

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

*“Προσδιορισμός της επίδρασης της πολυφαινολικής σύστασης
Ελληνικών ελαιολάδων στις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες”*



ΤΖΩΡΤΖΗ ΔΗΜΗΤΡΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2018

***“Προσδιορισμός της επίδρασης της πολυφαινολικής σύστασης
Ελληνικών ελαιολάδων στις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες”***

Τζώρτζη Δήμητρα

Επιβλέπων καθηγητής: Κουρέτας Δημήτριος
Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών

***“Determination of the effect of the polyphenolic composition of Greek
olive oils on their antioxidant properties”***

TZORTZI DIMITRA

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.

Χαρουτουνιάν Σέρκο: Καθηγητής Χημείας στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Θρέψεως & Διατροφής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και Συντονιστής της Θεματικής Ενότητας «Οργανική Χημεία» στο Ελληνικό Ανοικτό Πανεπιστήμιο.

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, υπό την επίβλεψη του καθηγητή κ. Δημήτριου Κουρέτα. Θα ήθελα λοιπόν, να ευχαριστήσω αρχικά τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Δημήτριο Κουρέτα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε ώστε να αναλάβω μια τόσο σημαντική και ενδιαφέρουσα πτυχιακή εργασία.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στην υποψήφια διδάκτορα Κούκα Παρασκευή για την καθοριστική βοήθεια της και για τον χρόνο που αφιέρωσε κατά την εκτέλεση του εργαστηριακού μέρους αλλά και για τις συμβουλές και τις γνώσεις που μου παρείχε κατά τη συγγραφή της εργασίας.

Τέλος, ευχαριστίες οφείλω σε όλη την ομάδα του εργαστηρίου, για το φιλικό κλίμα συνεργασίας και την προθυμία τους να επιλύσουν οποιαδήποτε απορία μου.

Περίληψη

Το ελαιόλαδο αποτελεί βασικό στοιχείο της μεσογειακής διατροφής και σύμφωνα με μια πληθώρα μελετών, προσφέρει εξαιρετικά σημαντικές και ωφέλιμες επιδράσεις στην υγεία του ανθρώπου. Μία από τις πιο ενδιαφέρουσες κατηγορίες ενώσεων που βρίσκονται στο ελαιόλαδο είναι οι φαινόλες, οι οποίες χαρακτηρίζονται από υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα. Στη συγκεκριμένη μελέτη εξετάστηκε η αντιοξειδωτική δράση δύο πολυφαινολικών εκχυλισμάτων ελληνικού παρθένου ελαιόλαδου, κορωνέικης ποικιλίας. Τα εκχυλίσματα που εξετάστηκαν περιείχαν διαφορετικές ποσότητες από δύο από τις σημαντικότερες φαινόλες του ελαιόλαδου, την υδροξυτυροσόλη και την τυροσόλη. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να εξεταστεί η συμβολή της διαφορετικής πολυφαινολικής σύστασης των εκχυλισμάτων στις αντιοξειδωτικές ιδιότητες τους. Για την επίτευξη του σκοπού πραγματοποιήθηκαν *in vitro* τεχνικές για τον έλεγχο της αντιοξειδωτικής και αντιμεταλλαξιγόνου δράσης των δύο εκχυλισμάτων, ενώ η δράση τους αξιολογήθηκε και σε κυτταρικό επίπεδο. Τα αποτελέσματα των *in vitro* πειραμάτων έδειξαν πως το εκχύλισμα με την περίσσεια υδροξυτυροσόλης εμφάνισε ισχυρότερη αντιοξειδωτική και προστατευτική δράση. Ωστόσο, στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε επίπεδο κυττάρου και τα δυο εκχυλίσματα εμφάνισαν σχεδόν ισότιμη δράση, λόγω του μεταβολισμού των κυττάρων, ο οποίος φάνηκε να έχει σημαντική επίδραση στη δραστηριότητά τους.

Abstract

Olive oil constitutes the base of the Mediterranean diet and according to plenty of studies, it offers countless and extremely significant and beneficial effects on human health. One of the most interesting categories of olive oil's chemical compounds is phenols, which are characterized by high antioxidant ability. In this study, two polyphenolic extracts, derived from the endemic olive variety Koroneiki, were examined for their antioxidant capacity. These two extracts contained different amounts of two of the most important phenols of olive oil, hydroxytyrosol and tyrosol. The purpose of this study was to examine the contribution of the extracts' different polyphenolic composition to their antioxidant properties. In order to achieve this goal, *in vitro* and *ex vivo* methods were performed for the assessment of the antioxidant and antimutagenic activity of the two extracts. The results of the *in vitro* experiments showed that the extract with the excess amount of hydroxytyrosol exhibited a stronger antioxidant and protective effect. However, in the *ex vivo* experiments, both extracts showed almost equal activity, due to cell metabolism, which appeared to have a significant effect on their potency.

Πίνακας περιεχομένων

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ	3
Ευχαριστίες	4
Περίληψη	5
Abstract	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	12
1.1 Ελαιόλαδο	12
1.1.1 Τύποι ελαιόλαδου	12
1.1.2 Σύσταση ελαιόλαδου	14
1.1.3 Ελαιόλαδο και υγεία	14
1.2 Φαινολικές ενώσεις	15
1.2.1 Ταξινόμηση φαινολικών ενώσεων	16
1.2.2 Γενικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί φαινολικών ενώσεων	17
1.2.3 Η πορεία των φαινολικών ριζών μετά την εξουδετέρωση της ελεύθερης ρίζας	18
1.3 Φαινολικό περιεχόμενο ελαιόλαδου	20
1.3.1 Τυροσόλη και Υδροξυτυροσόλη	22
1.4 Ελεύθερες ρίζες	25
1.4.1 Ταξινόμηση ελεύθερων ριζών	26
1.4.2 Παραγωγή ελεύθερων ριζών	27
1.5 Αντιοξειδωτικά και οξειδωτικό στρες	29
2. ΣΚΟΠΟΣ	31
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	32
3.1 Πολυφαινολικά εκχυλίσματα ελαιόλαδων	32
3.2 Σύσταση πολυφαινολικών εκχυλισμάτων	33
3.3 Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς HeLa	33

3.4 Προσδιορισμός της κυτταροτοξικής δράσης του εκχυλίσματος με τη μέθοδο XTT	35
3.5 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας ABTS•+	37
3.6 Εκτίμηση της προστατευτικής δράσης απέναντι στην επαγόμενη από ρίζες ROO• πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA	38
3.6.1. Μέθοδος χαλάρωσης πλασμιδιακού DNA (Plasmid relaxation assay)	39
3.6.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA	40
3.6.3 Εκτίμηση της προστατευτικής δράσης απέναντι στην επαγόμενη από ρίζες ROO• πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA	41
3.6.4 Ποσοτικός προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής/προστατευτικής δράσης απέναντι στην επαγόμενη από ελεύθερες ρίζες πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA	43
3.7 Προσδιορισμός των επιπέδων της GSH και των ROS με κυτταρομετρία ροής	44
3.8 Στατιστική ανάλυση	46
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	47
4.1 Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω δέσμευσης της ρίζας ABTS•+	47
4.2 Επαγόμενη από ρίζες περοξυλίου (ROO•) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA.....	47
4.3 Προσδιορισμός κυτταροτοξικής δράσης ουσιών με τη μέθοδο XTT.....	49
4.4 Προσδιορισμός της οξειδοαναγωγικής κατάστασης με κυτταρομετρία ροής ...	50
4.4.1. Επίπεδα γλουταθειόνης (GSH).....	50
4.4.2. Επίπεδα δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS).....	53
5. Συζήτηση.....	56
Βιβλιογραφία	62

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1. Οι διαφορετικοί τύποι ελαιόλαδου.....	13
Εικόνα 2. Δύο από τις κυριότερες μη φλαβονοειδείς ενώσεις.....	17
Εικόνα 3. Οι κυριότερες κατηγορίες των φλαβονοειδών.....	17
Εικόνα 4. Το σύμβολο Yin-Yang αντιπροσωπεύει την ισορροπία μεταξύ αντιοξειδωτικών και προοξειδωτικών χαρακτηριστικών των φαινολικών αντιοξειδωτικών.....	20
Εικόνα 5. Παραδείγματα φαινολικών οξέων. Πάνω το βενζοϊκό οξύ και κάτω το γαλλικό οξύ.....	20
Εικόνα 6. Παράδειγμα φαινολικής αλκοόλης: Τυροσόλη.....	21
Εικόνα 7. Παράδειγμα σερικοειδούς: Ολευρωπέϊνη.....	21
Εικόνα 8. 1-φαινυλο-6,7-διϋδροξυ-ισοχρωμάνιο.....	21
Εικόνα 9. Παράδειγμα Φλαβονοειδών: Απιγενίνη.....	21
Εικόνα 10. Παράδειγμα Λιγνάνης: Ακετοξυπινορεσινόλη.....	21
Εικόνα 11. Χημικές δομές τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης.....	22
Εικόνα 12. Μεταβολικά μονοπάτια της υδροξυτυροσόλης.....	24
Εικόνα 13. Απεικόνιση δράσης ελεύθερων ριζών.....	26
Εικόνα 14. Πηγές ελεύθερων ριζών.....	27
Εικόνα 15. Τα κυριότερα αντιοξειδωτικά και οι λειτουργίες τους.....	29
Εικόνα 16. Ο μηχανισμός αναγωγής των ελεύθερων ριζών από τα αντιοξειδωτικά.....	29
Εικόνα 17. Αναπαράσταση του ορισμού του οξειδωτικού στρες.....	30

Εικόνα 18. Βλαπτικές επιδράσεις του οξειδωτικού στρες στην υγεία του ανθρώπου.....	30
Εικόνα 19. Διαγραμματική απεικόνιση της διαδικασίας εκχύλισης.....	31
Εικόνα 20. Εξαγωγή ολικού πολυφαινολικού κλάσματος από το ελαιόλαδο και απομόνωση των επιμέρους συστατικών του.....	31
Εικόνα 21. Διαδικασία καλλιέργειας κυττάρων.....	34
Εικόνα 22. Μεταβολισμός του XTT σε υδατοδιαλυτή φορμαζάνη από ζωντανά κύτταρα.....	35
Εικόνα 23. Παραγωγή της ρίζας του ABTS•- μέσω της δράσης περοξειδάσης παρουσία H ₂ O ₂	36
Εικόνα 24. Μηχανισμός αλληλεπίδρασης αντιοξειδωτική ουσίας με τη ρίζα του ABTS•+.....	36
Εικόνα 25. Διαμορφώσεις του πλασμιδιακού DNA.....	39
Εικόνα 26. Χημική δομή της ένωσης AAPH και οι αντιδράσεις της θερμικής της διάσπασης και του σχηματισμού των ριζών ROO•.....	41
Εικόνα 27. Υδροδυναμική εστίαση του δείγματος μέσα από το θάλαμο ροής.....	44
Εικόνα 28. Το μηχάνημα της κυτταρομετρίας ροής από την Becton-Dickinson.....	45
Εικόνα 29. Επαγόμενη από ρίζες περοξυλίου (ROO•) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό	47
Εικόνα 30. Επαγόμενη από ρίζες περοξυλίου (ROO•) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA.....	47
Εικόνα 31. Πηκτή ηλεκτροφόρησης για το OLE05.....	47

Εικόνα 32. Πηκτή ηλεκτροφόρησης για το OLE50.....	48
Εικόνα 33. Επίδραση OLE05 στα επίπεδα GSH στην κυτταρική σειρά HeLa.....	50
Εικόνα 34. Επίδραση OLE50 στα επίπεδα GSH στην κυτταρική σειρά HeLa.....	51
Εικόνα 35. Επίδραση OLE05 στα επίπεδα ROS στην κυτταρική σειρά HeLa.....	53
Εικόνα 36. Επίδραση OLE50 στα επίπεδα ROS στην κυτταρική σειρά HeLa.....	54
Εικόνα 37. Οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις γλουταθειόνης.....	57

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1. Ταξινόμηση των φαινολικών ενώσεων με βάση τον αριθμό και τη διευθέτηση των ατόμων άνθρακα.....	16
Πίνακας 2. Οι κυριότερες δραστικές μορφές οξυγόνου.....	26
Πίνακας 3. Οι κυριότερες δραστικές μορφές αζώτου και χλωρίου.....	27
Πίνακας 4. Πληροφορίες για το εκχύλισμα OLE50.....	32
Πίνακας 5. Πληροφορίες για το εκχύλισμα OLE05.....	33

Κατάλογος Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1.....	46
Διάγραμμα 2.....	48
Διάγραμμα 3.....	49
Διάγραμμα 4.....	52

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ελαιόλαδο

Ελαιόλαδο είναι το λάδι που προέρχεται από τους καρπούς της ελιάς (*Olea europaea*) (Owen et al., 2000). Αποτελεί βασικό στοιχείο της μεσογειακής διατροφής και θεωρείται προϊόν υγιεινής διατροφής λόγω της περιεκτικότητάς του σε μονοακόρεστα λιπαρά, αντιοξειδωτικές ουσίες κλπ. Το ελαιόλαδο χρησιμοποιείται στα καλλυντικά, στην ιατρική, στη μαγειρική, στα σαπούνια, καθώς επίσης στο παρελθόν σημαντική ήταν η χρήση του ως καύσιμο για παραδοσιακούς λαμπτήρες. Προήλθε αρχικά από τη Μεσόγειο, αλλά σήμερα χρησιμοποιείται παγκοσμίως, με την Ισπανία να αποτελεί τη χώρα με τη μεγαλύτερη παραγωγή ελαιόλαδου, ακολουθούμενη από την Ιταλία και την Ελλάδα (Malheiro et al., 2014). Παρ' όλα αυτά η κατανάλωση ελαιόλαδου είναι μεγαλύτερη στην Ελλάδα, μετά στην Ισπανία και μετά στην Ιταλία (Covas et al., 2009).

1.1.1 Τύποι ελαιόλαδου

Σύμφωνα με την ευρωπαϊκή νομοθεσία οι διάφοροι τύποι των ελαιόλαδων ταξινομούνται σε 8 κατηγορίες, ανάλογα με τα φυσικά, χημικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους (Εικόνα 1) (Russo et al., 2015). Το κυριότερο από αυτά είναι η ελεύθερη οξύτητα, η οποία αποτελεί μια σημαντική παράμετρο, καθοριστική για την ποιότητα του ελαιόλαδου και ορίζεται ως το ποσοστό σε γραμμάρια ολεϊκού οξέος ανά 100 γραμμάρια ελαιόλαδου (De Oliveira et al., 2010). Όσο μικρότερη η ελεύθερη οξύτητα, τόσο καλύτερη η ποιότητα. Όσον αφορά τις κατηγορίες, τα παρθένα ελαιόλαδα είναι κατάλληλα για κατανάλωση, έτσι όπως είναι. Λαμβάνονται από τους καρπούς του ελαιόδεντρου *Olea Europaea L.* μέσω μηχανικών ή άλλων φυσικών μεθόδων, ιδιαίτερα ύπο θερμικές συνθήκες, που δεν οδηγούν σε αλλοιώσεις των συστατικών τους (Russo et al., 2015). Επίσης δεν έχουν υποβληθεί σε άλλη επεξεργασία εκτός από πλύση, απόχυση, φυγοκέντριση και διήθηση. Εξευγενισμένο ονομάζεται το ελαιόλαδο που λαμβάνεται από παρθένα ελαιόλαδα μέσω μεθόδων εξευγενισμού, οι οποίες δεν οδηγούν σε αλλαγές στην αρχική δομή των γλυκεριδίων (Russo et al., 2015). Τέλος, το πυρηνέλαιο αποτελεί το προϊόν που λαμβάνεται από το υπόλειμμα του κυρίως ελαιόλαδου μετά από επεξεργασία του πυρήνα του ελαιόκαρπου (Russo et al., 2015). Η λεπτομερής ταξινόμηση των διαφορετικών ελαιόλαδων είναι η εξής (Russo et al., 2015):

1. Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο: παρθένο ελαιόλαδο που έχει ελεύθερη οξύτητα, εκφραζόμενη ως περιεκτικότητα σε ολεϊκό οξύ, μέχρι 0.8%.
2. Παρθένο ελαιόλαδο: παρθένο ελαιόλαδο που έχει ελεύθερη οξύτητα από 0.8 μέχρι 2%.
3. Λαμπάντε (Lampante) ελαιόλαδο: παρθένο ελαιόλαδο που έχει ελεύθερη οξύτητα πάνω από 2%.
4. Εξευγενισμένο ελαιόλαδο: το ελαιόλαδο που λαμβάνεται από παρθένα ελαιόλαδα μέσω μεθόδων εξευγενισμού, οι οποίες δεν οδηγούν σε αλλαγές στην αρχική δομή των γλυκεριδίων. Η ελεύθερη οξύτητα του δεν ξεπερνά το 0.3%.
5. Ελαιόλαδο αποτελούμενο από εξευγενισμένο και παρθένο ελαιόλαδο: αποτελεί ένα μίγμα που δεν ξεπερνά 1.0% ελεύθερη οξύτητα.
6. Ακατέργαστος ελαιοπυρήνας: είναι το κατάλοιπο από την παράγωγη του παρθένου ελαιόλαδου. Δεν έχει κάποιο όριο στην οξύτητα. Προκειμένου να χρησιμοποιηθεί για ανθρώπινη κατανάλωση θα πρέπει να περάσει από μεθόδους εξευγενισμού, ή μπορεί να χρησιμοποιηθεί χωρίς επεξεργασία για τεχνική χρήση.
7. Εξευγενισμένο πυρηνέλαιο: το λάδι που λαμβάνεται από ακατέργαστο πυρηνέλαιο, μέσω μεθόδων εξευγενισμού, οι οποίες δεν προκαλούν αλλαγές στην αρχική δομή των γλυκεριδίων. Η ελεύθερη οξύτητά του δεν ξεπερνά το 0.3%.
8. Πυρηνέλαιο: το λάδι το οποίο αποτελείται από εξευγενισμένο πυρηνέλαιο και παρθένο ελαιόλαδο. Η ελεύθερη οξύτητά του δεν ξεπερνά το 1%.



Εικόνα 5. Οι διαφορετικοί τύποι ελαιόλαδου.

1.1.2 Σύσταση ελαιόλαδου

Το ελαιόλαδο αποτελείται κυρίως από τριακυλογλυκερόλες (~99%) και δευτερευόντως από ελεύθερα λιπαρά οξέα, μονο- και διακυλογλυκερόλες και μια σειρά λιπιδίων όπως υδρογονάνθρακες, στερόλες, αλειφατικές αλκοόλες, τοκοφερόλες και χρωστικές ουσίες (Blekas et al., 2006). Εκτός από τα παραπάνω το ελαιόλαδο εμπεριέχει και σημαντικές ποσότητες πτητικών και φαινολικών ενώσεων (Blekas et al., 2006). Οι τελευταίες θα αναλυθούν εκτενέστερα παρακάτω. Τα κυριότερα λιπαρά οξέα που συναντώνται στο ελαιόλαδο είναι το παλμιτικό, το παλμιτολεϊκό, το στεαρικό, το ολεϊκό, το λινολεϊκό και το λινολενικό (Blekas et al., 2006). Η παρουσία των μερικών γλυκεριδίων στο ελαιόλαδο οφείλονται είτε στην ατελή βιοσύνθεση τριακυλογλυκερολών ή σε υδρολυτικές αντιδράσεις. Όσον αφορά τους υδρογονάνθρακες, δυο είναι αυτοί που βρίσκονται σε σημαντικές συγκεντρώσεις, το σκουαλένιο και το β-καροτένιο (Blekas et al., 2006). Το σκουαλένιο αποτελεί το πρόδρομο μόριο της οικογένειας των στεροειδών, ενώ το β-καροτένιο αποτελεί μια κόκκινη-πορτοκαλί χρωστική. Εκτός από αυτή τη χρωστική, το ελαιόλαδο εμπεριέχει και άλλα καροτενοειδή τα οποία του προσδίδουν κίτρινο χρώμα, το οποίο σε συνδυασμό με το πράσινο χρώμα που του προσδίδουν οι χλωροφύλλες, έχει ως αποτέλεσμα το γνωστό ιδιαίτερο χρώμα του ελαιόλαδου (Blekas et al., 2006). Όσον αφορά τις στερόλες, αυτές αποτελούν σημαντικά λιπίδια, τα οποία σχετίζονται με την ποιότητα του ελαιόλαδου και χρησιμοποιούνται ευρέως για έλεγχο της γνησιότητας του. Τέλος αξίζει να σημειωθεί ότι η σύνθεση κάθε ελαιόλαδου ποικίλλει ανά ποικιλία, περιοχή, υψόμετρο, χρόνο συγκομιδής και διαδικασία εκχύλισης (Blekas et al., 2006).

1.1.3 Ελαιόλαδο και υγεία

Σύμφωνα με μελέτες το ελαιόλαδο φαίνεται να είναι χημειοπροστατευτικό έναντι του καρκίνου αλλά και να μειώνει σε μεγάλο βαθμό τη θνησιμότητα από στεφανιαία νόσο (Owen et al., 2000). Σημαντικό είναι το γεγονός ότι η θνησιμότητα από καρκίνο του μαστού και καρκίνο του παχέος εντέρου είναι σημαντικά χαμηλότερη σε χώρες όπου η κατανάλωση ελαιόλαδου είναι υψηλή (όπως στην Ελλάδα, την Ιταλία και την Ισπανία) συγκριτικά με αυτές που η κατανάλωση είναι χαμηλή (όπως στη Σκωτία και στην Αγγλία) (Owen et al., 2000). Εκτός από τις παραπάνω ιδιότητες όμως, το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο φαίνεται να έχει και άλλα ευεργετικά

χαρακτηριστικά όσον αφορά την υγεία του ανθρώπου, τα οποία είναι τα εξής (Salazar-garc & Town, 2017):

- Δρα προστατευτικά έναντι καρδιαγγειακών και αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων,
- Προλαμβάνει τις νευροεκφυλιστικές διαταραχές (νόσος του Πάρκινσον και νόσος του Alzheimer),
- Έχει αντιφλεγμονώδεις δράσεις,
- Παίζει σημαντικό ρόλο σε ορισμένα σύνδρομα του ανθρώπινου μεταβολισμού,
- Έχει αποτοξινωτικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες,
- Τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα που περιέχει συμβάλουν στη διατήρηση φυσιολογικών επιπέδων χοληστερόλης στο αίμα,
- Συμβάλει στην καθυστέρηση της απώλειας της γνωστικής ικανότητας σε ηλικιωμένους, καθώς τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα που περιέχει προλαμβάνουν τη νευρωνική βλάβη που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες,

Όλες οι παραπάνω ωφέλιμες επιδράσεις του ελαιόλαδου στην υγεία έχουν τραβήξει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας στον τομέα των λειτουργικών τροφίμων και των φαρμάκων, με σκοπό να χρησιμοποιήσουν συστατικά του ελαιόλαδου ώστε να δημιουργήσουν τρόφιμα εμπλουτισμένα με τα ευεργετικά στοιχεία του, αλλά και συμπληρώματα διατροφής και φάρμακα. Για την επίτευξη αυτού του στόχου σημαντική είναι η εκτενής μελέτη των διαφορετικών στοιχείων του ελαιόλαδου και της επίδρασής τους στην υγεία καθώς και η εύρεση αποτελεσματικών μεθόδων απομόνωσης τους. Μία από τις πιο ενδιαφέρουσες κατηγορίες ενώσεων που βρίσκονται στο ελαιόλαδο είναι οι φαινόλες, οι οποίες χαρακτηρίζονται από υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα και θα αναλυθούν στην επόμενη υποενότητα.

1.2 Φαινολικές ενώσεις

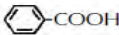
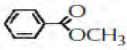
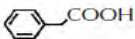
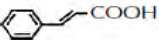
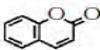

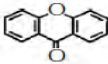
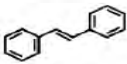
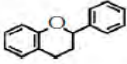
Οι φαινόλες χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη τουλάχιστον ενός αρωματικού δακτυλίου με μια ή περισσότερες υδροξυλικές ομάδες (Crozier et al., 2007). Μέχρι τώρα έχουν ανακαλυφθεί πάνω από 8000 φαινολικές δομές, οι οποίες είναι ευρέως διασκορπισμένες σε όλο το φυτικό βασίλειο (Strack, 1997). Οι φαινολικές ενώσεις

ποικίλουν από χαμηλού μοριακού βάρους ενώσεις με έναν αρωματικό δακτύλιο μέχρι περίπλοκες ταννίνες και φλαβόνες.

1.2.1 Ταξινόμηση φαινολικών ενώσεων

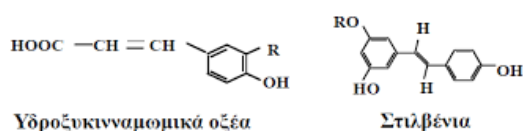
Ταξινομούνται με βάση τον αριθμό και τη διευθέτηση των ατόμων άνθρακα και συχνά βρίσκονται συζευγμένες με σάκχαρα και οργανικά οξέα (Πίνακας 1) (Crozier et al., 2007).

Πίνακας 6. Ταξινόμηση των φαινολικών ενώσεων με βάση τον αριθμό και τη διευθέτηση των ατόμων άνθρακα (οι ομάδες υδροξυλίου δε φαίνονται). (Crozier et al., 2007)

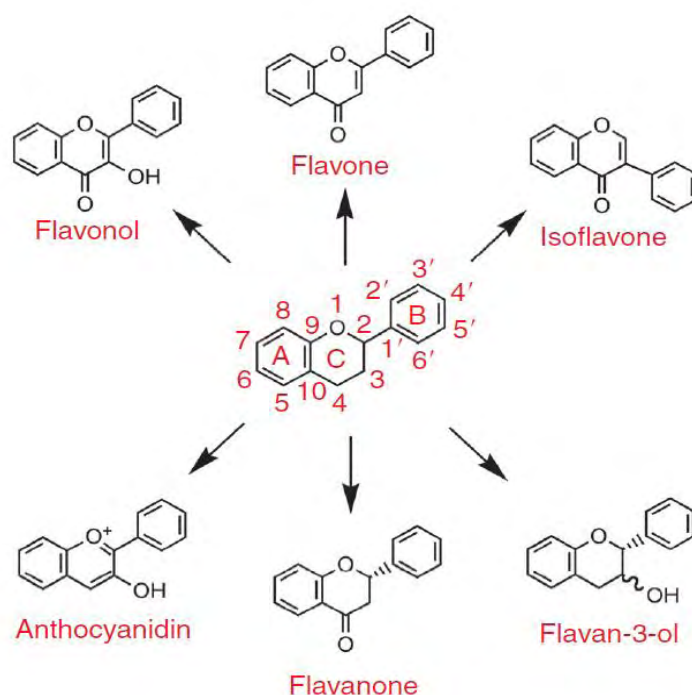
Number of carbons	Skeleton	Classification	Example	Basic structure
7	C ₆ -C ₁	Phenolic acids	Gallic acid	
8	C ₆ -C ₂	Acetophenones	Gallacetophenone	
8	C ₆ -C ₂	Phenylacetic acid	<i>p</i> -Hydroxyphenyl-acetic acid	
9	C ₆ -C ₃	Hydroxycinnamic acids	<i>p</i> -Coumaric acid	
9	C ₆ -C ₃	Coumarins	Esculetin	
10	C ₆ -C ₄	Naphthoquinones	Juglone	
13	C ₆ -C ₁ -C ₆	Xanthenes	Mangiferin	
14	C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbenes	Resveratrol	
15	C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoids	Naringenin	

Επίσης οι φαινόλες μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο ομάδες: τα φλαβονοειδή και τα μη-φλαβονοειδή. Τα φλαβονοειδή είναι πολυφαινολικές ενώσεις που αποτελούνται από δεκαπέντε άνθρακες, με δυο αρωματικούς δακτύλιους συνδεδεμένους από μια γέφυρα τριών ανθράκων (Crozier et al., 2007). Αποτελούν την πολυπληθέστερη ομάδα των φαινολικών ενώσεων και βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στην επιδερμίδα των φύλλων και στη φλούδα των φρούτων (Harborne, 1994). Επίσης συμβάλουν σε σημαντικές διεργασίες ως δευτερογενείς μεταβολίτες στα φυτά όπως στην προστασία από την UV ακτινοβολία και την αντίσταση σε ασθένειες (Koes et al., 1994). Οι κυριότερες υποκατηγορίες των φλαβονοειδών είναι οι φλαβόνες,

οι φλαβονόλες, οι φλαβαν-3-όλες, οι ισοφλαβόνες, οι φλαβονόνες και οι ανθοκυανιδίνες (Εικόνα 3) (Crozier et al., 2007). Όσον αφορά τα μη φλαβονοειδή, τα κυριότερα από αυτά που έχουν και υψηλή διατροφική σημασία είναι τα C6-C1 φαινολικά οξέα (κυρίως το γαλλικό οξύ), τα C6-C3 υδροξυ-κινναμωμικά οξέα και τα πολυφαινολικά C6-C2-C6 στυλβένια (Εικόνα 2) (Crozier et al., 2007).



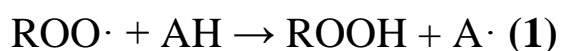
Εικόνα 6. Δύο από τις κυριότερες μη φλαβονοειδείς ενώσεις.



Εικόνα 7. Οι κυριότερες κατηγορίες των φλαβονοειδών.

1.2.2 Γενικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί φαινολικών ενώσεων

Οι φαινολικές ενώσεις μπορούν να δράσουν ως αντιοξειδωτικά με πολλούς τρόπους. Οι υδροξυλομάδες τους αποτελούν καλούς δότες υδρογόνου και τους δίνουν τη δυνατότητα να αντιδράσουν με δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου σε μια αντίδραση τερματισμού, που έχει ως αποτέλεσμα τη λήξη του κύκλου αναγέννησης καινούριων ελεύθερων ριζών (1) (V.E. & TYURINA, 1998).



όπου $\text{ROO}\cdot$ = ρίζα περοξυλίου και AH = αντιοξειδωτικό στην ανηγμένη μορφή του.

Μετά από αυτή την αντίδραση το αντιοξειδωτικό μετατρέπεται το ίδιο σε ρίζα, η οποία έχει πολύ μεγαλύτερη σταθερότητα από ότι η αρχική. Αυτή η σταθερότητα οφείλεται στο γεγονός ότι ο αρωματικός του δακτύλιος αποτελεί ένα υβρίδιο δυο δομών συντονισμού και οι δεσμοί C-C που εμπεριέχει δεν είναι κλασσικοί απλοί ή διπλοί δεσμοί, αλλά είναι όλοι ισοδύναμοι έχοντας χαρακτήρα ενδιάμεσο (μεταξύ απλού και διπλού δεσμού) (Pereira et al., 2009). Αυτή η δομή δίνει τη δυνατότητα στο μονήρες ηλεκτρόνιο που έχει προκύψει να μετακινείται από άτομο σε άτομο στη δομή του βενζολίου, γεγονός που καθιστά τη ρίζα της φαινολικής ένωσης εξαιρετικά σταθερή (Pereira et al., 2009). Εκτός από τον παραπάνω μηχανισμό οι φαινολικές ενώσεις έχουν τη δυνατότητα να δεσμεύουν μεταλλικά ιόντα, τα οποία εμπλέκονται στην παραγωγή ελεύθερων ριζών (Yang et al., 2001). Παρ' όλα αυτά οι φαινόλες μπορούν να δράσουν και ως προ-οξειδωτικά, δεσμεύοντας μέταλλα με τέτοιο τρόπο που να διατηρεί ή να αυξάνει την καταλυτική τους ικανότητα ή ανάγοντας μέταλλα, γεγονός το οποίο αυξάνει την ικανότητά τους να δημιουργούν ελεύθερες ρίζες (Croft, 1998). Ακόμα οι φαινολικές δομές έχουν τη δυνατότητα να αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες, λόγω των υδροφοβικών βενζολικών δακτυλίων τους και της δυνατότητας τους να δημιουργούν δεσμούς υδρογόνου μέσω των υδροξυλικών ομάδων τους (Pereira et al., 2009). Αυτό το γεγονός τους δίνει τη δυνατότητα να αναστέλλουν κάποια ένζυμα που εμπλέκονται στη δημιουργία ελεύθερων ριζών όπως το κυτόχρωμα P450, οι λιποξυγενάσες, οι κυκλοξυγενάσες και οι οξειδάσες της ξανθίνης (Parr & Bolwell, 2000). Τέλος σύμφωνα με έρευνες οι φαινολικές ενώσεις έχουν τη δυνατότητα να δρουν συνεργιστικά με άλλα αντιοξειδωτικά, συγκεκριμένα το ασκορβικό οξύ, το καροτένιο και τις τοκοφερόλες και να συμβάλουν στη ρύθμιση των ενδοκυτταρικών επιπέδων γλουταθειόνης (Pereira et al., 2009).

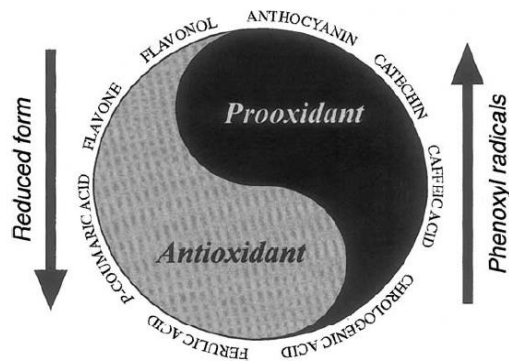
1.2.3 Η πορεία των φαινολικών ριζών μετά την εξουδετέρωση της ελεύθερης ρίζας

Η μοίρα της αντιοξειδωτικής ρίζας που σχηματίζεται στην αντίδραση (1) είναι εξαιρετικά σημαντική διότι οι αντιδράσεις που θα ακολουθήσουν θα καθορίσουν αν η φαινολική ρίζα θα δράσει σαν αντιοξειδωτικό ή σαν κυτταροτοξικός παράγοντας (Εικόνα 4). Συνήθως, υπό φυσιολογικές συνθήκες οι φαινολικές ρίζες δεν εμφανίζουν βλαβερές προοξειδωτικές δράσεις, λόγω της γρήγορης μετατροπής τους σε μη ρίζες, μέσω αντιδράσεων πολυμερισμού καθώς και μέσω ενζυμικών και μη ενζυμικών αντιδράσεων αναγωγής (Sakihama et al., 2002). Υπάρχουν τρία βασικά μονοπάτια που

μπορεί να ακολουθήσει μια αντιοξειδωτική ρίζα (V.E. & TYURINA, 1998): 1) Μπορεί να ανασυνδυαστεί με μία άλλη ρίζα –αντιοξειδωτική ή δραστική- και έτσι να ενισχύσει ή να μειώσει την αντιοξειδωτική της ικανότητα, αντίστοιχα. 2) Μπορεί να αλληλεπιδράσει με κάποιους σχετικούς αναγωγικούς παράγοντες και να ανακυκλωθεί η αντιοξειδωτική της δράση. 3) Τέλος, μπορεί να αντιδράσει άμεσα με κάποια σημαντικά βιολογικά μόρια και να προκαλέσει κυτταροτοξική βλάβη. Μερικά παραδείγματα των παραπάνω μονοπατιών θα αναφερθούν στις δύο επόμενες παραγράφους.

Έχει βρεθεί ότι οι φαινολικές ρίζες μπορούν να αναχθούν στις πατρικές τους ενώσεις μέσω μη ενζυμικών αντιδράσεων με ασκορβικό και ουβικινόλη (Takahama & Oniki, 1992). Επίσης το 2000 αποδείχθηκε ότι τα φαινολικά αντιοξειδωτικά μπορούν να αναγεννηθούν μέσω της αναγωγής του MDA (μονοδεϋδροασκορβικό) (Sakihama et al., 2000). Η αναγωγή του MDA είναι ένα ένζυμο που συμμετέχει στον κύκλο ασκορβικού-γλουταθειόνης και καταλύει την αναγωγή της ρίζας του MDA ώστε να αναγεννηθεί η πατρική ένωση του ασκορβικού (Sakihama et al., 2002). Παλαιότερες μελέτες έδειξαν ότι ένζυμα της μεμβράνης των μιτοχονδρίων που συμμετέχουν στη μεταφορά ηλεκτρονίων μπορούν ως δότες ηλεκτρονίων να ανάγουν τις φαινολικές ρίζες (V.E. & TYURINA, 1998). Σημαντικός έχει βρεθεί να είναι και ο ρόλος των ενδοκυτταρικών θειολών δηλαδή των πρωτεϊνικών σουλφυδρυλικών ομάδων και της γλουταθειόνης στην αναγωγή των φαινολικών ριζών (V.E. & TYURINA, 1998).

Οι φαινολικές ενώσεις, των οποίων οι φαινολικές ρίζες παρουσιάζουν χαμηλή δραστικότητα, οξειδώνουν ειδικά ενδοκυτταρικά συστατικά όπως το ασκορβικό και η ουβικινόλη και ανακυκλώνονται, ενώ οι χημικά δραστικές φαινολικές ρίζες έχουν σημαντικά χαμηλότερη εξειδίκευση και επιτίθενται σε βιολογικά σημαντικούς στόχους για να παραγάγουν μη λειτουργικά οξειδωμένα μόρια (V.E. & TYURINA, 1998). Έχει βρεθεί επίσης ότι οι φαινολικές ρίζες εμφανίζουν προοξειδωτική δράση όταν ο χρόνος ζωής τους επιμηκύνεται μέσω των λεγόμενων “spin stabilization” μετάλλων, τα οποία σταθεροποιούν το σπιν των δραστικών ηλεκτρονίων της εξωτερικής στοιβάδας. (Sakihama et al., 2002).



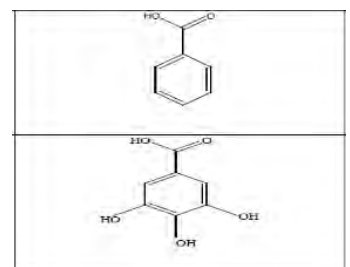
Εικόνα 8. Το σύμβολο Yin-Yang αντιπροσωπεύει την ισορροπία μεταξύ αντιοξειδωτικών και προοξειδωτικών χαρακτηριστικών των φαινολικών αντιοξειδωτικών.

1.3 Φαινολικό περιεχόμενο ελαιόλαδου

Οι φαινόλες του ελαιόλαδου έχουν κεντρίσει το ενδιαφέρον πολλών μελετών. Μέσα από αυτές τις μελέτες έχει βρεθεί ότι το φαινολικό περιεχόμενο του ελαιόλαδου έχει θετικές επιπτώσεις σε πολλές φυσιολογικές παραμέτρους όπως στις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος, στο οξειδωτικό στρες, σε φλεγμονώδεις δείκτες, στα αιμοπετάλια, στην κυτταρική λειτουργία και στην αντιμικροβιακή δραστηριότητα (Carluccio et al., 2003; Covas et al., 2006; Psaltopoulou et al., 2004). Έχει βρεθεί επίσης ότι οι φαινολικές ενώσεις του ελαιόλαδου έχουν υψηλή βιοδιαθεσιμότητα, γεγονός το οποίο υποστηρίζει και τις σημαντικά ευεργετικές επιπτώσεις τους στην υγεία (Cicerale et al., 2009).

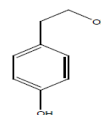
Το είδος και η ποσότητα των φαινολικών ενώσεων ποικίλουν ανάμεσα στους διαφορετικούς τύπους παρθένου ελαιόλαδου. Αυτή η παρέκκλιση οφείλεται σε διάφορους παράγοντες όπως η ποικιλία της ελιάς, η περιοχή καλλιέργειας του ελαιόδεντρου, οι γεωργικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται, η ωριμότητα της ελιάς, οι μέθοδοι εκχύλισης, επεξεργασίας και αποθήκευσης του ελαιόλαδου, καθώς και ο τρόπος μαγειρέματος (Cicerale et al., 2009). Έχουν αναγνωριστεί τουλάχιστον 36 διαφορετικές φαινολικές ενώσεις που βρίσκονται στο ελαιόλαδο και μπορούν να ταξινομηθούν σύμφωνα με τη χημική δομή τους ως εξής (Cicerale et al., 2009):

- Φαινολικά οξέα: Αυτές οι ενώσεις μπορούν να διαιρεθούν σε 3 υποομάδες: παράγωγα του βενζοϊκού οξέος, παράγωγα του κινναμωμικού οξέος και άλλα φαινολικά οξέα και παράγωγα τους.



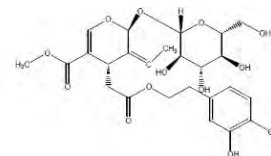
Εικόνα 5. Παραδείγματα φαινολικών οξέων. Πάνω το βενζοϊκό οξύ και κάτω το γαλλικό οξύ.

- Φαινολικές αλκοόλες: Αυτές οι ενώσεις αποτελούνται από μια ομάδα υδροξυλίου συζευγμένη με έναν αρωματικό υδρογονάνθρακα.



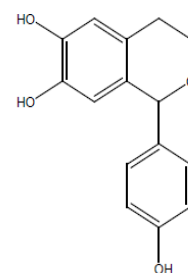
Εικόνα 6. Παράδειγμα φαινολικής αλκοόλης: Τυροσόλη

- Σεκοϊριδοειδή: Αυτή η ομάδα ενώσεων χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη είτε ελενολικού οξέος ή παραγώγων του στη μοριακή δομή τους.



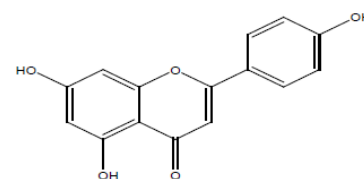
Εικόνα 7. Παράδειγμα σερικοειδούς: Ολευροπεΐνη

- Υδροξυ-χρωμάνια: Σχηματίζονται κατά την μάλαξη από ένζυμα όπως οι γλυκοσιδάσες και οι εστεράσες που αυξάνουν την ποσότητα της υδροξυτυροσόλης και των καρβονυλικών μορίων και κατ' αυτό τον τρόπο ευνοείται η παρουσία των μορίων που είναι απαραίτητα για το σχηματισμό των ισοχρωμανίων. Στο ελαιόλαδο συναντώνται το 1-φαινυλο-6,7-διϋδροξυ-ισοχρωμάνιο και το 1-(3'-μεθοξυ-4'-υδροξυ)-φαινυλο-6,7-διϋδροξυ-ισοχρωμάνιο τα οποία σχηματίζονται από την αντίδραση υδροξυτυροσόλης με βενζαλδεΐδη ή βανιλίνη (Bianco et al. 2001).



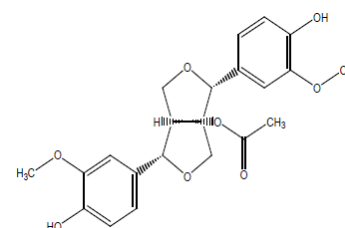
Εικόνα 8. 1-φαινυλο-6,7-διϋδροξυ-ισοχρωμάνιο

- Φλαβονοειδή: Αυτές οι πολυφαινολικές ενώσεις περιέχουν δυο δακτυλίους βενζολίου ενωμένους από μια αλυσίδα 3 ανθράκων. Μπορούν να υποδιαιρεθούν σε δυο ομάδες: τις φλαβόνες και τις φλαβονόλες



Εικόνα 9. Παράδειγμα Φλαβονοειδών: Απιγενίνη

- Λιγνάνες: Είναι πολυφαινόλες, των οποίων η δομή βασίζεται στη συμπύκνωση αρωματικών αλδεΐδων.

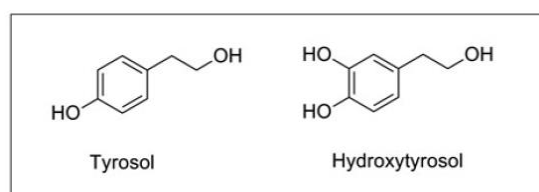


Εικόνα 10. Παράδειγμα Λιγνάνης: Ακετοξυπινορεσινόλη

Μετά τη διαδικασία παραγωγής του παρθένου ελαιόλαδου, η ποσότητα των φαινολικών ενώσεων που περιέχει κυμαίνεται από 100 μέχρι 600 mg/ml, με τη μισή ποσότητα να αντιστοιχεί στην υδροξυτυροσόλη και στα παράγωγά της (Tripoli et al., 2005). Η υδροξυτυροσόλη μαζί με την τυροσόλη θα αναλυθούν εκτενέστερα παρακάτω λόγω του σημαντικού τους ρόλου στην πρόληψη πολλών παθολογικών καταστάσεων.

1.3.1 Τυροσόλη και Υδροξυτυροσόλη

Η υδροξυτυροσόλη και η τυροσόλη είναι φαινολικές ενώσεις που βρίσκονται κυρίως στο ελαιόλαδο και στο κρασί, αλλά συντίθενται και ενδογενώς στον ανθρώπινο οργανισμό σαν υποπροϊόντα του μεταβολισμού της ντοπαμίνης



Εικόνα 11. Χημικές δομές τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης.

και της τυραμίνης, αντίστοιχα (Rodríguez-Morato et al., 2016). Ο ρόλος τους στη φύση είναι κυρίως αμυντικός έναντι των παθογόνων και των φυτοφάγων, ενώ στον ανθρώπινο οργανισμό αξιοσημείωτα είναι τα ευεργετικά τους αποτελέσματα στο μεταβολικό σύνδρομο, στον καρκίνο και στις νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Ortega-García & Peragón, 2010; Rodríguez-Morató et al., 2016).

1.3.1.1 Η τυροσόλη, η υδροξυτυροσόλη και οι επικρατούσες μορφές τους στο παρθένο ελαιόλαδο

Στο ελαιόλαδο η τυροσόλη και η υδροξυτυροσόλη βρίσκονται με τη μορφή γλυκοζιτών (γνωστών ως 2-(4-υδροξυφαινυλ)αιθυλ β-D-γλυκοπυρανοζίτης και HT-4-β-D-γλυκοζίτης) και σεκοϊριδοειδών (Rodríguez-Morato et al., 2016). Τα σεκοϊριδοειδή χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη του ελενολικού οξέος στη γλυκοζιτική και μη γλυκοζιτική μορφή συνδεδεμένου στην υδροξυτυροσόλη και την τυροσόλη (Rodríguez-Morato et al., 2016). Στο ελαιόλαδο τα σεκοϊριδοειδή είναι συνδεδεμένα σε ένα μόριο γλυκόζης (γνωστά ως ολευρωπεΐνη και λιγκστροσίδη) και παράγονται από το βιοχημικό μονοπάτι παραγωγής τερπενίων (Bendini et al., 2007). Παρ' όλα αυτά κατά τη διαδικασία της έκθλιψης και της μάλαξης των αλεσμένων ελιών οι β-γλυκοσιδάσες καταλύουν την απογλυκοζυλίωση αυτών των ενώσεων, με αποτέλεσμα την παραγωγή των μη γλυκοζυλιωμένων μορφών τους (Bendini et al.,

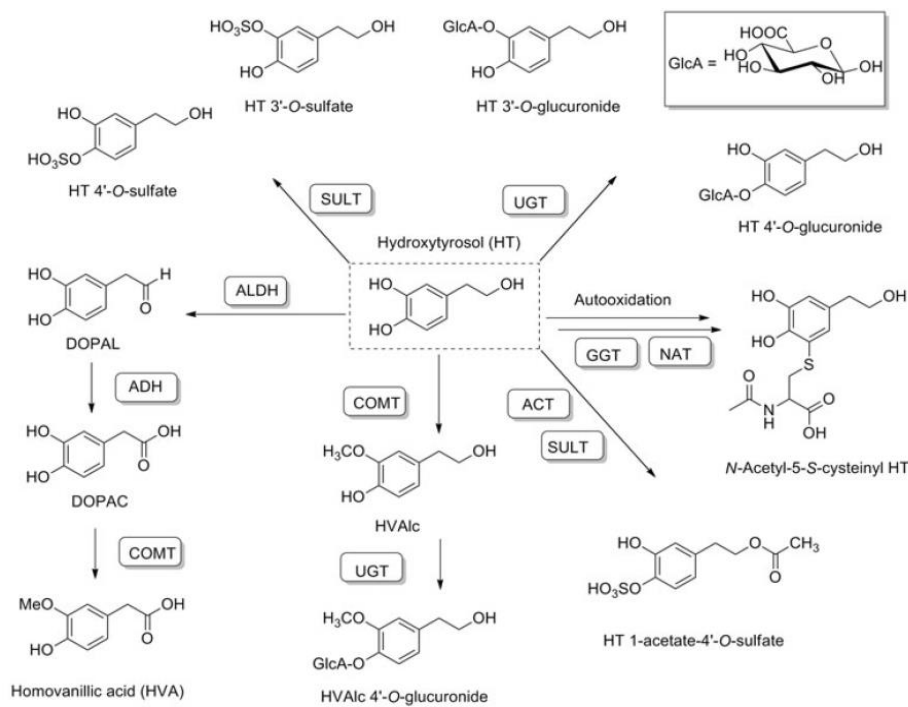
2007). Οι μη γλυκοζυλιωμένες μορφές της ολευρωπεΐνης και της λιγκστροσίδης υδρολύονται περαιτέρω στο έντερο, παράγοντας ελενολικό οξύ και τις φαινόλες υδροξυτυροσόλη και τυροσόλη (Obied et al., 2008). Απελευθέρωση υδροξυτυροσόλης και τυροσόλης πραγματοποιείται και κατά την αποθήκευση του ελαιόλαδου, λόγω υδρολυτικών αντιδράσεων των σύνθετων σεκοϊριδοειδών παραγώγων (Cinquanta, Esti, & Notte, 1997). Ακόμα δυο μορφές της υδροξυτυροσόλης και της τυροσόλης που αποτελούν βιολογικά δραστικές ουσίες του παρθένου ελαιόλαδου είναι οι εστέρες τους με το δεακετοξυ ελενολικό οξύ γνωστές ως ολεοκανθάλη και ολεασίνη, αντίστοιχα (Karkoula et al., 2012). Από όλες τις φαινολικές ενώσεις του παρθένου ελαιόλαδου αυτές που υπερτερούν σε ποσότητα είναι οι γλυκοζυλιωμένες και μη μορφές της ολευρωπεΐνης και της λιγκστροσίδης, η υδροξυτυροσόλη και η τυροσόλη (Rodríguez-Morato et al., 2016).

1.3.1.2 Ενδογενής σχηματισμός τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης

Όσον αφορά τον ενδογενή σχηματισμό των δυο αυτών ενώσεων, πολλές έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί για τη μελέτη του μονοπατιού βιοσύνθεσής τους και τους παράγοντες που το επηρεάζουν. Όπως προαναφέρθηκε, η υδροξυτυροσόλη αποτελεί υποπροϊόν του μεταβολισμού της ντοπαμίνης και η τυροσόλη προκύπτει από την τυραμίνη (μονοαμίνη που προέρχεται από την αποκαρβοξυλίωση του αμινοξέος τυροσίνη). Πειράματα σε ζώα έχουν δείξει ότι ο ενδογενής σχηματισμός των δυο αυτών ενώσεων παρουσίασε σημαντική αύξηση μετά από χορήγηση αιθανόλης, λόγω της σημαντικής επίδρασης της τελευταίας στο μονοπάτι μεταβολισμού της ντοπαμίνης και της τυραμίνης (Davis & Walsh, 1970; Tacker, McIsaac, & Creaven, 1970). Επίσης πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα απέδειξαν ότι η τυροσόλη αποτελεί πρόδρομο μόριο της υδροξυτυροσόλης λόγω του γεγονότος ότι η χορήγηση της πρώτης σε αρουραίους έδειξε να αυξάνει την απέκκριση της τελευταίας μέσω των ούρων με δόσοεξαρτώμενο τρόπο (Rodríguez-Morato et al., 2016). Αποδείχθηκε ότι σε αυτή τη χημική αντίδραση πιθανότατα να εμπλέκεται το κυτόχρωμα P450 και πιο συγκεκριμένα τα ισοένζυμα CYP2A6 και CYP2D6 (Rodríguez-Morato et al., 2016).

1.3.1.3 Απορρόφηση, μεταβολισμός και βιοδιαθεσιμότητα τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης

Πολλές έρευνες έχουν ασχοληθεί με την απορρόφηση, τον μεταβολισμό και τη βιοδιαθεσιμότητα των συγκεκριμένων ενώσεων λόγω του ότι η επίδρασή τους στον οργανισμό εξαρτάται από την ενεργή βιοδιαθέσιμη ποσότητά τους και όχι από την αρχική ποσότητα που καταναλώνεται (Holst & Williamson, 2008). Έχει βρεθεί ότι ενώ η απορρόφηση των ενώσεων είναι αρκετά καλή, η βιοδιαθεσιμότητα τους είναι εξαιρετικά μειωμένη (Vissers et al., 2002). Αυτό το γεγονός οφείλεται στο μεταβολισμό πρώτης διόδου που υφίστανται αυτές οι ενώσεις στο έντερο και στο ήπαρ. Μέχρι τώρα έχουν βρεθεί πάνω από 10 μεταβολίτες, στους οποίους συμπεριλαμβάνονται Ο-μεθυλιωμένες μορφές, αλδεΐδες και οξέα που προκύπτουν μέσω της οξειδωσης της αλειφατικής αλκοόλης, θειικά άλατα, γλυκουρονίδια, ακετυλιωμένα και σουλφυδρυλιωμένα παράγωγα καθώς και παράγωγα N-ακέτυλοκυστεϊνης (Εικόνα 12) (Rodríguez-Morato et al., 2016). Έτσι έχει δημιουργηθεί η ανάγκη στην επιστημονική κοινότητα να στρέψει το ενδιαφέρον της προς τη μελέτη της δράσης των παραπάνω μεταβολιτών και πώς αυτή οδηγεί στα ευεργετικά αποτελέσματα της τυροσόλης και της υδροξυτυροσόλης στον ανθρώπινο οργανισμό. Δυστυχώς όμως, πολύ λίγες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί στο συγκεκριμένο τομέα και μερικές από αυτές είναι οι εξής: 1)Σημαντικά πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα έδειξαν ότι οι μεταβολίτες που κυριαρχούν στο πλάσμα και στα ούρα είναι τα θειικά άλατα της τυροσόλης και της υδροξυτυροσόλης (Suárez et al., 2009; Pérez-Mañá et al., 2015). 2)Επίσης, σύμφωνα με τελευταίες έρευνες, οι συζευγμένες μορφές της τυροσόλης και της υδροξυτυροσόλης φαίνεται να παρουσιάζουν τις ίδιες βιολογικές δραστηριότητες με τις ελεύθερες ενώσεις, αλλά πιθανότατα μέσω διαφορετικών μηχανισμών δράσης (Rodríguez-Morato et al., 2016). 3)Παρ' όλα αυτά έχει βρεθεί ότι η απορρόφηση και ο μεταβολισμός των φαινολικών ενώσεων διαφέρουν από άνθρωπο σε άνθρωπο, πιθανότατα λόγω διαφορών στην ενζυμική δραστηριότητα (Bock et al., 2013).



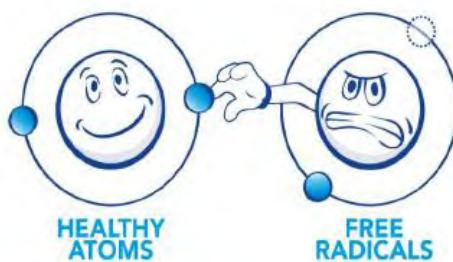
Εικόνα 12. Μεταβολικά μονοπάτια της υδροξυτυροσόλης.

1.4 Ελεύθερες ρίζες

Οι ελεύθερες ρίζες (Free radicals) αποτελούν άτομα ή μόρια, με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στιβάδα και με δυνατότητα αυτοδύναμης ύπαρξης (Pilcher, 2002). Η ύπαρξη αυτού του ασύζευκτου ηλεκτρονίου προσδίδει αστάθεια στις ελεύθερες ρίζες και τις καθιστά εξαιρετικά δραστικές. Στην προσπάθειά τους να εξισορροπήσουν τη δομή τους, αποσπών ηλεκτρόνια από άλλα μόρια ή προσφέρουν ηλεκτρόνια σε αυτά με απώτερο σκοπό να αποκτήσουν τη μέγιστη σταθερότητα (V. Lobo et al., 2010). Έτσι ξεκινάει μια αλυσίδα κατά την οποία η πρώτη ελεύθερη ρίζα αποσπά ένα ηλεκτρόνιο από ένα μόριο, το οποίο τελικά αποσταθεροποιείται και μετατρέπεται το ίδιο σε ελεύθερη ρίζα. Αυτό το μόριο με τη σειρά του αποσπά ένα ηλεκτρόνιο από άλλο μόριο και έτσι ξεκινά ένας καταρράκτης οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων που μπορεί τελικά να καταστρέψει ολόκληρο το κύτταρο (Togo & Togo, 2004).

Οι ελεύθερες ρίζες έχουν διττό ρόλο στη βιολογία του κυττάρου. Προσβάλλουν τα βιομόρια (DNA, πρωτεΐνες, λιπίδια) και τροποποιούν τις φυσιολογικές λειτουργίες τους, καθώς και αποτελούν βασικό μοριακό σύμπτωμα πολλών ασθενειών και άλλων καταστάσεων (καρκίνος, διαβήτης, νευροεκφυλιστικές νόσοι, γήρανση, ασκησιογενές οξειδωτικό στρες) (Moskovitz et al., 2002). Παρ' όλα αυτά έρευνες έχουν δείξει ότι οι ελεύθερες ρίζες, έχουν και ευεργετικές επιδράσεις στο κύτταρο: προάγουν την

κυτταρική σηματοδότηση, καθώς και προκαλούν χρήσιμες προσαρμογές μετά από επαναλαμβανόμενη έκθεση σε αυτές (Seshadri et al., 2010). Έχει βρεθεί ότι οι δραστικές μορφές οξυγόνου, που παράγονται από τον κυτταρικό μεταβολισμό, παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο ως σηματοδοτικά μόρια στο ανοσοποιητικό σύστημα (Chen et al., 2016). Πιο συγκεκριμένα, πρόσφατη μελέτη απέδειξε ότι αυξημένα επίπεδα δραστικών μορφών οξυγόνου στο μικροπεριβάλλον ενός όγκου συνδέονται με επαγόμενη από όγκο ανοσοκαταστολή, καθώς συμμετέχουν στην ενεργοποίηση, την απόπτωση και τη μειωμένη ανταπόκριση των T λεμφοκυττάρων (Chen et al., 2016). Εξίσου σημαντική έχει βρεθεί να είναι και η συμβολή των δραστικών μορφών οξυγόνου στις φυσιολογικές προσαρμογές που επέρχονται της άσκησης, όπως για παράδειγμα στην αναγέννηση του μυ (He et al., 2016). Επίσης έχει αποδειχθεί ότι μέτρια επίπεδα ROS είναι απαραίτητα για την παραγωγή της μυϊκής δύναμης (Powers & Jackson, 2008).



Εικόνα 13. Απεικόνιση δράσης ελεύθερων ριζών.

1.4.1 Ταξινόμηση ελεύθερων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες ανάλογα με το κεντρικό άτομο διακρίνονται σε: δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) (Πίνακας 2), δραστικές μορφές αζώτου (Reactive Nitrogen Species, RNS) (Πίνακας 3) και δραστικές μορφές χλωρίου (Reactive Chlorine Species, RCS) (Πίνακας 3) (Ługowski et al., 2011; Villamena, 2013). Οι παραπάνω δραστικές μορφές αποτελούν δραστικές χημικές ενώσεις που περιέχουν οξυγόνο, άζωτο και χλώριο αντίστοιχα. Στις δραστικές μορφές περιλαμβάνονται και μη ρίζες, οι οποίες όμως είναι εξίσου δραστικές ή και περισσότερο (Villamena, 2013). Από όλες τις παραπάνω κατηγορίες, αυτές που έχουν μελετηθεί περισσότερο είναι οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS). Οι δραστικές μορφές οξυγόνου προκύπτουν σαν ένα φυσικό προϊόν από το μεταβολισμό του

οξυγόνου και παίζουν σημαντικό ρόλο στην κυτταρική σηματοδότηση και στην ομοιόσταση (Hayyan et al., 2016).

Πίνακας 7. Οι κυριότερες δραστικές μορφές οξυγόνου.

Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS)	Σύμβολο	Χρόνος ημιζωής	Χαρακτηριστικά
Ρίζα Υδροξυλίου (Hydroxyl Radical)	OH [•]	10 ⁻⁹ s	Εξαιρετικά δραστική ρίζα Διαχέεται διαμέσου των μεμβρανών
Μονήρες Οξυγόνο (Singlet Oxygen)	¹ O ₂	10 ⁻⁶ s	Ισχυρό οξειδωτικό Παράγεται στις βιολογικές αντιδράσεις
Ρίζα Σουπεροξειδίου (Superoxide Radical)	O ₂ ^{•-}	10 ⁻⁶ s	Μη ισχυρό οξειδωτικό Παράγεται στα μιτοχόνδρια
Ρίζα Αλκοξυλίου (Alkoxy Radical)	RO [•]	10 ⁻⁶ s	Ισχυρό οξειδωτικό Παράγεται κατά την οξείδωση λιπιδίων
Ρίζα Περοξυλίου (Peroxy Radical)	ROO [•]	10 ⁻² s	Μη ισχυρό οξειδωτικό Παράγεται κατά την οξείδωση λιπιδίων
Όζον (Ozone)	O ₃	s	Βρίσκεται στην ατμόσφαιρα Παράγει ¹ O ₂
Υπεροξειδιο του Υδρογόνου (Hydrogen Peroxide)	H ₂ O ₂	min	Σταθερή ROS, Σηματοδοτικό μόριο Οδηγεί στην παραγωγή OH [•]
Υδροϋπεροξειδιο (Hydroperoxide)	ROOH	Σταθερό	Αντιδρά με μέταλλα και παράγει ελεύθερες ρίζες

Πίνακας 8. Οι κυριότερες δραστικές μορφές αζώτου και χλωρίου.

Δραστικές Μορφές Αζώτου (Reactive Nitrogen Species, RNS)	Σύμβολο	Χρόνος ημιζωής	Χαρακτηριστικά
Περοξυνιτρίτης (Peroxynitrite)	ONOO ⁻	10 ⁻³ s	Ισχυρό οξειδωτικό Νευροδιαβιβαστής
Μονοξειδιο του Αζώτου (Nitric Oxide)	NO [•]	s	Σηματοδοτικό μόριο Παράγει ελεύθερες ρίζες
Διοξειδιο του Αζώτου (Nitric Dioxide)	NO ₂	s	Παράγεται στην ατμόσφαιρα
Περοξυνιτρώδες Οξύ (Peroxynitrous Acid)	ONOOH	Σταθερό	Παράγεται από τον ONOO ⁻

Δραστικές Μορφές Χλωρίου (Reactive Chlorine Species, RCS)	Σύμβολο	Χρόνος ημιζωής	Χαρακτηριστικά
Υποχλωριώδες Οξύ (Hypochlorous Acid)	HClO	min	Ισχυρό οξειδωτικό Παράγεται στη φλεγμονή
Υποχλωριώδες Ανιόν (Hypochlorite Anion)	OCl ⁻	Σταθερό	Παράγεται στη φλεγμονή

1.4.2 Παραγωγή ελεύθερων ριζών

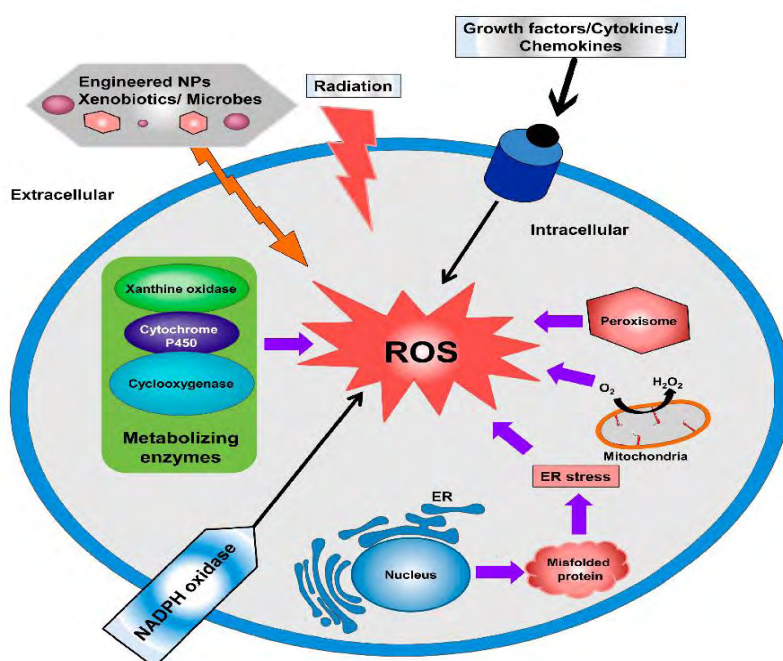
Οι ελεύθερες ρίζες και άλλες δραστικές μορφές οξυγόνου παράγονται είτε μέσω σημαντικών μεταβολικών διαδικασιών στο ανθρώπινο σώμα ή από εξωτερικές πηγές όπως έκθεση σε ακτίνες X, όζον, κάπνισμα, ατμοσφαιρικοί ρύποι και χημικά

βιομηχανιών. Η δημιουργία ελευθέρων ριζών συμβαίνει συνεχόμενα στα κύτταρα σαν αποτέλεσμα ενζυμικών και μη ενζυμικών αντιδράσεων (V. Lobo et al., 2010). Οι πρώτες περιλαμβάνουν αυτές που εμπλέκονται στην αναπνευστική αλυσίδα, στη φαγοκυττάρωση, στη σύνθεση προσταγλανδινών και στο σύστημα του κυτοχρώματος P-450 (V. Lobo et al., 2010). Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να σχηματιστούν επίσης μέσω μη ενζυμικών αντιδράσεων οξυγόνου με οργανικές ενώσεις, όπως για παράδειγμα μέσω αντιδράσεων ιονισμού (V. Lobo et al., 2010). Μερικές ενδογενείς πηγές ελευθέρων ριζών είναι (V. Lobo et al., 2010):

- Τα μιτοχόνδρια
- Η οξειδάση της ξανθίνης
- Τα υπεροξειδισώματα
- Η φλεγμονή
- Η φαγοκύτωση
- Η άσκηση
- Μονοπάτια αραχιδονικού
- Ισχαιμία

Μερικές εξωγενείς πηγές ελεύθερων ριζών είναι (V. Lobo et al., 2010):

- Ο καπνός του τσιγάρου
- Οι περιβαλλοντικοί ρύποι
- Η ακτινοβολία
- Μερικά φάρμακα, εντομοκτόνα
- Βιομηχανικοί διαλύτες
- Όζον



Εικόνα 14. Πηγές ελεύθερων ριζών.

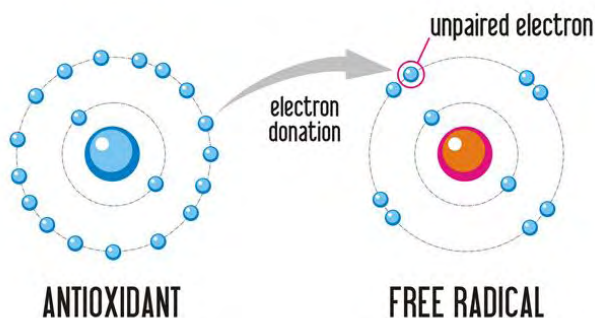
1.5 Αντιοξειδωτικά και οξειδωτικό στρες

Το ανθρώπινο σώμα είναι εξοπλισμένο με μία πληθώρα αντιοξειδωτικών, τα οποία είναι υπεύθυνα για την εξισορρόπηση της επίδρασης των οξειδωτικών. Πιο συγκεκριμένα αποτελούν ενώσεις, που βρίσκονται σε χαμηλή συγκέντρωση συγκριτικά με το υπόστρωμά τους (βιομόρια) και καθυστερούν ή αναστέλλουν την οξείδωση του συγκεκριμένου υποστρώματος (Birben, Sahiner, Sackesen, Erzurum, & Kalayci, 2012). Ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες, τα ενζυμικά και τα μη ενζυμικά και τα κυριότερα από αυτά καθώς και οι λειτουργίες τους απεικονίζονται στην Εικόνα 15 (Gutteridge, 1995).

Αντιοξειδωτικά και οι λειτουργίες τους	
Δισμουτάση του Υπεροξειδίου (Mn, Cu, Zn)	Απομακρύνει τη $O_2^{\bullet -}$
Καταλάση (Fe)	Απομακρύνει το H_2O_2 (σε υψηλές συγκεντρώσεις)
Υπεροξειδάση της Γλουταθειόνης (Se)	Απομακρύνει τα υδροϋπεροξειδία και το H_2O_2 (σε χαμηλές συγκεντρώσεις)
Αναγωγή της Γλουταθειόνης	Ανάγει την οξειδωμένη γλουταθειόνη
Τρανσφεράση της Γλουταθειόνης	Απομακρύνει τα ξενοβιοτικά
Οξειδάση του Κυτοχρώματος (Cu)	Παράγει O_2 στην αναπνευστική αλυσίδα
Γλουταθειόνη	Αδρανοποιεί ελεύθερες ρίζες απομακρύνει τα ξενοβιοτικά
Ουρικό οξύ	Αδρανοποιεί τη ROO^{\bullet} και τη OH^{\bullet}
Αλβουμίνη	Δεσμεύει Cu, αδρανοποιεί ελεύθερες ρίζες ($HClO$)
Ασκορβικό οξύ (Βιταμίνη C)	Αδρανοποιεί τη OH^{\bullet}
Βιταμίνη E (τοκοφερόλες, τοκοτριενόλες)	Διασπάει τις αλυσίδες των ελευθέρων ριζών
β-Καροτένιο	Αδρανοποιεί ελεύθερες ρίζες
Ουβικινόλη	Παράγει O_2 στην αναπνευστική αλυσίδα
Ουβικινόνη (Συνένζυμο Q)	Συμμετέχει στις αντιδράσεις της αναπνευστικής αλυσίδας
Χολερυθρίνη	Αδρανοποιεί τη ROO^{\bullet}
Τρανσφερίνη	Δεσμεύει τα ιόντα του τρισθενούς σιδήρου (Fe^{3+})
Λακτοφερρίνη	Δεσμεύει τα ιόντα του τρισθενούς σιδήρου (Fe^{3+}) σε μικρότερο pH

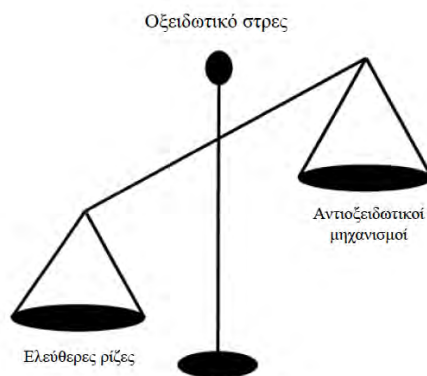
Εικόνα 15. Τα κυριότερα αντιοξειδωτικά και οι λειτουργίες τους.

How antioxidants reduce the free radicals

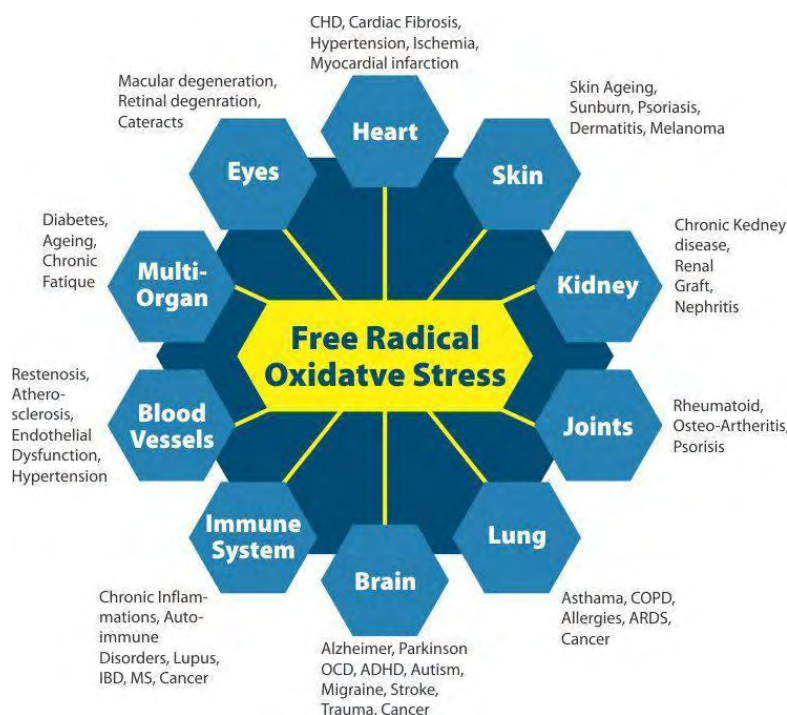


Εικόνα 16. Ο μηχανισμός αναγωγής των ελεύθερων ριζών από τα αντιοξειδωτικά.

Η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των ελευθέρων ριζών και του αντιοξειδωτικού μηχανισμού υπέρ των πρώτων, ορίζεται ως οξειδωτικό στρες (Εικόνα 17) (Birben et al., 2012). Το οξειδωτικό στρες έχει βρεθεί να εμπλέκεται με μία σειρά παθολογικών καταστάσεων και ασθενειών όπως καρκίνο, νευρολογικές διαταραχές, αθηροσκλήρωση, υπέρταση, ισχαιμία, διαβήτη και αναπνευστικές δυσλειτουργίες (Birben et al., 2012) (Εικόνα 18).



Εικόνα 17. Αναπαράσταση του ορισμού του οξειδωτικού στρες.



Εικόνα 18. Βλαπτικές επιδράσεις του οξειδωτικού στρες στην υγεία του ανθρώπου.

2. ΣΚΟΠΟΣ

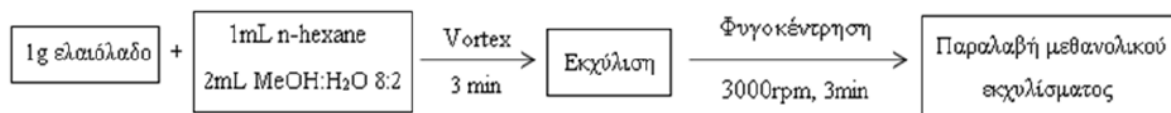
Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να εξεταστεί η συμβολή της διαφορετικής πολυφαινολικής σύστασης, δύο πολυφαινολικών εκχυλισμάτων ελαιόλαδου Ελληνικής προέλευσης, στις αντιοξειδωτικές ιδιότητες τους. Στόχος είναι να καταδείξουμε την σημαντικότητα της σύστασης έτσι ώστε να υιοθετηθούν καλύτερες μέθοδοι 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 ελληνικής προέλευσης με διαφορετική πολυφαινολική σύσταση, ένα υπερ παραγωγών τυροσόλης και ένα σχεδόν ίσης ποσότητας παραγωγών 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

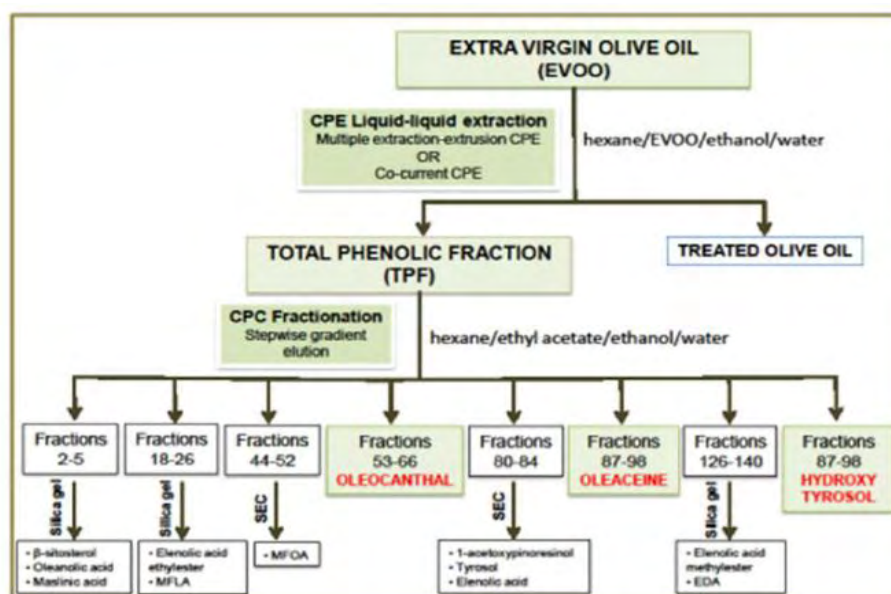
3.1 Πολυφαινολικά εκχυλίσματα ελαιόλαδων

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 Εικόνα 19. 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 19. 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 (Εικόνα 20) και περιγράφεται αναλυτικά σε άλλες μελέτες (Kouka et al., 2017; Angelis et al., 2017).



Εικόνα 20. Εξαγωγή ολικού πολυφαινολικού κλάσματος από το ελαιόλαδο και απομόνωση των επιμέρους συστατικών

Τα ελαιόλαδα, από τα οποία προέκυψαν τα εκχυλίσματα, ήταν κορωνέικης ποικιλίας. Για την παραγωγή του κάθε δείγματος χρησιμοποιήθηκαν 10 g ελαιολάδου. Το πρώτο πολυφαινολικό εκχύλισμα, με την κωδική ονομασία OLE 05 περιείχε 0,86 mg παραγώγων υδροξυτυροσόλης και 2,16 mg παραγώγων τυροσόλης. Αντίστοιχα το δεύτερο δείγμα με την κωδική ονομασία OLE 50 περιείχε 1,08 mg παραγώγων υδροξυτυροσόλης και 1,12 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 (EFSA, 2010).

3.2 Σύσταση πολυφαινολικών εκχυλισμάτων

Στους παρακάτω πίνακες παρατίθενται η περιεκτικότητα των δύο εκχυλισμάτων σε υδροξυτυροσόλη και τυροσόλη, πληροφορίες για την ποικιλία της ελιάς, τον τρόπο καλλιέργειας της καθώς και την ημερομηνία και τον τρόπο παραγωγής του ελαιόλαδου.

Πίνακας 9. Πληροφορίες για το εκχύλισμα OLE50.

	WEIGHT (mg)	YIELD (mg)	mg HT/20g	mg T/20g	TOTAL (HT+T)
OLE50	2.7	7.2	1.08	1.12	2.21

Πίνακας 10. Πληροφορίες για το εκχύλισμα OLE05.

	WEIGHT (mg of olive oil)	YIELD of polyphenols (mg)	mg of HT corresponding to 20g of olive oil	mg T corresponding to 20g of olive oil	TOTAL (HT+T)	ΠΕΡΙΟΧΗ/ΤΟ ΠΟΣ ΣΥΛΛΟΓΗΣ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΥ	ΠΟΙΚΙΛΙΑ	ΕΙΔΟΣ ΚΑΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	ΗΜ/ΝΙΑ ΣΥΛΛΟΓΗΣ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΥ	ΗΜ/ΝΙΑ ΕΛΑΙΟΠΟΙΗΣΗΣ	ΤΡΟΠΟΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
OLE05	10	17.4	0.86	2.16	3.01	ΑΡΧΑΝΕΣ, ΗΡΑΚΛΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ	ΚΟΡΩΝΕΪΚΗ	ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ	02/11/2016	04/11/2016	ΔΙΦΑΣΙΚΟ

3.3 Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς HeLa Υλικά καλλιέργειας

Θρεπτικό υλικό:

- Θρεπτικό μέσο Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, 4,5g/l Glucose, 1 mM sodium pyruvate, Gibco BRL 41966), περιέχει βιταμίνες, αμινοξέα, γλυκόζη, σίδηρο και κόκκινο της φαινόλης.
- 2mM L-γλουταμίνη (Biochrom KG Seromed).

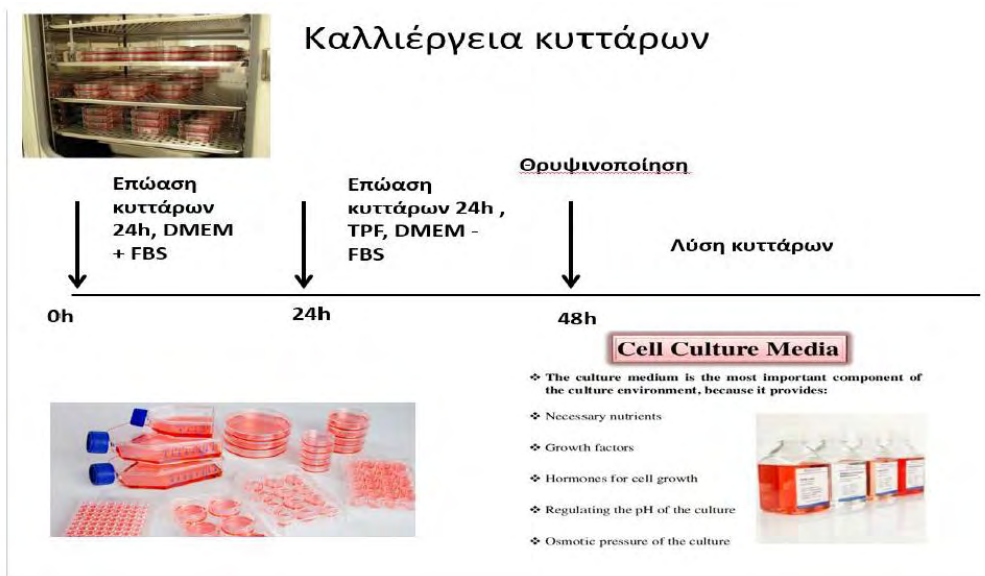
- Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη αντιβιοτικά (antibiotic-antimitotic solution, Gilbo).
- Fetal Bovine Serum, FBS (Biochrom KG Seromed) ορός βοδινού αίματος.
- Τρυψίνη 0.25% (Gibco), η οποία χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των κυττάρων της καλλιέργειας.
- PBS, pH 7,3 (Phosphate Buffer Saline 1x) (Gibco), 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 25cm² 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 CO₂ 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.

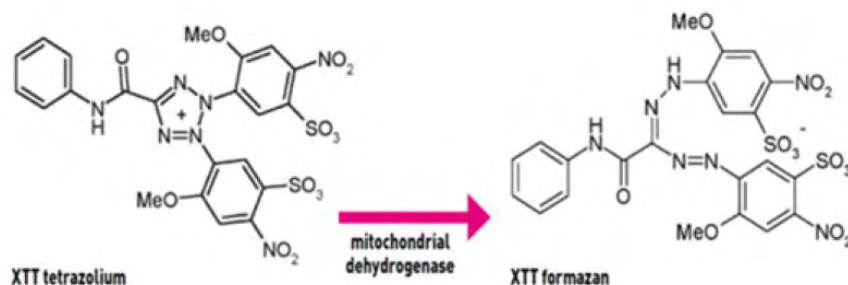
Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν για 24 ώρες, έπειτα έγινε η χορήγηση των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων σε θρεπτικό μέσο χωρίς FBS, σε διάφορες μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις, όπως παρατηρήθηκε με τη μέθοδο XTT, η οποία περιγράφεται παρακάτω, για ακόμα 24 ώρες και έπειτα έγινε θρυψινοποίηση και συλλογή των κυττάρων.



Εικόνα 21. Διαδικασία καλλιέργειας κυττάρων.

3.4 Προσδιορισμός της κυτταροτοξικής δράσης του εκχυλίσματος με τη μέθοδο XTT

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



Εικόνα 22. Μεταβολισμός του XTT σε υδατοδιαλυτή φορμαζάνη από ζωντανά κύτταρα.

Πειραματική Διαδικασία

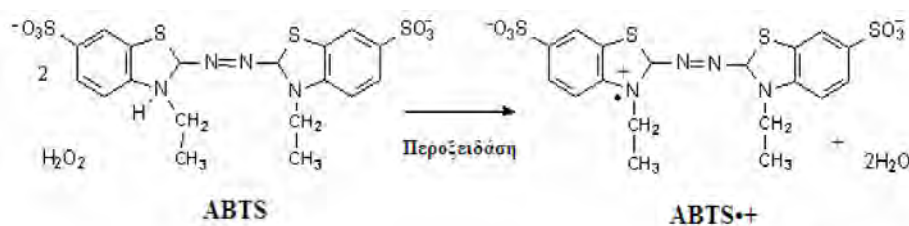
- Εφόσον τα κύτταρα έχουν καλύψει το 70-80% της φλάσκας 25cm², αποκολλώνται από την επιφάνεια της, με τη χρήση τρυψίνης 0,25% και ακολουθεί επαναϊώρησή τους σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS σε falcon. Μέτρηση του αριθμού τους πραγματοποιείται, με τη βοήθεια αντικειμενοφόρου πλάκας Neubauer.
- Στη συνέχεια, 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% CO₂, 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 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% CO₂.
- Την επόμενη ημέρα προστίθενται 50 μl από το αντιδραστήριο XTT σε κάθε θέση των 96-well plates και ακολουθεί επώαση για 4 ώρες. Αξίζει να σημειωθεί ότι το αντιδραστήριο XTT πρέπει να έχει αναλογία 50:1 μεταξύ των αντιδραστηρίων A και B, από τα οποία αποτελείται το kit. Παράλληλα σε κάθε πείραμα χρησιμοποιούνται και δείγματα ως αρνητικοί μάρτυρες, τα οποία περιείχαν μόνο κύτταρα και όχι XTT. Επίσης, χρησιμοποιούνται και δείγματα μάρτυρες που περιείχαν το εκχύλισμα, χωρίς όμως να περιέχουν και κύτταρα, προκειμένου να παρατηρηθεί αν η 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:

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

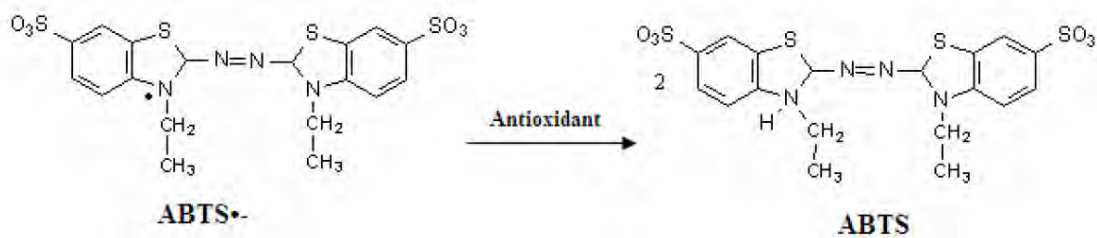
3.5 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας ABTS•+

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 (Rice-Evans, Miller, & Paganga, 1996). 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.

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 περοξειδάσων. 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 (Εικόνα 24). Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων η οξείδωση του ABTS πραγματοποιήθηκε ενζυμικά μέσω της δράσης μιας περοξειδάσης, της HRP, παρουσία H₂O₂ (Εικόνα 23).



Εικόνα 23. Παραγωγή της ρίζας του ABTS•+ μέσω της δράσης περοξειδάσης παρουσία H₂O₂.



Εικόνα 24. Μηχανισμός αλληλεπίδρασης αντιοξειδωτικής ουσίας με τη ρίζα του ABTS•+.

Πιο αναλυτικά, η δημιουργία της ρίζας πραγματοποιείται σε όγκο 1 mL στο οποίο περιέχονται 400μL H₂O, 1 mM ABTS (500 μL), 30 μM H₂O₂ (50 μL) και 6 μM περοξειδάση (50 μL). Αμέσως μετά την προσθήκη του ενζύμου τα δείγματα αναδεύονται και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι για 45 min (εμφάνιση πράσινου χρώματος). Μετά το πέρας της επώασης στα αντίστοιχα δείγματα προστέθηκαν 10 μl των εκχυλισμάτων σε διάφορες συγκεντρώσεις. Ακολούθησε ανάδευση και μέτρηση της απορρόφησης στα 730 nm. Στο μάρτυρα μετά τη δημιουργία της ρίζας δεν προστίθεται τίποτα. Σε κάθε πείραμα το εξεταζόμενο δείγμα μόνο του σε H₂O με 1 mM ABTS, 30 μM H₂O₂ αποτελούσε το τυφλό, ώστε να γίνει έλεγχος εάν οι ουσίες στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις, εμφάνιζαν απορρόφηση στα 730 nm. Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν και πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον δύο ανεξάρτητα πειράματα.

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

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

A₀: η οπτική απορρόφηση του θετικού μάρτυρα στα 730 nm, A_δ: 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 H₂O₂ 30% (w/v) αποκτήθηκε από την εταιρεία Merck (Darmstadt, Germany) και το θρεπτικό μέσο LB broth αποκτήθηκε από την Scharlau Chemie

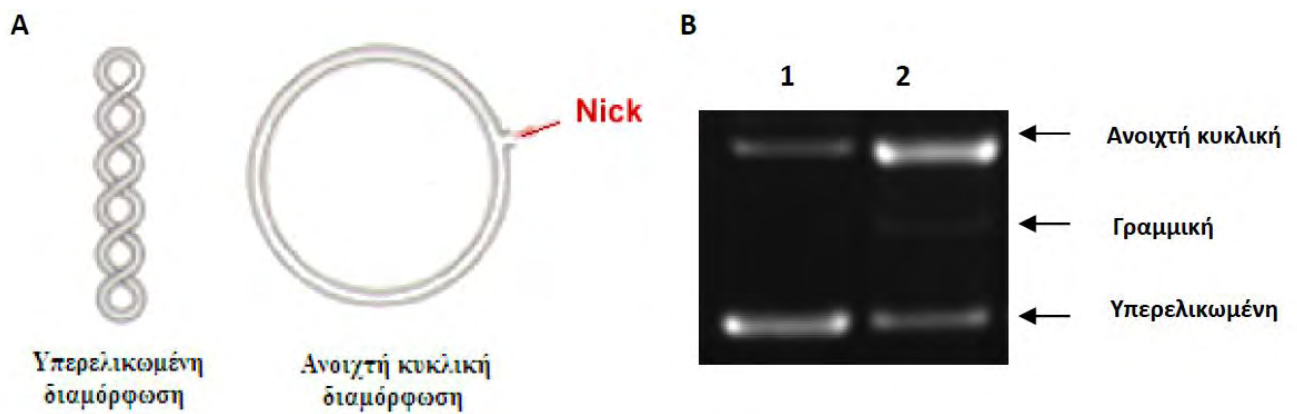
(Barcelona, Spain). Το πλασμιδιακό DNA Bluescript-SK+ (Fermentas, USA) είχε εισαχθεί προηγουμένως σε δεκτικά βακτηριακά κύτταρα *E. Coli* DH5A.

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 συμπακνωμένη του μορφή.
2. Η ανοιχτή κυκλική (Open circular, relaxed conformation), στην οποία μεταβαίνει όταν προκαλούνται σε αυτό μονόκλινα σπασίματα. Οι υπερελικώσεις δεν υπάρχουν και αυτό συμβαίνει είτε από ενζυμικούς είτε από άλλους παράγοντες (πχ. ελεύθερες ρίζες) που έχουν την ικανότητα να προκαλούν μονόκλινα σπασίματα στο DNA.
3. Η γραμμική διαμόρφωση (Linear conformation) στην οποία μεταβαίνει όταν φέρει δίκλινα σπασίματα.

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

Η συνολική καλλιέργεια χωρίζεται σε τέσσερις επιμέρους καλλιέργειες των 50 mL. Οι καλλιέργειες φυγοκεντρούνται για 20 min στα 2057 g στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και στο ίζημα των βακτηρίων προστίθενται 4 mL διαλύματος 1 (50 mM γλυκόζη, 25 mM Tris-Cl pH=8, 10 mM EDTA, pH 8) και κατόπιν ακολουθεί επαναδιάλυση του ιζήματος. Τα δείγματα παραμένουν για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου στα οποία στην συνέχεια προστίθενται 8 mL διαλύματος 2 (0,2 N NaOH, 1% SDS) και αναδεύονται πολύ απαλά 4-5 φορές. Επειδή το διάλυμα είναι πολύ αλκαλικό, το πλασμιδιακό DNA μεταβαίνει από την υπερελικωμένη διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση, γι' αυτό αμέσως μόλις διαυγάσει το διάλυμα προστίθεται 6 mL διαλύματος 3 ((100 mL) 5 M οξικό κάλιο

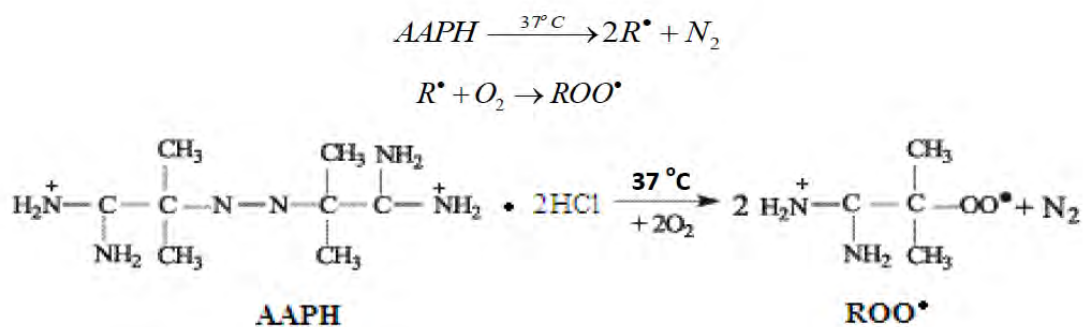
C₂H₃O₂K, 11,5 mL οξικού οξέος). Τα δείγματα αναδεύονται και παραμένουν για 7-8 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 20 min στα 3214 g στους 4°C και στην συνέχεια το υπερκείμενο συλλέγεται και μεταφέρεται σε καινούριο σωλήνα με ταυτόχρονη μέτρηση του όγκου του και η φυγοκέντρηση επαναλαμβάνεται. 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 φυγοκεντρώνται 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 (1OD₂₆₀→50 µg/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 H₂O 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• πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA

Η μέθοδος εκτίμησης της προστατευτικής δράσης απέναντι στη δράση των ριζών ROO• βασίζεται στη μέθοδο των Chang et al. (2001). Με βάση τη μέθοδο, οι

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



Εικόνα 26. Χημική δομή της ένωσης AAPH και οι αντιδράσεις της θερμικής της διάσπασης και του σχηματισμού των ριζών ROO•.

Πιο αναλυτικά η αντίδραση πραγματοποιείται σε όγκο 10 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 Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄). Όλα τα δείγματα αναδεύονται και επωάζονται για 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 70V. Στη συνέχεια το πήκτωμα χρωματίζεται σε διάλυμα 0,5 μg/mL βρωμιούχου αιθιδίου για 30 min και αποχρωματίζεται σε απιονισμένο H₂O για 30 min. Ακολουθεί φωτογράφιση του πηκτώματος και ανάλυση της φωτογραφίας. Η δράση του κάθε δείγματος δοκιμάζόταν εις τριπλούν στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις. Η αντιοξειδωτική/προστατευτική δράση των εξεταζόμενων δειγμάτων εκφράζεται ως το ποσοστό αναστολής της μετάβασης της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση παρουσία των ριζών ROO•.

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

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

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

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

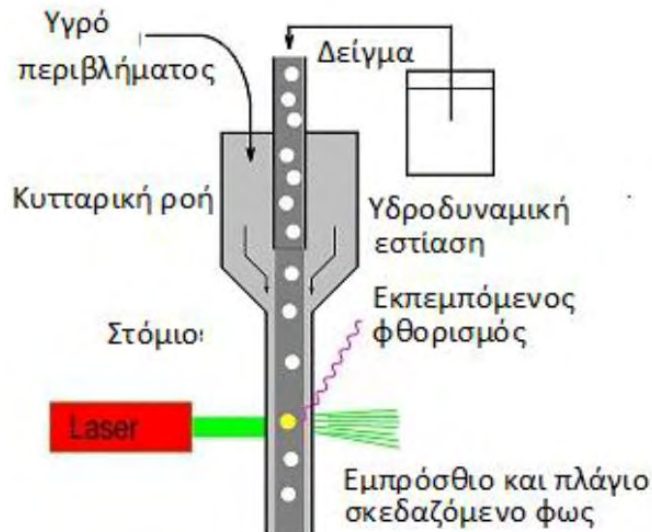
S₀: Ποσοστό της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδίου του αρνητικού μάρτυρα (πλασμιδιακό DNA μόνο του).

Για την σύγκριση της αντιοξειδωτικής/προστατευτικής δράσης των δειγμάτων υπολογίστηκε η τιμή IC₅₀. Η τιμή IC₅₀ αποτελεί τη συγκέντρωση του δείγματος που

οδηγεί σε 50% αναστολή της δράσης των ριζών ROO• (αλλαγή της διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA) σε σύγκριση με τον θετικό μάρτυρα. Όσο μικρότερη είναι η τιμή IC50 τόσο πιο ισχυρή είναι η δράση του δείγματος απέναντι στις ρίζες ROO•.

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



Εικόνα 27. Υδροδυναμική εστίαση του δείγματος μέσα από το θάλαμο ροής.

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



Εικόνα 28. Το μηχάνημα της κυτταρομετρίας ροής από την Becton-Dickinson.

Σε κάθε πείραμα παρασκευάζονται ένα διάλυμα της χρωστικής mercury orange (400 μM) διαλυμένης σε ακετόνη και ένα διάλυμα της χρωστικής DCF-DA (100 μM) διαλυμένης σε μεθανόλη. Το κυτταρικό αιώρημα επαναδιαλύεται σε 150 μl PBS και

επιδείκνεται παρουσία της χρωστικής mercury orange (15 μ l) (40 μ M) ή της χρωστικής DCF-DA (15 μ l) (10 μ 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 μ l PBS και φυγοκέντρηση στα 300 g, στους 4°C για 10 min. Το υπερκείμενο απομακρύνεται, προστίθενται 250 μ 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.

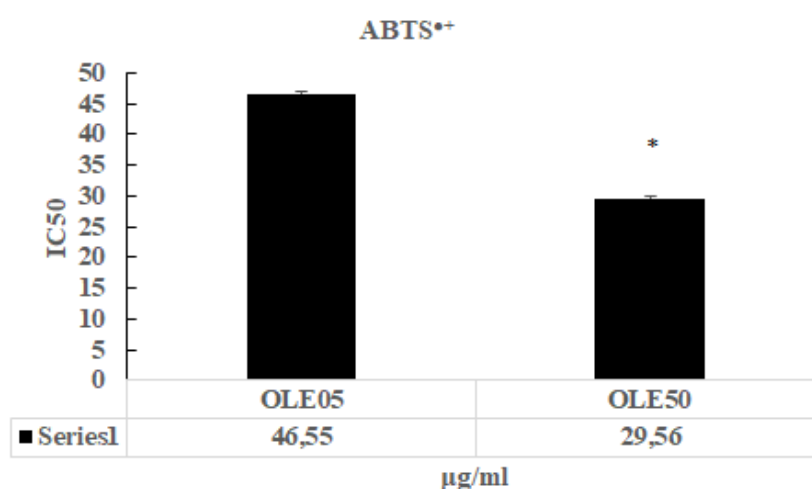
3.8 Στατιστική ανάλυση

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^{•+}

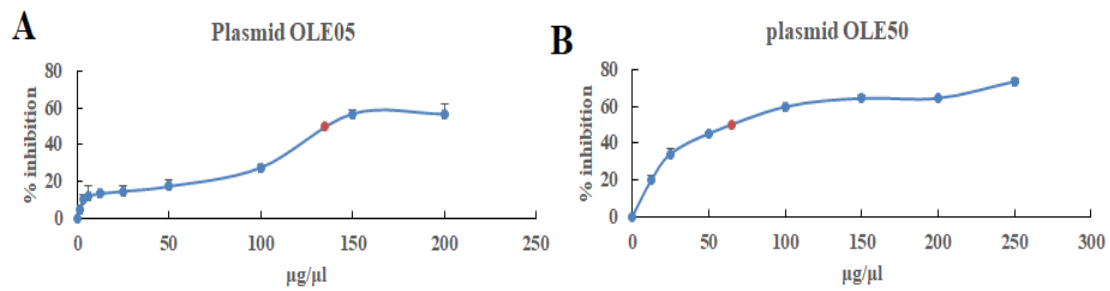
Με τη μέθοδο ABTS^{•+}, μετρήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα των δύο πολυφαινολικών εκχυλισμάτων ελαιόλαδου, με κωδική ονομασία OLE05 και OLE50. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως IC₅₀, δηλαδή τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος που απαιτείται για την εξουδετέρωση της ρίζας στο 50%. Όσο μικρότερη η τιμή του IC₅₀, τόσο πιο ισχυρή η αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος. Το OLE05 είχε IC₅₀ στα 46,55 µg/ml, ενώ το OLE50 είχε IC₅₀ στα 29,56 µg/ml. Συνεπώς, το OLE 50 είναι πιο ισχυρό από το OLE05.



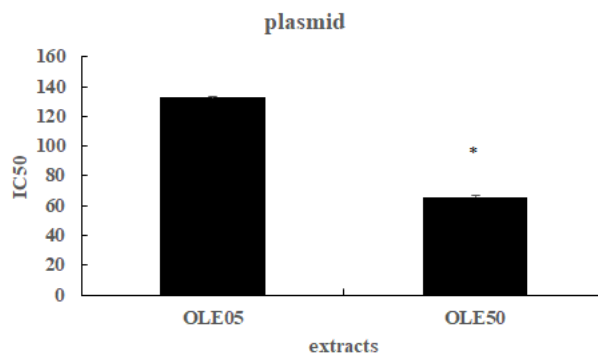
Διάγραμμα 1. Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω δέσμευσης της ρίζας ABTS^{•+}. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως \pm SEM. * Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών IC₅₀ των δύο εκχυλισμάτων ($p < 0,05$) ($n=3$).

4.2 Επαγόμενη από ρίζες περοξυλίου (ROO[•]) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA.

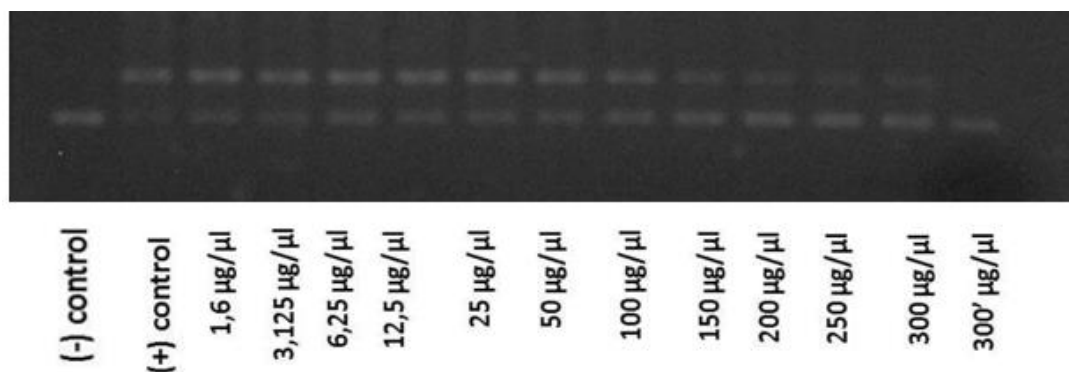
Με την μέθοδο των επαγόμενων θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA, προσδιορίσαμε την ικανότητα των δύο πολυφαινολικών εκχυλισμάτων ελαιόλαδων (OLE05, OLE50), να προστατεύουν το πλασμιδιακό DNA, από τα θραύσματα που προκαλούνται από τη ρίζα του ROO[•]. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως το OLE50 είχε στατιστικά σημαντικά ($p < 0,05$), μεγαλύτερη ικανότητα να προστατεύει τη θραύση του DNA, σε σχέση με το OLE05, καθώς εμφάνισε IC₅₀ στα 66 µg/ml σε αντίθεση με το OLE05, που εμφάνισε IC₅₀ στα 133 µg/ml.



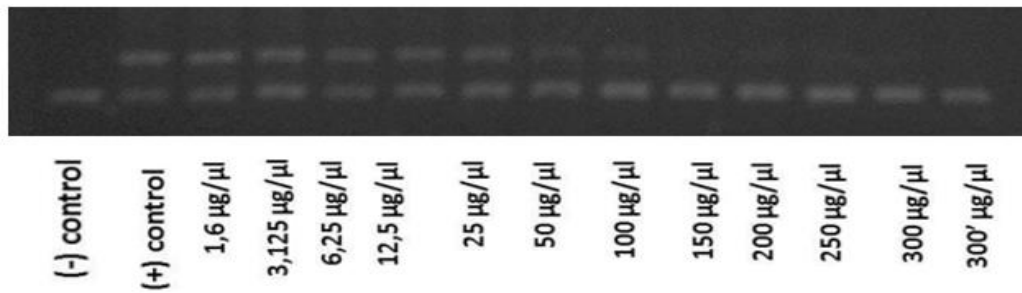
Εικόνα 29. Επαγόμενη από ρίζες περοξυλίου (ROO●) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA. Α) OLE05, IC50: 133 µg/µl, Β) OLE50, IC50: 66 µg/µl. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως επί τις εκατό αναστολή σε σύγκριση με το control και παρουσιάζονται ως mean ± SEM, (n=3).



Εικόνα 30. Επαγόμενη από ρίζες περοξυλίου (ROO●) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως IC50 και παρουσιάζονται ως mean ± SEM, (n=3). * $p < 0,05$ στατιστική σημαντικότητα μεταξύ των δύο εκχυλισμάτων.



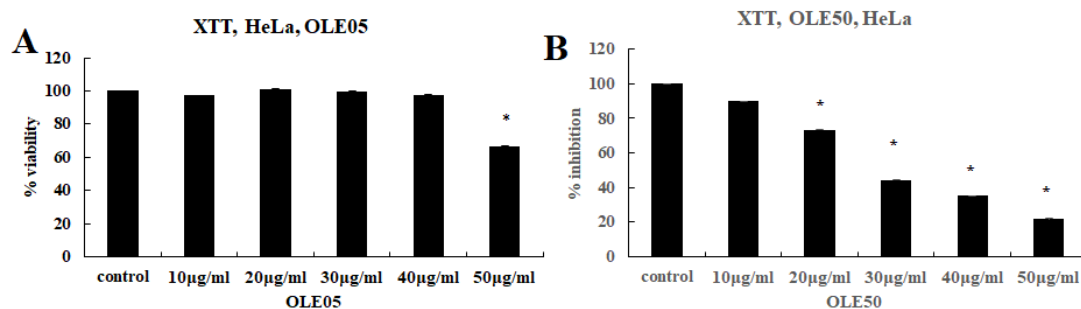
Εικόνα 31. Πηκτή ηλεκτροφόρησης για το OLE05. Παρατηρούμε ότι όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του πολυφαινολικού εκχυλίσματος, τόσο αυξάνεται και η υπερελικωμένη διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA, γεγονός που υποδεικνύει την προστατευτική δράση του OLE05, έναντι των μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA.



Εικόνα 32. Πηκτή ηλεκτροφόρησης για το OLE50. Παρατηρούμε ότι όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του πολυφαινολικού εκχυλίσματος, τόσο αυξάνεται και η υπερελικοωμένη διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA, γεγονός που υποδεικνύει την προστατευτική δράση του OLE50, έναντι των μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA.

4.3 Προσδιορισμός κυτταροτοξικής δράσης ουσιών με τη μέθοδο XTT.

Με την μέθοδο XTT έγινε προσδιορισμός των κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων. Οι μη κυτταροτοξικές χρησιμοποιήθηκαν έτσι ώστε να γίνει εκτίμηση της επίδρασης τους στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό του κυττάρου. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα τραχήλου της μήτρας (HeLa), όπου και χορηγήθηκε εύρος συγκεντρώσεων από 10,0-50,0 µg/ml. Ωστόσο συγκεντρώσεις πάνω από 50,0 µg/ml ήταν κυτταροτοξικές για το OLE05, ενώ συγκεντρώσεις πάνω από 20 µg/ml για το OLE50. Συνεπώς, για τον έλεγχο τις αντιοξειδωτικής δράσης των δύο εκχυλισμάτων, χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις από 10.0 – 25.0µg/ml OLE05 και 2.5-15.0 µg/ml OLE50.

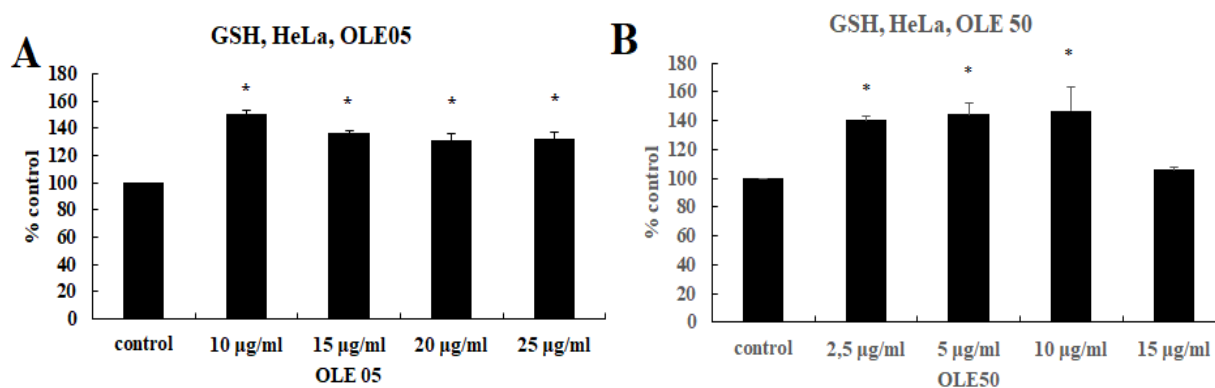


Διάγραμμα 2: Προσδιορισμός κυτταροτοξικότητας των εκχυλισμάτων OLE05, OLE50, στην κυτταρική σειρά HeLa, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης των εκχυλισμάτων, με τη μέθοδο XTT. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control και παρουσιάζονται ως mean ± SEM, (n=6). *p<0,05 στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με το control.

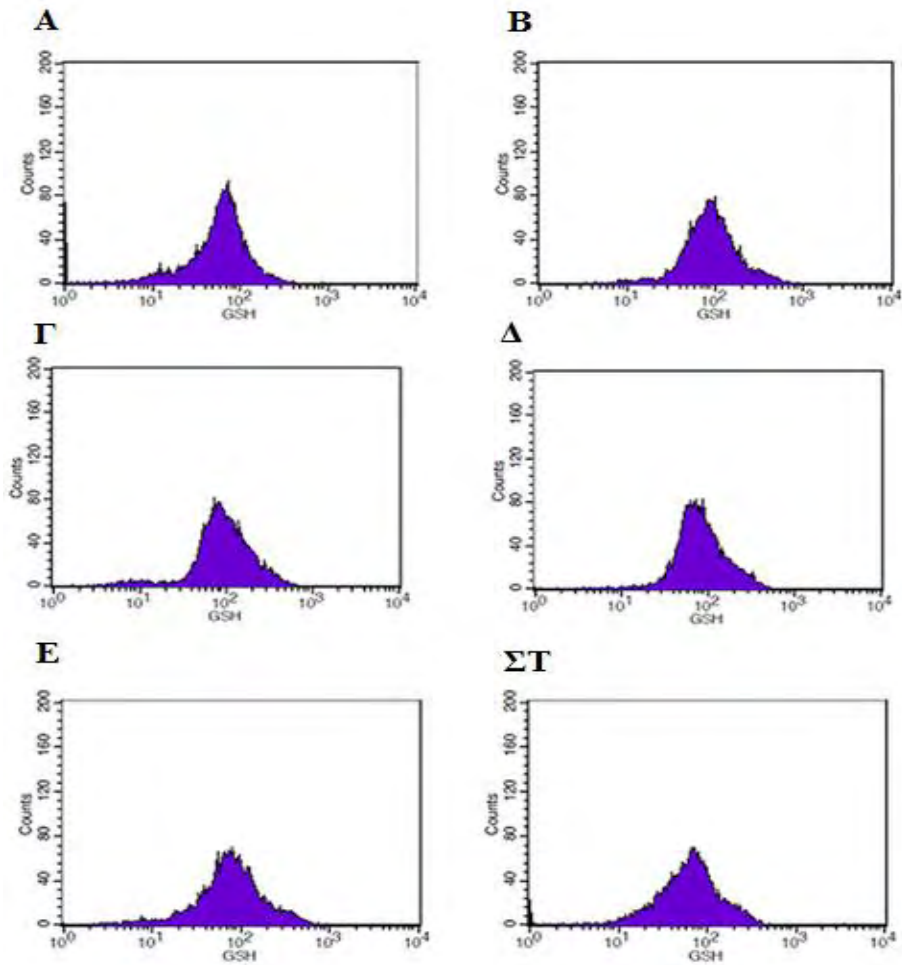
4.4 Προσδιορισμός της οξειδοαναγωγικής κατάστασης με κυτταρομετρία ροής

4.4.1. Επίπεδα γλουταθειόνης (GSH).

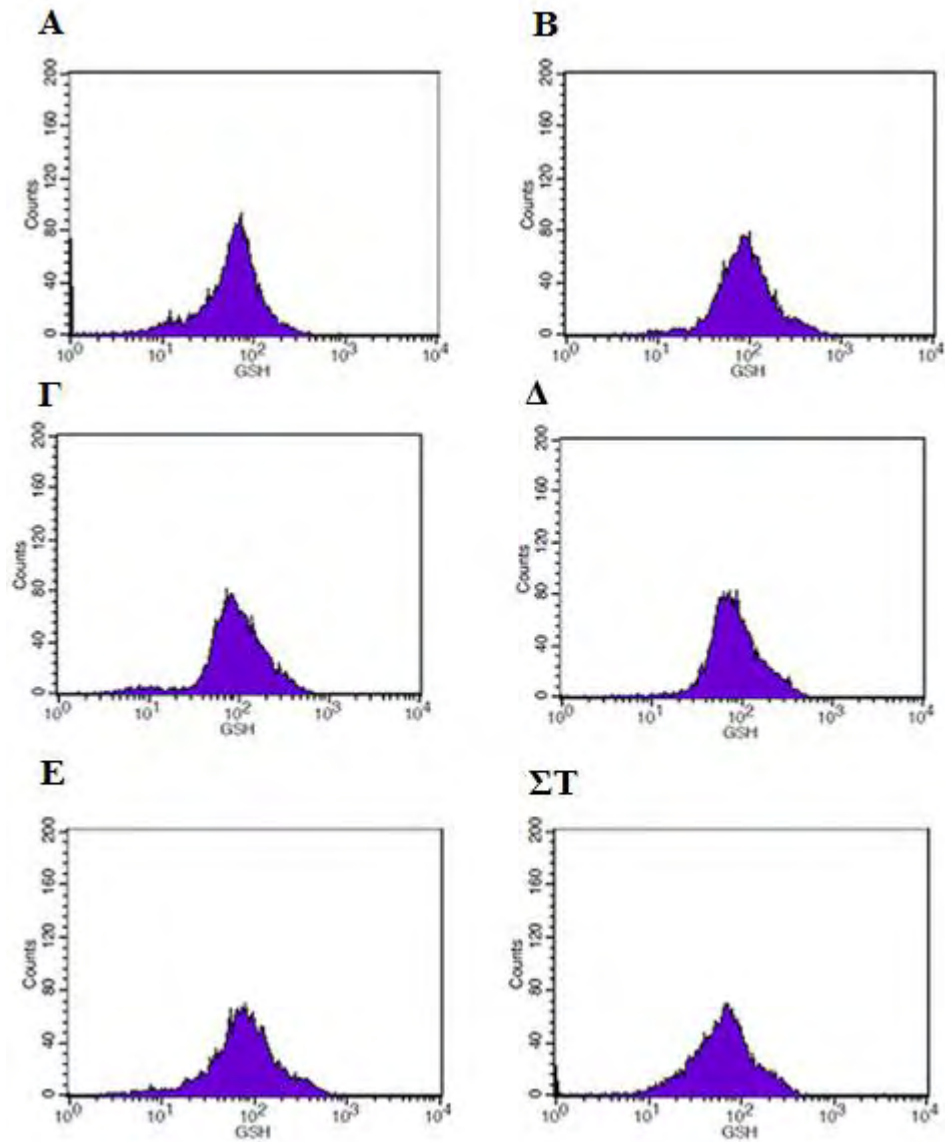
Τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής έδειξαν πως το εκχύλισμα OLE05 αύξησε στατιστικώς σημαντικά ($p<0,05$), τα επίπεδα της GSH κατά 51%, 36%, 31% και 33% στις συγκεντρώσεις 10.0, 15.0, 20.0, 25.0 $\mu\text{g/ml}$ OLE05, αντίστοιχα, σε σύγκριση με το control. Επιπλέον, το εκχύλισμα OLE50, αύξησε στατιστικώς σημαντικά ($p<0,05$), τα επίπεδα της GSH κατά 40%, 44% και 47% στις συγκέντρωσες 2.5, 5.0 και 10.0 $\mu\text{g/ml}$ OLE50 αντίστοιχα, σε σύγκριση με το control.



Διάγραμμα 3 Επίδραση εκχυλισμάτων ελαιόλαδου OLE05, OLE50, 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.



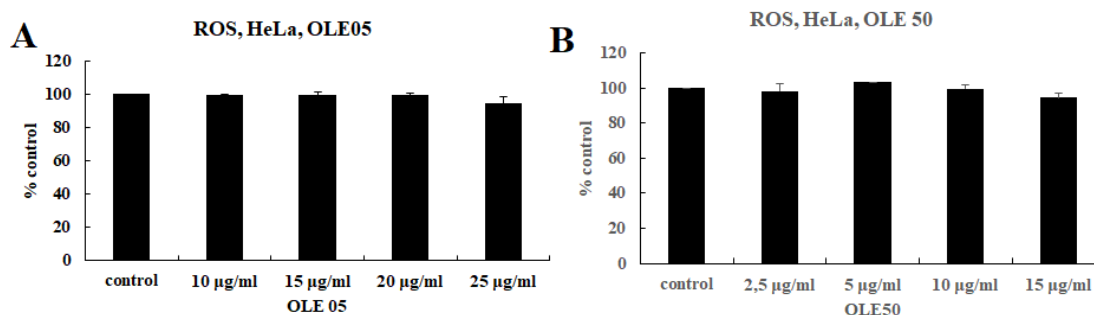
Εικόνα 33. Επίδραση OLE05 στα επίπεδα GSH στην κυτταρική σειρά HeLa. Τα ιστογράμματα παρουσιάζουν τον φθορισμό που εκπέμπεται από 10,000 κύτταρα κατά την μέτρηση της GSH, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Ο FL2 αντιπροσωπεύει τον φθορισμό που ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας 488 και 580 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και ως μήκος κύματος εκπομπής. Α και Β) Επίπεδα GSH στα controls (χωρίς OLE05). Γ) Επίπεδα GSH στα 10.0 $\mu\text{g/ml}$ OLE05. Δ) Επίπεδα GSH στα 15.0 $\mu\text{g/ml}$ OLE05. Ε) Επίπεδα GSH στα 20.0 $\mu\text{g/ml}$ OLE05. ΣΤ) Επίπεδα GSH στα 25.0 $\mu\text{g/ml}$ OLE05.



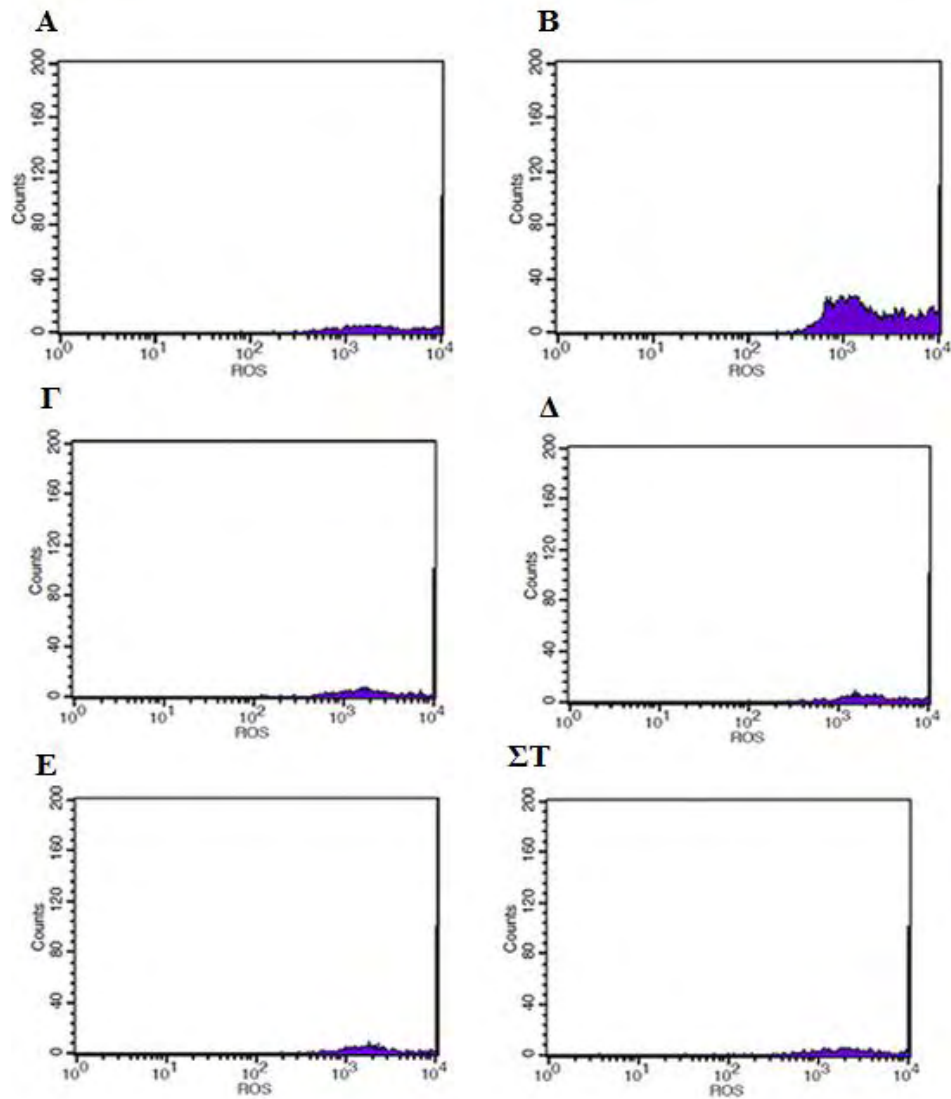
Εικόνα 34. Επίδραση OLE50 στα επίπεδα GSH στην κυτταρική σειρά HeLa. Τα ιστογράμματα παρουσιάζουν τον φθορισμό που εκπέμπεται από 10,000 κύτταρα κατά την μέτρηση της GSH, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Ο FL2 αντιπροσωπεύει τον φθορισμό που ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας 488 και 580 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και ως μήκος κύματος εκπομπής. Α και Β) Επίπεδα GSH στα controls (χωρίς OLE50). Γ) Επίπεδα GSH στα 2.5 $\mu\text{g/ml}$ OLE50. Δ) Επίπεδα GSH στα 5.0 $\mu\text{g/ml}$ OLE50. Ε) Επίπεδα GSH στα 10.0 $\mu\text{g/ml}$ OLE50. ΣΤ) Επίπεδα GSH στα 15.0 $\mu\text{g/ml}$ OLE50.

4.4.2. Επίπεδα δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS).

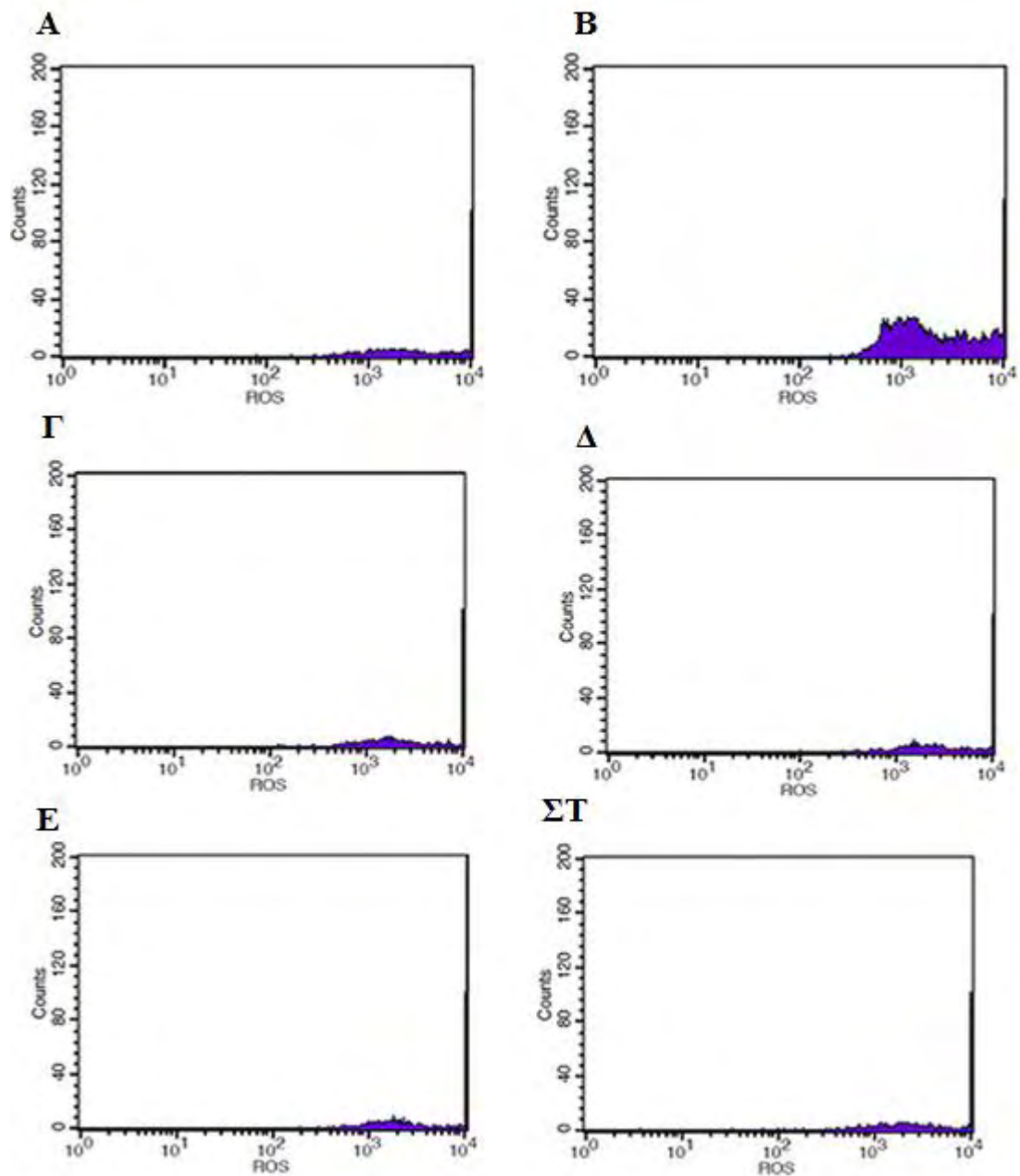
Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στα επίπεδα ROS, σε σύγκριση με το control, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης των εκχυλισμάτων OLE05 και OLE50.



Διάγραμμα 4 Επίδραση OLE05 και OLE50 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 \pm SEM, (n=3). *p<0,05 στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με το control.



Εικόνα 35. Επίδραση OLE05 στα επίπεδα ROS στην κυτταρική σειρά HeLa. Τα ιστογράμματα παρουσιάζουν τον φθορισμό που εκπέμπεται από 10,000 κύτταρα κατά την μέτρηση της DCF, 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 OLE05). Γ) Επίπεδα ROS στα 10 µg/ml OLE05. Δ) Επίπεδα ROS στα 15 µg/ml OLE05. Ε) Επίπεδα ROS στα 20 µg/ml OLE05. ΣΤ) Επίπεδα ROS στα 25 µg/ml OLE05.



Εικόνα 36. Επίδραση OLE50 στα επίπεδα ROS στην κυτταρική σειρά HeLa. Τα ιστογράμματα παρουσιάζουν τον φθορισμό που εκπέμπεται από 10,000 κύτταρα κατά την μέτρηση της DCF, 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 OLE50). Γ) Επίπεδα ROS στα 2.5 $\mu\text{g/ml}$ OLE50. Δ) Επίπεδα ROS στα 5.0 $\mu\text{g/ml}$ OLE50. Ε) Επίπεδα ROS στα 10.0 $\mu\text{g/ml}$ OLE50. ΣΤ) Επίπεδα ROS στα 15.0 $\mu\text{g/ml}$ OLE50.

5. Συζήτηση

Αντικείμενο της συγκεκριμένης μελέτης αποτέλεσαν η αντιοξειδωτική και η αντιμεταλλαξιγόνος δράση δυο πολυφαινολικών εκχυλισμάτων παρθένου ελαιόλαδου, κορωνέικης ποικιλίας. Τα δυο εκχυλίσματα διέφεραν στην περιεκτικότητά τους σε δύο από τις σημαντικότερες φαινολικές ενώσεις του ελαιόλαδου, την τυροσόλη και την υδροξυτυροσόλη. Το OLE05 περιείχε πολύ μεγαλύτερη ποσότητα τυροσόλης απ' ότι υδροξυτυροσόλης, ενώ το OLE50 περιείχε σχεδόν ίσες ποσότητες τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης, ενώ ταυτόχρονα τα επίπεδα υδροξυτυροσόλης του ξεπερνούσαν αυτά του OLE05.

Τα δυο αυτά εκχυλίσματα υποβλήθηκαν σε *in vitro* τεχνικές για τον έλεγχο της αντιοξειδωτικής και αντιμεταλλαξιγόνου δράσης τους, ενώ η δράση των δύο εκχυλισμάτων αξιολογήθηκε και σε κυτταρικό επίπεδο και πιο συγκεκριμένα σε καρκινικά κύτταρα τραχήλου της μήτρας (HeLa). Η αντιοξειδωτική ικανότητα των δυο εκχυλισμάτων εξετάστηκε μέσω της μεθόδου ABTS•, ενώ εξετάστηκε και η προστατευτική τους δράση έναντι μονόκλωνων θραυσμάτων DNA από ρίζες ROO•. Επίσης πραγματοποιήθηκαν και *in vivo* πειράματα σε καρκινικά κύτταρα τραχήλου της μήτρας (HeLa) τα οποία επιλέχθηκαν λόγω της πληθώρας μελετών, που σχετίζονται με την αντιπολλαπλασιαστική, προαποπτωτική και DNA προστατευτική δράση των πολυφαινολών ελαιόλαδου έναντι του καρκίνου (Pampaloni et al., 2014; Cárdeno et al., 2013; Warleta et al., 2011). Πριν από τη μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων σε επίπεδο *in vivo*, απαραίτητη ήταν η εκτίμηση της κυτταροτοξικότητάς τους μέσω της μεθόδου XTT, ώστε να χρησιμοποιηθούν μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις. Τέλος πραγματοποιήθηκε κυτταρομετρία ροής για τον έλεγχο των επιπέδων γλουταθειόνης και των δραστικών μορφών οξυγόνου.

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τη μέθοδο ABTS^{•+} έδειξε ότι το OLE05 είχε IC₅₀ στα 46,55 μg/ml, ενώ το OLE50 είχε IC₅₀ στα 29,56 μg/ml, γεγονός που υποδεικνύει ότι το OLE50 είναι πιο ισχυρό από το OLE05. Έρευνες έχουν δείξει ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα των φαινολικών ενώσεων αυξάνεται, με την αύξηση των ομάδων υδροξυλίου που διαθέτουν (Fukumoto & Mazza, 2000). Για το λόγο αυτό η υδροξυτυροσόλη εμφανίζει υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα συγκριτικά με την τυροσόλη (Εικόνα 11). Μπορεί λοιπόν να υποτεθεί ότι αυτή η μεγάλη διαφορά στις τιμές IC₅₀ των δυο εκχυλισμάτων οφείλεται

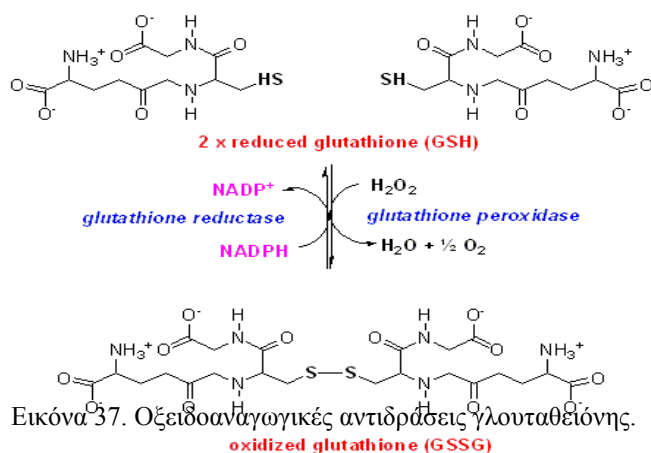
στο γεγονός ότι το εκχύλισμα OLE50 διαθέτει παραπάνω υδροξυτυροσόλη συγκριτικά με το OLE05 (OLE05: 0,86 mg HT, OLE50: 1,08 mg HT).

Τα αποτελέσματα της μεθόδου των επαγόμενων θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA έδειξαν πως το OLE50 είχε στατιστικά σημαντικά ($p < 0,05$), μεγαλύτερη ικανότητα να προστατεύει τη θραύση του DNA, σε σχέση με το OLE05, καθώς εμφάνισε IC₅₀ στα 66 μg/μl σε αντίθεση με το OLE05, που εμφάνισε IC₅₀ στα 133 μg/μl. Όπως βλέπουμε και στην πηκτή ηλεκτροφόρησης του OLE50 (Εικόνα 32) η αναλογία υπερελικωμένη διαμόρφωση: ανοιχτή κυκλική είναι πολύ μεγαλύτερη, με την αύξηση των συγκεντρώσεων του πολυφαινολικού εκχυλίσματος, συγκριτικά με αυτή του OLE05 (Εικόνα 31). Φαίνεται λοιπόν ότι τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μεθόδου συμφωνούν με αυτά της μεθόδου ABTS^{•+}. Κατά συνέπεια, θα μπορούσε να ειπωθεί ξανά ότι το OLE50 λόγω της μεγαλύτερης περιεκτικότητάς του σε υδροξυτυροσόλη, εμφανίζει και σημαντικά ισχυρότερη προστατευτική δράση απέναντι στη θραύση του DNA. Παρ' όλ' αυτά αξίζει να σημειωθεί ότι σύμφωνα με τα διαγράμματα της Εικόνας 29, και τα δύο εκχυλίσματα έδρασαν αποτελεσματικά στην εξουδετέρωση των ριζών υπεροξειδίου και στην προστασία του DNA από οξειδωση. Τα παραπάνω αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία με έρευνα που πραγματοποιήθηκε το 2011 σε ανθρώπινα μαστικά επιθηλιακά κύτταρα (MCF10A), σύμφωνα με την οποία η υδροξυτυροσόλη εμφανίζει μεγαλύτερη προστατευτική δράση στην οξειδωση του DNA, συγκριτικά με την τυροσόλη (Warleta et al., 2011). Επίσης μελέτη σε ανθρώπινα μονοπύρρηνα κύτταρα του αίματος (PBMC) και σε προμυελοκυτταρικά λευχαιμικά κύτταρα (HL60) απέδειξε ότι η υδροξυτυροσόλη εμφάνισε σημαντικά υψηλότερη προστατευτική ικανότητα απέναντι στην προκαλούμενη από υπεροξείδιο του υδρογόνου καταστροφή του DNA συγκριτικά με την τυροσόλη (Fabiani et al., 2008). Τέλος, η προστατευτική ικανότητα της υδροξυτυροσόλης απέναντι στο DNA, έχει επιβεβαιωθεί από ακόμα μια έρευνα σε ανθρώπινα μονοπύρρηνα κύτταρα του αίματος, όπου η υδροξυτυροσόλη φάνηκε να προστατεύει σε μεγάλο βαθμό το DNA από την τοξική ένωση TCDD (2,3,7,8-Τετραχλωροδιβενζο-p-διοξίνη) (Pavarasi et al., 2011).

Με τη μέθοδο XTT, έγινε προσδιορισμός των κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων, ώστε να χρησιμοποιηθούν οι κατάλληλες μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις για την εκτίμηση της επίδρασης τους στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό του κυττάρου, μέσω της κυτταρομετρίας ροής. Βρέθηκε ότι το OLE50 εμφάνισε κυτταροτοξικότητα σε μικρότερη συγκέντρωση, συγκριτικά με το OLE05 (OLE05: κυτταροτοξικό σε $c > 50,0$ μg/ml, OLE50: κυτταροτοξικό σε $c > 20$ μg/ml). Πρόσφατη

έρευνα μελέτησε την επίδραση της υδροξυτυροσόλης και της τυροσόλης σε παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα, με σκοπό τη διερεύνηση των επιπτώσεων τους στη βιωσιμότητα των συγκεκριμένων κυττάρων (Goldsmith et al., 2018). Βρέθηκε ότι η χορήγηση υδροξυτυροσόλης στα κύτταρα οδήγησε στην απόπτωση των κυττάρων μέσω μηχανισμών που θα αναφερθούν στη συνέχεια, ενώ η τυροσόλη δεν εμφάνισε καμία επίδραση στη βιωσιμότητα τους (Goldsmith et al., 2018). Οι μηχανισμοί με τους οποίους η υδροξυτυροσόλη οδήγησε στην απόπτωση των κυττάρων είναι οι εξής: 1) αλλαγές στον κυτταρικό κύκλο, 2) αύξηση της έκφρασης προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών, 3) ενεργοποίηση κασπασών (Goldsmith et al., 2018). Επίσης σύμφωνα με τη συγκεκριμένη έρευνα η υδροξυτυροσόλη παρουσίασε κυτταροτοξική δράση μόνο στα καρκινικά κύτταρα και όχι στα υγιή, πιθανότατα λόγω του αυξημένου οξειδωτικού περιβάλλοντος των καρκινικών κυττάρων (επιλεκτική δράση της υδροξυτυροσόλης λόγω της αυξημένης ευαισθησίας των καρκινικών κυττάρων στις ROS) (Goldsmith et al., 2018). Η παραπάνω μελέτη λοιπόν θα μπορούσε να δικαιολογήσει την αυξημένη κυτταροτοξικότητα που εμφάνισε το εκχύλισμα που υπερτερεί σε υδροξυτυροσόλη (OLE50), κατά τη μέθοδο του XTT. Για τον έλεγχο τις αντιοξειδωτικής δράσης των δύο εκχυλισμάτων, χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις από 10.0–25.0μg/ml OLE05 και 2.5–15.0 μg/ml OLE50.

Στη συνέχεια, έπειτα από 24 ώρες επώασης των καρκινικών κυττάρων τραχήλου της μήτρας με τα πολυφαινολικά εκχυλίσματα, μετρήθηκαν τα επίπεδα γλουταθειόνης και ROS. Η γλουταθειόνη αποτελεί ένα πολύ σημαντικό αντιοξειδωτικό στα κύτταρα, που διαδραματίζει μια πληθώρα κρίσιμων ρόλων στον έλεγχο των διαδικασιών σηματοδότησης, αποτοξίνωσης ορισμένων αντιβιοτικών και βαρέων μετάλλων, καθώς και άλλων λειτουργιών (Zitka et al., 2012). Οι σουλφυδρυλικές ομάδες της δρουν σαν αναγωγικοί παράγοντες, καθώς μπορούν να δανείσουν ένα H^+ ή e^- σε άλλα μόρια, όπως στις



Εικόνα 37. Οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις γλουταθειόνης.

δραστικές μορφές οξυγόνου και να τις εξουδετερώσουν (Deponte, 2013). Δανείζοντας ένα ηλεκτρόνιο, η γλουταθειόνη γίνεται η ίδια ρίζα και αντιδρά με μια άλλη ρίζα γλουταθειόνης σχηματίζοντας δισουλφίδιο γλουταθειόνης (GSSG) (Εικόνα

39) (Deronte, 2013). Η οξειδωμένη πλέον γλουταθειόνη μπορεί να αναχθεί ξανά από την αναγωγή της γλουταθειόνης, παρουσία του NADPH (δότης ηλεκτρονίων) (Εικόνα 39) (Deronte, 2013). Η αναλογία ανηγμένης και οξειδωμένης γλουταθειόνης αποτελεί δείκτη οξειδωτικού στρες στο κύτταρο (Zitka et al., 2012). Σε ένα κύτταρο, υπό συνθήκες ηρεμίας, η αναλογία GSH:GSSG ξεπερνά την τιμή 100:1, ενώ υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες, η αναλογία αυτή μειώνεται σε τιμές από 10:1 μέχρι 1:1 (Zitka et al., 2012).

Τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής έδειξαν πως το εκχύλισμα OLE05 αύξησε στατιστικώς σημαντικά ($p < 0,05$), τα επίπεδα της GSH κατά 51%, 36%, 31% και 33% στις συγκεντρώσεις 10.0, 15.0, 20.0, 25.0 $\mu\text{g/ml}$ OLE05, αντίστοιχα, σε σύγκριση με το control. Επιπλέον, το εκχύλισμα OLE50, αύξησε στατιστικώς σημαντικά ($p < 0,05$), τα επίπεδα της GSH κατά 40%, 44% και 47% στις συγκεντρώσεις 2.5, 5.0 και 10.0 $\mu\text{g/ml}$ OLE50 αντίστοιχα, σε σύγκριση με το control. Παρατηρούμε λοιπόν ότι και τα δύο εκχυλίσματα οδήγησαν σε σημαντική αύξηση των επιπέδων γλουταθειόνης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των παραπάνω πειραμάτων, αλλά και σημαντικών ερευνών που θα αναφερθούν παρακάτω, θα αναμέναμε το OLE50 να προκαλέσει σημαντικά μεγαλύτερη αύξηση της GSH, συγκριτικά με το OLE05. Η υδροξυτυροσόλη έχει βρεθεί να προκαλεί αύξηση της σύνθεσης της GSH σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα της χρωστικής του αμφιβληστροειδούς, μέσω ενεργοποίησης του πυρηνικού παράγοντα Nrf2, ο οποίος αποτελεί έναν μεταγραφικό παράγοντα και κρίσιμο ρυθμιστή του αντιοξειδωτικού συστήματος (Zou et al., 2012). Ο Nrf2 επάγει την έκφραση της λιγάσης $\gamma\text{-L-γλουταμυλ} - \text{L-κυστεΐνης}$ (GCL), η οποία έχει την ικανότητα να ρυθμίζει τη σύνθεση της GSH (Kobayashi & Yamamoto, 2006). Επίσης η υδροξυτυροσόλη έχει βρεθεί να ενεργοποιεί το μονοπάτι Nkrp62/SQSTM1 το οποίο είναι απαραίτητο για την επαγόμενη από τον Nrf2 σύνθεση της GSH (Zou et al., 2012). Επιπρόσθετα με τα αποτελέσματα των παραπάνω ερευνών λοιπόν θα περιμέναμε το OLE50 λόγω της περίσσειας υδροξυτυροσόλης να προκαλεί σημαντικά μεγαλύτερη αύξηση της GSH στα κύτταρα. Αντ' αυτού όμως, παρατηρήθηκε ότι και τα δύο εκχυλίσματα σε συγκέντρωση 10 $\mu\text{g/ml}$ προκάλεσαν παρόμοια αύξηση στα επίπεδα της GSH. Αυτό το γεγονός ίσως να οφείλεται στο ότι η επίδραση εξωγενών εκχυλισμάτων και ενώσεων στα κύτταρα έχει φανεί να διαφέρει ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο (KOUKA et al., 2017) αλλά και στο γεγονός ότι λόγω του σύνθετου περιεχομένου του πολυφαινολικού εκχυλίσματος είναι πολύ πιθανό η δράση κάθε ένωσης να επηρεάζεται και να τροποποιείται από τις υπόλοιπες ενώσεις του εκχυλίσματος.

Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, πειράματα σε αρουραίους έδειξαν ότι η τυροσόλη αποτελεί πρόδρομο μόριο της υδροξυτυροσόλης (Rodríguez-Morato et al., 2016), γεγονός το οποίο υποδηλώνει ότι η αρχική σύσταση των εκχυλισμάτων που χορηγούνται στα κύτταρα, δεν έχει καμία σχέση με την τελική, καθώς υπάρχει δυνατότητα μετατροπής ενώσεων σε άλλες ενώσεις. Επίσης, έρευνα που διεξήχθη το 2005 έδειξε ότι η τυροσόλη έχει την ικανότητα να συγκεντρώνεται ενδοκυτταρικά με το πέρασ του χρόνου, μέχρι να φτάσει υψηλές συγκεντρώσεις στις οποίες είναι ικανή να παρουσιάσει σημαντικά προστατευτικά και αντιοξειδωτικά αποτελέσματα (Di Benedetto et al., 2007). Σε αντίθεση με την τυροσόλη, τα χορηγούμενα επίπεδα υδροξυτυροσόλης στα κύτταρα μειώνονται πολύ γρήγορα (Di Benedetto et al., 2007). Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι οι δυο αυτές ενώσεις δρουν πολύ διαφορετικά σε επίπεδο κυττάρων. Τέλος, η μείωση που παρατηρείται στα επίπεδα της GSH στις μεγάλες συγκεντρώσεις του OLE05 μπορεί να οφείλεται είτε σε προοξειδωτικές ιδιότητες των πολυφαινολών, είτε στη γρήγορη μετατροπή της GSH σε GSSG, μετά την αντίδρασή της με ελεύθερες ρίζες.

Όσον αφορά τα επίπεδα των ROS, αυτά δεν παρουσίασαν καμία διαφορά συγκριτικά με το control. Αξίζει να σημειωθεί ότι δεν προστέθηκε κανένας εξωτερικός οξειδωτικός παράγοντας πριν από την προσθήκη των εκχυλισμάτων στα κύτταρα, και άρα τα επίπεδα ROS που μετρήθηκαν με την κυτταρομετρία ροής αντιστοιχούσαν στα φυσιολογικά υπάρχοντα επίπεδα ROS των κυττάρων. Προηγούμενες μελέτες, έχουν αποδείξει ότι αλλαγές στα επίπεδα του οξειδωτικού στρες ή στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου, δε συνοδεύονται πάντα από αλλαγές στα επίπεδα ROS (Kerasiotti et al., 2014; KOUKA et al., 2017).

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη, απέδειξαν ότι και τα δύο εκχυλίσματα εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση, καθώς και προστατευτική δράση έναντι των θραυσμάτων του DNA και έναντι της οξειδωτικής βλάβης, βελτιώνοντας τους δείκτες οξειδωτικού στρες. Στα in vitro πειράματα το εκχύλισμα που έδειξε να έχει την πιο ισχυρή δράση ήταν το OLE50. Όπως προαναφέρθηκε αυτό το γεγονός οφείλεται στη μεγαλύτερη περιεκτικότητα του OLE50 σε υδροξυτυροσόλη, η οποία διαθέτει μια επιπλέον υδροξυλομάδα συγκριτικά με την τυροσόλη. Αντίθετα στα in vivo πειράματα δεν παρατηρήθηκε ισχυρότερη δράση στο OLE50. Και τα δύο εκχυλίσματα σε συγκέντρωση 10μg/ml προκάλεσαν παρόμοια αύξηση στα επίπεδα της GSH. Αυτό το γεγονός οφείλεται πιθανότατα στο μεταβολισμό που υφίστανται οι δυο αυτές ενώσεις

στα κύτταρα, αλλά και στην αλληλεπίδραση τους με τις υπόλοιπες ουσίες του εκχυλίσματος σε επίπεδο κυττάρου (Rodríguez-Morató et al., 2016; Di Benedetto et al., 2007).

Μέσω της μελέτης αυτής έγινε μια πρώτη εκτίμηση για τη συσχέτιση της διαφορετικής σύστασης των ελαιόλαδων με τις αντιοξειδωτικές τους δράσεις. Τα αποτελέσματα αυτά θα μπορούσαν να αποτελέσουν μια γερή βάση για τη δημιουργία τροφίμων εμπλουτισμένων με τα ευεργετικά στοιχεία του ελαιόλαδου, αλλά και συμπληρωμάτων διατροφής και φαρμάκων. Ωστόσο χρειάζεται να γίνουν επιπλέον μελέτες για τον ακριβή μηχανισμό δράσης της υδροξυτυροσόλης και της τυροσόλης σε επίπεδο κυττάρου.

Βιβλιογραφία

- Angelis, A., Hamzaoui, M., Aligiannis, N., Nikou, T., Michailidis, D., Gerolimatos, P., ... 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. *Journal of Chromatography A*, 1491, 126–136.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.02.046>
- Bendini, A., Cerretani, L., Carrasco-Pancorbo, A., Gómez-Caravaca, A. M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., & Lercker, G. (2007). Phenolic molecules in virgin olive oils: A survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade. *Molecules*.
<https://doi.org/10.3390/12081679>
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *The World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9–19.
<https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>
- Blekas, G., Tsimidou, M., & Boskou, D. (2006). *Olive Oil Composition. Olive Oil* (Vol. 739568). <https://doi.org/10.1201/9781439832028.pt2>
- Bock, M. De, Derraik, J. G. B., Brennan, C. M., Biggs, J. B., Morgan, P. E., Hodgkinson, S. C., ... Cutfield, W. S. (2013). Olive (*Olea europaea* L .) Leaf Polyphenols Improve Insulin Sensitivity in Middle-Aged Overweight Men : A. *PLOS ONE*, 8(3).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057622>
- Cárdeno, A., Sánchez-Hidalgo, M., Cortes-Delgado, A., & Alarcón 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. *Nutrition and Cancer*.

<https://doi.org/10.1080/01635581.2013.806674>

Carlo Russo, Hanna Tuomisto, Claudio Pattara, George Michalopoulos, J. A. P. (2015). PEF screening report in the context of the EU Product Environmental Footprint Category Rules (PEFCR) Pilots - Feed for food producing animals, (July), 1–127.

<https://doi.org/10.13140/RG.2.1.1052.9361>

Carluccio, M. A., Siculella, L., Ancora, M. A., Massaro, M., Scoditti, E., Storelli, C., ... De Caterina, R. (2003). Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation:

Antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals.

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 23(4), 622–629.

<https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000062884.69432.A0>

Chen, X., Song, M., Zhang, B., & Zhang, Y. (2016). Reactive Oxygen Species Regulate T Cell Immune Response in the Tumor Microenvironment. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 11–16. <https://doi.org/10.1155/2016/1580967>

Cicerale, S., Conlan, X. A., Sinclair, A. J., & Keast, R. S. J. (2009). Chemistry and health of olive oil phenolics. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49(3), 218–236.

<https://doi.org/10.1080/10408390701856223>

Cinquanta, L., Esti, M., & Notte, E. La. (1997). Evolution of phenolic compounds in virgin olive oil during storage. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. <https://doi.org/10.1007/s11746-997-0054-8>

Covas, M.-I., de la Torre, K., Farré-Albaladejo, M., Kaikkonen, J., Fitó, M., López-Sabater, C., ... de la Torre, R. (2006). Postprandial LDL phenolic content and LDL oxidation are modulated by olive oil phenolic compounds in humans. *Free Radical Biology and Medicine*, 40(4), 608–616.

- <https://doi.org/http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.09.027>
- Covas, M.-I., Konstantinidou, V., & Fito, M. (2009). Olive oil and cardiovascular health. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 54(6), 477–482. <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e3181c5e7fd>
- Croft, K. D. (1998). The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 854, 435–442. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb09922.x>
- Crozier, A., Jaganath, I. B., & Clifford, M. N. (2007). Phenols, Polyphenols and Tannins: An Overview. *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*, (November), 1–24. <https://doi.org/10.1002/9780470988558.ch1>
- Davis, V. E., & Walsh, M. J. (1970). Alcohol, amines, and alkaloids: a possible biochemical basis for alcohol addiction. *Science (New York, N.Y.)*, 167(920), 1005–1007. <https://doi.org/10.1126/science.167.3920.1005>
- De Oliveira, M. A. L., Balesteros, M. R., Faria, A. F., & Vaz, F. A. S. (2010). Determination of Olive Oil Acidity. *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*, 545–552. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374420-3.00059-0>
- Deponte, M. (2013). Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.09.018>
- Di Benedetto, R., Vari, R., Scazzocchio, B., Filesì, C., Santangelo, C., Giovannini, C., ... Masella, R. (2007). Tyrosol, the major extra virgin olive oil compound, restored intracellular antioxidant defences in spite of its weak antioxidative effectiveness. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 17(7), 535–545. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2006.03.005>
- EFSA. (2010). EFSA Journal. *EFSA Journal*.

<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1459>.

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. *The Journal of Nutrition*, *138*(8), 1411–1416.

Fukumoto, L. R., & Mazza, G. (2000). Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(8), 3597–3604.

<https://doi.org/10.1021/jf000220w>

Goldsmith, C., Bond, D., Jankowski, H., Weidenhofer, J., Stathopoulos, C., Roach, P., & Scarlett, C. (2018). The Olive Biophenols Oleuropein and Hydroxytyrosol Selectively Reduce Proliferation, Influence the Cell Cycle, and Induce Apoptosis in Pancreatic Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(7), 1937.

<https://doi.org/10.3390/ijms19071937>

Gutteridge, J. M. C. (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry*, *41*(12 SUPPL.), 1819–1828. <https://doi.org/7497639>

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. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, *937*, 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.07.024>

Harborne, J. B. (1994). *The flavonoids advances in research since 1986: Phytochemistry* (Vol. 37). <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>

Hayyan, M., Hashim, M. A., & Alnashef, I. M. (2016). Superoxide Ion:

- Generation and Chemical Implications. *Chemical Reviews*.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00407>
- He, F., Li, J., Liu, Z., Chuang, C. C., Yang, W., & Zuo, L. (2016). Redox mechanism of reactive oxygen species in exercise. *Frontiers in Physiology*. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00486>
- Holst, B., & Williamson, G. (2008). Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. *Current Opinion in Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.03.003>
- Ilavarasi, K., Kiruthiga, P. V., Pandian, S. K., & Devi, K. P. (2011). Hydroxytyrosol, the phenolic compound of olive oil protects human PBMC against oxidative stress and DNA damage mediated by 2,3,7,8-TCDD. *Chemosphere*.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.06.017>
- Karkoula, E., Skantzari, A., Melliou, E., & Magiatis, P. (2012). Direct Measurement of Oleocanthal and Oleacein Levels in Olive Oil by Quantitative ^1H NMR. Establishment of a New Index for the Characterization of Extra Virgin Olive Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*, 11696–11703.
<https://doi.org/10.1021/jf3032765>
- Kerasioti, E., Stagos, D., Priftis, A., Aivazidis, S., Tsatsakis, A. M., Hayes, A. W., & Kouretas, D. (2014). Antioxidant effects of whey protein on muscle C2C12 cells. *Food Chemistry*, *155*, 271–278.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.066>
- Kobayashi, M., & Yamamoto, M. (2006). Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. *Advances in Enzyme Regulation*, *46*(1), 113–140.
<https://doi.org/10.1016/j.advenzreg.2006.01.007>
- Koes, R. E., Quattrocchio, F., & Mol, J. N. M. (1994). The flavonoid biosynthetic pathway in plants: Function and evolution. *BioEssays*.

<https://doi.org/10.1002/bies.950160209>

Kouka, P., Priftis, A., Stagos, D., Angelis, A., Stathopoulos, P., Xinou, N., ... Kouretas, D. (2017). Assessment of the antioxidant activity of an olive oil total polyphenolic fraction and hydroxytyrosol from a Greek *Olea europaea* variety in endothelial cells and myoblasts. *International Journal of Molecular Medicine*, 40(3), 703–712.

<https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3078>

KOUKA, P. U. of T. F. of M., BIOTECHNOLOGY, B. A., PRIFTIS, A. U. of T. F. of M., BIOTECHNOLOGY, B. A., STAGKOS, D. U. of T. F. of M., BIOTECHNOLOGY, B. A., ... BIOTECHNOLOGY. (n.d.). Assessment of antioxidant activity of a whole olive oil extract and hydroxytyrosol from a Greek *Olea Europea* variety in endothelial and myoblast cells Assessment of antioxidant activity of a whole olive oil extract and hydroxytyrosol from a Greek *Olea Eur. Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

Lobo, V., Patil, a, Phatak, a, & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Review*, 4(8), 118–26. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>

Ługowski, M., Saczko, J., Kulbacka, J., & Banaś, T. (2011). Reactive oxygen and nitrogen species. *Polski Merkuriusz Lekarski*, 31(185).

Malheiro, R., Casal, S., Baptista, P., & Pereira, J. A. (2014). *Virgin Olive Oil Production, Composition, Uses and Benefits for Man. Food and Beverage Consumption and Health Virgin*.

Moskovitz, J., Yim, M. Bin, & Chock, P. B. (2002). Free radicals and disease. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 397(2), 354–359. <https://doi.org/10.1006/abbi.2001.2692>

Obied, H. K., Prenzler, P. D., Ryan, D., Servili, M., Taticchi, A., Esposto, S., & Robards, K. (2008). Biosynthesis and biotransformations of

- phenol-conjugated oleosidic secoiridoids from *Olea europaea* L. *Natural Product Reports*. <https://doi.org/10.1039/b719736e>
- Ortega-García, F., & Peragón, J. (2010). HPLC analysis of oleuropein, hydroxytyrosol, and tyrosol in stems and roots of *olea europaea* L. cv. picual during ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *90*(13), 2295–2300. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4085>
- Owen, R. W., Giacosa, A., Hull, W. E., Haubner, R., Wurtele, G., Spiegelhalder, B., & Bartsch, H. (2000). Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants. *The Lancet. Oncology*, *1*, 107–112.
- Pampaloni, B., Mavilia, C., Fabbri, S., Romani, A., Ieri, F., Tanini, A., ... Brandi, M. L. (2014). In Vitro Effects of Extracts of Extra Virgin Olive Oil on Human Colon Cancer Cells. *Nutrition and Cancer*, *667*, 1228–1236. <https://doi.org/10.1080/01635581.2014.951727>
- Parr, A. J., & Bolwell, G. P. (2000). Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000515\)80:7<985::AID-JSFA572>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<985::AID-JSFA572>3.0.CO;2-7)
- Pereira, D. M., Valentão, P., Pereira, J. A., & Andrade, P. B. (2009). Phenolics: From chemistry to biology. *Molecules*, *14*(6), 2202–2211. <https://doi.org/10.3390/molecules14062202>
- Pérez-Mañá, C., Farré, M., Rodríguez-Morató, J., Papaseit, E., Pujadas, M., Fitó, M., ... de la Torre, R. (2015). Moderate consumption of wine, through both its phenolic compounds and alcohol content, promotes hydroxytyrosol endogenous generation in humans. A randomized controlled trial. *Molecular Nutrition and Food Research*, *59*(6), 1213–1216. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201400842>
- Pilcher, J. (2002). Free radicals. *Neonatal Network : NN*, *21*(7), 33–37.

- Powers, S. K., & Jackson, M. J. (2008). Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev*, 88(4), 1243–1276.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2007>
- Psaltopoulou, T., Naska, A., Orfanos, P., Trichopoulos, D., Mountokalakis, T., & Trichopoulou, A. (2004). Olive oil, the Mediterranean diet, and arterial blood pressure: the Greek European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80(4), 1012–1018.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.816736>
- Reddy Seshadri, V., Suchitra, M. M., Reddy, Y. M., & Reddy Prabhakar, E. (2010). Beneficial and detrimental actions of free radicals: A review. *Journal of Global Pharma Technology*.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02227-9](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02227-9)
- Rodriguez-Morato, J., Boronat, A., Kotronoulas, A., Pujadas, M., Pastor, A., Olesti, E., ... de la Torre, R. (2016). Metabolic disposition and biological significance of simple phenols of dietary origin: hydroxytyrosol and tyrosol. *Drug Metabolism Reviews*, 48(2), 218–236. <https://doi.org/10.1080/03602532.2016.1179754>
- Sakihama, Y., Cohen, M. F., Grace, S. C., & Yamasaki, H. (2002). Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*, 177(1), 67–80.
- Sakihama, Y., Mano, J., Sano, S., Asada, K., & Yamasaki, H. (2000). Reduction of phenoxyl radicals mediated by monodehydroascorbate reductase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*,

- 279(3), 949–954. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.4053>
- Salazar-garc, D. C., & Town, C. (2017). *Olive Oil : Composition and Health Benefits*.
- Strack, D. (1997). Phenolic metabolism. *Plant Biochemistry*, 387–416.
<https://doi.org/10.1016/B978-012214674-9/50011-4>
- Suárez, M., Romero, M.-P., Macià, A., Valls, R. M., Fernández, S., Solà, R., & Motilva, M.-J. (2009). Improved method for identifying and quantifying olive oil phenolic compounds and their metabolites in human plasma by microelution solid-phase extraction plate and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 877(32), 4097–4106.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.10.025>
- Tacker, M., McIsaac, W. M., & Creaven, P. J. (1970). Metabolism of tyramine-1-14C by the rat. *Biochemical Pharmacology*, 19(10), 2763–2773. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(70\)90103-6](https://doi.org/10.1016/0006-2952(70)90103-6)
- Takahama, U., & Oniki, T. (1992). Regulation of Peroxidase-Dependent Oxidation of Phenolics in the Apoplast of Spinach Leaves by Ascorbate. *Plant and Cell Physiology*, 33(4), 379–387.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078265>
- Togo, H., & Togo, H. (2004). What are Free Radicals? In *Advanced Free Radical Reactions for Organic Synthesis* (pp. 1–37).
<https://doi.org/10.1016/B978-008044374-4/50002-5>
- 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. *Nutrition Research Reviews*, 18(1), 98–112.
<https://doi.org/10.1079/NRR200495>
- V.E., & TYURINA, Kagan. A. Y. Y. (1998). Recycling and Redox Cycling of Phenolic Antioxidants. *ANNALS NEW YORK ACADEMY*

- OF SCIENCES*, 855(November), 274–276.
<https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2007.05216.x>
- Villamena, F. A. (2013). Chemistry of Reactive Species. In *Molecular Basis of Oxidative Stress* (pp. 1–48).
<https://doi.org/10.1002/9781118355886.ch1>
- Vissers, M. N., Zock, P. L., Roodenburg, A. J. C., Leenen, R., & Katan, M. B. (2002). Olive oil phenols are absorbed in humans. *The Journal of Nutrition*, 132(3), 409–17. Retrieved from
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11880564>
- Warleta, F., Quesada, C. S., Campos, M., Allouche, Y., Beltrán, G., & Gaforio, J. J. (2011). Hydroxytyrosol protects against oxidative DNA damage in human breast cells. *Nutrients*, 3(10), 839–857.
<https://doi.org/10.3390/nu3100839>
- Yang, C. S., Landau, J. M., Huang, M. T., & Newmark, H. L. (2001). Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annual Review of Nutrition*, 21, 381–406.
<https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.21.1.381>
- Zitka, O., Skalickova, S., Gumulec, J., Masarik, M., Adam, V., Hubalek, J., ... Kizek, R. (2012). Redox status expressed as GSH:GSSG ratio as a marker for oxidative stress in paediatric tumour patients. *Oncology Letters*. <https://doi.org/10.3892/ol.2012.931>
- Zou, X., Feng, Z., Li, Y., Wang, Y., Wertz, K., Weber, P., ... 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. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 23(8), 994–1006.
<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2011.05.006>