HeLa). According to the results, both extracts showed protective capacity against oxidative damage by improving the oxidative stress markers and in particular by increasing glutathione (GSH) in the cells. The extract with the excess amount of hydroxytyrosol exhibited greater increase, compared to the other extract. The increase in GSH may be attributed to the extract's ability to affect the expression levels of several antioxidant enzymes.

## Περιεχόμενα

Τριμελής επιτροπή.....	3
Ευχαριστίες.....	4
Περίληψη.....	5
Abstrast.....	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	11
1.1 Ελεύθερες ρίζες.....	11
1.2 Δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS).....	12
1.2.1 Δημιουργία ελευθέρων ριζών .....	12
1.3 Οξειδωτικό στρες.....	15
1.3.1 Επιπτώσεις οξειδωτικού στρες στα βιομόρια .....	15
1.4 Αντιοξειδωτικοί παράγοντες .....	18
1.4.1 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί .....	18
1.5 Πολυφαινόλες .....	19
1.5.1 Κατηγορίες πολυφαινολών .....	19
1.5.2 Δράση πολυφαινολών .....	21
1.5.3 Μεταβολισμός και βιοδιαθεσιμότητα πολυφαινολών .....	22
1.6 Το ελαιόλαδο .....	24
1.6.1 Χημική σύσταση ελαιολάδου .....	27
1.6.2 Δράση των πολυφαινολών του ελαιολάδου .....	28
1.6.3 Υδροξυτυροσόλη-Τυροσόλη .....	29
1.7 Ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα τραχήλου της μήτρας (HeLa) .....	30
2. ΣΚΟΠΟΣ .....	31
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	32
3.1 Πολυφαινολικά εκχυλίσματα ελαιολάδων .....	32
3.2 Σύσταση των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων ελαιολάδου.....	34
3.3 Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς HeLa .....	34
3.4 Προσδιορισμός της κυτταροτοξικής δράσης του εκχυλίσματος με τη μέθοδο ΧΤΤ.....	36
3.5 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας ABTS•+.....	38

3.6 Εκτίμηση της προστατευτικής δράσης απέναντι στην επαγόμενη από ρίζες ROO• πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA .....	40
3.6.1. Μέθοδος χαλάρωσης πλασμιδιακού DNA (Plasmid relaxation assay).....	40
3.6.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA.....	41
3.6.3 Εκτίμηση της προστατευτικής δράσης απέναντι στην επαγόμενη από ρίζες ROO• πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA .....	43
3.6.4 Ποσοτικός προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής/προστατευτικής δράσης απέναντι στην επαγόμενη από ελεύθερες ρίζες πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA .....	44
3.7 Προσδιορισμός των επιπέδων της GSH και των ROS με κυτταρομετρία ροής .....	45
3.8 Στατιστική ανάλυση .....	47
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	48
4.1 Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω δέσμευσης της ρίζας ABTS <sup>•+</sup> .....	48
4.2. Ποσοτικός προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής/προστατευτικής δράσης απέναντι στην επαγόμενη από ελεύθερες ρίζες πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA.....	48
4.3 Προσδιορισμός κυτταροτοξικής δράσης ουσιών με τη μέθοδο ΧΤΤ.....	51
4.4 Προσδιορισμός της οξειδοαναγωγικής κατάστασης με κυτταρομετρία ροής .....	51
4.4.1. Επίπεδα γλουταθειόνης (GSH).....	51
4.4.2. Επίπεδα δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS).....	55
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	58
6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	63



## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Παραγωγή ROS στα μιτοχόνδρια.....	13
Εικόνα 2: Εξωγενείς παράγοντες που οδηγούν στην παραγωγή ελευθέρων ριζών.....	14
Εικόνα 3: Οξειδωτικό στρες.....	15
Εικόνα 4: Διαταραχές που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες.....	17
Εικόνα 5: Τρόπος δράσης αντιοξειδωτικών παραγόντων.....	18
Εικόνα 6: Κατηγορίες πολυφαινολών.....	20
Εικόνα 7: Μονοπάτια απορρόφησης και μεταβολισμού των πολυφαινολών και των παραγώγων τους στον άνθρωπο.....	23
Εικόνα 8: Ποικιλίες ελιάς.....	27
Εικόνα 9: Δομή χαρακτηριστικών πολυφαινολών ελαιολάδου.....	28
Εικόνα 10: Βιολογικές δράσεις υδροξυτυροσόλης.....	30
Εικόνα 11: HeLa κύτταρα από καλλιέργεια.....	31
Εικόνα 12: Διαγραμματική απεικόνιση της διαδικασίας εκχύλισης.....	32
Εικόνα 13: Εξαγωγή ολικού πολυφαινολικού κλάσματος από το ελαιόλαδο και απομόνωση των επιμέρους συστατικών του.....	33
Εικόνα 14: Διαδικασία καλλιέργειας κυττάρων.....	35
Εικόνα 15: Μεταβολισμός του ΧΤΤ σε υδατοδιαλυτή φορμαζάνη από ζωντανά κύτταρα.....	36
Εικόνα 16: Παραγωγή της ρίζας του ABTS•- μέσω της δράσης περοξειδάσης παρουσία H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	38
Εικόνα 17: Μηχανισμός αλληλεπίδρασης αντιοξειδωτική ουσίας με τη ρίζα του ABTS•+.....	39
Εικόνα 18: Διαμορφώσεις του πλασμιδιακού DNA.....	41
Εικόνα 19: Χημική δομή της ένωσης AAPH και οι αντιδράσεις της θερμικής της διάσπασης και του σχηματισμού των ριζών ROO•.....	43
Εικόνα 20: Υδροδυναμική εστίαση του δείγματος μέσα από το θάλαμο ροής.....	46
Εικόνα 21: Το μηχάνημα της κυτταρομετρίας ροής από την Becton-Dickinson.....	46
Εικόνα 22: Εικόνα από το πήκτωμα αгарόζης για Α) το OLE19, Β) το OLE 20.....	50
Εικόνα 24: Το μονοπάτι μεταγωγής σήματος Keap1-Nrf2.....	61

## **ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ**

Πίνακας 1: Δραστικές μορφές οξυγόνου.....	12
Πίνακας 2: Σύσταση πολυφαινολικών εκχυλισμάτων ελαιόλαδου.....	34

## **ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ**

Διάγραμμα 1 .....	48
Διάγραμμα 2 .....	49
Διάγραμμα 3 .....	49
Διάγραμμα 4 .....	51
Διάγραμμα 5 .....	52
Διάγραμμα 6 .....	53
Διάγραμμα 7 .....	54
Διάγραμμα 8 .....	55
Διάγραμμα 9 .....	56
Διάγραμμα 10 .....	57

## 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Ελεύθερες ρίζες

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

Οι ελεύθερες ρίζες έχουν συνδεθεί κυρίως με τις βλάβες που δημιουργούν στον οργανισμό. Όμως έχει δειχθεί ότι εμπλέκονται και σε φυσιολογικές διαδικασίες. Πολλές από αυτές και ειδικά οι ROS παίζουν ρόλο στη δράση του ανοσοποιητικού συστήματος απέναντι στα αντιγόνα, κατά τη διάρκεια της φαγοκύτωσης (Finaud et al., 2006). Αυτό συμβαίνει και κατά την διάρκεια της φλεγμονής, η οποία μπορεί να εμφανιστεί για διάφορους λόγους, όπως μετά από έντονη άσκηση που προκαλεί μυϊκό τραυματισμό. Ακόμα μπορεί να έχουν ρόλο σηματοδοτικών μορίων και έτσι συμμετέχουν στην διακυτταρική επικοινωνία (Reid, 2001), τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την απόπτωση, τη μυϊκή συστολή και την έκφραση γονιδίων (Ji, 1999).

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

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

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

Πίνακας 2: Δραστικές μορφές οξυγόνου

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

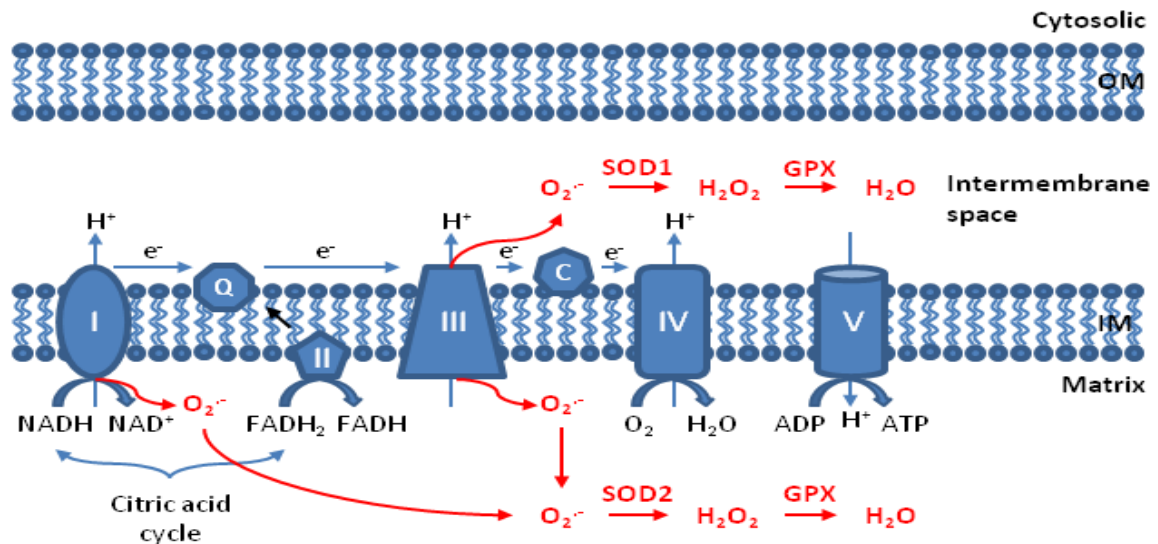
### 1.2.1. Δημιουργία Ελευθέρων Ριζών

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

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

A) Η πιο σημαντική πηγή ελεύθερων ριζών είναι μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (εικόνα 1), σύμφωνα με την οποία τα ηλεκτρόνια του NADH και  $FADH_2$  μεταφέρονται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, το οποίο αποτελείται από τρία συμπλέγματα πρωτεϊνών ενσωματωμένων στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων (σύμπλεγμα NADH δεϋδρογονάσης, σύμπλεγμα αναγωγάσης κυτοχρώματος c, σύμπλεγμα οξειδάσης κυτοχρώματος c) και από δύο ελεύθερα διαχεόμενα μόρια (ουβικινόνη, κυτόχρωμα c) που μεταφέρουν ηλεκτρόνια από το ένα σύμπλεγμα στο άλλο. Τελικός αποδέκτης των ηλεκτρονίων είναι το μοριακό οξυγόνο, το οποίο ανάγεται πλήρως προς νερό, ενώ

ταυτόχρονα η ενέργεια που δημιουργείται κατά τη μετακίνηση των πρωτονίων αποθηκεύεται στην ATP μέσω της συνθετάσης του ATP. Αυτό αφορά το 95-99% του οξυγόνου. Το υπόλοιπο οξυγόνο διαφεύγει από τα συμπλέγματα πρωτεϊνών με τη μορφή μονήρους οξυγόνου και σουπεροξειδίου (Παπαγαλάνης, 2014).



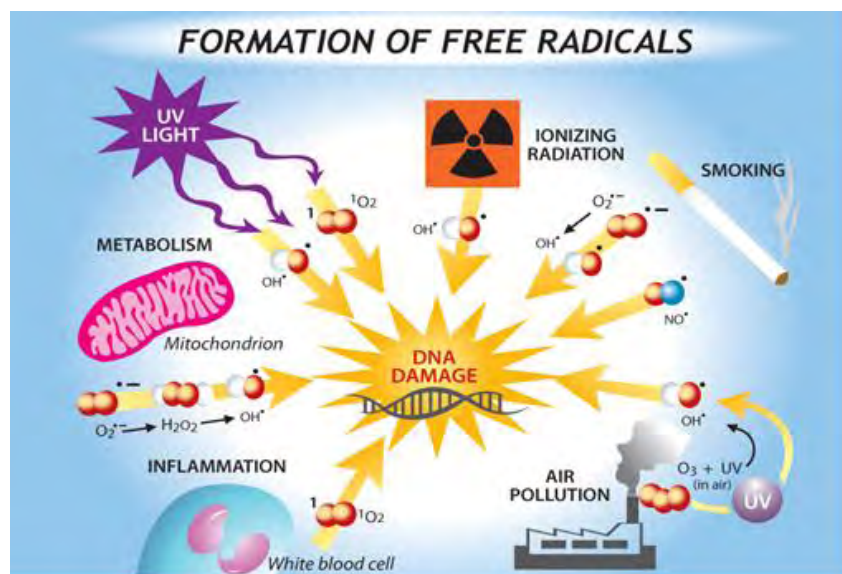
Εικόνα 1: Παραγωγή ROS στα μιτοχόνδρια

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

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

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

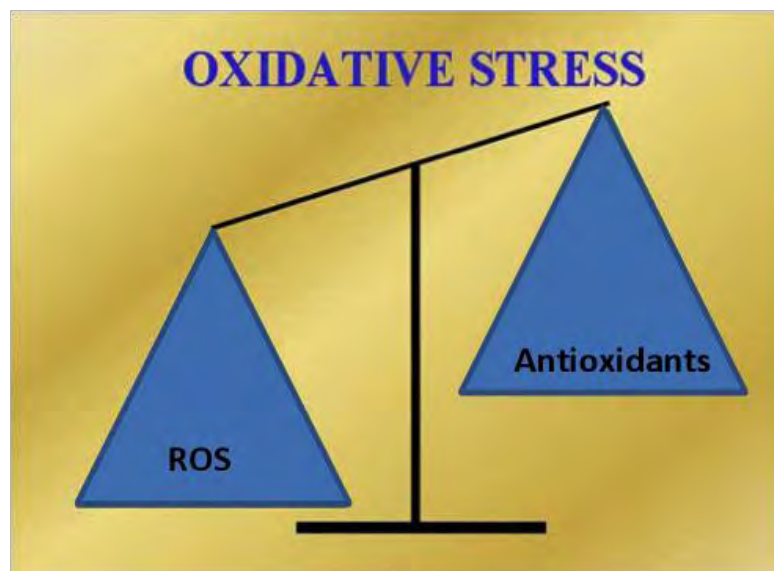
Εκτός από ενδογενείς παράγοντες, υπάρχουν και εξωγενείς όπως άγχος, διατροφή και τρόπος ζωής που είναι ικανοί να οδηγήσουν σε παραγωγή ελευθέρων ριζών. Συγκεκριμένα η έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία, υπεριώδες φως, περιβαλλοντική μόλυνση καθώς και η χρήση καπνού και η χρήση χημικών φαρμάκων, αλκοόλ και συντηρητικών των τροφών προκαλούν βλάβη στο DNA, στα λιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών και στις πρωτεΐνες (Phaniendra et al., 2015).



Εικόνα 2: Εξωγενείς παράγοντες που οδηγούν στην παραγωγή ελευθέρων ριζών

### 1.3 Οξειδωτικό στρες

Ως οξειδωτικό στρες ορίζεται η διαταραχή ανάμεσα στην προοξειδωτική και αντιοξειδωτική ισορροπία υπέρ της πρώτης, οδηγώντας σε ενδεχόμενη βλάβη (Sies, 1997). Πρόκειται για διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής ελευθέρων ριζών και της δράσης των αντιοξειδωτικών μηχανισμών των ιστών, με αποτέλεσμα είτε να υπερπαραγονται ελεύθερες ρίζες είτε να παρατηρείται μειωμένη δράση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του οργανισμού, όπως του μηχανισμού της ανηγμένης και οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSH/GSSG). Οι επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες εξαρτώνται από την έκταση των μεταβολών αυτών. Το κύτταρο είναι ικανό να ανακτήσει την αρχική του κατάσταση μετά από περιορισμένη οξειδωτική βλάβη. Σοβαρότερες διαταραχές, ωστόσο, οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο, είτε με τη διαδικασία της απόπτωσης, είτε με άμεση κυτταρική νέκρωση (Espinosa-Diez et al., 2015).



Εικόνα 3: Οξειδωτικό στρες

#### 1.3.1 Επιπτώσεις οξειδωτικού στρες στα βιομόρια

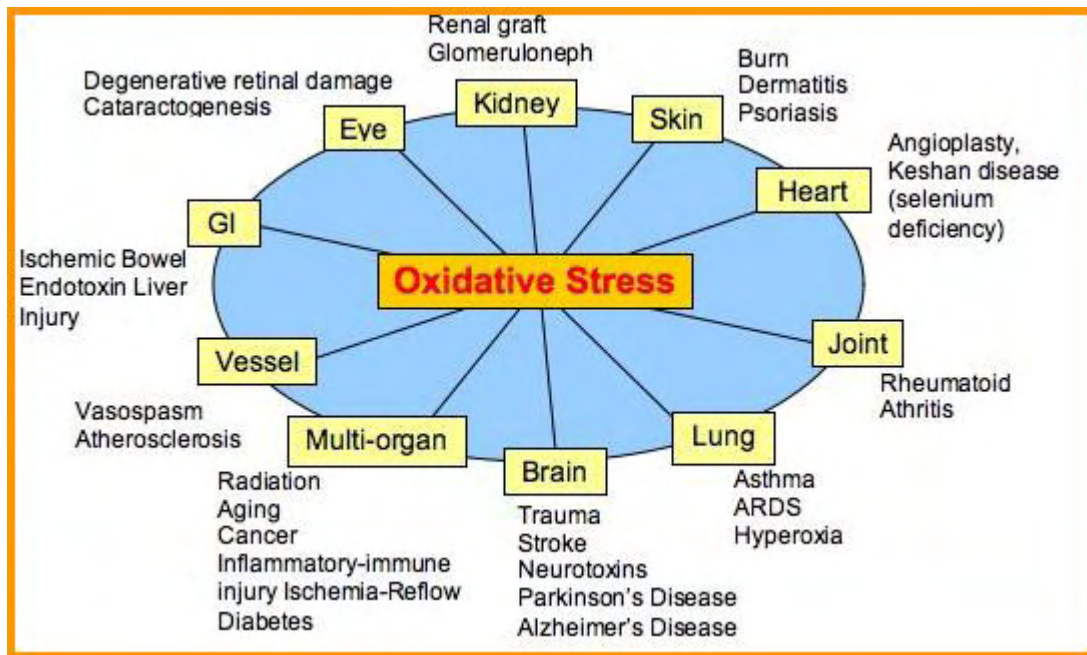
Το οξειδωτικό στρες, το οποίο προκύπτει ως αποτέλεσμα ανισορροπίας μεταξύ παραγωγής ελευθέρων ριζών και αντιοξειδωτικής άμυνας, συνδέεται με βλάβες σε ένα ευρύ φάσμα βιολογικών μορίων, συμπεριλαμβανομένων των λιπιδίων, των πρωτεϊνών και των νουκλεϊνικών οξέων (McCord, 2000). Τα λιπίδια αποτελούν τα πιο επιρρεπή μόρια προς

οξειδωση. Καθώς όλες οι κυτταρικές μεμβράνες αποτελούνται από λιπίδια μπορούν να υποστούν βλάβες από τις ελεύθερες ρίζες. Ως δομικά συστατικά των μεμβρανών προσβάλλονται κυρίως τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Η οξειδωση τους είναι η εναρκτήρια αντίδραση της λιπιδικής υπεροξειδωσης, η οποία οδηγεί στην παραγωγή ριζών περοξυλίου ROO●, συζυγών διενίων και μηλονικής διαλδεΰδης (MDA). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της ρευστότητας και της διαπερατότητας τους. Επίσης δραστικές μορφές οξυγόνου είναι ικανές να οξειδώσουν τόσο τη 'ραχοκοκαλιά' όσο και την πλευρική αλυσίδα πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα τη δημιουργία καρβονυλικών ομάδων, όπως αλδεΰδων και κετονών, οι οποίες προκαλούν αλλαγές στη δομή των πρωτεϊνών, εκφυλισμό τους και ίσως να οδηγήσουν και σε καταστροφή τους. Οι επιπτώσεις της πρωτεϊνικής καταστροφής σχετίζονται συνήθως με την απώλεια της φυσιολογικής λειτουργίας των πρωτεϊνών. Τέλος οι ROS βλάπτουν τα νουκλεϊνικά οξέα, προκαλώντας θραύση κλώνων και αλλοιώσεις στη δομή των βάσεων πουρίνης και πυριδίνης, έχοντας ως αποτέλεσμα μεταλλάξεις στο DNA (Gandhi and Abramov, 2012).

Με βάση πρόσφατες μελέτες, που αφορούν μονοπάτια σηματοδότησης, που σχετίζονται με την οξειδοαναγωγική κατάσταση του οργανισμού, τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς και τους δείκτες οξειδωτικού στρες, το οξειδωτικό στρες δεν περιορίζεται στις βλάβες βιομορίων από ελεύθερες ρίζες, αλλά επαναπροσδιορίζεται ως διαταραχή της σηματοδότησης και του ελέγχου της οξειδοαναγωγικής κατάστασης (Jones, 2006). Επομένως η δράση των αντιοξειδωτικών συστημάτων θεωρείται πιο περίπλοκη από την απλή δέσμευση αντιδρώντων ελεύθερων ριζών.

Το οξειδωτικό στρες θεωρείται πλέον ότι συμβάλλει σημαντικά σε όλες τις φλεγμονώδεις ασθένειες (αρθρίτιδα, αγγειίτιδα, σπειραματονεφρίτιδα, ερυθματώδη λύκο, σύνδρομο αναπνευστικών παθήσεων ενηλίκων), ισχαιμικές ασθένειες (καρδιακές παθήσεις, εγκεφαλικό επεισόδιο), αιμοχρωμάτωση, σύνδρομο επίκτητης ανοσοανεπάρκειας, μεταμόσχευση οργάνων, γαστρικά έλκη, υπέρταση και προεκλαμψία, νευρολογική διαταραχή (ασθένεια Alzheimer, νόσο του Πάρκινσον, μυϊκή δυστροφία), αλκοολισμός, ασθένειες που σχετίζονται με το κάπνισμα και πολλά άλλα (Lobo et al., 2010).

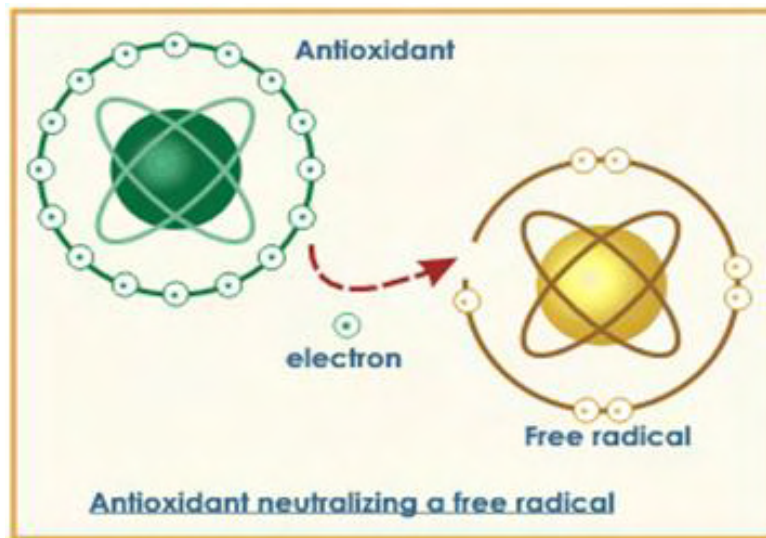




Εικόνα 4: Διαταραχές που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες

## 1.4 Αντιοξειδωτικοί παράγοντες

Ως αντιοξειδωτικός παράγοντας, ορίζεται μια ουσία η οποία όταν βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις συγκριτικά με εκείνες ενός προς οξείδωση υποστρώματος, επιβραδύνει ή εμποδίζει την οξείδωση αυτού του υποστρώματος. Πιο συγκεκριμένα τα αντιοξειδωτικά προσφέρουν στις ελεύθερες ρίζες το ηλεκτρόνιο ή το μόριο υδρογόνου, που τους λείπει και έτσι είτε εμποδίζουν τη δράση τους, είτε ενεργοποιούν τα ενδογενή αμυντικά συστήματα του οργανισμού (Halliwell, 2001).



Εικόνα 5: Τρόπος δράσης αντιοξειδωτικών παραγόντων

### 1.4.1 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Οι μηχανισμοί, με τους οποίους δρουν τα αντιοξειδωτικά, χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: στους ενζυμικούς και στους μη ενζυμικούς. Στους ενζυμικούς μηχανισμούς ανήκουν ένζυμα με αντιοξειδωτική δράση, τα οποία καταλύουν αντιδράσεις μετατροπής δραστικών μορφών οξυγόνου σε μη δραστικά πλέον μόρια, όπως  $H_2O$  και  $O_2$ . Χαρακτηριστικά ένζυμα, που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία είναι η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση (CAT), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX) και η αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR). Στους μη ενζυμικούς μηχανισμούς περιλαμβάνονται μόρια, που παράγονται κατά τη διάρκεια του φυσιολογικού μεταβολισμού στο σώμα, όπως η γλουταθειόνη, η ουβικινόλη (ανηγμένη μορφή συνένζυμου Q10) και το ουρικό οξύ, αλλά και άλλα τα οποία ο οργανισμός δεν μπορεί να παράγει, οπότε προσλαμβάνονται μέσω της διατροφής (Lobo et al., 2010). Βασικά μόρια αυτής της κατηγορίας είναι η βιταμίνη E (α-τοκοφερόλη), η βιταμίνη C

(ασκορβικό οξύ), το Β-καροτένιο, το σελήνιο, τα φλαβονοειδή, οι ανθοκυανίνες και οι φαινόλες.

## 1.5 Πολυφαινόλες

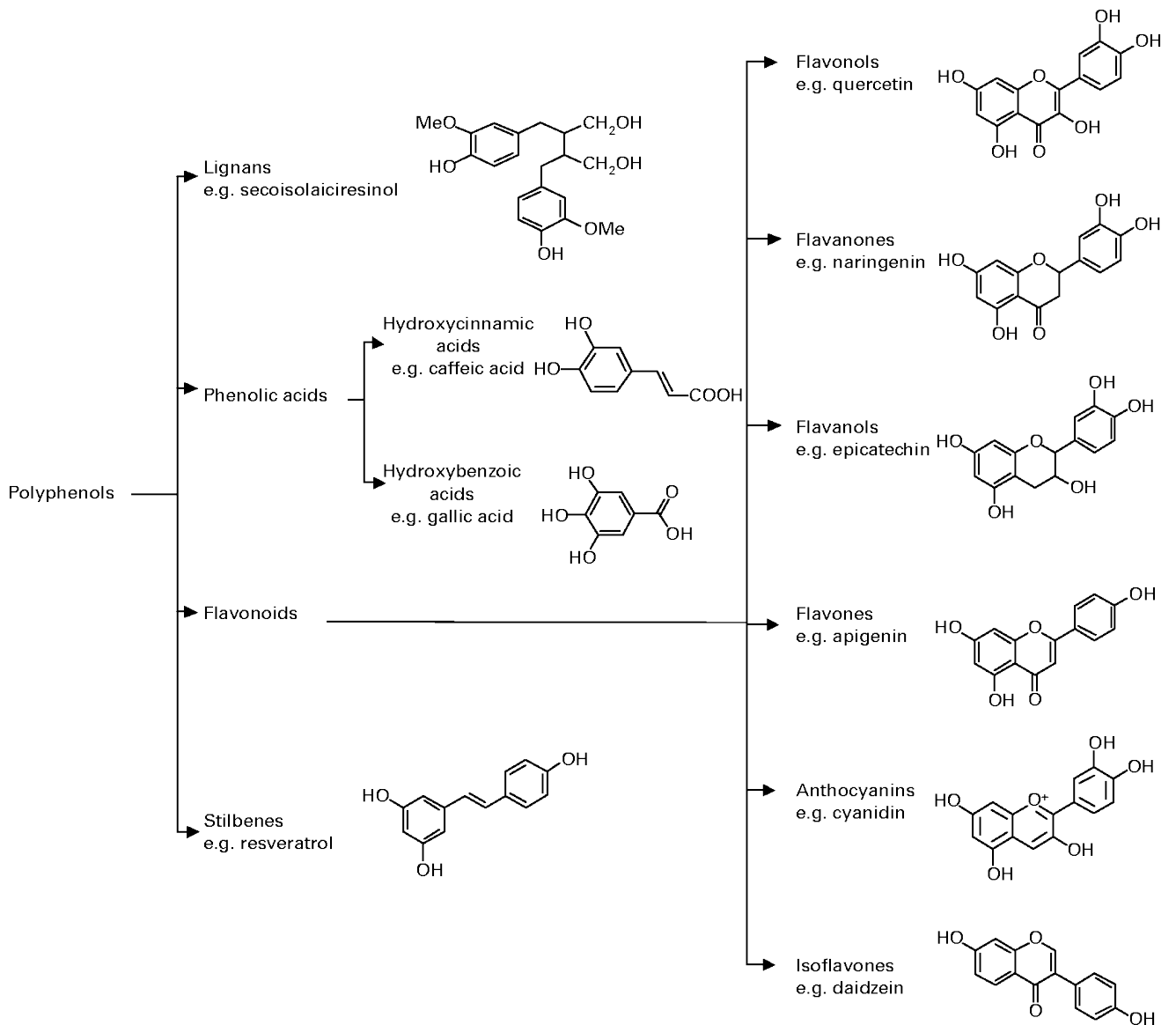
Οι πολυφαινόλες αντιπροσωπεύουν τη μεγαλύτερη ομάδα φυτοχημικών ενώσεων, που απαντώνται στα φυτά, ιδιαίτερα στα φρούτα, τους σπόρους και τα φύλλα (Ding et al., 2013). Πρόκειται για δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών, οι οποίοι εμπλέκονται στην άμυνα κατά της υπεριώδους ακτινοβολίας ή των επιθέσεων από παθογόνους παράγοντες. Στις τροφές, οι πολυφαινόλες συμβάλλουν στη στυπτικότητα, το χρώμα, τη γεύση, την οσμή και την οξειδωτική σταθερότητα (Pandey and Rizvi, 2009). Οι εξειδικευμένες χημικές τους δομές συμβάλλουν στο ευρύ φάσμα των φυσικών και βιολογικών τους δράσεων (Giovinazzo and Grieco, 2015). Συνήθως οι πολυφαινόλες είναι περίπλοκα σύμπλοκα περισσοτέρων του ενός πολυφαινολικών μορίων τα οποία προέρχονται από διμερισμό ή πολυμερισμό απλούστερων μορίων (Korkina et al., 2009).

### 1.5.1 Κατηγορίες πολυφαινολών

Κοινό χαρακτηριστικό όλων των ομάδων των πολυφαινολών είναι ότι διαθέτουν μια κοινή δομή, έναν αρωματικό δακτύλιο (ή και περισσότερους) υποκατεστημένο με τουλάχιστον μια υδροξυλομάδα, δηλαδή αποτελούν φαινολικές ενώσεις (Duthie et al., 2003). Έτσι μπορούν να ταξινομηθούν σε διάφορες ομάδες με βάση τις δομές τους. Οι κύριες κατηγορίες περιλαμβάνουν τα φλαβονοειδή, τα φαινολικά οξέα, τα στιλβένια και τις λιγνάνες. (εικόνα 6)

Μία από τις κύριες κατηγορίες πολυφαινολών είναι τα φλαβονοειδή, τα οποία αναγνωρίζονται από μία κοινή δομή αποτελούμενη από δύο αρωματικούς δακτυλίους, οι οποίοι συνδέονται μαζί με τρία άτομα άνθρακα που σχηματίζουν έναν οξυγονωμένο ετερόκυκλο. Με βάση την ποικιλία του εμπλεκόμενου ετερόκυκλου, τα φλαβονοειδή μπορούν να χωριστούν σε έξι υποκατηγορίες: τις φλαβονόλες, τις φλαβόνες, τις φλαβανόνες, τις φλαβανόλες, τις ανθοκυανίνες και τις ισοφλαβόνες. Οι μεμονωμένες διαφορές, σε κάθε ομάδα, προκύπτουν από τη μεταβολή του αριθμού και της διευθέτησης των υδροξυλικών ομάδων και την έκταση της αλκυλίωσης και / ή της γλυκοζυλίωσης. Επίσης τα φαινολικά οξέα είναι άφθονα στην τροφή και μπορούν να ταξινομηθούν σε παράγωγα του βενζοϊκού οξέος και των παραγώγων του κινναμικού οξέος. Τέλος οι πολυφαινολικές ενώσεις περιλαμβάνουν τα στιλβένια, οι οποίες είναι ενώσεις, που

διαθέτουν δομές 1,2-διαρυλαιθενίου και τις λιγνάνες, που χαρακτηρίζονται από δομή 1,4-διαρυλοβουτανίου (Spencer et al., 2008).



Εικόνα 6: Κατηγορίες πολυφαινολών

### 1.5.2 Δράση πολυφαινολών

Ως αντιοξειδωτικά, οι πολυφαινόλες μπορούν να προστατεύσουν τα κυτταρικά συστατικά κατά της οξειδωτικής βλάβης και, ως εκ τούτου, περιορίζουν τον κίνδυνο διάφορων ασθενειών, που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες (Scalbert et al., 2005). Πιο συγκεκριμένα, φάνηκε να έχουν ευεργετική δράση κατά ασθενειών, όπως καρδιαγγειακές νόσους, νευροεκφυλιστικές νόσους, στον καρκίνο, στον διαβήτη, στην οστεοπόρωση.

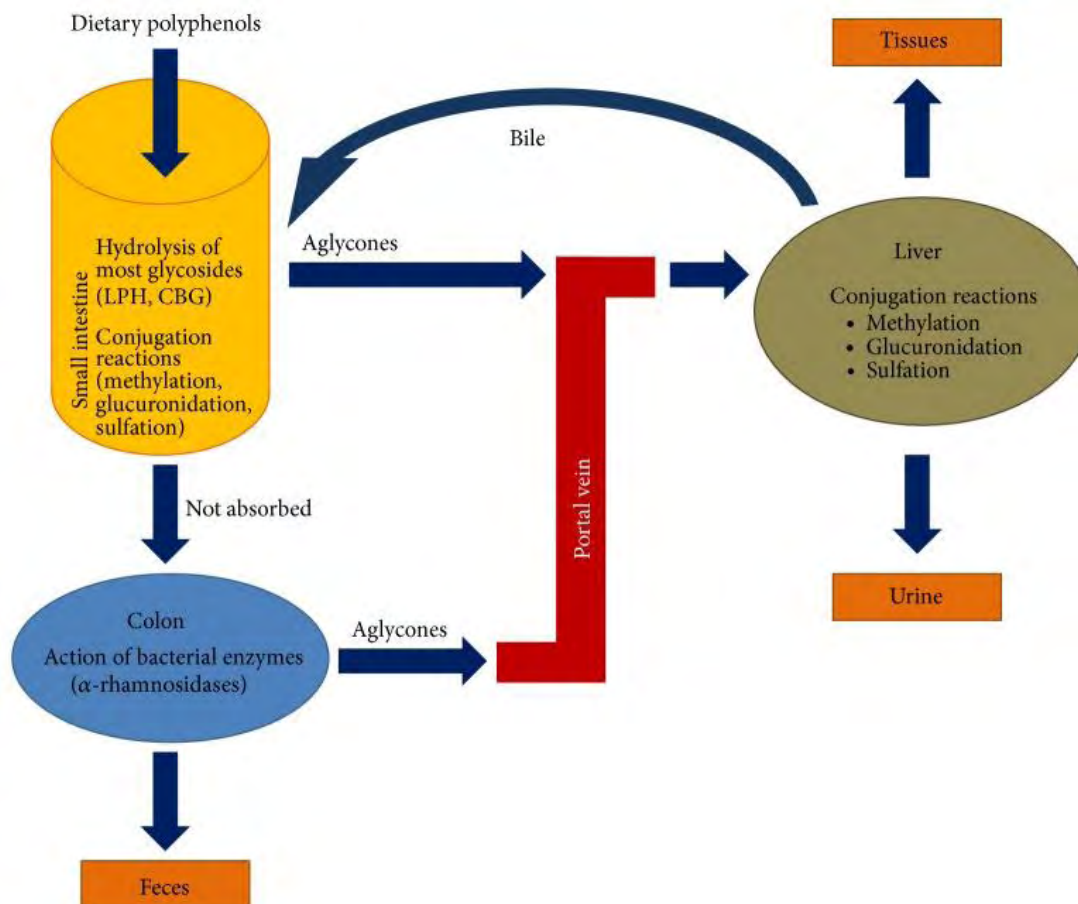
Οι πολυφαινόλες έχουν την δυνατότητα να καταστέλλουν τη δημιουργία ελεύθερων ριζών, εμποδίζοντας τον σχηματισμό τους ή απενεργοποιώντας τον, μειώνοντας έτσι τον ρυθμό οξειδωσης βιολογικών μορίων. Συχνότερα, καταφέρνουν να εξουδετερώνουν άμεσα τις ρίζες των αλυσιδωτών αντιδράσεων της λιπιδικής υπεροξειδωσης, προσφέροντας ένα ηλεκτρόνιο ή ένα άτομο υδρογόνου, με αποτέλεσμα να καθίστανται οι ίδιες σταθερές ρίζες (λιγότερο δραστικές), διακόπτοντας έτσι τις αλυσιδωτές αντιδράσεις (Guo et al., 2009). Επίσης είναι γνωστές ως χηλικοί παράγοντες μετάλλων. Η χηλικοποίηση μετάλλων όπως του  $Fe^{2+}$  μπορεί να μειώσει άμεσα τον ρυθμό αντίδρασης Fenton, εμποδίζοντας έτσι την οξειδωση που προκαλείται από τις εξαιρετικά δραστικές ρίζες υδροξυλίου (Pietta, 2000) (Perron and Brumaghim, 2009). Τέλος ορισμένες πολυφαινόλες μπορούν να επάγουν την έκφραση αντιοξειδωτικών ενζύμων *in vivo* (Croft, 2016). Τέτοια ένζυμα είναι η υπεροξειδική δισμουτάση, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και η καταλάση.

Οι πολυφαινόλες παρουσιάζουν αγγειοδιασταλτικές δράσεις και είναι σε θέση να βελτιώσουν το λιπιδικό προφίλ και να εξασθενήσουν την οξειδωση λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL). Επιπλέον, παρουσιάζουν σαφείς αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις και μπορούν να επάγουν αποπρωτικές διεργασίες στο αγγειακό ενδοθήλιο (Quinones et al., 2013). Κάτω από ορισμένες συνθήκες ωστόσο, για παράδειγμα υψηλή συγκέντρωση πολυφαινολικών αντιοξειδωτικών ουσιών, παρουσία μεταβατικών μετάλλων (σιδήρου, χαλκού), υψηλό pH, μπορούν να δράσουν προ-οξειδωτικά. Τη βιολογική, αντιοξειδωτική ή προ-οξειδωτική δράση των πολυφαινολών (τόσο σε επίπεδο κυττάρου όσο και σε επίπεδο οργανισμού) καθορίζουν η θέση των υποκαταστάσεων καθώς και ο αριθμός των υδροξυλομάδων (Valko et al., 2006).

### 1.5.3 Μεταβολισμός και βιοδιαθεσιμότητα πολυφαινολών

Οι βιολογικές ιδιότητες των πολυφαινολών εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τη βιοδιαθεσιμότητά τους. Το εντερικό μικροβίωμα διαδραματίζει βασικό ρόλο στη διαμόρφωση της παραγωγής, της βιοδιαθεσιμότητας και, συνεπώς, των βιολογικών δραστηριοτήτων των φαινολικών μεταβολιτών, ιδιαίτερα μετά την πρόσληψη τροφής που περιέχει πολυφαινόλες υψηλού μοριακού βάρους (Cardona et al., 2013).

Ο μεταβολισμός των πολυφαινολών γίνεται μέσω ενός μονοπατιού που ακολουθείται γενικά για τον μεταβολισμό των φαρμάκων (Scalbert and Williamson, 2000). Οι αγλυκόνες των πολυφαινολών μπορούν να απορροφηθούν από το λεπτό έντερο. Ωστόσο, οι περισσότερες πολυφαινόλες, υπάρχουν σε τρόφιμα, με τη μορφή εστέρων, γλυκοσιδίων ή πολυμερών, που δεν μπορούν να απορροφηθούν στη φυσική τους μορφή. Αυτές οι ουσίες πρέπει να υδρολυθούν από εντερικά ένζυμα ή από την μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου πριν απορροφηθούν. Κατά τη διάρκεια της απορρόφησης, οι πολυφαινόλες συζεύγγονται στο λεπτό έντερο και αργότερα στο ήπαρ. Αυτή η διαδικασία περιλαμβάνει κυρίως τη προσθήκη θειικών, μεθυλικών και γλυκουρονικών ομάδων. Πρόκειται για μια διαδικασία μεταβολικής αποτοξίνωσης κοινή σε πολλά ξеноβιοτικά, με στόχο να περιοριστούν οι πιθανές τοξικές τους επιδράσεις και διευκολύνει την απομάκρυνση τους είτε μέσω της χολής είτε μέσω των ούρων. Οι πολυφαινόλες, που εκκρίνονται μέσω της χολής, μπορούν να επιστρέψουν στο δωδεκαδάκτυλο, όπου υποβάλλονται στη δράση των βακτηριακών ενζύμων, ιδιαίτερα της β-γλυκουρονιδάσης, στα απομακρυσμένα τμήματα του εντέρου, με αποτέλεσμα να μπορούν εκ νέου να απορροφηθούν. Αυτή η εντεροηπατική ανακύκλωση μπορεί να οδηγήσει σε μεγαλύτερη παρουσία πολυφαινολών μέσα στο σώμα (Manach et al., 2004). Οι πολυφαινόλες είναι ικανές να διεισδύσουν στους ιστούς, ιδιαίτερα σε εκείνους στους οποίους μεταβολίζονται, αλλά η ικανότητά τους να συσσωρεύονται εντός συγκεκριμένων ιστών-στόχων πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω.



Εικόνα 7: Μονοπάτια απορρόφησης και μεταβολισμού των πολυφαινολών και των παραγώγων τους στον άνθρωπο.

## 1.6 Το ελαιόλαδο

Το ελαιόλαδο χαρακτηρίζεται ως το έλαιο, που λαμβάνεται από τους καρπούς της ελαιάς της Ευρωπαϊκής (*Olea europaea* L.) με μέσα αποκλειστικά μηχανικά και μεθόδους ή επεξεργασίες οπωσδήποτε φυσικές, σε θερμοκρασίες που να μην προκαλούν αλλοίωση του ελαίου (Κώδικας Τροφίμων, Ποτών και Αντικειμένων Κοινής Χρήσης, Άρθρο 71, παράγραφος 1).

Οι πρώτες μαρτυρίες για την καλλιέργειά της ελιάς στον ελλαδικό χώρο, σύμφωνα με τα αρχαιολογικά ευρήματα, ξεκίνησε στην Κρήτη, πριν από 3.500 χρόνια. Στην ομηρική εποχή το ελαιόλαδο γνωρίζουμε ότι χρησιμοποιούνταν ευρέως για την επάλειψη του σώματος ως καλλυντικό, πριν και μετά τους αγώνες στα γυμνάσια και στα βαλανεία, καθώς και για την επάλειψη του σώματος των νεκρών. Το λάδι ως προϊόν εισήλθε στη διατροφή με τον καιρό, αποτελώντας μέρος των περισσότερων φαγητών και αρτημάτων. Παράλληλα, εκτός των άλλων χρησιμοποιούνταν και για την κατεργασία του λίνου αλλά και για τον καθαρισμό των ενδυμάτων. Στην εποχή του Σόλωνα μάλιστα το ελαιόλαδο καλλιεργούνταν συστηματικότερα, ώστε να θεσμοθετηθούν και οι σχετικοί νόμοι που να αφορούν την κυκλοφορία του. Το λάδι χρησιμοποιούνταν στην αρχαιότητα και για τις θεραπευτικές ιδιότητές του. Στον Ιπποκράτειο Κώδικα αναφέρονται περισσότερες από 60 φαρμακευτικές χρήσεις του. Αυτές περιλαμβάνουν δερματολογικές ασθένειες, μυϊκούς πόνους, θεραπεία του έλκους και της χολέρας, φλεγμονές των ούλων, αϋπνία, ναυτία, πυρετό και στομαχικούς πόνους. Ακόμα ο Διοσκουρίδης ονομάζει το ελαιόλαδο προς την εν υγεία χρήση άριστον. Αναφέρει ποικίλες θεραπευτικές ιδιότητες κατά του έρπητος και της άφθας. Αναφέρει επίσης ότι το ελαιόλαδο από τις άγριες ελιές είναι στυπτικό και ευεργετικό για τις κεφαλαλγίες.

Η ποιοτική κατάταξη του ελαιολάδου ακολουθεί διεθνείς σταθερές που διαχωρίζουν τον τρόπο παραγωγής, το βαθμό της οξύτητας και βασικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Οι κατηγορίες, στις οποίες διαχωρίζεται είναι οι εξής:

### ➤ **Εξαιρετικό Παρθένο Ελαιόλαδο**

Η οξύτητά του είναι έως 0,8%

Πρόκειται για ελαιόλαδο ανωτέρας κατηγορίας με τέλειο άρωμα και γεύση, που παράγεται από την πρώτη έκθλιψη των υγιών ελιών και μόνο με μηχανικές μεθόδους χωρίς καμία χημική παρέμβαση.



➤ **Παρθένο Ελαιόλαδο**

Η οξύτητά του είναι έως 2%

Πρόκειται για φυσικό ελαιόλαδο με καλή γεύση που παράγεται απ' ευθείας από ελιές και μόνο με μηχανικές μεθόδους, χωρίς καμία χημική παρέμβαση.

➤ **Ελαιόλαδο αποτελούμενο από εξευγενισμένα και παρθένα ελαιόλαδα**

Μέγιστη οξύτητα 1%

Πρόκειται για μίγμα εξευγενισμένων και παρθένων ελαιολάδων

Στερείται συνήθως ισχυρής γεύσης

➤ **Πυρηνέλαιο**

Μέγιστη οξύτητα 1%

Πρόκειται για μίγμα εξευγενισμένων πυρηνελαίων και πιθανώς παρθένων ελαιολάδων

Κατάλληλο για κατανάλωση- κυρίως χρήση στη μαγειρική.

➤ **Εξευγενισμένο ή ραφιναρισμένο ελαιόλαδο**

Μέγιστη οξύτητα 0,3%

Πρόκειται για ελαιόλαδο που προκύπτει απ' τον εξευγενισμό κατώτερων, ακατάλληλων προς κατανάλωση παρθένων ελαιολάδων.

Κατάλληλο για κατανάλωση-κυρίως χρήση στη μαγειρική.

Κατά την παραγωγή του ελαιολάδου στις μέρες μας, ο διαχωρισμός του από την ελαιοζύμη γίνεται με χρήση φυγοκεντρικών συστημάτων διαχωρισμού δύο ή τριών φάσεων, τα οποία έχουν αντικαταστήσει την παραδοσιακή μέθοδο. Τα συστήματα αυτά διαφέρουν ως προς την ποσότητα και τη σύνθεση των αποβλήτων που παράγουν. Στα φυγοκεντρικά συστήματα διαχωρισμού τριών φάσεων, ο διαχωρισμός του λαδιού από την ελαιοζύμη γίνεται μέσω φυγοκέντρωσης σε οριζόντιους τριφασικούς φυγοκεντρικούς διαχωριστήρες, γνωστούς ως decanters. Για την παραγωγή ελαιολάδου (1η φάση) καταναλώνονται σημαντικές ποσότητες νερού και ως συνέπεια προκύπτουν σημαντικές ποσότητες υγρών αποβλήτων (2η φάση). Επιπλέον, παράγεται η ελαιοπυρήνα (3η φάση), η οποία αντιστοιχεί στα στερεά συστατικά του ελαιόκαρπου και επεξεργάζεται περαιτέρω στα πυρηνελαιουργεία για την παραγωγή πυρηνέλαιου και πυρηνόξυλου. Τα φυγοκεντρικά ελαιουργικά συγκροτήματα δύο φάσεων, αποκαλούμενα και ως οικολογικά συστήματα, χρησιμοποιούνται τα τελευταία χρόνια και αποτελούν παραλλαγή του συστήματος τριών φάσεων. Τα συστατικά του ελαιόκαρπου τροφοδοτούνται στον φυγοκεντρικό διαχωριστήρα δύο φάσεων και διαχωρίζονται στο ελαιόλαδο (1η φάση) και στα υπόλοιπα συστατικά της ελιάς (πούλπα, φυτικά υγρά), που στο σύνολο τους αντιστοιχούν στη διφασική ελαιοπυρήνα (2η φάση) (Petrakis, 2006).

Το ελαιόλαδο αποτελεί κύρια πηγή λιπαρών οξέων και θεωρείται βασικό συστατικό της μεσογειακής διατροφής. Τα ευεργετικά αποτελέσματα του μπορούν να αποδοθούν όχι μόνο στην υψηλή περιεκτικότητά του σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα αλλά και στην αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών ενώσεών του. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει χαμηλότερη συχνότητα εμφάνισης αθηροσκλήρωσης, καρδιαγγειακών παθήσεων και ορισμένων μορφών καρκίνου στην περιοχή της Μεσογείου (Tripoli et al., 2005).

Το 97% της παγκόσμιας παραγωγής ελαιολάδου παράγεται από τις χώρες της Μεσογείου. Η Ελλάδα είναι τρίτη ελαιοπαραγωγός χώρα στον κόσμο, μετά την Ισπανία και την Ιταλία με ετήσια παραγωγή να κυμαίνεται από 300.000 έως 400.000 τόνους ελαιόλαδο. Η καλλιέργεια της ελιάς στην χώρα μας καλύπτει έκταση 7 εκατομμυρίων στρεμμάτων δηλαδή 17% της καλλιεργούμενης γης.

Όσον αφορά τις καλλιεργητικές πρακτικές της ελιάς, οι πιο ευρέως διαδεδομένες, είναι η συμβατική, η οργανική, η οικολογική και η ολοκληρωμένη διαχείρισης. Η συμβατική καλλιέργεια είναι η συνήθης καλλιεργητική πρακτική, κατά την οποία χρησιμοποιούνται συνθετικά λιπάσματα, φυτοφάρμακα και εντομοκτόνα, χωρίς περιορισμούς τόσο στις εφαρμοζόμενες ποσότητες όσο και στη χρήση του γενετικού υλικού. Οργανικές είναι οι καλλιέργειες, στις οποίες για την ανάπτυξη των δέντρων δεν χρησιμοποιούνται συνθετικά λιπάσματα, γενετική μηχανική και φυτοφάρμακα. Η διαφορά της με τη συμβατική καλλιέργεια έγκειται στη χρήση των λιπασμάτων καθώς στην οργανική καλλιέργεια χρησιμοποιούνται φυσικά λιπάσματα. Η οικολογική καλλιέργεια της ελιάς βασίζεται σε μεθόδους αναζωογόνησης του εδάφους του ελαιώνα, στην ανακύκλωση των υποπροϊόντων και άλλων διαθέσιμων οργανικών υλικών και στην αναπαραγωγή και προστασία του περιβάλλοντος. Είναι μέθοδος ελαιοπαραγωγής που στοχεύει στην παραγωγή άριστης ποιότητας ελαιολάδου, απαλλαγμένου από υπολείμματα αγροχημικών. Τέλος το σύστημα ολοκληρωμένης διαχείρισης, είναι μια εναλλακτική της συμβατικής καλλιέργειας. Αποτελεί μία φιλοπεριβαλλοντική μέθοδο παραγωγής, σύμφωνα με την οποία ο παραγωγός μειώνει δραστικά τη χρήση χημικών σκευασμάτων και την ανεξέλεγκτη εφαρμογή καλλιεργητικών παρεμβάσεων. Είναι υποχρεωμένος να ακολουθήσει συγκεκριμένους κανόνες παραγωγής και να τηρεί αρχεία καταγραφόντων πρακτικών που εφαρμόζει, με στόχο τη διασφάλιση της υγείας του καταναλωτή και την προστασία του περιβάλλοντος (Beaufoy, n.d.).

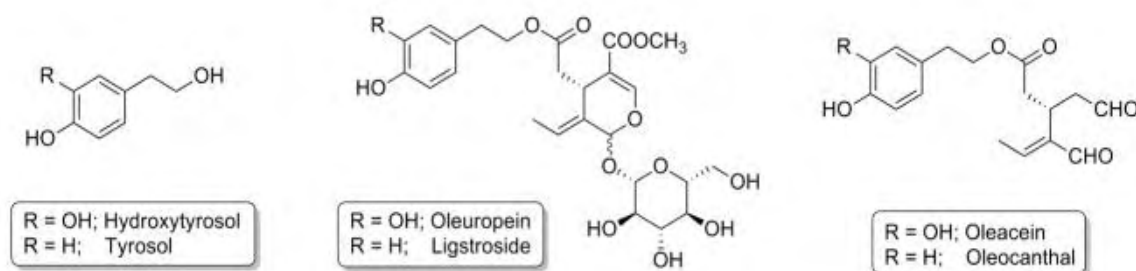
<b>ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ ΕΛΙΑΣ</b>		
Ποικιλία	Άλλα ονόματα	Κύριες περιοχές
<b>ΕΠΙΤΡΑΠΕΖΙΕΣ</b>		
Κονσερβολιά	Αμφίσσης, Άρτας Βολιώτικη, Χονδρολιά Χαλκιδικής	Κεντρική και Δυτική Ελλάδα, Χαλκιδική
Καλαμών	Καλαματιανή, Αετονυχιά, Κορακολιά	Πελοπόννησος, Κρήτη, Δ. Ελλάδα
<b>ΛΑΔΟΛΙΑ</b>		
Κορωνέτικη	Λιανολιά, Ψύολιά, Λαδολιά, Κρητικιά	Πελοπόννησος, Κρήτη, νησιά Ιονίου
Λιανολιά Κέρκυρας	Σουβλιολιά, Κορφολιά, Πρεβεζάνα Δαφνοφύλλη	Κέρκυρα, Παζοί, Κεφαλονιά, Ζάκυνθος Παραλία Ηπείρου
Κουτσουρελιά	Πατρινή, Λιανολιά	Πελοπόννησος, Ναύπακτος
Μαστοειδής	Τσουνάτη, Ματσολιά, Μουρατολιά	Πελοπόννησος, Κρήτη
<b>ΔΙΠΛΗΣ ΧΡΗΣΗΣ</b>		
Μεγαρίτικη	Περαχωρίτικη, Βοβοδίτικη, Χονδρολιά Αίγνας	Αττική, Βοιωτία, Κυνουρία
Κολοβή	Μυτιληνιά, Βαλιανολιά	Λέσβος, Χίος
Κοθρέτικη	Μανάκι, Μανασκολιά, Κορινθιακή	Δελφοί, Άμφισσα, Τροιζήνια, Κυνουρία
Θρουμπολιά	Θασίτικη, Χονδρολιά Εύβοιας	Νησιά Αιγαίου, Αττική, Εύβοια

Εικόνα 8: Ποικιλίες ελιάς

### 1.6.1 Χημική σύσταση ελαιολάδου

Τα συστατικά του ελαιολάδου διαχωρίζονται σε δύο μέρη. Το μεγαλύτερο κλάσμα (98-99% του συνολικού βάρους του ελαίου) αντιστοιχεί στο σαπωνοποιήσιμο τμήμα και αποτελείται κυρίως από τριακυλογλυκερόλες (TGs). Μεταξύ των λιπαρών οξέων που αποτελούν τις τριακυλογλυκερόλες, το μονοακόρεστο ελαϊκό οξύ είναι ο κύριος αντιπρόσωπος σε ποσοστό 55-83%, ακολουθούμενο από πολυακόρεστα σε ποσοστό 4-20% και κορεσμένα λιπαρά οξέα σε ποσοστό 8-14%. Το δευτερεύον κλάσμα περιλαμβάνει δύο τύπους συστατικών: το ασαπωνοποίητο κλάσμα και το διαλυτό μέρος, το οποίο περιέχει τις φαινολικές ενώσεις, όπως οξέα και αλκοόλες, που παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση. (Granados-Principal et al., 2010). Πιο συγκεκριμένα οι φαινολικές ενώσεις χωρίζονται στις απλές φαινολικές όπως βανιλικό, γαλλικό, κουμαρικό και καφεϊκό οξύ, τυροσόλη και υδροξυτυροσόλη και στις πιο πολύπλοκες ενώσεις, όπως τα σεκοϊριδοειδή (λιγκστροσίδη, ελαιοευρωπαΐνη), τα αντίστοιχα παράγωγα αποκαρβοξυλιωμένης διαλδεΰδης (ελιασίνη και ελαιοκανθάλη), και τις λιγνάνες (1-ακετοξυπιονορεζινόλη και πινορεζινόλη). Η ελαιοκανθάλη, η ελιασίνη και δευτερευόντως

τα άγλυκα της ελευρωπαίνης και του λιγκστοσίδη είναι οι κυριότερες μορφές συζευγμένης υδροξυτυροσόλης και τυροσόλης στα ελληνικά ελαιόλαδα. Παράγοντες που επηρεάζουν το πολυφαινολικό περιεχόμενο του ελαιολάδου είναι ο τόπος καλλιέργειας, το κλίμα, η ποικιλία της ελιάς και το επίπεδο ωρίμανσής της κατά τη στιγμή της συγκομιδής, φθάνοντας τα επίπεδα των φαινολικών ενώσεων στα 100-600 mg / kg. Περίπου το 50% αυτής της φαινολικής περιεκτικότητας αντιστοιχεί στην υδροξυτυροσόλη (HT) και τα παράγωγά της (Tripoli et al., 2005).



Εικόνα 9: Δομή χαρακτηριστικών πολυφαινολών ελαιολάδου

### 1.6.2 Δράση των πολυφαινολών του ελαιόλαδου

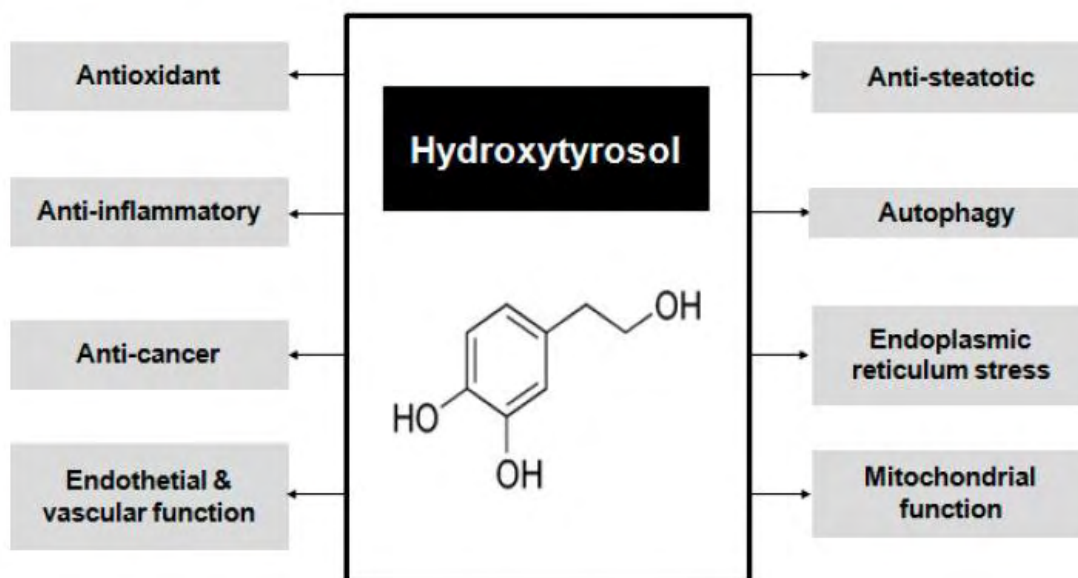
Όσον αφορά το μηχανισμό δράσης των φαινολικών ενώσεων του ελαιολάδου, είναι γνωστό ότι οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες των ο-διφαινολών σχετίζονται με τη δωρεά υδρογόνου, η οποία είναι η ικανότητά τους να βελτιώνουν τη σταθερότητα των ριζών, σχηματίζοντας έναν ενδομοριακό δεσμό υδρογόνου μεταξύ των ελεύθερων υδρογόνων της υδροξυλομάδας τους και των ριζών φαινοξυλίου τους. (Visioli et al., 2002). Το πολυφαινολικό περιεχόμενο του ελαιολάδου εμφανίζει ισχυρή αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη, αντικαρκινική, αντιυπερτασική, νευροπροστατευτική, καρδιοπροστατευτική και αντιγηραντική δράση. Πιο συγκεκριμένα έχει παρατηρηθεί βελτίωση της ενδοθηλιακής λειτουργίας σε υπερχοληστερολαιμικούς ασθενείς με πρόωρη αθηροσκλήρωση μετά από 4 μήνες χορήγησης ημερήσιας δόσης ελαιολάδου, που περιείχει 340 mg πολυφαινολών ανά kg ελαιολάδου (Widmer et al., 2013). Μελέτες σε ARPE-19 ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα αμφιβληστροειδή έδειξαν ότι η υδροξυτυροσόλη είναι σε θέση να αποτρέψει τον εκφυλισμό αυτών των κυττάρων με την επαγωγή ενζύμων της φάσης II και την ενίσχυση της μιτοχονδριακής βιογένεσης (Zhu et al., 2010). Ακόμα διαπιστώθηκε ότι σε SAMP8 ποντικούς, πολυφαινόλες έξτρα παρθένου ελαιολάδου είχαν ωφέλιμες επιδράσεις έναντι δυσκολιών στη μάθηση και τη μνήμη, που προέρχονται από γήρανση και ασθένειες, οι οποίες σχετίζονται με την υπερπαραγωγή πεπτιδίου β αμυλοειδούς (Farr et al., 2012). Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή επιτροπή ασφάλειας

τροφίμων (EFSA), υπάρχει σχέση αιτίου-αποτελέσματος μεταξύ της πρόσληψης φαινολικών ενώσεων ελαιολάδου (τυποποιημένων για την περιεκτικότητα σε τυροσόλη, υδροξυτυροσόλη (HT) και παράγωγα αυτών) και της προστασία των λιπιδίων του αίματος από το οξειδωτικό στρες. Προκειμένου να επιτευχθούν αυτά τα ευεργετικά αποτελέσματα, Η EFSA καθόρισε ελάχιστη απαίτηση ημερήσιας πρόσληψης 5 mg HT και των παραγώγων της (Martinez-Huelamo et al., 2017).

### 1.6.3 Υδροξυτυροσόλη (HT)-Τυροσόλη (T)

Η υδροξυτυροσόλη (HT) ή αλλιώς (3,4-διϋδροξυφαινουλο αιθανόλη), είναι πολυφαινόλη που υπάρχει κυρίως στο εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο (EVOO) αλλά και στο κόκκινο κρασί.

Έχει αποδειχθεί ότι το αντιοξειδωτικό αποτέλεσμα των φαινολικών ενώσεων του εξαιρετικού παρθένου ελαιολάδου οφείλεται στην παρουσία της ομάδας των κατεχολών, στην οποία ανήκουν η υδροξυτυροσόλη και η ελαιοευρωπαϊνή (J P De La Cruz et al., 2015). Η HT φαίνεται να εμφανίζει και έμμεση αντιοξειδωτική προστασία εκτός από τις ήδη γνωστές άμεσες αντιοξειδωτικές της ιδιότητες. Μελέτες σε κυτταρικές σειρές έχουν δείξει ότι η HT επάγει την έκφραση αποτοξινωτικών ενζύμων της φάσης II (GCL, GR, GSH GPx, HO-1, NQO1), αντιοξειδωτικών ενζύμων, όπως η καταλάση (CAT), γονιδίων, που εμπλέκονται στην οξειδωτική άμυνα καθώς και προωθεί τη μετατόπιση του Nrf2 στον πυρήνα σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες (Zhu et al., 2010). Επίσης η HT εμφανίζει ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση, προκαλώντας αναστολή στη παραγωγή του μονοξειδίου του αζώτου (NO) και της προσταγλανδίνης E2 (PGE2) καθώς και μείωση στην έκκριση προφλεγμονωδών κυτοκινών (ιντερλευκίνη (IL) -1α, IL-1β, IL-6, IL-12, παραγόντων νέκρωσης όγκων(TNF-α) και χημειοκινών (Richard et al., 2011).



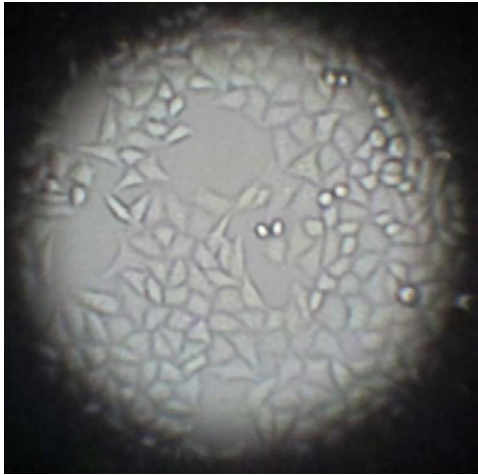
Εικόνα 10: Βιολογικές δράσεις υδροξυτυροσόλης

Η τυροσόλη (4-υδρόξυφαινόλη) είναι μια άλλη φαινολική ένωση που βρίσκεται στο ελαιόλαδο καθώς και σε ορισμένα αλκοολούχα ποτά, όπως η μπύρα, το κρασί και η σαμπάνια. Έχει αναφερθεί ότι η αντιοξειδωτική δράση της είναι ασθενέστερη σε σύγκριση με την υδροξυτυροσόλη, πιθανώς λόγω της απουσίας της ορθο-διφαινολικής ομάδας στη χημική της δομή. Παρά τη μειωμένη αντιοξειδωτική της ισχύ, αρκετά πειράματα έχουν επικεντρωθεί στις βιολογικές της δράσεις και έχει αποδειχθεί η προστασία, που προσφέρει από πολλές παθολογικές καταστάσεις (Martinez-Huelamo et al., 2017). Η τυροσόλη και η υδροξυτυροσόλη απορροφώνται από τον άνθρωπο με δόσοεξαρτώμενο τρόπο σε σχέση με το φαινολικό περιεχόμενο της ελαιολάδου, που τους χορηγήθηκε (Visioli et al., 2000).

### 1.7 Ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα τραχήλου της μήτρας (HeLa)

Τα HeLa είναι μια καρκινική σειρά κυττάρων του τραχήλου της μήτρας, που πήραν το όνομά τους από τα αρχικά του ονόματος της πρώτης ασθενούς με τον συγκεκριμένο τύπο καρκίνου (Henrietta Lacks) στις αρχές του 1950. Ανήκαν σε μια Αφροαμερικάνα του Αμερικάνικου Νότου που εργάζονταν ως καπνεργάτρια. Πέθανε το 1951 σε ηλικία 31 ετών

από μια μορφή καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Ο γιατρός της κράτησε δείγμα των καρκινικών κυττάρων, τα οποία καλλιεργήθηκαν στο εργαστήριο. Πρόκειται για αθάνατη κυτταρική σειρά, που έμελλε να αποτελέσει τη πρώτη ανθρώπινη κυτταρική σειρά, που αναπτύχθηκε γρήγορα σε κυτταρική καλλιέργεια και χρησιμοποιείται ευρέως μέχρι και σήμερα από ερευνητές σε όλο τον κόσμο.



Εικόνα 11: HeLa κύτταρα από καλλιέργεια

## 2. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να εξεταστεί η συμβολή της διαφορετικής πολυφαινολικής σύστασης, δύο διαφορετικών πολυφαινολιών εκχυλισμάτων ελαιόλαδου Ελληνικής προέλευσης, στις αντιοξειδωτικές ιδιότητες τους. Στόχος είναι να καταδείξουμε την σημαντικότητα της σύστασης έτσι ώστε να υιοθετηθούν καλύτερες μέθοδοι καλλιεργητικές, επεξεργασίας και παραγωγής ελαιόλαδων. Τελικός σκοπός η μελλοντική παραγωγή ελαιόλαδων υψηλής προστιθέμενης αξίας, αλλά και πιθανών βιολειτουργικών σκευασμάτων, που θα συμβάλλουν στην βελτίωση της υγείας.

Για την επίτευξη του σκοπού χρησιμοποιήθηκαν δύο ελαιόλαδα Ελληνική προέλευσης με διαφορετική πολυφαινολική σύσταση, ένα υπερ παραγώγων υδροξυτυροσόλης και ένα ίσης ποσότητας παραγώγων τυροσόλης και υδρόξυτυρολής, σε *in vitro* τεχνικές για τον έλεγχο της αντιοξειδωτικής και αντιμεταλλαξιγόνου δράσης, ενώ η δράση των δύο εκχυλισμάτων αξιολογήθηκε και σε κυτταρικό επίπεδο και πιο συγκεκριμένα σε καρκινικά κύτταρα τραχήλου της μήτρας (HeLa).

### 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1 Πολυφαινολικά εκχυλίσματα ελαιόλαδων

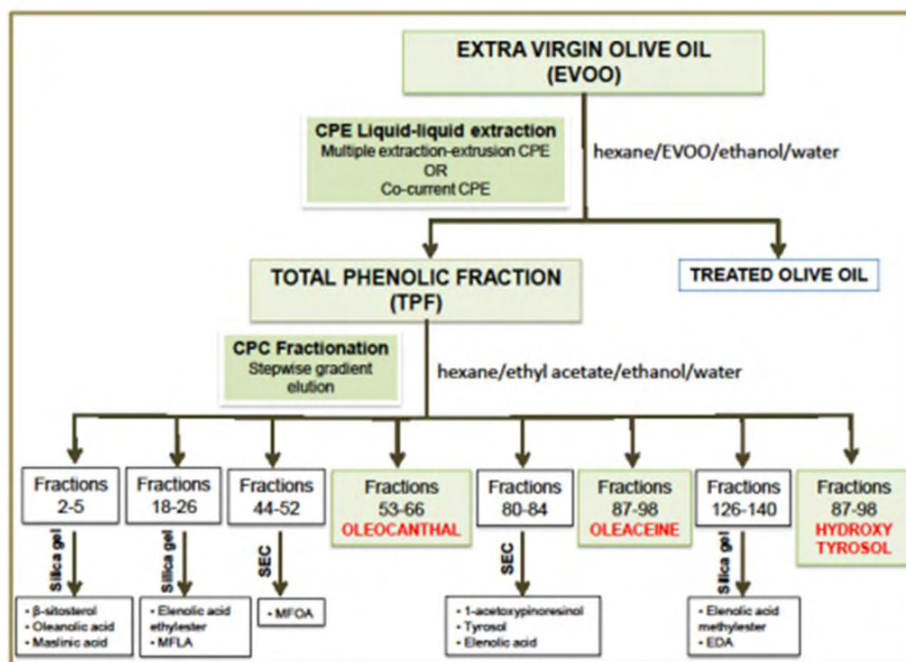
Τα πολυφαινολικά εκχυλίσματα ελαιόλαδου, ήταν ευγενή χορηγία του κύριου Λεάνδρου Σκαλτσούνη, Πανεπιστήμιο Αθηνών, τμήμα Φαρμακευτικής, τομέας Φαρμακογνωσίας και χημείας φυσικών προϊόντων. Για την παραλαβή του συνολικού φαινολικού περιεχομένου (TPF) από τα ελαιόλαδα, τα δείγματα εκχυλίστηκαν με μέθοδο εκχύλισης την προτεινόμενη από τον IOC (International Olive Council, 2009), με μικρές τροποποιήσεις, ώστε να επιταχυνθεί και να αυτοματοποιηθεί η διαδικασία, όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα. Συγκεκριμένα, εφαρμόστηκε η τεχνική της υγρής-υγρής εκχύλισης υποβοηθούμενης από φυγοκέντρηση (Centrifugal Liquid-Liquid Extraction - CLLE). Με τη συγκεκριμένη μέθοδο επιτελείται απομόνωση πολλών φυσικών μεταβολιτών από φυτικά εκχυλίσματα, όπως οι πολυφαινόλες.



Εικόνα 12: Διαγραμματική απεικόνιση της διαδικασίας εκχύλισης

Τα πλεονεκτήματα είναι η ολική ανάκτηση του δείγματος, υψηλή εκλεκτικότητα, υψηλή απόδοση, χαμηλή κατανάλωση διαλύτη, χορήγηση μεγάλων όγκων ελαιόλαδου, ανάκτηση φαινολικών ενώσεων υψηλής προστιθέμενης αξίας (Hamzaoui et al., 2013). Η διαδικασία, που ακολουθήθηκε, για την παραλαβή του ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου και την απομόνωση των επιμέρους συστατικών του, φαίνεται συνοπτικά στην παρακάτω εικόνα και περιγράφεται αναλυτικά σε άλλες μελέτες (Kouka et al., 2017) (Angelis et al., 2017).





Εικόνα 13: Εξαγωγή ολικού πολυφαινολικού κλάσματος από το ελαιόλαδο και απομόνωση των επιμέρους συστατικών του

Τα ελαιόλαδα, από τα οποία προέκυψαν τα εκχυλίσματα, ήταν κορωνέικης ποικιλίας και προήλθαν από την περιοχή της Λακωνίας. Για την παραγωγή του κάθε δείγματος χρησιμοποιήθηκαν 10 g ελαιολάδου. Το πρώτο πολυφαινολικό εκχύλισμα, με την κωδική ονομασία OLE 20 περιείχε 1,42 mg παραγώγων υδροξυτυροσόλης και 1,41 mg παραγώγων τυροσόλης. Αντίστοιχα το δεύτερο δείγμα με την κωδική ονομασία OLE 19 περιείχε 2,56 mg παραγώγων υδροξυτυροσόλης και 1,73 mg παραγώγων τυροσόλης. Οι ποσότητες αυτές υπολογίστηκαν έτσι ώστε να αντιστοιχούν σε 20 g ελαιολάδου, ποσότητα, που σύμφωνα με την EFSA, αποτελεί την ελάχιστη ημερήσια πρόσληψη, προκειμένου να επιτευχθούν ευεργετικά αποτελέσματα για τον οργανισμό.

### 3.2 Σύσταση πολυφαινολικών εκχυλισμάτων

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται η περιεκτικότητα των δύο εκχυλισμάτων σε υδροξυτυροσόλη και τυροσόλη, πληροφορίες για την ποικιλία της ελιάς, τον πρόπο καλλιέργειας της καθώς και την ημερομηνία και τον τρόπο παραγωγής του ελαιολάδου.

**Πίνακας 2: Σύσταση πολυφαινολικών εκχυλισμάτων ελαιολάδου**

	Βάρος ελαιολάδου (g)	Ποσότητα πολυφαινολών (mg)	mg HT που αντιστοιχούν σε 20g ελαιολάδου	mg T που αντιστοιχούν σε 20g ελαιολάδου	Σύνολο (HT+T)	Περιοχή/Τόπος συλλογής ελαιοκάρπου	Ποικιλία	Είδος καλλιέργειας	Ημ/νία συλλογής ελαιοκάρπου	Ημ/νία ελαιοποίησης	Τρόπος παραγωγής
OLE19	10	9.6	2.56	1.73	4.29	Φοινίκι Λακωνίας	Κορωνέικη	Ολοκληρωμένης Διαχείρισης	5/2/2017	6/2/2017	Τριφασικό
OLE20	10	8.3	1.42	1.41	2.83	Γλυκόβρυση Λακωνίας	Κορωνέικη	Ολοκληρωμένης Διαχείρισης	5/2/2017	6/2/2017	Τριφασικό

### 3.3 Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς HeLa

#### Υλικά καλλιέργειας

Θρεπτικό υλικό:

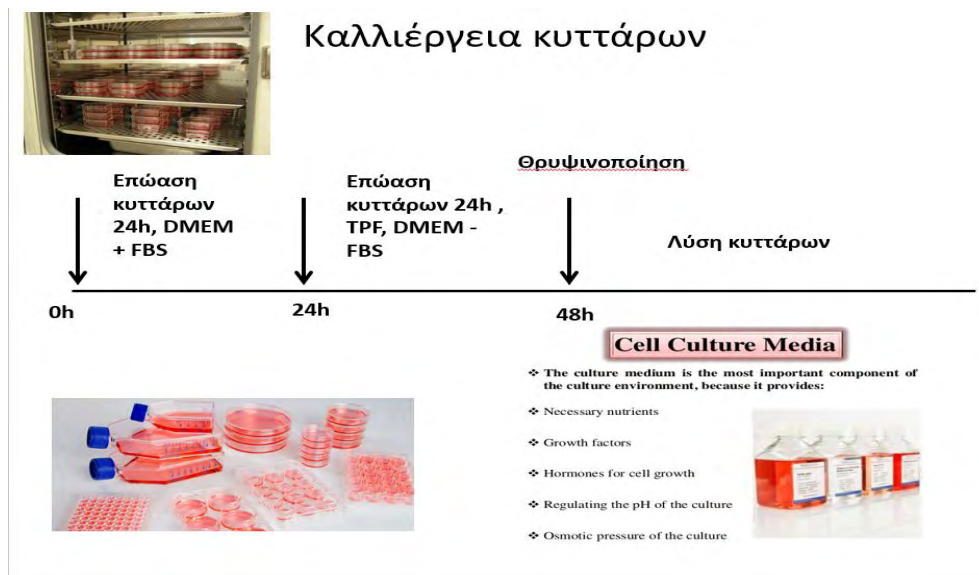
- ❖ Θρεπτικό μέσο Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, 4,5g/l Glucose, 1mM sodium pyruvate, Gibco BRL 41966), περιέχει βιταμίνες, αμινοξέα, γλυκόζη, σίδηρο και κόκκινο της φαινόλης.
- ❖ 2mM L-γλουταμίνη (Biochrom KG Seromed).
- ❖ Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη αντιβιοτικά (antibiotic-antimitotic solution,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

## Διαδικασία Καλλιέργειας

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

Τα κύτταρα αναπτύσσονταν στο θρεπτικό υλικό μέχρι η επιφάνεια της φλάσκας να καλυφθεί περίπου κατά 70-80% με αυτά. Τότε πραγματοποιείται επανακαλλιέργεια τους, με αφαίρεση θρεπτικού υλικού και ξέπλυμα με PBS, αποκολλώντας τα από την φλάσκα με 0,5mL τρυψίνης 0,25%. Ακολουθεί επώαση με την τρυψίνη για 5 λεπτά στους 37°C στον κλίβανο επώασης και στη συνέχεια επαναιώρηση των αποκολλημένων κυττάρων σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS. Οι χειρισμοί των κυττάρων πραγματοποιήθηκαν σε ειδικό θάλαμο καθέτου νηματικής ροής (Laminar air flow) με φως, αέρα και UV για αποστείρωση του χώρου εργασίας, όταν δε χρησιμοποιούταν.

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



Εικόνα 14: Διαδικασία καλλιέργειας κυττάρων

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

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



Εικόνα 15:Μεταβολισμός του ΧΤΤ σε υδατοδιαλυτή φορμαζάνη από ζωντανά κύτταρα

#### Πειραματική Διαδικασία

- ❖ Εφόσον τα κύτταρα έχουν καλύψει το 70-80% της φλάσκας 25cm<sup>2</sup>, αποκολλώνται από την επιφάνεια της, με τη χρήση τρυψίνης 0,25% και ακολουθεί επαναιώρησή τους σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS σε falcon. Μέτρηση του αριθμού τους πραγματοποιείται, με τη βοήθεια αντικειμενοφόρου πλάκας Neubauer.
- ❖ Στη συνέχεια, γίνεται επίστρωση 10.000 κύτταρα/θέση σε «πιάτα» 96 θέσεων (96-well plate) και προστίθεται σε αυτά 150μL θρεπτικό υλικό με 10% FBS (Fetal Bovine Saline). Ακολουθεί επώαση για 24 ώρες στους 37°C, σε 5% CO<sub>2</sub>, προκειμένου να προσκολληθούν στον πάτο του ειδικού «πιάτου» καλλιέργειας.
- ❖ Μετά το πέρας της επώασης, το θρεπτικό υλικό αφαιρείται και ακολουθεί προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων (0.78, 1.56, 3.12,

6.24 mg/ml) σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS (ώστε να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των συστατικών του FBS με τα δείγματα) συνολικού όγκου 100 μl.

- ❖ Επόμενο βήμα είναι η επώαση για 24 ώρες στους 37°C και σε 5% CO<sub>2</sub>.
- ❖ Την επόμενη ημέρα προστίθενται 50 μl από το αντιδραστήριο ΧΤΤ σε κάθε θέση των 96-well plates και ακολουθεί επώαση για 4 ώρες. Αξίζει να σημειωθεί ότι το αντιδραστήριο ΧΤΤ πρέπει να έχει αναλογία 50:1 μεταξύ των αντιδραστηρίων Α και Β, από τα οποία αποτελείται το kit. Η προετοιμασία του αντιδραστηρίου, προκειμένου να υπάρχει η επιθυμητή αναλογία μεταξύ των Α και Β, γίνεται πάντα πριν τη χρησιμοποίησή του. Παράλληλα σε κάθε πείραμα χρησιμοποιούνται και δείγματα ως αρνητικοί μάρτυρες, τα οποία περιείχαν μόνο κύτταρα και όχι ΧΤΤ. Επίσης, χρησιμοποιούνται και δείγματα μάρτυρες που περιείχαν το εκχύλισμα, χωρίς όμως να περιέχουν και κύτταρα, προκειμένου να παρατηρηθεί αν η συγκέντρωση του επηρεάζει την τιμή της απορρόφησης.
- ❖ Μετά την τετράωρη επώαση προσδιορίστηκε η απορρόφηση στα 450 nm με φασματοφωτόμετρο ELISA plate reader (Biotek) και τη χρήση του λογισμικού Gen5 (Biotek).
- ❖ Η εξέταση των εκχυλισμάτων έγινε σε τρία ανεξάρτητα πειράματα.

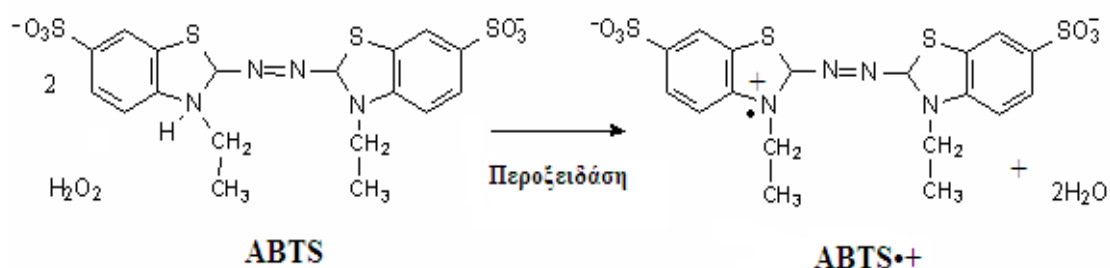
Η % αναστολή των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων ελαιολάδου στην κυτταρική αύξηση της κυτταρικής σειράς HeLa, υπολογίστηκε από τον τύπο:

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

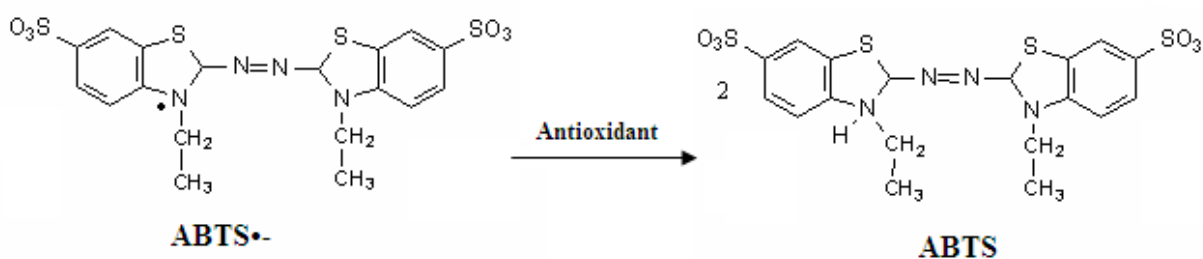
### 3.5 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της ικανότητας δέσμωσης της ρίζας **ABTS•+**

Η μέθοδος εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας, βασιζόμενη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης με την ρίζα **ABTS•+** (κατιόν) πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά από τους Miller και Rice-Evans (Miller et al., 1993). Ο μηχανισμός αλληλεπίδρασης των προς εξέταση αντιοξειδωτικών παραγόντων με την ρίζα **ABTS•+** είναι όμοιος με εκείνον της ρίζας **DPPH•**, η οποία μπορεί να αδρανοποιηθεί είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου είτε μέσω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου (Prior et al., 2005).

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



Εικόνα 16: Παραγωγή της ρίζας του **ABTS•+** μέσω της δράσης περοξειδάσης παρουσία  $H_2O_2$



Εικόνα 17: Μηχανισμός αλληλεπίδρασης αντιοξειδωτική ουσίας με τη ρίζα του ABTS<sup>•+</sup>

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

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

$$\% \text{ αναστολή} = (\text{A}_0 - \text{A}_\delta) / \text{A}_0 \times 100$$

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

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

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

#### **Αντιδραστήρια**

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

#### **3.6.1. Μέθοδος χαλάρωσης πλασμιδιακού DNA (Plasmid relaxation assay)**

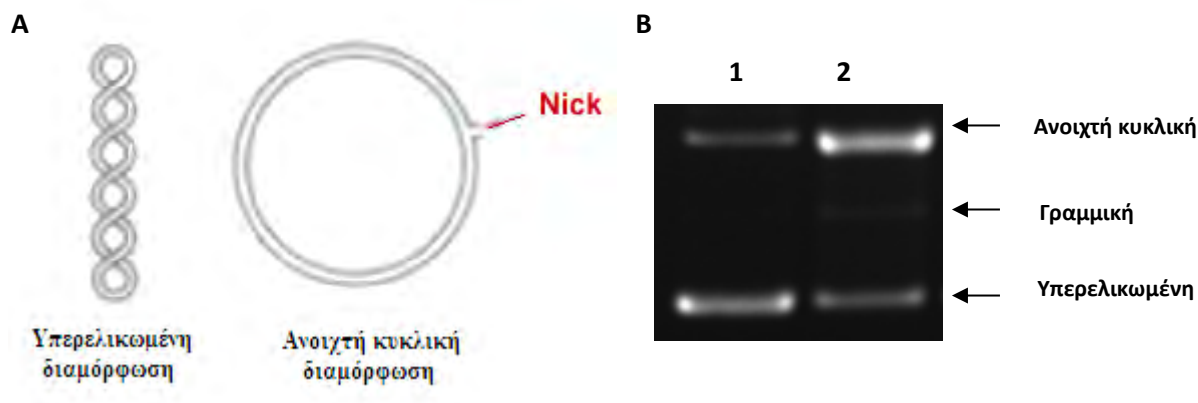
Η μέθοδος χαλάρωσης πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιήθηκε ως μοντέλο για παρατήρηση της αντιοξειδωτικής/προστατευτικής δράσης φυτικών εκχυλισμάτων ή βιοδραστικών ουσιών απέναντι στην επαγόμενη από οξειδωτικούς παράγοντες (π.χ. ελεύθερες ρίζες) και ένζυμα, πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA. Βασίζεται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

1. Η υπερελικωμένη διαμόρφωση (Supercoiled conformation), στην οποία το πλασμιδιακό DNA είναι άθικτο (χωρίς σπασίματα) και αποτελεί την πιο συμπυκνωμένη του μορφή.
2. Η ανοιχτή κυκλική (Open circular, relaxed conformation), στην οποία μεταβαίνει όταν προκαλούνται σε αυτό μονόκλινα σπασίματα. Οι υπερελικώσεις δεν υπάρχουν και αυτό συμβαίνει είτε από ενζυμικούς είτε από άλλους παράγοντες (π.χ. ελεύθερες ρίζες) που έχουν την ικανότητα να προκαλούν μονόκλινα σπασίματα στο DNA.
3. Η γραμμική διαμόρφωση (Linear conformation) στην οποία μεταβαίνει όταν φέρει δίκλινα σπασίματα (Εικόνα ).

Όσο πιο μικρή είναι η διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA τόσο πιο γρήγορα διαπερνά τους πόρους της αγαρόζης και εμφανίζεται πιο κάτω στο πήκτωμα της αγαρόζης. Επομένως η υπερελικωμένη διαμόρφωση τρέχει πρώτη, δεύτερη η γραμμική και τρίτη η ανοιχτή κυκλική (Εικόνα 15). Η εκτίμηση της προστατευτικής δράσης των εξεταζόμενων δειγμάτων (φυτικών εκχυλισμάτων, κλασμάτων και καθαρών ουσιών) απέναντι στην



ικανότητα ελευθέρων ριζών και άλλων οξειδωτικών παραγόντων, να προκαλούν μονόκλινα σπασίματα στο πλασμιδιακό DNA βασίζεται στην παρεμπόδιση της μετάβασης της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδίου στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση.



Εικόνα 18: Διαμορφώσεις του πλασμιδιακού DNA. (Α) Σχηματική απεικόνιση της αλλαγής της διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA μετά από την πρόκληση σε αυτό μονόκλωνων θραυσμάτων (Nicks). (Β) Φωτογραφία πηκτώματος αγαρόζης στο οποίο φαίνεται οι τρεις κύριες διαμορφώσεις του πλασμιδιακού DNA. Στήλη 1: πλασμιδιακό DNA χωρίς την επίδραση οξειδωτικού παράγοντα (20% ανοιχτή κυκλική και 80% υπερελικωμένη διαμόρφωση). Στήλη 2. πλασμιδιακό DNA μετά από επίδραση οξειδωτικού παράγοντα (30% ανοιχτή κυκλική, 6% γραμμική και 64% υπερελικωμένη διαμόρφωση).

### 3.6.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

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

Η συνολική καλλιέργεια χωρίζεται σε τέσσερις επιμέρους καλλιέργειες των 50 mL. Οι καλλιέργειες φυγοκεντρώνται για 20 min στα 2057 g στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και στο ίζημα των βακτηρίων προστίθενται 4 mL διαλύματος 1 (50 mM γλυκόζη, 25 mM Tris-Cl pH=8, 10 mM EDTA, pH 8) και κατόπιν ακολουθεί επαναδιάλυση του ιζήματος. Τα δείγματα παραμένουν για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου στα οποία στην συνέχεια προστίθενται 8 mL διαλύματος 2 (0,2 N NaOH, 1% SDS) και αναδεύονται πολύ απαλά 4-5 φορές. Επειδή το διάλυμα είναι πολύ αλκαλικό, το πλασμιδιακό DNA μεταβαίνει

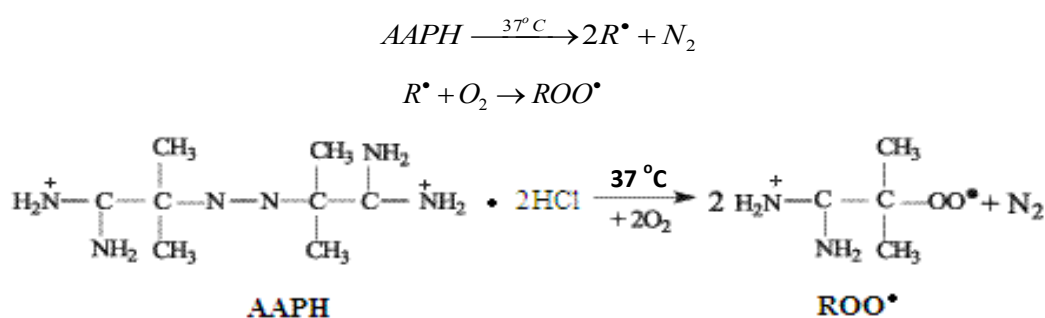
από την υπερελικωμένη διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση, γι' αυτό αμέσως μόλις διαυγάσει το διάλυμα προστίθεται 6 mL διαλύματος 3 ((100 mL) 5 M οξικό κάλιο  $C_2H_3O_2K$ , 11,5 mL οξικού οξέος). Τα δείγματα αναδεύονται και παραμένουν για 7-8 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 20 min στα 3214 g στους 4°C και στην συνέχεια το υπερκείμενο συλλέγεται και μεταφέρεται σε καινούριο σωλήνα με ταυτόχρονη μέτρηση του όγκου του και η φυγοκέντρηση επαναλαμβάνεται.

Κατόπιν στο υπερκείμενο που συλλέγεται, προστίθενται διάλυμα προπανόλης σε όγκο ίσο με 60% του όγκου του υπερκείμενου. Τα δείγματα αναδεύονται και παραμένουν για 3-5min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρούνται για 20 min στα 3214 g στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και στο ίζημα προστίθενται διάλυμα αιθανόλης 70% v/v σε όγκο ίσο με 50% του όγκου του υπερκείμενου. Ακολουθεί ανάδευση και φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 20 min στα 3214 g στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα (πλασμιδιακό DNA) αφού στεγνώσει επαναδιαλύεται σε διάλυμα TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, ένζυμο RNase 10 µg/mL).

Ο προσδιορισμός της ποσότητας του πλασμιδιακού DNA που απομονώθηκε γίνεται με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 260 nm. Μία μονάδα οπτικής απορρόφησης στα 260 nm αντιστοιχεί σε συγκέντρωση DNA 50 µg/mL ( $1OD_{260} \rightarrow 50 \mu\text{g/mL}$ ). Για τον προσδιορισμό της καθαρότητας του πλασμιδιακού DNA γίνεται μέτρηση της οπτικής απορρόφησης και στα 280 nm και υπολογίζεται ο λόγος των τιμών της οπτικής απορρόφησης 260/280 (στα 280 απορροφούν οι πρωτεΐνες και στα 260 το DNA). Όταν ο λόγος είναι >1,8 η καθαρότητα του πλασμιδίου θεωρείται πολύ καλή. Για τον έλεγχο της διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 1% στα 100 V. Στην συνέχεια το πήκτωμα χρωματίζεται σε διάλυμα 0,5 µg/mL βρωμιούχου αιθιδίου για 30 min και αποχρωματίζεται σε απιονισμένο  $H_2O$  για 30 min. Ακολουθεί φωτογράφιση του πηκτώματος με το σύστημα ανάλυσης εικόνας Vilber Lourmat DP-001 (Torcy, France) μετά από έκθεση του πηκτώματος σε συσκευή εκπομπής UV. Το πλασμιδιακό DNA που απομονώθηκε ήταν καλής καθαρότητας και βρίσκεται κατά 10-20% στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση πριν την πραγματοποίηση των πειραμάτων.

### 3.6.3 Εκτίμηση της προστατευτικής δράσης απέναντι στην επαγόμενη από ρίζες ROO<sup>•</sup> πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA

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



Εικόνα 19 : Χημική δομή της ένωσης AAPH και οι αντιδράσεις της θερμικής της διάσπασης και του σχηματισμού των ριζών ROO<sup>•</sup>.

Πιο αναλυτικά η αντίδραση πραγματοποιείται σε όγκο 10 μL. Στο μείγμα της αντίδρασης περιέχονται 1 μg (2 μL) πλασμιδιακού DNA Bluescript-SK+, το εξεταζόμενο δείγμα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (3 μL) και 2,5 mM AAPH (4 μL) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7,4 (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Όλα τα δείγματα αναδεύονται και επωάζονται στους 45 min στους 37 °C στο σκοτάδι. Το AAPH προστίθεται λίγο πριν την επώαση. Μετά την επώαση η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη 3 μL διαλύματος φόρτωσης (0,25% χρωστικής κυανό της βρωμοφαινόλης και

30% γλυκερόλη). Το δείγμα, το οποίο περιέχει το πλασμιδιακό DNA μόνο του στο ρυθμιστικό διάλυμα αποτελεί τον αρνητικό μάρτυρα, ενώ το δείγμα που περιέχει το πλασμιδιακό DNA μαζί με 2,5 mM AAPH αποτελεί το θετικό μάρτυρα. Κάθε δείγμα δοκιμάζεται και μόνο του μαζί με το πλασμιδιακό DNA στην μεγαλύτερη εξεταζόμενη συγκέντρωσή του για να παρατηρηθεί η πιθανή επίδραση του δείγματος ή του διαλύτη στον οποίο είναι διαλυμένο το δείγμα στην υπερελικωμένη διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA.

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

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

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

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

S<sub>θ</sub>: Ποσοστό της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδίου του θετικού μάρτυρα (πλασμιδιακό DNA και ρίζες OH<sup>•</sup> ή ROO<sup>•</sup>).

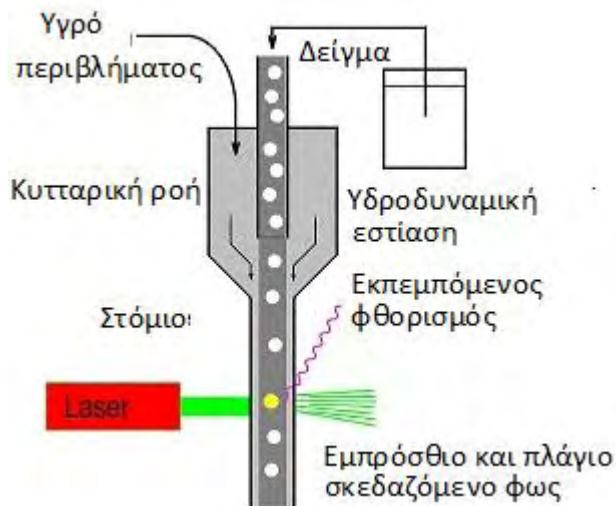
S<sub>δ</sub>: Ποσοστό της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδίου του δείγματος (πλασμιδιακό DNA, ρίζες OH<sup>•</sup> ή ROO<sup>•</sup> και δείγμα [φυτικό εκχύλισμα, κλάσμα, καθαρή ένωση]).

S<sub>0</sub>: Ποσοστό της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδίου του αρνητικού μάρτυρα (πλασμιδιακό DNA μόνο του).

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

### 3.7 Προσδιορισμός των επιπέδων της GSH και των ROS με κυτταρομετρία ροής

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



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

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



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

Σε κάθε πείραμα παρασκευάζονται ένα διάλυμα της χρωστικής mercury orange (400  $\mu\text{M}$ ) διαλυμένης σε ακετόνη και ένα διάλυμα της χρωστικής DCF-DA (100  $\mu\text{M}$ ) διαλυμένης σε μεθανόλη. Το κυτταρικό αιώρημα επαναδιαλύεται σε 150  $\mu\text{l}$  PBS και επωάζονται παρουσία της χρωστικής mercury orange (15  $\mu\text{l}$ ) (40 $\mu\text{M}$ ) ή της χρωστικής DCF-DA (15  $\mu\text{l}$ ) (10 $\mu\text{M}$ ), για τον προσδιορισμό της GSH ή των ROS αντίστοιχα, στο κλίβανο στους 37°C για 30 min. Ακολουθεί πλύση και επαναδιάλυση των κυττάρων σε 250  $\mu\text{l}$  PBS και φυγοκέντρηση στα 300 g, στους 4°C για 10 min. Το υπερκείμενο απομακρύνεται, προστίθενται 250  $\mu\text{l}$  PBS και προχωράμε στην ανάλυση με τη χρήση κυτταρομέτρου ροής FACScan (Becton Dickinson, NJ, USA) με φάσμα διέγερσης και εκπομπής στα 488 και 530 nm για τα ROS και τα 488 και 580 nm για την GSH. Επίσης μετρήθηκαν η εμπρόσθια και δεξιά οπτική γωνία σκέδασης του φωτός που δείχνουν το μέγεθος και την εσωτερική πολυπλοκότητα των κυττάρων. Τα κύτταρα αναλύθηκαν με έναν ρυθμό 100-200 γεγονότων/δευτερόλεπτο. Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε 10.000 κύτταρα ανά δείγμα και η ένταση φθορισμού μετρήθηκε σε λογαριθμική κλίμακα. Τα δεδομένα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό BD Cell Quest (Becton Dickinson). Το κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκε τουλάχιστον τρεις φορές.

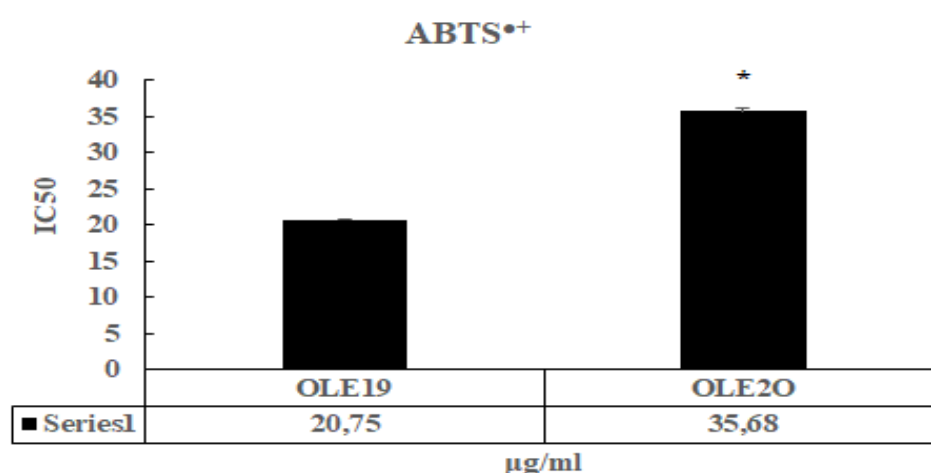
### 3.8 Στατιστική ανάλυση

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

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

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

Με τη μέθοδο ABTS<sup>•+</sup>, μετρήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα των δύο πολυφαινολικών εκχυλισμάτων ελαιόλαδου, OLE19 και OLE20. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως IC50, δηλαδή τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος που απαιτείται για την εξουδετέρωση της ρίζας στο 50%. Όσο μικρότερη η τιμή του IC50, τόσο πιο ισχυρή η αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος. Το OLE19 είχε IC50 στα 20,75 µg/ml, ενώ το OLE20 είχε IC50 στα 35,68 µg/ml. Συνεπώς, το OLE19, είχε στατιστικά σημαντικά ( $p < 0,05$ ) μεγαλύτερη ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας του ABTS<sup>•+</sup>, σε σύγκριση με το OLE20.

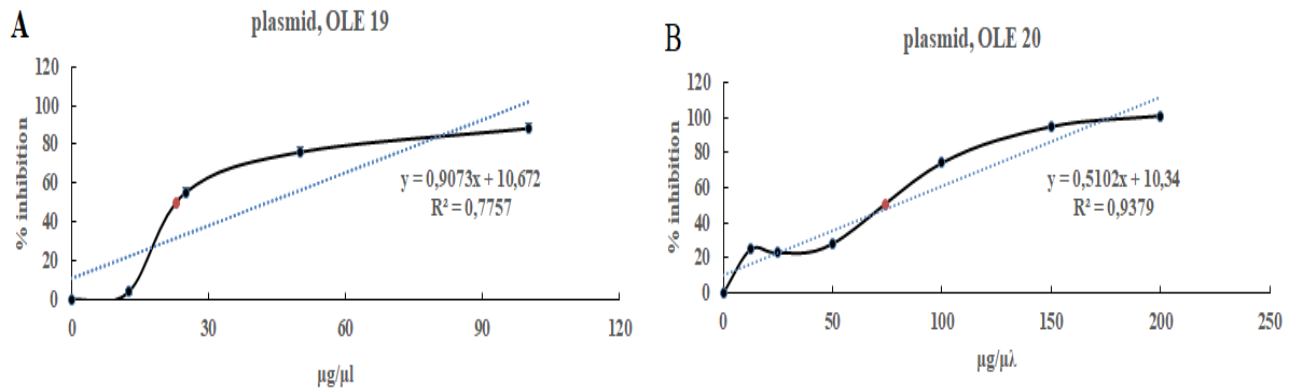


Διάγραμμα 1: Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω δέσμευσης της ρίζας ABTS<sup>•+</sup>. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως  $\pm$  SEM. \* Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών IC50 των δύο εκχυλισμάτων ( $p < 0,05$ ) ( $n=3$ ).

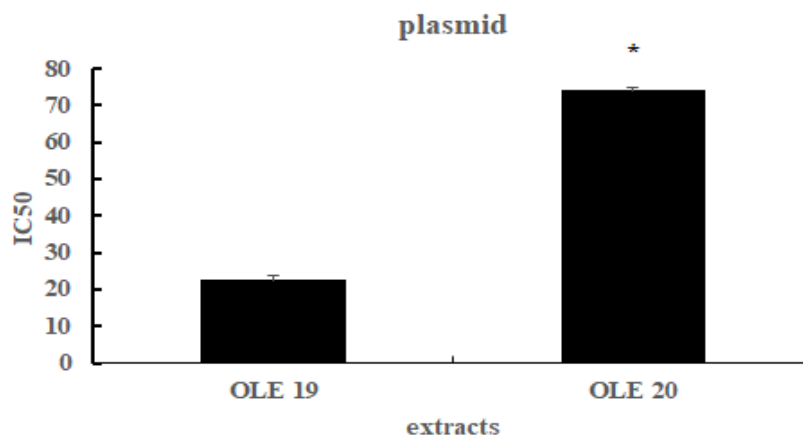
### 4.2 Επαγόμενη από ρίζες περοξυλίου (ROO●) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA.

Με την μέθοδο των επαγόμενων θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA, προσδιορίστηκε η ικανότητα των δύο πολυφαινολικών εκχυλισμάτων ελαιόλαδων (OLE 19, OLE 20), να προστατεύουν το πλασμιδιακό DNA, από τα θραύσματα που προκαλούνται από τη ρίζα του ROO●. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως το OLE 19 είχε στατιστικά σημαντικά ( $p < 0,05$ ), μεγαλύτερη ικανότητα να προστατεύει τη θραύση του DNA, σε σχέση με το OLE 20, καθώς εμφάνισε IC50 στα 22,5 µg/ml σε αντίθεση με το OLE 20, που εμφάνισε IC50 στα 74 µg/ml.

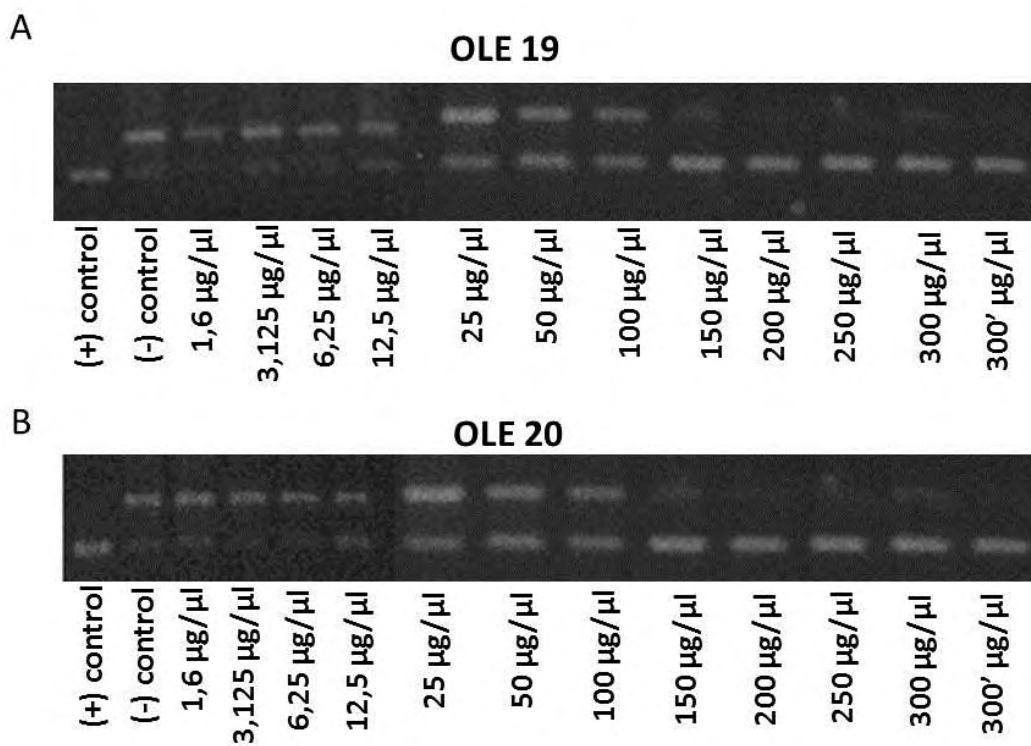




**Διάγραμμα 2:** Επαγόμενη από ρίζες περοξυλίου (ROO•) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδικό DNA. A) OLE 19 IC50 22,5 µg/µl, B) OLE 20 IC50 74µg/µl. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως επί τις εκατό αναστολή σε σύγκριση με το control και παρουσιάζονται ως mean ± SEM, (n=3).



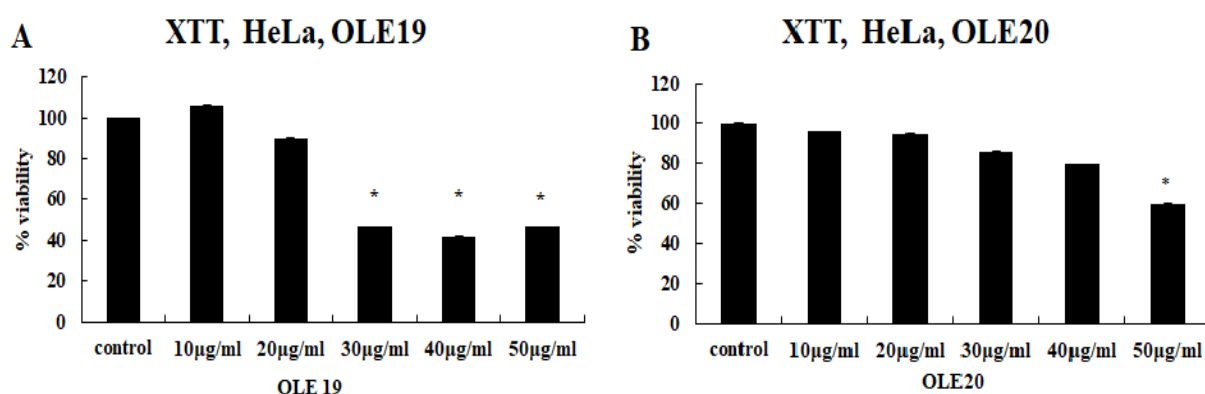
**Διάγραμμα 3:** Επαγόμενη από ρίζες περοξυλίου (ROO•) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδικό DNA. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως επί τις εκατό αναστολή σε σύγκριση με το control και παρουσιάζονται ως mean ± SEM, (n=3). \* $p < 0,05$  στατιστική σημαντικότητα μεταξύ των δύο εκχυλισμάτων.



Εικόνα 22: Εικόνα από το πήκτωμα αгарόζης για A) το OLE19, B) το OLE 20

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

Με την μέθοδο ΧΤΤ έγινε προσδιορισμός των κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων. Οι μη κυτταροτοξικές χρησιμοποιήθηκαν έτσι ώστε να γίνει εκτίμηση της επίδρασης τους στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό του κυττάρου. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα τραχήλου της μήτρας (HeLa), όπου και χορηγήθηκε εύρος συγκεντρώσεων από 10,0-50,0  $\mu\text{g/ml}$ . Ωστόσο συγκεντρώσεις πάνω από 30,0  $\mu\text{g/ml}$  OLE19 και πάνω από 50 $\mu\text{g/ml}$  OLE20, ήταν κυτταροτοξικές. Συνεπώς, για τον έλεγχο τις αντιοξειδωτικής δράσης των δύο εκχυλισμάτων, χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις από 5,0-20,0  $\mu\text{g/ml}$  OLE19 και 10,0-25,0  $\mu\text{g/ml}$  OLE20.



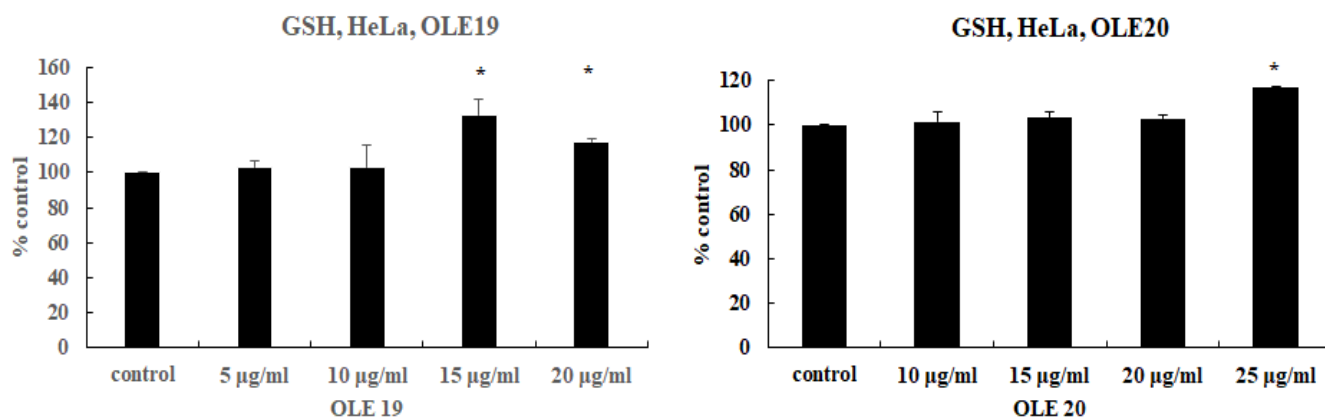
**Διάγραμμα 4:** Προσδιορισμός κυτταροτοξικότητας των εκχυλισμάτων OLE19, OLE 20, στην κυτταρική σειρά HeLa, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης των εκχυλισμάτων, με τη μέθοδο ΧΤΤ. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control και παρουσιάζονται ως mean  $\pm$  SEM, (n=6). \* $p < 0,05$  στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με το control.

### 4.4 Προσδιορισμός της οξειδοαναγωγικής κατάστασης με κυτταρομετρία ροής

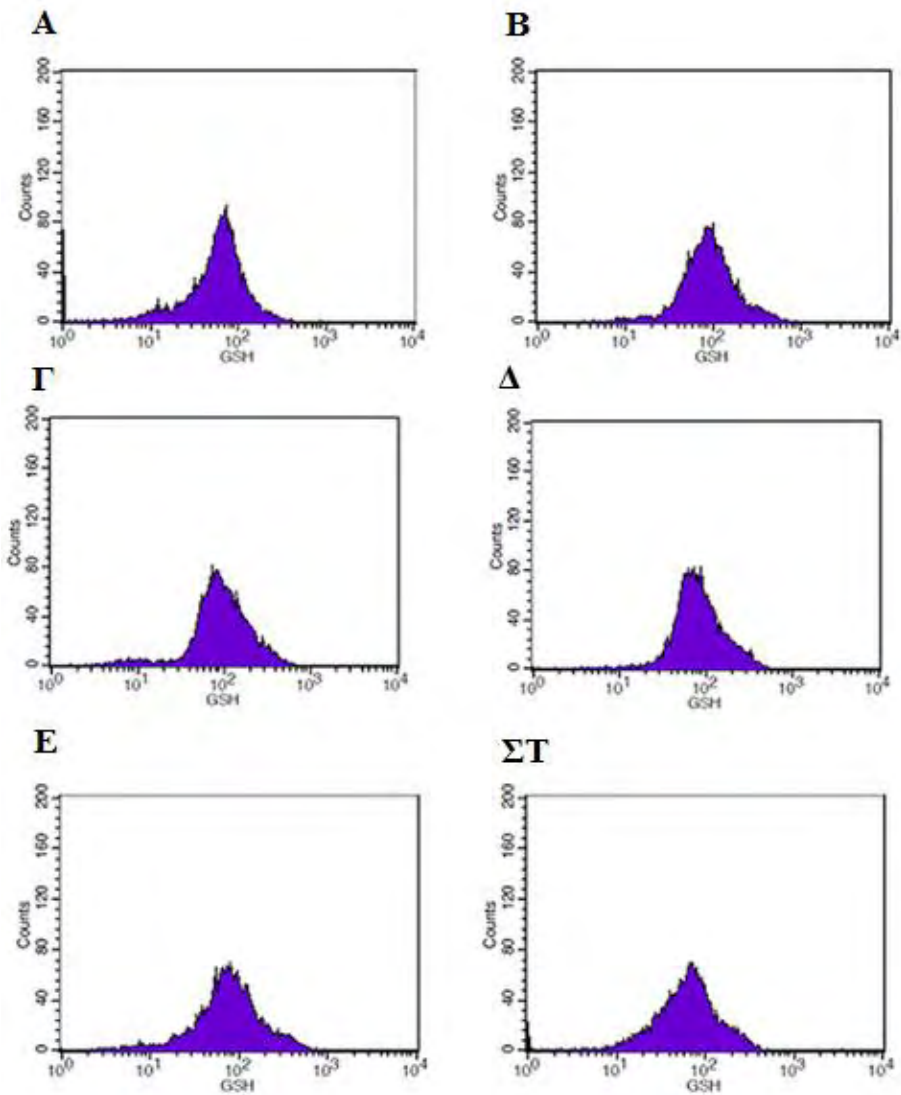
#### 4.4.1. Επίπεδα γλουταθειόνης (GSH).

Τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής έδειξαν πως το εκχύλισμα OLE19 αύξησε στατιστικώς σημαντικά ( $p < 0,05$ ), τα επίπεδα της GSH κατά 33 και 18 % στις συγκεντρώσεις 15 και 20  $\mu\text{g/ml}$  OLE19 αντίστοιχα, σε σύγκριση με το control. Επιπλέον, το εκχύλισμα

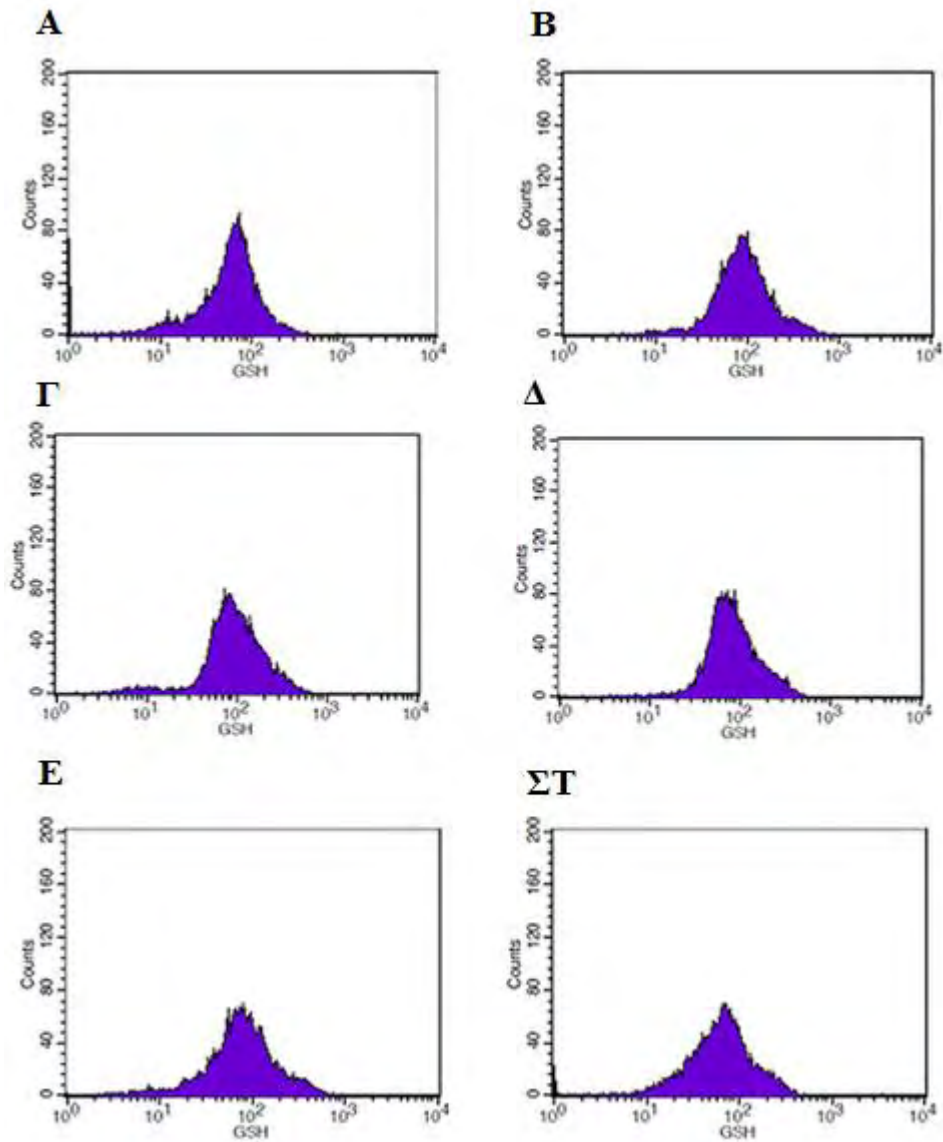
OLE20, αύξησε στατιστικώς σημαντικά ( $p<0,05$ ), τα επίπεδα της GSH κατά 17 % στην συγκέντρωση 25  $\mu\text{g/ml}$  OLE20 αντίστοιχα, σε σύγκριση με το control.



**Διάγραμμα 5:** Επίδραση εκχυλισμάτων ελαιόλαδου OLE19, OLE20, στα επίπεδα GSH, στην κυτταρική σειρά HeLa, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης των εκχυλισμάτων, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control και παρουσιάζονται ως mean  $\pm$  SEM, (n=3). \* $p<0,05$  στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με το control.



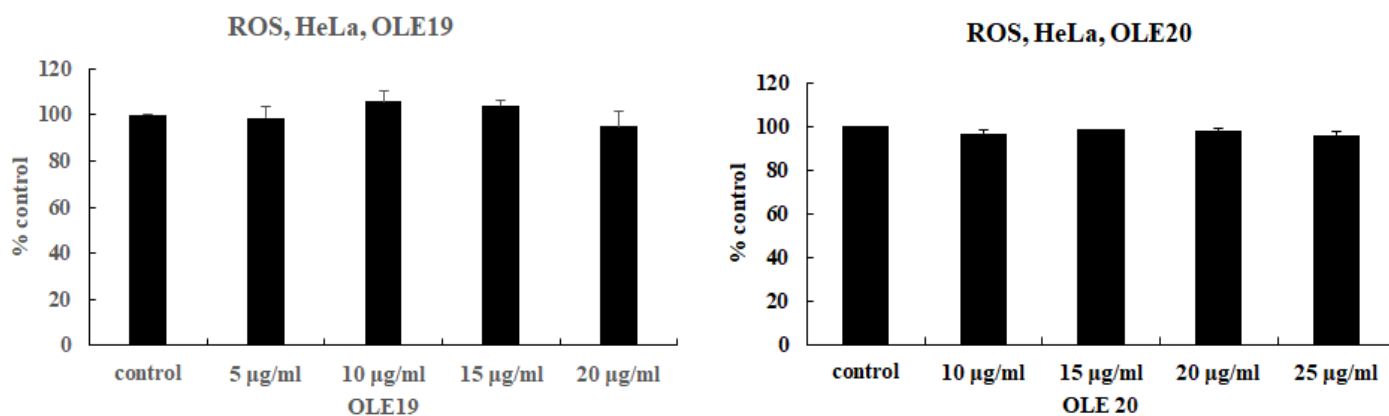
**Διάγραμμα 6: Επίδραση OLE19 στα επίπεδα GSH στην κυτταρική σειρά HeLa. Τα ιστογράμματα παρουσιάζουν τον φθορισμό που εκπέμπεται από 10,000 κύτταρα κατά την μέτρηση της GSH, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Ο FL2 αντιπροσωπεύει τον φθορισμό που ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας 488 και 580 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και ως μήκος κύματος εκπομπής. Α και Β) Επίπεδα GSH στα controls (χωρίς OLE19). Γ) Επίπεδα GSH στα 5 µg/ml OLE19. Δ) Επίπεδα GSH στα 10 µg/ml OLE19. Ε) Επίπεδα GSH στα 15 µg/ml OLE19. ΣΤ) Επίπεδα GSH στα 20 µg/ml OLE19.**



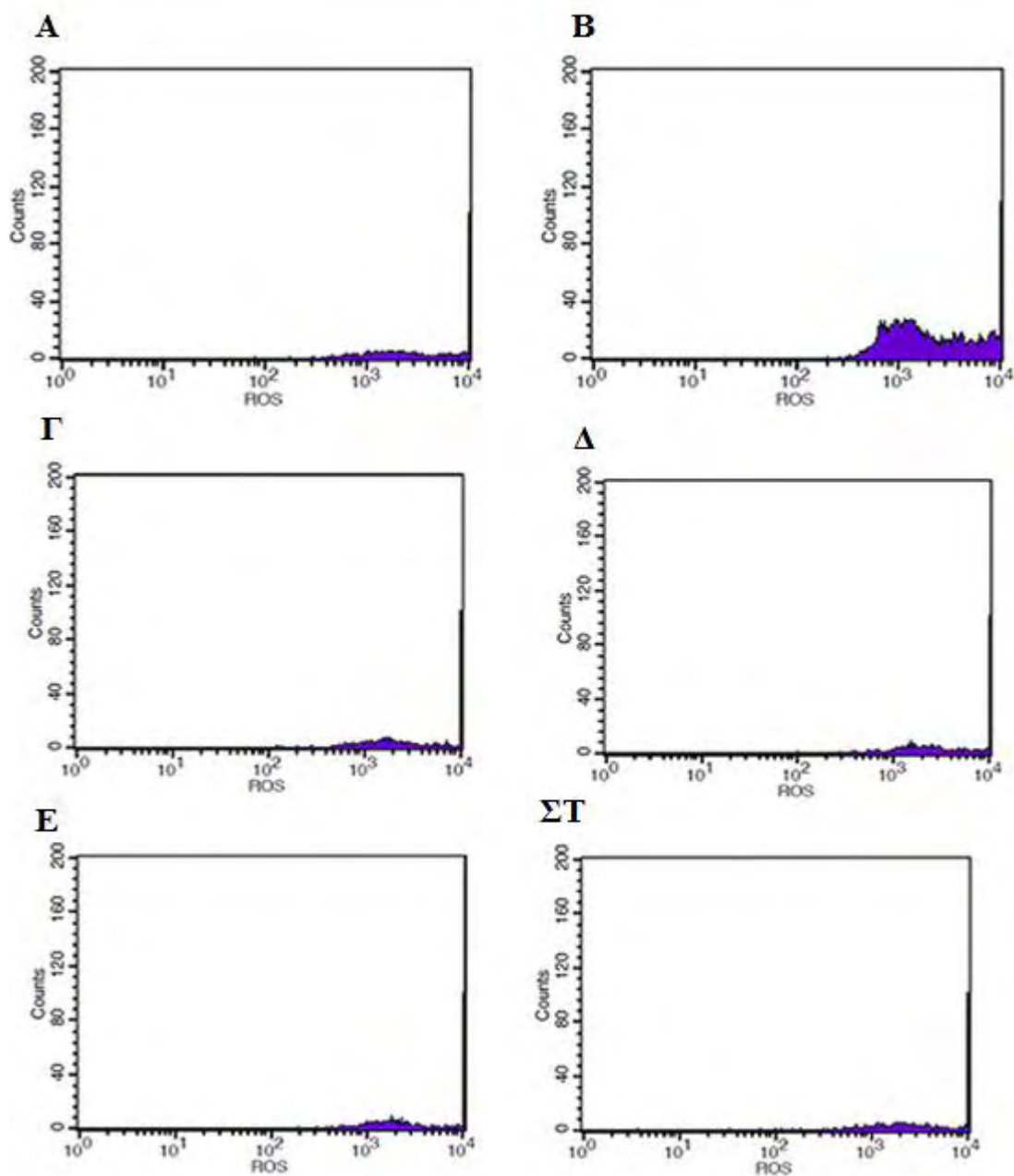
**Διάγραμμα 7: Επίδραση OLE20 στα επίπεδα GSH στην κυτταρική σειρά HeLa. Τα ιστογράμματα παρουσιάζουν τον φθορισμό που εκπέμπεται από 10,000 κύτταρα κατά την μέτρηση της GSH, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Ο FL2 αντιπροσωπεύει τον φθορισμό που ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας 488 και 580 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και ως μήκος κύματος εκπομπής. Α και Β) Επίπεδα GSH στα controls (χωρίς OLE20). Γ) Επίπεδα GSH στα 10  $\mu\text{g/ml}$  OLE20. Δ) Επίπεδα GSH στα 15  $\mu\text{g/ml}$  OLE20. Ε) Επίπεδα GSH στα 20  $\mu\text{g/ml}$  OLE20. ΣΤ) Επίπεδα GSH στα 25  $\mu\text{g/ml}$  OLE20.**

#### 4.4.2. Επίπεδα δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS).

Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στα επίπεδα ROS, σε σύγκριση με το control, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης των εκχυλισμάτων OLE19 και OLE20.

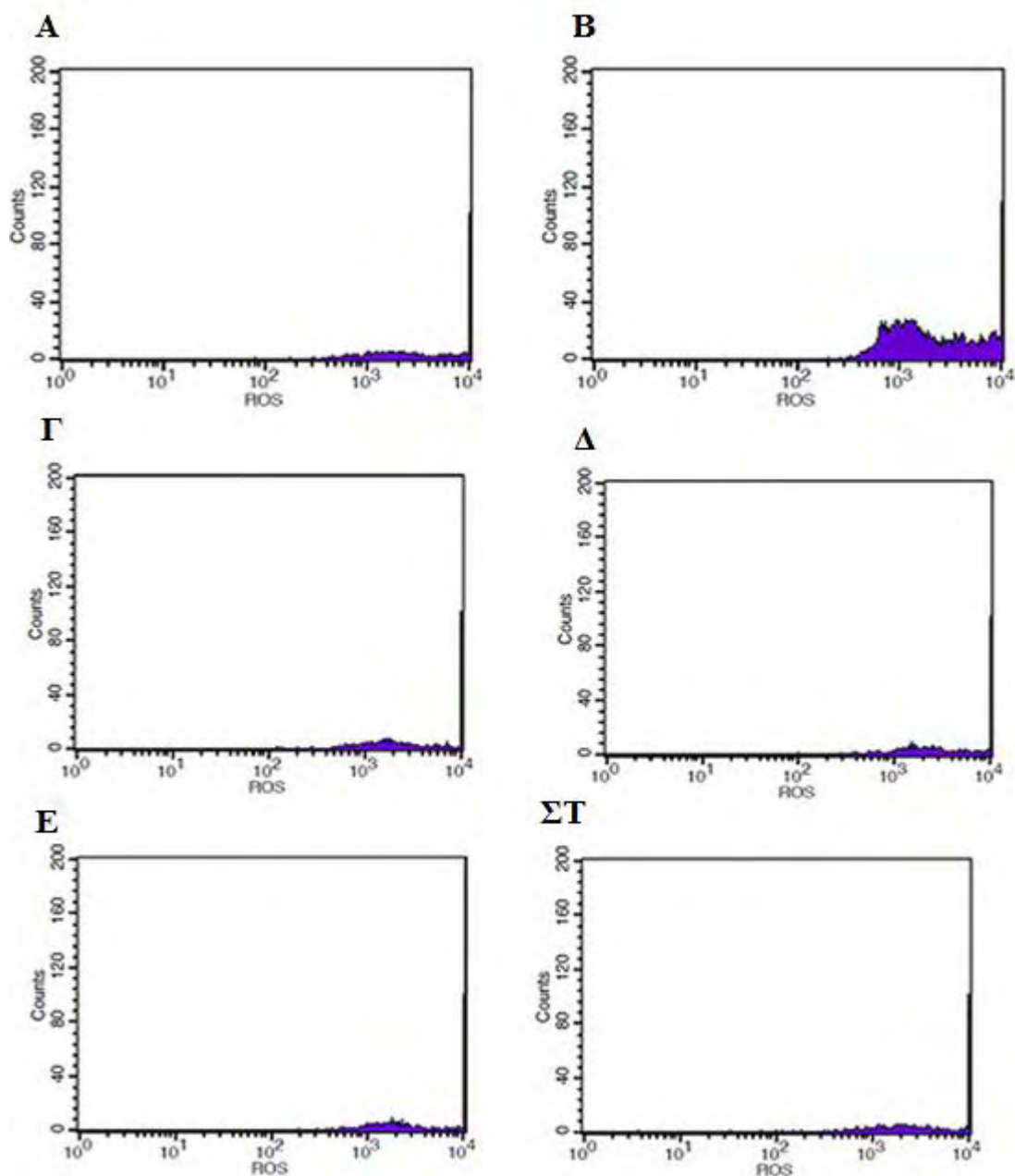


**Διάγραμμα 8:** Επίδραση OLE19 και OLE20 στα επίπεδα ROS, στην κυτταρική σειρά HeLa έπειτα από 24 ώρες χορήγησης των εκχυλισμάτων, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control και παρουσιάζονται ως mean ± SEM, (n=3). \*p<0,05 στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με το control.



**Διάγραμμα 9:** Επίδραση OLE19 στα επίπεδα ROS στην κυτταρική σειρά HeLa. Τα ιστογράμματα παρουσιάζουν τον φθορισμό που εκπέμπεται από 10,000 κύτταρα κατά την μέτρηση της GSH, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Ο FL2 αντιπροσωπεύει τον φθορισμό που ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας 488 και 580 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και ως μήκος κύματος εκπομπής. Α και Β) Επίπεδα ROS στα controls (χωρίς OLE19). Γ) Επίπεδα ROS στα 5 µg/ml OLE19. Δ) Επίπεδα ROS στα 10 µg/ml OLE19. Ε) Επίπεδα ROS στα 15 µg/ml OLE19. ΣΤ) Επίπεδα ROS στα 20 µg/ml OLE19.





**Διάγραμμα 10:** Επίδραση OLE20 στα επίπεδα ROS στην κυτταρική σειρά HeLa. Τα ιστογράμματα παρουσιάζουν τον φθορισμό που εκπέμπεται από 10,000 κύτταρα κατά την μέτρηση της GSH, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Ο FL2 αντιπροσωπεύει τον φθορισμό που ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας 488 και 580 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και ως μήκος κύματος εκπομπής. Α και Β) Επίπεδα ROS στα controls (χωρίς OLE20). Γ) Επίπεδα ROS στα 10 µg/ml OLE20. Δ) Επίπεδα ROS στα 15 µg/ml OLE20. Ε) Επίπεδα ROS στα 20 µg/ml OLE20. ΣΤ) Επίπεδα ROS στα 25 µg/ml OLE20.

## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν η αντιοξειδωτική και αντιμεταλλαξιγόνος δράση δύο πολυφαινολικών εκχυλισμάτων παρθένου ελαιολάδου, που προήλθε από την ενδημική ποικιλία ελιάς κορωνέικη. Τα εκχυλίσματα εμφάνισαν διαφορετική περιεκτικότητα σε υδροξυτυροσόλη και τυροσόλη, δύο εκ των κυριότερων πολυφαινολικών συστατικών του ελαιολάδου, με ιδιαίτερα ευεργετικές ιδιότητες για την υγεία του ανθρώπου. Πιο συγκεκριμένα, το OLE 19 είναι ένα εκχύλισμα, του οποίου η σύσταση υπερτερεί σε υδροξυτυροσόλη και παραγώγων αυτής, ενώ το εκχύλισμα OLE 20 περιέχει ίση ποσότητα υδροξυτυροσόλης, τυροσόλης και παραγώγων αυτών, ωστόσο η ποσότητα υδροξυτυροσόλης είναι μικρότερη σε σύγκριση με αυτή του OLE 19.

Πιο συγκεκριμένα μέσω της μεθόδου ABTS<sup>•+</sup>, μετρήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα των δύο πολυφαινολικών εκχυλισμάτων ελαιολάδου, OLE19 και OLE20. Στη συνέχεια τα εκχυλίσματα εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να παρεμποδίζουν την επαγόμενη από ρίζες ROO<sup>•</sup> πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων DNA. Ακόμα η αντιοξειδωτική δράση των υπό εξέταση δειγμάτων αξιολογήθηκε σε κυτταρικό επίπεδο, με την χρήση της κυτταρικής σειράς ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων τραχήλου της μήτρας (HeLa), η οποία επιλέχθηκε λόγω της πληθώρας μελετών, που σχετίζονται με την αντιπολλαπλασιαστική, προαποπτωτική και DNA προστατευτική δράση των πολυφαινολικών ελαιολάδου έναντι του καρκίνου (Pampaloni et al., 2014)(Cardeno et al., 2013)(Warleta et al., 2011). Προκειμένου να χρησιμοποιηθούν μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις των δειγμάτων στα πειράματα, η κυτταροτοξικότητά τους εκτιμήθηκε με την μέθοδο ΧΤΤ. Τέλος έγινε προσδιορισμός της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των κυττάρων μέσω κυτταρομετρίας ροής, όπου ελέγχθηκαν τα επίπεδα γλουταθειόνης (GSH) και τα επίπεδα δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS).

Κατά την μέθοδο ABTS<sup>•+</sup> και τα δύο δείγματα εμφάνισαν μια δόσοεξαρτώμενη ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας, όμως το OLE19 με τιμή IC50 στα 20,75 μg/ml φάνηκε να έχει στατιστικά σημαντικά ( $p < 0,05$ ) μεγαλύτερη ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας του ABTS<sup>•+</sup>, σε σύγκριση με το OLE20, του οποίου η τιμή IC50 υπολογίστηκε στα 35,68 μg/ml. Το αποτέλεσμα αυτό ίσως οφείλεται στο γεγονός ότι το OLE19 έχει μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε υδροξυτυροσόλη, σε σχέση με το OLE20, η οποία λόγω της επιπλέον υδροξυλομάδας, που έχει σε σχέση με την τυροσόλη, εμφανίζει ισχυρότερες αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Jose Pedro De La Cruz et al., 2015).

Τα αποτελέσματα της μεθόδου για την εκτίμηση της προστατευτικής δράσης των εκχυλισμάτων απέναντι στην επαγόμενη από ρίζες ROO• πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA, έδειξαν πως το OLE 19 είχε στατιστικά σημαντικά ( $p < 0,05$ ), μεγαλύτερη ικανότητα να προστατεύει τη θραύση του DNA, σε σχέση με το OLE 20, καθώς εμφάνισε IC50 στα 22,5 μg/μl σε αντίθεση με το OLE 20, που εμφάνισε IC50 στα 74 μg/μl. Και τα δύο εκχυλίσματα φαίνεται να δρουν αποτελεσματικά στην εξουδετέρωση ριζών υπεροξειδίου και στην προστασία του DNA από οξειδωση. Μελέτη σε ανθρώπινα μονοπύρνα κύτταρα του αίματος (PBMC) και σε προμυελοκυτταρικά λευχαιμικά κύτταρα (HL60), καταδεικνύει την δυνατότητα των πολυφαινολών του ελαιολάδου να αποτρέπουν την καταστροφή του DNA από το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fabiani et al., 2008). Παρόλα αυτά το OLE 19 εμφάνισε την ισχυρότερη δράση. Το γεγονός αυτό φαίνεται να οφείλεται στην περίσσεια σε υδροξυτυροσόλη, που περιέχεται στο OLE 19, η οποία όπως έδειξε και η μέθοδος ABTS<sup>•+</sup>, εμφάνισε μεγαλύτερη ικανότητα εξουδετέρωσης ελευθέρων ριζών. Επίσης η υδροξυτυροσόλη εμφάνισε μεγαλύτερη προστατευτική δράση στην οξειδωση του DNA σε ανθρώπινα μαστικά επιθηλιακά κύτταρα (MCF10A) σε αντίθεση με την τυροσόλη (Warleta et al., 2011). Έτσι θα μπορούσαμε να πούμε ότι εμφανίζει πιθανή προληπτική δράση έναντι του καρκίνου.

Τα αποτελέσματα από την μέθοδο XTT έδειξαν πως κυτταροτοξικότητα εμφανίστηκε για συγκεντρώσεις πάνω από 30,0 μg/ml για το OLE19 και πάνω από 50μg/ml για το OLE20. Συνεπώς, για τον έλεγχο τις αντιοξειδωτικής δράσης των δύο εκχυλισμάτων, χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις από 5,0-20,0 μg/ml OLE19 και 10,0-25,0 μg/ml OLE20. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, το OLE19 εμφάνισε κυτταροτοξικότητα σε μικρότερες συγκεντρώσεις από ότι το OLE 20.

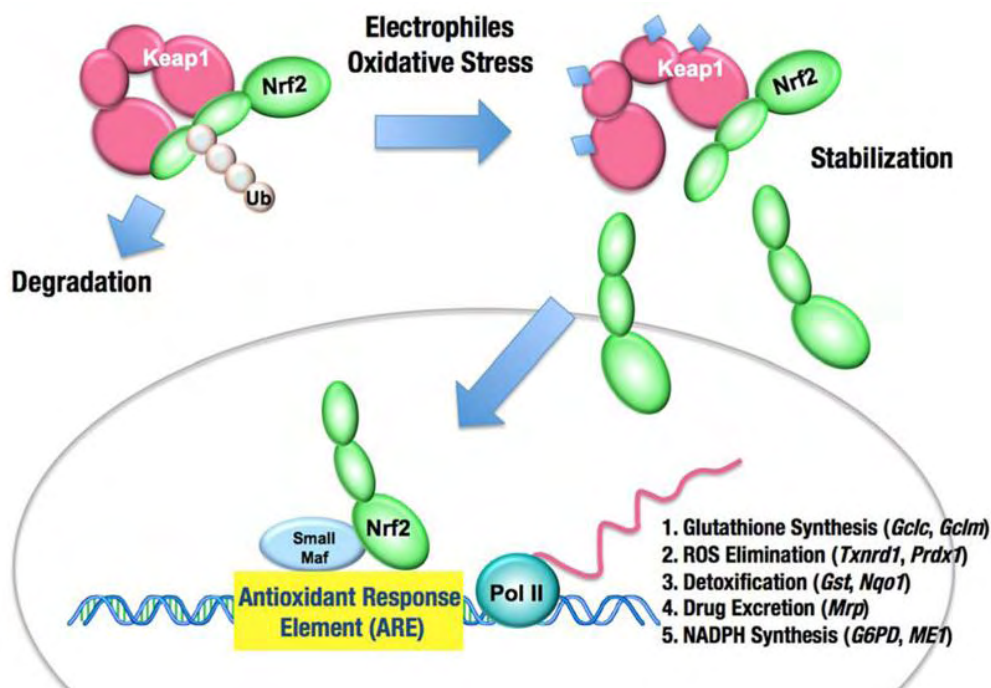
Μέσω της κυτταρομετρίας ροής μετρήθηκαν τα επίπεδα της γλουταθειόνης και των ROS, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων, σε καρκινικά κύτταρα τραχήλου της μήτρας.

Η GSH, η πιο άφθονη μη πρωτεϊνική πηγή θειόλης στα κύτταρα, είναι ένα σημαντικό ενδοκυτταρικό αντιοξειδωτικό που προστατεύει από το οξειδωτικό στρες. Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της συγκεκριμένης ένωσης, είναι οι αναγωγικές της ιδιότητες. Ειδικότερα, αυτές φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορα μεταβολικά μονοπάτια, με χαρακτηριστικό παράδειγμα το αντιοξειδωτικό σύστημα των περισσότερων αερόβιων κυττάρων.

Μεγαλύτερη αύξηση της γλουταθειόνης και σε μικρότερη συγκέντρωση του πολυφαινολικού εκχυλίσματος παρατηρήθηκε για το OLE19, σε σύγκριση με το OLE20. Είναι εμφανές πως το εκχύλισμα OLE19, τείνει να επάγει την αύξηση των επιπέδων της

γλουταθειόνης σε μεγαλύτερο βαθμό από το OLE20. Η ικανότητα του OLE19 να επάγει την έκφραση της GSH σε μικρότερες συγκεντρώσεις φαίνεται να οφείλεται στην διαφορετική πολυφαινολική του σύσταση και πιο συγκεκριμένα στην περίσσεια υδροξυτυροσόλης, που περιέχει, η οποία φαίνεται να ενεργοποιεί την σύνθεση γλουταθειόνης (Kouka et al., 2017)(Zou et al., 2012).

Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες τόσο σε ζώα αλλά και στον άνθρωπο, στους οποίους χορηγήθηκαν πολυφαινόλες, που προήλθαν από υγρά απόβλητα ελαιολιβερίου, οι πιθανοί μοριακοί μηχανισμοί, στους οποίους μπορεί να οφείλεται η παρατηρούμενη αύξηση των επιπέδων της γλουταθειόνης, είναι οι εξής: (i) αύξηση των ενζύμων που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση της GSH (π.χ., λιγάση γ-γλουταμυλ κυστεΐνης και συνθετάση GSH), (ii) περίσσεια GSH από την αντίδραση της με ελεύθερες ρίζες με αποτέλεσμα την άμεση εξουδετέρωσή τους, (iii) αύξηση της δραστηριότητας της ρεδοκτάσης γλουταθειόνης (GR), η οποία αναγεννά την GSH από την GSSG(οξειδωμένη μορφή)(Paradourou et al., 2017), (iv) ενεργοποίηση του μονοπατιού, που επάγεται από τον μεταγραφικό παράγοντα Nrf2 και ενεργοποιεί το ARE, σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες(Visioli et al., 2009). Το μονοπάτι μεταγωγής σήματος Keap1-Nrf2 αποτελεί κύριο μηχανισμό της κυτταρικής άμυνας έναντι στο οξειδωτικό στρες καθώς ελέγχει την έκφραση γονιδίων, των οποίων τα πρωτεϊνικά προϊόντα εμπλέκονται στην αποτοξικοποίηση και την απομάκρυνση δραστικών οξειδωτικών παραγόντων μέσω συζευκτικών αντιδράσεων και στην ενίσχυση της κυτταρικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (Nguyen et al., 2009). Υπό φυσιολογικές συνθήκες, ο Nrf2 διατηρείται ανενεργός στο κυτταρόπλασμα, όπου συνδέεται με την πρωτεΐνη Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1). Πρόκειται για έναν υποδοχέα ηλεκτρόφιλων ενώσεων, ο οποίος επάγει την ουβικιτινίωση του Nrf2 και την αποικοδόμηση του στο πρωτεάσωμα. Όταν το κύτταρο εκτεθεί σε οξειδωτικό στρες, η αποικοδόμηση του Nrf2 σταματά, το σύμπλοκο Nrf2 / Keap1 αποσυνδέεται και έτσι ο Nrf2 σταθεροποιείται και οδηγείται στον πυρήνα, όπου σχηματίζει ένα ετεροδιμερές με μία από τις μικρές Maf πρωτεΐνες, η οποία συνδέεται με το ARE και ενεργοποιεί τη μεταγραφή ώστε να ξεκινήσει η αντιοξειδωτική απόκριση (Martinez-Huelamo et al., 2017). Ένα από τα αποτελέσματα της αντιοξειδωτικής απόκρισης είναι η σύνθεση της γλουταθειόνης.



Εικόνα 23: Το μονοπάτι μεταγωγής σήματος Keap1-Nrf2

Ακόμα παρατηρήθηκε πως στην υψηλότερη συγκέντρωση του OLE19 (20 µg/ml), τα επίπεδα γλουταθειόνης εμφάνισαν μείωση, σε αντίθεση με το OLE20, όπου στην μεγαλύτερη συγκέντρωσή του, παρατηρήθηκε αύξηση της γλουταθειόνης. Αυτό το γεγονός μπορεί να αποδοθεί σε πιθανή εμφάνιση προοξειδωτικής δράσης των πολυφαινόλων σε υψηλές συγκεντρώσεις και ειδικότερα της υδροξυτυροσόλης, που βρίσκεται σε περίσσεια στο OLE19. Η ελαιουρωπαίνη και η υδροξυτυροσόλη έχουν την ικανότητα να ανάγουν τα μέταλλα και η ανηγμένη μορφή αυτών των μετάλλων καταλύει την παραγωγή OH· μέσω αντίδρασης fenton. Η εμφάνιση προ-οξειδωτικού χαρακτήρα στις πολυφαινόλες εξαρτάται από τη χημική τους φύση και τη συγκέντρωσή τους καθώς και από τις μικροπεριβαλλοντικές συνθήκες, όπως ο κυτταρικός τύπος, το pH και η οξειδοαναγωγική κατάσταση των κυττάρων (Leon-Gonzalez et al., 2015) (Kouka et al., 2017).

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

Καταλήγοντας, τα αποτελέσματα στο σύνολο τους έδειξαν πως τα δύο πολυφαινολικά εκχυλίσματα εμφάνισαν αντιοξειδωτική και DNA προστατευτική δράση και φάνηκε να βελτιώνουν την οξειδοαναγωγική κατάσταση των καρκινικών κυττάρων τραχήλου της μήτρας. Εντούτοις, από την σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ των εκχυλισμάτων, το OLE 19 φάνηκε να είναι ισχυρότερο τόσο όσο προς την αντιοξειδωτική δράση αλλά και ως προς την ικανότητα να προστατεύει το DNA από βλάβη καθώς και να επάγει την αύξηση της γλουταθειόνης στα κύτταρα. Από την συσχέτιση των παραπάνω αποτελεσμάτων με την πολυφαινολική σύσταση των εκχυλισμάτων, φάνηκε πως η δραστηριότητα του OLE 19 οφείλεται στην μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε υδροξυτυροσόλη. Μέσω της μελέτης αυτής έγινε μια πρώτη εκτίμηση για την σχέση χημικής δομής και αντιοξειδωτικής δράσης για τις πολυφαινόλες του ελαιολάδου, ωστόσο απαιτείται επιπλέον έρευνα για την πλήρη κατανόηση του μοριακού μηχανισμού.

Μελλοντικά, παρόμοιες μελέτες θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν στην ανάδειξη της βιολογικής αξίας των ελληνικών ελαιολάδων και στην κατηγοριοποίηση τους με βάση τα επιμέρους συστατικά του πολυφαινολικού τους περιεχομένου.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Παπαγαλάνης, Ν., 2014. Οξειδωτικό στρες και ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημα I . Δραστικές ρίζες οξυγόνου 26, 151–194.
- Angelis, A., Hamzaoui, M., Aligiannis, N., Nikou, T., Michailidis, D., Gerolimatos, P., Termentzi, A., Hubert, J., Halabalaki, M., Renault, J.-H., Skaltsounis, A.-L., 2017. An integrated process for the recovery of high added-value compounds from olive oil using solid support free liquid-liquid extraction and chromatography techniques. *J. Chromatogr. A* 1491, 126–136. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.02.046>
- Barrera, G., 2012. Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. *ISRN Oncol.* 2012, 137289. <https://doi.org/10.5402/2012/137289>
- Beaufoy, G., n.d. The environmental impact of olive oil production in the European Union : practical options for improving the environmental impact.
- Cardeno, A., Sanchez-Hidalgo, M., Cortes-Delgado, A., Alarcon de la Lastra, C., 2013. Mechanisms involved in the antiproliferative and proapoptotic effects of unsaponifiable fraction of extra virgin olive oil on HT-29 cancer cells. *Nutr. Cancer* 65, 908–918. <https://doi.org/10.1080/01635581.2013.806674>
- Cardona, F., Andrés-Lacueva, C., Tulipani, S., Tinahones, F.J., Queipo-Ortuño, M.I., 2013. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *J. Nutr. Biochem.* 24, 1415–1422. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.05.001>
- Croft, K.D., 2016. Dietary polyphenols: Antioxidants or not? *Arch. Biochem. Biophys.* 595, 120–124. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.11.014>
- De La Cruz, J.P., Ruiz-Moreno, M.I., Guerrero, A., Lopez-Villodres, J.A., Reyes, J.J., Espartero, J.L., Labajos, M.T., Gonzalez-Correa, J.A., 2015. Role of the catechol group in the antioxidant and neuroprotective effects of virgin olive oil components in rat brain. *J. Nutr. Biochem.* 26, 549–555. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.12.013>
- De La Cruz, J.P., Ruiz-Moreno, M.I., Guerrero, A., Reyes, J.J., Benitez-Guerrero, A., Espartero, J.L., Gonzalez-Correa, J.A., 2015. Differences in the Neuroprotective Effect of Orally Administered Virgin Olive Oil (*Olea europaea*) Polyphenols Tyrosol and Hydroxytyrosol in Rats. *J. Agric. Food Chem.* 63, 5957–5963. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00627>
- Ding, Y., Yao, H., Yao, Y., Fai, L.Y., Zhang, Z., 2013. Protection of dietary polyphenols against oral cancer. *Nutrients* 5, 2173–2191. <https://doi.org/10.3390/nu5062173>

- Duthie, G.G., Gardner, P.T., Kyle, J.A.M., 2003. Plant polyphenols: are they the new magic bullet? *Proc. Nutr. Soc.* 62, 599–603. <https://doi.org/10.1079/PNS2003275>
- Espinosa-Diez, C., Miguel, V., Mennerich, D., Kietzmann, T., Sánchez-Pérez, P., Cadenas, S., Lamas, S., 2015. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biol.* 6, 183–197. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.07.008>
- Fabiani, R., Rosignoli, P., De Bartolomeo, A., Fuccelli, R., Servili, M., Montedoro, G.F., Morozzi, G., 2008. Oxidative DNA damage is prevented by extracts of olive oil, hydroxytyrosol, and other olive phenolic compounds in human blood mononuclear cells and HL60 cells. *J. Nutr.* 138, 1411–1416.
- Farr, S.A., Price, T.O., Dominguez, L.J., Motisi, A., Saiano, F., Niehoff, M.L., Morley, J.E., Banks, W.A., Ercal, N., Barbagallo, M., 2012. Extra virgin olive oil improves learning and memory in SAMP8 mice. *J. Alzheimers. Dis.* 28, 81–92. <https://doi.org/10.3233/JAD-2011-110662>
- Finaud, J., Lac, G., Filaire, E., 2006. Oxidative stress : relationship with exercise and training. *Sports Med.* 36, 327–358.
- Gandhi, S., Abramov, A.Y., 2012. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2012, 428010. <https://doi.org/10.1155/2012/428010>
- Giovinazzo, G., Grieco, F., 2015. Functional Properties of Grape and Wine Polyphenols. *Plant Foods Hum. Nutr.* 70, 454–462. <https://doi.org/10.1007/s11130-015-0518-1>
- Granados-Principal, S., Quiles, J.L., Ramirez-Tortosa, C.L., Sanchez-Rovira, P., Ramirez-Tortosa, M.C., 2010. Hydroxytyrosol: from laboratory investigations to future clinical trials. *Nutr. Rev.* 68, 191–206. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2010.00278.x>
- Guo, J.-J., Hsieh, H.-Y., Hu, C.-H., 2009. Chain-breaking activity of carotenes in lipid peroxidation: a theoretical study. *J. Phys. Chem. B* 113, 15699–15708. <https://doi.org/10.1021/jp907822h>
- Halliwell, B., 2001. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* 18, 685–716.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M., 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 186, 1–85.
- Hamzaoui, M., Renault, J.-H., Reynaud, R., Hubert, J., 2013. Centrifugal partition extraction in the pH-zone-refining displacement mode: an efficient strategy for the screening and isolation of biologically active phenolic compounds. *J. Chromatogr. B, Anal. Technol.*



- Biomed. life Sci. 937, 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.07.024>
- Ji, L.L., 1999. Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 222, 283–292.
- Jones, D.P., 2006. Redefining oxidative stress. *Antioxid. Redox Signal.* 8, 1865–1879. <https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.1865>
- Kerasiotti, E., Stagos, D., Priftis, A., Aivazidis, S., Tsatsakis, A.M., Hayes, A.W., Kouretas, D., 2014. Antioxidant effects of whey protein on muscle C2C12 cells. *Food Chem.* 155, 271–278. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.066>
- Knight, J.A., 2000. Review: Free radicals, antioxidants, and the immune system. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 30, 145–158.
- Korkina, L.G., De Luca, C., Kostyuk, V.A., Pastore, S., 2009. Plant polyphenols and tumors: from mechanisms to therapies, prevention, and protection against toxicity of anti-cancer treatments. *Curr. Med. Chem.* 16, 3943–3965.
- Kouka, P., Priftis, A., Stagos, D., Angelis, A., Stathopoulos, P., Xinos, N., Skaltsounis, A.-L., Mamoulakis, C., Tsatsakis, A.M., Spandidos, D.A., Kouretas, D., 2017. Assessment of the antioxidant activity of an olive oil total polyphenolic fraction and hydroxytyrosol from a Greek *Olea europea* variety in endothelial cells and myoblasts. *Int. J. Mol. Med.* 40, 703–712. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3078>
- Leon-Gonzalez, A.J., Auger, C., Schini-Kerth, V.B., 2015. Pro-oxidant activity of polyphenols and its implication on cancer chemoprevention and chemotherapy. *Biochem. Pharmacol.* 98, 371–380. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.07.017>
- Lobo, V., Patil, a, Phatak, a, Chandra, N., 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn. Rev.* 4, 118–26. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L., 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition* 79, 727–747.
- Martinez-Huelamo, M., Rodriguez-Morato, J., Boronat, A., de la Torre, R., 2017. Modulation of Nrf2 by Olive Oil and Wine Polyphenols and Neuroprotection. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 6. <https://doi.org/10.3390/antiox6040073>
- McCord, J.M., 2000. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am. J. Med.* 108, 652–659.
- Mylonas, C., Kouretas, D., 1999. Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo* 13, 295–

- Nguyen, T., Nioi, P., Pickett, C.B., 2009. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 284, 13291–13295. <https://doi.org/10.1074/jbc.R900010200>
- Pampaloni, B., Mavilia, C., Fabbri, S., Romani, A., Ieri, F., Tanini, A., Tonelli, F., Brandi, M.L., 2014. In vitro effects of extracts of extra virgin olive oil on human colon cancer cells. *Nutr. Cancer* 66, 1228–1236. <https://doi.org/10.1080/01635581.2014.951727>
- Pandey, K.B., Rizvi, S.I., 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2, 270–278. <https://doi.org/10.4161/oxim.2.5.9498>
- Papadopoulou, A., Petrotos, K., Stagos, D., Gerasopoulos, K., Maimaris, A., Makris, H., Kafantaris, I., Makri, S., Kerasioti, E., Halabalaki, M., Brieudes, V., Ntasi, G., Kokkas, S., Tzimas, P., Goulas, P., Zakharenko, A.M., Golokhvast, K.S., Tsatsakis, A., Kouretas, D., 2017. Enhancement of Antioxidant Mechanisms and Reduction of Oxidative Stress in Chickens after the Administration of Drinking Water Enriched with Polyphenolic Powder from Olive Mill Waste Waters. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017, 8273160. <https://doi.org/10.1155/2017/8273160>
- Perron, N.R., Brumaghim, J.L., 2009. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochem. Biophys.* 53, 75–100. <https://doi.org/10.1007/s12013-009-9043-x>
- Petrakis, C., 2006. 9 – Olive Oil Extraction, in: *Olive Oil*. pp. 191–223. <https://doi.org/10.1016/B978-1-893997-88-2.50013-4>
- Phaniendra, A., Jestadi, D.B., Periyasamy, L., 2015. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian J. Clin. Biochem.* 30, 11–26. <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>
- Pietta, P.G., 2000. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* 63, 1035–1042.
- Quinones, M., Miguel, M., Aleixandre, A., 2013. Beneficial effects of polyphenols on cardiovascular disease. *Pharmacol. Res.* 68, 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.10.018>
- Reid, M.B., 2001. Plasticity in Skeletal, Cardiac, and Smooth Muscle: Invited Review: Redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *J Appl Physiol* 90, 724–731. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00017.2004>

- Richard, N., Arnold, S., Hoeller, U., Kilpert, C., Wertz, K., Schwager, J., 2011. Hydroxytyrosol is the major anti-inflammatory compound in aqueous olive extracts and impairs cytokine and chemokine production in macrophages. *Planta Med.* 77, 1890–1897. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1280022>
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., Jimenez, L., 2005. Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 45, 287–306.
- Scalbert, A., Williamson, G., 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* 130, 2073S–85S.
- Sies, H., 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.* 82, 291–295.
- Spencer, J.P.E., Abd El Mohsen, M.M., Minihane, A.-M., Mathers, J.C., 2008. Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research. *Br. J. Nutr.* 99, 12–22. <https://doi.org/10.1017/S0007114507798938>
- Tripoli, E., Giammanco, M., Tabacchi, G., Di Majo, D., Giammanco, S., La Guardia, M., 2005. The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutr. Res. Rev.* 18, 98–112. <https://doi.org/10.1079/NRR200495>
- Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006. Freeradicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions* 160, 1–40. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>
- Visioli, F., Galli, C., Bornet, F., Mattei, A., Patelli, R., Galli, G., Caruso, D., 2000. Olive oil phenolics are dose-dependently absorbed in humans. *FEBS Lett.* 468, 159–160.
- Visioli, F., Poli, A., Gall, C., 2002. Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Med. Res. Rev.* 22, 65–75.
- Visioli, F., Wolfram, R., Richard, D., Abdullah, M.I.C.B., Crea, R., 2009. Olive Phenolics increase glutathione levels in healthy volunteers. *J. Agric. Food Chem.* 57, 1793–1796. <https://doi.org/10.1021/jf8034429>
- Warleta, F., Quesada, C.S., Campos, M., Allouche, Y., Beltran, G., Gaforio, J.J., 2011. Hydroxytyrosol protects against oxidative DNA damage in human breast cells. *Nutrients* 3, 839–857. <https://doi.org/10.3390/nu3100839>
- Widmer, R.J., Freund, M.A., Flammer, A.J., Sexton, J., Lennon, R., Romani, A., Mulinacci, N., Vinceri, F.F., Lerman, L.O., Lerman, A., 2013. Beneficial effects of polyphenol-rich olive oil in patients with early atherosclerosis. *Eur. J. Nutr.* 52, 1223–1231.

<https://doi.org/10.1007/s00394-012-0433-2>

Zhu, L., Liu, Z., Feng, Z., Hao, J., Shen, W., Li, X., Sun, L., Sharman, E., Wang, Y., Wertz, K., Weber, P., Shi, X., Liu, J., 2010. Hydroxytyrosol protects against oxidative damage by simultaneous activation of mitochondrial biogenesis and phase II detoxifying enzyme systems in retinal pigment epithelial cells. *J. Nutr. Biochem.* 21, 1089–1098.  
<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.09.006>

Zou, X., Feng, Z., Li, Y., Wang, Y., Wertz, K., Weber, P., Fu, Y., Liu, J., 2012. Stimulation of GSH synthesis to prevent oxidative stress-induced apoptosis by hydroxytyrosol in human retinal pigment epithelial cells: activation of Nrf2 and JNK-p62/SQSTM1 pathways. *J. Nutr. Biochem.* 23, 994–1006.  
<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2011.05.006>