



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑΣ ΚΑΙ ΧΗΜΕΙΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ

Ελαιοκανθάλη και ελαιασίνη: Απομόνωση και μελέτη βιολογικών δράσεων σε κυτταρικό επίπεδο.

Αγαπάκης Σωτήριος

Βιολόγος

Επιβλέπων καθηγητής: Αναπληρωτής καθηγητής Μαγιάτης Προκόπιος

Αθήνα, Ιούλιος 2016

Τριμελής Επιτροπή:

Μαγιάτης Προκόπιος, Αναπληρωτής Καθηγητής του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων

Χήνου Ιωάννα, Καθηγήτρια του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων

Βασιλακοπούλου Διδώ, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας

Ευχαριστίες

Μετά την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας, νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω τον αναπληρωτή καθηγητή και επιβλέποντα κύριο Προκόπη Μαγιάτη για την ανάθεση του θέματος αλλά και για την καθοδήγηση και βοήθεια που παρείχε καθ' όλη την διάρκεια της εργασίας. Κρίνεται αναγκαίο να αναφέρω πως σε συζήτηση για πιθανή συνεργασία με τον κύριο Προκόπη Μαγιάτη του είχα αναφέρει πως θα με ενδιέφερε και ήταν βασικός επιστημονικός μου στόχος να μελετήσω την όποια βιολογική δράση του ελαιολάδου καθώς και την πιθανή μετατροπή του ίδιου του ελαιολάδου ή προϊόντων και παραπροϊόντων της ελιάς σε πιθανό λίπασμα ή εντομοαπωθητικό για την διευκόλυνση της καλλιέργειας της ελιάς καθώς οι μνήμες μου από τα ελαιόδεντρα ξεκινούν από τα πολύ παιδικά μου χρόνια όπως ακριβώς υποθέτω συμβαίνει με όλους τους ανθρώπους της μεσογείου και όχι μόνο. Αυτό επιδίωξε να μου χαρίσει ο επιβλέπωντας καθηγητής μου και του είμαι ευγνώμον παρά τις όποιες δυσκολίες συναντήσαμε σε αυτήν την πορεία. Επίσης την κυρία Βασιλακοπούλου γιατί μέσω της συνεργασίας με εκείνη και την συνέργεια της η πειραματική διαδικασία αυτή έγινε πραγματικότητα. Επιπλέον ευχαριστώ τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, κ. Χήνου, για τον χρόνο που αφιέρωσαν για την εργασία μου.

Επιπλέον έχω υποχρέωση να ευχαριστήσω την κυρία Μαρκομιχελάκη και την εταιρεία Volvi Estate τόσο για την χορήγηση του έξτρα παρθένου ελαιολάδου όσο και για την οικονομική υποστήριξη που μας παρείχε και που ήταν αναγκαία για την διενέργεια των πειραμάτων.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια, την κοπέλα μου και τους φίλους μου για την κατανόηση που έδειξαν κατά την διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών καθώς και την ψυχολογική στήριξη που μου παρείχαν όταν η μελέτη αυτή συναντούσε δυσκολίες.

Εν συνεχεία νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω τους συναδέλφους από το εργαστήριο στην Φαρμακευτική και ιδιαίτερα τον Διαμαντάκο Παναγιώτη για την συνεργασία και την βοήθεια που μου παρείχε, αλλά και στο Βιολογικό και μια σειρά από ανθρώπους εκτός Πανεπιστημίου που με στήριξαν και με βοήθησαν και στα δυο χρόνια αυτού του μεταπτυχιακού διπλώματος. Χωρίς αυτούς τόσο το μεταπτυχιακό δίπλωμα όσο και η περαίωση του θα ήταν ακόμη ένας στόχος.

Τέλος θα ήθελα από καρδιάς να ευχαριστήσω τον συνάδελφο Καλατζή Βαγγέλη γιατί η καθοδήγηση και η βοήθεια του ήταν εξαιρετική ενώ και η στήριξη που μου παρείχε ανά τακτά χρονικά διαστήματα ήταν συγκλονιστική.

Ιούνιος 2016, Αγαπάκης Σωτήρης

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	4
ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	7
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	10
Abstract	12
1. Εισαγωγή	13
1.1 Ελιά.....	15
1.2 Βοτανική Ταξινόμηση	15
1.2.1 Διάκριση ποικιλιών ελαιόδεντρων.....	16
1.3 Ελαιόλαδο	19
1.3.1 Παραγωγή ελαιολάδου στην αρχαιότητα.....	19
1.3.2 Παραγωγή ελαιολάδου και σύγχρονα ελαιοτριβεία	21
1.4 Χημική σύσταση ελαιολάδου.....	23
1.4.1 Φαινολικές ενώσεις.....	24
1.4.2 Ιριδοειδή- Σεκοϊριδοειδή	25
1.4.3 Περιεκτικότητα σε φαινόλες	27
1.4.4 Διάκριση ειδών ελαιολάδου	28
1.4.5 Ελαιόλαδο Volvi Estate.....	29
1.5 Ελαιοκανθάλη και Ελαιασίνη	31
1.5.1 Βιολογικές δράσεις και ιδιότητες Ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης	31
1.5.2 Κυτταροτοξική δράση.....	32
1.5.3 Ελαιοκανθάλη όπως ιβουπροφαίνη	33
1.5.4 Ελαιοκανθάλη και νευρικό σύστημα	35
1.5.5 Ελαιασίνη ως αντιφλεγμονώδες	36
1.5.6 Ελαιασίνη και LOX.....	37
1.6 Ανάλυση ελαιολάδου	37
1.6.1 Απομόνωση φαινολικών συστατικών	37
1.6.2 Υγρή –υγρή εκχύλιση	38
1.6.3 Εκχύλιση στερεής φάσης	40
1.6.4 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας	41
1.6 Μελέτη κυτταροτοξικότητας με την μέθοδο Trypan blue	42
2. Πειραματικό μέρος.....	43
2.1 Υλικά και μέθοδοι.....	44
2.1.1 Πρωτόκολλο εκχύλισης και φασματοσκοπικός προσδιορισμός	45

2.1.2 Απομόνωση ενώσεων	48
2.1.3 Προετοιμασία ελαιοκανθάλης, ελαιασίνης και μίγματος για βιολογικά πειράματα	53
2.1.4 Παραλαβή υδατικού εκχυλίσματος ελαιολάδου, ελαιασίνης, και ελαιοκανθάλης ..	54
2.1.5 Βιολογικό υλικό	57
Καλλιέργειες ευκαρυωτικών κυττάρων	57
2.2 Μέθοδοι	64
2.2.1 Μεθοδολογία κυτταρικής καλλιέργειας ευκαρυωτικών κυττάρων.....	64
2.2.2 Παρασκευή θρεπτικού υλικού	64
2.2.3 Ξεπάγωμα κυττάρων από το υγρό άζωτο	64
2.2.4 Αραίωση Κυττάρων (Split).....	65
2.2.5 Ψύξη και αποθήκευση κυττάρων στο υγρό άζωτο	65
2.4.2.1 Κυτταρικός θάνατος/ Σταυροσπορίνη.....	66
2.4.2.2. Χρώση με Trypan blue.....	68
2.4.3 Μέτρηση κυτταροτοξικότητας με τη χρήση αιμακυτταρόμετρου.....	69
2.4.4 Υπολογισμός κυτταροτοξικότητας	70
3 Αποτελέσματα.....	71
3.1 Επίδραση εκχυλίσματος ελαιολάδου σε κύτταρα CHO και CHO/DDC	71
3.2 Επίδραση εκχυλίσματος ελαιολάδου σε κύτταρα SH- SY5Y	73
3.3 Επίδραση εκχυλίσματος ελαιολάδου σε κύτταρα MCF-7.....	74
3.4 Επίδραση Ελαιοκανθάλης και Ελαιασίνης σε κύτταρα HS- SY5Y.....	76
3.5 Επίδραση εκχυλίσματος ελαιολάδου, Ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης σε κύτταρα HeLa	78
3.5.1 Συσχέτιση δόσης-δράσης (dose response) εκχυλίσματος και απομονωμένων ουσιών σε κύτταρα HeLa.....	80
3.6 Επίδραση Ελαιοκανθάλης, ελαιασίνης και εκχυλίσματος ελαιολάδου σε ενυδατωμένη μορφή σε καρκινικά κύτταρα HeLa.....	83
3.6.1 Συσχέτιση δόσης δράσης(Dose response) ενυδατωμένων μορφών	86
3.6.2 Σύγκριση ενυδατωμένων μορφών με μη ενυδατωμένες μορφές.....	87
4. Συζήτηση- Συμπεράσματα.....	92
Βιβλιογραφία	98

ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στην διπλωματική εργασία που παρουσιάζεται γίνεται μελέτη των βιολογικών δράσεων δυο σεκοϊριδοειδών και συγκεκριμένα της ελαιοκανθάλης και της ελαιασίνης που απομονώθηκαν από εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο και ταυτοποιήθηκαν με χρήση φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού. Στις ουσίες αυτές έχουν αποδοθεί ποικίλες βιολογικές ιδιότητες ενώ η περιεκτικότητα του ελαιολάδου σε αυτές χρησιμοποιείται σαν δείκτης ποιότητας αυτού.

Το ελαιόλαδο αποτελεί βασικό προϊόν της χώρας μας τόσο με εμπορικούς όρους όπως θα αναφερθεί παρακάτω όσο και με όρους διατροφής. Επιλέχτηκε το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο για την διενέργεια των πειραμάτων για έναν απλό λόγο, εμφανίζει μεγαλύτερα ποσοστά φαινολικών συστατικών ακριβώς αυτών δηλαδή που χρησιμοποιήθηκαν, της ελαιοκανθάλης και της ελαιασίνης.

Η ελαιοκανθάλη και η ελαιασίνη έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας τα τελευταία χρόνια με τα αποτελέσματα να είναι ήδη πολύ σημαντικά. Η αξία της έρευνας στο συγκεκριμένο αντικείμενο είναι ιδιαίτερα μεγάλη αν συνυπολογιστεί πως εν μέσω κρίσης στον ελλαδικό χώρο φαίνεται μια τάση επιστροφής του πληθυσμού, στον αγροτικό τομέα και έτσι κάθε συνεισφορά στην αύξηση της αξίας των πρωτογενών και δευτερογενών προϊόντων όπως το ελαιόλαδο έχει ιδιαίτερη βαρύτητα. Η σύνδεση όμως της ποιότητας του ελαιολάδου με την συγκέντρωση των φαινολών τα τελευταία χρόνια έχει οδηγήσει σε ορισμένες περιπτώσεις σε αύξηση της τιμής του. Η ελαιοκανθάλη έχει εμφανίσει προστατευτική δράση έναντι φυσιολογικών κυττάρων ενώ πληθυσμοί που τρέφονται σε υψηλά ποσοστά με εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο φαίνεται ότι προστατεύονται από καρδιαγγειακές παθήσεις. Εμφανίζει αντιφλεγμονώδεις δράσεις αλλά και κυτταροτοξικές δράσεις ενάντια σε καρκινικές σειρές. Πρόκειται δηλαδή για μια ουσία με ποικίλες και πολύ διαφορετικές μεταξύ τους ιδιότητες. Η σειρά με την οποία μελετάται η φαρμακευτική δράση μιας ουσίας είναι σαφής, πρώτα *in vitro*, ύστερα *in vivo* και μετά ακολουθούν πειράματα σε πρωτεύοντα και ανθρώπους ασθενείς ή υγιείς ανάλογα με την βαθμίδα της μελέτης.

Η σπουδαιότητα όμως των διάφορων ερευνών έγκειται στο γεγονός πως το ελαιόδεντρο καλλιεργείται παγκοσμίως και καταναλώνεται επίσης παγκοσμίως. Η απόδειξη δηλαδή της οποιαδήποτε δράσης πολλαπλασιάζεται ακριβώς γιατί σημαντικό μέρος του ανθρώπινου πληθυσμού τρέφεται συνεχώς και καθημερινώς με ελαιόλαδο. Κρίνεται αναγκαίο να τονιστεί εκ νέου, ότι οι όποιες μελέτες, αφορούν στο εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο το οποίο χαρακτηρίζεται από την

ύπαρξη φαινολικών συστατικών πάνω από κάποια επίπεδα και όχι γενικά το ελαιόλαδο. Με την επιλογή του, το εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο της εταιρείας Volvi Estate εκχυλίστηκε με διάφορες μεθόδους προκειμένου στο τέλος να απομονωθούν οι υπό μελέτη ουσίες, η ελαιοκανθάλη και η ελαιασίνη. Ταυτόχρονα το ίδιο εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο επεξεργάστηκε με αποσταγμένο νερό και στην συνέχεια ακολουθήθηκαν οι ίδιες διαδικασίες προκειμένου να απομονωθούν οι ουσίες. Είναι απαραίτητο να αναφερθεί ότι στην οποιαδήποτε πειραματική διαδικασία όπως αναφέρεται και παρακάτω, απουσίαζε η μεθανόλη, η οποία έχει πειραματικά δείχτει ότι πιθανώς καταστρέφει σε έναν βαθμό την ελαιοκανθάλη και την ελαιασίνη. Η παραπάνω κατεργασία με αποσταγμένο νερό έγινε λόγω της παρατήρησης από διάφορα μέλη της επιστημονικής κοινότητας, ότι μέχρι στιγμής παρά το γεγονός ότι παρατηρείται η βιολογική επίδραση της ελαιοκανθάλης και της ελαιασίνης, δεν μπορεί σε καμία από τις περιπτώσεις να ανιχνεύει η δραστική ουσία μετά την εισαγωγή της στα κύτταρα ή στον ανθρώπινο οργανισμό. Εισερχόμενες οι ουσίες στον ανθρώπινο οργανισμό πιθανώς διασπώνται σε έναν ποσοστό, ενώ το υπόλοιπο αλλάζει μορφή και γι αυτό και δεν ανιχνεύονται. **Η υπόθεση είναι ότι οι ουσίες αυτές ενυδατώνονται και μετατρέπονται σε νέες ως τώρα άγνωστες δραστικές μορφές.** Οι ουσίες λοιπόν που απομονώθηκαν από το ελαιόλαδο μετατράπηκαν σε ενυδατωμένες μορφές (1,1 διόλες) ώστε να πραγματοποιηθεί μίμηση της διαδικασίας που πιθανά συμβαίνει όταν οι ουσίες εισέρχονται στα κύτταρα ή στον ανθρώπινο οργανισμό.

Έτσι βασικός σκοπός της μελέτης ήταν να δείχτει πειραματικά πως η ενυδατωμένη μορφή της ελαιοκανθάλης και της ελαιασίνης εμφανίζουν την δραστικότητα που ως τώρα αποδιδόταν στην αλδεϋδική τους μορφή.

Οι κυτταρικές σειρές που επιλέχτηκαν ήταν οι CHO, CHO/ DDC, SY5Y, MCF-7 και τα HeLa για διαφορετικούς λόγους η κάθε μια. Τα CHO που προέρχονται από την επιθηλιακή κυτταρική γραμμή των ωοθηκών των κινέζικων χαμστερ επειδή είναι εύκολα στον χειρισμό ενώ έχουν μειωμένο αριθμό χρωμοσωμάτων, γεγονός που τα καθιστά ένα αρκετά καλό μοντέλο εργαστηριακών μελετών. Τα CHO/ DDC τα οποία είναι και αυτά επιθηλιακά κύτταρα ωοθηκών κινέζικων χαμστερ ωστόσο έχει τεχνητά εισαχθεί cDNA της ανθρώπινης L- Dopa αποκαρβοξυλάσης(DDC) η οποία εμπλέκεται στους μηχανισμούς της απόπτωσης. Στη συνέχεια τα SY5Y καθότι προήλθαν από βιοψία μυελού των οστών γυναίκας με νευροβλάστωμα υπερισχύει η νευρική τους φύση. Τα εν λόγω κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν για να εξεταστεί η πιθανή δράση ή συσχέτιση της ελαιοκανθάλης και της ελαιασίνης, με διάφορες νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως ακριβώς η νόσος του Alzheimer. Επιπλέον τα κύτταρα MCF-7 τα οποία είναι κύτταρα του καρκίνου του μαστού, μιας νόσου που έρχεται αντιμέτωπος ο γυναικείος πληθυσμός παγκοσμίως, σε μεγάλα ποσοστά. Η οποιαδήποτε συσχέτιση δράσης λοιπόν αποδειχτεί, είναι ένα θετικό βήμα ακριβώς γιατί θα βοηθούσε σε ένα πολύ μεγάλο πρόβλημα. Τέλος επιλέχτηκαν τα κύτταρα

HeLa που απομονώθηκαν από ασθενή με καρκίνο στον τράχηλο της μήτρας και χρησιμοποιήθηκαν ακριβώς λόγω του ότι συντελούν στην γνώση γύρω από τον καρκίνο με πειράματα που πραγματοποιούνται σε αυτά καθώς επίσης επειδή διαθέτουν την ενεργή μορφή της τελομεράσης με αποτέλεσμα να αποτρέπεται η σταδιακή σμίκρυνση των τελομερών που συνδέεται με το γήρας και τελικά οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο.

Τέλος πραγματοποιήθηκαν πειράματα τα οποία αφορούσαν την δραστικότητα των δυο μορφών της ελαιοκανθάλης και της ελαιασίνης, σε μικρότερες συγκεντρώσεις, προκειμένου να ανιχνευθεί η μικρότερη δυνατή συγκέντρωση στην οποία συνεχίζουν να εμφανίζουν δράση. Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε τόσο για την ελαιοκανθάλη, την ελαιασίνη και το εκχύλισμα αλδεϋδικής φύσεως όσο και για τα υδατικής φύσεως εκχυλίσματα. Η ελαιοκανθάλη και η ελαιασίνη αφού μέσω της διατροφής εισέρχονται στον ανθρώπινο οργανισμό, μερικώς πιθανόν απορροφούνται και εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος, φτάνοντας στα ανθρώπινα κύτταρα. Ακριβώς για αυτόν τον λόγο πραγματοποιήθηκαν τα προαναφερθέντα πειράματα, για να διαπιστωθεί αν τα αποτελέσματα των πειραμάτων ήταν ρεαλιστικά αν δηλαδή μέσω της διατροφής οι απομονωμένες ουσίες μπορούν όντως να βοηθήσουν τον ανθρώπινο πληθυσμό βάσει των υπολογισμών για την πιθανή συγκέντρωση μετά την εισαγωγή τους στον ανθρώπινο οργανισμό. Το σίγουρο είναι ότι το ελαιόλαδο αποτελεί ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον επιστημονικό αντικείμενο και θα συνεχίσει να αποτελεί ακριβώς λόγω της σημασίας του και της συμμετοχής του στην διατροφή, στον πολιτισμό και στην οικονομία του κόσμου, όσο και την πιθανή φαρμακευτική χρήση την οποία μπορεί να αποδειχτεί μετά από τα αποτελέσματα των ερευνών.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στο πρώτο μέρος αυτής της εργασίας αναλύονται τα βοτανικά χαρακτηριστικά της οικογένειας Oleaceae καθώς και οι διάφορες ποικιλίες που ανευρίσκονται στον ελλαδικό χώρο ενώ στην συνέχεια γίνεται μια εκτενής αναφορά στο ελαιόλαδο και στον τρόπο παρασκευής του στα ελαιοτριβεία. Έπειτα αναφέρονται και περιγράφονται αναλυτικά χρήσεις και βιολογικές δράσεις που έχουν αποδοθεί στην ελαιοκανθάλη και την ελαιασίνη κατά το παρελθόν.

Στο δεύτερο μέρος περιγράφεται η πειραματική διαδικασία η οποία χωρίζεται σε δύο μεγάλες ενότητες. Η πρώτη ενότητα αναφέρεται στην κατεργασία εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου με διάφορες τεχνικές προκειμένου να απομονωθούν οι δραστικοί μεταβολίτες, η ανάλυση των οποίων πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπικές μεθόδους. Στην δεύτερη ενότητα περιλαμβάνονται πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο τμήμα Βιολογίας του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών προκειμένου να εξακριβωθούν πιθανές βιολογικές δράσεις αυτών καθώς και η επίδραση αυτών σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές.

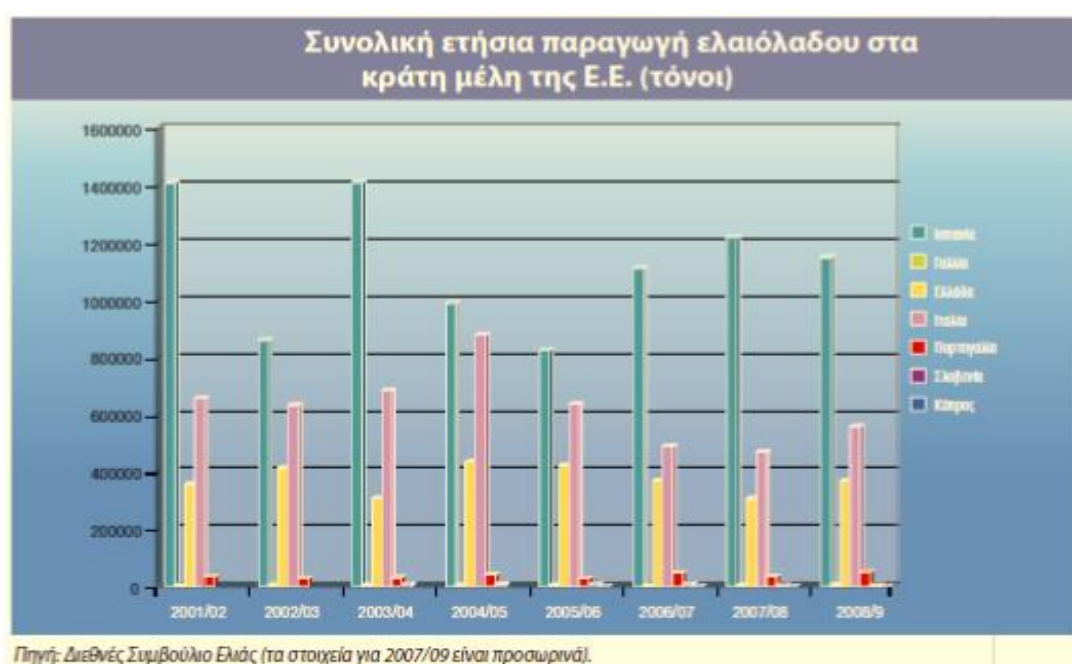
Abstract

In the first part of this research paper, the botanic characteristics of the Oleaceae family and the tribes represented in Greece, are being identified. An extend report on olive oil is presented, followed by a description the production process used by olive oil mills. Additionally, utilisation and biological activities attributed to oleocanthal and oleacein in the past are being defined.

In the second part, the experimental process is being described, divided in two major sections. The first section refers to extra virgin olive oil processing, mentioning different methods used to isolate active metabolites, the analysis of which was made by spectroscopic method. The second major section includes experiments that took place at the department of Biology of the National Kapodistrian University of Athens, which were used to check their possible biological activities as well as the effect on different cell lines.

1. Εισαγωγή

Το δέντρο της ελιάς αποτελεί συνώνυμο της γεωγραφίας της Μεσογείου και των χωρών που περικλείουν αυτή. Η ελιά καλλιεργείται στην ευρύτερη περιοχή χιλιάδες χρόνια και έχει εισχωρήσει τόσο στον πολιτισμό των χωρών αυτών όσο και στην διατροφή, την λεγόμενη μεσογειακή διατροφή. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το έλαιο που παράγεται από τον καρπό της ελιάς να αποτελεί βασικό συστατικό της καθημερινότητας αλλά ίσως και το πιο σημαντικό εμπορικό προϊόν της περιοχής αυτής όπως φαίνεται και παρακάτω.



(Πίνακας 1 Παραγωγή ελαιολάδου στα κράτη μέλη της Ευρωπαϊκής Ένωσης)

Όπως φαίνεται από τον παραπάνω πίνακα η Ελλάδα βρίσκεται στην 3^η θέση μεταξύ των χωρών της Ευρωπαϊκής Ένωσης στην παραγωγή ελαιολάδου πίσω μόνο από την Ισπανία και την Γαλλία, ενώ κράτη μέλη όπως η Ιταλία και η Πορτογαλία καθώς και τα υπόλοιπα κράτη μέλη εμφανίζουν πολύ λιγότερη παραγωγή ελαιολάδου. Το γεγονός αυτό αποτυπώνει την σημασία που έχει το ελαιόλαδο για την οικονομία της Ελλάδας.

Η σημασία του ελαιολάδου όμως για τον ελλαδικό χώρο δεν σταματά μόνο στους οικονομικούς παράγοντες καθώς όπως φαίνεται στον πίνακα 2 που παρατίθεται παρακάτω στον οποίο και αποτυπώνεται η κατανάλωση ελαιολάδου ανά άτομο στις χώρες κράτη μέλη της Ευρωπαϊκής Ένωσης, η Ελλάδα εμφανίζει την μεγαλύτερη κατανάλωση αφήνοντας πίσω της όλες τις υπόλοιπες χώρες. Το στατιστικό στοιχείο αυτό είναι εξίσου σημαντικό καθώς αναδεικνύει την επιρροή που έχει το ελαιόλαδο στην χώρα και την σημασία που αποδίδεται μέσω της διατροφής του πληθυσμού.

Country	Consumption per capita (kg)	Consumption 2011/2012 (1000t)	Population in 2011
Greece	17.9	202.6	11309885
Spain	12.6	580.1	46152926
Italy	10.9	660	60626442
Cyprus	7.5	6.3	839751
Portugal	7.4	78	10572157
Luxembourg	2.7	1.4	511840
France	1.7	111.2	64994907
Malta	1.7	0.7	415832
Belgium	1.2	13.4	11000638
Austria	1.1	9.2	8404252

(Πίνακας 2 Κατανάλωση ελαιολάδου στα κράτη μέλη της Ευρωπαϊκής Ένωσης για το έτος 2011)

Χιλιάδες χρόνια εξέλιξης και φυσικής προσαρμογής οδήγησαν το δέντρο της ελιάς στην παραγωγή πλήθους βιοδραστικών μεταβολιτών, οι οποίοι, στην συνέχεια μεταφέρονται μαζί με άλλα συστατικά στο ελαιόλαδο κατά την διάρκεια της κατεργασίας και ελαιοποίησης του καρπού. Την τεράστια σημασία του ελαιολάδου έρχεται να ενισχύσει ένας ακόμη πολύ σημαντικός παράγοντας, οι βιολογικές του δράσεις. Τίποτα δεν είναι σπουδαίο στην φύση χωρίς το φώς και την σημασία της βιολογίας. Γι αυτό ακριβώς έχουν εξαιρετική σημασία οι μεταβολίτες του ελαιολάδου καθώς από την περιεκτικότητα αυτών καθορίζεται και ο ισχυρισμός περί υγειοπροστατευτικών ιδιοτήτων. Στην Ευρωπαϊκή Ένωση έγινε αντιληπτό και με τον νόμο (ΕΕ 432/2012) με βάση την επιστημονική γνώση του EFSA επέτρεψε συγκεκριμένους ισχυρισμούς υγείας που σχετίζονται με τις φαινολικές ενώσεις και τα επίπεδα τους στο ελαιόλαδο.

1.1 Ελιά

Υπάρχουν αναφορές για την καλλιέργεια της ελιάς από το 7000 πΧ ενώ στον μινωικό πολιτισμό είδη από το 3000 πΧ είχαν αντιληφθεί την εμπορική της σημασία. Γίνεται κατανοητό λοιπόν ότι η ελιά είναι από τα αρχαιότερα καλλιεργούμενα είδη στον πλανήτη ενώ από την ίδια εποχή φαίνεται πως είχαν ξεκινήσει προσπάθειες κατεργασίας και αξιοποίησης. Φυσικά οι θεραπευτικές ιδιότητες του ελαιόλαδου και η συσχέτιση του με την περιποίηση του δέρματος ή η σύνδεση εκχυλισμάτων των φύλλων ελιάς με την θεραπεία της ελονοσίας, είναι γνωστές ήδη από την αρχαία Αίγυπτο, με αναφορές που έχουν έρθει στην επιφάνεια αρκετά χρόνια πριν.

1.2 Βοτανική Ταξινόμηση

Η επιστημονική ονομασία του φυτού είναι *Olea europaea* και ανήκει στην οικογένεια *Oleaceae*. Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει 22 γένη και πάνω από 500 είδη με χαρακτηριστικούς αντιπροσώπους τα γένη *Fraxinus*, *Ligustrum*, *Forsythia* και το γένος *Olea* με περίπου 40 είδη. Η επιστημονική κοινότητα έχει εστιάσει το ενδιαφέρον της στο είδος *Olea europaea* με τα Ταξα που υπάγονται σε αυτό να διακρίνονται στις καλλιεργούμενες ποικιλίες οι οποίες συνιστούν το υποείδος *Olea europaea var. sativa*.

Βασίλειο	<i>Plantae</i>
Διαίρεση	<i>Magnoliophyta</i>
Κλάση	<i>Magnoliopsida</i>
Τάξη	<i>Lamiales</i>
Οικογένεια	<i>Oleaceae</i>
Υποοικογένεια	<i>Oleoideae</i>
Γένος	<i>Olea</i>

(Πίνακας 3. Βοτανική ταξινόμηση ελιάς)

Η ελιά είναι δέντρο αειθαλές που φτάνει σε ύψος 20 μέτρων ενώ ο μέσος όρος ζωής είναι τα 500 χρόνια ωστόσο στην περιοχή της μεσογείου εντοπίζονται ελαιόδεντρα 1500 ετών καθώς επίσης στην Ελλάδα το αρχαιότερο που έχει ανευρεθεί έχει ηλικία λίγο μικρότερη από τον ελληνικό πολιτισμό, τα 5000 χρόνια.

1.2.1 Διάκριση ποικιλιών ελαιόδεντρων

Το είδος *Olea europaea* περιλαμβάνει εκατοντάδες καλλιεργητικές ποικιλίες οι σημαντικότερες εκ των οποίων για την Ελλάδα είναι οι εξής (Γεωργαλάς Γ.Κ.):

1. Ελαία η άγρια (*Olea europaea* L. var. *sylvestris*) Hoffmanns and Link, κοινώς αγριελιά ή αγριλίδι
2. Ελαία η αιολόκαρπος (*Olea europaea* cv. *aeolocarpus*)
3. Ελαία η ηδύκαρπος (*Olea europaea* cv. *nigra dulcis*)
4. Ελαία η ισπανική (*Olea europaea* cv. *hispanica*)
5. Ελαία η κρανιόμορφος (*Olea europaea* cv. *craniomorpha*), κοινώς Λιανολιά Κερκύρας
6. Ελαία η κρεμοκλαδής (*Olea europaea* cv. *pendulata*), κοινώς κρεβατοελιά
7. Ελαία η κωνική (*Olea europaea* cv. *conica*), κοινώς ελιά σαλωνίτικη
8. Ελαία η λευκόκαρπος (*Olea europaea* cv. *leucocarpa*)
9. Ελαία η μακρόκαρπος (*Olea europaea* cv. *macrocarpa*), κοινώς αετονυχολιά
10. Ελαία η μικρόκαρπος (*Olea europaea* cv. *microcarpa*), κοινώς κορωνέικη
11. Ελαία η μαστοειδής (*Olea europaea* cv. *mamillaris*), κοινώς αθηνολιά
12. Ελαία η πρώιμος (*Olea europaea* cv. *precox*), κοινώς καλοκαιρίδα
13. Ελαία η σαλέρνιος (*Olea europaea* cv. *salerniensis*), κοινώς γαϊδουρολιά
14. Ελαία η στρεπτή (*Olea europaea* cv. *contorta*), κοινώς στριφτολιά
15. Ελαία η στρογγυλοειδής (*Olea europaea* cv. *rotunda virida*)
16. Ελαία η υποστρογγύλος (*Olea europaea* cv. *subrotunda*)
17. Ελαία η σφαιρική (*Olea europaea* cv. *sphaerica*)
18. Ελαία η υπόχλωρος (*Olea europaea* cv. *virida*)

Η ταξινόμηση των ποικιλιών της ελιάς μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους όπως για παράδειγμα το μέγεθος του καρπού με αποτέλεσμα να προκύπτουν οι μικρόκαρπες (βάρος καρπού μικρότερο από 2,6g) , οι μεσόκαρπες (βάρος καρπού κυμαινόμενο από 2,7g έως 4,2g) και οι αδρόκαρπες (βάρος καρπού μεγαλύτερο από 4,3g) .

Σε μια διαφορετική κατηγοριοποίηση, οι ποικιλίες διαχωρίζονται ανάλογα με τον σκοπό καλλιέργειας, δηλαδή προς ελαιοποίηση, επιτραπέζιες και διπλής χρήσης. Παρατίθενται παρακάτω οι διάφορες ποικιλίες για ελαιοποίηση που ανευρίσκονται στον ελληνικό χώρο.

- ∴ Κορωνέικη – *Olea europaea* cv. *microcarpa* καλλιεργείται στην Πελοπόννησο (Μεσσηνία, Λακωνία, Αχαΐα), στην Κρήτη (Χανιά, Ρέθυμνο, Ηράκλειο), στα Ιόνια νησιά (Ζάκυνθος, Κεφαλονιά), στη Δυτική Στερεά, στη Σάμο, στην Ικαρία και αλλού
- ∴ Αγουρομανάκι – *Olea europaea* cv. *onalis* καλλιεργείται στην Αργολίδα, Κορινθία, Αρκαδία, Σπέτσες και στην Ερμιονίδα
- ∴ Αδραμυτινή – *Olea europaea* cv. *media subrotunda* καλλιεργείται σε Μυτιλήνη, Χίο, Εύβοια και στην Άνδρο
- ∴ Αθηνολιά – *Olea europaea* cv. *mamilaris* καλλιεργείται σε Χανιά, Λακωνία, Ρέθυμνο και Μεσσηνία. Είναι γνωστή επίσης ως Τσουνάτη, Μαστοειδής, Μαστολιά, Ματσολιά, Μουρατολιά
- ∴ Βαλανολιά – *Olea europaea* cv. *pyriformis* καλλιεργείται στη Μυτιλήνη, Χίο και Σκύρο
- ∴ Κουτσουρελιά – *Olea europaea* cv. *microphylla* καλλιεργείται στην Αιγιαλεία (Αχαΐα), στην Κορινθία και την Αιτωλοακαρνανία
- ∴ Λιανολιά Κερκύρας – *Olea europaea* cv. *craneomorpha* καλλιεργείται στα Ιόνια νησιά και στα παράλια της Ηπείρου.
- ∴ Μεγαρίτικη – *Olea europaea* cv. *argentata* καλλιεργείται κυρίως στην Αττική και στη Βοιωτία, αλλά και σε Αργολίδα, Αιγιαλεία (Αχαΐα) και Κυνουρία
- ∴ Μυρτολιά – *Olea europaea* cv. *microcarpa subrotunda* καλλιεργείται κυρίως στη Λακωνία και είναι γνωστή ως Μερτολιά ή Μουρτολιά

Ωστόσο στον ελληνικό χώρο υπάρχουν και επιτραπέζιες ποικιλίες όπως

- Αδρόκαρπη – *Olea europaea* cv. *mayor* ή *prunera* καλλιεργείται σε όλη την Ελλάδα
- Κονσερβολιά – *Olea europaea* cv. *rotunda* καλλιεργείται κυρίως στο Αγρίνιο, στην Άμφισσα, Άρτα, Εύβοια, Λαμία, Πάτρα, Πήλιο, αλλά και σε πολλές άλλες περιοχές της χώρας
- Βασιλακάδα – *Olea europaea* cv. *regalis* καλλιεργείται στην Κέρκυρα, στις Ροβιές Ευβοίας και στη Χαλκιδική

- Καλαμών – *Olea europaea* cv. *ceraticarpa* καλλιεργείται κυρίως στη Μεσσηνία, Λακωνία καθώς και στην Αχαΐα
- Καρολιά – *Olea europaea* cv. *oblonga* καλλιεργείται σε Μυτιλήνη, Κέρκυρα και Ζάκυνθο, με το ενδιαφέρον γι' αυτή να είναι περιορισμένο
- Καρυδολιά – *Olea europaea* cv. *maxima* καλλιεργείται σε Κέρκυρα, Άμφισσα, Λαμία, Εύβοια, Χαλκιδική και Αττική
- Κολυμπάδα – *Olea europaea* cv. *uberina* καλλιεργείται περιορισμένα στην Αττική, Φωκίδα, Κυκλάδες, Μεσσηνία, Εύβοια και αλλού
- Στρογγυλολιά – *Olea europaea* cv. *rubrotunda* καλλιεργείται κυρίως στη Χαλκιδική και αποκαλείται αλλιώς Γαλανή, Πρασινολιά, Στρογγυλοραχάτη και Μηλολιά

Όπως επίσης και μεικτές ποικιλίες

- Θρούμπα – *Olea europaea* cv. *media oblonga* καλλιεργείται κυρίως στη Χίο, τη Σάμο, τις Κυκλάδες, καθώς και στην Κρήτη, την Αττική, τη Θάσο, τη Ρόδο και αλλού
- Μανάκι – *Olea europaea* cv. *minor rotunda* καλλιεργείται σε Κορινθία, Αργολίδα, Άμφισσα, Δελφούς, Ιτέα, Αράχοβα, Λαμία, Κυνουρία, Ερμιόνη και Πόρο
- Αμυγδαλολιά – *Olea europaea* cv. *amygdaliformis* καλλιεργείται στην Άμφισσα για την παραγωγή λαδιού, ενώ στην Αττική και αλλού για την παραγωγή επιτραπέζιας πράσινης ελιάς
- Ματολιά καλλιεργείται στην Ηλεία. Είναι γνωστή και ως Ρουσολιά, Νυχάκι, Χοντρολιά, Νταμουρελιά

1.3 Ελαιόλαδο

1.3.1 Παραγωγή ελαιολάδου στην αρχαιότητα

Μελέτες που ξεκίνησαν από τις δεκαετίες του 50 και του 60 όπως η μελέτη «Lyon Diet Heart Study» αλλά κυρίως η «Μελέτη των Επτά Χωρών» έδειξαν ότι ο πληθυσμός της Κρήτης παρουσίαζε την καλύτερη κατάσταση υγείας και τα μικρότερα ποσοστά θνησιμότητας από στεφανιαία νόσο και καρκίνο, σε σχέση με όλους τους άλλους πληθυσμούς που μελετήθηκαν. Η διαφορά μεταξύ των πληθυσμών ήταν μία, η κατανάλωση του ελαιολάδου, που στην Κρήτη καταγράφηκε πολύ πιο αυξημένη σε σύγκριση με τους άλλους πληθυσμούς. Το γεγονός αυτό είχε γίνει αντιληπτό από την αρχαιότητα και η παραγωγή του ελαιολάδου καταγράφεται πριν από τα ιστορικά χρόνια, ενώ στον ελλαδικό χώρο ευρήματα όπως πιεστήρια παραγωγής ελαιολάδου ή και πιθάρια αποθήκευσης του, αποδεικνύουν την οργανωμένη μορφή που είχε ήδη η παραγωγή από τότε.



(Εικόνα 1 Απολιθωμένο φύλλο ελιάς που βρέθηκε στην Σαντορίνη/ Κουκούτσια από καρπό ελιάς που έχουν βρεθεί στο ανάκτορο της Ζάκρου στην Κρήτη)

Η παραγωγή του ελαιολάδου στην αρχαιότητα γινόταν με την βοήθεια μυλοπετρών, με το σύστημα να αποτελείται αρχικά από μία και μετέπειτα δυο παράλληλες μυλόπετρες (Τραπητής) το οποίο κυλούσε πάνω σε μια τραχιά πέτρινη λεκάνη στην οποία βρίσκονταν οι ελιές.

Στην συνέχεια πραγματοποιούνταν η απομάκρυνση των κουκουτσιών της ελιάς ενώ επόμενο βήμα ήταν η βύθιση του παραγόμενου πολτού σε ζεστό νερό κι έπειτα μια δεύτερη πίεση με την πρέσα τύπου δοκού σύνθλιψης. Έπειτα το λάδι μαζί με τους υπόλοιπους χυμούς που είχαν προηγουμένως ξεχωριστεί από τον πολτό συγκεντρώνονταν σε αγγεία για να «ηρεμήσει».

Ο διαχωρισμός του ελαιολάδου από τους υπόλοιπους χυμούς γινόταν με την βοήθεια της βαρύτητας καθώς το ελαιόλαδο είναι ελαφρύτερο από άλλα συστατικά και αυτό είχε ως αποτέλεσμα να επιπλέει. Στην συνέχεια με απλή απόχυση

απομακρυνόταν από τις δεξαμενές που βρίσκονται μαζί με τον πολτό ή σε επόμενες εποχές με ειδικά αγγεία τύπου διαχωριστήρα που είχαν στο κάτω μέρος μια προχοή για την διαδοχική απελευθέρωση των υγρών. Το ελαιόλαδο επέπλεε με αποτέλεσμα να αποβάλλονται τα λοιπά φυτικά υγρά πρώτα και στο τέλος συλλεγόταν σε αγγεία ή δεξαμενές για περαιτέρω καθαρισμό. Μια πρώτη παρατήρηση θα μπορούσε να αφορά η απουσία μάλαξης του πολτού. Η μόνη μάλαξη που πραγματοποιούνταν στον καρπό ήταν μονάχα κατά την διάρκεια της έκθλιψης της ελιάς όπου η μυλόπετρα κυλούσε πάνω στον πολτό δημιουργώντας ένα είδος μάλαξης.



(Εικόνα 2 Υπολείμματα υποτυπώδους ελαιουργείου στα ανάκτορα της αρχαίας Φαιστού)

1.3.2 Παραγωγή ελαιολάδου και σύγχρονα ελαιοτριβεία

Ο καρπός της ελιάς ωριμάζει στα μέσα προς τα τέλη του φθινοπώρου όταν και ξεκινάει η συγκομιδή και ελαιοποίηση του καρπού. Συγκεκριμένα η ελαιοκομική περίοδος αρχίζει τον Οκτώβρη και τελειώνει στα τέλη της εποχής του χειμώνα. Η απόδοση δε του ελαιολάδου στην κλίμακα «κιλά ελαιολάδου ανά κιλό ελαιόκαρπου» αυξάνεται όσο ωριμάζει ο καρπός της ελιάς.

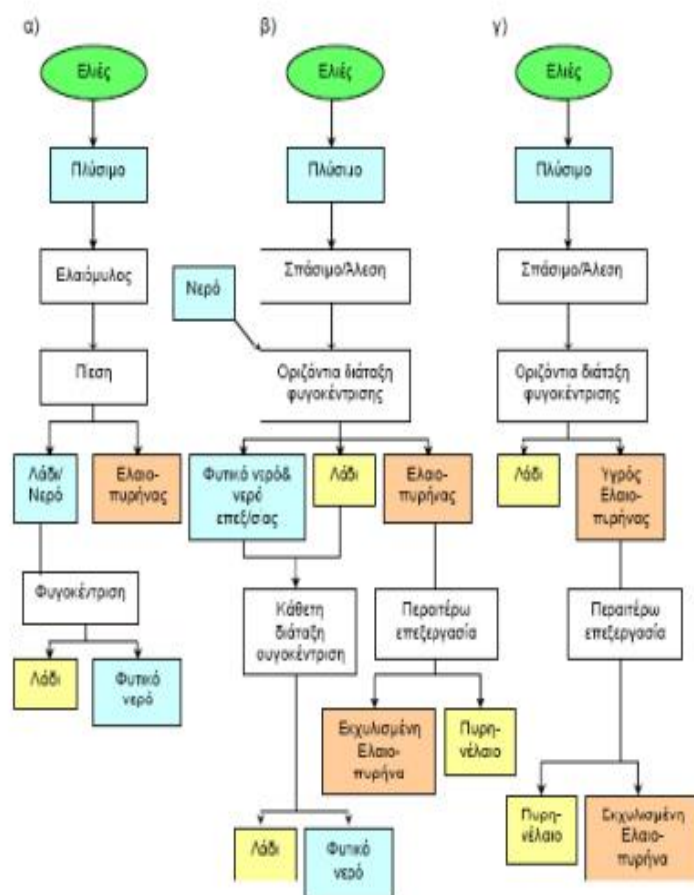


Εικόνα 3. Σύγχρονο ελαιοτριβείο

Το ελαιόλαδο λαμβάνεται μόνο από τον καρπό της ελιάς και παράγεται μόνο με μηχανικά ή άλλα φυσικά μέσα με συγκεκριμένες συνθήκες κυρίως θερμικές, χωρίς να προκαλείται αλλοίωση του ελαίου. Έτσι λοιπόν πραγματοποιείται η άλεση του καρπού ενώ ως συστήματα εξαγωγής χρησιμοποιούνται σήμερα εκείνα που βασίζονται στη φυγοκέντρωση. Εκείνα ανάλογα με την ποσότητα και την σύνθεση των προϊόντων και των υποπροϊόντων που δίνουν ή από την πρόσθεση νερού ή όχι στα decanter, διακρίνονται σε δυο ή τριών φάσεων. Ακόμα, πραγματοποιείται και η παραδοσιακή διαδικασία όπου το ελαιόλαδο παράγεται με πίεση σε υδραυλικό πιεστήριο.

Το πρώτο στάδιο είναι το πλύσιμο και το ζύγισμα όταν ο καρπός φτάνει στο ελαιοτριβείο και απομακρύνονται φύλλα, ξένες ύλες, σκόνη, χώμα, πέτρες και άλλες προσμίξεις με ειδικές μηχανές που βασίζονται στον αέρα, δημιουργώντας ρεύμα (αποφυλλωτήρια). Στη συνέχεια οι καρποί περνούν σε ένα τύμπανο όπου κυκλοφορεί νερό για να πλυθούν και να απομακρυνθούν οι ξένες ύλες. Ύστερα ζυγίζονται και έπειτα αλέθονται σε ελαιόμυλους. Στόχος είναι να σπάσουν τα κύτταρα του μεσοκαρπίου, ώστε να πραγματοποιηθεί ευκολότερα η εξαγωγή του ελαίου από τα χυμοτόπια και να σχηματιστούν μεγαλύτερες σταγόνες. Η διαδικασία

αυτή γίνεται συνήθως σε μύλους από γρανίτη ή σε μεταλλικούς μύλους, σφυρόμυλους και σπαστήρες με αντίθετα περιστρεφόμενους οδοντωτούς δίσκους. Τέλος πραγματοποιείται η μάλαξη που λαμβάνει χώρα σε δεξαμενές όπου κυκλοφορεί νερό με θερμοκρασία από 20 έως 30 °C προκειμένου να διασπαστεί το γαλάκτωμα του ελαίου και να συνενωθεί σε μεγαλύτερες σταγόνες το ελαιόλαδο ούτως ώστε να γίνει ευκολότερος ο διαχωρισμός.



Εικόνα 4 Διάγραμμα ροής των τριών διαφορετικών διαδικασιών παραγωγής ελαιόλαδου
α) παραδοσιακή β) τριών φάσεων γ) δύο φάσεων

1.4 Χημική σύσταση ελαιολάδου

Το ελαιόλαδο, είναι ένα μίγμα τρι-, δι-, και μονο-γλυκεριδίων και αποτελεί το προϊόν της εκχύλισης του ελαιόκαρπου. Θεωρείται ως μια από τις καλύτερες πηγές λιπαρών οξέων και φυσικών αντιοξειδωτικών, όπως είναι οι πολυφαινόλες, οι τοκοφερόλες. Το ελαιόλαδο αποτελείται από μονοακόρεστα (ελαϊκό οξύ), πολυακόρεστα και κορεσμένα λιπαρά οξέα, κυρίως υπό τη μορφή εστέρων με γλυκερόλη (τριγλυκερίδια), τα οποία συνιστούν περισσότερο από το 98% της σύστασης του ελαιόλαδου. Τα δευτερεύοντα αλλά εξίσου σημαντικά συστατικά του ελαιόλαδου είναι τα εξής: φυτοστερόλες, (β-σιτοστερόλη), υδρογονάνθρακες (σκουαλένιο), πτητικές ενώσεις (κυρίως τα δευτερογενή προϊόντα που προκύπτουν λόγω οξείδωσης), τερπενόλες και τερπενικά οξέα (μασλινικό οξύ), πολυφαινολικά συστατικά, νερό, ελεύθερη γλυκερόλη και ελεύθερα λιπαρά οξέα, μονο- και διακυλογλυκερόλες. Ως αποτέλεσμα, το ελαιόλαδο, σαν τρόφιμο, αποτελεί μια σύνθετη μήτρα με πολλά συστατικά, η ανάλυση των οποίων δεν είναι ένα εύκολο έργο. Ο έγκυρος και ακριβής προσδιορισμός της σύνθεσης του ελαιόλαδου δεν είναι μόνο θέμα πιστοποίησης της υπεροχής του έναντι των άλλων βρώσιμων ελαίων, αλλά το πιο σημαντικό θεμέλιο για την αξιολόγηση της ποιότητας και της αυθεντικότητάς του. Ανάμεσα στα συστατικά του ελαιόλαδου, ίσως τον πιο σημαντικό ρόλο παίζουν οι πολυφαινόλες με πιο βασικές κατηγορίες να αποτελούν οι απλές φαινόλες όπως υδρόξυτυροσόλη, τυροσόλη, βανιλίνη, τα σεκοϊριδοειδή όπως τα προϊόντα υδρόλυσης της ελευρωπαΐνης και του λιγκστροσίδη, τα λιγνάνια και τα φλαβονοειδή.



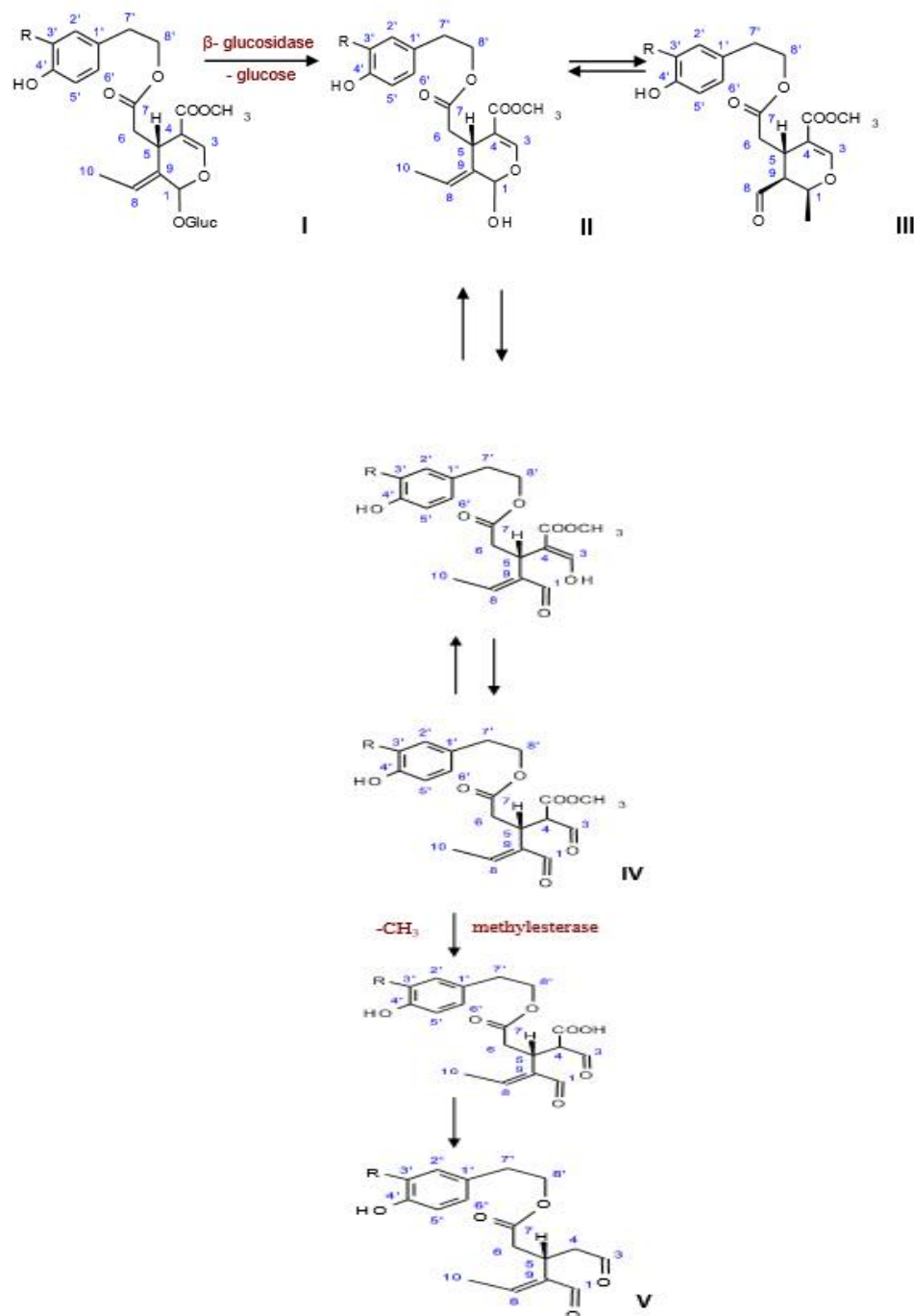
(Πίνακας 4 Χημική σύσταση ελαιολάδου)

1.4.1 Φαινολικές ενώσεις

Οι φαινολικές (ή καταχρηστικά γνωστές ως πολυφαινολικές ενώσεις), είναι οι οργανικές ενώσεις στις οποίες μία (τουλάχιστον) υδροξυλομάδα συνδέεται άμεσα με ένα βενζολικό δακτύλιο. Οι φαινολικές ενώσεις διακρίνονται σε απλές φαινολικές ενώσεις, σύνθετες φαινολικές ενώσεις (φαινολικοί γλυκοσίδες και σεκοϊριδοειδή) και флаβονοειδή. Οι φαινολικές ενώσεις προέρχονται από τον γενικό μεταβολισμό του φαιτυλοπροπανίου, ο οποίος, στα τρία πρώτα του βήματα, αποτελείται από τη μετατροπή της L-φαιτυλαλανίνης σε διάφορα υδροξυκιναμικά οξέα. Τα ένζυμα που καταλύουν τα επιμέρους βήματα αυτής της διαδικασίας είναι, αντιστοίχως: η αμμωνιακή λυάση της φαιτυλαλανίνης (PAL), η κινναμική-4-υδροξυλάση και η CoA λιγάση. Η αμμωνιακή λυάση της L- φαιτυλαλανίνης θεωρείται το βασικό ένζυμο σε φαινολικές βιοσυνθέσεις, δεδομένου ότι καταλύει την αναγωγική απαμίνωση της L-φαιτυλαλανίνης σε μορφή trans-κινναμικού οξέος, το πρώτο βήμα στη βιοσύνθεση των φυτικών φαιτυλοπροπανοειδικών ενώσεων, η οποία περιλαμβάνει το σχηματισμό λιγνίνης, флаβονοειδών και υδροξυκιναμικών οξέων. Η δραστηριότητα της αμμωνιακής λυάσης της L- φαιτυλαλανίνης ποικίλλει ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης του φυτού και τη διαφοροποίηση των ιστών και των κυττάρων, αλλά και κατόπιν επιδράσεως και άλλων παραγόντων, όπως ακτινοβολία, τραυματισμός, διατροφικές ανεπάρκειες του φυτού, ζιζανιοκτόνα φάρμακα και προσβολές από ιούς, μύκητες και έντομα, τα οποία αυξάνουν τη σύνθεση ή τη δραστηριότητα της αμμωνιακής λυάσης της L- φαιτυλαλανίνης σε διάφορα φυτά. (Morello J.R. et al., 2005)

1.4.2 Ιριδοειδή- Σεκοϊριδοειδή

Τα ιριδοειδή είναι μονοτερπένια, που χαρακτηρίζονται από κυκλοπεντανο-(c)πυρανικό σύστημα δακτυλίων. Σαν φυσικά προϊόντα απαντώνται σπάνια σαν άγλυκα, συνήθως σαν γλυκοσίδες στη θέση 1, με διπλό δεσμό στη θέση 3-4 και με υποκαταστάτη στη θέση 4 ένα καρβοξυμεθύλιο ($\text{CH}_3\text{COO}-$). Εάν ανοίξει ο δακτύλιος του κυκλοπεντανίου σχηματίζονται τα σεκοϊριδοειδή, βιογενετικά συγγενείς ενώσεις με τα ιριδοειδή (Βερυκοκίδου- Βιτσαροπούλου Ε., 1997). Στην οικογένεια Oleaceae, συναντώνται συνήθως απλά σεκοϊριδοειδή και σεκοϊριδοειδή τα οποία είναι συζευγμένα με φαινολική ομάδα. Έχουν βασικό σκελετό, τον ολεοσίδη, που χαρακτηρίζεται από ένα εξωκυκλικό 8,9-ολεφινικό τμήμα και είναι συνδυασμός του ελενολικού οξέος με ένα γλυκοσιδικό τμήμα. Όταν ο ολεοσίδης είναι συζευγμένος με μια φαινολική μονάδα, όπως η υδροxyτυροσόλη ή η τυροσόλη, προκύπτουν αντίστοιχα, η ελευρωπαϊνή και ο λιγκστροσίδης. Στην παρούσα εργασία ασχοληθήκαμε με δύο σεκοϊριδοειδή του ελαιόλαδου, την ελαιοκανθάλη και την ελαιασίνη, που αποτελούν τη διαλδεϋδική μορφή του άγλυκου του λιγκστροσίδη χωρίς την καρβοξυμεθυλομάδα και τη διαλδεϋδική μορφή του άγλυκου της ελευρωπαϊνης χωρίς την καρβοξυμεθυλομάδα αντίστοιχα. Η συγκέντρωση της ελαιασίνης και της ελαιοκανθάλης στο ελαιόλαδο, αυξάνεται στο στάδιο της μάλaxης του καρπού, ενώ μειώνεται όσο αυξάνεται η διάρκεια μάλaxης καθώς και η θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιείται το στάδιο αυτό (Servilli M. et al., 2002, Ranalli A. et al., 2001) .



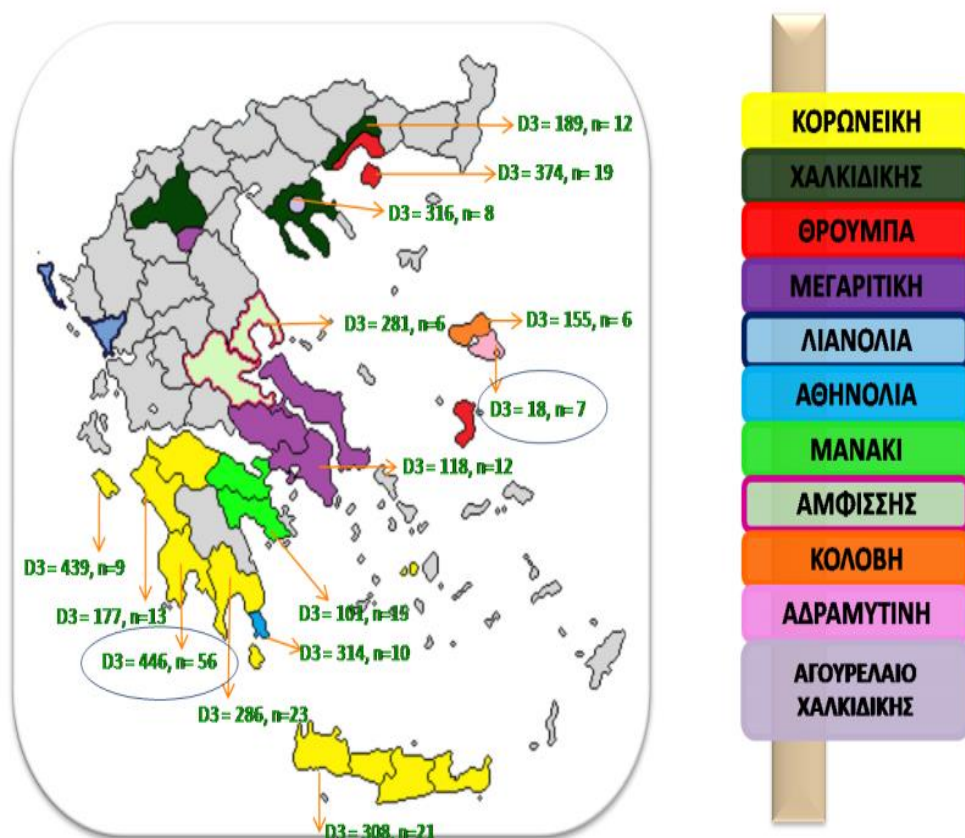
(Εικόνα 5 Πιθανός βιοχημικός μηχανισμός σχηματισμού σεκοΐριδοειδών I) R= H : λιγκτροσίδη, R= OH : ελευρωπαΐνη, II) R= H : άγλυκο του λιγκτροσίδη, R= OH : άγλυκο της ελευρωπαΐνης, III) R= H : αλδεϋδική μορφή του άγλυκου του λιγκτροσίδη, R= OH : αλδεϋδική μορφή του άγλυκου της ελευρωπαΐνης, IV) R= H : διαλδεϋδική μορφή του άγλυκου του λιγκτροσίδη, R= OH : διαλδεϋδική μορφή του άγλυκου της ελευρωπαΐνης, V) R= H : ελαιοκανθάλη, R= OH : ελαιασίνη (Servili M. et al., 2004).)

1.4.3 Περιεκτικότητα σε φαινόλες

Το 2013 πραγματοποιήθηκε η χαρτογράφηση του ελληνικού ελαιολάδου όπου μελετήθηκε ανά περιοχή και ανά ποικιλία η περιεκτικότητα του ελαιολάδου σε φαινολικά συστατικά. Η αναφορά σε αυτήν την ερευνητική εργασία κρίνεται αναγκαία προκειμένου να αντιληφθούμε σε ποιο ποσοστό είναι ρεαλιστικά τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας. (Karkoula et al. , 2014)

Ύστερα από μελέτη 291 δειγμάτων έξτρα παρθένου ελαιόλαδου ελληνικής παραγωγής η μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε φαινόλες κατά μέσο όρο βρέθηκε στην Κορωνέικη ποικιλία και συγκεκριμένα στην περιοχή της Μεσσηνίας από όπου όπως αναφέρεται πραγματοποιήθηκε και μεγαλύτερη δειγματοληψία. Σε αντίθεση με την Κορωνέικη, η Αδραμυτινή από τη Λέσβο χαρακτηρίστηκε η πιο φτωχή ποικιλία.

Στον παρακάτω χάρτη συνοψίζονται τα αποτελέσματα της εργασίας όπου αναφέρεται ο δείκτης D3 ο οποίος είναι το άθροισμα και των τεσσάρων σεκοϊριδοειδών σε mg/kg και πιο συγκεκριμένα το άθροισμα της ελαιοκανθάλης, της ελαιασίνης, της αλδεϋδικής μορφής του άγλυκου της ελευρωπαΐνης και της αλδεϋδικής μορφής του άγλυκου του λιγκστροσίδη ενώ ως η αναφέρεται ο αριθμός των δειγμάτων που αναλύθηκαν. (Karkoula et al. , 2014)



Χάρτης 1. Χαρτογράφηση ελληνικού ελαιολάδου(Karkoula et al. , 2014)

Συμπερασματικά αναφέρεται ότι ελαιόλαδα ίδιας ποικιλίας εμφανίζουν παρόμοιο φαινολικό προφίλ στο φάσμα ^1H - NMR ενώ παρατηρείται επίσης μια διαφοροποίηση μεταξύ διαφορετικών ποικιλιών ελαιολάδου η οποία αφορά ως επί των πλείστων την περιεκτικότητα του ελαιολάδου σε ελαιοκανθάλη και ελαιασίνη. Τέλος αναφέρθηκε πως ίδιας ποικιλίας ελαιόλαδα μπορεί να διαφέρουν μεταξύ τους λόγω των διαφορετικών συνθηκών παραγωγής του ελαιολάδου.

1.4.4 Διάκριση ειδών ελαιολάδου

Στο σημείο αυτό κρίνεται αναγκαίο να αναφερθούν τα διάφορα είδη ελαιολάδου όπως αυτά κατηγοριοποιούνται ανάλογα με τον τρόπο παρασκευής, παραγωγής και επεξεργασίας τους. Τα παρθένα ελαιόλαδα είναι έλαια που προκύπτουν από τον καρπό της ελιάς με μηχανικές ή άλλες φυσικές μεθόδους υπό συνθήκες θερμικές ενώ οι μόνες διαδικασίες που μπορούν να ακολουθηθούν είναι αυτές της πλύσης, της καθίζησης, της φυγοκέντρωσης και της διήθησης. Το παρθένο ελαιόλαδο διακρίνεται σε δύο κατηγορίες, το απλό παρθένο ελαιόλαδο και το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο. Στο εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο δεν επιτρέπονται οργανοληπτικά ελαττώματα και η ελεύθερη οξύτητα εκφραζόμενη σε ελαϊκό οξύ έχει ως ανώτερο όριο τα 0,8g ανά 100g, ενώ τα υπόλοιπα χαρακτηριστικά θα πρέπει να είναι τα προβλεπόμενα για την κατηγορία. Στο απλό παρθένο ελαιόλαδο ο βαθμός οργανοληπτικής αξιολόγησης ελαττώματος είναι μικρότερος του 2,5 και η ελεύθερη οξύτητα, εκφραζόμενη σε ελαϊκό οξύ έχει ως ανώτερο όριο τα 2,0g ανά 100g, ενώ τα υπόλοιπα χαρακτηριστικά του οποίου είναι σύμφωνα με τα προβλεπόμενα για την κατηγορία. Στο ελαιόλαδο LAMPANTE η ελεύθερη οξύτητα, εκφραζόμενη σε ελαϊκό οξύ, είναι ανώτερη των 2,0 g ανά 100 g ενώ ξανά τα υπόλοιπα χαρακτηριστικά είναι τα απαραίτητα για την κατηγορία αυτή.

Επιπλέον κατηγορίες ελαιολάδου αποτελούν το εξευγενισμένο (ραφινέ ελαιόλαδο και το ελαιόλαδο αποτελούμενο από εξευγενισμένα ελαιόλαδα και παρθένα ελαιόλαδα, όπου το στο πρώτο η ελεύθερη οξύτητα, εκφραζόμενη σε ελαϊκό οξύ, δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 0,3 g ανά 100 g ενώ στο δεύτερο το οποίο αποτελεί προϊόν ανάμειξης εξευγενισμένου με παρθένου ελαιολάδου, η ελεύθερη οξύτητα, εκφραζόμενη σε ελαϊκό οξύ, δεν πρέπει να υπερβαίνει το 1,0 g ανά 100 g.

Κατηγορία	Οξύτητα (%) (*)	Δείκτης υπεροξειδίων mEq O ₂ /kg (*)	Κηροί mg/kg (**)	Κορεσμένα λιπαρά οξέα στη θέση 2 του τριγλυκεριδίου (%)	Στηγματοειδή mg/kg (†)	Διαφορά ECN42 HPLC και ECN42 θεωρητικός υπολογισμός	K ₁₃₂ (*)	K ₂₃₀ (†)	Δέλτα-K (*)	Οργανοληπτική αξιολόγηση Διάμεση τιμή του ελαττώματος (Md) (*)	Οργανοληπτική αξιολόγηση Διάμεση τιμή του φρουτώδους (Mf) (*)
1. Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο	≤ 0,8	≤ 20	≤ 250	≤ 1,5	≤ 0,15	≤ 0,2	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0	Mf > 0
2. Παρθένο ελαιόλαδο	≤ 2,0	≤ 20	≤ 250	≤ 1,5	≤ 0,15	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 2,5	Mf > 0
3. Ελαιόλαδο λαμπάντε	> 2,0	—	≤ 300 (‡)	≤ 1,5	≤ 0,50	≤ 0,3	—	—	—	Md > 2,5 (‡)	—
4. Εξευγενισμένο ελαιόλαδο	≤ 0,3	≤ 5	≤ 350	≤ 1,8	—	≤ 0,3	—	≤ 1,10	≤ 0,16	—	—
5. Σύνθετο ελαιόλαδο αποτελούμενο από εξευγενισμένα ελαιόλαδα και παρθένα ελαιόλαδα	≤ 1,0	≤ 15	≤ 350	≤ 1,8	—	≤ 0,3	—	≤ 0,90	≤ 0,15	—	—

(*) Λιθόσωμα ισομερών που θα μπορούσαν να διαχωριστούν (ή όχι) με τριχοειδή σήλη.

(‡) Η εάν η διάμεση τιμή του ελαττώματος είναι κατώτερη από ή ίση του 2,5 και η διάμεση τιμή του φρουτώδους ισούται με 0.

(†) Τα έλαια με περιεκτικότητα σε κηρούς που περιλαμβάνεται μεταξύ 300 και 350 mg/kg θεωρούνται ελαιόλαδα λαμπάντε αν οι ολικές αλειφατικές αλκοόλες είναι κατώτερες από ή ίσες με 350 mg/kg ή αν το ποσοστό σε ερυθροδιόλη και ουβαόλη είναι κατώτερο από ή ίσο του 3,5.

(‡) Τα έλαια με περιεκτικότητα σε κηρούς που περιλαμβάνεται μεταξύ 300 και 350 mg/kg θεωρούνται ακατέργαστα πυρηνέλαια αν οι ολικές αλειφατικές αλκοόλες είναι ανώτερες από 350 mg/kg και αν το ποσοστό σε ερυθροδιόλη και ουβαόλη είναι ανώτερο του 3,5.

Εικόνα 6 Κατηγοριοποίηση των διάφορων τύπων ελαιολάδου

1.4.5 Ελαιόλαδο Volvi Estate

Ύστερα από την ανάλυση αρκετών δειγμάτων επιλέχθηκε η χρησιμοποίηση του ελαιολάδου Volvi Estate Extra Virgin Olive Oil σύμφωνα με διαδικασίες που θα περιγραφούν σε επόμενο κεφάλαιο.



Εικόνα 7. Στιγμιότυπο από το κτήμα Volvi

Το κτήμα Volvi βρίσκεται στις ακτές της λίμνης Βόλβης, 60 χιλιόμετρα μακριά από την Θεσσαλονίκη στην βόρεια Ελλάδα. Με έκταση περίπου 4,000,000 cm² και με περίπου 100,000 ελαιόδεντρα αποτελεί το μεγαλύτερο ιδιωτικό κτήμα αγριελιάς στον ελλαδικό χώρο. Ο πληθυσμός Αγριελιάς εκτείνεται στην περιοχή εδώ και αιώνες, χωρίς να το επηρεάζουν ανθρώπινοι παράγοντες. Τα προϊόντα του κτήματος είναι βιολογικά, έχοντας να επιδείξουν αρκετά βραβεία από διαγωνισμούς ελαιολάδου.

VOLVI ESTATE

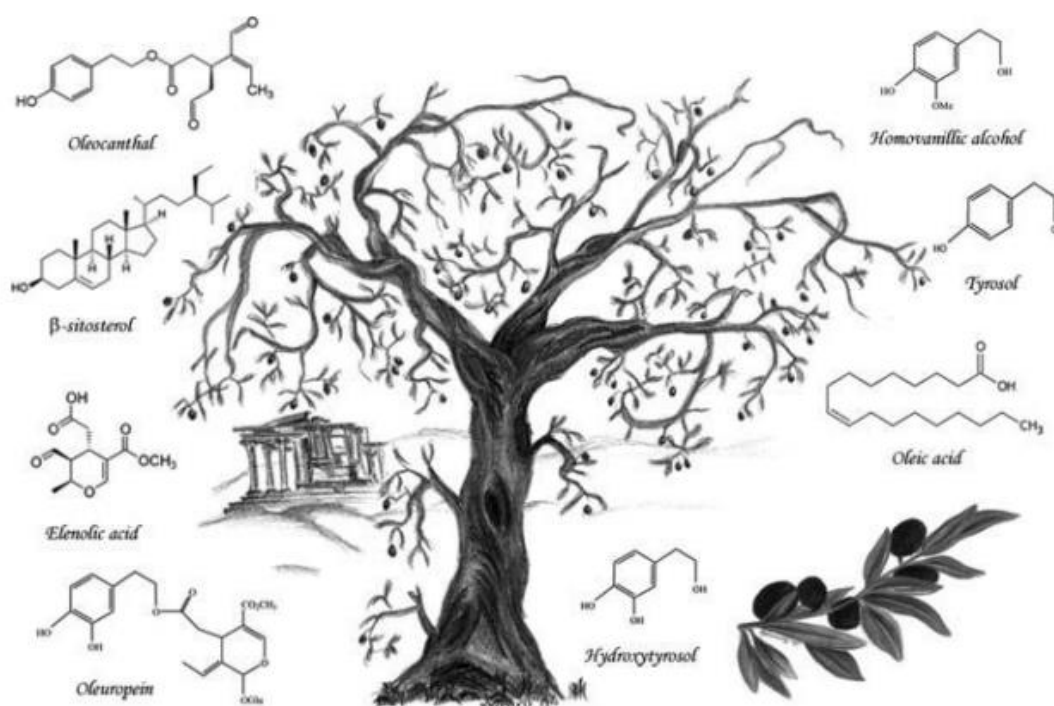


Εικόνα 8. Το ελαιόλαδο του κτήματος Volvi

1.5 Ελαιοκανθάλη και Ελαιασίνη

1.5.1 Βιολογικές δράσεις και ιδιότητες Ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης

Η ελαιοκανθάλη και ελαιασίνη έχουν προσελκύσει τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας. Το γεγονός ότι το ελαιόλαδο, που τις περιέχει σε κάποιο βαθμό ανάλογα με την ποιότητα του και τον χαρακτηρισμό του, αποτελεί βασικό συστατικό στην καθημερινή διατροφή εκατομμυρίων ανθρώπων, κάνει επιτακτική την αποσαφήνιση των βιολογικών δράσεων των φαινολών, ενώ την ίδια στιγμή παράλληλα με τα βήματα που πραγματοποιεί η επιστημονική κοινότητα, ακολουθεί η αύξηση της εμπορικής του αξίας. Οι βιολογικές δράσεις που έχουν αποδοθεί είναι ποικίλες και ευρύτατες μετατρέποντας το ελαιόλαδο από ένα διατροφικό συστατικό σε υγειοπροστατευτικό ή και εν δυνάμει θεραπευτικό προϊόν .



Εικόνα 9 Οι κύριοι μεταβολίτες του ελαιολάδου. (Rafehi et al., 2012).

Πρέπει να αναφερθεί πώς αρκετές επιδημιολογικές μελέτες εμφάνισαν μεγάλες αποκλίσεις σε κατοίκους διαφορετικών χωρών σε ότι αφορά τις τάσεις θνησιμότητας και νοσηρότητας σε διάφορους τύπους καρκίνου όπως μαστού, παχέος εντέρου, προστάτη, ενδομητρίου σε συσχέτιση φυσικά με την κατανάλωση λιπαρών τροφών. Στην πλειονότητα τους οι έρευνες αυτές επικεντρώθηκαν στον κυριότερο τύπο καρκίνο που προσβάλλει τις γυναίκες, τον καρκίνο του μαστού. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι ο κίνδυνος εμφάνισης συνδέεται με την πρόσληψη ζωικών λιπών ενώ δεν συσχετίζεται με την ολική πρόσληψη λιπαρών. Εν αντιθέσει οι γυναίκες εκείνες που στην διατροφή τους κυριαρχούσε το ελαιόλαδο ή άλλα φυτικά έλαια παρουσίασαν μικρότερη επικινδυνότητα για τον καρκίνο μαστού.

1.5.2 Κυτταροτοξική δράση

Η επίδραση της ελαιοκανθάλης σε καρκινικά κύτταρα διαφόρων τύπων έχει μελετηθεί πολύ πρόσφατα.

Μετά από απομόνωση ελαιοκανθάλης από εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο σε *in vitro* πειράματα έχει παρατηρηθεί ότι ακόμα και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό σε κακοήγη κύτταρα τύπου μελανώματος. Η βιωσιμότητα τέτοιου τύπου ανθρώπινων κυττάρων βάση του πρωτοκόλλου WST-1 έδειξαν ότι η ελαιοκανθάλη έχει μια αξιοσημείωτη και επιλεκτική δράση εναντίον των δερμικών ινοβλαστών με IC_{50} σε πολύ χαμηλά επίπεδα. Αυτή ακριβώς η επίδραση παραλληλίζεται με την δράση του ERK1/2 και AKT φωσφορυλίωσης και της μείωσης της έκφρασης της Bcl-2 πρωτεΐνης (Fogli S. et al., 2016).

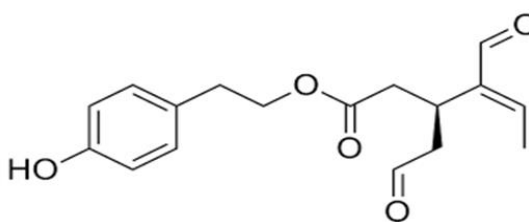
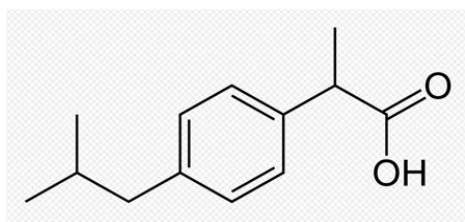
Επιπλέον γνωστή είναι η δράση της ελαιοκανθάλης σε καρκινώματα ηπατικών κυττάρων τύπου HCC που αποτελεί μάλιστα τον πιο συνήθη καρκίνο σε ηπατικά κύτταρα. Η ελαιοκανθάλη επηρεάζει την βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων καθώς και τον κυτταρικό κύκλο αυτών καθώς προκαλεί τον κυτταρικό θάνατο στα HCC κύτταρα περιορίζοντας κατά αυτόν τον τρόπο την ανάπτυξη περαιτέρω του όγκου. Η ελαιοκανθάλη δρα και αναστέλλει την επιθηλιακή μεσενγχυματική μετάβαση μέσω μειωμένης έκφρασης του Twist που είναι στόχος για την STAT3. Επίσης μειώνει την μετατόπιση της πυρηνικής STAT3 καθώς και την ικανότητα του DNA για δέσμευση. Η υπερέκφραση της STAT3 είχε ως αποτέλεσμα την ανακοπή της κυτταροτοξικής δράσης της ελαιοκανθάλης που συγκρατεί την δράση της πρώτης μέσω μείωσης της ενεργότητας της JAK1 και JAK2 κινάσης και αυξάνοντας την ενεργότητα της SHP-1 πρωτεΐνης (Pei T. et al., 2016). Εν συνέχεια πειράματα σε κυτταρικές σειρές MDA-MB-231, MCF-7 και BT-474 έδειξαν πως η ελαιοκανθάλη παρεμποδίζει την εξέλιξη του καρκίνου του μαστού και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων ενώ σε ίδιες συγκεντρώσεις δεν παρατηρήθηκε τέτοιου τύπου επίδραση

της ελαιοκανθάλης σε φυσιολογικά ανθρώπινα κύτταρα MCF10A(Akl MR. et al. , 2014).

Έχει επίσης αναφερθεί στην βιβλιογραφία η εξαιρετική σημασία της ελαιοκανθάλης στην ανθρώπινη διατροφή καθώς έχει αποκαλυφθεί πως εμφανίζει δράση εναντίον καρκινικών κυττάρων πριν ακόμα περάσουν 30 λεπτά από την χορήγηση της ωστόσο η καλλιέργεια των κυττάρων έγινε απουσία ορού. Επιπλέον . στοιχεία κατατέθηκαν για αποπτωτική επαγωγή μέσω επίδρασης στην διαπερατότητα των λυσοσωμικών μεμβρανών. Τα δεδομένα συγκλίνουν στο συμπέρασμα ότι τα καρκινικά κύτταρα που τείνουν να έχουν πιο εύθραυστες λυσοσωμικές μεμβράνες σε σύγκριση με τις μεμβράνες των μη καρκινικών κυττάρων οδηγούνται σε κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από λυσοσωματικούς παράγοντες(LeGendre O. et al., 2015). Επιπλέον μια παραλλαγή της Huisgn 1,3 διπολικής κυκλοπροσθήκης καταλούμενης από τον χαλκό, έδειξε πιθανούς στόχους της ελαιοκανθάλης μέσα στον ανθρώπινο οργανισμό. Τέτοιες πρωτεΐνες όπως οι HSP70 και HSP90 εμπλέκονται σε καρκινικές διαδικασίες(Cassiano C, et al. , 2015).

1.5.3 Ελαιοκανθάλη όπως ιβουπροφαίνη

Η ιβουπροφαίνη (ibuprofen) είναι ένα μη στεροειδές αντιφλεγμονώδες φάρμακο, παράγωγο του προπιονικού οξέος. Έχει σημαντική αντιφλεγμονώδη, αναλγητική και αντιπυρετική δράση που οφείλεται κύρια στην αναστολή της σύνθεσης των προσταγλανδινών που προκαλεί. Η ελαιοκανθάλη έχει βρεθεί ότι διαθέτει ακριβώς την ίδια δράση με την ιβουπροφαίνη διακόπτοντας την παραγωγή προσταγλανδινών, αναστέλλοντας την δράση της κυκλοοξυγενάσης, δρώντας κατά αυτόν τον τρόπο ως ένα φυσικό αντιφλεγμονώδες χωρίς να υπάρχει καμία δομική ομοιότητα μεταξύ των δυο ουσιών (Beauchamp G. et al. , 2005).



Εικόνα 10 Η δομή της ιβουπροφαίνης (υπογραμμισμένη) και η δομή της ελαιοκανθάλης προς σύγκριση

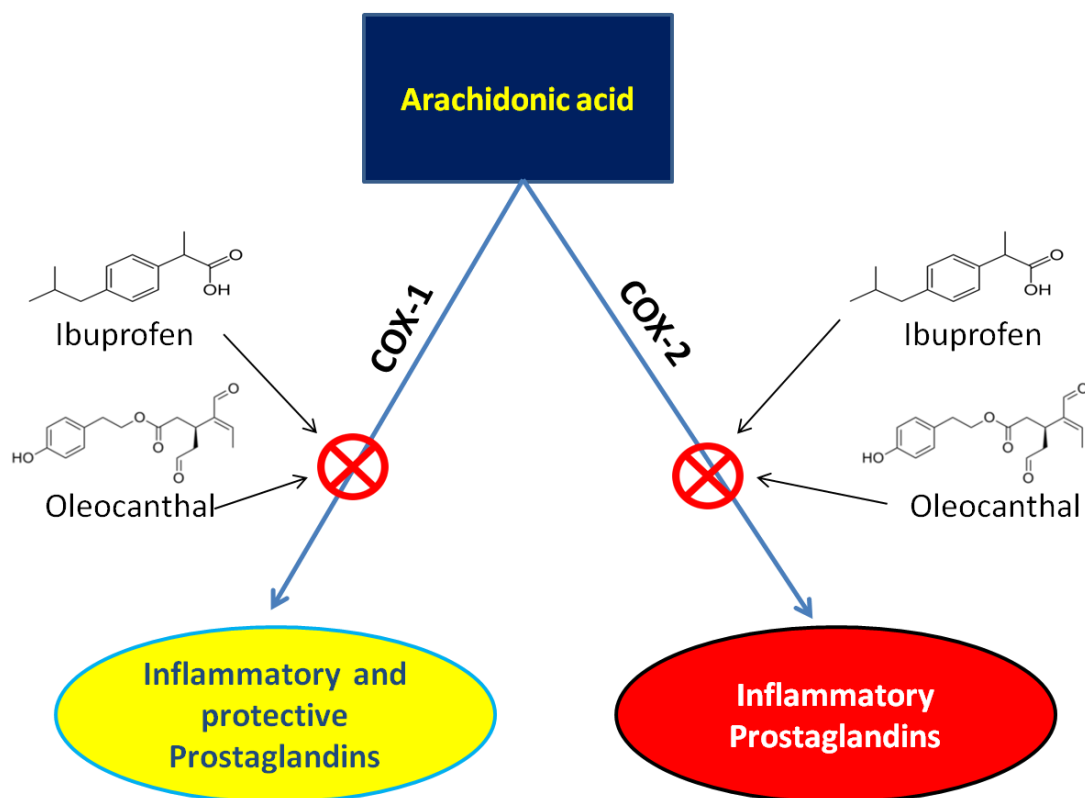
Οι κάτοικοι της μεσογείου ακολουθώντας την μεσογειακή διατροφή εμφανίζουν μειωμένα ποσοστά χρόνιων φλεγμονοπαθειών. Είναι αναγκαίο να τονιστεί ότι αυτή η επισήμανση οφείλεται πιθανά στο εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο και στην δράση της ελαιοκανθάλης και της ελαιασίνης, λόγω της παρόμοιας δράσης της πρώτης με την ιβουπροφαίνη. Οι ουσίες αυτές επιδρούν με διάφορους τρόπους και μέσω διάφορων οδών για να μειώσουν την εμφάνιση των φλεγμονοπαθειών (Parkinson L. et al. , 2015).

Η ελαιοκανθάλη αποτελεί ένα εν δυνάμει όπλο κατά των φλεγμονοπαθειών ενώ εξαιρετικά ενδιαφέρουσα είναι η δράση της στα μακροφάγα ποντικού J774 και στα χονδροκύτταρα ποντικού ATDC5 με εστίαση στην αναστολή που προκαλείται στην έκφραση γονιδίων. Η ελαιοκανθάλη επάγει την παραγωγή οξειδίων του αζώτου και ταυτόχρονα αναστέλλει την δράση των λιποπολυσακχαριτών χωρίς να επηρεάζει την βιωσιμότητα των κυττάρων. Επιπλέον αναστέλλει την έκφραση των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την πρωτεϊνοσύνθεση τόσο για την MIP-1α και της IL-6 πρωτεϊνών τόσο στα ATDC5 χονδροκύτταρα όσο και στα J774 μακροφάγα. Επίσης αναστέλλει την σύνθεση των IL-1β, TNF-α , GM-CSF πρωτεϊνών σε διεγερμένα από λιποπολυσακχαρίτες μακροφάγα (Scotece M. et al., 2012).

Έχει δειχθεί πειραματικά ότι η ελαιοκανθάλη ενεργοποιεί επιλεκτικά την hTRPA1 δίοδο σε κύτταρα HEK 293 κι αυτή ακριβώς η δυνατότητα μαζί με την δυνατότητα διέγερσης των γαγγλίων του τριδύμου στα ποντίκια συνδέεται με την λειτουργική TRPA1 πρωτεΐνη όπως ακριβώς συμβαίνει και με την ιβουπροφαίνη. Χρησιμοποιώντας κύτταρα του ρινικού ιστού και της στοματικής κοιλότητας παρατηρήθηκε μια επικάλυψη στην κατανομή της TRPA1 πρωτεΐνης σε περιοχές ενόχλησης των ανθρώπων από την ελαιοκανθάλη. Προτάθηκε λοιπόν ότι η έκφραση της TRPA1 πρωτεΐνης είναι υπεύθυνη για την ευαισθησία των εν λόγω ιστών στην ελαιοκανθάλη (Peyrot des Gachons C. et al., 2011). Για αυτόν ακριβώς τον λόγο ανά τον κόσμο η ελαιοκανθάλη και η ιβουπροφαίνη μετά την κατανάλωση τους προκαλούν την ίδια ακριβώς αίσθηση.

Χαρακτηρισμένη ως αναστολέας της κυκλοοξυγενάσης, η ελαιοκανθάλη, χρησιμοποιήθηκε για να διαπιστωθεί η επίδραση της σε ενήλικες άντρες. Επιλέχθηκαν λοιπόν τρία διαφορετικά έξτρα παρθένα ελαιόλαδα που όμως διέφεραν ως προς την συγκέντρωση της ελαιοκανθάλης και πιο συγκεκριμένα στην αναλογία ελαιοκανθάλης, ελαιασίνης. Το πρώτο δείγμα περιείχε διπλή ποσότητα ελαιοκανθάλης σε σχέση με την ελαιασίνη, το δεύτερο διπλή ποσότητα ελαιασίνης σε σχέση με την ελαιοκανθάλη και το τρίτο χρησιμοποιήθηκε ως control με μειωμένη συγκέντρωση είτε ελαιοκανθάλης είτε ελαιασίνης ωστόσο είχε παρόμοια

συγκέντρωση φαινολικών συστατικών υπό την μορφή τυροσόλης. Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν συσχετίστηκαν με τις αλλαγές στο άθροισμα της κυκλοοξυγενάσης COX και της 12- λιποξυγενάσης (LOX). Το συμπέρασμα της έρευνας ήταν πως η δράση δεν οφείλεται στο σύνολο των φαινολικών συστατικών αλλά στα συγκεκριμένα συστατικά (Agrawal et al., 2016).



Εικόνα 11 Μηχανισμός δράσης ιβουπροφαίνης και ελαιοκανθάλης

1.5.4 Ελαιοκανθάλη και νευρικό σύστημα

Πειραματικά δεδομένα έχουν δείξει ότι τα διαλυτά ολιγομερή του πεπτιδίου Αβ που προκύπτει από την πρωτεολυτική διάσπαση του ολιγομερούς, εν αντιθέσει με τα άλλα πεπτίδια δρουν ως πρωτογενείς νευροτοξίνες στην νόσο του Alzheimer (AD). Ενώσεις λοιπόν που έχουν την δυνατότητα να αλλοιώσουν την δομή των ανωτέρων ολιγομερών θα μπορούσαν να θεωρηθούν ως θεραπευτική προσέγγιση. Οι φαινολικές ενώσεις έχουν υποδειχτεί στην βιβλιογραφία ότι έχουν την ικανότητα να παρεμβαίνουν στον ολιγομερισμό του Αβ πεπτιδίου. Η ελαιοκανθάλη αυξάνει την ανοσολογική απόκριση των διαλυτών πεπτιδίων Αβ όπως προσδιορίστηκε με την αλληλούχιση και την διαμόρφωση ειδικών αντισωμάτων του αμυλοειδούς, όπως υποστηρίζεται από την μοριακή ανάλυση και μελέτη της διαμόρφωσης που έχουν

παραχθεί έναντι του Αβ αμυλοειδούς. Η ανάλυση δε, των ολιγομερών παρουσία ελαιοκανθάλης έδειξε αύξηση του μοριακού τους βάρους και αλλαγή στην δομή τους. Παρουσία ελαιοκανθάλης εμφανίστηκαν ισοδύναμα ολιγομερή με αυξημένο ανοσοφθορισμό ως αποτέλεσμα της αυξημένης επιλεκτικότητας των αντισωμάτων. Αναφέρεται ότι τα αποτελέσματα δείχνουν πως η ελαιοκανθάλη είναι ικανή να αλλοιώσει τον ολιγομερισμό των ολιγομερών του αμυλοειδούς προστατεύοντας τους νευρώνες από την δράση τους με αποτέλεσμα να αντιμετωπίζεται ως όπλο στην θεραπεία της ασθένειας (Pitt J. et al., 2009). Φαίνεται ότι η ελαιοκανθάλη έχει την δυνατότητα να αυξάνει την αποικοδόμηση του Α β πεπτιδίου από τον εγκέφαλο μέσω της ρύθμισης της Ρ- γλυκοπρωτεΐνης και του LDL λιποπρωτεϊνικού υποδοχέα ο οποίος είναι συσχετιζόμενος, με την κύρια μεταφορική πρωτεΐνη του Αβ στον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, την LRP1 πρωτεΐνη (Abuznait AH. et al., 2013).

Είναι έκδηλη λοιπόν η δυνατότητα της ελαιοκανθάλης να αποτρέπει την συσσώρευση της Αβ, να εξισορροπεί την συγκέντρωση του πεπτιδίου στους εγκεφάλους ποντικών *in vivo* και να αποτρέπει την συσσωμάτωση της πρωτεΐνης *tau in vitro*, υποστηρίζει την χρήση της ένωσης στην θεραπευτική. Όλη η ουσία είναι ακριβώς σε αυτήν της δράση η οποία επιτυγχάνεται σε πειράματα μετά από 4 εβδομάδες χορήγησης σε ποντικούς. Η θεωρία αναφέρει πως επάγει την αύξηση της έκφρασης πρωτεϊνών που είναι υπεύθυνες για αυτήν διαδικασία όπως Ρ- γλυκοπρωτεΐνη και η LRP1 ενώ επισημαίνεται πως ενεργοποιεί το μονοπάτι ΑρσΕ στους εγκεφάλους των ποντικών που επίσης ως ρόλο έχει την εξισορρόπηση – μείωση των επιπέδων της Αβ στον εγκέφαλο (Qosa H. et al., 2015).

Συμπερασματικά αναφέρεται ότι οι λειτουργικές βλάβες, ο εκφυλισμός πρωτεϊνών και η υπερβολική συγκέντρωση πρωτεϊνών και πεπτιδίων είναι οι αιτίες που προκαλούν την ασθένεια του Alzheimer. Εμφανές είναι όμως πως η μεσογειακή διατροφή μέσω της ελαιοκανθάλης και όχι μόνο μπορεί πιθανώς να περιορίσει ή και να αντιστρέψει τα γεγονότα και να αποτρέψει την εμφάνιση της νόσου.

1.5.5 Ελαιασίνη ως αντιφλεγμονώδες

Η ελαιασίνη όπως έχει αποδειχτεί πειραματικά κατέχει κι εκείνη μια θέση στην λίστα με τις ουσίες που έχουν αντιφλεγμονώδη και αντιοξειδωτική δράση. Εξετάστηκε λοιπόν αν η ελαιασίνη αυξάνει την έκφραση της CD163 πρωτεΐνης και του υποδοχέα IL-10 όπως επίσης και της έκκρισης της HO-1 στα ανθρώπινα μακροφάγα. Το αποτέλεσμα έδειξε πως η ελαιασίνη σε συνέργεια με το σύμπλεγμα HbHp11 ή HbHp22 διεγείρει την έκφραση της CD163, της IL-10 και της HO-1 μετά από 5 μέρες συνεπώσεως. Συνεπώς η ελαιασίνη ενισχύει την δράση του συμπλέγματος αιμοσφαιρίνης και απτοσφαιρίνης 1-1 και 2-2 (Filipek A. et al., 2015).

1.5.6 Ελαιασίνη και LOX

Μετά την απομόνωση ελαιασίνης από φύλλο ελιάς, ερευνητές προχώρησαν με μια αποτελεσματική διαδικασία στην ανάπτυξη της ελαιασίνης μέσω ημι- σύνθεσης κάτω από συνθήκες Krapcho δεκαρβομεθοξυλίωσης. Αξιοσημείωτο είναι το αποτέλεσμα της έρευνας, που ανέδειξε ότι η 5- λιποοξυγενάση αποτελεί άμεσο στόχο της ελαιασίνης με μέση ανασταλτική δράση στα 2μM, πιο ισχυρά απ ό τι η ελαιοκανθάλη. Είναι αναγκαίο να αναφερθεί πως η 5- λιποοξυγενάση είναι ένζυμο το οποίο καταλύει τα αρχικά στάδια στην βιοσύνθεση των προφλεγμονώδων λευκοτριενών (Vougiannopoulou et al.,2014).

1.6 Ανάλυση ελαιολάδου

Σε αυτό το κεφάλαιο παρουσιάζονται συνοπτικά οι κυριότερες μέθοδοι που αφορούν την μελέτη του φαινολικού κλάσματος του ελαιολάδου.

Το πρώτο βήμα που ακολουθείται αφορά την εκχύλιση του ελαιολάδου, με τις τεχνικές να πολλαπλασιάζονται συνεχώς και η εξέλιξη τους να είναι αρκετά «λαμπερή», με νέα πρωτόκολλα να δημοσιεύονται συνεχώς, με καλύτερες αποδόσεις από τις προηγούμενες, με << πράσινα>> φιλικά προς το περιβάλλον χαρακτηριστικά ενδυναμώνοντας κατά αυτόν τον τρόπο τις δυνατότητες των ερευνητών και γενικότερα της επιστήμης.

1.6.1 Απομόνωση φαινολικών συστατικών

Σωρεία συστατικών και ένα πολύπλοκο προφίλ συστατικών χαρακτηρίζουν τα φυτικά εκχυλίσματα ενώ από τα συστατικά που εμπεριέχονται είναι αρκετά εκείνα που δεν έχουν ακόμα απομονωθεί και η δομή καθώς και οι ιδιότητες τους παραμένουν ακόμα άγνωστες. Το γεγονός αυτό κάνει εξαιρετικής σημασίας την επιλογή της κατάλληλης μεθόδου που θα επιλεγεί για την εκχύλιση προκειμένου μετά το εκχύλισμα να αναλυθεί και να απομονωθούν οι προσδοκώμενες ενώσεις ενώ όλα αυτά θα πρέπει να επιτευχθούν σε συνδυασμό με την καλύτερη δυνατή

απόδοση και με την ανάγκη να μην πραγματοποιηθούν δομικές αλλαγές στις ενώσεις κατά την κατεργασία.

1.6.2 Υγρή –υγρή εκχύλιση

Το θεωρητικό κομμάτι της διαδικασίας είναι απλό, καθώς γίνεται προσπάθεια να μεταφέρουν οι διαλυμένες ουσίες ενός αρχικού διαλύματος με την βοήθεια ενός διαλύτη, σε ένα δεύτερο διάλυμα. Βασίζεται στην διαφορετική σχετική διαλυτότητα μιας ουσίας σε δύο ή περισσότερα ανάλογα με το σύστημα διαλυτών που χρησιμοποιείται, διαλύτες. Είναι σύνηθες το ελαιόλαδο να διαλύεται σε κάποιον λιπόφιλο διαλύτη όπως εξάνιο σε διάφορες συγκεντρώσεις με μεθανόλη ή και μεθανόλη με νερό. Οι παράγοντες όμως που συντελούν στην διαδικασία είναι πολλοί, έτσι μπορούν να επιλεχθούν διάφορες διαδικασίες που πραγματοποιούνται ταυτόχρονα όπως ανάδευση ή υπέρηχοι. Επόμενο στάδιο ο διαχωρισμός της λιπόφιλης από την υδατική φάση με φυγοκέντρηση στις 3000 rpm για 3 min συνήθως. Η υδατική φάση απομονώνεται και εξατμίζεται σε ήπια θερμοκρασία σε συσκευή απόσταξης rotary evaporator. Μπορεί σε επόμενο βήμα να εκχυλιστεί ξανά το εκχύλισμα άλλες δυο φορές με εξάνιο για περαιτέρω απολίπανση ενώ στην συνέχεια εξατμίζεται πάλι. Το σύστημα διαλυτών πρέπει να επιλέγεται προσεκτικά γιατί επηρεάζει την απόδοση και την δυνατότητα ανάκτησης των πολυφαινολικών στο τελικό εκχύλισμα.

Επίσης έχει χρησιμοποιηθεί σύστημα διαλυτών τετραϋδροφουράνιο/νερό και στην συνέχεια φυγοκέντρηση, καθώς και εκχύλιση με N,N-dimethylformamide.

Η χρήση των υπερήχων συγκριτικά με την απλή ανάδευση μελετήθηκε και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι αν και η απλή ανάδευση δίνει ικανοποιητικά αποτελέσματα, η χρήση υπερήχων κατά την διάρκεια της εκχύλισης έχει ως αποτέλεσμα την βέλτιστη ανάκτηση του φαινολικού κλάσματος. Στην ίδια μελέτη παρουσιάζεται και μια παραλλαγή της μεθόδου αυτή με ψύξη του δείγματος (2-3 ώρες στους -25°C) κατά την οποία επιτυγχάνεται καλύτερη απομάκρυνση του μη πολικού κλάσματος(Klen J. et al., 2012).

Οι μέθοδοι εκχύλισης έχουν εξεταστεί για απλά και υδρολύσιμα φαινολικά συστατικά στο παρθένο ελαιόλαδο, με τις επιλογές στους διαφορετικούς διαλύτες σε διαφορετικά συστήματα να είναι πολλές, και με διαφορετικές συγκεντρώσεις των διαλυμάτων. Το συμπέρασμα ήταν ότι το βέλτιστο σύστημα διαλυτών ήταν το μεθανόλη/νερό (80:20 v/v) σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα. Ωστόσο, λίγα χρόνια αργότερα παρουσιάστηκαν αντίθετα αποτελέσματα(Montedoro G.F. et al., 1992). Η ατελής ανάκτηση κάποιων συστατικών και η δημιουργία γαλακτώματος

ανάμεσα στο νερό και την μεθανόλη τους οδήγησε στο να διαλέξουν καθαρή μεθανόλη για την εκχύλιση (Angerosa F. Et al., 1995).

Δοκιμάστηκε επίσης η εκχύλιση των πολικών συστατικών του ελαιολάδου με τετραϋδροφουράνιο (80:20 v/v) και στην συνέχεια φυγοκέντρωση, και έφτασαν στο συμπέρασμα πως για την συγκεκριμένη μέθοδο η ανάκτηση ήταν πέντε φορές μεγαλύτερη για την υδροξυτυροσόλη και δύο φορές για την τυροσόλη σε σχέση με το σύστημα μεθανόλη/νερό (60:40 v/v). Η χρήση N,N-dimethylformamide έδειξε να έχει ενδιαφέροντα αποτελέσματα στα επίπεδα της ανάκτησης πολυφαινολικών συστατικών (Cortessi N. et al., 1995).

Μετά την διαδικασία της υγρής – υγρής εκχύλισης και με σκοπό την απομόνωση των επιθυμητών αναλυτών από παρεμποδιστικές ουσίες, το υπολειπόμενο έλαιο απομακρύνεται με φύλαξη σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για ένα βράδυ, και φυγοκέντρωση ή επιπλέον εκχύλιση με εξάνιο.

Σε πρόσφατη μελέτη χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση του φαινολικού κλάσματος του ελαιολάδου κύκλο-εξάνιο ως λιπόφιλος διαλύτης και ακετονιτρίλιο. Σύμφωνα με αυτό το πρωτόκολλο 5g ελαιολάδου διαλύονται σε 20 ml Chex και το διάλυμα αναδεύεται για 1min. Στην συνέχεια προστίθενται 25ml ACN και το μίγμα αναδεύεται για άλλο ένα λεπτό. Ο διαχωρισμός των δύο φάσεων γίνεται με φυγοκέντρωση στις 4000rpm για 5 min (Karkoula E. et al., 2012).

Ένα συχνό πρόβλημα που παρατηρείται κατά την προσπάθεια απομόνωσης του φαινολικού κλάσματος του ελαιολάδου με τις διάφορες μεθόδους είναι οι αντιδράσεις που επιτελούνται μεταξύ κάποιων φαινολικών συστατικών και των διαλυτών που χρησιμοποιούνται και που έχουν ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό προϊόντων που δεν υπάρχουν στο αρχικό εκχύλισμα.

Σε μελέτη που έγινε για την εξακρίβωση της επίδρασης του διαλύτη στις ουσίες που εμπεριέχονται στο φαινολικό κλάσμα, προκύπτει ότι τόσο η ελαιοκανθάλη όσο και η ελαιασίνη κατά την διάλυση τους σε μεθανόλη καθώς και σε υδατικό διάλυμα μεθανόλης, αντιδρούν και προκύπτουν ημιακετάλες ή ακετάλες. Αντίθετα με την χρήση ακετονιτρίλιου καμία αλλαγή δεν παρουσιάζεται στο τελικό εκχύλισμα. Συχνό επίσης είναι το φαινόμενο ισομερίωσης των ενώσεων όπως παρουσιάστηκε σε πρόσφατη εργασία (Adhami et al., 2015).

1.6.3 Εκχύλιση στερεής φάσης

Η εκχύλιση στερεής φάσης (SPE) είναι μια διαδικασία διαχωρισμού κατά την οποία τα συστατικά τα οποία είναι διαλυμένα σε ένα διάλυμα είναι δυνατόν να διαχωριστούν βάσει των διαφορετικών φυσικοχημικών τους ιδιοτήτων.

Η μεγάλη ευελιξία της SPE οδήγησε τους ερευνητές στο να χρησιμοποιήσουν την τεχνική αυτήν για την ανάκτηση φαινολικών συστατικών από το παρθένο ελαιόλαδο. Η ευρεία χρήση της τεχνικής αυτής είχε ως αποτέλεσμα να προταθούν πολλά συστήματα διαλυτών, τόσο για το στάδιο της απομόνωσης, όσο και για το στάδιο του καθαρισμού ενός εκχυλίσματος.

Η εκχύλιση στερεής φάσης περιλαμβάνει δύο καταστάσεις λειτουργίας, την λειτουργία κανονικής φάσης και την λειτουργία αντίστροφης φάσης. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μέθοδοι για την SPE είναι με χρήση silica C8 (κανονική φάση) και C18 (αντίστροφη φάση).

Το 2001 χρησιμοποιήθηκαν στήλες με silica C-18 σύμφωνα με το ακόλουθο πρωτόκολλο: 1 g ελαιολάδου διαλύεται σε 10 ml εξανίου και τοποθετείται σε μία στήλη η οποία προηγουμένως είχε εκλουσθεί με 2x10 ml μεθανόλης και 2x10 ml εξανίου. Στην συνέχεια η στήλη εκλούεται με 4x10 ml εξανίου ώστε να απομακρυνθούν οι λιπόφιλες ενώσεις. Το φαινολικό κλάσμα και όποιες πολικές ενώσεις έχουν παραμείνει στην στήλη ανακτώνται με έκλυση με 4x10 ml μεθανόλης. Σύμφωνα με τους συγγραφείς, τα αποτελέσματα δεν συμφωνούν πλήρως με εκείνες της εκχύλισης υγρού-υγρού. (Liberatore L. et al., 2001)

Οι στήλες C-18 έχουν χρησιμοποιηθεί αρκετές φορές για την απομόνωση φαινολικών ενώσεων από τα παρθένα ελαιόλαδα. Οι στήλες ιοντικής ανταλλαγής, έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση φαινολικών κλασμάτων από διάφορα έλαια, αλλά οι ανακτήσεις που επιτεύχθηκαν ήταν αρκετά χαμηλές (53-62%). Ακόμα, πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα παρουσίασαν οι Mateos et al που δούλεψε με στήλη αμίνης η οποία έδειξε αποτελέσματα ανάκτησης μεγαλύτερη του 90% σε όλα τα φαινολικά συστατικά.

Τέλος , και όσο αφορά την στήλη που θα επιλέξει ο εκάστοτε ερευνητής για την απομόνωση του φαινολικού κλάσματος, χρήσιμο εργαλείο αποτελούν οι στήλες diol-bonded, οι οποίες αποτελούν την μέση οδό μεταξύ silica κανονικής και αντίστροφης φάσης, ενώ είναι συμβατές με μεγάλο εύρος διαλυτών. (R'ios J. J. et al., 2005)

Συνοψίζοντας όλα αυτά που αναφέρθηκαν στο κεφάλαιο αυτό, συμπεραίνεται ότι η στήλη C-18 είναι μια αξιόπιστη μέθοδος για την απομόνωση απλών φαινολικών ουσιών. Ωστόσο, παρουσιάζεται χαμηλή ανάκτηση στην περίπτωση σεκοϊριδοειδικών παραγώγων και κυρίως των διαλδεΐδικών μορφών τους. Σε μια πρόσφατη μελέτη, 15 φαινολικά συστατικά απομονώθηκαν με σκοπό την μελέτη των ανακτήσεων του κάθε αναλυτή, και έδειξε ότι η υγρή – υγρή εκχύλιση έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα σε βαθμούς ανάκτησης των φαινολικών από δείγμα φαινολών που προστέθηκε σε έλαιο άλλης πηγής πέρα του ελαιολάδου.

1.6.4 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας

Η χρωματογραφία χάρτου και η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, έχουν επινοηθεί και αξιοποιηθεί για προκαταρκτικούς διαχωρισμούς και για το στάδιο του καθαρισμού του φαινολικού εκχυλίσματος του ελαιολάδου.

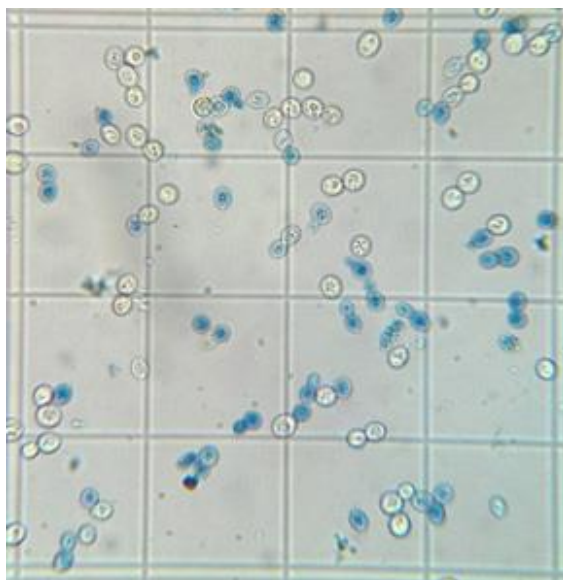
Παλαιότερα, η χρωματογραφία χάρτου και η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, είχε μικρή εφαρμογή στον διαχωρισμό των φαινολικών συστατικών του παρθένου ελαιολάδου. Ωστόσο, ο διαχωρισμός περίπου 20 φαινολικών συστατικών ή συγκεκριμένων φαινολικών ομάδων από το ελαιολάδο με την χρήση silica σε TLC (Thin layer chromatography), κυτταρίνης, και πολυαμιδίου, έχουν αναφερθεί στην βιβλιογραφία. Η έκλυση των συστατικών του πολικού εκχυλίσματος του ελαιολάδου έχει γίνει και με δισδιάστατη TLC με την χρήση διαφόρων συστημάτων. (Roncero A. V. et al. , 1974) n-βουτανόλη/οξικό οξύ/νερό (5:4:1) (σύστημα A) και νερό (σύστημα B) ; τολουένιο /ethyl formate /φορμικό οξύ (5:4:1) (σύστημα A) και οξικό οξύ 2% (σύστημα B) βενζένιο/μεθανόλη/νερό(80:1:1)(σύστημα A) βενζένιο/μεθανόλη/νερό (45:8:4) (σύστημα B).

Επιπλέον, έχουν χρησιμοποιηθεί πλάκες TLC με κυτταρίνη και πολυαμίδιο για στατικές φάσεις. Στην πρώτη περίπτωση, η κινητή φάση ήταν: χλωροφόρμιο/οξικό οξύ/νερό (8:2:1) ενώ στην δεύτερη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε σύστημα μεθανόλη/ακετόνη/νερό (3:1:1) ή μεθανόλη/ακετόνη/νερό (6:1:1) (Ragazzi E. et al. , 1973)

Σήμερα, η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για καθαρισμό εκχυλισμάτων και όχι για ποιοτικό έλεγχο.

1.6 Μελέτη κυτταροτοξικότητας με την μέθοδο Trypan blue

Η ουσία Trypan blue παράγεται από την τολουδίνη $C_{14}H_{16}N_2$ η οποία είναι οποιαδήποτε από τα τρία μεταμερικά αμιδο- παράγωγα του τολουόλιου ανάλογα της ανιλίνης. Η χρώση αυτή είναι επίσης γνωστή και ως μπλε της διαμίνης ή μπλε του Νιαγάρα. Τα ζωντανά κύτταρα έχοντας συμπαγείς μεμβράνες δεν δύναται να χρωματιστούν εφόσον διατηρούν την εκλεκτικότητα τους στις ενώσεις που θα διαπεράσουν την μεμβράνη τους, εν αντιθέσει με τα νεκρά κύτταρα που δεν διατηρούν την παραπάνω ιδιότητα και ως εκ τούτου βάφονται. Η μέθοδος αυτή αναφέρεται σαν μέθοδος αποκλεισμού μέσω χρώσης ακριβώς επειδή τα ζωντανά κύτταρα αποκλείονται από την χρώση.



Εικόνα 12 Απεικόνιση της χρώσης των νεκρών κυττάρων

και της μη χρώσης των ζωντανών κυττάρων.

2. Πειραματικό μέρος

Το πειραματικό κομμάτι της παρούσας εργασίας, επικεντρώθηκε στο φαινολικό κλάσμα του ελαιολάδου. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκαν και παρατηρήθηκαν οι βιολογικές δράσεις δυο ενώσεων που απομονώνονται από το ελαιόλαδο, την ελαιοκανθάλη και την ελαιασίνη. Η εργασία εστιάστηκε σε αυτές τις δυο ενώσεις ακριβώς γιατί έχει εκεί εστιαστεί το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας τα τελευταία χρόνια με τα αποτελέσματα να παρουσιάζονται και να δημοσιεύονται συνεχώς νέα δεδομένα. Στην βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετές αναφορές για την δράση των εν λόγω ουσιών που φαίνεται να παρουσιάζουν τόσο κυτταροτοξική δράση σε μη φυσιολογικά κύτταρα και ακόμα και προστατευτική δράση σε φυσιολογικά κύτταρα.

Για την απομόνωση των ενώσεων, χρησιμοποιήθηκαν διάφορες μέθοδοι, όπως υγρή- υγρή εκχύλιση και εκχύλιση στερεής φάσης. Καθ όλη την διάρκεια των διεργασιών οι χειρισμοί ήταν προσεκτικοί καθώς ο κίνδυνος να μετασχηματιστούν ή και να διασπαστούν οι ουσίες αυτές ήταν αυξημένος κατά την διάρκεια της απομόνωσης. Έτσι λοιπόν για να προχωρήσει η πειραματική διαδικασία κρίθηκε αναγκαίο να ταυτοποιούνται οι ουσίες σε κάθε στάδιο μέσα από φάσματα NMR. Τα παραπάνω πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο τμήμα Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου.

Στη συνέχεια αφού απομονώθηκαν οι συγκεκριμένες ενώσεις εισήχθησαν σε κυτταροκαλλιέργειες κυττάρων προκειμένου να μελετηθεί η βιολογική τους δράση. Στα κύτταρα επαγόταν ο κυτταρικός θάνατος με χημική απόπτωση και παρατηρήθηκαν διαφορές οι οποίες σε ορισμένες περιπτώσεις κρίθηκαν αξιοσημείωτες. Τα πειράματα αυτά πραγματοποιήθηκαν στο τμήμα Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου.

2.1 Υλικά και μέθοδοι

Στο εν λόγω κεφάλαιο παρουσιάζονται οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν και ακολουθήθηκαν τόσο για την απομόνωση των ουσιών και την ταυτοποίηση τους όσο και για την μελέτη των βιολογικών τους δράσεων.

A) Υγρή υγρή εκχύλιση ελαιολάδου

Η εκχύλιση του φαινολικού κλάσματος του ελαιολάδου έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο εκχύλισης που δημοσιεύτηκε προσφάτως από τους Karkoula E. et al. Χρησιμοποιήθηκαν διαλύτες όπως κυκλοεξάνιο (cHex) και το ακετονιτρίλιο (ACN) .

B) Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatography)

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας χρησιμοποιήθηκε κυρίως για τον ποιοτικό έλεγχο των προσλαμβανόμενων προϊόντων.

Γ) Φασματοσκοπία NMR

Για την ταυτοποίηση των ενώσεων που εκχυλίσουμε χρησιμοποιήσαμε την μέθοδο φασματοσκοπίας NMR. Ελήφθησαν δείγματα ^1H NMR σε φασματογράφο μαγνητικού πεδίου 400 MHz.

Δ) Καλλιέργειες κυττάρων

Πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες κυττάρων CHO, CHO/ DDC, SY5Y, Mcf- 7 καθώς και HeLa.

E) Κυτταρικός θάνατος

Στα κύτταρα επαγόταν ο κυτταρικός θάνατος μέσω τεχνητής απόπτωσης με την χορήγηση σταυροσπορίνης(Sts) .

Z) Μελέτη κυτταροτοξικότητας

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων παρατηρούταν στη συνέχεια με την χρώση των κυττάρων με το αντιδραστήριο Trypan blue και με την βοήθεια του αιμοκυτταρόμετρου.

2.1.1 Πρωτόκολλο εκχύλισης και φασματοσκοπικός προσδιορισμός

Το πρώτο βήμα της ερευνητικής μελέτης ήταν η επιλογή του ελαιολάδου από το οποίο θα απομονωνόταν η ελαιοκανθάλη και η ελαιασίνη. Ακολουθήθηκε ανάλυση μεγάλου αριθμού ελαιολάδου για την επιλογή εκείνου με την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ελαιοκανθάλη και ελαιασίνη.

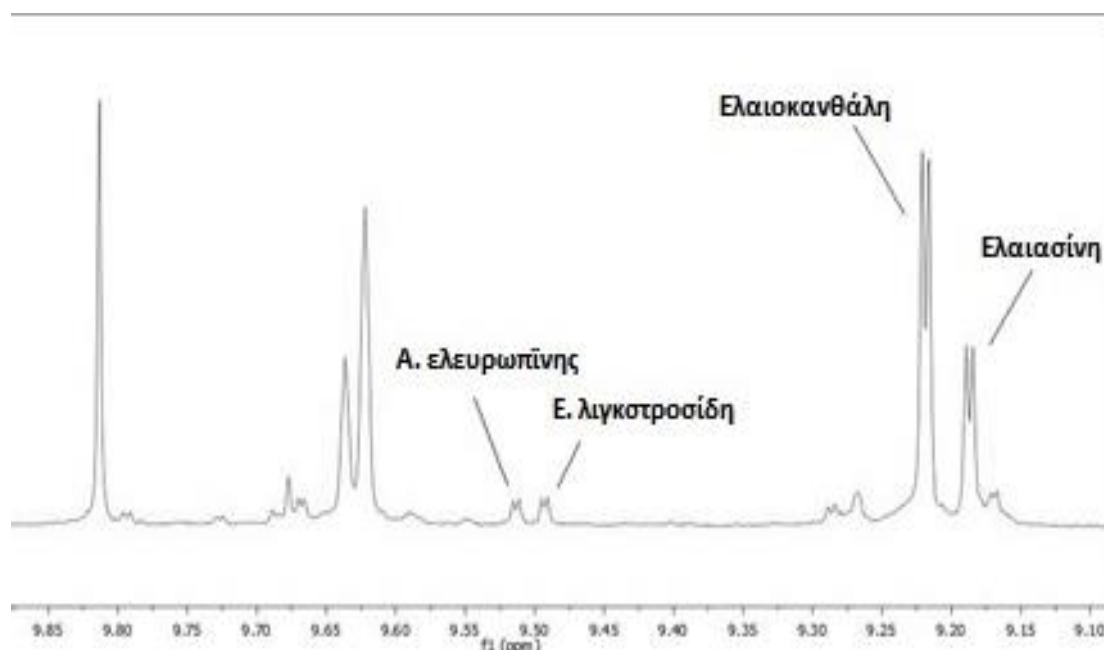
Σε εναρμονισμό με το δημοσιευμένο πρωτόκολλο (Karkoula et al., 2012) 5 g ελαιολάδου ζυγίζονται και διαλύονται σε 20ml κυκλοεξάνιο (cHex) . Το διάλυμα αναδεύεται για 1 min και στη συνέχεια προστίθενται 25ml ακετονιτρίλιο (ACN) και αναδεύουμε για ακόμα 1 min. Το μίγμα εναποτίθεται σε falcon και φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στις 4000 rpm με σκοπό να υποβοηθηθεί ο διαχωρισμός των δύο φάσεων. Συλλέγουμε την φάση του ακετονιτριλίου δηλαδή 25ml και προσθέτουμε 1ml διάλυμα συρριγγαλδεΐδης (0,5 mg/ ml) σε ακετονιτρίλιο. Εξατμίστηκε το διάλυμα με την βοήθεια rotary evaporator μέχρι ξηρού και επαναδιαλύτοποιήθηκε σε 750 μl δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3). Παραλαμβάνουμε 550 μl τα οποία και τοποθετούμε σε σωληνάκι NMR.



Εικόνα 13 Μηχάνημα rotary evaporator στο οποίο εξατμίστηκαν τα εκχυλίσματα μέχρι ξηρού

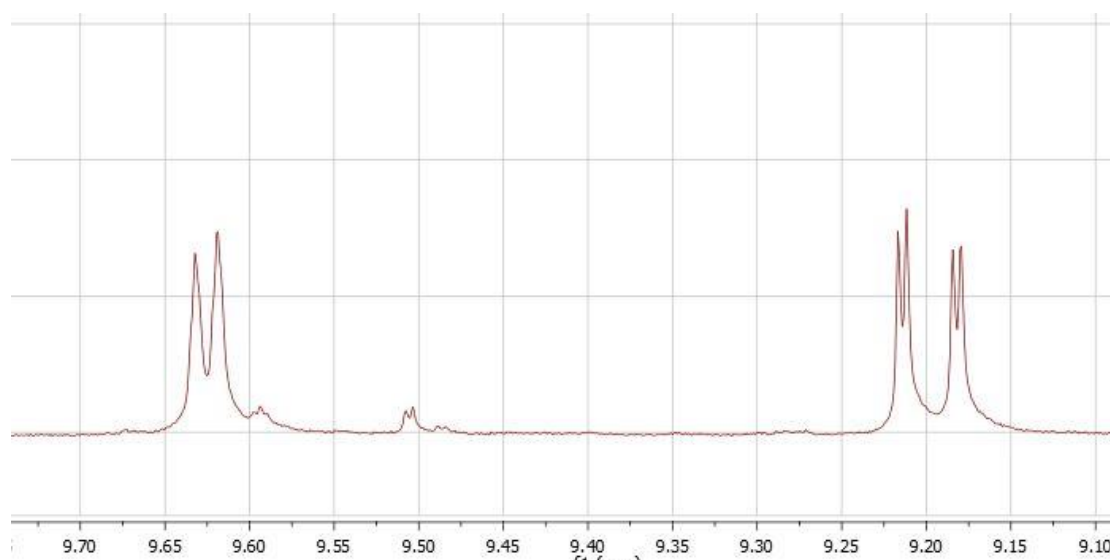
Τα φάσματα πρωτονίου NMR ελήφθησαν σε 400 MHz (Bruker Avance 400). Ελήφθησαν 50 scans σε 32K και εύρος 0-16 ppm με relaxation delay 1 s και acquisition time 1.7 s. Αμέσως μετά τον μετασχηματισμό Fourier εφαρμόστηκε exponential weighing factor 0.3 Hz. Η διόρθωση του φάσματος, οι ολοκληρώσεις και όλες οι επεξεργασίες πραγματοποιήθηκαν στο πρόγραμμα MestRenova. Κατά την

ανάλυση του ελαιολάδου λοιπόν οι κορυφές ολοκλήρωσης που αφορούσαν τα φαινορικά συστατικά ήταν στα 9,19 ppm για την ελαιασίνη και στα 9,23 ppm για την ελαιοκανθάλη.



Εικόνα 14 Τυπικό φαινολικό προφίλ ελαιολάδου

Παρατίθεται το φάσμα πρωτονίου του λαδιού που επιλέχθηκε τελικά.



Φάσμα 1 Το εκχύλισμα ελαιολάδου

Το ελαιόλαδο που επιλέχθηκε ήταν της εταιρείας Volvi Estate (Μαρκομιχελάκη) από αγριελιές στην περιοχή της λίμνης Βόλβης. Μετά την επιλογή πραγματοποιήθηκε επανάληψη της ανωτέρω διαδικασίας σε μεγαλύτερη όμως κλίμακα αυτήν την

φορά. 500 g ελαιολάδου ζυγίζονται και διαλύονται σε 2L κυκλοεξάνιο (cHex) . Το διάλυμα αναδεύεται για 1 min και στη συνέχεια προστίθενται 2.5L ακετονιτρίλιο (ACN) και αναδεύουμε για ακόμα 1 min. Το μίγμα εναποτίθεται σε μεγάλα δοχεία και φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στις 4000 rpm με σκοπό να υποβοηθηθεί ο διαχωρισμός των δύο φάσεων. Έγινε συλλογή της φάσης του ακετονιτρίλιου δηλαδή 2,5L. Εξατμίστηκε το διάλυμα με την βοήθεια rotary evaporator μέχρι ξηρού, με αποτέλεσμα να παραληφθεί 500 mg εκχύλισμα το οποίο περιείχε σε αναλογία 1:1 ελαιοκανθάλη και ελαιασίνη.

Η ακριβής ποσότητα ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης στο εκχύλισμα υπολογίστηκε με την βοήθεια εσωτερικού προτύπου ούτως ώστε να εξασφαλιστεί η προσομοίωση της συμπεριφοράς τους όταν βρίσκονται μέσα στο ελαιόλαδο για τον καλύτερο ποσοτικό προσδιορισμό τους. Αρχικά επιλέχτηκε ως εσωτερικό πρότυπο η συριγγαλδεΐδη ή (4hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyde), αφ' ενός γιατί δεν υπάρχει στο ελαιόλαδο και αφετέρου διότι το σήμα που δίνει το πρωτόνιο της αλδεΐδης της στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ βρίσκεται σε περιοχή που δεν επικαλύπτει κανένα σήμα των ουσιών που μελετήθηκαν και συγκεκριμένα στα 9,81 ppm, έτσι ακριβώς όπως υποδηλώνει η βιβλιογραφία (Karkoula et al., 2012). Ο ακριβής υπολογισμός βασίζεται στην αναλογία της ολοκλήρωσης της κορυφής του αλδευδικού πρωτονίου της ελαιοκανθάλης(9,23 ppm) και της ελαιασίνης(9,54ppm) ως προς την ολοκλήρωση του αλδευδικού πρωτονίου της συριγγαλδεΐδης (9,81 ppm). Χρησιμοποιήθηκε η καμπύλη αναφοράς της ελαιοκανθάλης και της ελαιασίνης όπως προκύπτει από τους παρακάτω πίνακες.

Αναλογία	Εξίσωση παλινδρόμησης	Συντελεστής συσχέτισης r^2
Ελαιοκανθάλη/ Εσωτερικό πρότυπο	$y=270,1x+4,2$	0,999

Πίνακας 5. Καμπύλη αναφοράς για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ελαιοκανθάλης σε ελαιόλαδο

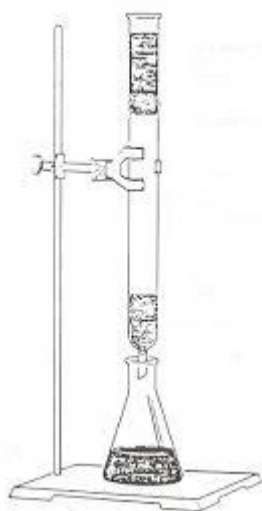
Αναλογία	Εξίσωση παλινδρόμησης	Συντελεστής συσχέτισης r^2
Ελαιασίνη/ Εσωτερικό πρότυπο	$y=279,7x+6,5$	0,994

Πίνακας 6. Καμπύλη αναφοράς για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ελαιασίνης σε ελαιόλαδο

Υπολογίστηκε λοιπόν ότι το εκχύλισμα περιείχε περίπου 100mg ελαιοκανθάλης και 90mg ελαιασίνης.

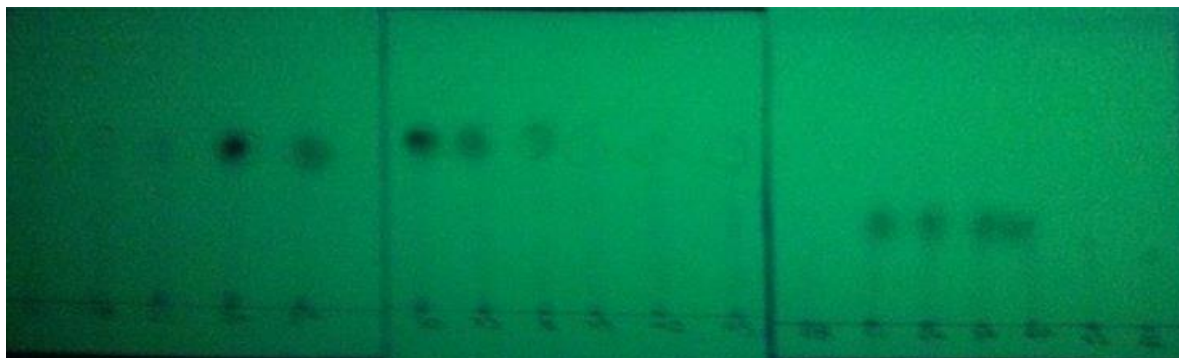
2.1.2 Απομόνωση ενώσεων

Με το προηγούμενο βήμα επετεύχθη η απομάκρυνση μεγάλου μέρους μη πολικών ενώσεων από το ελαιόλαδο και κυρίως τα λιπίδια. Για την απομόνωση των ενώσεων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της χρωματογραφίας αντιστρόφου φάσεως για να πετύχουμε έναν όσο γίνεται καλύτερο καθαρισμό του εκχυλίσματος. Σε στήλη λοιπόν 20x 1 cm τοποθετήσαμε silica gel αντίστροφης φάσης και τοποθετήθηκε το εκχύλισμα. Στη συνέχεια έγινε έκλουση με ακετονιτρίλιο και νερό (90: 10). Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε δυο φορές, κάθε φορά τοποθετούνταν στην στήλη 200 mg εκχυλίσματος.



Εικόνα 15 Στήλη χρωματογραφίας

Τα κλάσματα που συλλέχτηκαν ήταν 70 σε αριθμό όγκου 10ml το καθένα και εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού με την βοήθεια της συσκευής απόσταξης rotary evaporator αφού προηγουμένως είχε εξεταστεί σε ποια από τα κλάσματα βρίσκονται οι ενώσεις. Η εν λόγω διαδικασία έγινε σε πλάκες κανονικής φάσης με μικροποσότητα εκχυλίσματος ενώ οι πλάκες αναπτύχθηκαν σε σύστημα cHex: EtOAc 60:40 ενώ επιλέχτηκαν για εξάτμιση τα κλάσματα από 20 έως 32 για την απομόνωση της ελαιοκανθάλης και τα κλάσματα 47 έως 55 για την απομόνωση ελαιασίνης. Ο έλεγχος δε έγινε με οπτική παρατήρηση στα 254nm. Παραλάβαμε εν τέλει 90mg καθαρής ελαιοκανθάλης και 85mg καθαρής ελαιασίνης.



Εικόνα 16 Πλάκα TLC που αναπτύχθηκε για τον διαχωρισμό των κλασμάτων για την απομόνωση του ουσιών.

Πρέπει σε αυτό το σημείο να αναφερθεί εκ νέου πως πριν την εξάτμιση και μετά την παρατήρηση των πλακών χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας, πραγματοποιήθηκε λήψη φάσματος NMR ακριβώς για την επιβεβαίωση ύπαρξης των φαινολών στα κλάσματα, και μετά την εξάτμιση των εκχυλισμάτων, αυτά διαλύθηκαν σε 600 μl δευτεριωμένου χλωροφορμίου(CDCl_3) τα οποία και τοποθετούμε σε σωληνάκι NMR.

Όσο αφορά την ελαιοκανθάλη στο ^1H NMR παρατηρούνται τα εξής:

- ❖ Μια ευρεία απλή κορυφή στα 9,64 ppm που ολοκληρώνει για ένα H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της αλδεΐδης που εμφανίζεται στη θέση 3.
- ❖ Μια διπλή κορυφή στα 9,24 ppm που ολοκληρώνει για ένα H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της αλδεΐδης που εμφανίζεται στη θέση 1 ($J_{1-5} = 2.0 \text{ Hz}$).
- ❖ Μια διπλή κορυφή στα 7,05 ppm που ολοκληρώνει για 2 H αρωματικού πυρήνα, τα οποία αντιστοιχούν στα πρωτόνια των θέσεων 8' και 4'. Έχουν όρθο σύζευξη με τα H των θέσεων 5' και 7' ($J_{4'-5' / 7'-8'} = 8.5 \text{ Hz}$).
- ❖ Μια διπλή κορυφή στα 6,77 ppm που ολοκληρώνει για 2 H αρωματικού πυρήνα, τα οποία αντιστοιχούν στα πρωτόνια των θέσεων 5' και 7'. Έχουν όρθο σύζευξη με τα H των θέσεων 4' και 8' ($J_{5'-4' / 8'-7'} = 8.5 \text{ Hz}$).
- ❖ Στα 6,66 ppm εμφανίζεται μια τετραπλή κορυφή, που ολοκληρώνει για ένα H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 9. Έχει σύζευξη με το H-10 ($J = 7.1 \text{ Hz}$).

- ❖ Μια πολλαπλή κορυφή στα 4,22 ppm που ολοκληρώνει για 2 H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 1'.
- ❖ Στα 3,62 ppm εμφανίζεται μια πολλαπλή κορυφή και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 5. Έχει σύζευξη με τα H των θέσεων 6, 4 και 1.
- ❖ Στα 2,99 ppm και 2,74 ppm εμφανίζονται δυο διπλές- διπλές- διπλές κορυφές που ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η κάθε μια, και αντιστοιχούν στα H-4a ($J_{4ab}=18.4$ Hz, $J_{4a-5}= 8.5$ Hz, $J_{4a-3}=1.0$ Hz) και 4β ($J_{4b-a}=18.4$ Hz, $J_{4b-5}= 5.5$ Hz, $J_{4b-3}=2.4$ Hz).
- ❖ Μια τριπλή κορυφή στα 2,83 ppm, η οποία ολοκληρώνει για 2 H ανήκει στα H της θέσης 2'. Εμφανίζει σύζευξη με τα H της θέσης 1' ($J= 6.8$ Hz).
- ❖ Στα 2,66 ppm έχουμε την πολλαπλή κορυφή του H- 6, η οποία ολοκληρώνει για 2.
- ❖ Τέλος, στα 2,08 ppm εμφανίζεται η διπλή κορυφή του μεθυλίου της θέσης 10, και η οποία ολοκληρώνει για 3 H και έχει σύζευξη με το H- 9 ($J= 7.1$ Hz).

Άτομο	$^{13}\text{C-NMR}$ (δ ppm)	$^1\text{H-NMR}$ (δ ppm, J Hz)
1	200,25	9.24(1H, d, $J=2.0$ Hz)
3	195,09	9.64(1H, brs)
4a	46.2	2.99(1H, ddd, $J= 18.4$ Hz, 8.5 Hz, 1.0 Hz)
4b	-	2.74(1H, ddd, $J= 18.4$ Hz, 5.5 Hz, 1.0 Hz)
6	26.97	3.62(1H, m)
6	36.82	2.66(2H, m)
7	171.99	-
8	143.39	-
9	153.82	6.66(1H, q, $J=7.1$ Hz)
10	15.25	2.08(3H, d, $J=7.1$ Hz)
1'	64.72	4.22(2H, m)
2'	34.24	2.83(2H, t, $J=6.8$ Hz)
3'	129.86	-

4', 8'	130.14	7.05(2H, d, J= 8.5Hz)
5', 7'	115.337	6.77(2H, d, J= 8.5Hz)
6'	154.0	-

Εικόνα 17 Φασματοσκοπικά δεδομένα ¹H-NMR και ¹³C-NMR (CDCl₃) της ελαιοκανθάλης

Αντιστοιχώς για την ελαιαίνη:

- Μια ευρεία απλή κορυφή στα 9,65 ppm που ολοκληρώνει για ένα H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της αλδεΐδης που εμφανίζεται στη θέση 3.
- Μια διπλή κορυφή στα 9,21 ppm που ολοκληρώνει για ένα H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της αλδεΐδης που εμφανίζεται στη θέση 1 ($J_{1-5} = 1.8$ Hz).
- Στα 6,79 ppm έχουμε μια διπλή κορυφή για το H- 7' ($J_{7'-8'} = 8.0$ Hz).
Μια διπλή κορυφή του H- 4' στα 6,72 ppm ($J_{8'-4'} = 2.0$ Hz).
- Στα 6,66 ppm η τετραπλή κορυφή του H- 9 ($J_{9-10} = 7.1$ Hz).
- Η διπλή- διπλή κορυφή του H- 8' εμφανίζεται στα 6,61 ppm ($J_{8'-7'} = 8.0$ Hz, $J_{4'-8'} = 2.0$ Hz).
- Εμφανίζεται μια διπλή -τριπλή κορυφή στα 4,22 ppm που αντιστοιχεί στο H- 1'a ($J_{1'a-b} = 10.8$ Hz, $J_{1'a-2'a/b} = 5.9$ Hz), ενώ η πολλαπλή στα 4,15 ppm είναι η κορυφή του H- 1'b ($J_{1'b-a} = 10.8$ Hz, $J_{1'b-2'a/b} = 6.0$ Hz).
- Στα 3,64 ppm συντονίζεται το πρωτόνιο 5 και δίνει μια πολλαπλή κορυφή.
- Η διπλή- διπλή- διπλή κορυφή στα 2,94 ppm είναι του H- 4a ($J_{4a-b} = 18.5$ Hz, $J_{4a-5} = 8.3$ Hz, $J_{4a-3} = 1.2$ Hz).
- Το H- 6β συντονίζεται στα 2,62 ppm ($J_{6b-a} = 15.7$ Hz, $J_{6b-5} = 6.4$ Hz).
- Στα 2,77 ppm η κορυφή που ολοκληρώνει για 2, ανήκει στο H- 2'.
- Στα 2,73 ppm η διπλή- διπλή κορυφή του H- 6 ($J_{6a-b} = 15.7$ Hz, $J_{6a-5} = 8.9$ Hz).
- Η διπλή- διπλή- διπλή κορυφή στα 2,79 ppm είναι του H- 4b ($J_{4b-a} = 18.5$ Hz, $J_{4b-5} = 6.0$ Hz, $J_{4b-3} = 1.0$ Hz).
- Τέλος, στα 2,06 ppm εμφανίζεται η διπλή κορυφή του μεθυλίου της θέσης 10, και η οποία ολοκληρώνει για 3 H ($J_{10-9} = 7.1$ Hz).

Άτομο	¹³ C-NMR(δ ppm)	¹ H-NMR(δ ppm, J Hz)
1	195.78	9.21(1H, d, J= 1.8 Hz)
3	200.97	9.65(1H, brs)
4a	46.24	2.94(1H, ddd, J= 18.5Hz, 8.3 Hz, 1.2 Hz)
4b	-	2.79(1H, ddd, J= 18.5 Hz, 6.0 Hz, 1.0 Hz)
5	27.22	3.64(1H, m)
6a	36.99	2.73(1H, dd, J=15.7 Hz, 8.9 Hz)
6b	-	2.62(1H, dd, J= 15.7 Hz, 6.4 Hz)
7	172.02	-
8	143.19	-
9	155.17	6.66(1H, q, J= 7.1 Hz)
10	15.29	2.08(3H, d, J=7.1 Hz)
1'a	65.25	4.22(1H, dt, J= 10.8 Hz, 5.9 Hz)
1'b	-	4.15(1H, dt J= 10.8 Hz, 6.0 Hz)
2'	34.26	2.77(2H, m)
3'	130.44	-
4'	121.21	6.72(1H, d, J= 2Hz)
5'	115.33	-
6'	65.25	-
7'	143.60	6.79(1H, d, J= 8 Hz)
8'	116.22	6.61(1H, dd, J= 8Hz, 2 Hz)

Εικόνα 18 Φασματοσκοπικά δεδομένα ¹H-NMR και ¹³C-NMR (CDCl₃) της ελαιασίνης

2.1.3 Προετοιμασία ελαιοκανθάλης, ελαιασίνης και μίγματος για βιολογικά πειράματα

Αντίστοιχα για την ελαιοκανθάλη με μοριακό βάρος $304,34 \text{ g mol}^{-1}$ για συγκέντρωση ίση με $50 \mu\text{M}$ που υποδηλώνει η διεθνής βιβλιογραφία και όγκο διαλύματος 1 ml απαιτούνταν $5 \cdot 10^{-8} \text{ mol}$ ή μάζα ίση με $15 \cdot 10^{-5} \text{ gr}$. Για την ασφάλεια της παρασκευής η ελαιοκανθάλη διαλυτοποιήθηκε σε 400 ml αποσταγμένου νερού όπου θα έπρεπε να περιέχει $0,006 \text{ gr}$ ελαιοκανθάλης ή $0,00015 \text{ gr} / 10 \text{ ml}$. Τα 200 ml εξατμίστηκαν σε rotary evaporator μέχρι ξηρού και ζυγίστηκε βάρος ίσο με $0,003 \text{ gr}$. Άρα οι υπολογισμοί ήταν σωστοί καθώς το 1 ml θα περιείχε $0,000015 \text{ gr}$ ή $15 \cdot 10^{-5} \text{ gr}$, ποσότητα που διαλυτοποιήθηκε σε 1 ml διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι για την επιβεβαίωση των χειρισμών πραγματοποιήθηκε λήψη φάσματος $^1\text{H NMR}$.

Αντίστοιχη διαδικασία ακολουθήθηκε και για την ελαιασίνη. Η οποία με μοριακό βάρος $321,34 \text{ g mol}^{-1}$ για διάλυμα όγκου 1 ml για συγκέντρωση $50 \mu\text{M}$ απαιτούνταν $5 \cdot 10^{-8} \text{ mol}$ ή μάζα ίση με $15 \cdot 10^{-5} \text{ gr}$. Έτσι διαλυτοποιήθηκε σε αποσταγμένο νερό με τελικό όγκο 400 ml . Τα 200 ml εξατμίστηκαν σε rotary evaporator μέχρι ξηρού και ζυγίστηκε βάρος ίσο με $0,003 \text{ gr}$. Ξανά για την επιβεβαίωση των χειρισμών πραγματοποιήθηκε λήψη φάσματος $^1\text{H NMR}$.

Τέλος για την μελέτη πιθανής συνέργειας στα πειράματα κυτταροτοξικότητας στις κυτταρικές σειρές όπως αναφέρθηκε προηγουμένως η ίδια διαδικασία και η ο ίδιος συλλογισμός ακολουθήθηκε και στο εκχύλισμα ελαιολάδου που είχε κρατηθεί για τον εν λόγω σκοπό. Στο εκχύλισμα είχε υπολογιστεί μέσω του πρωτοκόλλου των πρότυπων καμπυλών και του εσωτερικού προτύπου, στο οποίο ελαιοκανθάλη και ελαιασίνη βρίσκονταν σε αναλογία $1:1$, πως στα 100 mg βρίσκονταν 45 mg ελαιοκανθάλη και 45 mg ελαιασίνη, έτσι λοιπόν με βάση τα μοριακά βάρη για την ελαιοκανθάλη $304,34 \text{ mol}^{-1}$ και για την ελαιασίνη $321,34 \text{ mol}^{-1}$ και την συγκέντρωση που δηλωνόταν από την διεθνή βιβλιογραφία, ακολουθήθηκε ξανά η ανωτέρω διαδικασία.

2.1.4 Παραλαβή υδατικού εκχυλίσματος ελαιολάδου, ελαιασίνης, και ελαιοκανθάλης

Στη συνέχεια για την διενέργεια πειραμάτων υδατικού εκχυλίσματος ελαιολάδου, ελαιασίνης και ελαιοκανθάλης παραλήφθηκε ποσότητα η οποία είχε προηγουμένως παρασκευασθεί σε συνεργασία με τον υποψήφιο διδάκτορα Διαμαντάκο Παναγιώτη.

Το υδατικό διάλυμα εξατμίστηκε μέχρι ξηρού με την βοήθεια rotary evaporator με αποτέλεσμα να παραληφθούν 2 gr εκχυλίσματος με αναλογία ελαιοκανθάλης ελαιασίνης 1:1 ενώ είναι σημαντικό να τονίσουμε ξανά πως σε κάθε βήμα πραγματοποιούταν λήψη φάσματος NMR για την επιβεβαίωση της διαδικασίας.

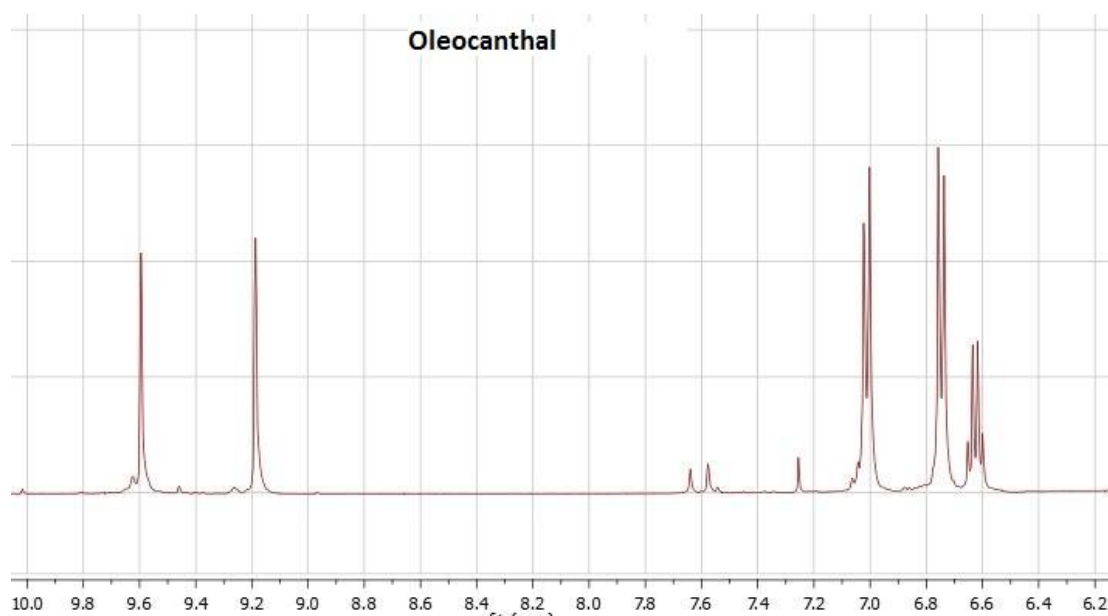


Φάσμα 2. Το εκχύλισμα του ελαιολάδου σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο όπως φαίνεται σε φάσμα από το πρόγραμμα MestRenova

Ένα μέρος του εκχυλίσματος διατηρήθηκε για τα βιολογικά πειράματα ενώ μια ποσότητα χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση και τον διαχωρισμό της ελαιοκανθάλης και της ελαιασίνης με τις ίδιες διαδικασίες που περιγράφηκαν προηγουμένως (χρωματογραφία στήλης και χρωματογραφία λεπτής στιβάδας με τις ίδιες ακριβώς παραμέτρους όπως και προηγουμένως). Είναι αναγκαίο να αναφερθεί πως η όλη διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με τον υποψήφιο διδάκτορα Διαμαντάκο Παναγιώτη.

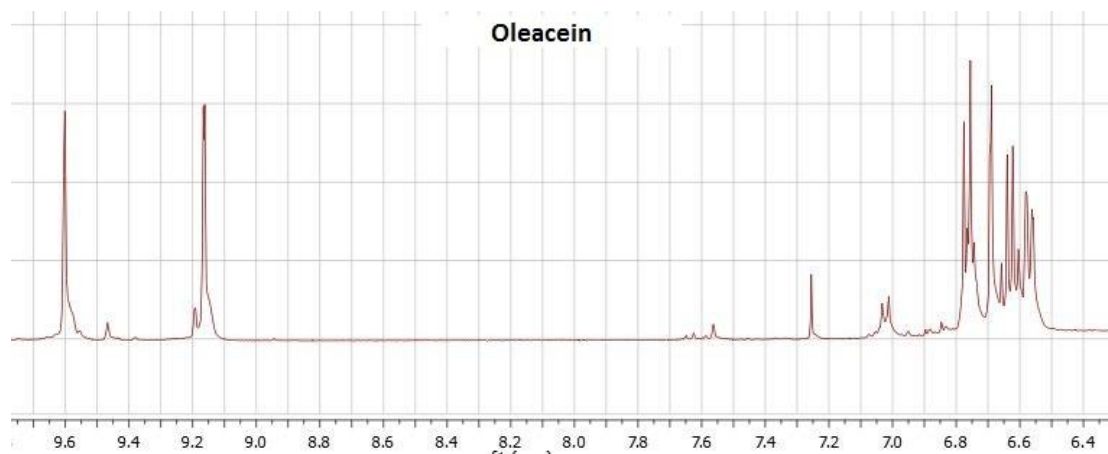
Η δομή της ελαιοκανθάλης δεν μεταβάλλεται σε μεγάλο βαθμό μεταξύ των δυο φάσεων όμως πρέπει να αποσαφηνιστεί η μεταβολή. Όταν υδατικό μέσο εξατμιστεί και παραληφθεί η ελαιοκανθάλη ή η ελαιασίνη τότε έχουν την αλδεϋδική τους μορφή. Αυτό φαίνεται με τη λήψη φασμάτων NMR σε CDCl_3 (Φάσματα 3 & 4). Ωστόσο πριν εξατμιστεί το υδατικό μέσο, δηλαδή την ώρα που οι ουσίες είναι διαλυμένες σε νερό, μετατρέπονται στην ενυδατωμένη τους μορφή.

Μετά την απομόνωση τα φάσματα πρωτονίου NMR ελήφθησαν σε 400 MHz (Bruker Avance 400). Ελήφθησαν 50 scans σε 32K και εύρος 0-16 ppm με relaxation delay 1 s και acquisition time 1.7 s. Αμέσως μετά τον μετασχηματισμό Fourier εφαρμόστηκε exponential weighing factor 0.3 Hz. Η διόρθωση του φάσματος, οι ολοκληρώσεις και όλες οι επεξεργασίες πραγματοποιήθηκαν στο πρόγραμμα MestRenova. Η διαδικασία αυτή έγινε για την ταυτοποίηση των καθαρών ουσιών. Ελαιοκανθάλη :



Φάσμα 3. Η ελαιοκανθάλη που απομονώθηκε

Ελαιασίνη :



Φάσμα 4. Η ελαιασίνη που απομονώθηκε

2.1.5 Βιολογικό υλικό

Καλλιέργειες ευκαρυωτικών κυττάρων

Οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν αρχικά ως μια μέθοδος μελέτης της συμπεριφοράς των κυττάρων ελεύθερων από πιθανές *in vivo* επιδράσεις που συμβαίνουν στον οργανισμό. Σκοπός των καλλιεργειών κυττάρων είναι να διατηρηθούν τα κύτταρα βιώσιμα μακριά από τον φυσιολογικό οργανισμό από τον οποίο προήλθαν. Από την πρώτη περιγραφή καλλιέργειας ιστού το 1907 ως την ανάπτυξη της πρώτης συνεχούς ανθρώπινης σειράς καρκινικών κυττάρων, HeLa, το 1952, οι κυτταροκαλλιέργειες έχουν εξελιχθεί σε ένα απαραίτητο ερευνητικό εργαλείο. Επίσης αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της φαρμακοβιομηχανίας, της βιομηχανίας τροφίμων και της βιοτεχνολογίας.



Εικόνα 19 Κυτταροκαλλιέργειες σε six well plate

Μελετήθηκε η κυτταροτοξικότητα, μέσω της καλλιέργειας κυττάρων προκειμένου των φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου όπως είναι η ελαιοκανθάλη και η ελαιασίνη σε διάφορους τύπους κυττάρων.

Όλα τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα έχουν προηγουμένως αποστειρωθεί στον αυτόκαυστο ή έχουν φιλτραριστεί και φυλάσσονται στους 4 °C.

- Θρεπτικό Υλικό

89% DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)

10% FBS (Fetal Bovine Serum)

1% Μίγμα αντιβιοτικών (10000 units πενικιλίνης/ στρεπτομυκίνης)

- Ρυθμιστικό διάλυμα κυττάρων (10X PBS - Phosphate Buffered Saline)

8% NaCl

0,24% KCl

0,2% K₂HPO₄

1,8% NaHPO₄·2H₂O

- Διάλυμα κατάψυξης κυττάρων (Freezing medium).

90% FBS

10% DMSO

Για την κυτταρική σειρά mcf-7 το θρεπτικό διάλυμα ήταν

89% DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)

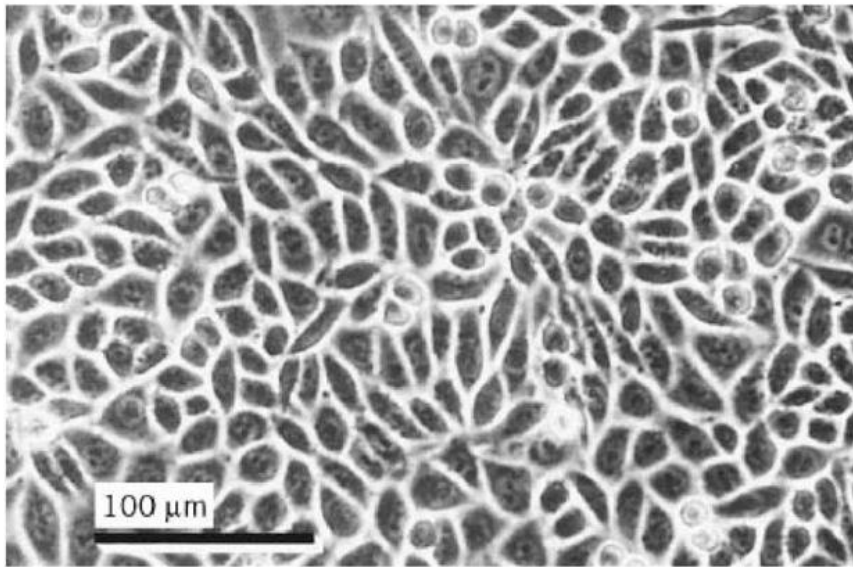
10% FBS (Fetal Bovine Serum)

1% Μίγμα αντιβιοτικών (10000 units πενικιλίνης/ στρεπτομυκίνης)

0,1% Ινσουλίνη

Συγκεκριμένα για την μελέτη των βιολογικών δράσεων της ελαιοκανθάλης, της ελαιασίνης αλλά και του συνολικού φαινολικού κλάσματος αυτών πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια κυττάρων :

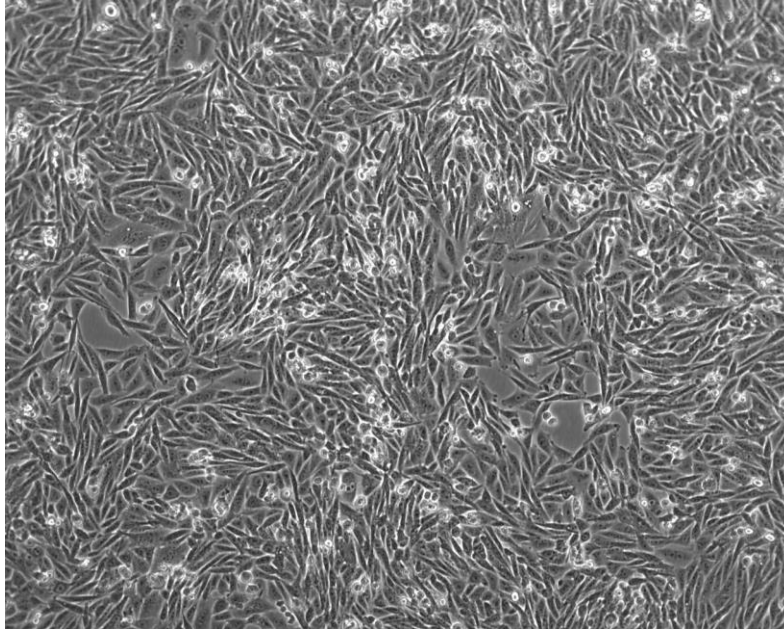
CHO (Επιθηλιακά κύτταρα κινέζικων χάμστερ)



Εικόνα 20 Απεικόνιση των κυττάρων CHO στο μικροσκόπιο

Τα CHO κύτταρα είναι εργαστηριακά καλλιεργούμενα κύτταρα που προέρχονται από τις ωθήκες των κινέζικων χάμστερ. Τα κινέζικα χάμστερ χρησιμοποιούνται ευρέως στα εργαστήρια ακριβώς λόγω του μικρού του μεγέθους και του μικρού αριθμού των χρωμοσωμάτων που τα χαρακτηρίζει κάτι που τα καθιστά ένα αρκετά καλό μοντέλο εργαστηριακών μελετών. Τα κύτταρα αυτά προέρχονται από την επιθηλιακή κυτταρική γραμμή των ωθηκών των κινέζικων χάμστερ και είναι τα πιο διαδεδομένα κύτταρα σε χρήση σε εργαστηριακές μεθόδους. Τα κύτταρα αυτά τέλος δεν έχουν επαρκή σύνθεση προλίνης ενώ δεν εκφράζουν γονίδια που κωδικοποιούν τον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) .

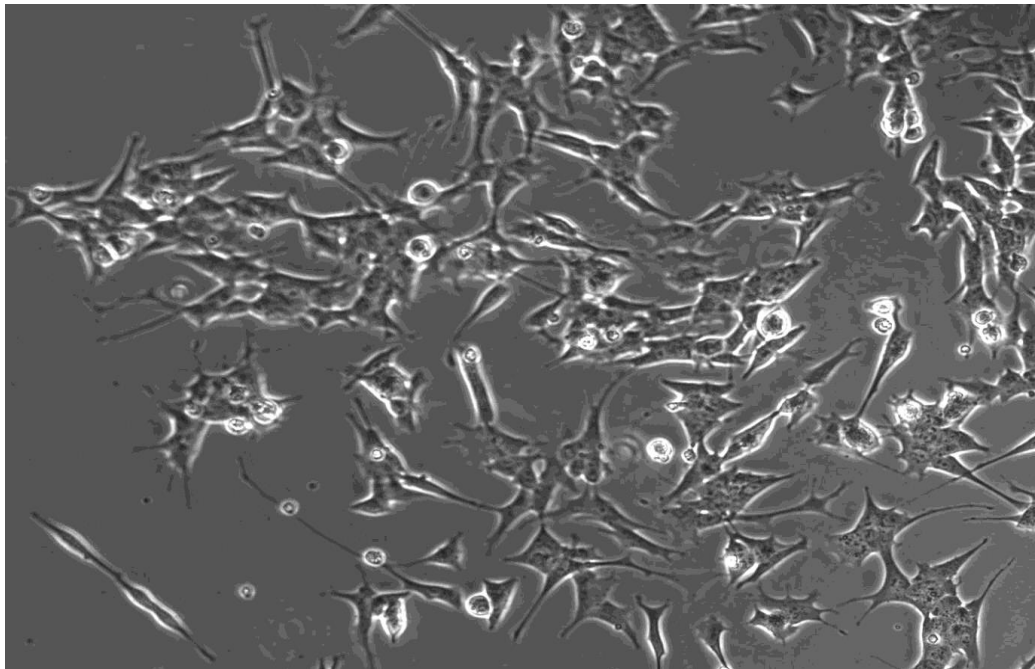
CHO/ DDC Κύτταρα ωοθηκών κινέζικων χάμστερ



Εικόνα 21 Απεικόνιση των κυττάρων CHO/ DDC όπως αυτά φαίνονται στο μικροσκόπιο

Πρόσφατες μελέτες (Kalatzis et al., 2013) έδειξαν ότι η L- Dopa αποκαρβοξυλάση, ένζυμο υπεύθυνο για την αποκαρβοξυλίωση, εμπλέκεται στους μηχανισμούς απόπτωσης. Από την στιγμή που τα CHO περιγράφηκαν το 1956 πολλές παραλλαγές τους επετεύχθησαν στα εργαστήρια προκειμένου να επιτευχθούν διάφοροι στόχοι. Μια τέτοια περίπτωση είναι και τα CHO/ DDC τα οποία είναι επιμολυσμένα τεχνηέντως με το πλήρους μήκους μετάγραφο(cDNA) της ανθρώπινης DDC, δίνοντας τους έτσι την δυνατότητα να παράγουν ανθρώπινη L- Dopa αποκαρβοξυλάση.

SH-SY5Y (Κύτταρα ανθρώπινου νευροβλαστώματος)

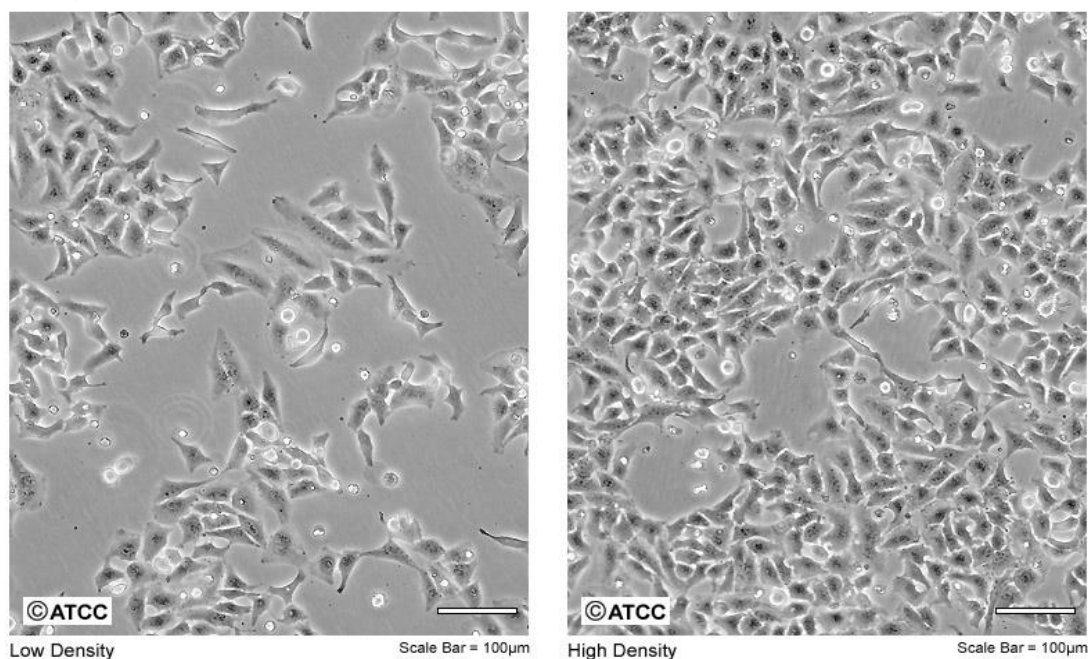


Εικόνα 22 Απεικόνιση των κυττάρων SY5Y στο μικροσκόπιο

Τα κύτταρα αυτά προέρχονται από τον άνθρωπο ενώ η αρχική κυτταρική σειρά από όπου υποκλωνοποιήθηκαν και απομονώθηκαν προήλθαν από την βιοψία του μυελού των οστών ενός τετράχρονου κοριτσιού με νευροβλάστωμα. Αυτά τα απομονωμένα κύτταρα μέσω υποκλωνοποιήσεων αναπτύχθηκαν αρκετές κυτταρικές σειρές μέχρι εν τέλει να αποκτήσουν την τελική τους μορφή, με νευρική κυρίως φύση. Τα συγκεκριμένα κύτταρα χρησιμοποιούνται για την μελέτη νευροεκφυλιστικών ασθενειών όπως η νόσος του Alzheimer και του Parkinson, καθώς έχουν αδρενεργικό φαινότυπο και επίσης εκφράζουν ντοπαμινεργικούς υποδοχείς.

HeLa (Καρκινικά κύτταρα)

ATCC Number: **CCL-2**
Designation: **HeLa**



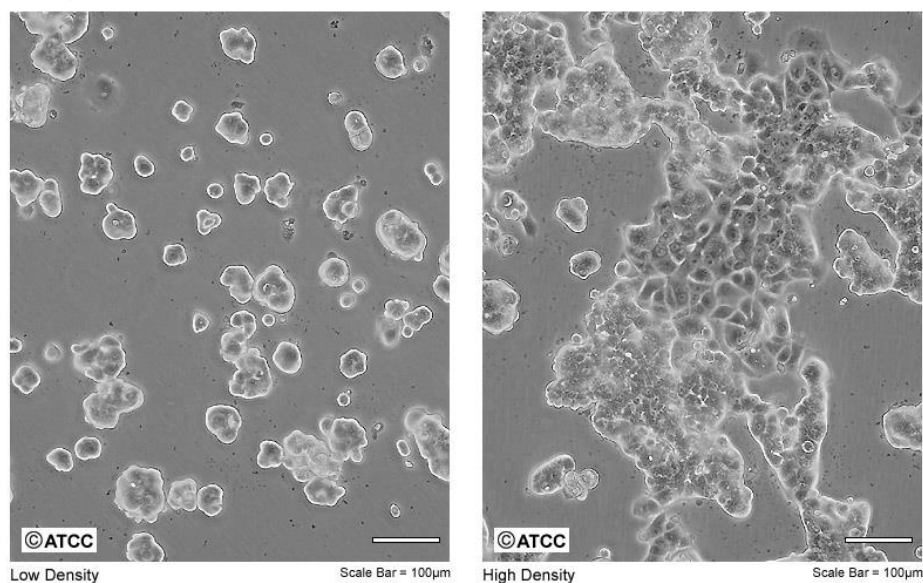
Εικόνα 23 Απεικόνιση των κυττάρων HeLa στο μικροσκόπιο

Αποτελεί μια αθάνατη κυτταρική σειρά που χρησιμοποιείται ευρέως από την επιστημονική κοινότητα. Είναι η αρχαιότερη ανθρώπινη κυτταρική σειρά που καλλιεργείται σε εργαστήρια ενώ απομονώθηκε από την ασθενή Henrietta Lacks (σε εκείνην οφείλουν το όνομα τους) που ήταν ο δότης και έπασχε από καρκίνο στον τράχηλο της μήτρας. Σε αντίθεση με άλλες κυτταρικές σειρές της εποχής που γινόταν προσπάθεια για να κρατηθούν ζωντανά αντί να γίνονται πειράματα με αυτά, τα κύτταρα αυτά απομονώθηκαν, αναπτύχθηκαν και πολλαπλασιάστηκαν με ευκολία. Μετά από αυτήν την παρατήρηση η κυτταρική σειρά αυτή άρχισε να παράγεται μαζικά και να γίνονται πειράματα με αυτήν σε διάφορα πανεπιστήμια του κόσμου. Πολλαπλασιάζονται με μεγάλο ρυθμό ακόμα και σε σύγκριση με άλλα καρκινικά κύτταρα ενώ ακριβώς όπως και τα υπόλοιπα καρκινικά κύτταρα διαθέτουν την ενεργή μορφή της τελομεράσης με αποτέλεσμα να αποτρέπεται το σταδιακό κόντεμα των τελομερών που εμπλέκεται στο γήρας και τελικά στον κυτταρικό θάνατο. Ως συνέπεια τα κύτταρα αυτά έχουν καταστρατηγήσει το όριο του Hayflick σύμφωνα με το οποίο κάθε φυσιολογικό κύτταρο μπορεί να διαιρεθεί

μόνο ορισμένες φορές πριν τελικά οδηγηθεί σε κυτταρικό θάνατο (Hayflick L. et al., 1965).

MCF-7 (Καρκινικά κύτταρα)

ATCC Number: **HTB-22**
Designation: **MCF-7**



Εικόνα 24 Απεικόνιση κυττάρων MCF-7 όπως αυτά φαίνονται στο μικροσκόπιο

Τα κύτταρα MCF-7 απομονώθηκαν το 1970 από μια 69χρονη γυναίκα και πρόκειται για κύτταρα που προέρχονται από καρκίνωμα του μαστού. Είναι ακριβώς το ακρωνύμιο του Michigan Cancer Foundation 7 αναφερόμενο στο ινστιτούτο που τα απομόνωσε. Τα εν λόγω κύτταρα χρησιμοποιούνται και έχουν αποδειχτεί ιδιαίτερα χρήσιμα στην μελέτη της παθογένεσης του καρκίνου του μαστού.

2.2 Μέθοδοι

2.2.1 Μεθοδολογία κυτταρικής καλλιέργειας ευκαρυωτικών κυττάρων

Όλα τα στάδια που περιγράφονται παρακάτω πραγματοποιήθηκαν κάτω από αυστηρά ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο νηματικής ροής, μέσα στον οποίο αποστειρώνονται όλα τα σκεύη ύστερα από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία για τουλάχιστον 20min. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε ειδικές φλάσκες εμβαδού 75 cm², μέσα σε κλίβανο-επωαστήρα σε θερμοκρασία 37°C και ατμόσφαιρα 5% CO₂, ενώ στο υγρό άζωτο σε σκοτάδι και θερμοκρασία -198°C.

Οι φυγοκεντρήσεις έγιναν στους 4 °C σε ψυχόμενη φυγόκεντρο HETTICH για 2 λεπτά στις 1440 rpm.

2.2.2 Παρασκευή θρεπτικού υλικού

Το θρεπτικό που χρησιμοποιήθηκε στις κυτταρικές σειρές αποτελείται από 89 % DMEM, 10 % Fetal Bovine Serum (το οποίο προηγουμένως έχει απενεργοποιηθεί για 30min στους 56 °C) και 1 % μίγμα αντιβιοτικών πενικιλίνης και στρεπτομυκίνης και στην περίπτωση των κυττάρων MCF-7 0,1% ινσουλίνης. Το θρεπτικό υλικό παρασκευάστηκε όλες τις φορές μέσα σε θάλαμο νηματικής ροής, φιλτραρίστηκε και φυλάχτηκε στους 4 °C.

2.2.3 Ξεπάγωμα κυττάρων από το υγρό άζωτο

Τα αποθηκευμένα κύτταρα προκειμένου να χρησιμοποιηθούν πρέπει να υποστούν μια διαδικασία που πρέπει να γίνεται με μεγάλη ταχύτητα και πάντοτε μέσα σε θάλαμο νηματικής ροής για την αποφυγή επιμολύνσεων. Αποστειρώθηκε με καθαρό οινόπνευμα το κρυοφιαλίδιο, που περιείχε τα κύτταρα που ενδιαφέρουν στο εκάστοτε πείραμα και εισάγονται στο θάλαμο. Ακολουθεί ξεπάγωμα των κυττάρων με την βοήθεια της τριβής, ενώ εν συνεχεία απορρίπτεται το περιεχόμενο του κρυοφιαλιδίου σε αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα, το οποίο περιέχει 1ml θρεπτικό υλικό. Στη συνέχεια, ο δοκιμαστικός σωλήνας φυγοκεντρείται για 2 λεπτά στους 4°C και στις 1440 rpm. Το ίζημα των κυττάρων που προκύπτει επαναιωρείται σε 1ml θρεπτικό, αφού απορριφθεί το υπερκείμενο και τοποθετείται σε φλάσκα που περιέχει 10ml θρεπτικό και στην συνέχεια όπου τέλος εισάγεται στον κλίβανο.

2.2.4 Αραίωση Κυττάρων (Split)

Η αραίωση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε όταν τα κύτταρα μετά από παρατήρηση στο μικροσκόπιο είχαν καλύψει τουλάχιστον το 80% του επιπέδου της φλάσκας με άμεση συνέπεια να έχουν έρθει σε στενή επαφή μεταξύ τους και να διακόπτεται ή να περιορίζεται η περαιτέρω ανάπτυξή τους, φαινόμενο που καλείται αναστολή εξ' επαφής. Για τον διαχωρισμό των κυττάρων σε παραπάνω φλάσκες ανάλογα με την επιθυμητή αραίωση, αρχικά, πραγματοποιείται αποκόλληση από την φλάσκα. Αυτό το στάδιο γίνεται ύστερα από την απορρίψη του υπάρχοντος θρεπτικού υλικού και εν συνεχεία πλύσιμο με 2ml ρυθμιστικού διαλύματος PBS(1X) . Έπειτα, προστίθενται 1ml θρυψίνης και η φλάσκα τοποθετείται στον κλίβανο επώασης για 8 λεπτά. Ακολουθεί ήπια ανάδευση με σκοπό να αποκολληθούν τα κύτταρα, αποφεύγοντας την μηχανική λύση τους και τοποθέτηση του περιεχομένου σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει 1 ml θρεπτικού, το οποίο είναι απαραίτητο για την απενεργοποίηση της δράσης της θρυψίνης.

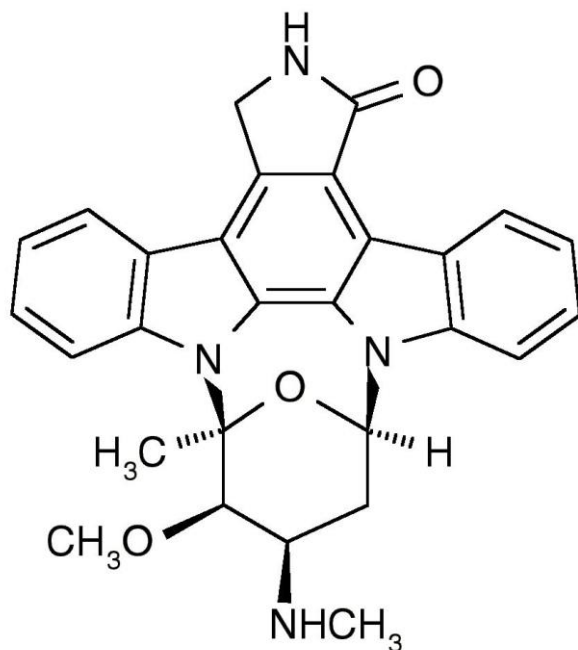
Μετά τη φυγοκέντρηση το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε κατάλληλο όγκο θρεπτικού. Τα κύτταρα διαμοιράζονται σε φλάσκες που περιέχουν θρεπτικό υλικό και τοποθετούνται στον κλίβανο επώασης.

2.2.5 Ψύξη και αποθήκευση κυττάρων στο υγρό άζωτο

Τα κύτταρα φυλάσσονται αφού αποκολληθούν με τη διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω. Το ίζημα επαναιωρείται σε διάλυμα ψύξης των κυττάρων (freezing medium) που αποτελείται από 90 % FBS και 10 % DMSO (κρυοπροστατευτική ουσία). Το DMSO προστίθεται σταγόνα σταγόνα στο ίζημα, καθώς η ουσία αυτή προκαλεί θερμικό και ωσμωτικό σοκ στα κύτταρα. Το μίγμα μοιράζεται στα κρυοφιαλίδια τα οποία μεταφέρονται στους -80 °C για 24 ώρες. Την επόμενη μέρα κρυοφιαλίδια μπορούν να μεταφερθούν στο υγρό άζωτο (-196 °C), όπου και παραμένουν μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

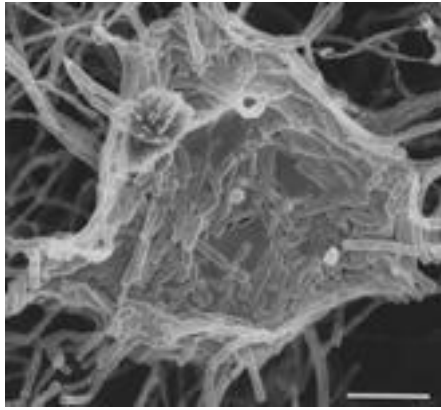
2.4.2.1 Κυτταρικός θάνατος/ Σταυροσπορίνη

Για να παρατηρηθεί πιθανός μηχανισμός συνέργειας με τις υπό μελέτη ουσίες αλλά και για να συγκριθεί η δράση τους χρησιμοποιήθηκε σταυροσπορίνη κατά την διάρκεια των πειραμάτων είτε μόνη της σε συγκέντρωση 100 NM είτε σε συνδυασμό με τα εκχυλίσματα ή τις απομονωμένες ουσίες σε συγκέντρωση 100NM.



Εικόνα 25 Δομή σταυροσπορίνης

Πρώτη αναφορά έγινε το 1977 μέσω της διαδικασίας της απομόνωσης ενός ινδολοκαρβαζολίου από φυσική πηγή. Το αλκαλοειδές που βρέθηκε ονομάστηκε AM-2282 και απομονώθηκε από καλλιέργειες του *Streptomyces staurosporeus* το οποίο μετέπειτα ταξινομήθηκε ως *Lentzea albida*. Έπειτα αυτό το αλκαλοειδές ονομάστηκε σταυροσπορίνη και προσδιορίστηκε η κρυσταλλική της δομή. Η πραγματική της στερεοχημεία ανακαλύφθηκε το 1994 και επιβεβαιώθηκε από ολική σύνθεση.



Εικόνα 26 *Lentzea albida*

Η σταυροσπορίνη χαρακτηρίζεται από ποικίλες δράσεις μερικές εξ αυτών ιδιαίτερα χρήσιμες, γεγονός που μας οδήγησε στην χρησιμοποίησή της.

- Έχει αντιμυκητιακές ιδιότητες, ενώ σε αντίθεση με τη ρεμπεκαμυκίνη, στερείται αντιβακτηριακών ιδιοτήτων.
- Εμφανίζει ανασταλτική δράση έναντι πρωτεϊνικών κινασών και έτσι η παραγωγή της μπορεί να παρέχει προστασία από ευκαρυωτικούς θηρευτές στον μικροοργανισμό από τον οποίο προέρχεται. (C. M. Cesar Sanchez, 2006)
- Παρουσιάζει δυνατή υποτασική δράση. Η σταυροσπορίνη άρχισε να προσελκύει την προσοχή το 1986, όταν αποδείχθηκε ότι είναι ισχυρός αναστολέας της 54 πρωτεϊνικής κινάσης (PKC) 3 με ισχυρές κυτταροτοξικές ιδιότητες.
- Είναι ισχυρός αλλά μη εκλεκτικός αναστολέας κινασών. Ανήκει στην κατηγορία των αναστολέων που συναγωνίζονται το ATP. Η μη ειδική της δράση οφείλεται στο ότι η θέση πρόσδεσης του ATP είναι εξαιρετικά συντηρημένη (C. M. Cesar Sanchez, 2006).

Επιλέχτηκε λοιπόν η σταυροσπορίνη ακριβώς επειδή η δράση της είναι γνωστή ως τοξική για τα κύτταρα για να παρατηρηθεί πιθανή προστατευτική δράση των ενώσεων σε περίπτωση φυσιολογικών αλλά και για να συγκριθεί η κυτταροτοξική δράση της, με πιθανή κυτταροτοξική δράση της ελαιοκανθάλης και της ελαιασίνης στην περίπτωση για παράδειγμα των καρκινικών κυττάρων.

2.4.2.2. Χρώση με Trypan blue

Χρησιμοποιείται για την μελέτη της κυτταροτοξικότητας ενώσεων σε μια κυτταρική καλλιέργεια. Με αυτή τη μέθοδο, μπορεί να προσδιοριστεί με μεγάλη ακρίβεια ο αριθμός των ζωντανών και νεκρών κυττάρων σε μια κυτταροκαλλιέργεια χωρίς όμως να μπορεί να γίνει διάκριση μεταξύ των νεκρωτικών και των αποπτωτικών κυττάρων.(Slater et al., 1963)

Είναι γνωστό πως το ζωντανά κύτταρα είναι ιδιαίτερα επιλεκτικά στις ουσίες που μπορούν να διαπεράσουν την κυτταρική τους μεμβράνη, συνεπώς σε ένα τέτοιο κύτταρο η χρωστική Trypan blue δεν μπορεί να απορροφηθεί. Παρ' όλα αυτά, δεν ισχύει το ίδιο και στα νεκρά κύτταρα. Η Trypan blue διαπερνά την κυτταρική τους μεμβράνης, εισέρχεται στο εσωτερικό τους και χρωματίζει μπλε τα νεκρά κύτταρα. Συγκεκριμένα, το κυτταρικό εναιώρημα φυγοκεντρείται στις 1440 rpm για 2min και το ίζημα επαναιωρείται σε διάλυμα 0,1 % Trypan blue σε PBS(1X) . Ο αριθμός των χρωματισμένων νεκρών κυττάρων και των ζωντανών κυττάρων προσδιορίζεται με τη βοήθεια αιμοκυτταρόμετρου.



Εικόνα 27 Διάλυμα Trypan blue

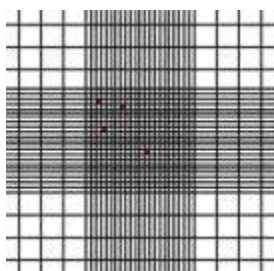
2.4.3 Μέτρηση κυτταροτοξικότητας με τη χρήση αιμακυτταρόμετρου

Το αιμοκυτταρόμετρο ή πλάκα Neubauer είναι ένα είδος πλακιδίου που εφευρέθηκε από τον Louis-Charles Malassez και χρησιμοποιείται για να προσδιοριστεί η συγκέντρωση των κυττάρων σε ένα υγρό διάλυμα. Κυρίως όμως χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των κυττάρων του αίματος, απ' όπου πήρε και το όνομά του.



Εικόνα 28 Αιματοκυττόμετρο ή πλάκα Neubauer

Η καλυπτρίδα, που τοποθετείται επί του πλακιδίου, με τέτοιο τρόπο που να αποφεύγεται η κινητικότητα της και συγκρατείται σε συγκεκριμένη θέση σε ένα προσδιορισμένο ύψος (συνήθως 0,1 mm). Επιπροσθέτως, η γυάλινη επιφάνεια έχει υποστεί χάραξη ώστε να φέρει μία διαρρύθμιση τετραγώνων διαφορετικών μεγεθών, επιτρέποντας την εύκολη μέτρηση των κυττάρων. Με αυτό τον τρόπο γίνεται δυνατή η μέτρηση κι ο προσδιορισμός του αριθμού των κυττάρων σε ένα συγκεκριμένο όγκο.



Εικόνα 29 Πλέγμα διάταξη του αιμοκυτταρόμετρο Neubauer.

Ανάλογα με τα τετράγωνα στα οποία γίνεται η μέτρηση και με δεδομένο τον όγκο υγρού που αυτά καταλαμβάνουν, γίνεται υπολογισμός του συνολικού αριθμού κυττάρων που περιέχονται στο υπό μελέτη δείγμα. Σημειώνεται ότι κύτταρα που

βρίσκονται σε τομές των τετραγώνων δεν προσμετρώνται. Όσο χαμηλότερη είναι η συγκέντρωση των μετρούμενων κυττάρων, τόσο περισσότερα τετράγωνα θα πρέπει να προσμετρώνται. Διαφορετικά οδηγούμαστε σε στατιστικά σφάλματα. Συνήθως η μέτρηση γίνεται στα τέσσερα μεγάλα γωνιακά τετράγωνα, δύο τουλάχιστον φορές (<http://www.microbehunter.com/2010/06/27/thehemocytometer-counting-chamber/>).

2.4.4 Υπολογισμός κυτταροτοξικότητας

Το ποσοστό κυτταρικού θανάτου μπορεί να υπολογιστεί μετά από την μέτρηση δύο δειγμάτων που έχουν υποστεί ακριβώς την ίδια κατεργασία. Πιο συγκεκριμένα, το ένα δείγμα ορίζεται ως «δείγμα ελέγχου» (“control”) ενώ το δεύτερο ως «πειραματικό δείγμα» (experimental sample) όπου η μέτρηση γίνεται τρεις φορές και το πείραμα επαναλαμβάνεται τουλάχιστον τρεις φορές. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η κυτταροτοξικότητα εις βάρος διάφορων κυτταρικών σειρών, έπειτα από 24ωρη επώαση των κυττάρων:

- Απουσία σταυροσπορίνης
- Παρουσία σταυροσπορίνης
- Παρουσία σταυροσπορίνης και ελαιοκανθάλης
- Παρουσία σταυροσπορίνης και ελαιασίνης
- Παρουσία ελαιοκανθάλης
- Παρουσία ελαιασίνης
- Παρουσία σταυροσπορίνης και εκχυλίσματος ελαιολάδου
- Παρουσία εκχυλίσματος ελαιολάδου

Το ποσοστό κυτταρικού θανάτου δίνεται από τον τύπο: $\text{ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΘΑΝΑΤΟΣ} = \frac{\text{ΑΡΙΘΜΟΣ ΝΕΚΡΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ}}{\text{ΑΡΙΘΜΟΣ ΝΕΚΡΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ} + \text{ΑΡΙΘΜΟΣ ΖΩΝΤΑΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ}}$ εξίσωση 1

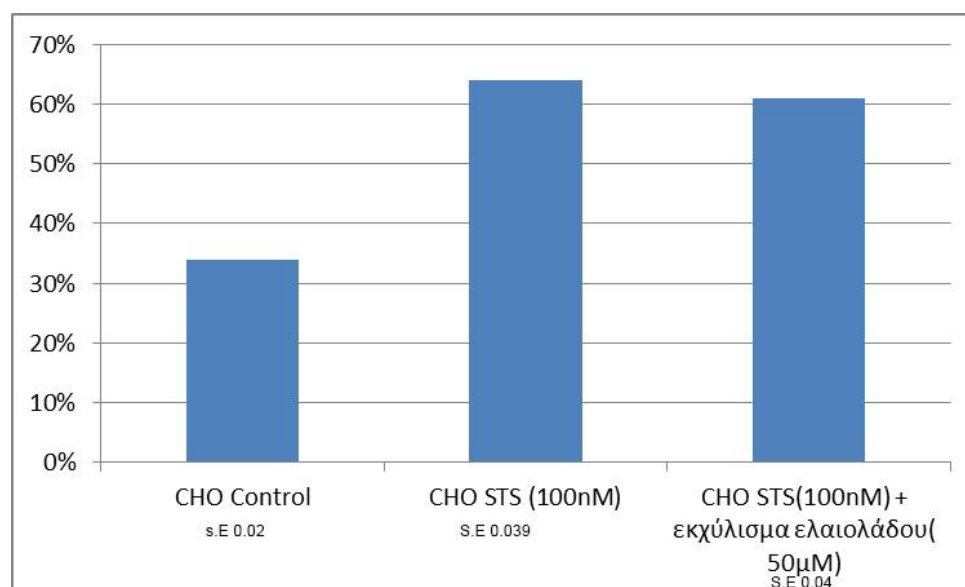
3 Αποτελέσματα

3.1 Επίδραση εκχυλίσματος ελαιολάδου σε κύτταρα CHO και CHO/DDC

Η συγκέντρωση του αποπτωτικού παράγοντα σταυροσπορίνη που χρησιμοποιήθηκε είναι τα 100nM όπου σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία, ορίζεται ως η συγκέντρωση στην οποία τα κύτταρα εμφανίζουν συνήθως κυτταρικό θάνατο σε ποσοστό 50%.

Πίνακας 7 Ποσοστό κυτταρικού θανάτου (βλ. εξίσωση 1) έπειτα από 24h επώαση με STS στην κυτταρική σειρά CHO παρουσία σταυροσπορίνης και παρουσία σταυροσπορίνης μαζί με εκχύλισμα ελαιολάδου από εξαιρετικά παρθένο δείγμα. Οι τιμές αντιστοιχούν στον μέσο όρο 4 πειραμάτων.

CHO Control	34%
CHO STS (100nM)	64%
CHO STS(100nM) + εκχύλισμα ελαιολάδου(50μM)	61%



Διάγραμμα 1. Διαγραμματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων του Πίνακα 7

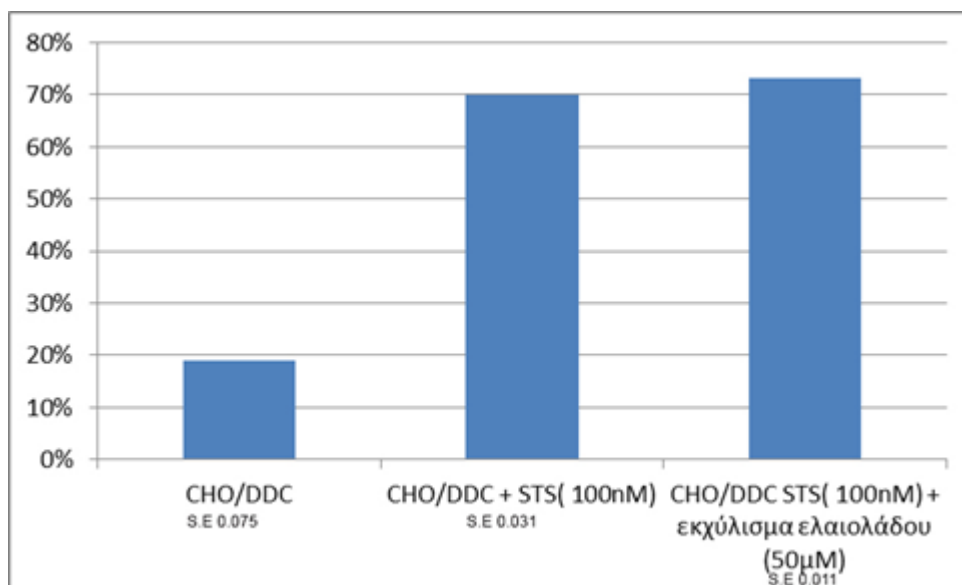
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν βρέθηκε ότι το ποσοστό κυτταρικού θανάτου σε κύτταρα CHO μειώνεται παρουσία εκχυλίσματος εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου. Βάση των αποτελεσμάτων διατυπώνεται η τάση που ανιχνεύτηκε ότι ο κυτταρικός θάνατος αυξάνεται σε σημαντικά επίπεδα παρουσία σταυροσπορίνης ενώ δείχνει να μειώνεται όταν χορηγηθεί ταυτόχρονα με σταυροσπορίνη και εκχύλισμα ελαιολάδου. Χρειάζονται βεβαίως περαιτέρω πειράματα και επιπλέον στατιστικές μελέτες.

Το πειραματικό σφάλμα υπολογίστηκε μέσω του προγράμματος Excel (Standard error) για κάθε χειρισμό με τη συνάρτηση SQRT ως εξής : $\text{Standard error} = \text{STDV} / \text{SQRT}(n)$, όπου n ο αριθμός των επαναλήψεων.

Πίνακας 8 Ποσοστό κυτταρικού θανάτου (βλ. εξίσωση 1) έπειτα από 24h επώαση με STS στην κυτταρική σειρά CHO/DDC παρουσία σταυροσπορίνης και παρουσία σταυροσπορίνης μαζί με εκχύλισμα ελαιολάδου από εξαιρετικά παρθένο δείγμα. Οι τιμές αντιστοιχούν στον μέσο όρο 3 πειραμάτων.

CHO/DDC	19%
CHO/DDC + STS(100nM)	70%
CHO/DDC STS(100nM) + εκχύλισμα ελαιολάδου (50μM)	73%

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν βρέθηκε ότι το ποσοστό κυτταρικού θανάτου σε κύτταρα CHO/DDC αυξάνεται παρουσία εκχυλίσματος εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου. Αυτό οφείλεται στην τοξικότητα που εμφανίζει και η ίδια L- Dopa αποκαρβοξυλάση στα ίδια κύτταρα στα οποία έχει εισαχθεί cDNA ανθρώπινης L- Dopa αποκαρβοξυλάσης.



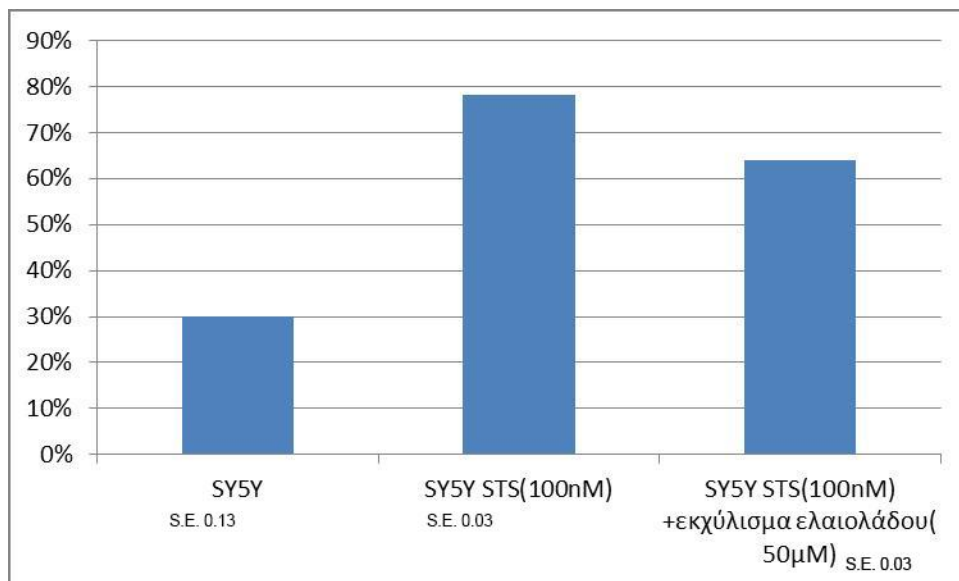
Διάγραμμα 2. Απεικόνιση των αποτελεσμάτων του Πίνακα 8. Το πειραματικό σφάλμα υπολογίσθηκε μέσω του προγράμματος Excel (Standard error) για κάθε χειρισμό με τη συνάρτηση SQRT ως εξής : $\text{Standard error} = \text{STDV} / \text{SQRT}(n)$, όπου n ο αριθμός των επαναλήψεων.

3.2 Επίδραση εκχυλίσματος ελαιολάδου σε κύτταρα SH- SY5Y

Η συγκέντρωση του αποπτωτικού παράγοντα σταυροσπορίνη που χρησιμοποιήθηκε είναι τα 100nM όπου σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία, ορίζεται ως η συγκέντρωση στην οποία τα κύτταρα εμφανίζουν συνήθως κυτταρικό θάνατο σε ποσοστό 50%. Για τις ανάγκες του πειράματος μας, χρησιμοποιήθηκε αυτή η κυτταρική σειρά, ως νευρικού τύπου εκπρόσωπος.

SH-SY5Y	30%
SH-SY5Y STS(100nM)	78%
SH-SY5Y STS(100nM) +εκχύλισμα ελαιολάδου(50μM)	64%

Πίνακας 9 Πόσοστο κυτταρικού θανάτου (βλ. εξίσωση 1) έπειτα από 24h επώαση με STS στην κυτταρική σειρά SH-SY5Y παρουσία σταυροσπορίνης και παρουσία σταυροσπορίνης μαζί με εκχύλισμα ελαιολάδου από εξαιρετικά παρθένο δείγμα. Οι τιμές αντιστοιχούν στον μέσο όρο 3 πειραμάτων.



Διάγραμμα 3. Απεικόνιση των αποτελεσμάτων του Πίνακα 9. Το πειραματικό σφάλμα υπολογίσθηκε μέσω του προγράμματος Excel (Standard error) για κάθε χειρισμό με τη συνάρτηση SQRT ως εξής : $\text{Standard error} = \text{STDV} / \text{SQRT}(n)$, όπου n ο αριθμός των επαναλήψεων.

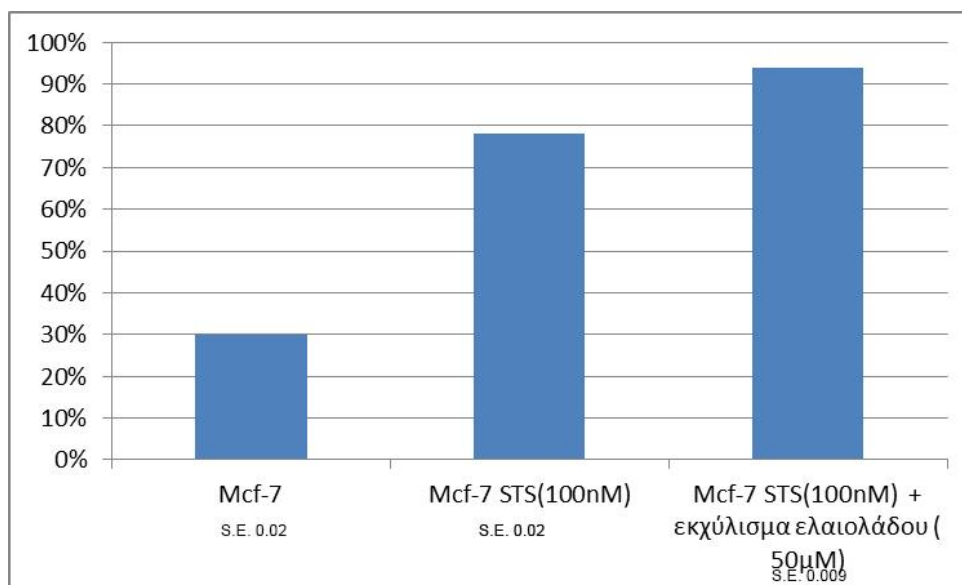
Φαίνεται λοιπόν μέσα από τα αποτελέσματα πως ο κυτταρικός θάνατος των νευρικών κυττάρων SY5Y μειώνεται παρουσία εκχυλίσματος ελαιολάδου από εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο. Τα κύτταρα SY5Y είναι μεν κύτταρα νευροβλαστώματος ωστόσο υπερισχύει η νευρική τους φύση και παρατηρείται ότι όταν χορηγείται σταυροσπορίνη ο κυτταρικός θάνατος αγγίζει το 80% αλλά σε περίπτωση που χορηγηθεί με ταυτόχρονη παρουσία εκχυλίσματος ελαιολάδου τότε μειώνεται κατά 14 μονάδες, αλλαγή που χαρακτηρίζεται αξιοσημείωτη. Πρόκειται δηλαδή για μια πιθανολογούμενη προστατευτική δράση που ωστόσο για να καθοριστεί είναι αναγκαίο να γίνουν περισσότερες μελέτες.

3.3 Επίδραση εκχυλίσματος ελαιολάδου σε κύτταρα MCF-7

Η συγκέντρωση του αποπτωτικού παράγοντα σταυροσπορίνη που χρησιμοποιήθηκε είναι τα 100nM όπου σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία, ορίζεται ως η συγκέντρωση στην οποία τα κύτταρα εμφανίζουν συνήθως κυτταρικό θάνατο σε ποσοστό 50%. Η συγκέντρωση του παράγοντα, του εκχυλίσματος του ελαιολάδου που προέκυψε από εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο υπολογίστηκε πάλι βάση της διεθνούς βιβλιογραφίας στα 50μM

Πίνακας 10. Ποσοστό κυτταρικού θανάτου (βλ. εξίσωση 1) έπειτα από 24h επώαση με STS στην κυτταρική σειρά MCF-7 παρουσία σταυροσπορίνης και παρουσία σταυροσπορίνης μαζί με εκχύλισμα ελαιολάδου από εξαιρετικά παρθένο δείγμα. Οι τιμές αντιστοιχούν στον μέσο όρο 3 πειραμάτων.

MCF-7	30%
MCF-7 STS(100nM)	78%
MCF-7 STS(100nM) + εκχύλισμα ελαιολάδου (50μM)	94%



Διάγραμμα 4. Απεικόνιση των αποτελεσμάτων του πίνακα 10. Το πειραματικό σφάλμα υπολογίστηκε μέσω του προγράμματος Excel (Standard error) για κάθε χειρισμό με τη συνάρτηση SQRT ως εξής : Standard error = STDV/ SQRT(n) , όπου n ο αριθμός των επαναλήψεων.

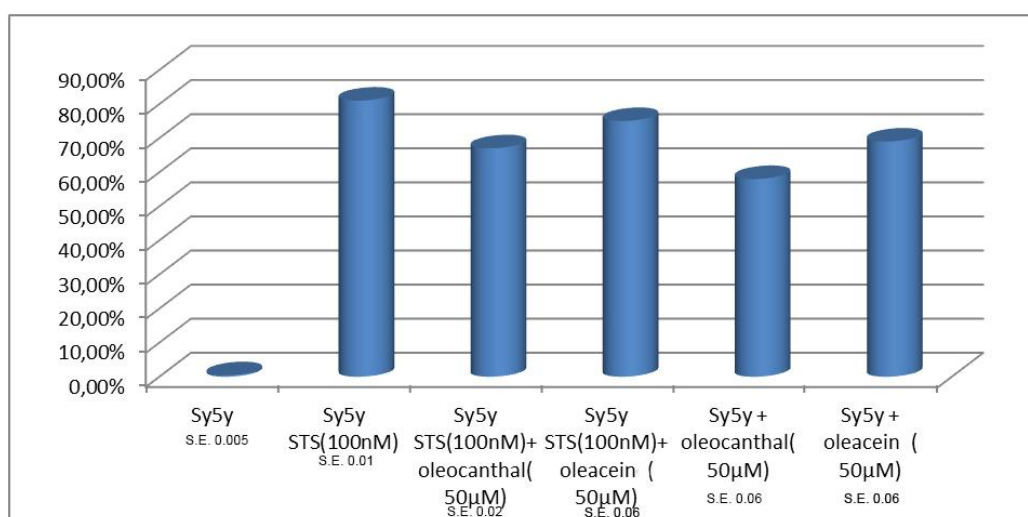
Από το παραπάνω πείραμα είναι εμφανές ότι παρουσία εκχυλίσματος ελαιολάδου διαλυμένου σε DMSO το ποσοστό κυτταρικού θανάτου αυξάνεται δραματικά για τα καρκινικά κύτταρα MCF-7. Χαρακτηριστική κυτταρική σειρά καρκίνου του μαστού και αποτυπώνεται η τάση παροθσία σταυροσπορίνης να αυξάνεται σημαντικά η θνησιμότητα των κυττάρων, ωστόσο ταυτόχρονη παρουσία εκχυλίσματος ελαιολάδου αυξάνει το ποσοστό κυτταρικού θανάτου κατά 16 μονάδες, υποδηλώνοντας πιθανή συνέργεια μεταξύ εκχυλίσματος και κυτταροτοξικών παραγόντων.

3.4 Επίδραση Ελαιοκανθάλης και Ελαιασίνης σε κύτταρα HS- SY5Y

Η συγκέντρωση του αποπτωτικού παράγοντα σταυροσπορίνη που χρησιμοποιήθηκε είναι τα 100nM όπου σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία, ορίζεται ως η συγκέντρωση στην οποία τα κύτταρα εμφανίζουν συνήθως κυτταρικό θάνατο σε ποσοστό 50%. Για τις ανάγκες του πειράματος μας, χρησιμοποιήθηκε αυτή η κυτταρική σειρά, ως νευρικού τύπου εκπρόσωπος.

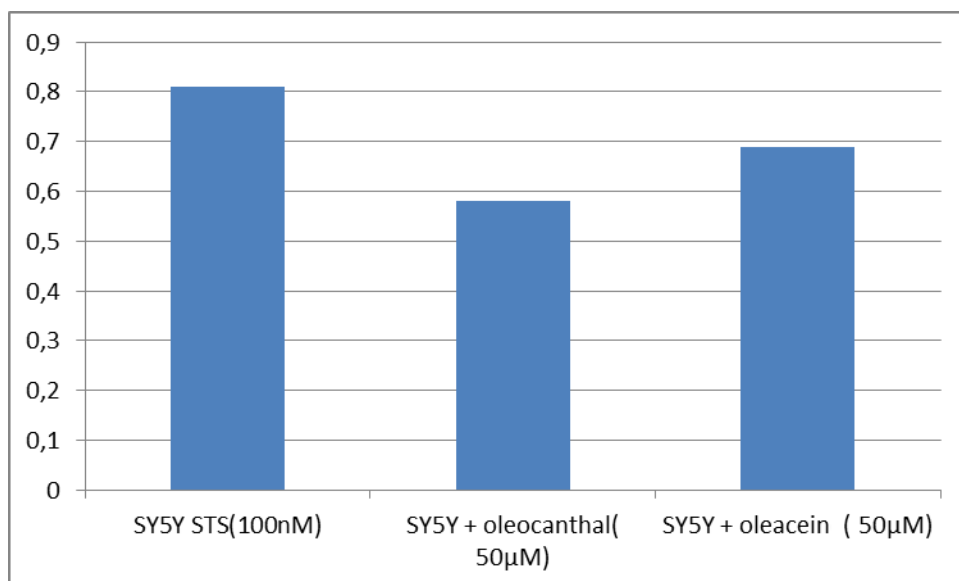
SY5Y	0.43%
SY5Y STS(100nM)	81%
SY5Y STS(100nM)+ ελαιοκανθάλη(50μM)	67%
SY5Y STS(100nM)+ ελαιασίνη(50μM)	75%
SY5Y + ελαιοκανθάλη(50μM)	58%
SY5Y + ελαιασίνη(50μM)	69%

Πίνακας 11. Ποσοστό κυτταρικού θανάτου (βλ. εξίσωση 1) έπειτα από 24h επώαση με STS στην κυτταρική σειρά HS-SY5Y παρουσία σταυροσπορίνης και παρουσία σταυροσπορίνης μαζί με Ελαιοκανθάλη και ελαιασίνη απομονωμένες από εξαιρετικά παρθένο δείγμα και διαλυτοποιημένες σε διάλυμα DMSO. Οι τιμές αντιστοιχούν στον μέσο όρο 3 πειραμάτων.



Διάγραμμα 5 Απεικόνιση των αποτελεσμάτων του πίνακα 11. Το πειραματικό σφάλμα υπολογίσθηκε μέσω του προγράμματος Excel (Standard error) για κάθε χειρισμό με τη συνάρτηση SQRT ως εξής : Standard error = STDV/ SQRT(n) , όπου n ο αριθμός των επαναλήψεων .

Δίνεται όμως και επιπλέον διάγραμμα για την εξαγωγή συμπερασμάτων και την σύγκριση της κυτταροτοξικότητας μεταξύ της σταυροσπορίνης και των φαινολικών συστατικών.



Διάγραμμα 5.1 Απεικόνιση επιμέρους αποτελεσμάτων του πίνακα 11

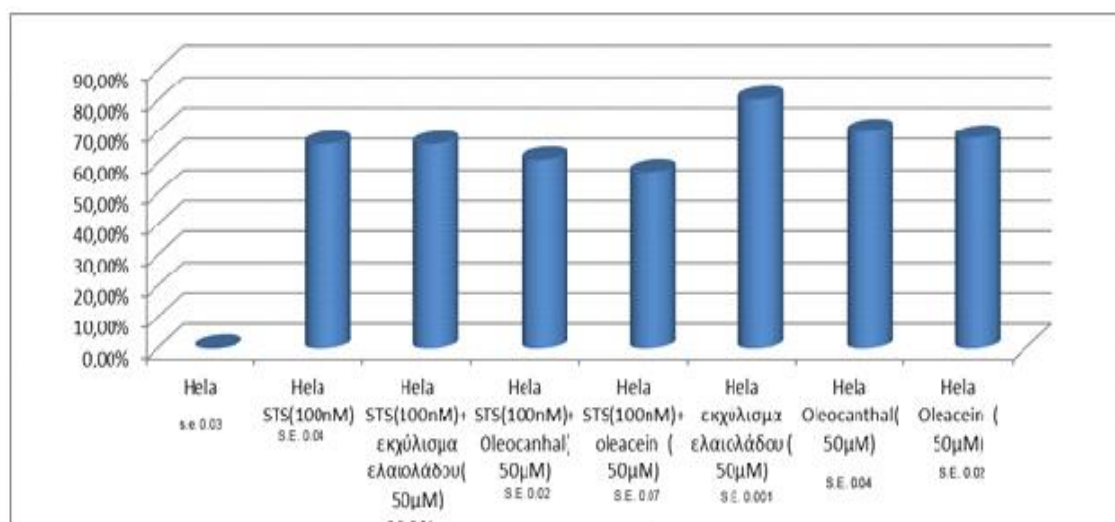
Από το εν λόγω πείραμα προκύπτει και διατυπώνεται η υπόθεση πως οι φαινόλες όταν χορηγούνται με ταυτόχρονη παρουσία σταυροσπορίνης μειώνουν το ποσοστό κυτταρικού θανάτου υποδηλώνοντας έτσι μια πιθανή προστατευτική δράση. Παρουσία σταυροσπορίνης με ταυτόχρονη παρουσία απομονωμένων ενώσεων μειώνουν τον κυτταρικό θάνατο κατά 6 και 14 μονάδες για την ελαιασίνη και την ελαιοκανθάλη αντίστοιχα. Επιπλέον παρατηρείται πιθανή κυτταροτοξικότητα όταν χορηγείται σε αποκλειστικότητα κάποια από τις φαινόλες, δηλώνοντας έτσι μια πιθανή κυτταροτοξικότητα ίσως με διαφορετικούς μηχανισμούς από εκείνους που δρα η σταυροσπορίνη. Ωστόσο για τον πλήρη αποσαφηνισμό κρίνεται αναγκαίο να πραγματοποιηθούν περαιτέρω πειράματα, ιδιαίτερα δε σε φυσιολογικά κύτταρα, όπως είναι τα κύτταρα HEK293 που είναι κύτταρα ανθρωπίνου εμβρυϊκού ιστού.

3.5 Επίδραση εκχυλίσματος ελαιολάδου, Ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης σε κύτταρα HeLa

Η συγκέντρωση του αποπτωτικού παράγοντα σταυροσπορίνη που χρησιμοποιήθηκε είναι τα 100nM όπου σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία, ορίζεται ως η συγκέντρωση στην οποία τα κύτταρα εμφανίζουν συνήθως απόπτωση σε ποσοστό 50%.

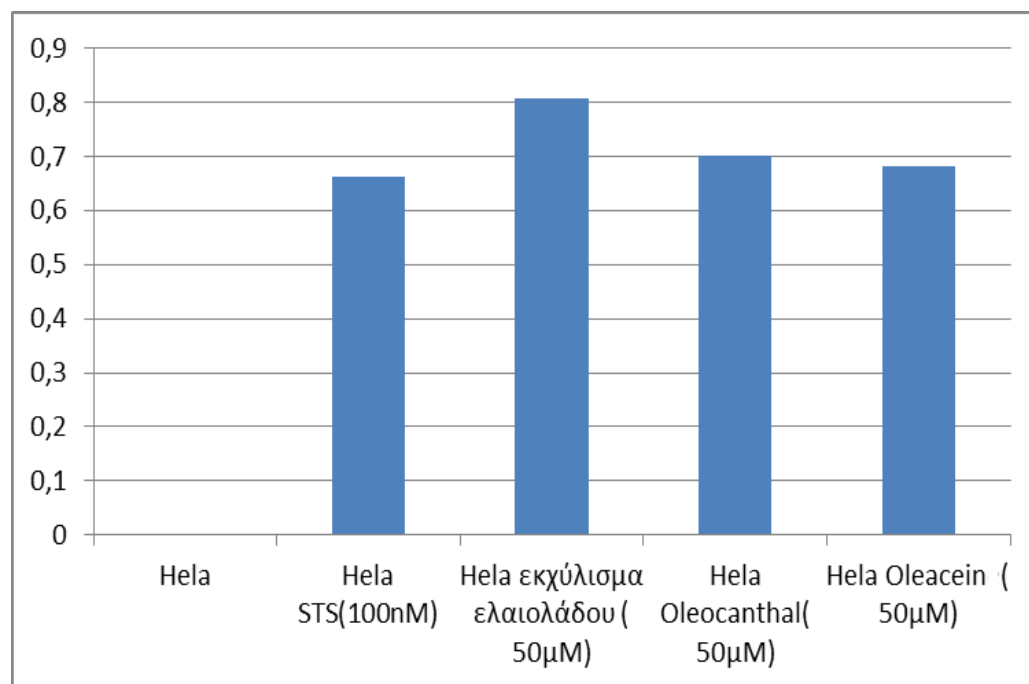
HeLa	0,1%
HeLa STS(100nM)	66%
HeLa STS(100nM)+ εκχύλισμα ελαιολάδου(50μM)	66%
HeLa STS(100nM)+ Ελαιοκανθάλη(50μM)	61%
HeLa STS(100nM)+ Ελαιασίνη (50μM)	57%
HeLa εκχύλισμα ελαιολάδου (50μM)	80,5%
HeLa Ελαιοκανθάλη(50μM)	70%
HeLa Ελαιασίνη(50μM)	68%

Πίνακας 12 Ποσοστό κυτταρικού θανάτου (βλ. εξίσωση 1) έπειτα από 24h επώαση με STS στην κυτταρική σειρά HeLa παρουσία σταυροσπορίνης και παρουσία σταυροσπορίνης μαζί με Ελαιοκανθάλη και ελαιασίνη απομονωμένες από εξαιρετικά παρθένο δείγμα και διαλυτοποιημένες σε διάλυμα DMSO. Οι τιμές αντιστοιχούν στον μέσο όρο 3 πειραμάτων.



Διάγραμμα 6 Απεικόνιση των αποτελεσμάτων του Πίνακα 12. Το πειραματικό σφάλμα υπολογίσθηκε μέσω του προγράμματος Excel (Standard error) για κάθε χειρισμό με τη συνάρτηση SQRT ως εξής : $\text{Standard error} = \text{STDV} / \text{SQRT}(n)$, όπου n ο αριθμός των επαναλήψεων .

Δίνεται όμως και επιπλέον διάγραμμα για την εξαγωγή συμπερασμάτων και την σύγκριση της κυτταροτοξικότητας μεταξύ της σταυροσπορίνης και των φαινολικών συστατικών.



Διάγραμμα 6.1 Απεικόνιση επιμέρους αποτελεσμάτων του πίνακα 12

Με βάση τα αποτελέσματα του πειράματος φαίνεται πως οι απομονωμένες φαινόλες διαλυτοποιημένες σε DMSO προκαλούν μεγαλύτερα ποσοστά κυτταρικού θανάτου όταν παρέχονται μόνες τους σε τέτοιο βαθμό που προκαλούν μεγαλύτερη απόπτωση απ ότι ο παράγοντας τεχνητής απόπτωσης, σταυροσπορίνη. Ενώ φαίνεται ότι το εκχύλισμα του εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου προκαλεί ακόμα

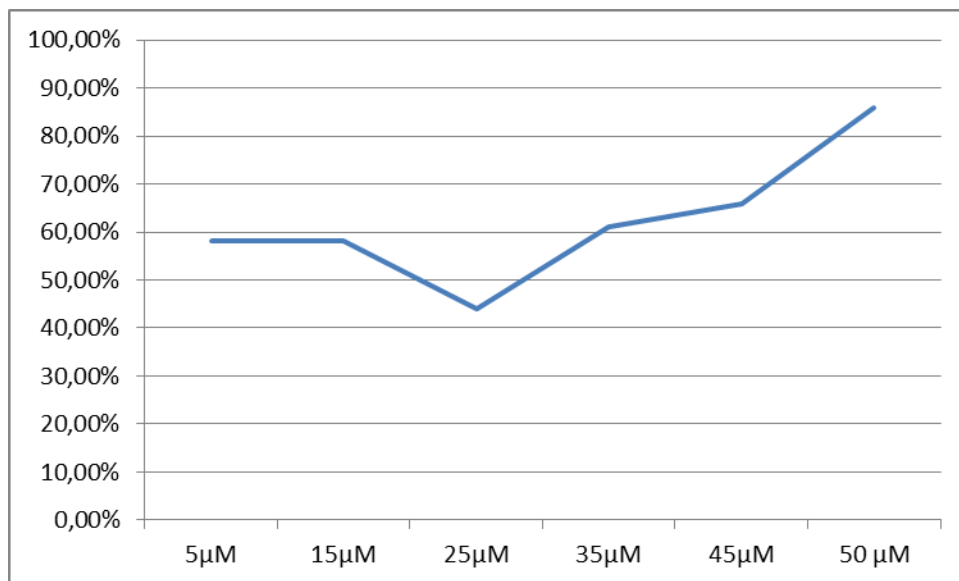
μεγαλύτερα ποσοστά κυτταρικού θανάτου. Σε παρουσία αποκλειστικά απομονωμένων ουσιών τα ποσοστά κυτταρικού θανάτου αυξάνονται σε σχέση με την αποκλειστική χορήγηση σταυροσπορίνης κατά 2 ή 4 μονάδες για την ελαιασίνη και την ελαιοκανθάλη αντίστοιχα. Ωστόσο το μεγαλύτερο ποσοστό κυτταρικού θανάτου παρατηρείται όταν χορηγείται αποκλειστικά εκχύλισμα ελαιολάδου μίγμα δηλαδή φαινολών ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης, μεγαλύτερο κατά 14 μονάδες απ όταν χορηγείται σταυροσπορίνη στις κυτταρικές σειρές, με αποτέλεσμα να υποδηλώνεται έντονα μια πιθανή συνέργεια μεταξύ των δυο ουσιών. Παρατηρείται παραμφερής κυτταροτοξικότητα μεταξύ εκχυλίσματος ελαιολάδου και των απομονωμένων φαινολών ενώ αξιοσημείωτη είναι η τάση που προκύπτει να έχουν δράση ανάλογη της σταυροσπορίνης.

3.5.1 Συσχέτιση δόσης-δράσης (dose response) εκχυλίσματος και απομονωμένων ουσιών σε κύτταρα HeLa

Βάση των πολύ ενδιαφερόντων αποτελεσμάτων που αναφέρθηκαν παραπάνω των προηγούμενων πειραμάτων και την παρατηρούμενη συγκρίσιμη δράση των παραγώγων του ελαιολάδου, με την σταυροσπορίνη πραγματοποιήθηκε νέα σειρά πειραμάτων για τον έλεγχο των επιπέδων κυτταροτοξικής δράσης των ουσιών συναρτήσει της δοσολογίας. Έτσι χορηγήθηκε στα κύτταρα εκχύλισμα ελαιολάδου από εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο, ελαιοκανθάλη και ελαιασίνη απομονωμένες από εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο σε διαδοχικά μικρότερες συγκεντρώσεις έως ότου παρατηρηθεί δραστηριότητα μικρότερη του 50% .

HeLa dose response- εκχύλισμα ελαιολάδου	
50 μ M	86%
5 μ M	58%
15M	58%
25 μ M	44%
35 μ M	61%
45 μ M	66%

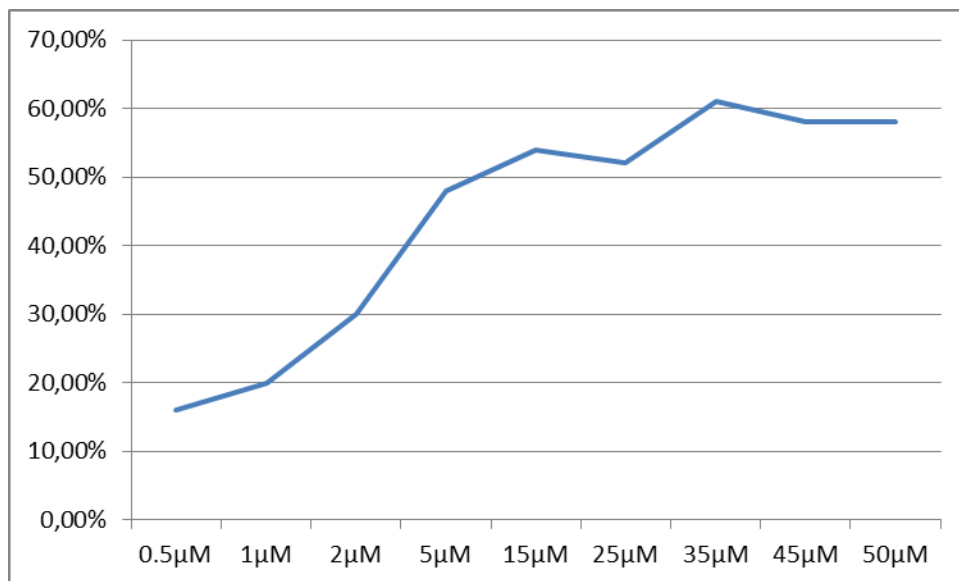
Πίνακας 13 Dose response εκχυλίσματος ελαιολάδου σε κύτταρα HeLa



Διάγραμμα 7. Απεικόνιση των αποτελεσμάτων του πίνακα 13 όπου φαίνεται ακριβώς πως η δράση του εκχυλίσματος ελαιολάδου παραμένει σε υψηλά επίπεδα ακόμα και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις.

HeLa dose response-ελαιασίνη	
50 μM	58%
0.5μM	16%
1μM	20%
2μM	30%
5μM	48%
15μM	54%
25μM	52%
35μM	61%
45μM	58%

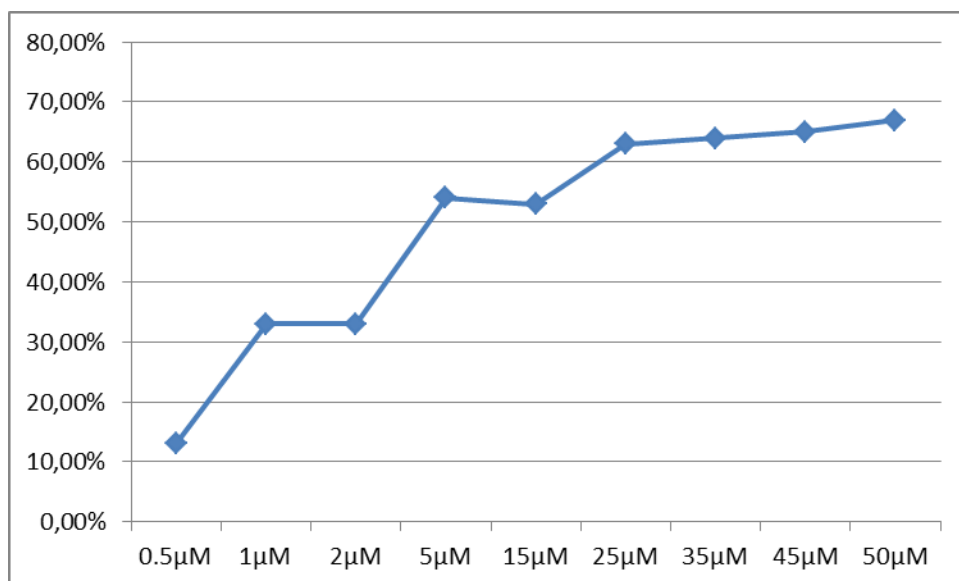
Πίνακας 14 Dose response της ελαιασίνης σε κύτταρα HeLa



Διάγραμμα 8 Απεικόνιση των αποτελεσμάτων του πίνακα 14 όπου φαίνεται πως η δράση της ελαιοσίνης αυξάνεται εκθετικά όσο ανεβάζουμε τις δόσεις σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις.

HeLa dose response-ελαιοκανθάλη	
50 μM	67%
0.5μM	13%
1μM	33%
2μM	33%
5μM	54%
15μM	53%
25μM	63%
35μM	64%
45μM	65%

Πίνακας 15 Dose response Ελαιοκανθάλης για τον έλεγχο της δραστηριότητας της σε καρκινικά κύτταρα HeLa



Διάγραμμα 9 Απεικόνιση των αποτελεσμάτων του πίνακα 15. Η δράση της Ελαιοκανθάλης παραμένει σε αξιοσημείωτα επίπεδα ακόμα και σε μικρότερες συγκεντρώσεις.

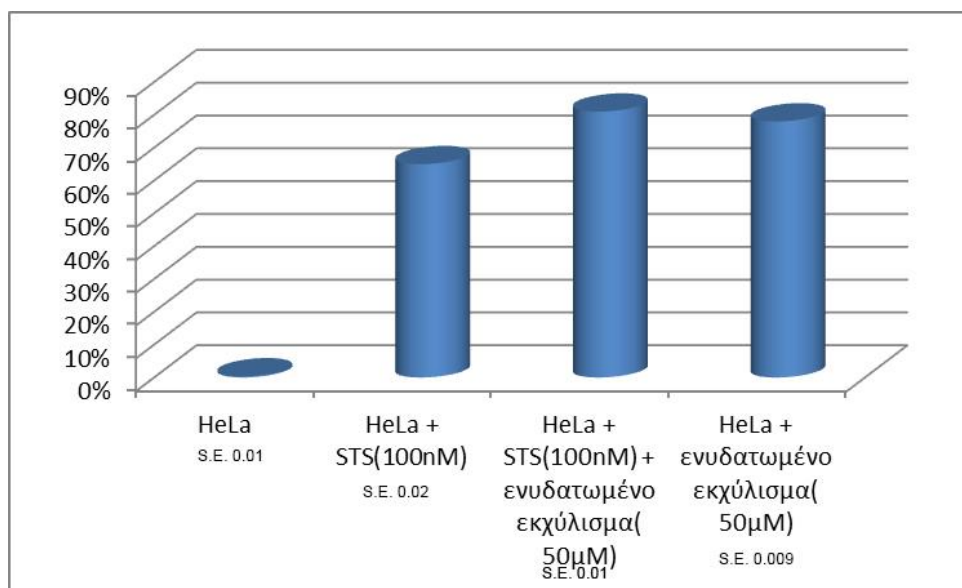
3.6 Επίδραση Ελαιοκανθάλης, ελαιασίνης και εκχυλίσματος ελαιολάδου σε ενυδατωμένη μορφή σε καρκινικά κύτταρα HeLa

Βάση των αποτελεσμάτων από τα προηγούμενα πειράματα επιχειρήθηκε να απομονωθούν οι φαινολικές ουσίες αφού πρώτα ενυδατωθούν. Η σημαντικότητα των πειραμάτων αποδίδεται στο γεγονός πως παρότι εμφανίζονται δράσεις των ουσιών ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης *in vivo* και *in vitro* σε διαφορετικά πειράματα της επιστημονικής κοινότητας, η δραστική ουσία δεν έχει γίνει εφικτό να απομονωθεί ή ακόμα και να ανιχνευθεί στο εσωτερικό κυττάρων ή οργανισμών, με αποτέλεσμα να υιοθετείται η υπόθεση πως αυτό συμβαίνει γιατί η δραστική μορφή δεν είναι η αλδεϋδική αλλά η ενυδατωμένη.

Η συγκέντρωση του αποπτωτικού παράγοντα σταυροσπορίνη που χρησιμοποιήθηκε είναι τα 100nM όπου σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία, ορίζεται ως η συγκέντρωση στην οποία τα κύτταρα εμφανίζουν συνήθως κυτταρικό θάνατο σε ποσοστό 50%.

HeLa	0,36%
HeLa + STS(100nM)	65%
HeLa + STS(100nM) + ενυδατωμένο εκχύλισμα(50μM)	81%
HeLa + ενυδατωμένο εκχύλισμα(50μM)	78%

Πίνακας 16 Ποσοστό κυτταρικού θανάτου (βλ. εξίσωση 1) έπειτα από 24h επώαση με STS στην κυτταρική σειρά HeLa παρουσία σταυροσπορίνης και παρουσία ή απουσία σταυροσπορίνης μαζί με ενυδατωμένο εκχύλισμα. Οι τιμές αντιστοιχούν στον μέσο όρο 3 πειραμάτων.



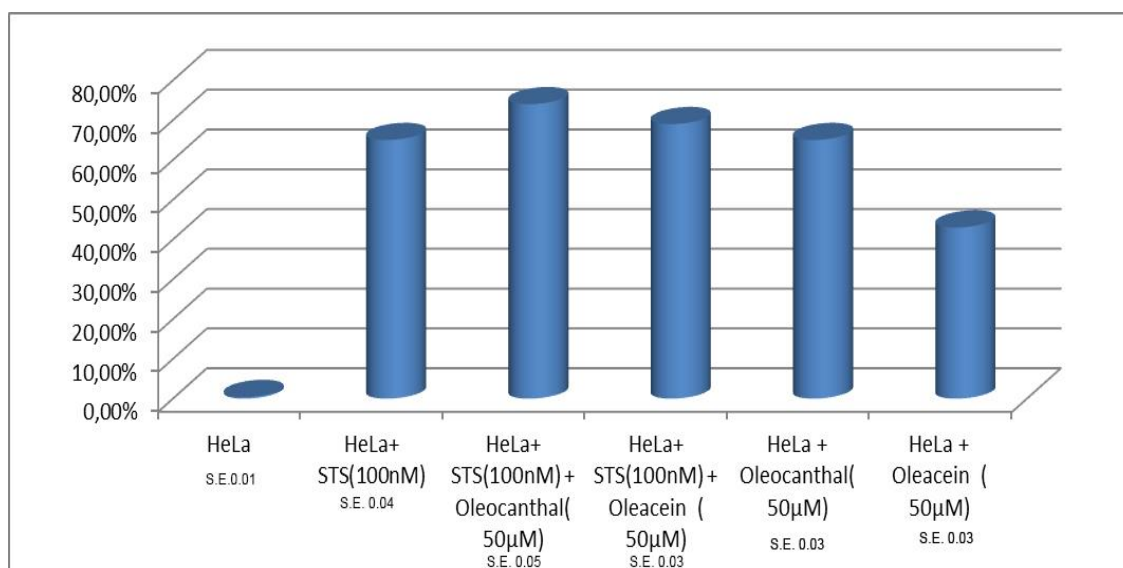
Διάγραμμα 10 Απεικόνιση των αποτελεσμάτων που περιγράφηκαν στον Πίνακα 16. Το πειραματικό σφάλμα υπολογίστηκε μέσω του προγράμματος Excel (Standard error) για κάθε χειρισμό με τη συνάρτηση SQRT ως εξής : Standard error = STDV/ SQRT(n) , όπου n ο αριθμός των επαναλήψεων.

Παρατηρείται πως το ποσοστό κυτταρικού θανάτου παρουσία ενυδατωμένου εκχυλίσματος αυξάνεται κατά 13 μονάδες , σε σύγκριση με το ποσοστό θανάτου όταν χορηγείται αποκλειστικά σταυροσπορίνη, ενώ με ταυτόχρονη χορήγηση ενυδατωμένου εκχυλίσματος και σταυροσπορίνης το ποσοστό κυτταρικού θανάτου αυξάνεται κατά 16 μονάδες.

Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε για την ελαιοκανθάλη και την ελαιασίνη ενώ τα αποτελέσματα περιγράφονται στον παρακάτω πίνακα.

HeLa	0,4%
HeLa+ STS(100nM)	65%
HeLa+ STS(100nM) + Ελαιοκανθάλη (50μM)	74%
HeLa+ STS(100nM) + Ελαιασίνη(50μM)	69%
HeLa + Ελαιοκανθάλη(50μM)	65%
HeLa + Ελαιασίνη(50μM)	43%

Πίνακας 17. Επίδραση ενυδατωμένης μορφής Ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης σε καρκινικά κύτταρα HeLa. Οι τιμές αφορούν τον μέσο όρο τριών πειραμάτων



Διάγραμμα 11 Απεικόνιση των αποτελεσμάτων του πίνακα 17. Το πειραματικό σφάλμα υπολογίστηκε μέσω του προγράμματος Excel (Standard error) για κάθε χειρισμό με τη συνάρτηση SQRT ως εξής : Standard error = STDV/ SQRT(n) , όπου n ο αριθμός των επαναλήψεων.

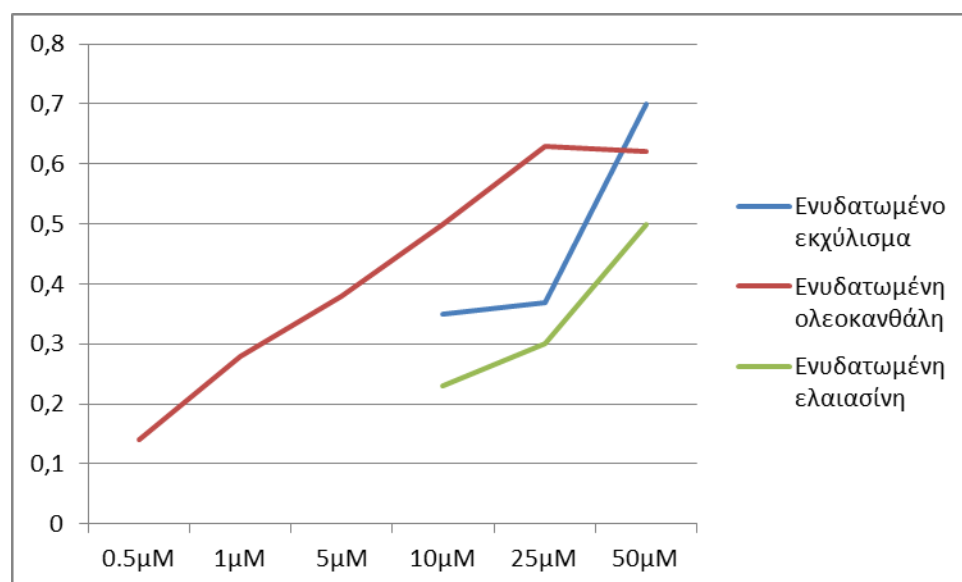
Σε μια ακόμα περίπτωση φαίνεται η αυξημένη δράση της ελαιοκανθάλης τόσο σε σύγκριση με την ελαιασίνη όσο και με τον αποπτωτικό παράγοντα σταυροσπορίνη από τον οποίο παρουσιάζει μεγαλύτερα ποσοστά. Το ποσοστό κυτταρικού θανάτου με αποκλειστική χορήγηση σταυροσπορίνης αγγίζει το 65% ενώ το ποσοστό αυτό με ταυτόχρονη παρουσία ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης αυξάνεται κατά 9 και 4 μονάδες αντίστοιχα. Όταν δε χορηγείται αποκλειστικά ελαιοκανθάλη στα καρκινικά κύτταρα εμφανίζεται ποσοστό κυτταρικού θανάτου ίσο, με το ποσοστό κυτταρικού θανάτου που προκύπτει από χορήγηση σταυροσπορίνης στην περίπτωση της ελαιοκανθάλης και μειωμένο κατά 22 μονάδες ωστόσο διατηρημένο σε υψηλά επίπεδα στην περίπτωση της ελαιασίνης.

3.6.1 Συσχέτιση δόσης δράσης(Dose response) ενυδατωμένων μορφών

Μετά από τα προηγούμενα αποτελέσματα επιλέχτηκε διαδικασία ελέγχου της δραστηριότητας των ουσιών μας αυτή την φορά όσο αφορά την ενυδατωμένη τους μορφή. Έτσι χορηγήθηκε στα κύτταρα ενυδατωμένο εκχύλισμα ελαιόλαδου από εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο, ενυδατωμένη ελαιοκανθάλη και ελαιασίνη απομονωμένες από εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο, σε διαδοχικά μικρότερες συγκεντρώσεις έως ότου παρατηρηθεί δραστηριότητα μικρότερη του 50% .

HeLa	Ενυδατωμένο εκχύλισμα	Ενυδατωμένη Ελαιοκανθάλη	Ενυδατωμένη ελαιασίνη
0.5μM		14%	16%
1μM	33%	28%	40%
5μM		38%	31%
10μM	35%	50%	23%
25μM	37%	63%	30%
50μM	70%	62%	50%

Πίνακας 18 Dose response ενυδατωμένου εκχυλίσματος, ενυδατωμένης ελαιοκανθάλης και ενυδατωμένης ελαιασίνης



Διάγραμμα 12 Απεικόνιση των αποτελεσμάτων του Πίνακα 18

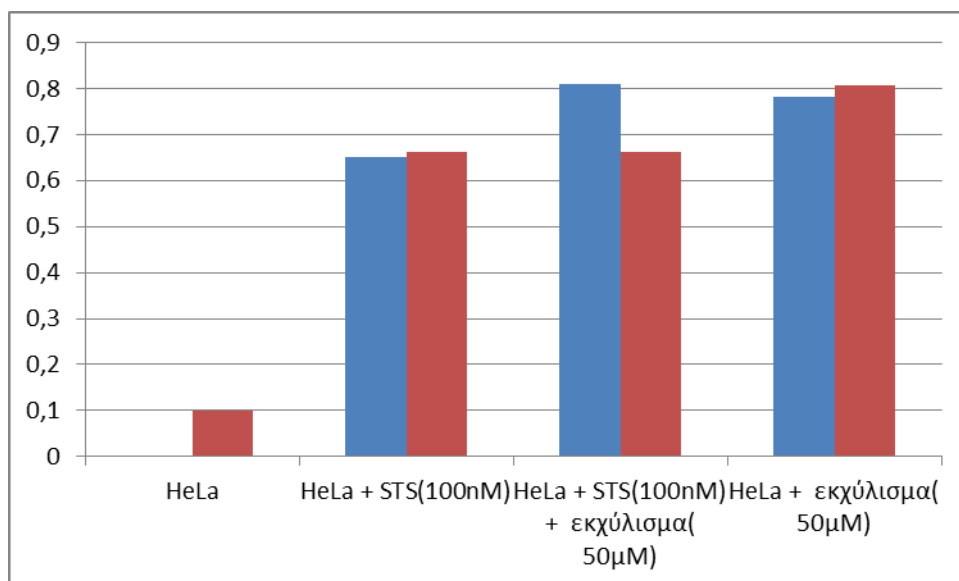
Όπως είναι εμφανές η ελαιοκανθάλη σε σύγκριση με την ελαιασίνη έχει σημαντικά μεγαλύτερη δράση ενώ φαίνεται επίσης ότι το εκχύλισμα του ελαιολάδου που περιέχει και τις δύο, σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις έχει καλύτερα αποτελέσματα γεγονός που υποδηλώνει συνέργεια.

Η πειραματική διαδικασία αυτή ακολουθήθηκε προκειμένου να γίνει εμφανές κατά πόσο είναι εφικτή πιθανή φαρμακευτική προσέγγιση με χορήγηση ουσιών απομονωμένων από εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο και τις συγκεντρώσεις τις οποίες πιθανώς να εμφάνιζε στο εσωτερικό του ανθρώπινου οργανισμού.

3.6.2 Σύγκριση ενυδατωμένων μορφών με μη ενυδατωμένες μορφές

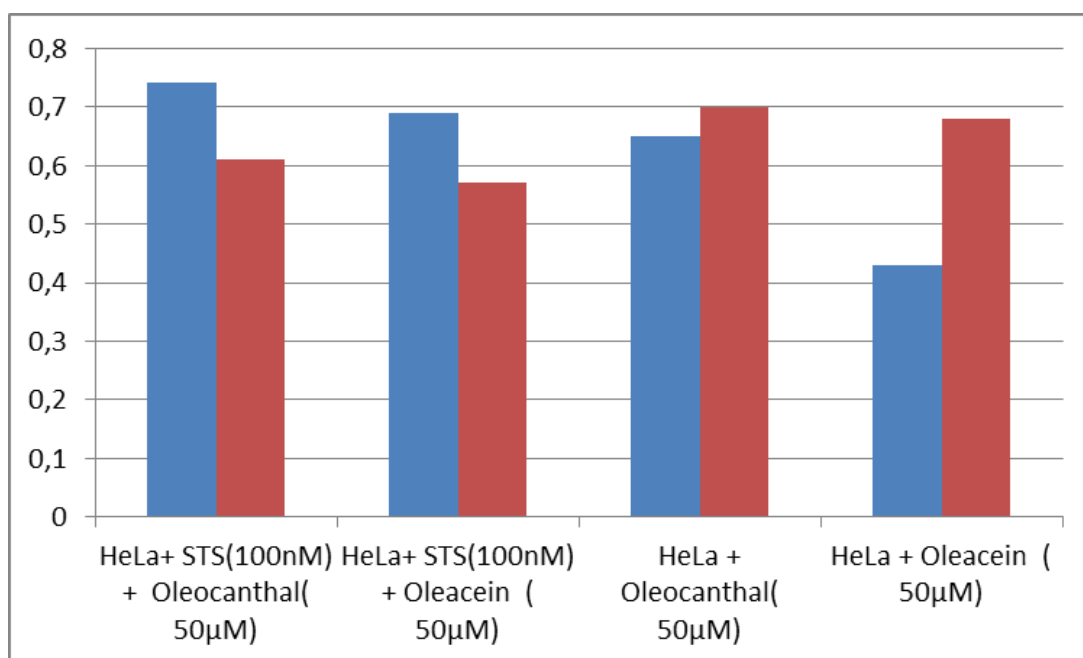
Παρατηρώντας τα καταγεγραμμένα αποτελέσματα των πειραμάτων είναι φανερό πως οι εν λόγω ουσίες σε οποιαδήποτε μορφή έχουν μια πολύ σημαντική δράση είτε σε φυσιολογικά κύτταρα προστατεύοντας και μειώνοντας τα ποσοστά κυτταρικού θανάτου είτε σε καρκινικά κύτταρα που αποδεικνύονται τοξικές αυξάνοντας το ποσοστό κυτταρικού θανάτου αξιοσημείωτα.

Επιπλέον παρατίθενται σε διαγραμματική απεικόνιση οι δυο σειρές πειραμάτων σε καρκινικά κύτταρα HeLa για την διευκόλυνση της κατανόησης των αποτελεσμάτων. Υπενθυμίζεται πως οι τιμές αποτελούν μέσους όρους τριών πειραμάτων.



Διάγραμμα 13 Σύγκριση εκχυλισμάτων ενυδατωμένων μορφών με κόκκινο χρώμα και μη ενυδατωμένων με μπλε χρώμα

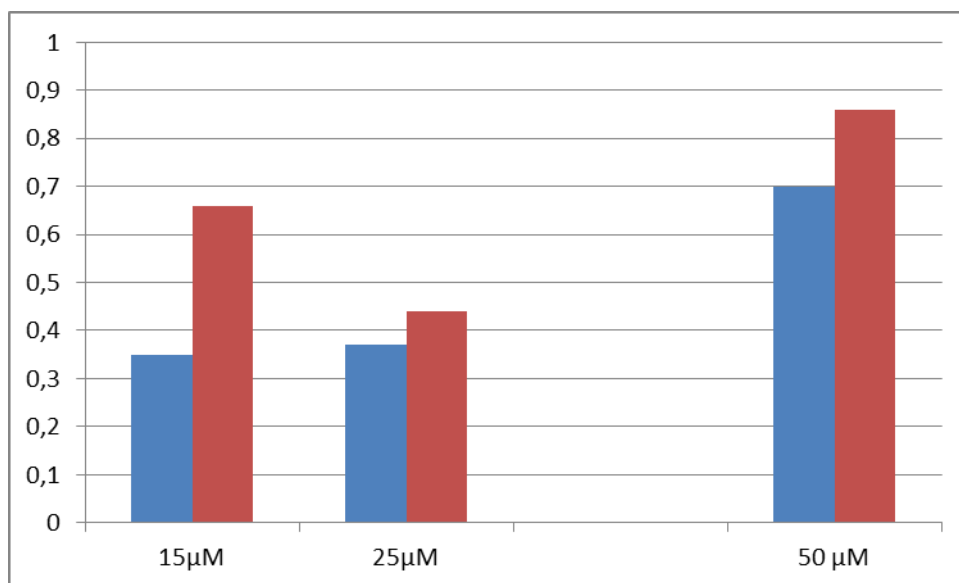
Από το διάγραμμα 13 φαίνεται λοιπόν ότι σε περίπτωση αποκλειστικής χορήγησης το ενυδατωμένο εκχύλισμα εμφανίζει μεγαλύτερα ποσοστά πρόκλησης κυτταρικού θανάτου σε σύγκριση με την αλδεϋδική μορφή ενώ σε περίπτωση συγχορήγησης εκχυλίσματος με σταυροσπορίνη τα ποσοστά πρόκλησης κυτταρικού θανάτου είναι μεγαλύτερα στην περίπτωση της αλδεϋδικής μορφής.



Διάγραμμα 14 Σύγκριση ποσοστών κυτταρικού θανάτου μετά από χορήγηση ενυδατωμένης μορφής απομονωμένων ουσιών (κόκκινο χρώμα) και αλδεϋδικής (μπλε χρώμα)

Όπως φαίνεται στο διάγραμμα 14 η πρόκληση κυτταρικού θανάτου με την χορήγηση ενυδατωμένης ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης εκφράζεται με πολύ μεγαλύτερα ποσοστά, ιδιαίτερα στην περίπτωση της ελαιασίνης ενώ σε περίπτωση χορήγησης ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης με ταυτόχρονη χορήγηση σταυροσπορίνης προκαλεί μεγαλύτερα ποσοστά κυτταρικού θανάτου στην περίπτωση των αλδευδικών μορφών των ουσιών.

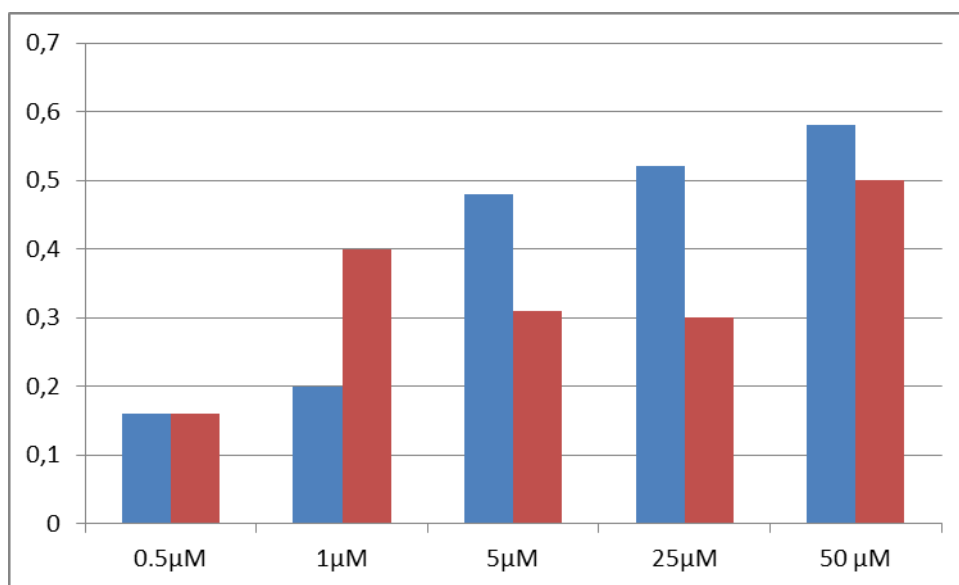
Επιπλέον πραγματοποιείται σύγκριση της δραστικότητας σε μειωμένες συγκεντρώσεις προκειμένου να παρατηρηθεί εάν οι συγκεντρώσεις που υποδηλώνονται στην βιβλιογραφία έχουν κάποια επίδραση μέσω της διατροφής ή άλλων πηγών για να διαπιστωθεί ποια από τις δυο μορφές των ουσιών, η ενυδατωμένη ή η αλδεϋδική είναι πιο δραστική και εάν εμφανίζουν δραστικότητα όπως διαπιστώθηκε προηγουμένως.



Διάγραμμα 15 Απεικόνιση σύγκρισης ενυδατωμένης μορφής ενώσεων μίγμα εκχυλίσματος (μπλε χρώμα) και αλδεϋδικής μορφής μίγμα ενώσεων (κόκκινο χρώμα)

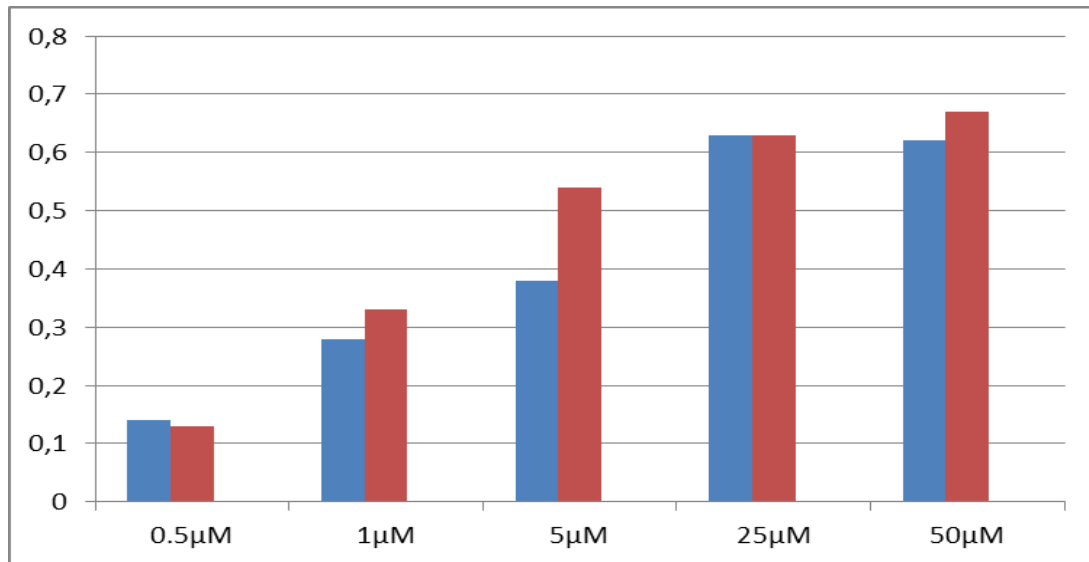
Παρατηρείται ότι το αλδεϋδικής φύσης εκχύλισμα εμφανίζει μεγαλύτερη δραστικότητα από το υδατικής φύσης εκχύλισμα, με τα ποσοστά του δεύτερου όμως να παραμένουν αξιοσημείωτα ακόμα και σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις κάτι που δεν παρατηρήθηκε στα πρώτα όπως αναφέρθηκε προηγουμένως.

Όσο αφορά την Ελαιασίνη ξανά μεταξύ των δυο μορφών η αλδεϋδική εμφανίζει μεγαλύτερη δραστικότητα αλλά σε μικρότερες συγκεντρώσεις η εικόνα αντιστρέφεται με την ενυδατωμένη μορφή αυτήν την φορά να εμφανίζει μεγαλύτερη δραστικότητα όπως παρατηρείται από το επόμενο διάγραμμα.



Διάγραμμα 16 Απεικόνιση σύγκρισης μεταξύ ενυδατωμένης μορφής ελαιασίνης(κόκκινο χρώμα) και αλδευδικής μορφής(μπλε χρώμα) σε διάφορες συγκεντρώσεις

Τέλος για την ελαιοκανθάλη στις μεγάλες συγκεντρώσεις τα ποσοστά κυμαίνονται στα ίδια επίπεδα τόσο για την ενυδατωμένη μορφή όσο και για την αλδευδική ενώ για τις μικρότερες συγκεντρώσεις τα ποσοστά δραστηριότητας εναλλάσσονται και εμφανίζονται τότε πιο υψηλά για την ενυδατωμένη μορφή (0, 5μM) και τότε πιο υψηλά για την αλδευδική μορφή(1μM) .



Διάγραμμα 17 Απεικόνιση σύγκρισης μεταξύ ενυδατωμένης μορφής ελαιοκανθάλης (κόκκινο χρώμα) και αλδευδικής μορφής(μπλε χρώμα) σε διάφορες συγκεντρώσεις

4. Συζήτηση- Συμπεράσματα

Η ελαιοκανθάλη και η ελαιασίνη έχουν προσελκύσει το επιστημονικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια, με την ελπίδα ότι οι ουσίες αυτές διαθέτουν θεραπευτικές ιδιότητες. Οι θετικές πειραματικές ενδείξεις συνεχώς πληθαίνουν. Αυτό που πρέπει να τονιστεί είναι ότι η απόσταση που χωρίζει μια δομή που έχει θεραπευτικές δράσεις μέχρι την παρασκευή σκευάσματος χαρακτηρισμένο ως φάρμακο είναι πολύ μεγάλη και απαιτεί μεγάλο αριθμό πειραμάτων και χρόνου.

Στην παρούσα ερευνητική μελέτη ακολουθήθηκαν ένα ένα τα βήματα που πρέπει να ακολουθηθούν σε τέτοια περίπτωση και εξελίχθηκαν ως τον βαθμό που διέπει το επίπεδο μιας διπλωματικής εργασίας στο στάδιο του μεταπτυχιακού. Επιλέχθηκε ένα εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο μετά από ανάλυση περισσότερων από είκοσι που βρίσκονταν εκείνη την στιγμή στην διάθεση του εργαστηρίου με βάση συγκεκριμένα χαρακτηριστικά. Τα χαρακτηριστικά που αναζητήθηκαν ήταν εξαιρετικά μεγάλη συγκέντρωση ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης σε τέτοιο βαθμό που λοιπές ουσίες να μην ανευρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες προκειμένου να είναι εύκολο να τις απομακρύνουμε. Οι χειρισμοί που επιλέχθηκαν ήταν τέτοιοι ώστε να μην προκαλούν την διάσπαση τους ή την μετατροπή τους σε άλλες.

Το ελαιόλαδο εκχυλίστηκε και οι ουσίες απομονώθηκαν με υγρή- υγρή εκχύλιση και με χρωματογραφία στήλης. Στη συνέχεια επιλέχθηκε ένα μέσο διάλυσης για την χορήγηση στις κυτταρικές σειρές όπως είναι το διμεθυλοσουλφοξείδιο εν αντιθέσει με άλλα πειράματα που χρησιμοποιήθηκε η μεθανόλη και που έχει πειραματικά αποδειχτεί ότι καταστρέφει σε ένα βαθμό τις φαινόλες (Abuznait et al., 2013).

Ακριβώς επόμενο στάδιο ήταν η μελέτη της βιολογικής τους δράσης και έτσι ακριβώς σε αντιστοιχία με διάφορα μοντέλα επιλέχθηκαν διαφορετικές κυτταρικές σειρές για την πλήρη μελέτη, όσο το δυνατόν, που θα μπορούσε να καταγραφεί. Επιλέχθηκαν δυο καρκινικές σειρές για την μελέτη της κυτταροτοξικής δράσης της ελαιοκανθάλης και της ελαιασίνης έναντι καρκινικών κυττάρων αλλά και εκχυλίσματος ελαιολάδου που περιείχε και τις δυο προκειμένου να εξεταστεί πιθανή συνέργεια των δυο ουσιών. Επιλέχθηκε επίσης η κυτταρική σειρά SH-SY5Y με υπερισχύουσα φύση νευρική προκειμένου να δούμε την επίδραση τους σε κύτταρα που παρά την καρκινική προέλευση τους συμπεριφέρονται μερικώς σαν φυσιολογικά κύτταρα για την σύνδεση της μελέτης με την νόσο Parkinson και του Alzheimer όπως συνηθίζεται σε ερευνητικές μελέτες. Ενώ τέλος επιλέχθηκαν δυο κυτταρικές σειρές πανομοιότυπες με την μια να εκφράζει τεχνητά και την άλλη να μην εκφράζει την L- Dopa αποκαρβοξυλάση για την σύνδεση της μελέτης μας, με την νόσο του Alzheimer καθώς έχει αποδειχτεί ότι συνδέεται με την απόπτωση (Kalatzis et al., 2013). Τέλος χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα σταυροσπορίνη πρώτον γιατί η δράση της είναι γνωστή έναντι των κυττάρων για να υπάρχει κάποιο

συγκρίσιμο μέγεθος μεταξύ της κυτταροτοξικότητας των ουσιών και για να εξετάσουμε πιθανή συνέργεια μεταξύ των ουσιών και άλλων κυτταροτοξικών ενώσεων για την περίπτωση που αποδειχτεί τέτοια τάση.

Αρχικά για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν CHO και σε CHO/ DDC όπου σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες (Kalatzis et al., 2013) η L- Dopa αποκαρβοξυλάση(DDC) εκτός από ένζυμο υπεύθυνο για την αποκαρβοξυλίωση της L-Dopa σε ντοπαμίνη εμπλέκεται και στους μηχανισμούς του κυτταρικού θανάτου. Στα CHO φάνηκε η πιθανή προστατευτική δράση μίγματος ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης όταν τεχνητά επαγόταν ο κυτταρικός θάνατος με σταυροσπορίνη. Όπως ήταν αναμενόμενο κάτι τέτοιο δεν παρατηρήθηκε και στα κύτταρα CHO/ DDC ακριβώς επειδή η ίδια η L-Dopa αποκαρβοξυλάση είναι και η ίδια τοξική για τα κύτταρα.

Στη συνέχεια έγιναν πειράματα σε κύτταρα SH- SY5Y που προέρχονται από τον άνθρωπο και προήλθαν από την βιοψία του μυελού των οστών μιας τετράχρονης γυναίκας με νευροβλάστωμα. Τα συγκεκριμένα κύτταρα χρησιμοποιούνται αρκετά συχνά για την μελέτη της νευρικής λειτουργίας ακριβώς λόγω του γεγονότος ότι μετά από αρκετή κατεργασία υπερίσχυσε η νευρική τους φύση. Σε αυτήν την περίπτωση επίσης διαπιστώθηκε τάση για προστατευτική δράση του εκχυλίσματος του ελαιολάδου αλλά και των απομονωμένων ουσιών όταν επαγόταν ο κυτταρικός θάνατος με χημικό μέσο (σταυροσπορίνη) ενώ αξίζει να σημειωθεί πως διαπιστώθηκε επίσης πιθανή κυτταροτοξική δράση των ίδιων των φαινολών όταν χορηγούταν απουσία σταυροσπορίνης στα κύτταρα. Η πιθανή τάση αυτή θα μπορούσε να αποδοθεί σε πιθανή κυτταροτοξική δράση των φαινολών που πιθανώς να γίνεται με διαφορετικούς μηχανισμούς από την δράση της σταυροσπορίνης.

Έπειτα επιχειρήθηκε μελέτη για πιθανή κυτταροτοξική δράση σε κύτταρα MCF-7 και HeLa . Τα πρώτα είναι ακριβώς η πηγή γνώσης της ανθρωπότητας για τον καρκίνο του μαστού ενώ τα δεύτερα απομονωμένα από ασθενή που απεβίωσε τελικά από καρκίνο στον τράχηλο της μήτρας. Παρατηρήθηκε λοιπόν ότι η τόσο το εκχύλισμα των φαινολών όσο και μόνες τους οι απομονωμένες ουσίες έχουν πιθανώς κυτταροτοξική δράση είτε δρώντας σε συνέργεια με χημικά μέσα προκαλώντας τον κυτταρικό θάνατο είτε δρώντας μόνα τους λειτουργώντας εκείνα ως μέσα πρόκλησης κυτταρικού θανάτου.

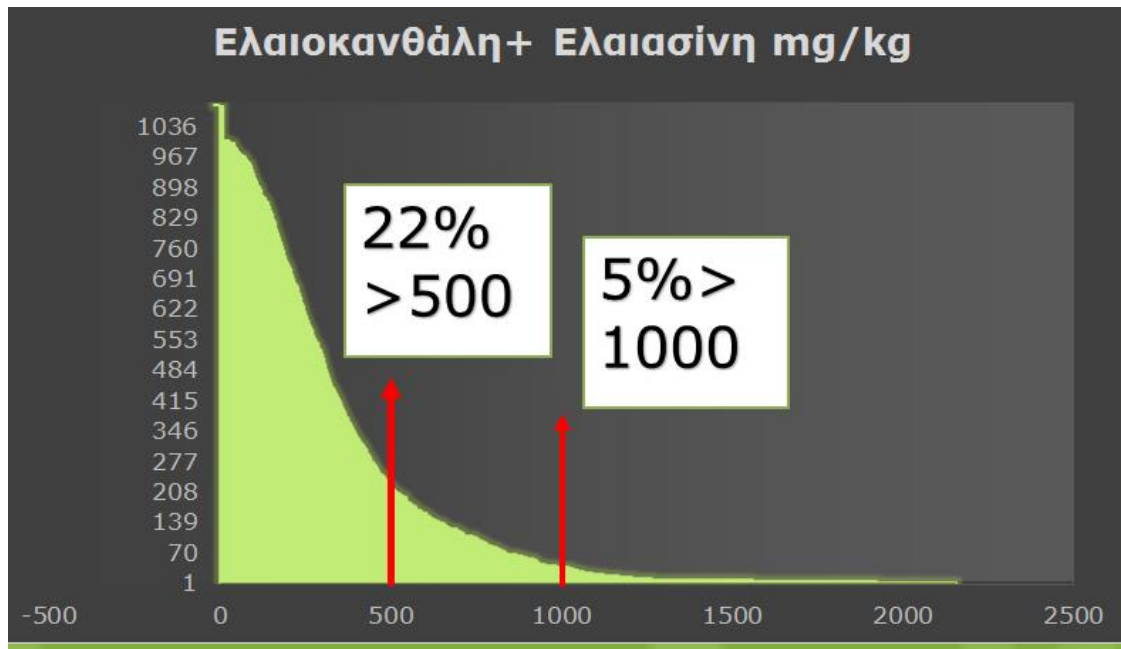
Από την διεθνή βιβλιογραφία προκύπτουν σοβαρά στοιχεία που επιβεβαιώνουν τη δράση των φαινολών του ελαιολάδου αλλά δεν προκύπτει εξήγηση για το ποια είναι η δραστική μορφή. Κανείς δεν ξέρει τι συμβαίνει με την ελαιοκανθάλη και με την ελαιασίνη όταν εισέρθουν στον ανθρώπινο οργανισμό παρά την δράση τους που είναι εμφανής. Η υπόθεση διατυπώθηκε είναι ότι πιθανόν οι ουσίες αυτές να ενυδατώνονται και να μετατρέπονται σε δραστικά παράγωγα και γι αυτό να μην μπορεί να ανιχνευθεί η αρχική τους μορφή ύστερα από την είσοδο της σε κύτταρα.

Έτσι λοιπόν επιλέχτηκε έξτρα παρθένο ελαιόλαδο με όσο το δυνατόν μεγαλύτερη συγκέντρωση των επιλεγμένων προς μελέτη φαινολών. Το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο απουσία θέρμανσης, υπερήχων ή άλλου μέσου αφέθηκε προς ανάδευση με αποσταγμένο νερό ενώ στη συνέχεια αφέθηκε σε ηρεμία. Στη συνέχεια έλαβε χώρα διαχωρισμός των δυο φάσεων και έπειτα απομονώθηκε η υδατική φάση και απολιπώθηκε δυο φορές με κυκλοεξάνιο (cHex) . Θα πρέπει να σημειωθεί επίσης ότι σε δεύτερη απόπειρα έγινε προσπάθεια να πραγματοποιηθεί το συγκεκριμένο πρωτόκολλο πιο φιλικό στο περιβάλλον και λιγότερο επεξεργασμένο με διαλύτες και συστήματα διαλυτών. Οπότε αυξήθηκε ακόμα περισσότερο ο χρόνος που αφηνόταν σε ηρεμία μετά την ανάδευση το ελαιόλαδο και το αποσταγμένο νερό με αποτέλεσμα να διαχωρίζονται οι δυο φάσεις μόνες τους χωρίς να χρειαστεί να απολιπωθεί η υδατική φάση στην συνέχεια με κυκλοεξάνιο ή άλλο διαλύτη. Ακολούθησε η συμπύκνωση μέχρι ξηρού σε rotary evaporator. Τέλος επιχειρήθηκε χρωματογραφία στήλης για να απομονωθούν οι ουσίες κρατώντας ωστόσο εκχύλισμα προκειμένου να μελετηθεί πιθανή συνέργεια. Η ελαιοκανθάλη, η ελαιασίνη και το εκχύλισμα διαλύτοποιήθηκαν σε αποσταγμένο νερό εκ νέου σε συγκέντρωση τέτοια όπως υποδήλωνε η διεθνής βιβλιογραφία (50μM) και όπως υπολογίστηκε.

Προκρίθηκε λοιπόν η μελέτη της βιολογικής δράσης των παραπάνω σε καρκινικά κύτταρα HeLa και τα αποτελέσματα όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως ήταν τα ίδια. Είτε χορηγήθηκε απλό εκχύλισμα είτε ενυδατωμένο, ελαιοκανθάλη ή η ενυδατωμένη μορφή της η δράση παρέμενε η ίδια.

Είναι φανερό ότι η δράση τους δεν αλλάζει, παρουσιάζουν πιθανώς κυτταροτοξική δράση για τα καρκινικά κύτταρα HeLa. Εμφανίζουν αρκετά μεγάλα ποσοστά κυτταρικού θανάτου τόσο ως απομονωμένες ουσίες όσο και ως μίγμα φαινολών. Επίσης όταν χρησιμοποιούνται μαζί με αποπτωτικούς παράγοντες τότε τα ποσοστά κυτταρικού θανάτου που προκαλούν οι ενυδατωμένες μορφές είναι πολύ υψηλότερα των πρωταρχικών μορφών.

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί μια υπόθεση υπόστασης της μελέτης χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από το εργαστήριο. Από την μελέτη κατανομής και την ανάλυση των ποιοτικών και ποσοτικών χαρακτηριστικών του ελαιολάδου,σε περισσότερα από 1000 ελαιόλαδα, προέκυψε ότι ένα εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο πλούσιο σε φαινολικά συστατικά μπορεί να συναντηθεί με συγκέντρωση ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης σε επίπεδα άνω των 1000 mg/ L σε ποσοστό 5% και με συγκέντρωση άνω των 500mg/L σε ποσοστό 22%.



Εικόνα 30. Κατανομή συγκέντρωσης ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης

Κατά συνέπεια αν υποτεθεί ότι ενήλικας τρέφεται με ελαιόλαδο με συγκέντρωση ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης άνω των 1000mg/L. Είναι γεγονός ότι στον μέσο ενήλικα το αίμα αποτελεί περίπου το 7% του βάρους κι ότι έχει συνολικό όγκο αίματος γύρω στα 5 λίτρα, από τα οποία τα 2,7 έως 3 λίτρα είναι πλάσμα και το υπόλοιπο της σύστασής του είναι τα έμμορφα κυτταρικά στοιχεία που αιωρούνται σε αυτό. Επιπλέον στην χώρα μας η μέση κατανάλωση κατά άτομο είναι περίπου 17,4 Kg τον χρόνο σύμφωνα με στοιχεία της Ευρωπαϊκής Ένωσης δηλαδή περίπου 0,047 Kg την ημέρα δηλαδή 0,051 L. Καταναλώνοντας λοιπόν έξτρα παρθένο ελαιόλαδο με συγκέντρωση ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης 1000 mg/ L ημερησίως λαμβάνει κανείς 61,2mg ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης. Η ελαιοκανθάλη και η ελαιασίνη εισερχόμενη στον ανθρώπινο οργανισμό και στην συνέχεια με όποια μορφή (ενυδατωμένη ή μη) εισέρχεται στο ανθρώπινο αίμα. Συνεπώς πρόκειται για 61,2 mg σε 5L αίμα δηλαδή 12,25 mg ανά λίτρο ή εκφραζόμενο σε συγκέντρωση 40 μM. Αν υποτεθεί ότι τρέφεται με ελαιόλαδο με συγκέντρωση ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης άνω των 500mg/L, τότε η συγκέντρωση στο ανθρώπινο αίμα θα είναι 20μM. Επιπλέον όπως έχει αναφερθεί ήδη η μεγαλύτερη ποσότητα ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης που θα εισέλθουν στον οργανισμό θα καταστραφεί ή θα μετατραπεί σε μη ενεργή μορφή με αποτέλεσμα να μην εισέλθει στην κυκλοφορία. Αν υποτεθεί ότι μόνο το 1% εισέρχεται στην κυκλοφορία από την συνολική ποσότητα ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης και είναι διαθέσιμη για τα κύτταρα, τότε η συγκέντρωση ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης στο αίμα φτάνει το 0,5μM. Φυσικά τα πραγματικά επίπεδα θα είναι αρκετά μικρότερα αν γίνει η υπόθεση ότι ένα μόνο μικρό ποσοστό θα απορροφηθεί και θα φτάσει στην κυκλοφορία αλλά όμως οι πιθανές τιμές συγκέντρωσης της ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης είναι στα πλαίσια

των συγκεντρώσεων για τις οποίες παρατηρήθηκε δραστηριότητα. Κατά συνέπεια η πιθανή απόδειξη της δράσης είναι πολύ σημαντική. Ωστόσο πάλι θα πρέπει να ληφθεί υπόψη η πηγή της ελαιοκανθάλης, δηλαδή όπως αναφέρθηκε στην αρχή της εργασίας, οι διαφορές που παρουσιάζουν τα έξτρα παρθένα ελαιόλαδα ανά περιοχή καθώς και ανά ποικιλία ελαιόδεντρου από όπου παράγονται. Ενώ επίσης θα πρέπει να τονιστεί ότι οι υψηλές συγκεντρώσεις παρατηρούνται μόνο στο έξτρα παρθένο ελαιόλαδο και όχι γενικά στο ελαιόλαδο.

Η κυτταροτοξική δράση των απομονωμένων ουσιών έχει γίνει πρόσφατα γνωστή στην επιστημονική κοινότητα και τα αποτελέσματα που συλλέγονται κατά καιρούς είναι σημαντικά. Ωστόσο όπως έχει αναφερθεί ήδη δεν έχει γίνει ακόμα γνωστός ο ακριβής μηχανισμός δράσης. Επιπλέον παρότι τα φαινολικά συστατικά χορηγούνται και εμφανίζονται τα αποτελέσματα, δεν έχουν ανευρεθεί στον ανθρώπινο οργανισμό. Μια ποσότητα σίγουρα καταστρέφεται, ωστόσο η υπόλοιπη ποσότητα μετατρέπεται σε κάποια άλλη μορφή, με τις πιθανότητες να ενυδατώνεται να είναι αυξημένες και γι αυτό να μην μπορεί να ανιχνευθεί καμία από τις φαινολικές ουσίες στον ανθρώπινο οργανισμό. Στην παρούσα ερευνητική εργασία έγινε προσπάθεια να ανευρεθεί πιθανή δραστηριότητα στις ενυδατωμένες μορφές των απομονωμένων ουσιών. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως εμφανίζουν δράση ανάλογη των μη ενυδατωμένων μορφών. Η παρούσα εργασία επιχείρησε να αποδείξει τη δραστηριότητα των ενυδατωμένων μορφών των ουσιών καθώς στο εσωτερικό οργανισμών ή κυττάρων δεν ανιχνεύονται οι αλδευδικές μορφές. Η δράση που παρατηρήθηκε δίνει για πρώτη φορά μια πειστική εξήγηση ότι η πραγματική δραστηριότητα των ουσιών αυτών είναι η ενυδατωμένη .

Επιπλέον κρίνεται αναγκαίο να τονιστεί πως όπως αποτυπώνονται τα αποτελέσματα των πειραμάτων εκφράζεται η πιθανότητα τα ποσοστά του κυτταρικού θανάτου να είναι μεν σημαντικά όταν χορηγούνται απομονωμένες η ελαιοκανθάλη ή η ελαιασίνη, ωστόσο το ποσοστό κυτταρικού θανάτου και στις ενυδατωμένες μορφές και στις αλδευδικές είναι ιδιαίτερα αυξημένα όταν το εκχύλισμα αφορά και τις δύο όταν δηλαδή πρόκειται για μίγμα και των δυο, γεγονός που υποδηλώνει πιθανή συνέργεια των δυο ουσιών. Εξίσου σημαντικό κρίνεται το γεγονός πως τα εκχυλίσματα που χορηγήθηκαν σε συνδυασμό με χορήγηση σταυροσπορίνης καταγράφηκε η τάση για μεγάλη αύξηση του ποσοστού κυτταρικού θανάτου. Αυτό το γεγονός μας οδηγεί στην υπόθεση πως οι εν λόγω ουσίες θα μπορούσαν πιθανώς να χρησιμοποιηθούν ως φαρμακευτική προσέγγιση σε συνδυασμό και με άλλα φαρμακευτικά σκευάσματα ή κυτταροτοξικές ουσίες όπως είναι και η σταυροσπορίνη.

Συμπερασματικά, η απόδειξη της κυτταροτοξικής και εν δυνάμει, κυτταροτοξικής έναντι καρκινικών κυττάρων, δράσης των συστατικών του ελαιολάδου είναι ένα πολύ σημαντικό γεγονός ακριβώς επειδή το ελαιόλαδο αποτελεί βασικό στοιχείο

της διατροφής εκατομμυρίων ανθρώπων εδώ και αιώνες. Βέβαια είναι πολύ σημαντικό να γίνουν επιπλέον πειράματα για να τεκμηριωθεί η τάση που καταγράφηκε στα πειράματα της παρούσας εργασίας καθώς και στατιστικές μελέτες. Παγκοσμίως ο άνθρωπος καταναλώνει διάφορα είδη ελαιολάδου, όμως πρέπει να τονιστεί ότι η συγκέντρωση του ελαιολάδου σε φαινόλες, διαφέρει σε πολύ μεγάλο βαθμό από ελαιόλαδο σε ελαιόλαδο, ανάλογο με τον τρόπο παραγωγής του και την ποικιλία ελιάς. Όπως επίσης πρέπει να αποσαφηνιστεί μια ακόμη φορά πως πιθανή απόδειξη ή απόδειξη θεραπευτικής δράσης σε ουσίες ή δομές που απομονώνονται από κάποιο μέσο, δεν μετατρέπουν το μέσο σε θεραπευτικό σκεύασμα. Ωστόσο η επιστημονική κοινότητα ενθουσιασμένη κάνει μικρά βήματα προς τα εμπρός και με τον στόχο να παραμένει πάντα ο ίδιος. Αν και όταν συμβεί αυτό θα είναι πολύ σημαντικό για την διατροφή και την προστασία της υγείας του ανθρώπου.

Βιβλιογραφία

Abuznait AH, Qosa H, Busnena BA, El Sayed KA, Kaddoumi A, 2013, Olive-oil-derived oleocanthal enhances β -amyloid clearance as a potential neuroprotective mechanism against Alzheimer's disease: in vitro and in vivo studies. ACS Chemical Neuroscience, 4(6):973-82

Adhami, H.R., M. Zehl, C. Dangl, Dorfmeister, D., M. Stadler, E. Urban, P. Hewitson, Ignatova & K. L. & S., «Preparative isolation of oleocanthal, tyrosol, and hydroxytyrosol from olive oil by HPCCC.,» Food Chemistry, τόμ. 170, pp. 154-159

Adhami, H.R., M. Zehl, C. Dangl, Dorfmeister, D., M. Stadler, E. Urban, P. Hewitson, Ignatova και K. L. & S., «Preparative isolation of oleocanthal, tyrosol, and hydroxytyrosol from olive oil by HPCCC.,» Food Chemistry ,, τόμ. 170, pp. 154-159., 2015.

Agrawal A, Roberta R Holt, Xuequi Shirley Li, Eleni Melliou, Theresa Lynn Pedersen, Selina C Wang, Dan Flynn, Prokopios Magiatis, W. Newman, 2016, The FASEB Journal vol. 30 no. 1

Akl MR, Ayoub NM, Mohyeldin MM, Busnena BA, Foudah AI, Liu YY, Sayed KA, 2014, Olive phenolics as c-Met inhibitors: Oleocanthal attenuates cell proliferation, invasiveness, and tumor growth in breast cancer models. Plos One, 9(5):e97622

Alaa H. Abuznait, Hisham Qosa, Belnaser A. Busnena, Khalid A. El Sayed, and Amal Kaddoumi, 2013, Olive-Oil-Derived Oleocanthal Enhances β -Amyloid Clearance as a Potential Neuroprotective Mechanism against Alzheimer's Disease: In Vitro and in Vivo Studies.

Beauchamp GK, Keast RS, Morel D, Lin J, Pika J, Han Q, Lee CH, Smith AB, Breslin PA, 2005, Phytochemistry: ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. Nature, 437(7055):45-6

Cassiano C, Casapullo A, Tosco A, Monti MC, Riccio R, 2015, n Cell Interactome of Oleocanthal, an Extra Virgin Olive Oil Bioactive Component. Natural Products Communications, 10(6):1013-6

Cesar Sanchez, Alfredo Brana, Carmen Mendez, Jose Salas. «Reevaluation of the Violacein Biosynthetic Pathway and Its Relationship to Indolocarbazole Biosynthesis.» ChemBioChem, 2006: 1231-1240.

Chalatsa I, 2012, Μελέτη της ρύθμισης της L-Dopa αποκαρβοξυλάσης.

Cortesi N. , M. Azzolini, P. Rovelini, E. Fedeli, Riv. Ital. Sost, τόμ. 72, pp. 241-251

Diamantakos P, Velkou A, Killday K, Gimisis T, Melliou E, Magiatis P, 2016, Oleokoronal and oleomissional: new major phenolic ingredients of extra virgin olive oil.

El-Shinnawi U, Soory M, 2015, Actions of Adjunctive Nutritional Antioxidants in Periodontitis and Prevalent Systemic Inflammatory Diseases. Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets, 15(4):261-76

F. Angerosa; N. D'Alessandro; P. Konstantinidou; L. Di Giacinto, Agric. Food Chem,

Filipek A, Czerwińska ME, Kiss AK, Wrzosek M, Naruszewicz M, 2015, Oleacein enhances anti-inflammatory activity of human macrophages by increasing CD163 receptor expression. Phytomedicine, 22(14):1255-61

Fitzgerald GA, Patrono C, 2011, The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2.

Fogli S, Arena C, Carpi S, Polini B, Bertini S, Digiacomo M, Gado F, Saba A, Saccomanni G, Breschi MC, Nieri P, Manera C, Macchia M, 2016, Cytotoxic Activity of Oleocanthal Isolated from Virgin Olive Oil on Human Melanoma Cells. Nutr Cancer, 68(5):873-7.

Hayflick L, 1965, The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains

G.F. Montedoro; M. Servilli; M. Bardioli; E. Miniati,, Agric. Food Chem, τόμ. 40, pp. 1571-1576

Ginter E, Simko V, 2015, Recent data on Mediterranean diet, cardiovascular disease, cancer, diabetes and life expectancy. Bratislavske Lekarske listy, 116(6):346-8

Gutfinger T, «Polyphenols in olive oils,» Journal of the American Oil Chemists Society, τόμ. 58, αρ. 11, pp. 966-968, 1981.

Ghanbari R, F. Anwar, K.M. Alkharfy, A.-H. Gilani, N. Saari, «Valuable nutrients and functional bioactives in different parts of olive (*Olea europaea* L.) – a review,» International Journal of Molecule Science, τόμ. 13, pp. 3291-3340, 2012.

J. Klen και M. V. B., «Optimisation of olive oil phenol extraction conditions using a high-power probe ultrasonication.,» Food Chem, τόμ. 134, αρ. 4, pp. 2481-2488, 2012.

Joshi K1, Hankey A, Patwardhan B, 2007, Traditional phytochemistry: identification of drug by 'taste'. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 4(2):145-8

Karkoula E, A. Skantzari, E. Melliou και P. Magiatis, «Direct measurement of oleocanthal and oleacein.,» J. Agric. Food Chem, τόμ. 60, pp. 11696-11703

Khanal P, Oh WK, Yun HJ, Namgoong GM, Ahn SG, Kwon SM, Choi HK, Choi HS, p-HPEA-EDA, 2011, A phenolic compound of virgin olive oil, activates AMP-activated protein kinase to inhibit carcinogenesis. Carcinogenesis, 32(4):545-53

LeGendre O, Breslin PA, Foster DA, 2015, Oleocanthal rapidly and selectively induces cancer cell death via lysosomal membrane permeabilization. Molecular and Cellular Oncology, 2(4)

Lucas L, Russell A, Keast R, 2011, Molecular mechanisms of inflammation. Anti-inflammatory benefits of virgin olive oil and the phenolic compound oleocanthal. Current Pharmaceutical Design, 17(8):754-68

Margarucci L, Monti MC, Cassiano C, Mozzicafreddo M, Angeletti M, Riccio R, Tosco A, Casapullo A, 2013, Chemical proteomics-driven discovery of oleocanthal as an Hsp90 inhibitor. Chemical Communications Cambridge England, 49(52):5844-6

Materljan E, Materljan M, Materljan B, Vlacić H, Barićev-Novaković Z, Sepčić J, 2009, Multiple sclerosis and cancers in Croatia--a possible protective role of the "Mediterranean diet". *Collegium Anthropologicum*, 33(2):539-45

Mohyeldin MM, Busnena BA, Akl MR, Dragoi AM, Cardelli JA, El Sayed KA, 2016, Novel c-Met inhibitory olive secoiridoid semisynthetic analogs for the control of invasive breast cancer. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 118:299-315

Mousouri E, Melliou E, Magiatis P, 2014, Isolation of megaritolactones and other bioactive metabolites from megaritiki table olives and debittering water.

Parkinson L, Keast R, 2015, Oleocanthal, a phenolic derived from virgin olive oil: a review of the beneficial effects on inflammatory disease. *International Journal of Molecular Science*, 15(7):12323-34

Pei T, Meng Q, Han J, Li HS, Song R, Sun B, Pan S, Liang D, Liu L, 2016, Oleocanthal inhibits growth and metastasis by blocking activation of STAT3 in human hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*,

Peyrot des Gachons C, Uchida K, Bryant B, Shima A, Sperry JB, Dankulich-Nagrudny L, Tominaga M, Smith AB 3rd, Beauchamp GK, Breslin PA, 2011, Unusual pungency from extra-virgin olive oil is attributable to restricted spatial expression of the receptor of oleocanthal. *The journal of Neuroscience*, 31(3):999-1009

Pitt J, Roth W, Lacor P, Smith AB 3rd, Blankenship M, Velasco P, De Felice F, Breslin P, Klein WL, 2009, Alzheimer's-associated A β oligomers show altered structure, immunoreactivity and synaptotoxicity with low doses of oleocanthal. *Toxicology and applied Pharmacology*, 240(2):189-97

Qosa H, Batarseh YS, Mohyeldin MM, El Sayed KA, Keller JN, Kaddoumi A, 2015, Oleocanthal enhances amyloid- β clearance from the brains of TgSwDI mice and in vitro across a human blood-brain barrier model. *ACS Chemical Neuroscience*, 6(11):1849-59

Rafehi et al., 2012, Hydroxytyrosyl ethyl ether exhibits stronger intestinal anticarcinogenic potency and effects on transcript profiles compared to hydroxytyrosol

Ramón Estruch, Emilio Ros, Jordi Salas-Salvadó, Maria-Isabel Covas, Dolores Corella, Fernando Arós, Enrique Gómez-Gracia, Valentina Ruiz-Gutiérrez, Miquel Fiol, José Lapetra, Rosa Maria Lamuela-Raventos, Lluís Serra-Majem, Xavier Pintó, Josep Basora, Miguel Angel Muñoz, José V. Sorlí, José Alfredo Martínez, Miguel Angel Martínez-González, 2013, Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet.

Rigacci S, 2015, Olive Oil Phenols as Promising Multi-targeting Agents Against Alzheimer's Disease. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 863:1-20

Rigacci S, Stefani M, 2015, Nutraceuticals and amyloid neurodegenerative diseases: a focus on natural phenols. *Expert Review of Neurotherapeutics*, (1):41-52

Rodríguez-Morató J, Xicota L, Fitó M, Farré M, Dierssen M, de la Torre R, 2015, Potential role of olive oil phenolic compounds in the prevention of neurodegenerative diseases. *Molecules*, 20(3):4655-80

Scotece M, Conde J, Abella V, Lopez V, Pino J, Lago F, Smith AB, Gómez-Reino JJ, Gualillo O, 2015, New drugs from ancient natural foods. Oleocanthal, the natural occurring spicy compound of olive oil: a brief history. *Drug Discovery Today*, 20(4):406-10

Scotece M, Gómez R, Conde J, Lopez V, Gómez-Reino JJ, Lago F, Smith AB 3rd, Gualillo O, 2012, Further evidence for the anti-inflammatory activity of oleocanthal: inhibition of MIP-1 α and IL-6 in J774 macrophages and in ATDC5 chondrocytes. *Life Sciences*, 91(23-24)

Slater, T.F., et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 77, 383 (1963).

Smith AB 3rd, Han Q, Breslin PA, Beauchamp GK, 2005, Synthesis and assignment of absolute configuration of (-)-oleocanthal: a potent, naturally occurring non-steroidal

anti-inflammatory and anti-oxidant agent derived from extra virgin olive oils. *Organic Letters*, 7(22):5075-8

Tsakou A, 2012, Study upon the effect of L-Dopa Dycarboxylase in apoptosis.

Vane JR, Botting RM, 1995, New insights into the mode of action of anti-inflammatory drugs. *Inflamm Res*.

Virruso C, Accardi G, Colonna-Romano G, Candore G, Vasto S, Caruso C, 2014, Nutraceutical properties of extra-virgin olive oil: a natural remedy for age-related disease. *Rejuvenation Research*, 17(2):217-20

Vougogiannopoulou K1, Lemus C, Halabalaki M, Pergola C, Werz O, Smith AB 3rd, Michel S, Skaltsounis L, Deguin B, 2014, One-step semisynthesis of oleacein and the determination as a 5-lipoxygenase inhibitor, *Journal of natural products*

Vulcano I, Halabalaki M, Skaltsounis L, Ganzera M, 2014, Quantitative analysis of pungent and anti-inflammatory phenolic compounds in olive oil by capillary electrophoresis. *Food Chemistry*, 169:381-6

Zervakaki V, 2013, Study upon the subcellular topology of full-length L-Dopa Dycarboxylase and alternative isoforms.

E. COMMISSION, «COMMISSION REGULATION (EU) No 432/2012,» *Official Journal of the European Union*, pp. 136/1-136/40, 2012.

K. Δ. Ε. & Μ. Τεχνολογίας, «Το ελαιόλαδο στον αρχαίο κόσμο,»

[Ηλεκτρονικό]. Available: http://www.noesis.edu.gr/aet/thematic_areas/p40.html.

Α. εταιρία, «Πρακτικά Αρχαιολογικής Εταιρείας,» pp. 23-24, 1903.

Α. Εταιρείας, «Πρακτικά Αρχαιολογικής Εταιρείας,» p. 88, 1906.

European union, publication, statistics 2009.

Olive Oil Consumption in Europe, 2011/12, European Union statistics.