ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ ΙΙΙ

‘ΣΥΝΘΕΤΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ, ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ – ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ’

«ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΦΥΛΛΩΝ ΕΛΙΑΣ ΣΕ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥΣ ΤΗΣ ΑΘΗΡΟΘΡΟΜΒΩΣΗΣ»

Μαρία Νεκταρία Μαγκούλια (ΑΜ: 1491)

Χημικός

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Ιωάννινα 2026

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

(ΓΣ Τμ. Χημείας αριθμ.1163/29.05.2026)

Δρ. Δέσποινα Πανταζή (ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ)

Εργαστηριακό Διδακτικό Προσωπικό (ΕΔΙΠ) βαθμού Α΄ στο Εργαστήριο Βιοχημείας, του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.

Συνεργάτης του Ερευνητικού Κέντρου Αθηροθρόμβωσης (ΕΚΑ) του Δικτύου Εργαστηρίων Υποστήριξης Έρευνας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Αλέξανδρος Δ. Τσελέπης

Ομότιμος Καθηγητής Βιοχημείας-Κλινικής Χημείας, Εργαστήριο Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.

Επιστημονικός Υπεύθυνος του Ερευνητικού Κέντρου Αθηροθρόμβωσης του Δικτύου Εργαστηρίων Υποστήριξης Έρευνας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Αλέξιος-Λέανδρος Σκαλτσούνης

Ομότιμος Καθηγητής, Εργαστήριο Αξιοποίησης Βιοδραστικών Φυσικών Προϊόντων Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ – ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τομέα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, στο πλαίσιο του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών Του Τμήματος Χημείας, ειδίκευση ΙΙΙ, «Συνθετική Χημεία, Βιοχημεία – Συνθετικές Ενώσεις». Μέρος της πειραματικής διαδικασίας υποστηρίχθηκε και από τον εξοπλισμό του Ερευνητικού Κέντρου Αθηροθρόμβωσης, το οποίο εντάσσεται στο Δίκτυο Εργαστηρίων Υποστήριξης Έρευνας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα της διατριβής μου, κα Δέσποινα Πανταζή, ΕΔΙΠ βαθμού Α΄ του Εργαστηρίου Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας, για την πολύτιμη επιστημονική της καθοδήγηση, την εμπιστοσύνη και τη σταθερή υποστήριξη που μου προσέφερε σε κάθε στάδιο της εργασίας. Η συμβολή της ήταν καθοριστική στην ομαλή και ουσιαστική ολοκλήρωση της μελέτης αυτής.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες στον κ. Αλέξανδρο Δ. Τσελέπη, Ομότιμο Καθηγητή του Εργαστηρίου Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας, για την επιστημονική του στήριξη και την πρόσβαση στις υποδομές του Ερευνητικού Κέντρου Αθηροθρόμβωσης.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου προς τον ομότιμο καθηγητή του Τμήματος Φαρμακευτικής του ΕΚΠΑ κ. Αλέξιο-Λέανδρο Σκαλτσούνη, στον κ. Παναγιώτη Σταθόπουλο, ΕΔΙΠ βαθμού Α΄ του Τμήματος Φαρμακευτικής του ΕΚΠΑ, καθώς και στην κα Γεωργία Παπαδοπούλου, απόφοιτη του ίδιου Τμήματος, για την ευγενική παραχώρηση των φυτικών εκχυλισμάτων από το Εργαστήριο Αξιοποίησης Βιοδραστικών Φυσικών Προϊόντων του Τμήματος Φαρμακευτικής του ΕΚΠΑ, καθώς και για την πολύτιμη τεχνογνωσία και υποστήριξη που μου παρείχαν.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες στον κ. Π. Σταθόπουλο για την ουσιαστική συμβολή του στην πειραματική διαδικασία, καθώς και για τις πολύτιμες παρατηρήσεις και διορθώσεις του κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας. Η καθοδήγηση και η υποστήριξή του συνέβαλαν σημαντικά στην ολοκλήρωσή της.

Ευχαριστώ επίσης, το τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και συγκεκριμένα τον κ. Δημήτριο Αλίβερτη, επίκουρο

καθηγητή, καθώς και τον κ. Ιωάννη Γκλίκα, υποψήφιο διδάκτορα για τη βοήθειά τους στην εκτέλεση πειραμάτων με κυτταρικές σειρές.

Επιπλέον, ένα ευχαριστώ και στη Δρ. Μπέλλου Σοφία μέλος Εργαστηριακού Διδακτικού Προσωπικού (ΕΔΙΠ), στη Μονάδα Συνεστιακής Μικροσκοπίας Σάρωσης Laser του Δικτύου Εργαστηρίων Υποστήριξης Έρευνας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Ευχαριστώ και το προσωπικό του Τμήματος Αιμοληψιών του Γενικού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων καθώς και την κα Παπαπέτρου Ευαγγελία, επιμελήτρια Α στο Αιματολογικό Τμήμα του Γενικού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Επίσης και τον κ. Γεώργιο Τσουμάνη, ιατρό μικροβιολόγο, για τη διαθεσιμότητα και την πρόθυμη υποστήριξη κατά τη διάρκεια της πειραματικής εκτέλεσης αυτής της εργασίας.

Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τους συναδέλφους μου κ.κ. Δρ. Ηρακλή Μοσχονά, Δρ. Αικατερίνη Τσούκα, τον υποψήφιο διδάκτορα Ιωάννη Κουτσαλιάρη, Ειρήνη Λάνταβου, Γεωργία Σκέντζου για την προθυμία τους να με βοηθήσουν με οποιονδήποτε προβληματισμό ερχόμουν αντιμέτωπη στο εργαστήριο κατά τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας μου.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω και στη συναδέλφισσά μου και συνοδοιπόρο σε αυτό το μεταπτυχιακό ταξίδι, κα Κασσιανή Λαλεχού, με την οποία μοιραστήκαμε κάθε βήμα αυτής της διαδρομής. Η συνεργασία μας, η αλληλοϋποστήριξη και η αφοσίωσή της υπήρξαν καθοριστικής σημασίας για την πορεία και την ολοκλήρωση αυτής της εργασίας. Η παρουσία της έκανε τις απαιτήσεις αυτής της προσπάθειας πιο ουσιαστικές, αλλά και πιο όμορφες.

Τέλος, νιώθω βαθιά ευγνωμοσύνη για την υπομονή και την ηθική στήριξη της οικογένειάς μου. Ευχαριστώ τους γονείς μου, Θέμελη και Φωτεινή, και την αδελφή μου Γραμματική για τα σταθερά τους βήματα δίπλα μου σε κάθε επιλογή και δυσκολία.

ΣΚΟΠΟΣ

Η ελιά και τα φύλλα της αποτελούν πλούσια πηγή φυσικών βιοδραστικών ενώσεων με ποικίλες ευεργετικές βιολογικές δράσεις, γεγονός που έχει ενισχύσει σημαντικά το επιστημονικό ενδιαφέρον για τη μελέτη εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς και την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής, αντιθρομβωτικής και αντικαρκινικής τους δραστικότητας. Στο πλαίσιο αυτό, σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη της βιολογικής δράσης εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς διαφορετικής χημικής σύστασης, συμπεριλαμβανομένων εκχυλισμάτων πλούσιων σε φαινολικά συστατικά (σεκοϊριδοειδή και φλαβονοειδή), εκχυλισμάτων εμπλουτισμένων σε φαινολικά συστατικά ή τερπένια μετά από επεξεργασία με διχλωρομεθάνιο (DCM), καθώς και των μεμονωμένων ενώσεων ολευρωπεΐνης και ολευρωσίδης. Η αξιολόγηση της βιολογικής τους δράσης αποσκοπούσε στη διερεύνηση της συμβολής των επιμέρους χημικών ομάδων και ενώσεων στις βιοδραστικές ιδιότητες των φύλλων ελιάς. Τα ολικά εκχυλίσματα ετοιμάστηκαν στο Εργαστήριο Αξιοποίησης Βιοδραστικών Φυσικών Προϊόντων του Τμήματος Φαρμακευτικής του ΕΚΠΑ. Ειδικότερα, τα εκχυλίσματα αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν την οξείδωση της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL), καθώς και ως προς την επίδρασή τους στη συσσώρευση αιμοπεταλίων , ενώ πραγματοποιήθηκε και μελέτη της δράσης τους στη νέτωση. Παράλληλα, διερευνήθηκε η αντικαρκινική δράση των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο MTT, με στόχο την εκτίμηση της επίδρασής τους στη βιωσιμότητα κυττάρων. Μέσω της συνδυαστικής αυτής προσέγγισης, η παρούσα εργασία αποσκοπούσε στη συνολική αξιολόγηση της βιολογικής δραστικότητας των συγκεκριμένων εκχυλισμάτων και στη διερεύνηση της ενδεχόμενης επίδρασης τους σε μηχανισμούς της αθηροθρόμβωσης.

ABSTRACT

The olive tree (*Olea europaea L.*) and its leaves constitute a rich source of bioactive compounds and exhibit a wide range of biological activities, including antioxidant, anti-inflammatory, antithrombotic, and anticancer effects, as documented in numerous scientific studies. Oleuropein is one of the principal and most extensively studied phenolic constituents of olive leaves and is considered responsible for many of their beneficial properties. In parallel, terpenes represent a broad and distinct class of bioactive compounds and major constituents of essential oils, which have also been reported to exert significant biological activities.

In the present thesis, olive leaf extracts with different chemical compositions were investigated in order to evaluate their biological activity and elucidate the contribution of their individual bioactive constituents. Specifically, a phenolic-rich extract (containing secoiridoids and flavonoids), a phenolic-enriched extract obtained following dichloromethane (DCM) treatment, and a terpene-enriched extract produced through a corresponding treatment were studied. Furthermore, oleuropein and oleuroside were examined as reference compounds to assess their contribution to the observed biological responses. These extracts were prepared at the Laboratory of Bioactive Natural Products Exploitation, Department of Pharmacy, National and Kapodistrian University of Athens (NKUA). During the extraction and chemical characterization procedures, HPLC-DAD and HPLC-MS/Q analytical techniques were employed for the chromatographic separation, identification, and confirmation of the major constituents of the extracts.

The antioxidant activity of the extracts was evaluated through their ability to inhibit LDL cholesterol oxidation. For this purpose, low-density lipoprotein (LDL) was isolated from the plasma of apparently healthy donors and subjected to non-enzymatic oxidation induced by copper ions in the presence of the extracts. Their antiplatelet activity was investigated by measuring platelet aggregation using arachidonic acid (AA), adenosine diphosphate (ADP), and TRAP-6 as agonists. In addition, the effect of oleuropein and of the phenolic-rich extract following DCM treatment on NETosis was

examined. To this end, neutrophils were isolated from the blood of apparently healthy donors and subsequently stimulated with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) to induce the formation of neutrophil extracellular traps (NETs). Furthermore, the anticancer activity of the extracts was assessed using the MTT assay in the MCF-7 breast cancer cell line.

The results demonstrated that oleuroside exhibited the strongest antioxidant activity, while the extract enriched in secoiridoids and flavonoids showed greater inhibition of LDL oxidation compared with isolated oleuropein, suggesting a possible synergistic effect among phenolic constituents. In contrast, the terpene-enriched extract did not display noteworthy antioxidant activity. None of the extracts exhibited inhibitory effects on platelet aggregation. Furthermore, neither the secoiridoid- and flavonoid-enriched extract nor oleuropein significantly affected NET formation, while both demonstrated comparable inhibitory effects on cellular viability, with no evidence of synergistic cytotoxicity when combined.

These findings highlight the importance of interactions among the constituents of olive leaf extracts and support further investigation into their role in shaping the biological properties of these extracts, particularly those associated with the mechanisms underlying atherothrombosis.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ελιά (*Olea europaea L.*) και τα φύλλα της αποτελούν πλούσια πηγή βιοδραστικών ενώσεων και παρουσιάζουν σημαντικές βιολογικές δράσεις, όπως αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη, αντιθρομβωτική και αντικαρκινική, σύμφωνα με πλήθος βιβλιογραφικών δεδομένων. Η ολευρωπεΐνη αποτελεί ένα από τα κύρια και πλέον μελετημένα φαινολικά συστατικά των φύλλων ελιάς, στην οποία αποδίδονται πολλές από τις ευεργετικές τους ιδιότητες. Παράλληλα, τα τερπένια αποτελούν μία ευρεία και διακριτή κατηγορία βιοδραστικών ενώσεων, συστατικών των αιθέριων ελαίων, τα οποία έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία για τις σημαντικές βιολογικές τους δράσεις.

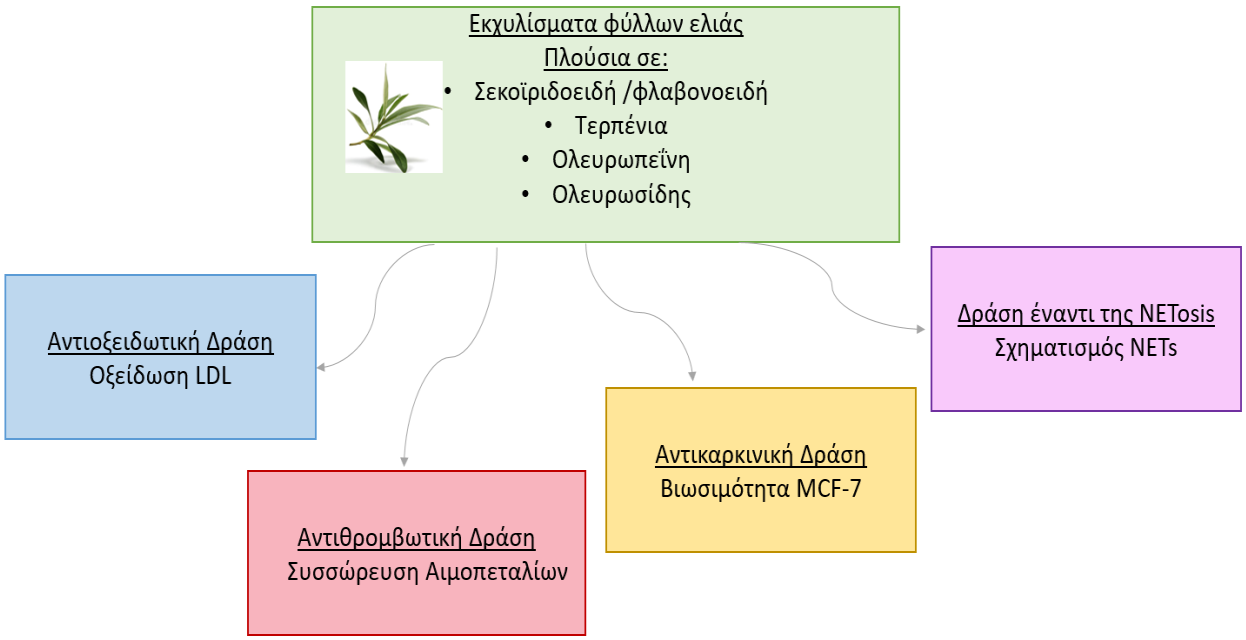
Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκαν εκχυλίσματα φύλλων ελιάς με διαφορετική χημική σύσταση, με σκοπό τη διερεύνηση της βιολογικής τους δράσης και της συμβολής των επιμέρους βιοδραστικών συστατικών τους. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν εκχύλισμα πλούσιο σε φαινολικά συστατικά (σεκοϊριδοειδή και φλαβονοειδή), εκχύλισμα εμπλουτισμένο σε φαινολικά συστατικά μετά από επεξεργασία με διχλωρομεθάνιο (DCM) και εκχύλισμα εμπλουτισμένο σε τερπένια μετά από αντίστοιχη επεξεργασία. Επιπλέον, η ολευρωπεΐνη και ο ολευρωσίδης μελετήθηκαν ως πρότυπες ενώσεις αναφοράς, προκειμένου να αξιολογηθεί η συμβολή τους στις παρατηρούμενες βιολογικές αποκρίσεις. Τα εκχυλίσματα αυτά ετοιμάστηκαν στο Εργαστήριο Αξιοποίησης Βιοδραστικών Φυσικών Προϊόντων του Τμήματος Φαρμακευτικής του ΕΚΠΑ. Κατά το στάδιο της εκχύλισης και του χημικού χαρακτηρισμού των εκχυλισμάτων εφαρμόστηκαν οι αναλυτικές τεχνικές HPLC-DAD και HPLC-MSQ, με σκοπό το χρωματογραφικό διαχωρισμό, την ταυτοποίηση και την επιβεβαίωση των κύριων συστατικών τους.

Η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων αξιολογήθηκε μέσω της αναστολής της οξείδωσης της LDL χοληστερόλης. Για το σκοπό αυτό απομονώθηκε λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας (LDL) από πλάσμα φαινομενικά υγιών δοτών και υποβλήθηκε σε μη ενζυμική οξείδωση με χρήση ιόντων χαλκού παρουσία των εκχυλισμάτων. Η αντιαιμοπεταλιακή δράση τους διερευνήθηκε με τη μέτρηση της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης, χρησιμοποιώντας ως αγωνιστές το αραχιδονικό οξύ (AA), τη

διφωσφορική αδενοσίνη (ADP) και το TRAP-6. Επιπλέον, μελετήθηκε η επίδραση της ολευρωπεΐνης αλλά και του εκχυλίσματος πλούσιου σε φαινολικά συστατικά μετά από επεξεργασία με DCM στη νέτωση. Για το σκοπό αυτό, απομονώθηκαν ουδετερόφιλα από αίμα φαινομενικά υγιών δοτών και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με τον αγωνιστή PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate, Φορβόλη 12-μυριστική 13-οξικό) προς σχηματισμό εξωκυττάριων παγίδων ουδετερόφιλων (NETs). Επιπλέον, η αντικαρκινική δράση των εκχυλισμάτων αξιολογήθηκε με τη μέθοδο MTT σε καρκινική κυτταρική σειρά μαστού MCF-7.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο ολευρωσίδης παρουσίασε την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση, ενώ το εκχύλισμα εμπλουτισμένο σε σεκοιριδοειδή και φλαβονοειδή εμφάνισε μεγαλύτερη αναστολή της οξείδωσης της LDL συγκριτικά με την απομονωμένη ολευρωπεΐνη, υποδηλώνοντας πιθανή συνεργατική δράση των φαινολικών συστατικών. Το εκχύλισμα εμπλουτισμένο σε τερπένια δεν παρουσίασε αξιόλογη αντιοξειδωτική δράση. Αντίθετα, κανένα από τα εκχυλίσματα δεν ανέστειλε τη συσσώρευση αιμοπεταλίων. Επιπλέον, τόσο το εκχύλισμα εμπλουτισμένο σε σεκοϊριδοειδή και φλαβονοειδή όσο και η ολευρωπεΐνη δεν επηρέασαν σημαντικά το σχηματισμό εξωκυττάριων παγίδων ουδετερόφιλων (NETs), ενώ παρουσίασαν παρόμοια ανασταλτική επίδραση στην κυτταρική βιωσιμότητα χωρίς να παρατηρείται συνεργατική κυτταροτοξική δράση κατά τον συνδυασμό τους.

Τα αποτελέσματα αυτά αναδεικνύουν τη σημασία των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των συστατικών των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς και υποστηρίζουν την περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου τους στη διαμόρφωση των βιολογικών ιδιοτήτων τους που σχετίζονται με τους μηχανισμούς της αθηροθρόμβωσης.



Graphical Abstract

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

ACD: Acid-Citrate-Dextrose – όξινο κιτρικό δεξτρόζη

ADP: Adenosine Diphosphate – διφωσφορική αδενοσίνη

BPs: Bound Particles – δεσμευμένα σωματίδια

cAMP-PDE: cAMP Phosphodiesterase – φωσφοδιεστεράση της κυκλικής 3',5'-μονοφωσφορικής αδενοσίνης

CVD: Cardiovascular Disease – καρδιαγγειακή νόσος / καρδιαγγειακές παθήσεις

EC: Endothelial Cells – ενδοθηλιακά κύτταρα

EFSA: European Food Safety Authority – Ευρωπαϊκή Αρχή Ασφάλειας Τροφίμων

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay – ανοσοενζυμική μέθοδος προσδιορισμού

EOs: Essential Oils – αιθέρια έλαια

ER: Estrogen Receptor – υποδοχέας οιστρογόνων

EVOO: Extra Virgin Olive Oil – εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο

FBS: Fetal Bovine Serum – ορός εμβρύου μόσχου

FPs: Free Particles – ελεύθερα σωματίδια

HDL: High-Density Lipoprotein – λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας

HPLC-DAD: High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector – υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή συστοιχίας διόδων

HPLC-MS: High Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry – υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης συνδεδεμένη με φασματομετρία μάζας

HT: Hydroxytyrosol – υδροξυτυροσόλη

iNOS: inducible Nitric Oxide Synthase – επαγώγιμη συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου

LDL: Low-Density Lipoprotein – λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας

LTA: Light Transmission Aggregometry – συσσωρευομετρία οπτικής διαπερατότητας

MA: Maslinic Acid – μεσλινικό οξύ

MPO: Myeloperoxidase – μυελοϋπεροξειδάση

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide – άλας τετραζολίου MTT

NE: Neutrophil Elastase – ουδετεροφιλική ελαστάση

NETs: Neutrophil Extracellular Traps – εξωκυττάριες παγίδες ουδετερόφιλων

NF-κB: Nuclear Factor kappa B – πυρηνικός παράγοντας κάππα Β

OC: Oleocanthal – ολεοκανθάλη

OLE: Olive Leaf Extract – εκχύλισμα φύλλων ελιάς

OL: Oleuropein – ολευρωπεΐνη

OO: Olive Oil – ελαιόλαδο

ox-LDL: Oxidized Low-Density Lipoprotein – οξειδωμένη λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας

PA: Perillic Acid – περιλλικό οξύ

POH: Perillyl Alcohol – περιλλυλική αλκοόλη

PPP: Platelet-Poor Plasma – πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια

PRP: Platelet-Rich Plasma – πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια

ROS/RNS: Reactive Oxygen/Nitrogen Species – αντιδραστικά είδη οξυγόνου/αζώτου

Rt: Retention Time – χρόνος κατακράτησης

SMC: Smooth Muscle Cells – λεία μυϊκά κύτταρα

TF: Tissue Factor – ιστικός παράγοντας

TxA2: Thromboxane A2 – θρομβοξάνη Α2

VLDL: Very Low-Density Lipoprotein – λιποπρωτεΐνη πολύ χαμηλής πυκνότητας

VOO: Virgin Olive Oil – παρθένο ελαιόλαδο

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Σκοπός……σελ.4

Abstract ……σελ.5

Περίληψη……σελ.7

Συντμήσεις……σελ.10

Κεφάλαιο 1ο: Ελιά, φύλλα ελιάς, ελαιόλαδο

1.1 Ελιά, ελαιόλαδο και φύλλα ελιάς……σελ.15

1.2 Ανάλυση βιοδραστικών συστατικών……σελ.18

1.2.α Φαινολικές ενώσεις, πολυφαινόλες και φλαβονοειδή……σελ.18

I. Φαινολικές ενώσεις……σελ.18

II. Πολυφαινόλες ……σελ.19

III. Φλαβονοειδή…… σελ.19

IV. Δραστικές ενώσεις ελιάς……σελ.21

1.2.β Ολευρωπεΐνη……σελ.22

1.2.β1 Ολευρωπεΐνη και παράγωγά της ως κύριες φαινολικές ενώσεις στην ελιά και στα φύλλα ελιάς……σελ.22

1.2.β2 Ολευρωσίδης: Ισομερές σεκοϊριδοειδές της ελιάς……σελ.24

1.2.β3 Σύνθεση ολευρωπεΐνης……σελ.25

1.2.β4 Βιολογικές δράσεις της ολευρωπεΐνης και των παραγώγων της……σελ.26

I. Αντιυπερτασιακή και καρδιοπροστατευτική δράση……σελ.26

II. Αντικαρκινική δράση ……σελ.27

III. Άλλες δράσεις……σελ.27

Κεφάλαιο 2ο: Δράσεις ελιάς και προϊόντων της

2.1 Ελιά, φύλλα ελιάς και δράσεις ……σελ.30

2.1.α Αντιοξειδωτική δράση……σελ.31

2.1.β Αντιθρομβωτική δράση ……σελ.32

2.1.γ Αντικαρκινική δράση ……σελ.35

Κεφάλαιο 3ο : Τερπένια

3.1 Τερπένια……σελ.38

3.2 Δράσεις τερπενίων……σελ.38

3.3 Τριτερπενικά οξέα των φύλλων ελιάς: ολεανολικό και μασλινικό οξύ……σελ.39

Κεφάλαιο 4ο: Αθηροθρόμβωση

4.1 Εισαγωγή……..σελ.41

4.2 Παθοφυσιολογία της νόσου ……..σελ.42

4.3 Σταθερότητα και ρήξη πλάκας……..σελ.48

4.4 Παράγοντες κινδύνου……..σελ.49

4.5 Φλεγμονή και αθηροσκλήρωση……σελ.50

4.6 NETs (Neutrophil Extracellular Traps) και αθηροσκλήρωση……..σελ.51

4.7 Αθηροσκλήρωση & ελιά……σελ.53

Κεφάλαιο 5ο: Υλικά – Μέθοδοι

5.1.α Προετοιμασία δειγμάτων……σελ.56

5.1.β Αραιώσεις εκχυλισμάτων - Ετοιμασία διαλυμάτων εργασίας ……..σελ.58

5.2 Απομόνωση λιποπρωτεϊνών με διαδοχικές υπερφυγοκεντρήσεις……σελ.60

5.2.α Απομόνωση χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (Low Density Lipoprotein-LDL)……..σελ.61

5.2.β Διαπίδυση……..σελ.64

5.2.γ Ποσοτικοποίηση της LDL με τη μέθοδο της BCA……σελ.65

5.2.δ Οξειδωτική τροποποίηση της LDL με ιόντα Cu^{2+}……σελ.67

5.3 Συσσωρευομετρία οπτικής διαπερατότητας (Light Transmission Aggregometry, LTA)……σελ.69

5.4 Έλεγχος κυτταροτοξικότητας……σελ.77

5.4.α Ετοιμασία καλλιέργειας……..σελ.78

5.4.β Splitting ……σελ.79

5.4.γ Πάγωμα κυττάρων……..σελ.81

5.4.δ Δοκιμασία κυτταρικής βιωσιμότητας MTT (MTT assay)……..σελ.81

5.5 Νέτωση……σελ.86

5.5.α Απομόνωση ουδετερόφιλων……..σελ.86

5.5.β Ανοσοφθορισμός και μικροσκοπική παρατήρηση εξωκυττάριων παγίδων ουδετερόφιλων (Neutrophil Extracellular Traps)……σελ.91

5.6 Στατιστική ανάλυση……σελ.99

Κεφάλαιο 6ο: Αποτελέσματα

6.1 Αποτελέσματα χρωματογραφικής ανάλυσης……..σελ.100

6.2 Αποτελέσματα οξείδωσης LDL……..σελ.109

6.3 Αποτελέσματα συσσώρευσης αιμοπεταλίων……..σελ.114

6.4 Αποτελέσματα κυτταροτοξικότητας……σελ.119

6.5 Αποτελέσματα νέτωσης……..σελ.125

Κεφάλαιο 7ο: Συμπεράσματα……σελ.129

Κεφάλαιο 8ο: Συζήτηση……σελ.133

Βιβλιογραφία……σελ.144

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1ο : ΕΛΙΑ, ΦΥΛΛΑ ΕΛΙΑΣ, ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ

1.1 Ελιά, ελαιόλαδο και φύλλα ελιάς

Η ελιά (*Olea europaea L.*) αποτελεί μέλος της οικογένειας *Oleaceae* και είναι ένα αειθαλές δέντρο με επιμήκη φύλλα (Lalas et al., 2011), γνωστό για την ανθεκτικότητά του στην ξηρασία (Markhali et al., 2020). Το φυτό αυτό καλλιεργείται στην περιοχή της Μεσογείου για περισσότερο από 7000 χρόνια, γεγονός που υπογραμμίζει τη βαθιά του σύνδεση με την ιστορία και τον πολιτισμό των λαών της περιοχής (Lalas et al., 2011) καθώς η ελαιοκαλλιέργεια κατέχει εξέχουσα θέση στις μεσογειακές χώρες, αποτελώντας μία από τις πιο διαδεδομένες και οικονομικά σημαντικές γεωργικές δραστηριότητες (Tarchoune et al., 2019).

Η παρουσία της ελιάς και των προϊόντων της, όπως το ελαιόλαδο, είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με τη μεσογειακή διατροφή, η οποία έχει συσχετιστεί με μειωμένη συχνότητα εμφάνισης σοβαρών ασθενειών, όπως ο καρκίνος και οι καρδιαγγειακές παθήσεις (Lalas et al., 2011). Οι ελιές και τα παράγωγά τους αποτελούν αναπόσπαστο στοιχείο αυτού του διατροφικού προτύπου (Ben Othman et al., 2008) **(Εικόνα 1)**.

Εικόνα 1: Ελαιόλαδο, ελιές και φύλλα ελιάς (Kaufman & Keyserling, 2023).

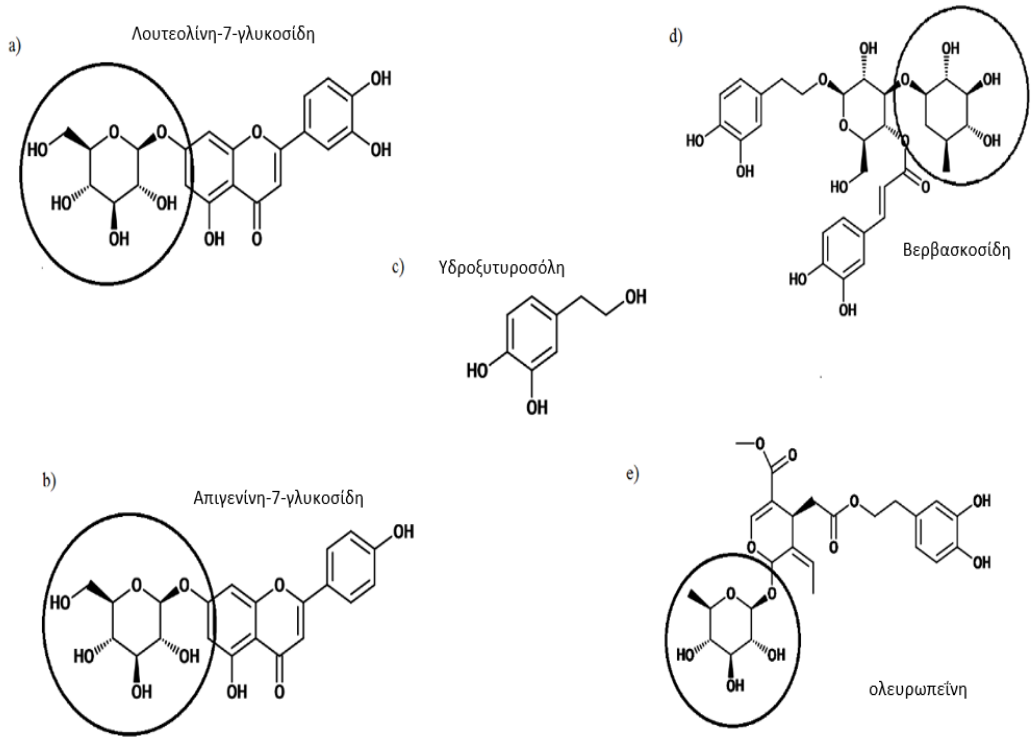
Οι ευεργετικές επιδράσεις της ελιάς και του ελαιολάδου στην ανθρώπινη υγεία έχουν βρεθεί στο επίκεντρο του ενδιαφέροντος όλο και περισσότερο τα τελευταία χρόνια (Tarchoune et al., 2019). Το ελαιόλαδο διαθέτει σημαντικές αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, καρδιοπροστατευτικές, αντικαρκινικές (Boss et al., 2016), αντιδιαβητικές και νευροπροστατευτικές ιδιότητες (Tarchoune et al., 2019).

Το χρώμα του ελαιολάδου καθορίζεται κυρίως από τη σύνθεση και τη συγκέντρωση των χρωστικών του. Από την άλλη, η χλωροφύλλη διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη διαμόρφωση της απόχρωσης. Παράλληλα, η οξείδωση αποτελεί τη σημαντικότερη διεργασία που οδηγεί σε «υποβάθμιση» της ποιότητας του ελαιολάδου, εξαιτίας της υψηλής περιεκτικότητάς του σε ακόρεστα λιπαρά οξέα (Tarchoune et al., 2019). Επίσης, ο χρόνος συγκομιδής αποτελεί κρίσιμο παράγοντα για τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του ελαιολάδου και συμβάλλει στην παραγωγή προϊόντων υψηλής ποιότητας (Malheiro et al., 2013).

Τα φύλλα της ελιάς αποτελούν σημαντικό υποπροϊόν της ελαιοκαλλιέργειας, αντιστοιχώντας περίπου στο 10% του συνολικού βάρους της συγκομιδής (Selim et al., 2022). Παρουσιάζουν ιδιαίτερο ερευνητικό και βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον, καθώς αποτελούν πλούσια πηγή φυσικών αντιοξειδωτικών ενώσεων (Talhaoui et al., 2015) και χρησιμοποιούνται παραδοσιακά στη λαϊκή ιατρική των μεσογειακών περιοχών (Mourtzinos et al., 2007).

Τα φύλλα της ελιάς αποτελούν πλούσια πηγή πολυφαινολών, παρόμοιων με εκείνες που εντοπίζονται στον ελαιόκαρπο και στο έξτρα παρθένο ελαιόλαδο, αλλά σε σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις (Boss et al., 2016). Ως αποτέλεσμα, το εκχύλισμα φύλλων ελιάς (Olive Leaf Extract-OLE) παρουσιάζει ισχυρότερη βιοδραστική ικανότητα και ενδέχεται να προσφέρει πιο έντονα οφέλη για την ανθρώπινη υγεία συγκριτικά με το ίδιο το ελαιόλαδο (Boss et al., 2016). Η αυξημένη αυτή δράση αποδίδεται στο υψηλότερο ποσοστό πολυφαινολικών ενώσεων που περιέχουν γλυκοζιτικό υπόλειμμα, καθώς η παρουσία του μορίου γλυκόζης φαίνεται να επηρεάζει καθοριστικά τη βιοδιαθεσιμότητα και τη βιοδραστικότητα των ενώσεων αυτών (Boss et al., 2016) **(Εικόνα 2)**. Επιπλέον, το εκχύλισμα φύλλων ελιάς (OLE) αποτελεί ένα από τα πιο πολύτιμα παράγωγα της ελαιοκομικής βιομηχανίας (Selim et al., 2022). Πρόκειται για ένα σκούρο καφέ, πικρό υγρό, πλούσιο σε

βιοδραστικά συστατικά, των οποίων η συγκέντρωση διαφοροποιείται ανάλογα με την ποικιλία της ελιάς και τις εκάστοτε περιβαλλοντικές συνθήκες (Selim et al., 2022).



Εικόνα 2: Οι κυριότερες φαινολικές ενώσεις που απαντώνται στο εκχύλισμα φύλλων ελιάς (OLE). Οι ενώσεις (a) λουτεολίνη-7-γλυκοζίτης και (b) απιγενίνη-7-γλυκοζίτης ανήκουν στα φλαβονοειδή. Η ένωση (c) υδροξυτυροσόλη είναι ένα απλό φαινολικό συστατικό, ενώ οι ενώσεις (d) βερβασκοσίδη και (e) ολευρωπεΐνη αποτελούν εστέρες που περιέχουν μονάδα υδροξυτυροσόλης. Τα γλυκοζιτικά τμήματα των μορίων επισημαίνονται με κύκλο (Boss et al., 2016).

Τα φύλλα της ελιάς και τα εκχυλίσματα φύλλων ελιάς (OLE) χρησιμοποιούνται ευρέως σε ιατρικά, καλλυντικά και φαρμακευτικά προϊόντα (Erbay & Icier, 2010). Διατίθενται εμπορικά σε διάφορες μορφές — πλήρη αποξηραμένα φύλλα, σκόνη, εκχυλίσματα ή δισκία — και ως συστατικά σε τσάι βοτάνων ή συμπληρώματα διατροφής (Talhaoui et al., 2015). Η ενθυλάκωση του εκχυλίσματος με β-κυκλοδεξτρίνη βελτιώνει την υδατοδιαλυτότητα του πολυφαινολικού κλάσματος γεγονός που διευκολύνει τη χρήση τους σε βιομηχανικές εφαρμογές (Mourtzinos et al., 2007).

Το OLE (olive leaf extract) παρουσιάζει σημαντικό ενδιαφέρον για εξαγωγή σε προϊόντα της βιομηχανίας τροφίμων (Erbay & Icier, 2010), είτε ως φυσικός αντιβακτηριακός παράγοντας ενσωματωμένος απευθείας σε τρόφιμα (Selim et al., 2022), είτε — πιο συχνά — ως ενεργό συστατικό σε υλικά συσκευασίας, όπως αντιμικροβιακές μεμβράνες (Selim et al., 2022). Τέτοια αντιμικροβιακά σύνθετα υλικά δημιουργούν περιβάλλον που επιβραδύνει ή αναστέλλει την ανάπτυξη μικροοργανισμών, μειώνοντας τον ρυθμό μικροβιακής ανάπτυξης και επιμηκύνοντας τη διάρκεια ζωής των τροφίμων (Selim et al., 2022).

1.2 Ανάλυση βιοδραστικών συστατικών

Η χημική σύσταση των φύλλων ελιάς και των παραγώγων τους περιλαμβάνει ποικιλία φαινολικών ενώσεων (Talhaoui et al., 2015) και είναι εμπλουτισμένη με σημαντικές βιοδραστικές ενώσεις, φυσικά συστατικά που υπάρχουν στα τρόφιμα (Markhali et al., 2020).

1.2.α Φαινολικές ενώσεις, πολυφαινόλες και φλαβονοειδή

Ι. Φαινολικές ενώσεις

Οι φαινολικές ενώσεις, στις οποίες περιλαμβάνονται οι πολυφαινόλες και τα φλαβονοειδή, ανήκουν στους δευτερογενείς μεταβολίτες που απαντώνται σε σημαντικές ποσότητες στα φυτά και στα εκχυλίσματά τους (Lamponi, 2021). Στο ελαιόλαδο έχουν εντοπιστεί τουλάχιστον τριάντα διαφορετικοί τύποι φαινολικών ενώσεων, γεγονός που καταδεικνύει τη χημική τους πολυπλοκότητα (Ghanbari et al., 2012). Κατηγορία των δευτερογενών μεταβολιτών αποτελούν και τα τερπενοειδή (Lamponi, 2021), τα τερπένια της ελιάς που υπάρχουν στα φύλλα και σε άλλα υποπροϊόντα της, τα οποία έχει επίσης αποδειχθεί ότι έχουν ευεργετικές επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία (López-Salas et al., 2025). Η φαινολική σύσταση τόσο της ελιάς όσο και του ελαιολάδου χαρακτηρίζεται από ποικιλομορφία, ενώ η συγκέντρωση των ενώσεων αυτών επηρεάζεται από πλήθος παραγόντων, όπως το στάδιο ωρίμανσης του καρπού, η ποικιλία, οι κλιματολογικές συνθήκες, η εποχή συγκομιδής, καθώς και οι τεχνολογικές διεργασίες που εφαρμόζονται κατά την παραγωγή, τη συσκευασία και την αποθήκευση (Ghanbari et al., 2012). Στα φύλλα της ελιάς, μεταξύ των πιο χαρακτηριστικών φαινολικών ενώσεων συναντώνται η ολευρωπεΐνη και η

υδροξυτυροσόλη, οι οποίες παρουσιάζουν έντονη βιοδραστικότητα (Markhali et al., 2020).

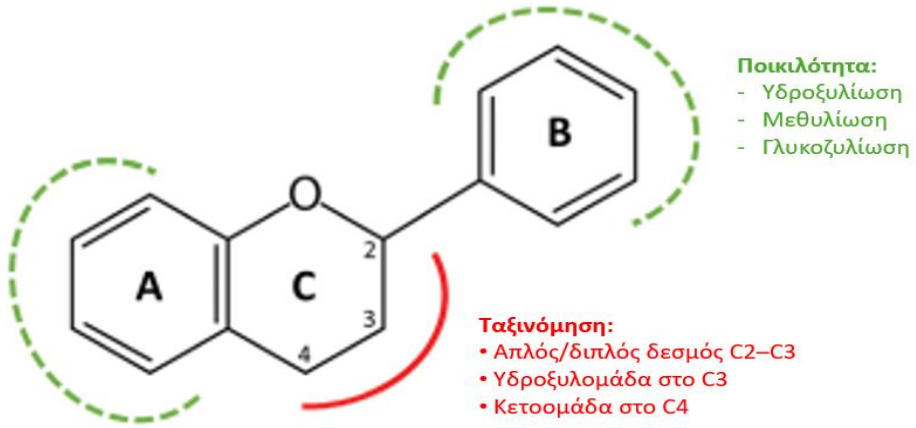
II. Πολυφαινόλες

Οι πολυφαινόλες διακρίνονται από τη χαρακτηριστική μοριακή τους δομή, που περιλαμβάνει έναν ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους συνδεδεμένους με ομάδες υδροξυλίου, στοιχείο που καθορίζει τόσο τη χημική τους συμπεριφορά όσο και τη βιολογική τους δράση (Markhali et al., 2020). Οι ομάδες αυτές χαρακτηρίζονται από ένα κοινό δομικό στοιχείο στον ανθρακικό τους σκελετό, γνωστό ως μονάδα φαινυλοπροπανοειδούς (C6–C3) (Talhaoui et al., 2015). Η βιοσύνθεση μέσω αυτής της βασικής δομής οδηγεί στη δημιουργία μιας μεγάλης ποικιλίας φυτικών φαινολικών ενώσεων, όπως: κινναμωμικά οξέα (C6–C3), βενζοϊκά οξέα (C6–C1), φλαβονοειδή (C6–C3–C6), προανθοκυανιδίνες [(C6–C3–C6)n], κουμαρίνες (C6–C3), στιλβένια (C6–C2–C6), λιγνάνες (C6–C3–C3–C6) και λιγνίνες [(C6–C3)n] (Talhaoui et al., 2015). Με άλλα λόγια, αυτή η κοινή μοριακή βάση αποτελεί τη “ρίζα” από την οποία προκύπτουν οι διάφορες κατηγορίες φαινολικών ενώσεων στα φυτά (Talhaoui et al., 2015). Η αντιοξειδωτική τους ικανότητα εξαρτάται από τον αριθμό, τη θέση και τη διάταξη των υδροξυλομάδων, καθώς και από τη μορφή υπό την οποία βρίσκονται μέσα στο τρόφιμο — είτε σε ελεύθερη είτε σε δεσμευμένη κατάσταση (Markhali et al., 2020). Συνολικά, η χημική δομή και η κατανομή των πολυφαινολών στη μήτρα του τροφίμου αποτελούν καθοριστικούς παράγοντες για τη βιοδιαθεσιμότητα και τη βιοδραστικότητά τους (Markhali et al., 2020).

III. Φλαβονοειδή

Οι φαινολικές ενώσεις περιλαμβάνουν τα φλαβονοειδή και τα μη φλαβονοειδή, διάκριση η οποία βασίζεται στον αριθμό των φαινολικών δακτυλίων που έχουν και στους υποκαταστάτες που συνδέονται με τους δακτυλίους (Lamponi, 2021). Τα φλαβονοειδή είναι πολυφαινολικές (Mutha et al., 2021), φυτοχημικές (Ullah et al., 2020), αρωματικές κετο-ενώσεις (Jia et al., 2021). Σε κυτταρικό επίπεδο, τα φλαβονοειδή δρουν πάνω σε ποικίλες βιοχημικές οδούς που σχετίζονται με διαδικασίες όπως η αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες, η φλεγμονώδης

αντίδραση, ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, η δημιουργία νέων αιμοφόρων αγγείων και η λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος. Πλήθος ερευνών υποδηλώνει ότι επηρεάζουν καθοριστικούς μηχανισμούς που συνδέονται με την εμφάνιση και την εξέλιξη των όγκων, ενώ φαίνεται να παίζουν βασικό ρόλο σε διαφορετικές μορφές καρκίνου, όπως η λευχαιμία και ο καρκίνος του μαστού (Chrysikopoulou et al., 2026). Δομικά αποτελούνται από ένα κοινό σκελετό άνθρακα διφαινυλοπροπανίου (Mutha et al., 2021), ο οποίος αποτελείται από 15 άτομα άνθρακα (Jia et al., 2021), μαζί με δύο βενζολικούς δακτυλίους A και B που συνδέονται μέσω της γραμμικής αλυσίδας τριών ατόμων άνθρακα (C6–C3–C6) (Mutha et al., 2021). Η κεντρική αυτή αλυσίδα ατόμων ανθράκων σχηματίζει ένα κλειστό δακτύλιο πυρανίου (Mutha et al., 2021). Πιο συνοπτικά η δομή τους περιλαμβάνει ένα δακτύλιο βενζοπυρόνης που φέρει φαινολικές ή πολυφαινολικές ομάδες σε διαφορετικές θέσεις (Ullah et al., 2020). Εμφανίζονται σε γλυκοζυλιωμένες μορφές, από χημική σκοπιά το πρώτο άτομο οξυγόνου είναι αλκαλικό άρα είναι ικανά να σχηματίσουν άλας σε αντιδράσεις με οξέα, έχουν αναγωγικές κυρίως ιδιότητες και ο διπλός δεσμός εμφανίζει μοναδική διαμόρφωση που οδηγεί το υδροξύλιο σε διακλάδωση (Jia et al., 2021). Η ποικιλομορφία τους οφείλεται στις δομικές παραλλαγές που προκύπτουν από υδροξυλίωση, μεθυλίωση και γλυκοζυλίωση (Bojić et al., 2019). Πιο συγκεκριμένα αλλαγές στο ετεροκυκλικό άτομο ταξινομεί τα φλαβονοειδή σε κατηγορίες ανάλογα με την ύπαρξη ή όχι διπλού δεσμού στην τέταρτη θέση του δακτυλίου και διπλού δεσμού μεταξύ ατόμων C2 και C3 και των υδροξυλομάδων στον δακτύλιο B (Mutha et al., 2021) **(Εικόνα 3)**.



Εικόνα 3: Δομή φλαβονοειδών - ταξινομούνται με βάση τα δομικά χαρακτηριστικά του δακτυλίου C (Bojić et al., 2019).

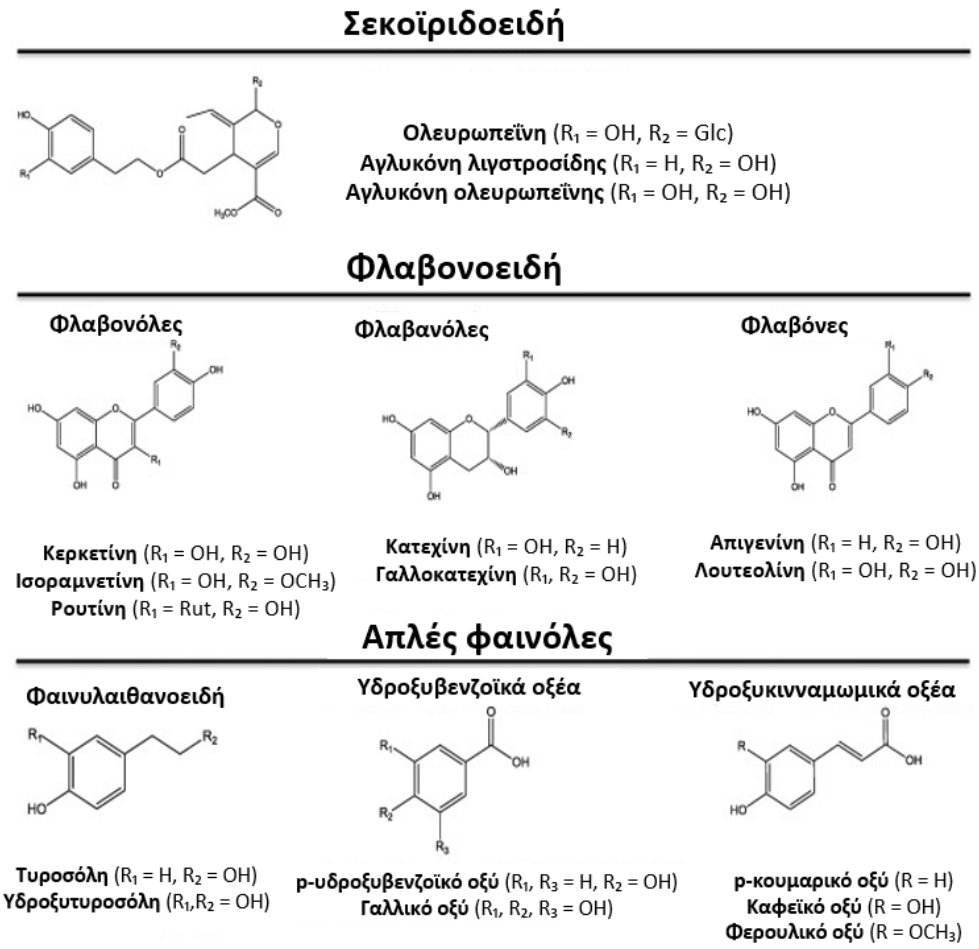
IV. Δραστικές ενώσεις ελιάς

Ανάμεσα στις ποικίλες φαινολικές ενώσεις που υπάρχουν στο φυτό της ελιάς ξεχωρίζουν οι απλές φαινόλες, όπως το καφεϊκό οξύ, η τυροσόλη και η υδροξυτυροσόλη (Mourtzinos et al., 2007), με την τελευταία, όπως προαναφέρθηκε να θεωρείται από τα κυριότερα συστατικά αυτής της κατηγορίας (Talhaoui et al., 2015). Εξίσου σημαντική ομάδα αποτελούν οι πολυφαινόλες, κυρίως τα φλαβονοειδή (Talhaoui et al., 2015), όπως η απιγενίνη, η καμπεφερόλη και η λουτεολίνη (Mourtzinos et al., 2007), καθώς και υποκατηγορίες τους όπως οι φλαβόνες, οι φλαβανόνες, οι φλαβονόλες και οι 3-φλαβανόλες (Talhaoui et al., 2015). Επιπλέον, βασικό ρόλο στη βιοδραστικότητα των φύλλων παίζουν τα σεκοϊριδοειδή (Mourtzinos et al., 2007), τα οποία ανήκουν στα ιριδοειδή — μονοτερπενικές ενώσεις με χαρακτηριστικό ιριδανικό δακτύλιο (Talhaoui et al., 2015). Στα σεκοϊριδοειδή, ο κυκλοπεντανικός δακτύλιος έχει διασπαστεί στη θέση 7–8, σχηματίζοντας ενώσεις που φέρουν φαινολικές ομάδες (Talhaoui et al., 2015). Σε αυτή την κατηγορία περιλαμβάνονται η ολευρωπεΐνη, η λιγοστροσίδη, η διμεθυλο-ολευρωπεΐνη και η ολεοσίδη (Mourtzinos et al., 2007). Τα σεκοϊριδοειδή αποτελούν μια κατηγορία ενώσεων που συναντώνται αποκλειστικά σε φυτά της οικογένειας *Oleaceae* και αντιπροσωπεύουν το μεγαλύτερο ποσοστό των πολυφαινολικών συστατικών της ελιάς, καλύπτοντας περίπου το 85% των πολυφαινολών που περιέχονται στα φύλλα της (Boss et al., 2016) **(Εικόνα 4)**. Η ολευρωπεΐνη, όπως θα αναλυθεί και στη συνέχεια, αποτελεί το κυριότερο σεκοϊριδοειδές συστατικό του εκχυλίσματος φύλλων ελιάς (Selim et al., 2022). Ως προς τη χημική της δομή, είναι ένας ετεροζυδικός (γλυκοζυδικός) εστέρας του ελενολικού οξέος με την υδροξυτυροσόλη και απαντάται κυρίως στα φύλλα, αλλά και στον φλοιό, στους σπόρους και στο ελαιόλαδο. Η παρουσία της συνδέεται με τις βασικές ιδιότητες του OLE, όπως την έντονη αντιοξειδωτική και αντιβακτηριακή του δράση (Selim et al., 2022).

1.2.β Ολευρωπεΐνη

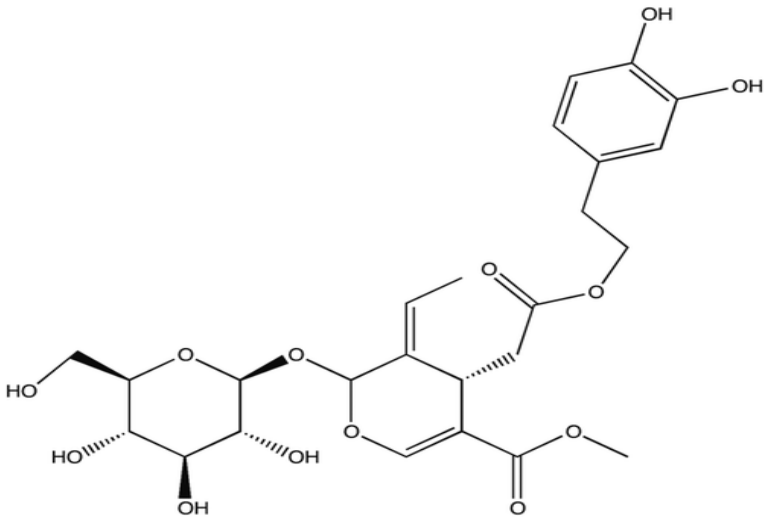
1.2.β$_1$ Ολευρωπεΐνη και παράγωγά της ως κύριες φαινολικές ενώσεις στην ελιά και στα φύλλα ελιάς

Η ολευρωπεΐνη (Oleuropein – OL,OLE ή OLEU) είναι μια πολυφαινολική η οποία έχει αποτελέσει αντικείμενο αυξημένου ερευνητικού ενδιαφέροντος τα τελευταία χρόνια λόγω των πολυάριθμων πιθανών ευεργετικών της δράσεων στην υγεία (Sun et al., 2017). Απαντάται σε ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις στα φύλλα της ελιάς (60–90 mg ανά γραμμάριο ξηρής μάζας), ενώ έχει εντοπιστεί και σε άλλα μέρη του φυτού, όπως στη φλούδα, τον πολτό, τον σπόρο του ελαιόκαρπου (Soler-Rivas et al., 2000), αλλά και στο ελαιόλαδο (Sun et al., 2017).



Εικόνα 4: Παραδείγματα φαινολικών ενώσεων από φύλλα ελιάς (Talhaoui et al., 2015).

Η πλειονότητα των πολυφαινολών που βρίσκονται στις ελιές είναι παράγωγα της υδρόλυσης της ολευρωπεΐνης (Lalas et al., 2011). Η πικράδα που εμφανίζει η ελιά σχετίζεται με την ολευρωπεΐνη και μέσω της διαδικασίας αλκαλικής υδρόλυσης σε υδροξυτυροσόλη απομακρύνεται (Lalas et al., 2011). Η υδρόλυσή της μπορεί να επιτευχθεί και με ενζυματικές ή όξινες ή, με την όξινη υδρόλυση να εφαρμόζεται συχνότερα σε εργαστηριακές και βιομηχανικές συνθήκες (Kourti et al., 2024). Όταν η ολευρωπεΐνη υδρολύεται, παράγει την αγλυκόνη της ολευρωπεΐνης, ελενολικό οξύ, υδροξυτυροσόλη (HT) και ένα μόριο γλυκόζης (Boss et al., 2016). Η υδροξυτυροσόλη είναι μια φαινολική αλκοόλη (Boss et al., 2016), μεταβολίτης της ολευρωπεΐνης (Sun et al., 2017), και αποτελεί το δεύτερο πιο άφθονο φαινολικό συστατικό στα φύλλα της ελιάς (Boss et al., 2016). Η συγκέντρωση αυτών εξαρτάται από την ωρίμανση και τη μέθοδο επεξεργασίας της ελιάς μέχρι να γίνει βρώσιμη (Lalas et al., 2011). Η τυροσόλη, επίσης φαινολικό οξύ που προέρχεται από την ολευρωπεΐνη, υπάρχει σε πολύ μικρότερες ποσότητες στα φύλλα (Boss et al., 2016). Οι βιολογικές δράσεις της ολευρωπεΐνης αποδίδονται κυρίως στην κατεχολική ομάδα της υδροξυτυροσόλης, η οποία χαρακτηρίζεται από υψηλή βιοδραστικότητα (Kourti et al., 2024).



Εικόνα 5: Χημική δομή ολευρωπεΐνης (Shamshoum et al., 2017).

Η ολευρωπεΐνη ανήκει στην ομάδα των σεκοϊριδοειδών, φυσικών ενώσεων που έχουν χημική δομή παρόμοια με τις κουμαρίνες και βρίσκονται σε διάφορα φυτά, όπως αυτά των οικογενειών *Oleaceae*, *Gentianales* και *Cornales* (Soler-Rivas et al., 2000). Τα σεκοϊριδοειδή και τα ιριδοειδή συνήθως υπάρχουν ως γλυκοζιτικά

παράγωγα, σχηματίζονται μέσω του δευτερογενούς μεταβολισμού των τερπενίων και λειτουργούν ως πρόδρομες ουσίες για τη δημιουργία διαφόρων ινδολικών αλκαλοειδών (Soler-Rivas et al., 2000). Στα φυτά της οικογένειας *Oleaceae*, τα σεκοϊριδοειδή προέρχονται κυρίως από τα ολεοσίδια, τα οποία συνδυάζουν ελενολικό οξύ με ένα γλυκοζιτικό υπόλειμμα και διαθέτουν μια εξωκυκλική 8,9-διπλή ένωση στη δομή τους (Soler-Rivas et al., 2000). Η ολευρωπεΐνη είναι ένας εστέρας της υδροξυτυροσόλης (2-(3,4-διυδροξυφαινυλ)αιθανόλη) και διαθέτει τον ολεοσιδικό σκελετό, ο οποίος είναι χαρακτηριστικός των σεκοϊριδοειδών γλυκοζιτών της οικογένειας *Oleaceae* (Haris Omar, 2010) **(Εικόνα 5)**. Στο ελαιόλαδο απαντάται κυρίως στη μορφή της αγλυκόνης, καθώς η παρουσία του σακχαριδικού τμήματος στην αρχική της μορφή (γλυκοζίτης) την καθιστά εξαιρετικά πολική και πρακτικά αδιάλυτη στο έλαιο (Haris Omar, 2010).

1.2.β₂ Ολευρωσίδης: Ισομερές σεκοϊριδοειδές της ελιάς

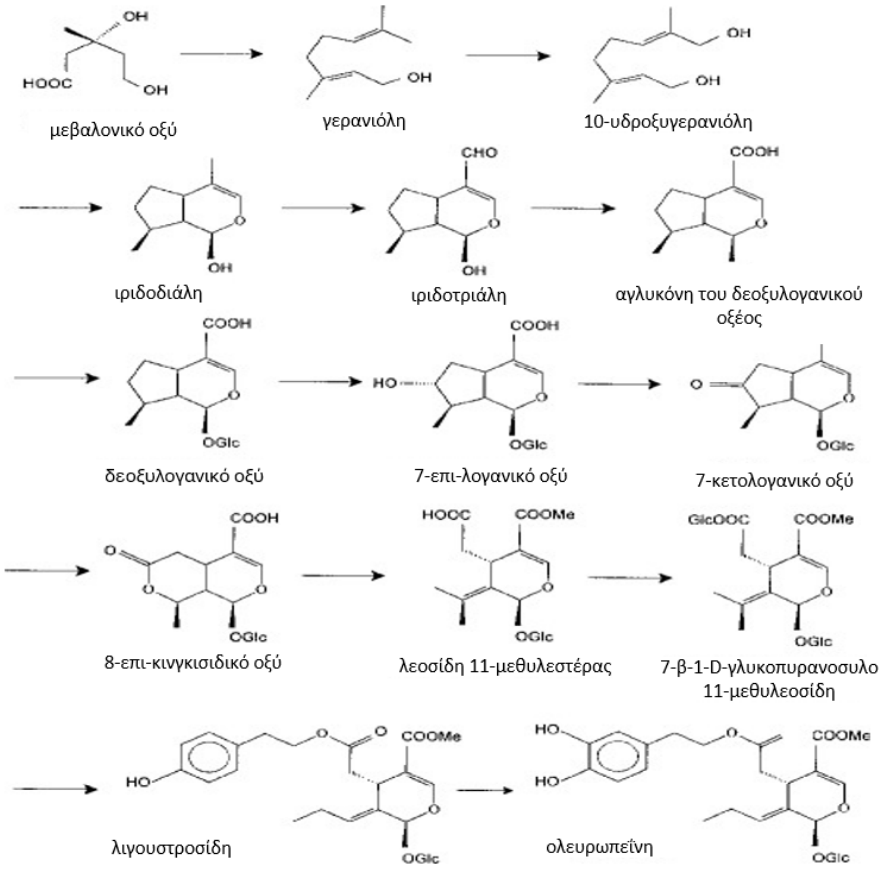
Ο ολευρωσίδης αποτελεί μία σεκοϊριδοειδή φαινολική ένωση που απαντάται στην *Olea europaea L.* και συγκαταλέγεται στα χαρακτηριστικά δευτερογενή μεταβολικά προϊόντα της ελιάς. Η περιεκτικότητά του στα φύλλα της ελιάς είναι ιδιαίτερα χαμηλή, συνήθως μικρότερη του 1%, γεγονός που καθιστά την παρουσία του περιορισμένη σε σύγκριση με άλλα φαινολικά συστατικά, όπως η ολευρωπεΐνη. Ωστόσο, παρουσιάζει ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον λόγω των σημαντικών βιολογικών του ιδιοτήτων και κυρίως της έντονης αντιοξειδωτικής του δράσης, η οποία συνδέεται με προστατευτικό ρόλο έναντι του οξειδωτικού στρες (Haris Omar, 2010).

Δομικά, ο ολευρωσίδης αποτελεί ισομερές της ολευρωπεΐνης, καθώς οι δύο ενώσεις διαθέτουν την ίδια μοριακή σύσταση και παρόμοιο χημικό σκελετό. Η βασική τους διαφορά εντοπίζεται στη θέση του εξωκυκλικού διπλού δεσμού στο μονοτερπενικό τμήμα του μορίου. Συγκεκριμένα, στον ολευρωσίδη ο διπλός δεσμός βρίσκεται μεταξύ των ατόμων άνθρακα C-8 και C-10, ενώ στην ολευρωπεΐνη μεταξύ των ατόμων C-8 και C-9. Η διαφοροποίηση αυτή, αν και φαινομενικά μικρή, μπορεί να επηρεάζει τις φυσικοχημικές ιδιότητες, τη βιοδιαθεσιμότητα και τη βιολογική δραστικότητα της ένωσης. Η ισχυρή αντιοξειδωτική του δράση έχει συσχετιστεί με την ικανότητά του να εξουδετερώνει δραστικά είδη οξυγόνου και να προστατεύει

βιολογικά μόρια από οξειδωτικές βλάβες, γεγονός που υποστηρίζει τον πιθανό ρόλο του στην πρόληψη παθολογικών καταστάσεων που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες (Haris Omar, 2010).

1.2.β₃ Σύνθεση ολευρωπεΐνης

Μέσα από οξειδώσεις και μετατροπές, σχηματίζεται η ολευρωπεΐνη, μια χαρακτηριστική φαινολική ένωση της ελιάς, με σημαντικές βιολογικές ιδιότητες (Haris Omar, 2010). Ειδικότερα στα φυτά της οικογένειας *Oleaceae*, η παραγωγή της ολευρωπεΐνης ακολουθεί ένα παρακλάδι της μεταβολικής οδού του μεβαλονικού οξέος, που ανήκει στο δευτερογενή μεταβολισμό. Μέσα από αυτή τη διαδικασία δημιουργούνται οι ολεοζίτες, από τους οποίους στη συνέχεια σχηματίζονται οι ενώσεις που ανήκουν στην ομάδα των σεκοϊριδοειδών (Soler-Rivas et al., 2000). Πιο συγκεκριμένα από αυτό παράγονται ενώσεις όπως η γερανιόλη και άλλοι πρόδρομοι, που μετατρέπονται σε ιριδοειδή και στη συνέχεια σε σεκοϊριδοειδή (Haris Omar, 2010). Από αυτά προκύπτουν οι ολεοζίτες, οι οποίοι εξελίσσονται σε λιγουστροσίδη, τον άμεσο πρόδρομο της ολευρωπεΐνης (Haris Omar, 2010). Κατά τη διαδικασία μεσολαβούν ενδιάμεσα μόρια, όπως το δεοξυλογανικό και το 7-κετολογανικό οξύ, ενώ τα επιμέρους στάδια μπορεί να διαφέρουν ανάλογα με το είδος του φυτού ή την εποχή (Haris Omar, 2010). Στο τελευταίο στάδιο της παραγωγής της ολευρωπεΐνης, η ένωση τυροσόλη ενώνεται με το μόριο 7-β-1-D-γλυκοπυρανοζυλ-11-μεθυλο ολεοσίδιο. Από αυτή τη σύνδεση σχηματίζονται δύο ουσίες: η λιγκστροσίδη και η 3,4-DHPEA-EDA (Shamshoum et al., 2017). Η λιγκστροσίδη λειτουργεί ως άμεσο πρόδρομο της ολευρωπεΐνης, ενώ η 3,4-DHPEA-EDA μετατρέπεται πρώτα σε αγλυκόνη ολευρωπεΐνης και στη συνέχεια στο τελικό μόριο της ολευρωπεΐνης (Shamshoum et al., 2017) **(Εικόνα 6)**.



Εικόνα 6: Προτεινόμενη πορεία βιοσύνθεσης της ολευρωπεΐνης στα φυτά της οικογένειας *Oleaceae* (Soler-Rivas et al., 2000).

1.2.β₄ Βιολογικές δράσεις της ολευρωπεΐνης και των παραγώγων της

Η ολευρωπεΐνη συνιστά μία από τις σημαντικότερες βιοδραστικές ενώσεις της ελιάς και έχει αποτελέσει αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας λόγω των πολλαπλών ευεργετικών της επιδράσεων στην υγεία (Boss et al., 2016), γεγονός που δικαιολογεί τη χρήση της ως συμπλήρωμα διατροφής σε χώρες της Μεσογείου (Haris Omar, 2010) **(Εικόνα 7)**.

I. Αντιυπερτασιακή και καρδιοπροστατευτική δράση

Η ολευρωπεΐνη είναι κυρίως γνωστή για την ικανότητά της να μειώνει την αρτηριακή πίεση (Sun et al., 2017). Πειραματικές μελέτες σε ζωικά μοντέλα έχουν δείξει ότι η ολευρωπεΐνη συμβάλλει στην ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης και στη μείωση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα, γεγονός που υποδηλώνει πιθανές καρδιομεταβολικές ωφέλειες (Boss et al., 2016). Τα δεδομένα δείχνουν ότι η χορήγησή της, είτε ενδοφλέβια είτε ενδοπεριτοναϊκά, οδηγεί σε αξιοσημείωτη

μείωση τόσο της συστολικής όσο και της διαστολικής πίεσης σε ζωικά μοντέλα (Sun et al., 2017). Η αντιυπερτασική αυτή δράση ενισχύει την επιστημονική τεκμηρίωση της παραδοσιακής χρήσης των φύλλων ελιάς για την αντιμετώπιση ήπιων έως μέτριων μορφών υπέρτασης (Sun et al., 2017).

Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι διαθέτει καρδιοπροστατευτική δράση έναντι της οξείας καρδιοτοξικότητας που προκαλεί η αδριαμυκίνη (Haris Omar, 2010).

II. Αντικαρκινική δράση

Παράλληλα, *in vitro* μελέτες σε καρκινικά κύτταρα έχουν αποκαλύψει την δυνητική αντικαρκινική της δράση (Boss et al., 2016). Μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν κλινικές δοκιμές σε ανθρώπους (Boss et al., 2016) όμως μελέτες σε ζώα έδειξαν ότι η ολευρωπεΐνη σχετίζεται με την ικανότητά της να ρυθμίζει μονοπάτια σηματοδότησης και να μεταβάλλει τη γονιδιακή έκφραση πρωτεϊνών που συμμετέχουν στον κυτταρικό κύκλο και τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (Shamshoum et al., 2017). Μπορεί να προκαλεί απόπτωση σε διάφορους τύπους καρκινικών κυττάρων, όπως του παχέος εντέρου, του προστάτη αλλά και του μαστού (Boss et al., 2016). Σχετικά με τον τελευταίο τύπο καρκίνου έχει βρεθεί ότι δρα ως ισχυρός αναστολέας του υποδοχέα HER2, μιας πρωτεΐνης του ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα, η οποία παρουσιάζει αυξημένη έκφραση σε πολλά κύτταρα καρκίνου του μαστού (Sun et al., 2017).

III. Άλλες δράσεις

Πέρα από τις παραπάνω δράσεις, η ολευρωπεΐνη έχει αναγνωριστεί για το ευρύ φάσμα φαρμακολογικών ιδιοτήτων της, συμπεριλαμβανομένων της αντιοξειδωτικής, αντιφλεγμονώδους, αντιαθηρογόνου, υπολιπιδαιμικής (Haris Omar, 2010), νευροπροστατευτικής, ηπατοπροστατευτικής (Shamshoum et al., 2017) αλλά και αντιμικροβιακής δράσης (Haris Omar, 2010), καθώς αναστέλλει την ανάπτυξη μικροοργανισμών και παρασίτων σε εργαστηριακές συνθήκες (Boss et al., 2016). Η αντιοξειδωτική της δράση σχετίζεται με το γεγονός ότι αναστέλλει την οξείδωση της LDL που επάγεται από μακροφάγα (Gorzynik-Debicka et al., 2018). Η φαρμακολογική της δράση εκτείνεται και σε άλλες θεραπευτικές ιδιότητες, καθώς έχουν αναφερθεί αγγειοδιασταλτικές, αντιαιμοπεταλιακές, υποτασικές, αντιρρευματικές, διουρητικές

και αντιπυρετικές επιδράσεις (Haris Omar, 2010). Ακόμη η ολευρωπεΐνη περιορίζει το οξειδωτικό στρες στη μέλαινα ουσία ηλικιωμένων αρουραίων, περιοχή του εγκεφάλου που είναι ιδιαίτερα ευάλωτη στη νευροεκφυλιστική διαδικασία της νόσου του Πάρκινσον (Sun et al., 2017).

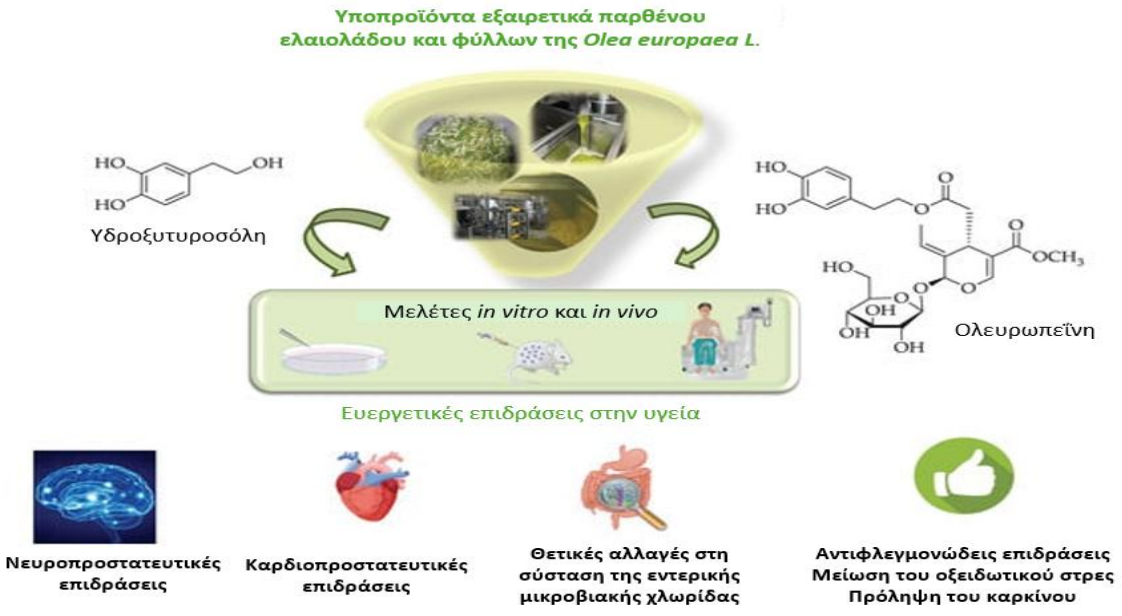
Αν και υπάρχουν μελέτες που αναφέρουν ότι τα φυσικά προϊόντα στοχεύουν τις εξωκυττάριες παγίδες ουδετερόφιλων (NETs), κυρίως στο πλαίσιο αντιθρομβωτικών θεραπευτικών προσεγγίσεων (Lei etal.,2024), εξ όσων γνωρίζουμε δεν έχουν μέχρι σήμερα δημοσιευθεί αντίστοιχες έρευνες που να συσχετίζουν άμεσα τη δράση βιοδραστικών ενώσεων των φύλλων ελιάς με τα NETs. Ωστόσο, σύμφωνα με μελέτη των Bedouhene et al., η ολευρωπεΐνη και η υδροξυτυροσόλη φαίνεται να ασκούν σημαντική ρυθμιστική επίδραση στη λειτουργία των ανθρώπινων ουδετερόφιλων, επηρεάζοντας κρίσιμους μηχανισμούς της φλεγμονώδους απόκρισης. Συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι αναστέλλουν την αποκοκκίωση των ουδετερόφιλων, μειώνοντας την απελευθέρωση τόσο των αζουρόφιλων όσο και των ειδικών κοκκίων. Η απελευθέρωση της μυελοϋπεροξειδάσης (MPO) από ουδετερόφιλα περιορίζεται με δοσοεξαρτώμενο τρόπο παρουσία των δύο αυτών φαινολικών ενώσεων, ενώ παρόμοια δοσοεξαρτώμενη ανασταλτική δράση παρατηρείται και στην έκκριση λακτοφερρίνης. Πέραν της ικανότητάς τους να δεσμεύουν αντιδραστικά είδη οξυγόνου (ROS), τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν ότι αυτά τα δύο μόρια παρεμβαίνουν άμεσα στους μηχανισμούς αποκοκκίωσης. Επιπλέον, φαίνεται ότι αναστέλλουν τη χημειοταξία και τη μετανάστευση των ουδετερόφιλων με δοσοεξαρτώμενο τρόπο, γεγονός που υποδηλώνει εμπλοκή τους σε σηματοδοτικές οδούς που ρυθμίζουν την κυτταρική κινητικότητα. Συνολικά, οι δράσεις αυτές υποστηρίζουν ότι οι εν λόγω ενώσεις ενδέχεται να περιορίζουν τη στρατολόγηση και ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων στις θέσεις φλεγμονής, συμβάλλοντας έτσι σε μια αντιφλεγμονώδη απόκριση (Bedouhene et al., 2017).

Εικόνα 7: Ορισμένες δράσεις της ολευρωπεΐνης και παράγωγων της (Haris Omar, 2010).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2ο : ΔΡΑΣΕΙΣ ΕΛΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ

2.1 Ελιά, φύλλα ελιάς και δράσεις

Ο καρπός της ελιάς αποτελεί κυρίως πηγή λιπαρών οξέων, ενώ ένα μικρό αλλά ιδιαίτερα σημαντικό ποσοστό του εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου αποτελείται από βιοδραστικά δευτερεύοντα συστατικά, με κυριότερα τις φαινολικές ενώσεις, οι οποίες παρουσιάζουν σημαντικά οφέλη για την ανθρώπινη υγεία **(Εικόνα 8)**. Ιδιαίτερο επιστημονικό ενδιαφέρον συγκεντρώνουν ενώσεις όπως η υδροξυτυροσόλη, η ολευρωπεΐνη, η ολεοκανθάλη και οι λιγνάνες, οι οποίες απαντώνται όχι μόνο στο εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο (Extra Virgin Olive Oil - EVOO) αλλά και στα υποπροϊόντα και τα φύλλα της ελιάς. Πλήθος μελετών, στο πλαίσιο της μεσογειακής διατροφής, τεκμηριώνουν τη συμβολή του ελαιολάδου στην καρδιαγγειακή προστασία, ενώ μεγάλες ευρωπαϊκές επιδημιολογικές έρευνες έχουν αναδείξει τη σχέση της κατανάλωσης EVOO με μειωμένο κίνδυνο στεφανιαίας νόσου και ορισμένων μορφών καρκίνου. Παράλληλα, τα φύλλα και τα υποπροϊόντα της ελιάς αναγνωρίζονται ως πολύτιμες πηγές φαινολικών ενώσεων, οι οποίες μπορούν να αξιοποιηθούν μέσω βιώσιμων τεχνολογιών, ενισχύοντας εφαρμογές σε τρόφιμα, φαρμακευτικά και βιοϊατρικά προϊόντα (Romani et al., 2019).



Εικόνα 8: Γραφική περίληψη δράσεων ελιάς (Romani et al., 2019).

2.1.α Αντιοξειδωτική δράση

Τα φύλλα ελιάς περιέχουν φυσικά αντιοξειδωτικά, όπως φαινολικές ενώσεις (Fazlollahi et al., 2023), οι οποίες απαντώνται τόσο σε ελεύθερη (Free Particles-FPs) όσο και σε δεσμευμένη μορφή (Bound Particles -BPs), με διαφοροποιημένη χημική σύσταση και βιολογική συμπεριφορά, με τις ελεύθερες να εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερη συνολική περιεκτικότητα σε φαινολικά και φλαβονοειδή (Li et al., 2023). Το οξειδωτικό στρες αποτελεί μια επιβλαβή κυτταρική κατάσταση σηματοδότησης, που προκαλείται από την υπερβολική παραγωγή αντιδραστικών ειδών οξυγόνου και αζώτου (ROS/RNS), με αποτέλεσμα τη διαταραχή της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης, η οποία ευνοεί την επικράτηση των οξειδωτικών διεργασιών (Rani et al., 2016). Το οξειδωτικό στρες έχει θεωρηθεί η βασική αιτία πολλών χρόνιων ασθενειών, όπως οι καρδιαγγειακές παθήσεις, η φλεγμονή, ο διαβήτης και ο καρκίνος (M. R. Miller, 2020). Οι φαινολικές ενώσεις που υπάρχουν στα φύλλα ελιάς προστατεύουν τα κύτταρα από την οξειδωτική βλάβη που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες που σχηματίζονται κατά το μεταβολισμό του οξυγόνου (Fazlollahi et al., 2023). Πιο συγκεκριμένα τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή, τα σεκοϊριδοειδή και οι απλές φαινόλες έχει αποδειχθεί ότι έχουν τη δυνατότητα να δεσμεύουν τις δραστικές ρίζες οξυγόνου και να αντιστέκονται στο οξειδωτικό στρες, αποτελώντας τις κύριες πηγές των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων των φύλλων ελιάς (Žugčić et al., 2019).

Η οξείδωση της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (Low-Density Lipoprotein - LDL) αποτελεί καθοριστικό μηχανισμό στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης και των καρδιαγγειακών νοσημάτων, γεγονός που έχει ενισχύσει το επιστημονικό ενδιαφέρον για ενώσεις με αντιοξειδωτική δράση (Vissers et al., 2004). Ιδιαίτερη σημασία αποδίδεται στις διαιτητικές φαινολικές ενώσεις, οι οποίες χαρακτηρίζονται από αρωματικό δακτύλιο και μία ή περισσότερες υδροξυλομάδες, με την αντιοξειδωτική τους αποτελεσματικότητα να εξαρτάται άμεσα από τη χημική τους δομή (Rice-Evans et al., 1996). Συγκεκριμένα, φαινόλες με δύο ή περισσότερες υδροξυλομάδες εμφανίζουν ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση σε πειραματικά συστήματα σε σύγκριση με εκείνες που φέρουν μόνο μία (Rice-Evans et al., 1996). Το εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο και τα φύλλα ελιάς περιέχουν τέτοιες φαινολικές

ενώσεις, γεγονός που έχει συμβάλει στην ανάδειξή του ως πιο υγιεινή λιπαρή ύλη σε σχέση με άλλα φυτικά έλαια. Ωστόσο, η έκταση της προστατευτικής τους δράσης έναντι της οξείδωσης της LDL και των καρδιαγγειακών παθήσεων απαιτεί περαιτέρω επιστημονική τεκμηρίωση (Vissers et al., 2004).

Παρότι το ελαϊκό οξύ θεωρείται βασικό συστατικό του ελαιολάδου με ευεργετική δράση, δεν είναι ο μοναδικός παράγοντας που συμβάλλει στην προστασία της LDL από την οξείδωση (Vissers et al., 2004). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι φαινολικές ενώσεις που συναντάμε στα φύλλα ελιάς, όπως υδροξυτυροσόλη, ολευρωπεΐνη, τυροσόλη, κουμαρικό οξύ, καφεϊκό οξύ, βανιλικό οξύ, φερουλικό οξύ, καμφερόλη και κερσετίνη (Stagos, 2019), οι οποίες φαίνεται να διαθέτουν σημαντική αντιοξειδωτική ικανότητα (Witztum & Steinberg, 1991). Συγκεκριμένα η υδροξυτυροσόλη (HT) και τα παράγωγά της έχουν αναγνωριστεί από την Ευρωπαϊκή Αρχή Ασφάλειας Τροφίμων (European Food Safety Authority-EFSA) για τη συμβολή τους στην προστασία της LDL χοληστερόλης από οξειδωτική βλάβη (Christodoulou et al., 2024). Σύμφωνα με την υπόθεση της οξειδωτικής τροποποίησης της αθηροσκλήρωσης, τα σωματίδια της LDL υφίστανται οξείδωση και στη συνέχεια προσλαμβάνονται από μακροφάγα στο αρτηριακό τοίχωμα, διαδικασία που συμβάλλει στο σχηματισμό αθηρωματικών πλακών (Witztum & Steinberg, 1991). Στο πλαίσιο αυτό, τα διαιτητικά αντιοξειδωτικά μπορούν να περιορίσουν την εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης, μειώνοντας τόσο την οξείδωση της LDL όσο και τη συσσώρευσή της στα μακροφάγα (Witztum & Steinberg, 1991). Οι φαινόλες του είναι δυνατόν να κυκλοφορούν στο πλάσμα είτε ελεύθερες είτε συνδεδεμένες με σωματίδια LDL, ασκώντας έτσι προστατευτική δράση έναντι της οξειδωτικής τους τροποποίησης (Witztum & Steinberg, 1991).

2.1.β Αντιθρομβωτική δράση

Έρευνες έχουν δείξει ότι αρκετές φαινολικές ενώσεις που ανιχνεύονται στα φύλλα ελιάς αλλά και στα εκχυλίσματα ελαιολάδου - μείγμα εξευγενισμένου ελαιολάδου με μικρές ποσότητες από εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο (Extra Virgin Olive Oil-EVOO) και από παρθένο ελαιόλαδο (Virgin Olive Oil-VOO) - είναι ικανές να αναστείλουν την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων (Katsa & Nomikos, 2022). Η ανασταλτική δράση των φαινολικών ενώσεων στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων

φαίνεται να προκύπτει μέσω διαφόρων μηχανισμών, με τον πιο σημαντικό να είναι η αναστολή της παραγωγής θρομβοξάνης Α2 (TxA2), ενός κρίσιμου εικοσανοειδούς που προάγει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων (Katsa & Nomikos, 2022). Τα φαινολικά εκχυλίσματα από το εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο, ανεξάρτητα από το αν διέθεταν υψηλή ή χαμηλή φαινολική περιεκτικότητα, ήταν ικανά να αναστείλουν τη δραστηριότητα της φωσφοδιεστεράσης της κυκλικής 3',5'-μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cAMP-phosphodiesterase), του ενζύμου που καταλύει τη διάσπαση του cAMP (Dell'Agli et al., 2008). Με τον τρόπο αυτό, εμποδίζεται η μείωση των επιπέδων cAMP στα αιμοπετάλια, η οποία αποτελεί κρίσιμο μηχανισμό για την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων (Dell'Agli et al., 2008). Επίσης προκλινικές μελέτες σε ζωικά μοντέλα ανέδειξαν την ικανότητα των φαινολικών ενώσεων να αναστέλλουν την *ex vivo* ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων (Katsa & Nomikos, 2022). Ορισμένες μελέτες έχουν καταδείξει ότι η ικανότητα των φαινολικών ενώσεων του εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου να αναστέλλουν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων εξαρτάται από τον τύπο του αγωνιστή που προκαλεί τη συσσώρευση(Katsa & Nomikos, 2022). Δύο ισοχρωμάνια, τα οποία ανήκουν στην κατηγορία των παραγώγων φαινολικών ενώσεων, αναστέλλουν την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων που προκαλείται από το αραχιδονικό οξύ και το κολλαγόνο, αλλά δεν επηρεάζουν τη συσσώρευση που προκαλείται από την διφωσφορική αδενοσίνη (Adenosine Diphosphate-ADP) (Togna et al., 2003). Σύμφωνα με τους ερευνητές, αυτό μπορεί να οφείλεται στη δυνατότητα των ισοχρωμανίων να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες, περιορίζοντας μόνο τις αρχικές φάσεις ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων που είναι ευαίσθητες σε οξειδοαναγωγικές μεταβολές και προκαλούνται από το κολλαγόνο και το αραχιδονικό οξύ (Togna et al., 2003). Επιπλέον, τα ισοχρωμάνια φαίνεται να αναστέλλουν την κινητοποίηση του αραχιδονικού οξέος από τα φωσφολιπίδια της μεμβράνης των αιμοπεταλίων που προκαλείται από τη θρομβίνη και το κολλαγόνο, υποδεικνύοντας άμεση αναστολή της φωσφολιπάσης Α2 (PLA_2) (Togna et al., 2003).

Η υδροξυτυροσόλη, σημαντική βιοδραστική ένωση που εντοπίζεται στα φύλλα ελιάς (Romani et al., 2019), έχει μελετηθεί εκτενώς σε κυτταρικά μοντέλα και έχει αποδειχθεί ότι διαθέτει σημαντική ικανότητα αναστολής της συσσώρευσης αιμοπεταλίων (Petroni et al., 1995). Μελέτες σε κυτταρικές σειρές και ζωικά μοντέλα έχουν δείξει ότι η υδροξυτυροσόλη είναι ικανή να περιορίσει την ενεργοποίηση των

αιμοπεταλίων που προκαλείται από διάφορους ενδογενείς αγωνιστές και παθολογικές καταστάσεις (Katsa & Nomikos, 2022). Συγκεκριμένα, η υδροξυτυροσόλη αναστέλλει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων που προκαλείται από κολλαγόνο, αδενοσινοδιφωσφορικό οξύ και πεπτίδια ενεργοποίησης του υποδοχέα θρομβίνης σε ανθρώπινο πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (De Roos et al., 2011). Επιπλέον, η ίδια ένωση περιορίζει τη συσσώρευση αιμοπεταλίων που προκαλείται από θρομβίνη σε πλυμένα ανθρώπινα αιμοπετάλια. Επιπλέον, η υδροξυτυροσόλη εμποδίζει τη συσσώρευση που επάγεται από κολλαγόνο, αδενοσινοδιφωσφορικό οξύ και αραχιδονικό οξύ σε λευκά αιμοσφαίρια υγιών δοτών (Katsa & Nomikos, 2022). Η ολευρωπεΐνη και η υδροξυτυροσόλη μπορούν επίσης να επηρεάσουν την κινητοποίηση του ασβεστίου που προκαλείται από τη θρομβίνη (Katsa & Nomikos, 2022). Επιπλέον, τα ακετυλιωμένα παράγωγα της τυροσόλης, τα οποία απαντώνται τόσο στις ελιές όσο και στο εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο, έχουν αποδειχθεί ότι αποτελούν σημαντικά ισχυρότερους αναστολείς της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων που προκαλείται από τον παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιών σε σχέση με την ίδια την τυροσόλη (Fragopoulou et al., 2007).

Συμπερασματικά, οι φαινολικές ενώσεις που αποτελούν συστατικά του εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου και των φύλλων ελιάς διαθέτουν ισχυρές αντιαιμοπεταλιακές ιδιότητες που επηρεάζουν πολλαπλές οδούς ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (Katsa & Nomikos, 2022). Αυτό υποστηρίζει την άποψη ότι τα φαινολικά συστατικά του ελαιολάδου συμβάλλουν σημαντικά στην προστασία της καρδιαγγειακής υγείας μέσω της αναστολής της αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης (Katsa & Nomikos, 2022). Επιπλέον, τα υποπροϊόντα της ελιάς αναδεικνύονται ως πολύτιμη πηγή φαινολικών ενώσεων, οι οποίες μπορούν να αξιοποιηθούν για την ανάπτυξη συμπληρωμάτων διατροφής και λειτουργικών τροφίμων με υποσχόμενες αντιαιμοπεταλιακές δράσεις (Katsa & Nomikos, 2022).

Η προστατευτική δράση της μεσογειακής διατροφής συνδέεται σε μεγάλο βαθμό με την υψηλή κατανάλωση ελαιολάδου, το οποίο αποτελεί την κύρια πηγή λιπαρών της δίαιτας, καθιστώντας την χαμηλή σε κορεσμένα λιπαρά και πλούσια σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, κυρίως ελαϊκό οξύ (Pérez-Jiménez et al., 2006). Παραδοσιακά, τα οφέλη των διαίτων πλούσιων σε μονοακόρεστα λιπαρά

συνδέονταν κυρίως με τη βελτίωση του μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών και, σε μικρότερο βαθμό, με άλλους παράγοντες καρδιαγγειακού κινδύνου, ενώ σήμερα αναγνωρίζεται ότι επεκτείνονται και σε άλλες βιολογικές δράσεις, όπως η ρύθμιση της αιμόστασης (Pérez-Jiménez et al., 2002).

Η κατανάλωση μονοακόρεστων λιπαρών οξέων, όπως αυτά που περιέχονται στο ελαιόλαδο, έχει αποδειχθεί ότι μειώνει την απέκκριση της 11-δεϋδρο-θρομβοξάνης Β2 στα ούρα, ενός μεταβολίτη της θρομβοξάνης Β2 που προέρχεται από τη θρομβοξάνη Α2, η οποία προάγει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων (Lahoz et al., 1997).

Παράλληλα, ο ιστικός παράγοντας (Tissue Factor-TF), που εκφράζεται στα κύτταρα του αρτηριακού τοιχώματος, ενισχύει τη θρομβογόνο δραστηριότητα των αθηρωματικών πλακών και ευνοεί την εμφάνιση οξέων στεφανιαίων επεισοδίων (Pérez-Jiménez et al., 2006). Η σύσταση της διατροφής σε λιπαρά επηρεάζει την έκφραση του ιστικού παράγοντα. Τα πολυακόρεστα λιπαρά και δίαιτες χαμηλές σε λιπαρά, όπως η μεσογειακή διατροφή, μειώνουν τη δραστηριότητα του ιστικού παράγοντα, σε αντίθεση με τα κορεσμένα λιπαρά οξέα που την ενισχύουν (Pérez-Jiménez et al., 2006). Επιπλέον, σε μελέτη αποδείχθηκε ότι η μεσογειακή διατροφή πλούσια σε ελαιόλαδο μπορεί να μειώσει τα επίπεδα του PAI-1, ενισχύοντας έτσι τη θρομβοπροστατευτική δράση της διατροφής (Lopez-Segura et al., 1996).

2.1.γ Αντικαρκινική δράση

Η υδροξυτυροσόλη (Hydroxytyrosol-HT) έχει βρεθεί ότι μειώνει την ικανότητα διατήρησης των ιδιοτήτων βλαστικότητας στα καρκινικά βλαστικά κύτταρα του μαστού, αναστέλλει την οδό Wnt/β-κατενίνης και καταστέλλει την επιθηλιακή προς μεσενχυματική μετάβαση (EMT) μέσω της αρνητικής ρύθμισης βασικών μεταγραφικών παραγόντων, όπως οι SLUG, SNAIL και ZEB1 (Melo Ferreira et al., 2025). Αυτή η δράση υποδηλώνει ότι η HT μπορεί να περιορίσει τη μετανάστευση, την εισβολή και το μεταστατικό δυναμικό των κυττάρων, ιδιαίτερα των τριπλά αρνητικών κυττάρων του καρκίνου του μαστού (TNBC) (Cruz-Lozano et al., 2019).

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η ολεοκανθάλη (Oleocanthal-OC) παρουσιάζει σημαντική αντικαρκινική δράση *in vivo*, περιορίζοντας το σχηματισμό και την ανάπτυξη όγκων σε θηλυκά γυμνά ποντίκια με ξενικά μοσχεύματα καρκινικών

κυττάρων, χωρίς να προκαλεί συστηματική τοξικότητα, γεγονός που αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα (Melo Ferreira et al., 2025). Η OC καταστέλλει τη μεταβαλλόμενη επιδερμική μετάβαση και αναστέλλει την ενεργοποίηση κρίσιμων υποδοχέων, όπως οι EGFR, HER2 και c-MET, περιορίζοντας τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και προάγοντας την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων (Melo Ferreira et al., 2025). Η ολεοκανθάλη επίσης αναστέλλει την ανάπτυξη των κυτταρικών σειρών καρκίνου του μαστού MCF-7, MDA-MB-231 και BT-474, χωρίς να επηρεάζει τα φυσιολογικά κύτταρα MCF10A (Akl et al., 2014). Η δράση της σχετίζεται με αναστολή της μετανάστευσης και της εισβολής των καρκινικών κυττάρων, καθώς και με παρεμπόδιση της μετάβασης του κυτταρικού κύκλου από τη φάση G1 στην S (Akl et al., 2014). Επιπλέον, η ολεοκανθάλη παρουσιάζει σημαντική αντιπολλαπλασιαστική δράση σε κυτταρικές σειρές ανθρώπινου μελανώματος (Antoniou & Hull, 2021).

Πολλές μελέτες δείχνουν ότι η ολευρωπεΐνη έχει αντικαρκινική δράση σε κύτταρα καρκίνου του μαστού (Antoniou & Hull, 2021). Η ολευρωπεΐνη αναστέλλει την ενεργοποίηση της ERK1/2 που προκαλείται από την οιστραδιόλη στα κύτταρα MCF-7, γεγονός σημαντικό επειδή η οιστραδιόλη προάγει την ανάπτυξη όγκων μέσω αυξημένου κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Sirianni et al., 2010). Επιπλέον, η ολευρωπεΐνη μειώνει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων MCF-7 και T47D, ενεργοποιώντας την αυτοφαγία και περιορίζοντας τη μετανάστευση και την εισβολή τους (Antoniou & Hull, 2021).

Σε κύτταρα καρκίνου του παχέος εντέρου, τα φαινολικά συστατικά του εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου αύξησαν την έκφραση του υποδοχέα κανναβινοειδών CB1 μειώνοντας τη μεθυλίωση του γονιδίου CNR1, με αποτέλεσμα τον περιορισμό του πολλαπλασιασμού των κυττάρων Caco-2 (Melo Ferreira et al., 2025). Αυτή η δράση επιβεβαιώθηκε και *in vivo* με τη χορήγηση συμπληρώματος EVOO (Di Francesco et al., 2015). Ακόμη το μεσλινικό οξύ (maslinic acid-MA) παρουσιάζει αντικαρκινική δράση σε κύτταρα καρκίνου του παχέος εντέρου, περιορίζοντας τη μετανάστευση, ρυθμίζοντας δείκτες μεταβαλλόμενης επιδερμικής μετάβασης (EMT) (Melo Ferreira et al., 2025).

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η απιγενίνη, ένα κοινό φλαβονοειδές που συναντάται στα προϊόντα της ελιάς, έχει αντιπολλαπλασιαστική δράση στην

κυτταρική σειρά HeLa του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας (Yang et al., 2018). Επιπλέον, οι Erdogan et al. διαπίστωσαν ότι η απιγενίνη μειώνει την επιβίωση και τη μετανάστευση βλαστικών κυττάρων καρκίνου του προστάτη, μέσω δράσης στα κύτταρα PC3 και στα καρκινικά βλαστικά κύτταρα (Erdogan et al., 2016).

Η βερβασκοσίδη, μια σημαντική φαινολική ένωση της ελιάς με κύρια παρουσία στα φύλλα, έχει δείξει αντικαρκινική δράση σε διάφορους τύπους καρκίνου στον άνθρωπο (Antoniou & Hull, 2021). Στον καρκίνο του παχέος εντέρου, προάγει την απόπτωση μέσω ρύθμισης μορίων όπως HIPK2, p53, HIF-1α και Rac-1. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει την ανάπτυξη όγκων και βελτιώνει την επιβίωση σε πειραματικά μοντέλα ποντικών (Hei et al., 2019).

Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται ενώσεις της ελιάς από διαφορετικές κατηγορίες με αποδεδειγμένη αντικαρκινική δράση, καθώς και οι καρκινικές κυτταρικές σειρές ή τα σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία επιδρούν.

Πίνακας 1: Αντικαρκινική δράση ενώσεων ελιάς (Melo Ferreira et al., 2025).

Συγκρ.	Καρκίνος	Υπάρχοντα	Μελέτη	Μοντέλο	Δόση
OC, αγλυκόνη λιγκοπροσιδής, παράγωγα TYR	Στήθος	Αντιπεριβατικό, αντιμεταναστευτικό, αντιπολλαπλασιαστικό, επιλεκτικό κυτταροτοξικό	In vitro, in silico	MDA-MB-231, MCF-10A	10-100 μM, 24-48 ώρες
HT, OL	Στήθος	Αντιπεριβατικό, αντιμεταναστευτικό, αντιπολλαπλασιαστικό		MDA-MB-231	0-150 μM, 24-48 ώρες
				MCF-7, T47D	
		Αντιπολλαπλασιαστικό, αποπτωτικό		HT-29	200-800 μM, 24-72 ώρες
HT, βουτανοϊκό HT, οκτανοϊκό και ολεϊκό	Παχύος εντέρου	Αντιπολλαπλασιαστικό	In vitro	HCT8-β8n	5-50 μM, 20-80 ώρες
HT, κατεχόλη, PA, PP, HPP, DHPP		Αντιπολλαπλασιαστικό, αποπτωτικό, κυτταροτοξικό		Caco-2, HT-29	100-200 μM, 8-48 ώρες
HT, TYR, OL, ελαϊκό οξύ	Γλοιοβλάστωμα	Αντιαγγειογενετικό, αντιφλεγμονώδες, αντιμεταναστευτικό		HBMEC, U-87	100 μM, 24 ώρες
HT, OL	Παγκρεατικός	Αντιπολλαπλασιαστική, αποπτωτική, επιλεκτική κυτταροτοξικότητα		ASPC-1, BxPC-3, CFPAC-1, HPDE, MIA PaCa-2	0-300 μM, 24-48 ώρες

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3ο : ΤΕΡΠΕΝΙΑ

3.1 Τερπένια

Τα τερπένια (terpenes), επίσης γνωστά ως τερπενοειδή (terpenoids), αποτελούν βασικά συστατικά των αιθέριων ελαίων (Essential Oils - EOs) και συνιστούν τη μεγαλύτερη και πιο ετερογενή κατηγορία φυσικών ενώσεων των φυτών (Xavier et al., 2023), καθώς παρουσιάζουν μεγάλη χημική ποικιλομορφία που προκύπτει από τη μετατροπή απλών πρόδρομων μορίων, όπως τα πρενυλικά διφωσφορικά (Jiang et al., 2016). Όλες αυτές οι ενώσεις έχουν ως βάση έναν υδρογονανθρακικό σκελετό, ο οποίος σχηματίζεται από αλυσίδες μονάδων πρενυλίου (C_5) διαφορετικού μήκους (Jiang et al., 2016). Όταν απομακρυνθεί η διφωσφορική ομάδα, δημιουργούνται ενδιάμεσα καρβοκατιόντα που μπορούν να οδηγήσουν, μέσω διαδοχικών αντιδράσεων, σε πολλά διαφορετικά μόρια, είτε γραμμικά είτε κυκλικά. Στη συνέχεια, αυτά τα μόρια μπορούν να τροποποιηθούν περαιτέρω με την προσθήκη διαφόρων ομάδων, όπως αλκοόλες, κετόνες, σάκχαρα ή λιπαρά οξέα (Jiang et al., 2016).

Ταξινομούνται με βάση τον αριθμό των ισοπρενικών μονάδων (isoprene units) σε μονοτερπένια (monoterpenes-C_{10}), σεσκιτερπένια (sesquiterpenes-C_{15}), διτερπένια (diterpenes-C_{20}) και τριτερπένια (triterpene-C_{30}) (Xavier et al., 2023).

Εξαιτίας αυτής της ποικιλίας, έχουν πολλές εφαρμογές, όπως σε αρώματα και βελτιωτικά γεύσης, σε λιπαντικά, στη γεωργία, στη φαρμακευτική και στη βιομηχανία (Jiang et al., 2016). Πλήθος μελετών έχει αναδείξει και το ευρύ φάσμα βιολογικών τους δράσεων, συμπεριλαμβανομένων αντιοξειδωτικών, αντικαρκινικών, αντιμικροβιακών, αντιφλεγμονωδών και άλλων φαρμακολογικών ιδιοτήτων (Xavier et al., 2023).

3.2 Δράσεις Τερπενίων

Τα τερπένια παρουσιάζουν σημαντική αντιοξειδωτική δράση, καθώς μπορούν να λειτουργούν είτε άμεσα, εξουδετερώνοντας ελεύθερες ρίζες, είτε έμμεσα, ενισχύοντας τους ενζυμικούς και μη ενζυμικούς μηχανισμούς άμυνας του οργανισμού. Χάρη σε αυτή τη διπλή τους λειτουργία, έχει διαπιστωθεί ότι

συμβάλλουν στην προστασία των κυττάρων απέναντι στο οξειδωτικό στρες, το οποίο σχετίζεται με την εμφάνιση και εξέλιξη διαφόρων παθολογικών καταστάσεων (Gonzalez-Burgos & Gomez-Serranillos, 2012).

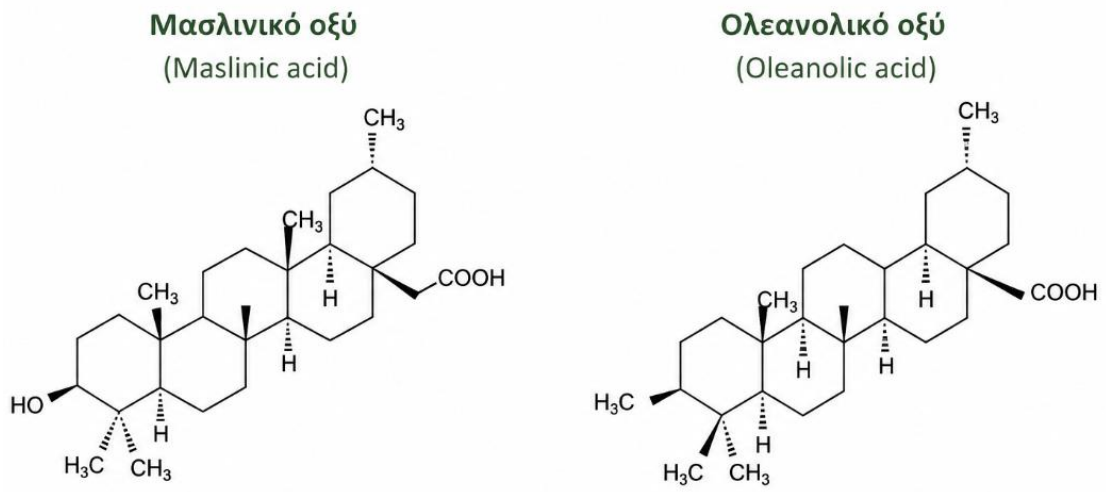
Τα αιθέρια έλαια έχουν παρουσιάσει αξιοσημείωτη αντικαρκινική δράση, η οποία εκδηλώνεται μέσω ποικίλων μηχανισμών, όπως η συμβολή τους στην πρόληψη της καρκινογένεσης, η άμεση επίδρασή τους σε ήδη υπάρχοντα καρκινικά κύτταρα και η αλληλεπίδρασή τους με το μικροπεριβάλλον του όγκου. Αν και οι ευεργετικές τους ιδιότητες είναι γνωστές από την αρχαιότητα μέσα από εμπειρικές παρατηρήσεις, σύγχρονες *in vitro* μελέτες έχουν επιβεβαιώσει την κυτταροτοξική τους δράση σε διαφορετικούς τύπους καρκινικών κυττάρων. Επιπλέον, φαίνεται ότι μπορούν να αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων χωρίς να επηρεάζουν τα υγιή, καθώς ενεργοποιούν συγκεκριμένους μοριακούς μηχανισμούς που οδηγούν σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (Mohamed Abdoul-Latif et al., 2023).

Τα τελευταία χρόνια, η επιστημονική έρευνα έχει αναδείξει τις σημαντικές αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες των φυσικών τερπενοειδών και των παραγώγων τους, τα οποία εμφανίζουν ιδιαίτερα ενθαρρυντικά αποτελέσματα τόσο σε προκλινικές όσο και σε κλινικές μελέτες σχετικές με φλεγμονώδεις παθήσεις. Η δράση τους αποδίδεται, μεταξύ άλλων, στην ικανότητά τους να περιορίζουν την έκφραση μορίων που ενεργοποιούνται από τον TNF-α, όπως το ICAM-1 και η επαγώγιμη συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου (inducible Nitric Oxide Synthase - iNOS), αναστέλλοντας έτσι την επακόλουθη παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (NO). Παράλληλα, ασκούν ισχυρή αντιφλεγμονώδη επίδραση μέσω της καταστολής της μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κB, γεγονός που οδηγεί στην περαιτέρω μείωση των επιπέδων της εν λόγω κυτταροκίνης (Ge et al., 2022).

3.3 Τριτερπενικά οξέα των φύλλων ελιάς: Ολεανολικό και Μασλινικό οξύ

Τα φύλλα της ελιάς (*Olea europaea*) αποτελούν σημαντική πηγή βιοδραστικών τερπενικών ενώσεων, με κυριότερους εκπροσώπους τα πεντακυκλικά τριτερπενικά οξέα μασλινικό και ολεανολικό οξύ. Το ολεανολικό οξύ είναι ευρέως διαδεδομένο στο φυτικό βασίλειο και ανήκει στην κατηγορία των oleanane-type τριτερπενίων, ενώ το μασλινικό οξύ, δομικά συγγενές, απαντά σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στην ελιά και θεωρείται χαρακτηριστικός δείκτης της φυτοχημικής της σύστασης (Mukhtar et

al., 2018). Και τα δύο μόρια παρουσιάζουν σημαντική βιολογική δραστικότητα, η οποία έχει τεκμηριωθεί κυρίως σε *in vitro* και προκλινικές μελέτες, συμπεριλαμβανομένων αντιοξειδωτικών, αντιφλεγμονωδών και ηπατοπροστατευτικών ιδιοτήτων (Lebedev et al., 2022). Επιπλέον, έχουν αναφερθεί πιθανές υπογλυκαιμικές δράσεις καθώς και αντικαρκινική δραστηριότητα μέσω μηχανισμών όπως η αναστολή του οξειδωτικού στρες, η ρύθμιση ενζυμικών συστημάτων και η τροποποίηση κυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών (Eddin et al., 2021). Η παρουσία τους, σε συνδυασμό με άλλες πολυφαινολικές ενώσεις των φύλλων ελιάς, συμβάλλει στη συνολική βιοδραστικότητα του εκχυλίσματος και εξηγεί το αυξανόμενο επιστημονικό ενδιαφέρον για τη μελέτη και αξιοποίησή τους σε φαρμακευτικές και διατροφικές εφαρμογές(Ibáñez et al., 2020).



Εικόνα 9: Χημική δομή του μασλινικού και του ολεανολικού οξέος

https://www.4elementsseeds.gr/terpenia-proelefsi-iamatikes-idiotites/ *(προσπέλαση 23.6.26)*

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4ο : ΑΘΗΡΟΘΡΟΜΒΩΣΗ

4.1 Εισαγωγή

Η αθηροσκλήρωση αποτελεί μια φλεγμονώδη νόσο των μεγάλων αρτηριών και θεωρείται η κύρια αιτία των καρδιαγγειακών νοσημάτων (Cardiovascular Disease - CVD) και των εγκεφαλικών επεισοδίων (Björkegren & Lusis, 2022). Ως εκ τούτου, η αθηροσκλήρωση αποτελεί τον πρωταρχικό παράγοντα που οδηγεί στην αυξημένη νοσηρότητα και θνησιμότητα παγκοσμίως (Rafieian-Kopaei et al., 2014). Η εμφάνισή της συνδέεται τόσο με παραδοσιακούς όσο και με μη παραδοσιακούς παράγοντες κινδύνου, οι οποίοι συντελούν στην παθογένειά της (Kong et al., 2022). Πρόκειται για μια πολύπλοκη διαδικασία σχηματισμού αθηρωματικής πλάκας, που περιλαμβάνει τη συσσώρευση διαφόρων κυττάρων, λιπιδίων και υπολειμμάτων ιστού στον έσω χιτώνα των αγγείων (Basatemur et al., 2019). Σήμερα, η αθηροσκλήρωση αναγνωρίζεται ευρέως ως μια χρόνια μορφή αγγειακής φλεγμονής (Soehnlein & Libby, 2021).

Ο όρος «αθηροσκλήρωση» έχει ελληνική προέλευση και περιγράφει την πάχυνση του έσω χιτώνα των αρτηριών εξαιτίας της συσσώρευσης λιπώδους υλικού, το οποίο εντοπίζεται στον κεντρικό πυρήνα της αθηρωματικής πλάκας και περιβάλλεται από ινώδες κάλυμμα (fibrous cap) (Rafieian-Kopaei et al., 2014). Ο όρος εμπεριέχει δύο επιμέρους έννοιες: την «αθηρωμάτωση», που αναφέρεται στη συγκέντρωση λιπιδίων και μακροφάγων, και τη «σκλήρυνση», η οποία αφορά τον σχηματισμό ινώδους ιστού που περιλαμβάνει λεία μυϊκά κύτταρα (Smooth Muscle Cells - SMC), λευκοκύτταρα και συνδετικό ιστό (Rafieian-Kopaei et al., 2014).

Παραδοσιακά, η αθηροσκλήρωση θεωρούνταν μια νόσος που οφείλεται κυρίως στη συσσώρευση χοληστερόλης εξαιτίας της κατακράτησης λιποπρωτεϊνών, ιδιαίτερα της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL), στον έσω χιτώνα των αρτηριών (Kong et al., 2022). Η LDL που προσλαμβάνεται από ειδικούς υποδοχείς προκαλεί τη συνεχή διείσδυση ανοσοκυττάρων στην αθηροσκληρωτική πλάκα, ενισχύοντας έτσι τη φλεγμονώδη διεργασία, ενώ η οξειδωμένη μορφή της LDL (ox-LDL, Oxidized Low-Density Lipoprotein), που σχηματίζεται είτε στο τοίχωμα του

αγγείου είτε κατά τη διάρκεια του αποπτωτικού θανάτου των κυττάρων, διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην πρόοδο της νόσου (Kong et al., 2022).

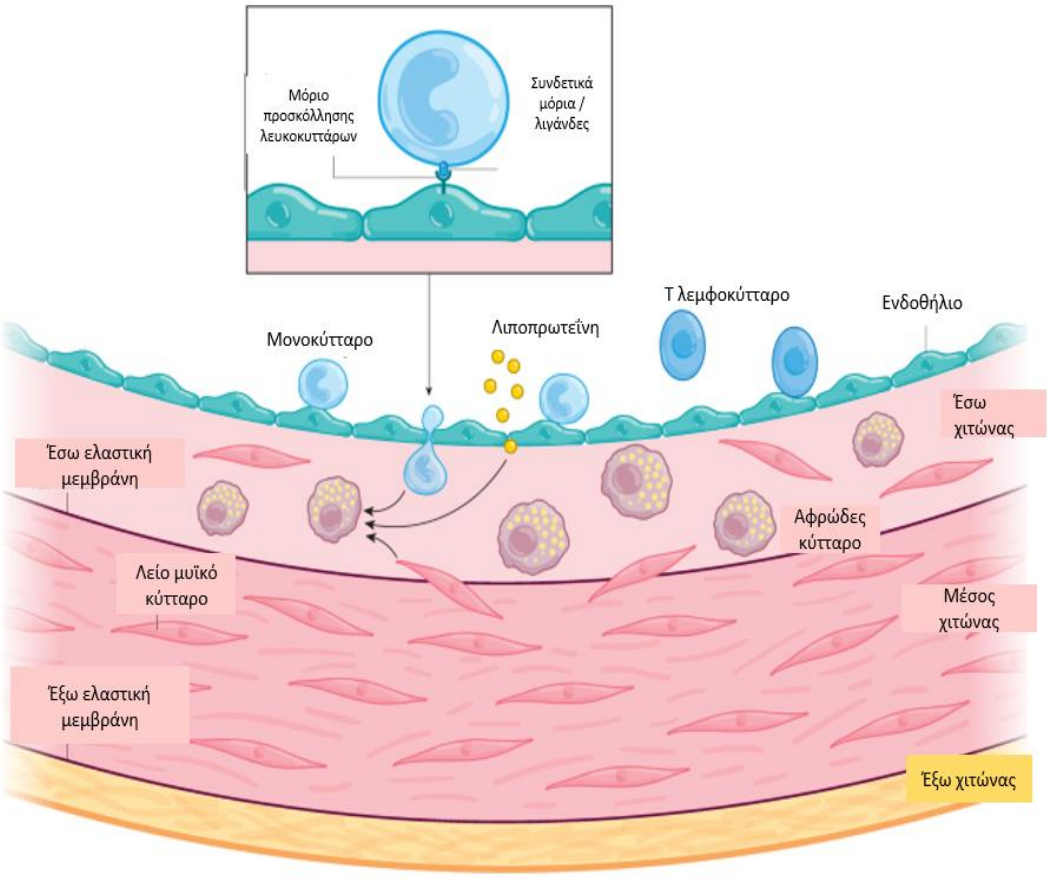
Η αθηροσκλήρωση αποτελεί την πιο συχνή μορφή καρδιαγγειακής νόσου (ΚΑΝ) και οφείλεται στη συσσώρευση και οξείδωση των λιπιδίων σε συνδυασμό με φλεγμονώδεις διεργασίες στα τοιχώματα των μεγάλων αρτηριών (Björkegren & Lusis, 2022) (Rafieian-Kopaei et al., 2014), οδηγώντας σε προοδευτική πάχυνση και σκλήρυνση τους (Ajoolabady et al., 2024) και τελικά, σε σοβαρές κλινικές εκδηλώσεις όπως το έμφραγμα του μυοκαρδίου (ΕΜ) και το εγκεφαλικό επεισόδιο (Björkegren & Lusis, 2022), (Rafieian-Kopaei et al., 2014).

Οι πλάκες αυτές περιέχουν λιπαρά οξέα, χοληστερόλη, ασβέστιο, ινώδες, κυτταρικά υπολείμματα και μεταβολικά προϊόντα, συμβάλλοντας στη στένωση του αρτηριακού αυλού και στον περιορισμό της ροής του αίματος (Ajoolabady et al., 2024). Η μειωμένη αιματική ροή μπορεί να προκαλέσει υποξία σε ζωτικά όργανα, όπως η καρδιά, ο εγκέφαλος, οι νεφροί και τα άκρα (Ajoolabady et al., 2024). Με την πάροδο του χρόνου, οι αθηρωματικές πλάκες καθίστανται ασταθείς και είναι πιθανό να υποστούν ρήξη, ενεργοποιώντας μηχανισμούς πήξης και σχηματισμό θρόμβου (Ajoolabady et al., 2024). Σε περίπτωση που αυτό συμβεί στις στεφανιαίες αρτηρίες, προκαλείται τοπικός θρόμβος ικανός να εμποδίσει πλήρως τη ροή του αίματος και να οδηγήσει σε έμφραγμα του μυοκαρδίου, ενώ εάν ο θρόμβος αποκολληθεί και μεταφερθεί μέσω της κυκλοφορίας, μπορεί να προκαλέσει εγκεφαλικό επεισόδιο (Björkegren & Lusis, 2022).

4.2 Παθοφυσιολογία της νόσου

Το τοίχωμα των αιμοφόρων αγγείων αποτελείται από τρία διακριτά στρώματα που συνεργάζονται για τη διατήρηση της αγγειακής ακεραιότητας και της ομαλής αιματικής ροής (Björkegren & Lusis, 2022). Το εσωτερικότερο στρώμα είναι η μονοστιβάδα ενδοθηλιακών κυττάρων (ΕΚ), γνωστή ως ενδοθήλιο, η οποία οριοθετεί τον αυλό του αγγείου. Λειτουργεί ως φραγμός μεταξύ του αίματος και των υποκείμενων ιστών, ρυθμίζοντας τη διαπερατότητα και την κυτταρική αλληλεπίδραση (Jebari-Benslaiman et al., 2022). Κάτω από τα ΕΚ βρίσκεται ο έσω χιτώνας, ένα λεπτό στρώμα πλούσιο σε γλυκοζαμινογλυκάνες και κολλαγόνο, το οποίο παρέχει μηχανική στήριξη και συμβάλλει στη ρύθμιση της ανταλλαγής ουσιών

μεταξύ του αίματος και των ιστών (Björkegren & Lusis, 2022 , Jebari-Benslaiman et al., 2022). Ακολουθεί ο μέσος χιτώνας, που αποτελείται κυρίως από λεία μυϊκά κύτταρα (ΛΜΚ), ελαστικές ίνες και κολλαγόνο. Το στρώμα αυτό προσδίδει ελαστικότητα και ικανότητα σύσπασης στο αγγείο, επιτρέποντας τη ρύθμιση της αγγειακής διαμέτρου και της ροής του αίματος (Jebari-Benslaiman et al., 2022). Το επιφανειακό στρώμα είναι ο έξω χιτώνας, ο οποίος αποτελείται κυρίως από πυκνό συνδετικό ιστό και εξασφαλίζει τη μηχανική προστασία και στήριξη του αγγείου στο περιβάλλον του (Jebari-Benslaiman et al., 2022). Παρότι η βασική αρχιτεκτονική είναι κοινή για όλα τα αιμοφόρα αγγεία, τα αρτηρίδια και τα φλεβίδια διαθέτουν σημαντικά λεπτότερο μέσο και έξω χιτώνα, ενώ στα μετατριχοειδή φλεβίδια απουσιάζουν εντελώς τα δύο αυτά στρώματα, αποτελούμενα αποκλειστικά από ενδοθηλιακά κύτταρα και μία βασική μεμβράνη (Jebari-Benslaiman et al., 2022) **(Εικόνα 10)**.



Εικόνα 10: Έναρξη αθηροσκλήρωσης (Libby, 2021).

Η αθηροσκλήρωση αρχίζει με τη συσσώρευση αθηρογόνων λιποπρωτεϊνών του πλάσματος, κυρίως των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL) και των υπολειμμάτων λιποπρωτεϊνών πλούσιων σε τριγλυκερίδια, στον έσω χιτώνα των αρτηριών (Björkegren & Lusis, 2022). Η παρατεταμένη παρουσία αυτών των λιποπρωτεϊνών οδηγεί σε ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων (EC), μέσω μηχανισμών που περιλαμβάνουν την οξείδωση των LDL και την παραγωγή προφλεγμονωδών λιπιδίων (Björkegren & Lusis, 2022), (Jebari-Benslaiman et al., 2022). Οι οξειδωμένες ή τροποποιημένες μορφές της LDL έχουν την ικανότητα να προσκολλώνται στα συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας, όπως οι πρωτεογλυκάνες, με αποτέλεσμα να παγιδεύονται στο εσωτερικό του αγγειακού τοιχώματος (Rafieian-Kopaei et al., 2014). Η παρουσία αυτών των τροποποιημένων λιποπρωτεϊνών προκαλεί τη στρατολόγηση μονοκυττάρων από την κυκλοφορία, τα οποία προσκολλώνται στο ενεργοποιημένο ενδοθήλιο και διεισδύουν στον έσω χιτώνα, όπου διαφοροποιούνται σε μακροφάγα (Jebari-Benslaiman et al., 2022). Τα μακροφάγα και τα λεία μυϊκά κύτταρα (VSMC) προσλαμβάνουν τις οξειδωμένες LDL μέσω ειδικών υποδοχέων, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση εστέρων χοληστερόλης στο εσωτερικό τους και το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων (Björkegren & Lusis, 2022 , Jebari-Benslaiman et al., 2022). Η συσσώρευση αυτών των κυττάρων, σε συνδυασμό με την ενεργοποίηση φλεγμονωδών οδών σηματοδότησης, οδηγεί στο σχηματισμό των λιπαρών γραμμώσεων (fatty streak formation), που αποτελούν το πρώιμο και χαρακτηριστικό στάδιο της αθηροσκληρωτικής διαδικασίας (Jebari-Benslaiman et al., 2022).

Πειραματικές και κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι οι λιπαρές ραβδώσεις αποτελούν το πρώιμο και χαρακτηριστικό στάδιο της αθηροσκλήρωσης, υποδηλώνοντας την έναρξη της αθηρωματικής διαδικασίας (Tavafi, 2013). Οι αρχικές αλλοιώσεις αποδίδονται κυρίως στη συσσώρευση λιποπρωτεϊνών στον έσω χιτώνα των αρτηριών, προκαλώντας τοπικές δομικές μεταβολές και την ενεργοποίηση φλεγμονωδών μηχανισμών (Tavafi, 2013). Κατά τα αρχικά στάδια σχηματισμού της αθηρωματικής πλάκας, η ανάπτυξή της τείνει να κατευθύνεται προς το εξωτερικό τοίχωμα του αγγείου, καθώς τα αγγεία παρουσιάζουν ικανότητα διαστολής για τη διατήρηση του εύρους τους και της ροής του αίματος (Rafieian-Kopaei et al., 2014). Η πρώιμη λιπαρή γράμμωση χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση αφρωδών

κυττάρων, εξωκυττάριων λιπιδίων και περιορισμένο αριθμό αιμοπεταλίων, στοιχεία που σηματοδοτούν την απαρχή της αθηροσκληρωτικής διεργασίας (Rafieian-Kopaei et al., 2014).

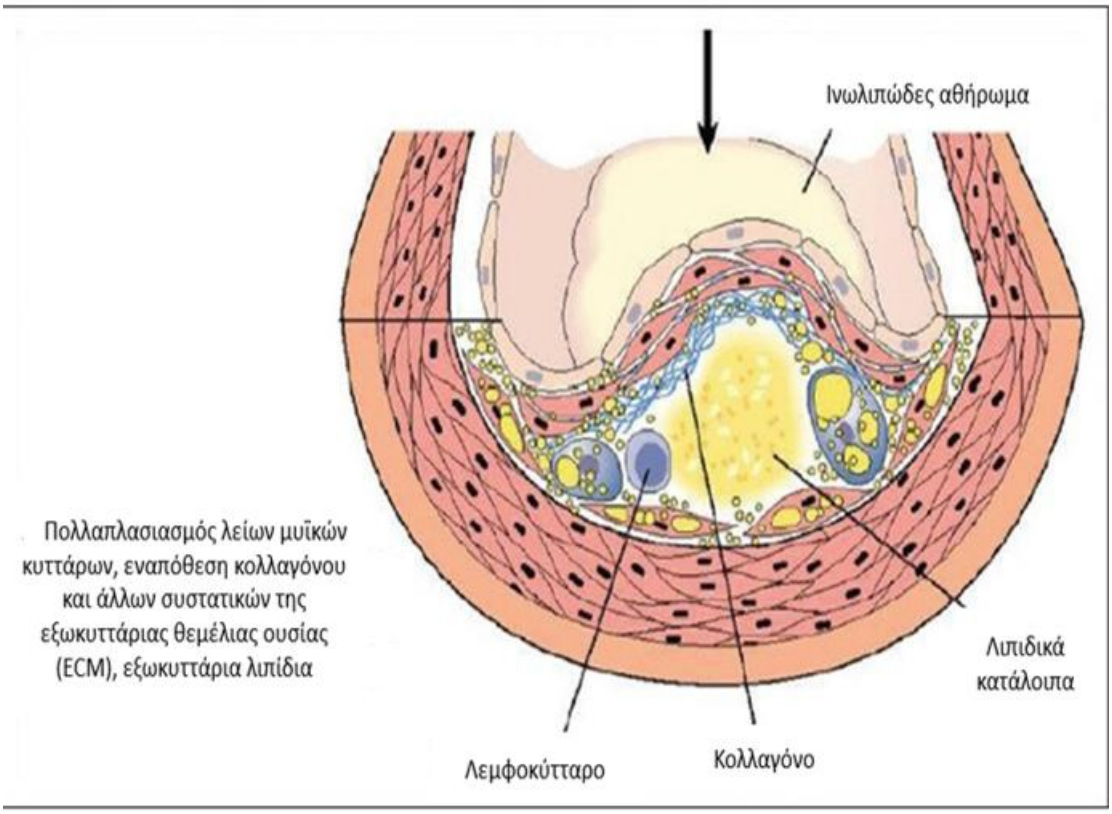
Ο σχηματισμός λιπαρών ραβδώσεων εξελίσσεται σε τέσσερα στάδια. Το πρώτο βήμα της αθηρογένεσης συνίσταται στην παγίδευση των λιποπρωτεϊνών στον έσω χιτώνα του αγγείου (Rafieian-Kopaei et al., 2014) **(Εικόνα 11)**. Η αύξηση της LDL στο αίμα διαταράσσει την ισορροπία μεταξύ πλάσματος και αρτηριακού τοιχώματος, οδηγώντας σε παγίδευση των σωματιδίων στον έσω χιτώνα (Tavafi, 2013). Η δέσμευσή τους από πρωτεογλυκάνες αυξάνει τη συγκέντρωση και τον χρόνο παραμονής τους στο ενδοθήλιο (Tavafi, 2013). Αυτό ευνοεί την οξείδωση της LDL, γεγονός που συμβάλλει στην έναρξη και εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης (Tavafi, 2013). Στη συνέχεια οι κυτοκίνες και τα οξειδωμένα λιπίδια ενεργοποιούν τα ενδοθηλιακά κύτταρα, διευκολύνοντας τη διείσδυση μονοκυττάρων και Τ λεμφοκυττάρων στα πρώιμα στάδια της αθηροσκλήρωσης (Rafieian-Kopaei et al., 2014). Η οξείδωση της LDL (ox-LDL) προκαλεί την παραγωγή μορίων προσκόλλησης, τα οποία ενισχύουν την κυτταρική αλληλεπίδραση και τη φλεγμονή (Blankenberg et al., 2003). Τα μονοκύτταρα διαφοροποιούνται σε μακροφάγα και προσλαμβάνουν οξειδωμένα λιπίδια, σχηματίζοντας αφρώδη κύτταρα (Burke-Gaffney et al., 2002). Η ox-LDL διεγείρει τα Τ κύτταρα και συμβάλλει στην έκκριση κυτοκινών που ενεργοποιούν μακροφάγα και τροποποιούν το ενδοθήλιο και τα λεία μυϊκά κύτταρα (Rafieian-Kopaei et al., 2014). Έπειτα λαμβάνει χώρα η ενεργοποίηση των λευκοκυττάρων, κατά την οποία τα μονοκύτταρα και τα Τ κύτταρα διεισδύουν στο ενδοθήλιο μέσω της ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB, ο οποίος προάγει την έκφραση μορίων προσκόλλησης και χημειοκινών (Rafieian-Kopaei et al., 2014). Τα ενδοθηλιακά κύτταρα παράγουν μόρια προσκόλλησης που επιτρέπουν την προσκόλληση και μετανάστευση λευκοκυττάρων προς τη βλάβη (Rafieian-Kopaei et al., 2014). Οι χημειοκίνες, όπως η MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1/Μονοκυτταρική Χημειοελκτική Πρωτεΐνη-1), καθοδηγούν τη μετανάστευση μονοκυττάρων στα αγγειακά τοιχώματα και εκφράζονται έντονα σε όλη την εξέλιξη της νόσου (Rafieian-Kopaei, 2013). Η ox-LDL συμβάλλει στην επαγωγή της έκφρασης των μορίων προσκόλλησης και του mRNA της MCP-1, μέσω της δράσης της λυσοφωσφατιδυλοχολίνης (Lyso-PC) (Rafieian-Kopaei et al., 2014). Το τελευταίο

βήμα για το πρώιμο στάδιο της νόσου χαρακτηρίζεται από το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων (Rafieian-Kopaei et al., 2014). Τα μονοκύτταρα μετατρέπονται σε μακροφάγα στον έσω χιτώνα, όπου φαγοκυτταρώνουν λιπίδια συμβάλλοντας αρχικά στην απομάκρυνσή τους από το αρτηριακό τοίχωμα (Rafieian-Kopaei, 2013). Όταν η εισροή λιπιδίων υπερβαίνει την απομάκρυνσή τους, επέρχεται συσσώρευση και σχηματισμός αθηρώματος (Rafieian-Kopaei, 2013). Η πρόσληψη ox-LDL από μακροφάγα μέσω ειδικών υποδοχέων οδηγεί στο σχηματισμό αφρωδών κυττάρων (Nayer, 2013). Τα φωσφολιπίδια της ox-LDL διαδραματίζουν ρόλο στη δέσμευσή της από τους υποδοχείς, προκαλώντας τη δημιουργία λιπιδικών ραβδώσεων (Ross, 1993). Ο κυτταρικός θάνατος των αφρωδών κυττάρων και η παραγωγή προφλεγμονωδών και οξειδωτικών ουσιών ενισχύουν τη νεκρωτική εκφύλιση και την εξέλιξη της πλάκας (Rafieian-Kopaei et al., 2014).

Η αθηροσκλήρωση μπορεί να εξελιχθεί σε αθηροθρόμβωση όταν μια αθηρωματική πλάκα καταστεί ασταθής και υποστεί ρήξη. Η έκθεση των θρομβογόνων συστατικών της πλάκας στο αίμα ενεργοποιεί τα αιμοπετάλια και τον μηχανισμό της πήξης, οδηγώντας στον σχηματισμό θρόμβου. Ο θρόμβος που δημιουργείται μπορεί να προκαλέσει σημαντική στένωση ή πλήρη απόφραξη του αγγείου, αυξάνοντας τον κίνδυνο εμφάνισης οξέων καρδιαγγειακών επεισοδίων, όπως το έμφραγμα του μυοκαρδίου και το ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο (Rafieian-Kopaei et al., 2014).

Η εξέλιξη της αθηροθρόμβωσης συνεχίζεται μετά το σχηματισμό των λιπαρών γραμμώσεων, με την εμφάνιση του αθηρώματος. Οι κυτοκίνες και οι αυξητικοί παράγοντες, όπως η IL-1 και ο TNF-α, διεγείρουν τη μετανάστευση των λείων μυϊκών κυττάρων προς το ενδοθήλιο, οδηγώντας στο σχηματισμό ινώδους καλύμματος πλούσιου σε κολλαγόνο και φλεγμονώδη κύτταρα (Steinbrecher et al., 1984). Το κάλυμμα αυτό αποτελεί χαρακτηριστικό της ώριμης αθηροσκληρωτικής πλάκας, η οποία περιορίζει τη ροή του αίματος (Steinbrecher et al., 1984).Τα μακροφάγα και τα Τ λεμφοκύτταρα συμβάλλουν στην αποδόμηση της εξωκυττάριας μήτρας μέσω μεταλλοπρωτεϊνασών (MMPs), καθώς και στην αναστολή της σύνθεσης κολλαγόνου (Steinbrecher et al., 1984). Αυτές οι διεργασίες αποδυναμώνουν το ινώδες κάλυμμα, καθιστώντας το επιρρεπές σε ρήξη (Steinbrecher et al., 1984). Η ρήξη εκθέτει το κολλαγόνο και τα λιπίδια στο αίμα, προκαλώντας ενεργοποίηση αιμοπεταλίων και

σχηματισμό θρόμβου που μπορεί να αποφράξει την κυκλοφορία (Steinbrecher et al., 1984).



Εικόνα 11: Σχηματισμός αθηρώματος (Rafieian-Kopaei et al., 2014).

Τελικά σχηματίζεται η αθηροσκληρωτική πλάκα, η οποία αποτελείται από ποικίλα κυτταρικά και μη κυτταρικά στοιχεία που συμβάλλουν στη δομή και εξέλιξή της (Rafieian-Kopaei et al., 2014). Το αγγειακό ενδοθήλιο ρυθμίζει την ανταλλαγή μακρομορίων και πρωτεϊνών μεταξύ αίματος και αγγειακού τοιχώματος, επηρεάζοντας τη διαπερατότητα και τη φλεγμονώδη απόκριση (Rafieian-Kopaei et al., 2014). Τα λεία μυϊκά κύτταρα διαδραματίζουν ρόλο στην αναδόμηση του αγγειακού τοιχώματος, στο μεταβολισμό των λιπιδίων και στην έκκριση κυτοκινών που ρυθμίζουν τον αγγειακό τόνο (Rafieian-Kopaei et al., 2014). Τα λεμφοκύτταρα συμμετέχουν σε ανοσολογικές διεργασίες που ενισχύουν τη φλεγμονή εντός της βλάβης (Rafieian-Kopaei et al., 2014). Ο πυρήνας της πλάκας περιλαμβάνει αφρώδη κύτταρα, ασβέστιο, εστέρες χοληστερόλης και λιπώδη μάζα, η οποία προσδίδει στην πλάκα χαρακτηριστικό ωχροκίτρινο χρώμα λόγω των καροτενοειδών χρωστικών (Rafieian-Kopaei et al., 2014).

4.3 Σταθερότητα και ρήξη πλάκας

Τα οξέα καρδιαγγειακά συμβάντα, όπως το έμφραγμα του μυοκαρδίου και το ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο, αποτελούν συνήθως συνέπειες της θρόμβωσης που προκαλείται από τη ρήξη αθηροσκληρωτικών πλακών (Libby, 2021). Η ρήξη του ινώδους καλύμματος μιας πλάκας, εκθέτει το αίμα και τους παράγοντες πήξης σε θρομβογόνες ουσίες, όπως ο ιστικός παράγοντας (TF). Αυτή η διαδικασία ενεργοποιεί το μηχανισμό της οξείας θρόμβωσης, οδηγώντας στη δημιουργία θρόμβου που μπορεί να αποφράξει πλήρως το αγγείο (Libby, 2013).

Οι αθηρωματικές πλάκες τείνουν να σχηματίζονται σε σημεία όπου τα αγγεία διακλαδίζονται, επειδή εκεί η ροή του αίματος γίνεται πιο αργή και στροβιλώδης, με αποτέλεσμα η διατμητική τάση στο τοίχωμα (Wall Shear Stress – WSS) να είναι χαμηλή. Οι περιοχές χαμηλού WSS προκαλούν ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, ευνοώντας τη συσσώρευση λιπιδίων και φλεγμονωδών κυττάρων, γεγονός που οδηγεί στην ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας (Jebari-Benslaiman et al., 2022).

Αρχικά, το αγγείο αντιδρά στη δημιουργία της πλάκας μέσω εξωτερικής αναδιαμόρφωσης, δηλαδή με τη διαστολή του τοιχώματος προς τα έξω, ώστε να διατηρηθεί ο φυσιολογικός αυλός και η ροή του αίματος. Ωστόσο, αυτή η προσαρμοστική αντίδραση παρατείνει τις συνθήκες χαμηλού WSS, ενισχύοντας τη συνεχή και άνιση (έκκεντρη) ανάπτυξη της πλάκας (Jebari-Benslaiman et al., 2022).

Οι έκκεντρες πλάκες υφίστανται αυξημένες μηχανικές τάσεις, καθιστώντας τις περισσότερο επιρρεπείς σε ρήξη (Slager et al., 2005). Οι ευάλωτες πλάκες χαρακτηρίζονται από λεπτό ινώδες κάλυμμα και έντονη φλεγμονώδη δραστηριότητα. Η διαρκής έκθεση του ενδοθηλίου στο προαθηρογόνο περιβάλλον αποδυναμώνει τη δομή της πλάκας, αυξάνοντας την πιθανότητα ρήξης και σχηματισμού θρόμβου, γεγονός που μπορεί να προκαλέσει οξύ στεφανιαίο ή εγκεφαλικό επεισόδιο (Stefanadis et al., 2017).

Όταν μια αθηρωματική πλάκα ραγίσει ή σπάσει, ο εσωτερικός της χώρος έρχεται σε άμεση επαφή με το αίμα, προκαλώντας την ενεργοποίηση του μηχανισμού πήξης ώστε να επιδιορθωθεί η βλάβη (Bentzon et al., 2014). Τα αιμοπετάλια προσκολλώνται και ενεργοποιούνται στο εκτεθειμένο κολλαγόνο του τοιχώματος του αγγείου, ενώ στη συνέχεια προσελκύουν επιπλέον αιμοπετάλια που συσσωματώνονται, σχηματίζοντας το αρχικό στρώμα επούλωσης (Yun et al., 2016).

Παράλληλα, ο καταρράκτης της πήξης ενεργοποιείται μέσω ουσιών που απελευθερώνονται από τον πυρήνα της πλάκας, οι οποίες έχουν θρομβογόνο δράση, και έρχονται σε επαφή με τους παράγοντες πήξης του αίματος (Badimon et al., 2012). Ο ιστικός παράγοντας (Tissue Factor, TF) αντιδρά με τον παράγοντα VII (FVII) του πλάσματος, προκαλώντας την παραγωγή θρομβίνης, η οποία με τη σειρά της συμβάλλει στη δημιουργία ινώδους, αδιάλυτη πρωτεΐνη που σχηματίζει πλέγμα ινών, το οποίο, σε συνδυασμό με τα αιμοπετάλια, σταθεροποιεί τη βλάβη και δημιουργεί τον τελικό θρόμβο (Jebari-Benslaiman et al., 2022).

Παρόλο που η διαδικασία αυτή αποσκοπεί στην επούλωση του αγγείου, μπορεί παράλληλα να οδηγήσει σε υπερπλασία του έσω χιτώνα του αγγείου. Αυτό συμβαίνει καθώς τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια απελευθερώνουν αυξητικούς παράγοντες (π.χ. TGF-β) οι οποίοι διεγείρουν την παραγωγή κολλαγόνου και συμβάλλουν στην πάχυνση της ινώδους κάψας (Grainger et al., 1995). Ως αποτέλεσμα, η αθηροσκληρωτική βλάβη μπορεί να επεκταθεί και ο αυλός του αγγείου να μειωθεί, χωρίς ωστόσο απαραίτητα να υπάρχει και κλινική επιπλοκή (Grainger et al., 1995).

Η δημιουργία θρόμβου κάνει τη βλάβη του αγγείου πιο σταθερή και λιγότερο πιθανή να σπάσει, όμως αυξάνει τον κίνδυνο να φράξει το αγγείο και να μειωθεί η ροή του αίματος, προκαλώντας ισχαιμία και καρδιαγγειακά προβλήματα (Jebari-Benslaiman et al., 2022). Αν η απόφραξη είναι πλήρης, μπορεί να προκληθεί έμφραγμα του μυοκαρδίου ή εγκεφαλικό επεισόδιο, ενώ αν ο θρόμβος αποκολληθεί και κινηθεί στο αίμα, μπορεί να φράξει άλλα αγγεία προκαλώντας τοπική ισχαιμία ή βλάβη οργάνων (Jebari-Benslaiman et al., 2022). Ωστόσο, αν η φλεγμονή περιοριστεί, η πλάκα μπορεί να σταθεροποιηθεί και να διατηρηθεί ικανοποιητική ροή αίματος (Jebari-Benslaiman et al., 2022).

4.4 Παράγοντες κινδύνου

Η αθηροσκλήρωση είναι μια πολύπλοκη και πολυπαραγοντική νόσος που επηρεάζεται από πλήθος παραγόντων κινδύνου διαφορετικής φύσης (Gusev & Sarapultsev, 2023). Μεταξύ αυτών, σημαντικό ρόλο παίζουν οι προφλεγμονώδεις διεργασίες και οι μεταβολικές διαταραχές, οι οποίες σχετίζονται με την παχυσαρκία, το μεταβολικό σύνδρομο και τον διαβήτη τύπου 2, καθώς αποτελούν εκδηλώσεις χρόνιας φλεγμονής χαμηλού βαθμού (López-Acosta et al., 2023). Η επίμονη αυτή

φλεγμονή θεωρείται βασικός μηχανισμός στην παθογένεση πολλών ασθενειών που σχετίζονται με την ηλικία, όπως η υπέρταση και η αθηροσκλήρωση (Fülöp et al., 2019). Επιπλέον, γενετικοί πολυμορφισμοί και επιγενετικοί μηχανισμοί επηρεάζουν την προδιάθεση για τη φύση της νόσου (Gusev & Sarapultsev, 2023), ενώ οικογενείς μορφές πρώιμης αθηροσκλήρωσης συνδέονται με διαταραχές στο μεταβολισμό της χοληστερόλης (Di Taranto et al., 2020). Οι ορμονικές διαφορές μεταξύ των φύλων επηρεάζουν επίσης τον κίνδυνο, με τα οιστρογόνα να παρέχουν προστατευτική δράση στις γυναίκες κάτω των 70 ετών (Padro et al., 2021). Παράγοντες τρόπου ζωής, όπως το κάπνισμα, η ανθυγιεινή διατροφή, το άγχος και η ατμοσφαιρική ρύπανση, ενισχύουν περαιτέρω την αθηρογένεση (Padro et al., 2021). Οι διαταραχές της εντερικής μικροχλωρίδας και η αυξημένη διαπερατότητα του εντέρου για τοξικά προϊόντα συμβάλλουν στην πρόοδο της νόσου (Qian et al., 2022). Επιπλέον, ορισμένες λοιμώξεις μπορούν να δράσουν ως επιβαρυντικοί παράγοντες (Hidi et al., 2022), ενώ ανατομικές ιδιαιτερότητες, όπως η στροβιλώδης ροή στις διακλαδώσεις των αρτηριών, διευκολύνουν την εναπόθεση LDL και τη δημιουργία αθηρωματικών βλαβών (Gusev & Sarapultsev, 2023). Τέλος, η αρτηριακή υπέρταση, μέσω της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας, αποτελεί το σημαντικότερο τροποποιήσιμο παράγοντα κινδύνου για αθηροσκλήρωση (Gusev & Sarapultsev, 2023).

4.5 Φλεγμονή και αθηροσκλήρωση

Η αθηροσκλήρωση αναγνωρίζεται σήμερα ως μια χρόνια φλεγμονώδης νόσος των ελαστικών και μυϊκών αρτηριών (elastic and muscular arteries) (Gusev & Sarapultsev, 2023), στην οποία συμμετέχουν πολλαπλές φλεγμονώδεις διεργασίες σε όλα τα στάδια της εξέλιξής της (Ridker et al., 2012). Παρότι η φλεγμονή αποτελεί κεντρικό στοιχείο της παθολογίας, ο όρος περιλαμβάνει ετερογενείς μηχανισμούς, γεγονός που καθιστά αναγκαίο τον σαφή προσδιορισμό των φλεγμονωδών αντιδράσεων που σχετίζονται ειδικά με την αθηροσκλήρωση (Gusev & Sarapultsev, 2023). Στα πρώιμα στάδια της νόσου, παρατηρείται τοπική ενδοθηλιακή ενεργοποίηση και χαμηλού βαθμού συστηματική φλεγμονή, που αποτελούν τα αρχικά γεγονότα της παθογένεσης (Gusev & Sarapultsev, 2023).

Η φλεγμονή συμβάλλει τόσο στην έναρξη όσο και στην πρόοδο του σχηματισμού της αθηροσκληρωτικής πλάκας, προκαλώντας αλλοιώσεις στα ενδοθηλιακά κύτταρα

(Zhu et al., 2018). Όταν αυτά ενεργοποιούνται, εκφράζουν χημειοκίνες και μόρια προσκόλλησης, όπως MCP-1, IL-8, ICAM-1, VCAM-1, E- και P-σελεκτίνη, τα οποία προσελκύουν μονοκύτταρα και λεμφοκύτταρα στο αγγειακό τοίχωμα, ενεργοποιώντας την τοπική φλεγμονώδη διεργασία (Chistiakov et al., 2018). Στη διαδικασία εμπλέκονται ποικίλα κύτταρα του ανοσοποιητικού, όπως μακροφάγα, Τ και Β λεμφοκύτταρα, δενδριτικά κύτταρα, ενδοθηλιακά και λεία μυϊκά κύτταρα, καθώς και κυτοκίνες και παράγοντες όπως ο TNF-α (Zhu et al., 2018).

Η συσσώρευση και ο οξειδωτικός μετασχηματισμός της LDL οδηγεί στη δημιουργία της οξειδωμένης μορφής της (ox-LDL), η οποία συμβάλλει καθοριστικά στη φλεγμονή και στη δημιουργία της αθηροσκληρωτικής πλάκας (Chistiakov et al., 2018). Τα προφλεγμονώδη μονοκύτταρα συγκεντρώνονται στις περιοχές της πλάκας και προσκολλώνται στα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα, ενισχύοντας τη φλεγμονώδη αντίδραση (Swirski et al., 2016). Η συνεχής παρουσία προφλεγμονωδών σημάτων όχι μόνο επιτείνει τη φλεγμονή, αλλά και εμποδίζει την αναγέννηση των δομικών συστατικών που προσδίδουν σταθερότητα στον ιστό (Zhu et al., 2018).

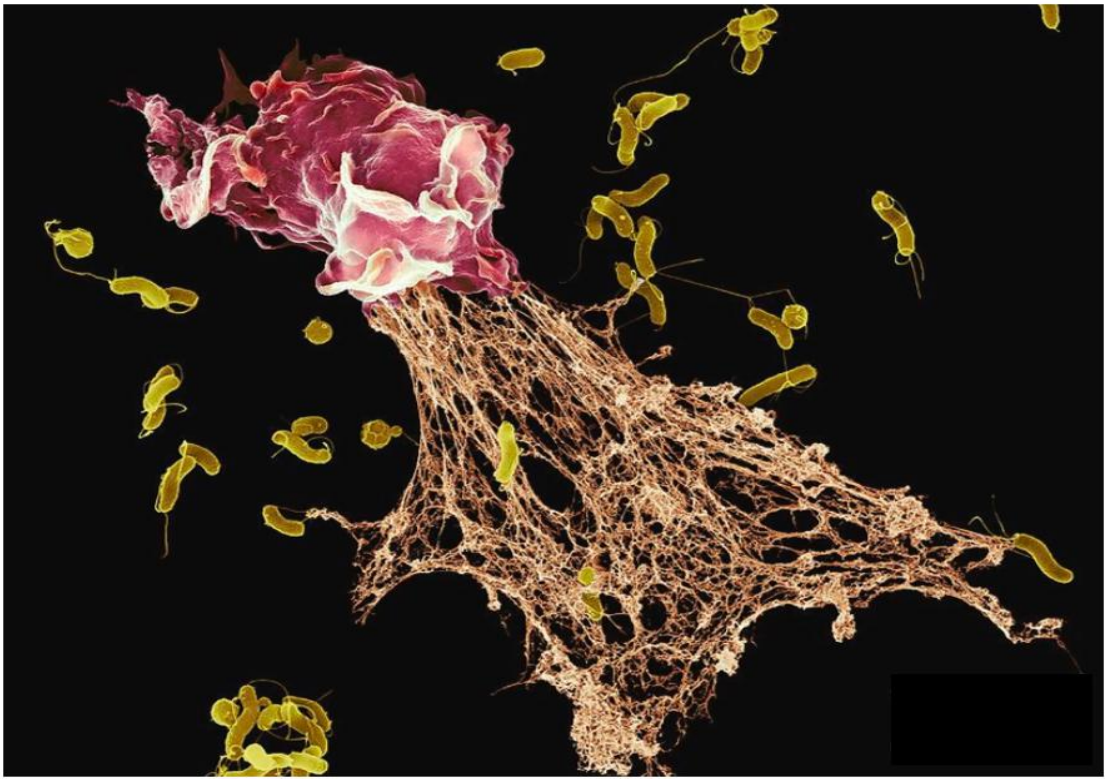
Τα ενδοθηλιακά και ανοσολογικά κύτταρα απελευθερώνουν ποικίλες φλεγμονώδεις ουσίες, όπως κυτοκίνες, χημειοκίνες, λιπιδικούς μεσολαβητές και μόρια προσκόλλησης, που συντηρούν τη φλεγμονώδη κατάσταση και προάγουν την ανάπτυξη της βλάβης (Chistiakov et al., 2018). Η oxLDL επιδρά άμεσα στα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα μακροφάγα, προκαλώντας ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και στρατολόγηση λευκοκυττάρων (Jebari-Benslaiman et al., 2022). Επιπλέον, μέσω του υποδοχέα CD36, η oxLDL ενεργοποιεί το φλεγμονόσωμα NLRP3, οδηγώντας σε παραγωγή της κυτοκίνης IL-1β, ενώ η δημιουργία ανοσοσυμπλόκων oxLDL–αντισώματος διεγείρει μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα να παράγουν επιπλέον φλεγμονώδεις ουσίες και αφρώδη κύτταρα μέσω του υποδοχέα FcγRI (Fragment crystallizable gamma Receptor I) (Jebari-Benslaiman et al., 2022).

4.6 NETs (Neutrophil Extracellular Traps) και αθηροσκλήρωση

Τα NETs (neutrophil extracellular traps - εξωκυττάριες παγίδες ουδετερόφιλων) αποτελούν δομές με μορφή δικτύου που εκκρίνονται από τα ουδετερόφιλα έπειτα από ενεργοποίησή τους από ποικίλα ερεθίσματα, μέσω μιας ειδικής διαδικασίας που ονομάζεται NETosis **(Εικόνα 12)**. Αποτελούνται κυρίως από αποσυμπυκνωμένη

πυρηνική, και σε ορισμένες περιπτώσεις μιτοχονδριακή, χρωματίνη, η οποία εκτείνεται υπό τη μορφή ινών DNA κατόπιν της ενεργοποίησης εξειδικευμένων κυτταροπλασματικών ενζύμων. Στο πλέγμα αυτό ενσωματώνονται πρωτεΐνες των κοκκίων των ουδετερόφιλων, όπως η μυελοϋπεροξειδάση (Myeloperoxidase - MPO), η ελαστάση (Neutrophil Elastase – NE) και άλλες πρωτεάσες, καθώς και πρωτεΐνες του εξωκυττάριου περιβάλλοντος, συμπεριλαμβανομένου του ιστικού παράγοντα. Ο συνδυασμός αυτών των συστατικών προσδίδει στα NETs έντονη αντιμικροβιακή και κυτταροτοξική δράση. Η σύστασή τους εμφανίζει ετερογένεια, γεγονός που αντανακλά τη διαφορετική προέλευση των ουδετερόφιλων, ενώ η τελική δομή καταλαμβάνει όγκο σημαντικά μεγαλύτερο από εκείνον του αρχικού κυττάρου (Adamidis et al., 2024).

Τα ουδετερόφιλα και οι εξωκυττάριες παγίδες τους (NETs) διαδραματίζουν καίριο ρόλο σε όλα τα στάδια της αθηροσκληρωτικής διαδικασίας, από την έναρξη έως τις θρομβωτικές επιπλοκές. Η παρουσία NETs εντοπίζεται κυρίως σε περίπλοκες και ασταθείς αθηροσκληρωτικές πλάκες, όπου συμβάλλουν στην ενίσχυση της τοπικής φλεγμονής και στην αποσταθεροποίηση της πλάκας. Τα ενεργοποιημένα λεία μυϊκά κύτταρα προσελκύουν ουδετερόφιλα μέσω χημειοκινών και οξειδωτικού στρες, προάγοντας την NETosis, ενώ τα ίδια τα NETs ασκούν κυτταροτοξική δράση στα λεία μυϊκά κύτταρα, κυρίως μέσω ιστονών, οδηγώντας σε λέπτυνση του ινώδους καλύμματος. Παράλληλα, τα NETs ενισχύουν τη διακυτταρική επικοινωνία μεταξύ μακροφάγων, Τ-κυττάρων και ουδετερόφιλων μέσω αυξημένης παραγωγής προφλεγμονωδών κυτοκινών, όπως η IL-1β, δημιουργώντας έναν φλεγμονώδη κύκλο. Συνολικά, τα δεδομένα υποστηρίζουν ότι τα NETs αποτελούν κρίσιμο μηχανισμό που συνδέει τη φλεγμονή με την αστάθεια της αθηροσκληρωτικής πλάκας και την εμφάνιση οξέων καρδιαγγειακών συμβάντων (Adamidis et al., 2024).



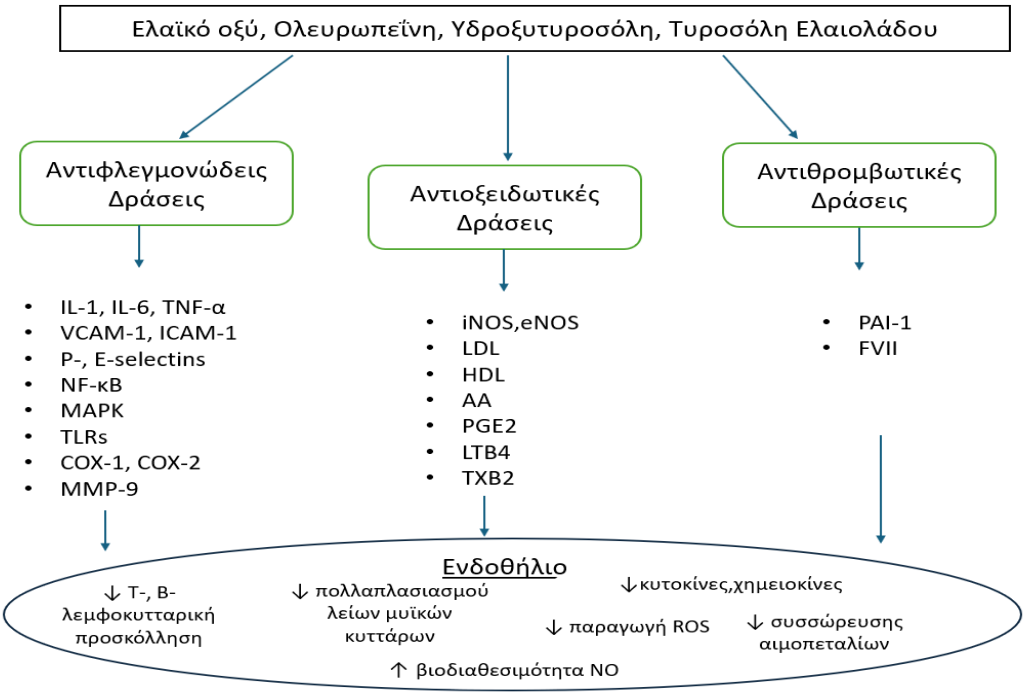
Εικόνα 12: Εξωκυττάριες παγίδες ουδετερόφιλων, *Sciencephoto-https://sciencephotogallery.com/featured/2-neutrophil-extracellular-trap-science-photo-library.html (προσπέλαση 20.3.26).*

4.7 Αθηροσκλήρωση & ελιά

Κλινικές μελέτες δείχνουν ότι η κατανάλωση εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου (EVOO) συνδέεται με ευεργετικές επιδράσεις στο καρδιαγγειακό σύστημα, ενώ πλήθος ερευνών υποστηρίζει τις αντιαθηροσκληρωτικές του ιδιότητες (Christodoulou et al., 2024). Οι δράσεις αυτές αποδίδονται σε μεγάλο βαθμό στις φαινολικές ενώσεις της ελιάς, όπως η ολευρωπεΐνη και η υδροξυτυροσόλη, οι οποίες επιδρούν ευεργετικά στο μυοκάρδιο. Ειδικότερα, έχει αποδειχθεί ότι παρουσιάζουν αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιαθηροσκληρωτικές, αντιισχαιμικές και υπολιπιδαιμικές ιδιότητες, όπως τεκμηριώνεται από πλήθος μελετών τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* (Efentakis et al., 2015).

Το οξειδωτικό στρες παίζει καθοριστικό ρόλο στην πρόκληση βλάβης του ενδοθηλίου, καθώς η αύξησή του συνδέεται άμεσα με την εμφάνιση ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας, η οποία αποτελεί πρώιμο στάδιο στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης και των καρδιαγγειακών νοσημάτων (Summerhill et al., 2018). Σε

αυτό το πλαίσιο, οι βιοδραστικές ενώσεις του ελαιολάδου φαίνεται να ασκούν προστατευτική δράση, καθώς μειώνουν το οξειδωτικό στρες και βελτιώνουν τη λειτουργία του ενδοθηλίου μέσω των αντιοξειδωτικών, αντιφλεγμονωδών και αντιθρομβωτικών ιδιοτήτων τους, συμβάλλοντας έτσι στη μείωση του κινδύνου και της εξέλιξης της αθηροσκλήρωσης (Summerhill et al., 2018) **(Εικόνα 13)**.



Εικόνα 13: Ενώσεις ελαιολάδου που τροποποιούν το οξειδωτικό στρες και βελτιώνουν την ενδοθηλιακή λειτουργία - Μετά από επεξεργασία (Summerhill et al., 2018).

Η υδροξυτυροσόλη, αντίθετα δεν φαίνεται να έχει πάντα την ίδια επίδραση στην αθηροσκλήρωση, καθώς τα αποτελέσματά της εξαρτώνται από τη δόση και τις συνθήκες χορήγησης (Lou-Bonafonte et al., 2012). Σε ορισμένες μελέτες, η χορήγησή της σε υψηλή δόση οδήγησε σε αύξηση των αθηροσκληρωτικών βλαβών, γεγονός που δείχνει ότι η απομονωμένη χρήση φαινολικών ενώσεων μπορεί να μην είναι ωφέλιμη και ενδεχομένως να είναι επιβλαβής (Lou-Bonafonte et al., 2012). Αντίθετα, χαμηλότερες δόσεις σε διαφορετικά πειραματικά μοντέλα μείωσαν το μέγεθος των αθηροσκληρωτικών βλαβών (Acín et al., 2006). Επομένως, η δράση της υδροξυτυροσόλης επηρεάζεται από τη δόση, το είδος του πειραματικού μοντέλου και τη διατροφή, και ότι πιθανότατα είναι πιο αποτελεσματική όταν λαμβάνεται στο

φυσικό της περιβάλλον, όπως στο ελαιόλαδο, και όχι ως μεμονωμένο συμπλήρωμα (González-Santiago et al., 2006).

Μελέτες *ex vivo* με παρθένο ελαιόλαδο (VOO) δείχνουν ότι το ελαιόλαδο μπορεί να μειώσει την οξείδωση των λιποπρωτεϊνών και τη φλεγμονώδη αντίδραση, περιορίζοντας την έκφραση μορίων προσκόλλησης (Lou-Bonafonte et al., 2012). Έτσι, συμβάλλει στη μείωση της προσέλκυσης των μονοκυττάρων και της μετατροπής τους σε αφρώδη κύτταρα, ενώ επηρεάζει θετικά τη λειτουργία των αιμοπεταλίων, την πήξη και τη διάλυση των θρόμβων (Lou-Bonafonte et al., 2012). Σε άλλες έρευνες διαπιστώθηκε ότι η χορήγηση σκουαλενίου, το οποίο αντιπροσωπεύει το κύριο δευτερεύον συστατικό του VOO ,ανέτρεψε επίσης την ενδοθηλιακή ενεργοποίηση σε αθηροσκληρωτικά κουνέλια (Lou-Bonafonte et al., 2012). Ωστόσο, οι διαθέσιμες πληροφορίες για τον ρόλο του VOO στην αθηροσκλήρωση στον άνθρωπο, παραμένουν περιορισμένες και απαιτούνται περισσότερες μελέτες για ασφαλή συμπεράσματα (Lou-Bonafonte et al., 2012).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^{ο} : ΥΛΙΚΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1.α Προετοιμασία δειγμάτων

Τα εκχυλίσματα ετοιμάστηκαν στο Εργαστήριο Αξιοποίησης Βιοδραστικών Φυσικών Προϊόντων του Τμήματος Φαρμακευτικής του ΕΚΠΑ (ΕΥ ομότιμος καθηγητής κ. Αλέξιος-Λέανδρος Σκαλτσούνης) σε συνεργασία με τον κ. Παναγιώτη Σταθόπουλο, ΕΔΙΠ βαθμού Α΄**(Πίνακας 2)**. Χρησιμοποιήθηκαν υλικά, μέθοδοι και ο εξοπλισμός του συγκεκριμένου εργαστηρίου.

Στα δείγματα εφαρμόστηκε μια τυπική σειρά εργαστηριακών βημάτων για την απομόνωση και ταυτοποίηση φαινολικών γλυκοσιδών και τερπενίων από φύλλα ελιάς. Η διαδικασία περιλάμβανε εκχύλιση με διαλύτες διαφορετικής πολικότητας. Οι διαφορετικοί διαλύτες και η όλη διαδικασία επέτρεψαν την απομόνωση συγκεκριμένων ενώσεων. Οι οργανικές/λιπόφιλες φάσεις περιείχαν κυρίως τερπένια, ενώ οι πολικότερες φάσεις περιείχαν φαινολικούς γλυκοζίτες.

Η αναλυτική καταγραφή των εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης με ανιχνευτή συστοιχίας διόδων, HPLC-DAD (High Performance Liquid Chromatography με Diode Array Detector). Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό, την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση των συστατικών ενός μείγματος. Ο ανιχνευτής DAD καταγράφει την απορρόφηση φωτός σε πολλαπλά μήκη κύματος ταυτόχρονα (συνήθως στην υπεριώδη και ορατή περιοχή), επιτρέποντας την απόκτηση φασμάτων απορρόφησης για κάθε κορυφή του χρωματογραφήματος. Τα χρωματογραφήματα καταγράφηκαν σε μήκη κύματος της UV περιοχής, παρέχοντας πολύτιμες πληροφορίες για την ταυτοποίηση των ενώσεων.

Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε HPLC-MSQ ανάλυση σε συνθήκες αρνητικού ιοντισμού ($[M–H]^-$), δηλαδή Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης με ανιχνευτή Φασματόμετρο Μάζας. Τα φάσματα μάζας των κορυφών (peak mass spectra) χρησιμοποιήθηκαν για την επιβεβαίωση των μοριακών ιόντων και την ταυτοποίηση των ενώσεων βάσει του παρατηρούμενου λόγου μάζας προς φορτίο (m/z) και της αναμενόμενης δομής.

Η συνδυαστική χρήση των τεχνικών HPLC-DAD (για το χρωματογραφικό διαχωρισμό και την οπτική απεικόνιση) και HPLC-MSQ (για τη μοριακή ταυτοποίηση) παρείχε αξιόπιστα αποτελέσματα ως προς την ταυτοποίηση των κύριων συστατικών. Με τον τρόπο αυτό επιβεβαιώθηκε η παρουσία των φαινολικών γλυκοζιτών καθώς και των τερπενικών οξέων στα εκχυλίσματα των φύλλων ελιάς.

Πίνακας 2: Περιγραφή εκχυλισμάτων.

ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ-ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΗ ΟΥΣΙΑ	**ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ - ΣΥΝΘΕΣΗ**
1	Φαινολικά συστατικά (σεκοϊριδοειδή/φλαβονοειδή) και τερπένια
2	Εμπλουτισμένο σε φαινολικά συστατικά μετά από επεξεργασία με DCM
3	Εμπλουτισμένο σε Τερπένια μετά από επεξεργασία DCM
4	Ολευρωπεΐνη
5	Ολευρωσίδης

Τα εκχυλίσματα παρασκευάστηκαν μέσω εκχύλισης αποξηραμένων φύλλων με ακετόνη για τέσσερις ημέρες υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στη συνέχεια, το εκχύλισμα διηθήθηκε και συμπυκνώθηκε σε συσκευή περιστροφικής εξάτμισης υπό ελαττωμένη πίεση, αποδίδοντας το αρχικό ακετονικό εκχύλισμα (Εκχύλισμα 1). Ακολούθως, το ακετονικό εκχύλισμα υποβλήθηκε σε έκπλυση με διχλωρομεθάνιο (DCM) με σκοπό την απομάκρυνση των άπολων συστατικών και τον εμπλουτισμό του σε φαινολικές ενώσεις, αποδίδοντας το φαινολικό κλάσμα (Εκχύλισμα 2). Τέλος, ο διαλύτης έκπλυσης (DCM) απομακρύνθηκε με περιστροφική εξάτμιση υπό ελαττωμένη πίεση και παραλήφθηκε το άπολο κλάσμα, το οποίο ήταν εμπλουτισμένο σε τερπενικές ενώσεις (Εκχύλισμα 3).

Τέλος τα εκχυλίσματα 4 και 5 αποτελούν δείγματα ολευρωπεΐνης και ολευρωσίδη αντίστοιχα, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως πρότυπα αναφοράς. Άρα η συγκριτική αξιολόγηση των εκχυλισμάτων αυτών καθιστά δυνατή τη διερεύνηση πιθανών συνεργατικών, αθροιστικών ή ανταγωνιστικών επιδράσεων ως προς τις βιολογικές τους ιδιότητες.

5.1.β Αραιώσεις εκχυλισμάτων - Ετοιμασία διαλυμάτων εργασίας

Για τα εκχυλίσματα 1–3 παρασκευάστηκε αρχικά πυκνό διάλυμα (stock) συγκέντρωσης 10mg/mL, διαλύοντας 10mg ουσίας σε 1mL DMSO. Η ζύγιση πραγματοποιήθηκε σε ζυγό ακριβείας και τα διαλύματα αναδεύτηκαν έως πλήρη διάλυση.

Για το εκχύλισμα 4 σε σωληνάριο τύπου eppendorf που περιείχε 56,32mg του δείγματος προστέθηκε 1mL απιονισμένου νερού και το δείγμα αναδεύτηκε έως πλήρους διάλυσης. Το διάλυμα που προέκυψε αποτέλεσε stock συγκέντρωσης 56,32mg/mL.

Για το εκχύλισμα 5 σε σωληνάριο τύπου eppendorf που περιείχε 25,94mg του δείγματος προστέθηκε 0,5mL απιονισμένου νερού και το δείγμα αναδεύτηκε έως πλήρους διάλυσης. Το προκύπτον διάλυμα αποτέλεσε stock συγκέντρωσης 51,88mg/mL.

Μετά την παρασκευή τους, όλα τα διαλύματα διατηρήθηκαν υπό ατμόσφαιρα αζώτου, σφραγίστηκαν με parafilm και αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία −20 °C

Ετοιμασία διαλυμάτων για την οξείδωση της LDL

Ακολούθησαν διαδοχικές αραιώσεις των προηγούμενων διαλυμάτων ως εξής:

Ετοιμασία διαλύματος εργασίας 200μg/mL

Για την επίτευξη τελικής συγκέντρωσης 200μg/mL, απαιτείται ενδιάμεσο διάλυμα συγκέντρωσης 10mg/mL, το οποίο αποτελεί το αρχικό πυκνό διάλυμα (stock) για τα εκχυλίσματα 1-3.

Για το εκχύλισμα 4 από διάλυμα stock συγκέντρωσης 56,32mg/mL λήφθηκαν 17,76μL και συμπληρώθηκαν με 82,24μL απιονισμένου νερού, με σκοπό την δημιουργία διαλύματος εργασίας 10mg/mL.

Για το εκχύλισμα 5 από διάλυμα stock συγκέντρωσης 51,88mg/mL λήφθηκαν 19,3μL και συμπληρώθηκαν με 80,7μL απιονισμένου νερού, με σκοπό τη δημιουργία διαλύματος εργασίας 10mg/mL.

Ετοιμασία διαλύματος εργασίας 150μg/mL

Για την παρασκευή διαλύματος που αντιστοιχεί σε τελική συγκέντρωση 150μg/mL, χρησιμοποιήθηκε το προηγούμενο διάλυμα των 10mg/mL. Από αυτό λήφθηκαν 75μL και προστέθηκαν 25μL DMSO για τα εκχυλίσματα 1-3 ενώ για τα εκχυλίσματα 4,5 προστίθεται απιονισμένο νερό, ώστε να προκύψει ενδιάμεσο διάλυμα συγκέντρωσης 7,5mg/mL.

Ετοιμασία διαλύματος εργασίας 100μg/mL

Αντίστοιχα, για την επίτευξη τελικής συγκέντρωσης 100μg/mL, παρασκευάστηκε ενδιάμεσο διάλυμα συγκέντρωσης 5mg/mL. Για το σκοπό αυτό λήφθηκαν 66,7μL από το προηγούμενο διάλυμα και συμπληρώθηκαν με 33,3μL DMSO για τα εκχυλίσματα 1-3 ενώ για τα εκχυλίσματα 4,5 προστέθηκε απιονισμένο νερό.

Ετοιμασία διαλύματος εργασίας 50μg/mL

Για την τελική συγκέντρωση 50μg/mL, παρασκευάστηκε ενδιάμεσο διάλυμα συγκέντρωσης 2,5mg/mL, λαμβάνοντας ίσους όγκους (50μL) από το διάλυμα των 5mg/mL και DMSO για τα εκχυλίσματα 1-3 ενώ για τα εκχυλίσματα 4,5 προστίθεται απιονισμένο νερό.

Ετοιμασία διαλύματος εργασίας 25μg/mL

Στη συνέχεια, για την επίτευξη τελικής συγκέντρωσης 25μg/mL, παρασκευάστηκε ενδιάμεσο διάλυμα συγκέντρωσης 1,25mg/mL, λαμβάνοντας ξανά ίσους όγκους (50μL) από το διάλυμα των 2,5mg/mL και DMSO για τα εκχυλίσματα 1-3 ενώ για τα εκχυλίσματα 4,5 προστίθεται απιονισμένο νερό.

Ετοιμασία διαλύματος εργασίας 10μg/mL

Για την τελική συγκέντρωση 10μg/mL, παρασκευάστηκε ενδιάμεσο διάλυμα συγκέντρωσης 0,5mg/mL, με λήψη 40μL από το διάλυμα των 1,25mg/mL και προσθήκη 60μL DMSO για τα εκχυλίσματα 1-3 ενώ για τα εκχυλίσματα 4,5 προστίθεται απιονισμένο νερό.

Ετοιμασία διαλύματος εργασίας 5μg/mL

Τέλος, για τελική συγκέντρωση 5μg/mL, παρασκευάστηκε ενδιάμεσο διάλυμα συγκέντρωσης 0,25mg/mL, με λήψη 50μL από το διάλυμα των 0,5mg/mL και προσθήκη 50μL DMSO για τα εκχυλίσματα 1-3 ενώ για τα εκχυλίσματα 4,5 προστέθηκε απιονισμένο νερό.

5.2 Απομόνωση λιποπρωτεϊνών με διαδοχικές υπερφυγοκεντρήσεις

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος διαχωρισμού των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος μέσω υπερφυγοκέντρησης αξιοποιεί τις διαφορές στην πυκνότητά τους. Αυτές οι διαφοροποιήσεις προκύπτουν κυρίως λόγω της ποικιλίας στη λιπιδική σύσταση των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων, η οποία επηρεάζει σημαντικά τη χημική τους δομή και κατά συνέπεια και την πυκνότητά τους. Ως αποτέλεσμα, οι λιποπρωτεΐνες μπορούν να διαχωριστούν σε διακριτές στιβάδες (ή ζώνες), επιπλέοντας σε συγκεκριμένα στρώματα ανάλογα με την πυκνότητά τους.

Οι κύριες κατηγορίες λιποπρωτεϊνών και οι αντίστοιχες πυκνότητές τους είναι:

- VLDL και IDL: d = 0,096-1,019 g/mL
- LDL: d = 1,019-1,063 g/mL
- HDL: d = 1,063-1,210 g/mL
- Lp(a): d = 1,060-1,107 g/mL

Εξοπλισμός και αντιδραστήρια:

1. Φυγόκεντρος Πάγκου (Hermle, Z320)
2. Υπερφυγόκεντρος (Beckman, μοντέλο L70)
3. Κεφαλή για υπερφυγοκέντρηση (NVT-65,Serial 735,Beckman,USA)
4. Σωλήνες υπερφυγοκέντρησης τύπου Quickseal (342412,Beckman,USA)
5. Αντιβιοτικά: πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη (Biowest, L0022-100)
6. EDTA- Συμπλοκοποιητής Titriplex III (Merck, 324503-1—GMCN, USA)
7. Βρωμιούχο κάλιο-KBr (104907,Merck): Ξήρανση σε πυριαντήριο στους 100°C για 24 ώρες. Φυλάσσεται σε ξηραντήρα.

8. Μονονατριούχο διυδροφωσφορικό άλας, μονοένυδρο - $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ (Merck, 1.06346.0500)

9. Δινάτριο υδροφωσφορικό άλας, διένυδρο - $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ (Merck, 1.06580.1000)

10. Χλωριούχο νάτριο - NaCl (Merck ,1.06404.1000)

Ετοιμασία εργαστηριακών διαλυμάτων:

➢ *Διάλυμα EDTA 10% w/v, pH 7,0*

Ζυγίζονται 12,8247g EDTA (Titriplex III) και διαλύονται σε 90mL απεσταγμένου νερού (dH_2O). Το pH ρυθμίζεται ακριβώς στο 7,0 και ο τελικός όγκος προσαρμόζεται στα 100mL με dH_2O. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C.

➢ *Διάλυμα KBr με πυκνότητα 1,019 g/mL*

Για την παρασκευή, διαλύονται 14,92g βρωμιούχου καλίου σε dH_2O μέχρι να επιτευχθεί τελικός όγκος 500mL. Προστίθενται 5μL ανά mL από το διάλυμα 10% EDTA και 1,25μL ανά mL από αντιβιοτικό διάλυμα πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης. Το τελικό διάλυμα διατηρείται στους 4°C.

➢ *Διάλυμα KBr με πυκνότητα 1,063 g/mL*

45,99g KBr διαλύονται σε απεσταγμένο νερό και ο όγκος συμπληρώνεται στα 500mL. Όπως και στο προηγούμενο, προστίθενται 5μL/mL από διάλυμα EDTA 10%w/v και 1,25μL/mL από πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.

➢ *Ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10mM με 0,05% EDTA, pH 7,4*

Ζυγίζονται 8,18g NaCl, 1,38g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ και 1,78g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ και διαλύονται σε 800mL dH_2O. Το pH ρυθμίζεται στο 7,4 και ο όγκος προσαρμόζεται στο 1 L. Στη συνέχεια, προστίθενται 5mL από το 10% EDTA. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C.

5.2.α Απομόνωση χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (Low Density Lipoprotein-LDL)

Αρχή της Μεθόδου

Η διαδικασία βασίζεται στη χρήση φυγοκέντρησης για την απομόνωση των λιποπρωτεϊνών από δείγμα αίματος από φαινομενικά υγιές άτομο. Αρχικά, το πλάσμα διαχωρίζεται από το ολικό αίμα με φυγοκέντρηση. Στη συνέχεια, υποβάλλεται σε υπερφυγοκέντρηση παρουσία διαλύματος βρωμιούχου καλίου (KBr)

για περίπου 8 ώρες. Από αυτή τη φάση, συλλέγεται το υπερκείμενο, το οποίο είναι πλούσιο σε LDL χοληστερόλη, ενώ το υπόλοιπο διατηρείται για την απομόνωση άλλων λιποπρωτεϊνών. Έπειτα, ακολουθεί δεύτερη υπερφυγοκέντρηση με προσθήκη KBr, και από αυτήν συλλέγεται η άνω στιβάδα, η οποία περιέχει LDL που έχει εκπλυθεί. Η τελική αποθήκευση της LDL γίνεται υπό αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου, ώστε να διατηρηθεί η σταθερότητά της.

Η μέθοδος αυτή αναφέρθηκε αρχικά από τον John L. Gofman και τους συνεργάτες του τη δεκαετία του 1940. Οι ερευνητές αυτοί εφάρμοσαν υπερφυγοκέντρηση με τη χρήση KBr, προκειμένου να διαχωρίσουν και να μελετήσουν τα λιποπρωτεϊνικά κλάσματα VLDL (Very Low-Density Lipoprotein-Λιποπρωτεΐνη πολύ χαμηλής πυκνότητας), LDL (Low-Density Lipoprotein-Λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας) και HDL (High-Density Lipoprotein-Λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας) (Havel et al., 1955, Gofman et al., 1954).

<u>Πειραματική πορεία</u>

Απομόνωση πλάσματος

Το αίμα συλλέγεται σε κατάλληλα σωληνάρια, τα οποία περιέχουν ως αντιπηκτικό διάλυμα EDTA, σε αναλογία 100 μL ανά 10 mL αίματος. Αφού ζυγοσταθμιστούν κατάλληλα τα σωληνάρια, ακολουθεί φυγοκέντρηση σε φυγόκεντρο πάγκου στις 3100 στροφές ανά λεπτό (rpm) για 20 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το υπερκείμενο (πλάσμα) συλλέγεται προσεκτικά με πιπέτα και μεταφέρεται σε σωληνάκι falcon για μέτρηση του τελικού όγκου. Στο πλάσμα προστίθεται 10% w/v EDTA σε αναλογία 5 μL ανά mL πλάσματος, καθώς και πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη σε ποσότητα 1,25 μL/mL πλάσματος.

<u>Πρώτη υπερφυγοκέντρηση - Απομόνωση της VLDL</u>

Αφού υπολογιστεί ο συνολικός όγκος του πλάσματος σε mL, ο αριθμός αυτός πολλαπλασιάζεται με τον συντελεστή 0,0212. Το αποτέλεσμα της πράξης δίνει την ποσότητα (σε γραμμάρια) του στερεού KBr που πρέπει να προστεθεί, ώστε να επιτευχθεί πυκνότητα 1,019g/mL. Το KBr προστίθεται σταδιακά στο πλάσμα και αναδεύεται απαλά μέχρι να διαλυθεί πλήρως. Ακολούθως, ο όγκος του διαλύματος προσαρμόζεται με την προσθήκη διαλύματος KBr ίδιας πυκνότητας (1,019 g/mL), το

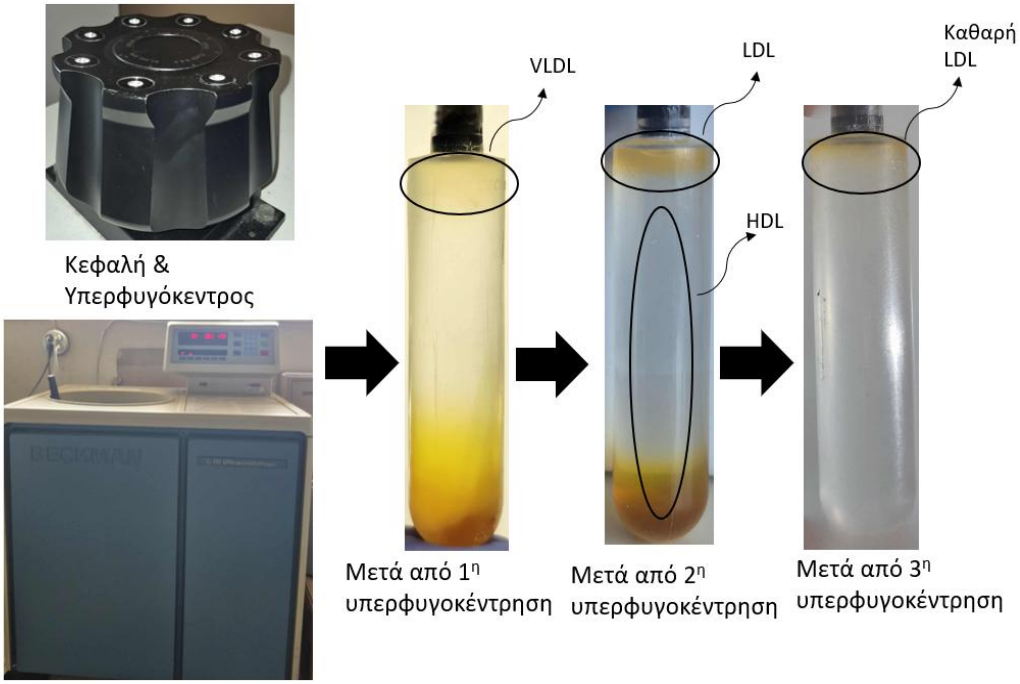
οποίο περιέχει ήδη 5μL/mL από διάλυμα EDTA 10% και 1,25 μL/mL πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης. Το τελικό μείγμα κατανέμεται ισόποσα στα ειδικά σωληνάρια της υπερφυγοκέντρησης, φροντίζοντας να γίνει ακριβής ζυγοστάθμιση. Τα σωληνάρια σφραγίζονται και τοποθετούνται στην υπερφυγόκεντρο. Η φυγοκέντρηση πραγματοποιείται στις 45.000 στροφές ανά λεπτό (rpm) για χρονικό διάστημα 8 ωρών, σε θερμοκρασία 14°C. Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας, η λιποπρωτεΐνη VLDL έχει μετακινηθεί στην επιφάνεια του δείγματος και έχει διαχωριστεί σαφώς από τα υπόλοιπα συστατικά. Αυτή η επιφανειακή στιβάδα συλλέγεται προσεκτικά με σύριγγα και απορρίπτεται. Το εναπομείναν πλάσμα, που περιέχει κυρίως LDL και HDL μεταφέρεται σε σωληνάκι falcon, όπου καταγράφεται εκ νέου ο όγκος του **(Εικόνα 14)**.

<u>Δεύτερη υπερφυγοκέντρηση - Απομόνωση της LDL</u>

Αφού μετρηθεί ο όγκος του πλάσματος που απέμεινε από την πρώτη υπερφυγοκέντρηση (σε mL), γίνεται πολλαπλασιασμός της τιμής αυτής με τον συντελεστή 0,060. Το αποτέλεσμα της πράξης αντιστοιχεί στη μάζα του στερεού KBr (σε γραμμάρια) που απαιτείται, προκειμένου να αυξηθεί η πυκνότητα του δείγματος από 1,019g/mL σε 1,063g/mL. Η υπολογισμένη ποσότητα KBr προστίθεται στο πλάσμα και ακολουθεί ήπια ανάδευση μέχρι να διαλυθεί πλήρως το άλας. Στη συνέχεια, ο συνολικός όγκος του διαλύματος προσαρμόζεται με την προσθήκη διαλύματος KBr πυκνότητας 1,063g/mL, το οποίο περιέχει επιπλέον 5μL/mL διαλύματος EDTA 10% και 1,25μL/mL διαλύματος πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης. Το τελικό μείγμα κατανέμεται στα ειδικά σωληνάρια της υπερφυγοκέντρησης, φροντίζοντας για ακριβή ζυγοστάθμιση. Ακολούθως, τα σωληνάρια σφραγίζονται και τοποθετούνται στην υπερφυγόκεντρο, ρυθμίζεται στις 45.000 στροφές ανά λεπτό (rpm) και θερμοκρασία 14°C για 8 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της δεύτερης υπερφυγοκέντρησης, η LDL έχει μετακινηθεί στην επιφάνεια του σωλήνα, διαχωρισμένη από τα υπόλοιπα συστατικά του δείγματος. Η LDL συλλέγεται με προσοχή χρησιμοποιώντας σύριγγα **(Εικόνα 14)**.

Τρίτη Υπερφυγοκέντρηση - Έκπλυση της LDL

Η απομονωμένη LDL υποβάλλεται σε μία επιπλέον διαδικασία υπερφυγοκέντρησης, με σκοπό την περαιτέρω απομάκρυνση της αλβουμίνης που πιθανόν να έχει παραμείνει από το πλάσμα. Η LDL κατανέμεται σε σωληνάρια, τα οποία συμπληρώνονται με διάλυμα KBr πυκνότητας 1,063g/mL. Αφού πραγματοποιηθεί η απαραίτητη ζυγοστάθμιση, τα σωληνάρια σφραγίζονται και τοποθετούνται στον υπερφυγόκεντρο. Η φυγοκέντρηση διεξάγεται στις 45.000 στροφές ανά λεπτό για χρονικό διάστημα 8 ωρών σε θερμοκρασία 14°C. Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας, η LDL λιποπρωτεΐνη εμφανίζεται στην επιφάνεια του διαλύματος και συλλέγεται προσεκτικά με τη χρήση σύριγγας. Στη συνέχεια, η LDL υποβάλλεται σε διαπίδυση, με στόχο την απομάκρυνση του EDTA **(Εικόνα 14)**.



Εικόνα 14: Απομόνωση LDL με τρεις διαδοχικές υπερφυγοκεντρήσεις.

5.2.β Διαπίδυση

Η διαπίδυση αποτελεί τεχνική διαχωρισμού που στηρίζεται στη μετακίνηση χαμηλού μοριακού βάρους ενώσεων μέσω μιας επιλεκτικά διαπερατής μεμβράνης, ενώ τα μόρια μεγάλου μεγέθους, όπως οι πρωτεΐνες και οι λιποπρωτεΐνες, παγιδεύονται και δεν τη διαπερνούν. Η πρώτη περιγραφή της μεθόδου έγινε το 1861

από τον Thomas Graham, ο οποίος διαπίστωσε ότι οι κολλοειδείς ουσίες μπορούν να απομονωθούν από τις κρυσταλλοειδείς, επειδή μόνο τα μικρότερα μόρια έχουν τη δυνατότητα να διαχέονται διαμέσου της μεμβράνης (Wisniak, 2013).

Αφού απομονωθεί η LDL, υποβάλλεται σε διαπίδυση με σκοπό την απομάκρυνση του EDTA, ώστε να μην παρεμποδίζεται η οξείδωση μέσω δέσμευσης του χαλκού, αλλά και για την απομάκρυνση του KBr. Η LDL τοποθετείται σε μεμβράνη διαπίδυσης και κατόπιν σε ποτήρι ζέσεως που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10mM (pH 7,4), σε όγκο περίπου 200 φορές μεγαλύτερο από αυτόν της LDL **(Εικόνα 15)**. Η διαδικασία πραγματοποιείται στους 4°C με συνεχή ανάδευση και διαρκεί τουλάχιστον 24 ώρες. Μετά την ολοκλήρωσή της, η LDL συλλέγεται με προσοχή και αποθηκεύεται σε περιβάλλον αζώτου, επίσης στους 4°C.

Εικόνα 15: Η LDL μέσα σε κατάλληλη μεμβράνη για τη διαπίδυση.

5.2.γ Προσδιορισμός LDL με τη μέθοδο της BCA

Η δοκιμασία BCA (bicinchoninic acid) αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη αναλυτική μέθοδο για τον προσδιορισμό της συνολικής περιεκτικότητας πρωτεΐνης σε βιολογικά δείγματα. Η αρχή της βασίζεται στην ικανότητα των πρωτεϊνών να προκαλούν αναγωγή των ιόντων χαλκού από τη δισθενή (Cu^{2+}) στη μονοσθενή μορφή (Cu^{+}) υπό αλκαλικές συνθήκες. Η αντίδραση αυτή οφείλεται κυρίως σε συγκεκριμένα αμινοξέα, όπως η κυστεΐνη ή κυστίνη, η τυροσίνη και η τρυπτοφάνη, καθώς και στους

πεπτιδικούς δεσμούς της πρωτεϊνικής δομής. Στη συνέχεια, τα ιόντα Cu^{+} δεσμεύονται από δύο μόρια δικινχονινικού οξέος (Bicinchoninic acid, BCA), σχηματίζοντας ένα σταθερό και υδατοδιαλυτό έγχρωμο σύμπλοκο, η ένταση του οποίου μετράται φασματοφωτομετρικά στα 562nm και είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης. Ωστόσο, η αξιοπιστία της μεθόδου μπορεί να επηρεαστεί από την παρουσία αναγωγικών ουσιών ή ενώσεων που δεσμεύουν τον χαλκό, όπως το EDTA (He, 2011).

Αρχή της μεθόδου

Σε αλκαλικό περιβάλλον, τα ιόντα Cu^{2+} ανάγονται από τις πρωτεΐνες σε Cu^{+}. Τα ιόντα Cu^{+} σχηματίζουν στη συνέχεια ένα έγχρωμο και υδατοδιαλυτό σύμπλοκο με δύο μόρια δικινχονινικού οξέος (BCA), σύμφωνα με την παρακάτω χημική αντίδραση. Το τελικό προϊόν παρουσιάζει απορρόφηση στα 562 nm. Η διαδικασία περιλαμβάνει αρχικά το σχηματισμό χηλικού συμπλόκου ανάμεσα στους πεπτιδικούς δεσμούς των πρωτεϊνών και τα ιόντα δισθενούς χαλκού.

Πρωτεΐνη (πεπτιδικοί δεσμοί) + Cu^{2+} → Χηλικό σύμπλοκο πρωτεΐνης–Cu^{+}

Cu^{+} + 2 BCA → Σύμπλοκο BCA–Cu^{+}

Αντιδραστήρια και Εργαστηριακός Εξοπλισμός:

1.Αντιδραστήριο Α (Thermo Scientific, 23228): Αποτελείται από μείγμα ανθρακικού και διττανθρακικού νατρίου, δικινχονινικού οξέος και ταρταρικού νατρίου, διαλυμένα σε 0,2 N διάλυμα NaOH (MERCK, 1064981000).

2.Αντιδραστήριο Β (Thermo Scientific, 1859078): Διάλυμα θειικού χαλκού ($CuSO_4$) σε συγκέντρωση 4%.

3.Πρότυπο διάλυμα BSA (Thermo Scientific, 23209): Διάλυμα αλβουμίνης σε συγκέντρωση 2 mg/mL BSA σε διάλυμα που περιέχει 0,9% NaCl και 0,05% NaN_3 ως συντηρητικό.

4.ELISA πλακίδιο 96 θέσεων (Sarstedt)

5.Φωτόμετρο BIOTEK- EPOCH 2: microplate reader, Metrolad

6.Ημιπερατή μεμβράνη διαπίδυσης (Sigma, 1003415685): Ενεργοποιείται σε διάλυμα PBS 1X (10mM) για 3 ώρες και συγκρατεί ουσίες με μοριακό βάρος άνω των 12 kDa.

Παρασκευή Διαλυμάτων:

- *Διάλυμα εργασίας:*

Προκύπτει από την ανάμιξη των αντιδραστηρίων Α και Β σε αναλογία 50:1 v/v. Η ανάμειξη γίνεται αμέσως πριν τη χρήση.

- *Πρότυπα διαλύματα BSA:*

Προετοιμάστηκαν με διαδοχικές αραιώσεις του αρχικού διαλύματος BSA (2 mg/mL) με απιονισμένο νερό, ώστε να προκύψουν τελικές συγκεντρώσεις 0,25, 0,50, 0,75, 1,00, 1,25 και 1,50 mg/mL. Τα διαλύματα αυτά φυλάχθηκαν στους −20°C.

Πειραματική πορεία

Σε κάθε θέση ενός πλακιδίου ELISA 96 θέσεων προστίθενται 20 μL από τα πρότυπα διαλύματα BSA (για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης), καθώς και 20 μL από το δείγμα LDL. Κατόπιν, σε κάθε θέση προστίθενται 200 μL από το διάλυμα εργασίας. Η πλάκα καλύπτεται με μεμβράνη, αναδεύεται ήπια και επωάζεται στους 37°C για 30 λεπτά στο σκοτάδι. Στη συνέχεια, μεταφέρεται στον αναγνώστη τύπου microELISA, όπου πραγματοποιείται μέτρηση απορρόφησης στο μήκος κύματος των 562 nm.

Με βάση τις τιμές απορρόφησης των προτύπων δειγμάτων και με χρήση υπολογιστικού προγράμματος, δημιουργείται γραφική παράσταση στην οποία στον άξονα Χ απεικονίζονται οι συγκεντρώσεις BSA και στον άξονα Υ οι αντίστοιχες απορροφήσεις. Από την εξίσωση της ευθείας προκύπτει η πρότυπη καμπύλη της μορφής: Απορρόφηση = α * x + b, όπου *α* και *b* είναι οι συντελεστές της ευθείας, και *x* η συγκέντρωση. Με βάση αυτή την εξίσωση, υπολογίζεται η συγκέντρωση πρωτεΐνης (σε mg/mL) στα δείγματα.

5.2.δ Οξειδωτική τροποποίηση της LDL με ιόντα Cu^{2+}

Αρχή της μεθόδου

Η οξείδωση της LDL πραγματοποιείται με επώασή της σε κατάλληλες συνθήκες, παρουσία ιόντων Cu^{2+} στους 37°C. Κατά την υπεροξείδωση των ενδογενών

πολυακόρεστων λιπαρών οξέων της λιποπρωτεΐνης σχηματίζονται συζυγή διένια, τα οποία απορροφούν στα 234 nm, σημείο όπου παρατηρείται και η τροποποίηση **(Εικόνα 16)**.

Αντιδραστήρια- Εξοπλισμός:

1. LDL: Απομονώνεται και φυλάσσεται στο ψυγείο (4°C) υπό ατμόσφαιρα αζώτου στο σκοτάδι.
2. $CuSO_4$ (MB=249,69 g/mol, Sigma-Aldrich,102442591)
3. Πλακίδιο ELISA 96 θέσεων (Sarstedt)
4. Αναγνώστης microELISA- TECAN (Spectra MAX 190, Molecular Devices)
5. Μονονατριούχο διυδροφωσφορικό άλας, μονοένυδρο - $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ (MERCK,1.06346.0500)
6. Διένυδρο Δινάτριο υδροφωσφορικό άλας - $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ (MERCK,1.06580.1000)
7. Χλωριούχο νάτριο - NaCl (Merck ,1.06404.1000)

Παρασκευή Διαλυμάτων:

- *Ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM, pH=7,4:*

Διαλύονται 8,18 g NaCl, 1,38 g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ και 1,78 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ σε 800 mL απιονισμένου νερού (dH_2O). Μετά τη ρύθμιση του pH στο 7,4, ο όγκος συμπληρώνεται στο 1 L.

- *Διάλυμα $CuSO_4$ 20 mM:*

0,4993 g $CuSO_4$ διαλύονται σε 100mL dH_2O. Φυλάσσεται στους 4°C.

- *Διάλυμα $CuSO_4$ 0,2 mM:*

Προκύπτει από αραίωση 1:100 v/v του διαλύματος 20mM. Διατηρείται στους 4°C.

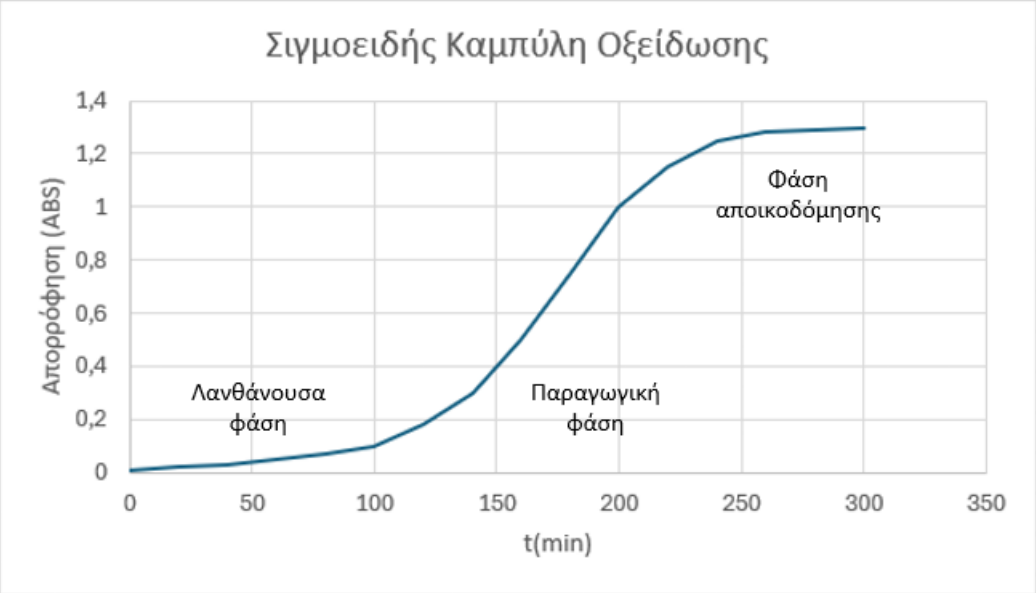
- *Διάλυμα $CuSO_4$ 0,1 mM:*

Παρασκευάζεται από το διάλυμα 0,2 mM με αραίωση 1:2 v/v. Φυλάσσεται στους 4°C.

Πειραματική πορεία

Η LDL αραιώνεται ώστε να έχει τελική συγκέντρωση 100μg πρωτεΐνης/mL, χρησιμοποιώντας κατάλληλο όγκο από το ρυθμιστικό PBS 10mM, pH 7,4. Η διαδικασία οξείδωσης ξεκινά με την προσθήκη διαλύματος $CuSO_4$ 0,1 mM σε ποσότητα που να επιτυγχάνει τελική συγκέντρωση 5μM. Ο συνολικός όγκος της

αντλιδρασης είναι 300μL. Το πλακίδιο τοποθετείται στον αναγνώστη microELISA στους 37°C για 5 ώρες. Η εξέλιξη της οξείδωσης παρακολουθείται απορροφώντας στα 234nm, με την καταγραφή της χαρακτηριστικής σιγμοειδούς καμπύλης που αντιστοιχεί στο σχηματισμό των συζυγών διενίων.



Εικόνα 16: Χαρακτηριστική σιγμοειδής καμπύλη οξείδωσης.

5.3 Συσσωρευομετρία οπτικής διαπερατότητας (Light Transmission Aggregometry, LTA)

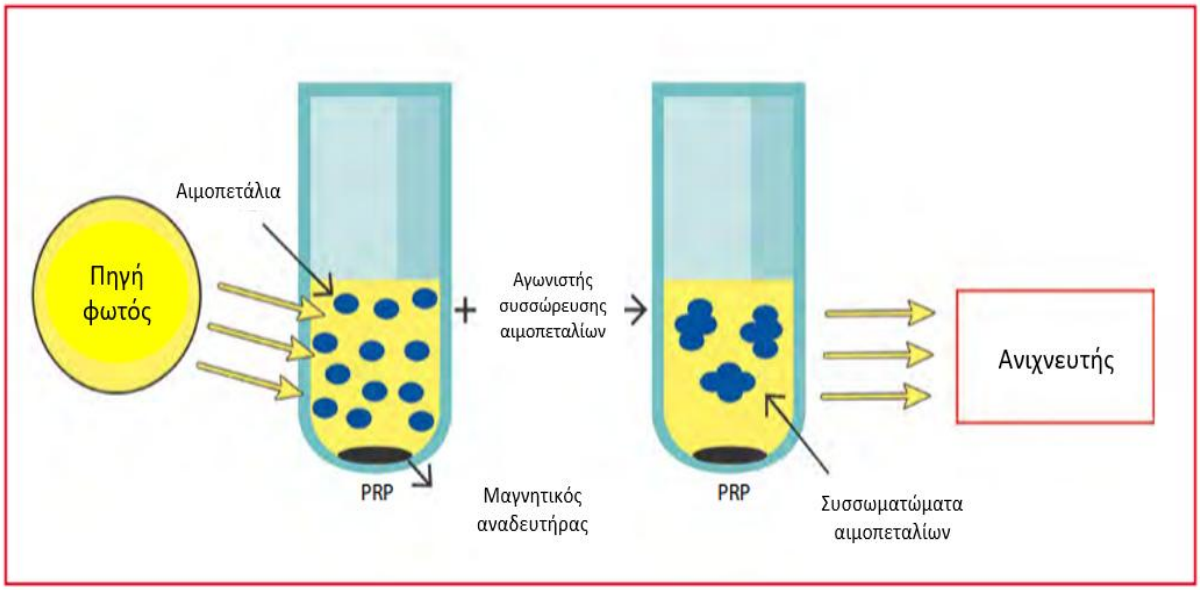
Η συσσωρευομετρία οπτικής διαπερατότητας - Light Transmission Aggregometry (LTA) θεωρείται διαχρονικά η πλέον καθιερωμένη τεχνική για την αξιολόγηση της λειτουργικής ικανότητας των αιμοπεταλίων να σχηματίζουν συσσωματώματα. Εφαρμόζεται τόσο σε πλάσμα με αυξημένη συγκέντρωση αιμοπεταλίων (PRP) όσο και σε απομονωμένα, πλυμένα αιμοπετάλια. Η εισαγωγή της μεθόδου έγινε στις αρχές της δεκαετίας του 1960 από τον Gustav Born, ο οποίος ανέπτυξε ένα σύστημα βασισμένο στη φωτομετρική καταγραφή των μεταβολών στη διαπερατότητα του φωτός κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης και συσσώρευσης των αιμοπεταλίων στο πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (Platelet-Rich Plasma - PRP) (Born, 1962).

<u>Αρχή της Μεθόδου</u>

Η LTA είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της συσσώρευσης αιμοπεταλίων είτε σε πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (Platelet-Rich Plasma PRP) είτε σε πλυμένα αιμοπετάλια. Η τεχνική αυτή βασίζεται στην παρακολούθηση των μεταβολών της οπτικής διαπερατότητας με τη χρήση φωτόμετρου, μετά την προσθήκη ενός αγωνιστή αιμοπεταλίων στο PRP. Από τις μετρήσεις που προκύπτουν, σχεδιάζεται η χαρακτηριστική καμπύλη συσσώρευσης, η οποία απεικονίζει την πορεία των αλλαγών στην οπτική διαπερατότητα. Επιπλέον, μπορούν να χρησιμοποιηθούν διαφορετικοί αγωνιστές, καθένας από τους οποίους μπορεί να ενεργοποιεί τα αιμοπετάλια με ξεχωριστό τρόπο.

Το συσσωρευόμετρο λειτουργεί με αρχή παρόμοια με αυτή του φασματοφωτομέτρου, χρησιμοποιώντας δέσμη υπέρυθρου φωτός? σταθερού μήκους κύματος. Το όργανο διαθέτει δύο θέσεις: μία για το δείγμα (PRP) και μία για το πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια (Platelet-Poor Plasma, PPP), που χρησιμεύει ως διάλυμα αναφοράς. Στην ανάλυση, το δείγμα PRP θεωρείται ότι έχει μηδενική διαπερατότητα (0%), ενώ το PPP ορίζεται ως 100% διαπερατό. Η διαδικασία πραγματοποιείται στους 37°C με συνεχή ανάδευση. Το φως περνά πρώτα από το δείγμα και στη συνέχεια από το διάλυμα αναφοράς και οι διακυμάνσεις ανιχνεύονται από ειδικό αισθητήρα, ο οποίος τις αποτυπώνει γραφικά.

Με την προσθήκη του αγωνιστή, τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται, αλλάζουν μορφή, εκκρίνουν τα περιεχόμενα των κοκκίων τους και σχηματίζουν συσσωματώματα ή μικρούς θρόμβους. Η δημιουργία αυτών των συσσωματωμάτων επιτρέπει σε περισσότερο φως να διαπεράσει το δείγμα, γεγονός που καταγράφεται από το όργανο ως αύξηση της διαπερατότητας. Το τελικό ποσοστό συσσώρευσης επηρεάζεται τόσο από τη συγκέντρωση του αγωνιστή όσο και από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των αιμοπεταλίων του κάθε δότη **(Εικόνα 17)**.



Εικόνα 17: Αρχή μεθόδου LTA (Malarczyk & Odnoczko, 2023) .

Αντιδραστήρια-Όργανα:

1. Κιτρικό οξύ ($C_6H_8O_7$, 192,13 g/mol, Merck, 423565000)
2. Κιτρικό νάτριο ($C_6H_5Na_3O_7$*$2H_2O$, 294,10 g/mol, Merck, 513320160)
3. D (+) Γλυκόζη ($C_6H_{12}O_6$, 180,16 g/mol, Fluka, A1422)
4. Οξαλικό αμμώνιο ($(NH_4)_2C_2O_4$, 142,11 g/mol, Mallinckrodt)
5. Διφωσφορική αδενοσίνη - ADP $C_{10}H_{15}N_5O_{10}P_2$ (427,201 g/mol, Chrono-Log, 30859SA)
6. Πεπτίδιο-ενεργοποιητής του υποδοχέα της θρομβίνης 6 - TRAP-6 $C_{34}H_{56}N_{10}O_9$ (748,87 g/mol, Bachem, 4017752.0005)
7. Αραχιδονικό οξύ - AA $(CH_3(CH_2)_4(CH=CHCH_2)_4CH_2CH_2CO_2H$ (304,47g/mol, Sigma, A3611)
8. Διμεθυλοσουλφοξείδιο DMSO (C_2H_6OS, 78,13g/mol, Merck, 802912)
9. Φυγόκεντρος πάγκου (Hermle, Z320)
10. Οπτικό μικροσκόπιο (Olympus, CX41)
11. Πλάκα Neubauer
12. Συσσωρευόμετρο (Chrono-Log,1-800-247-6665,Model 700)
13. Λογισμικό Aggrolink (Chrono-Log, version 8.0)
14. Γυάλινες κυψελίδες (Chrono-Log, 418156, USA)
15. Μαγνητάκια (Chrono-Log)

16. Διχρωμικό κάλιο - $K_2Cr_2O_7$ (Merck, 104864)
17. Θειικό οξύ - H_2SO_4 (Merck,100731)
18. Πιπέτες, τιπάκια, eppendorf

Διαλύματα Εργασίας:

- *Διάλυμα κιτρικών αλάτων (acid-citrate-dextrose, ACD):*

Το διάλυμα ACD περιέχει 42mM κιτρικού οξέος, 75mM κιτρικού νατρίου και 139mM D(+) γλυκόζης. Συγκεκριμένα, ζυγίζονται 0,8g κιτρικού οξέος, 2,2g κιτρικού νατρίου και 2,5 g D(+) γλυκόζης και διαλύονται σε 100mL απεσταγμένου ύδατος. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C για 1 μήνα.

- *Διάλυμα οξαλικού αμμωνίου (1% w/v $(NH_4)_2C_2O_4$):*

1 g οξαλικού αμμωνίου διαλύεται σε 100 mL απεσταγμένου νερού και το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C.

- *Διάλυμα φυσιολογικού ορού (saline) (0,9% w/v NaCl):*

Το διάλυμα είναι του εμπορίου και φυλάσσετε σε θερμοκρασία δωματίου.

- *Διάλυμα 5 mM TRAP-6:*

Για την παρασκευή διαλύματος stock του αγωνιστή TRAP-6 συγκέντρωσης 5mM, η ουσία διαλύθηκε σε τελικό όγκο 1,335mL φυσιολογικού ορού, σύμφωνα με τη σχέση C=m/(Mr·V). Αρχικά προστέθηκαν 335μL απευθείας στο φιαλίδιο παραλαβής για την πλήρη διάλυση της ουσίας χωρίς απώλειες, και στη συνέχεια το διάλυμα μεταφέρθηκε σε σωληνάριο eppendorf 2mL, όπου συμπληρώθηκε ο υπόλοιπος όγκος.

- *Διάλυμα εργασίας 1 mM TRAP-6:*

Από το διάλυμα stock (5mM) λήφθηκαν 200μL και αραιώθηκαν με 800μL φυσιολογικού ορού, ώστε να προκύψει τελικό διάλυμα 1mM σε όγκο 1 mL.

- *Διάλυμα αγωνιστή AA:*

100mg αραχιδονικού οξέος (MW = 304,47g/mol) διαλύονται σε 4,1mL απόλυτης αιθανόλης, δίνοντας διάλυμα συγκέντρωσης 80mM, από το οποίο παρασκευάζονται 10 eppendorf των 100μL (stock). Από το stock πραγματοποιείται αραίωση για την παρασκευή διαλύματος εργασίας 50mM με ανάμιξη 62,5μL από το stock διάλυμα (80mM) με 37,5μL απόλυτης αιθανόλης, ώστε ο τελικός όγκος να είναι 100μL. Τέλος,

3μL από το διάλυμα των 50mM προστίθενται σε τελικό όγκο 500μL, αποδίδοντας τελική συγκέντρωση 300μM στο πείραμα.

- *Διάλυμα εργασίας 1 mM ADP:*

Λήφθηκαν 100μL από διάλυμα stock 10mM ADP και αραιώθηκαν με 900μL φυσιολογικού ορού, ώστε να προκύψει τελικό διάλυμα όγκου 1mL και συγκέντρωσης 1mM.

- *Διάλυμα διχρωμικού καλίου για καθαρισμό κυψελίδων:*

Ζυγίστηκαν 25g $K_2Cr_2O_7$ και προστέθηκαν σε ποτήρι ζέσεως με 20 mL απεσταγμένου νερού υπό ανάδευση. Στη συνέχεια, σε μαγνητικό αναδευτήρα προστέθηκαν σταδιακά 475mL πυκνού H_2SO_4 υπό συνεχή ανάδευση. Το μίγμα αναδεύτηκε έως πλήρη διάλυση και ομογενοποίηση, μεταφέρθηκε σε γυάλινη φιάλη και αφέθηκε να ψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου.

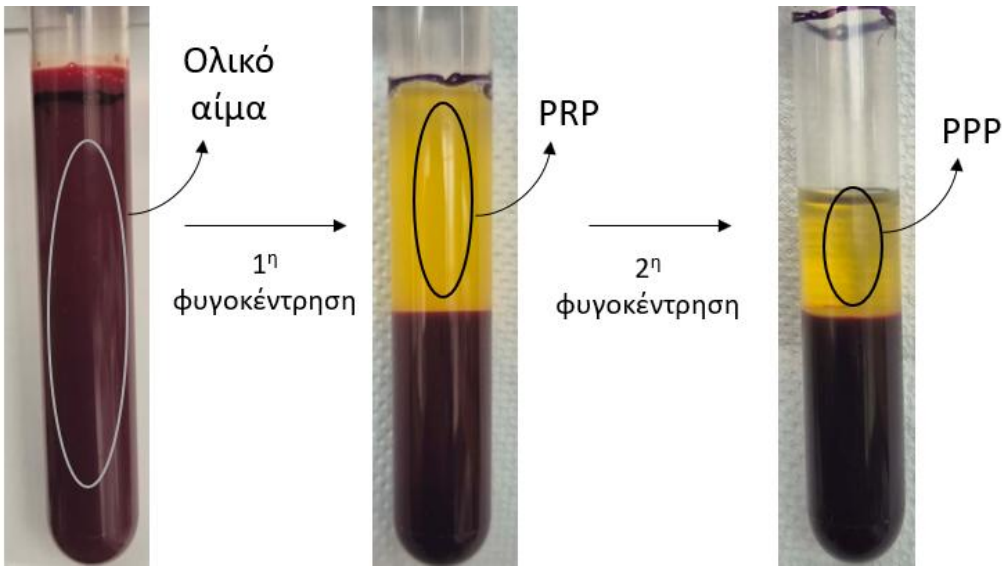
Πειραματική Πορεία

Η συλλογή του αίματος πραγματοποιείται τις πρωινές ώρες από φαινομενικά υγιείς εθελοντές, οι οποίοι έχουν ενημερωθεί πλήρως και έχουν δώσει τη συγκατάθεσή τους για τη χρήση του αίματος στα πειράματα. Οι δότες δεν έχουν λάβει αντιθρομβωτικά ή αντιφλεγμονώδη φάρμακα για τουλάχιστον δύο εβδομάδες πριν από την αιμοληψία. Όλοι οι συμμετέχοντες προσήλθαν μετά από 12ωρη νηστεία, έχοντας αποφύγει την κατανάλωση καφεΐνης. Η αιμοληψία γίνεται με τη χρήση βελόνας τύπου «πεταλούδα» και εκτελείται με ήπιο τρόπο, ώστε να αποφευχθεί η στάση του αίματος ή η δημιουργία αφρού. Το δείγμα συλλέγεται σε σωληνάρια πολυπροπυλενίου που περιέχουν 1mL διάλυμα κιτρικών αλάτων (ACD) ως αντιπηκτικό, στο οποίο προστίθενται 9mL περιφερικού αίματος (αναλογία 1:10 v/v).

<u>Απομόνωση και παρασκευή πλάσματος πλούσιου σε αιμοπετάλια (PRP)</u>

Η διαδικασία που εφαρμόζεται βασίζεται στο πρωτόκολλο του Ερευνητικού Κέντρου Αθηροθρόμβωσης (Koutsaliaris et al., 2024).

1. Αρχικά, συλλέγονται 20mL φλεβικού αίματος από περιφερική φλέβα, σε δοκιμαστικούς σωλήνες πολυπροπυλενίου, στους οποίους έχει προστεθεί αντιπηκτικό διάλυμα ACD, σε αναλογία 1:9 v/v.
2. Τα δείγματα υποβάλλονται σε φυγοκέντρηση στις 900rpm για 15 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, σε φυγόκεντρο πάγκου.
3. Στη συνέχεια, λαμβάνονται προσεκτικά περίπου τα 2/3 του υπερκειμένου, το οποίο αντιστοιχεί στο πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP), και μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι πολυπροπυλενίου. Καταγράφεται ο συνολικός όγκος του PRP.
4. Η υπόλοιπη ποσότητα του πλάσματος φυγοκεντρείται εκ νέου, αυτή τη φορά στις 3100 rpm (1500 × g) για 20 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Το υπερκείμενο που απομένει, γνωστό ως PPP (πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια), συλλέγεται και μεταφέρεται επίσης σε ξεχωριστό σωληνάκι πολυπροπυλενίου, ενώ καταμετράται ο όγκος του **(Εικόνα 18)**.



Εικόνα 18: Διαχωρισμός PPP και PRP.

6. Πραγματοποιείται προσδιορισμός του αριθμού των αιμοπεταλίων:

i. Σε ένα σωληνάκι eppendorf προστίθενται 190 μL διαλύματος οξαλικού αμμωνίου

και 10μL από το δείγμα PRP. Το μείγμα αναδεύεται ήπια μέχρι να επιτευχθεί πλήρης ομογενοποίηση (τελική αναλογία αραίωσης 1:20 v/v).

ii. Από το αραιωμένο εναιώρημα, λαμβάνονται 10μL και τοποθετούνται στις εσοχές της πλάκας Neubauer. Η πλάκα επωάζεται για 15 λεπτά εντός τρυβλίου Petri, το οποίο περιέχει ένα μικρό κομμάτι εμποτισμένου βαμβακιού ώστε να διατηρείται η υγρασία κατά την επώαση.

iii. Η μέτρηση των αιμοπεταλίων πραγματοποιείται με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου φωτεινού πεδίου (μεγέθυνση 40Χ). Καταμετρώνται τα αιμοπετάλια σε πέντε μεσαίου μεγέθους τετράγωνα της πλάκας Neubauer: στα τέσσερα στις γωνίες και στο κεντρικό. Ο τελικός αριθμός των αιμοπεταλίων (plts)/μL υπολογίζεται σύμφωνα με τον ακόλουθο τύπο:

$$Cplts = (Μέσος\ όρος\ αιμοπεταλίων\ στα\ 5\ τετράγωνα) \times 1000\ plts/mL$$

7. Με βάση τον αριθμό αιμοπεταλίων που υπολογίστηκε προηγουμένως, καθορίζεται η ποσότητα του PPP που απαιτείται για την αραίωση του PRP, ώστε να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση αιμοπεταλίων ίση με 250.000/μL. Ο υπολογισμός γίνεται σύμφωνα με την εξίσωση:

$$Cαρχ. \times VPRP = Cτελ. \times (VPRP + VPPP)$$

Η διαδικασία της συσσώρευσης που ακολουθείται είναι η εξής:

A. Το συσσωρευόμετρο τίθεται σε λειτουργία αρκετή ώρα πριν την ανάλυση, ώστε η θερμοκρασία να έχει σταθεροποιηθεί στους 37°C, όπως απαιτείται κατά τη διάρκεια της μέτρησης συσσώρευσης αιμοπεταλίων.

B. Στο λογισμικό Aggrolink (version 8.0) πραγματοποιούνται οι κατάλληλες ρυθμίσεις ανάλογα με τον τύπο της υπό εξέταση ουσίας και τον αγωνιστή που θα χρησιμοποιηθεί.

C. Προετοιμάζονται δείγματα αναφοράς σε αριθμό αντίστοιχο με τα ενεργά κανάλια του οργάνου. Κάθε αναφορά περιέχει 500μL PPP. Τα δείγματα τοποθετούνται στη θέση “reference” της συσκευής και παραμένουν εκεί καθ’ όλη τη διάρκεια του πειράματος.

D. Οι κυψελίδες που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν καθαρίζονται σχολαστικά, ενώ κατά το χειρισμό τους χρησιμοποιούνται γάντια μίας χρήσης, με σκοπό την

αποφυγή επιμολύνσεων και παραγόντων που θα μπορούσαν να επηρεάσουν την αξιοπιστία της οπτικής καταγραφής.

Ε. Σε μία από τις κυψελίδες τοποθετείται το control δείγμα, το οποίο περιέχει PRP και τον διαλύτη της εκάστοτε ουσίας. Εφόσον ο διαλύτης είναι DMSO, χρησιμοποιείται σε συγκέντρωση ≤0.4% λόγω της κυτταροτοξικότητάς του. Ο συνολικός όγκος κάθε δείγματος είναι 500μL και περιλαμβάνει: όγκο PRP, όγκο διαλύτη ή αγωνιστή και όγκο του εξεταζόμενου παράγοντα **(Πίνακας 3)**.

F. Η κυψελίδα με το PRP τοποθετείται στη σχετική θέση του οργάνου. Πραγματοποιείται ορισμός της γραμμής βάσης (baseline). Ακολουθεί επώαση του δείγματος για 3 λεπτά, και στη συνέχεια προστίθεται ο αγωνιστής. Η καταγραφή της συσσώρευσης διαρκεί 5 λεπτά.

G. Η % αναστολή στη συσσώρευση υπολογίζεται ως εξής:

{[ποσοστό συσσώρευσης απουσία αγωνιστή – ποσοστό συσσώρευσης παρουσία αγωνιστή]/ποσοστό συσσώρευσης απουσία αγωνιστή}x100

Η. Μετά το τέλος του πειράματος οι κυψελίδες τοποθετούνται στο διάλυμα διχρωμικού καλίου ($K_2Cr_2O_7$) για μερικές μέρες, έπειτα ξεπλένονται με άφθονο νερό και τέλος τοποθετούνται στο πυριαντήριο για να στεγνώσουν.

Πίνακας 3: Τελικές συγκεντρώσεις των αγωνιστών στην LTA.

ΑΓΩΝΙΣΤΗΣ	**ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ**
ADP	10μM
TRAP-6	10μM
AA	300μM

5.4 Έλεγχος Κυτταροτοξικότητας

Ο καρκίνος του μαστού περιλαμβάνει διαφορετικούς τύπους, με βασική διάκριση τους όγκους που είναι θετικοί ή αρνητικοί στους υποδοχείς οιστρογόνων (Estrogen Receptor - ER), γεγονός που επηρεάζει τη συμπεριφορά και την ανταπόκρισή τους στη θεραπεία. Η ολευρωπεΐνη, παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς εμφανίζει πολύ μικρή τοξικότητα στα φυσιολογικά κύτταρα και δρα επιλεκτικά στα καρκινικά κύτταρα του μαστού προκαλώντας τον προγραμματισμένο κυτταρικό τους θάνατο. Παράλληλα, αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό τους καθυστερώντας την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και μειώνει τη δραστηριότητα πρωτεϊνών που ευνοούν την ανάπτυξη και την επιβίωση του όγκου, όπως ο NF-κB και η κυκλίνη D1. Η αντικαρκινική της δράση είναι εντονότερη στους ER-αρνητικούς όγκους, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από πιο επιθετική συμπεριφορά και περιορισμένες θεραπευτικές επιλογές. Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν ότι η ολευρωπεΐνη μπορεί να συμβάλει στη ρύθμιση βασικών μηχανισμών ανάπτυξης του καρκίνου του μαστού και να αποτελέσει υποψήφιο συμπληρωματικό παράγοντα στην αντικαρκινική θεραπεία (Elamin et al., 2013).

Με βάση τα δεδομένα της βιβλιογραφίας, επιλέχθηκε η κυτταρική σειρά MCF-7, η οποία αποτελεί καθιερωμένο πρότυπο ER-θετικού καρκίνου του μαστού, με στόχο τη διερεύνηση της αντικαρκινικής δράσης των εκχυλισμάτων μας.

Εξοπλισμός και αντιδραστήρια:

- PBS - Phosphate Buffered Saline (Capricorn, CP24-7532)
- Θρυψίνη (Biowest, MS02KV1005)
- Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας – Dulbeccos Modified Eagle Medium/DMEM (Gibco, A5256701)
- Fetal Bovine Serum – FBS (Gibco, 16000-044): μετά από απενεργοποίηση για 30min στους 56°C
- Penicillin–Streptomycin (Biowest, MS02O21006)
- Αιθανόλη 70%- CH_3CH_2OH (Pan Reac Applichem, UN1170)
- Τρυβλία κυτταροκαλλιέργειας (Thermo, 150466)

- Διμεθυλοσουλφοξείδιο - DMSO (C_2H_6OS, Thermo Fisher Scientific, D/4121/PB15)
- Cryovials (SARSTEDT, 72.379)
- Φυγόκεντρος πάγκου (ROTOFIX 32 Hettrich)
- Θάλαμος νηματικής ροής -hood (NUAIR, CLASS II)
- Επωαστικός θάλαμος κυττάρων - Incubator (Binder, 37°C, 5% CO_2)
- Πιπέτες και αποστειρωμένα tips
- Σιφώνια (Sarsterdt,5,10,25ml)
- Φίλτρο μικροδιήθησης (Membrane Solutions, 290119102)
- Ανάστροφο μικροσκόπιο (A.KRUSS, optonic)
- Υδατόλουτρο (memmert)
- Falcon σωληνάκια (Sarsterdt, 15mL-62554502, 50mL-62547255)
- Πολυπιπέτες και αποστειρωμένα tips

Ετοιμασία εργαστηριακών διαλυμάτων:

- *Πλήρες θρεπτικό υλικό:*

Για την παρασκευή του πλήρους θρεπτικού υλικού, στο βασικό θρεπτικό μέσο προστέθηκε 10% (v/v) ορός εμβρύου μόσχου (Fetal Bovine Serum, FBS) και 1% (v/v) διάλυμα Penicillin–Streptomycin. Το διάλυμα ανακινήθηκε ελαφρώς για την ομογενοποίησή του και αποθηκεύτηκε στους 4 °C. Πριν από κάθε χρήση, το θρεπτικό υλικό θερμάνθηκε σε υδατόλουτρο στους 37 °C. Έγινε φιλτράρισμα στον ορό πριν την χρήση μέσω φίλτρων 0,22 μm.

- *Freezing medium:*

Αποτελείται από 50% FBS, 30% πλήρες θρεπτικό υλικό και 20% DMSO.

5.4.α Ετοιμασία καλλιέργειας

Οι κυτταρικές σειρές διατηρούνται σε cryovials σε υγρό άζωτο. Για την ετοιμασία της καλλιέργειας τα cryovials απομακρύνονται από το υγρό άζωτο και ακολουθεί άμεση απόψυξη των κυττάρων με εμβάπτιση σε υδατόλουτρο στους 37 °C έως την πλήρη απόψυξη. Στη συνέχεια, το κυτταρικό εναιώρημα μεταφέρεται σε τρυβλία καλλιέργειας που περιέχουν προθερμασμένο πλήρες θρεπτικό υλικό. Τα κύτταρα

επωάζονται για χρονικό διάστημα 4–6 ωρών, μετά το πέρας του οποίου πραγματοποιείται αλλαγή του θρεπτικού υλικού, με σκοπό την απομάκρυνση του διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO). Τα κύτταρα τοποθετούνται σε επωαστικό θάλαμο (incubator) υπό τις κατάλληλες συνθήκες καλλιέργειας (37°C, 5% CO_2), με σκοπό την ανάπτυξή τους και τη χρήση τους σε περαιτέρω πειραματικές διαδικασίες.

5.4.β Splitting

Αρχή της μεθόδου

Η υποκαλλιέργεια κυττάρων (splitting) αποτελεί βασική τεχνική της κυτταροκαλλιέργειας και εφαρμόζεται με σκοπό τη διατήρηση των κυττάρων σε βιώσιμη κατάσταση και σε φάση εκθετικής ανάπτυξης. Η μέθοδος βασίζεται στην ενζυμική αποκόλληση των προσκολλημένων κυττάρων από την επιφάνεια ανάπτυξης μέσω θρυψίνης, ακολουθούμενη από αραίωση και επαναδιασπορά τους σε νέα καλλιεργητικά σκεύη. Με τον τρόπο αυτό αποτρέπεται η υπερπληθυσμιακή πυκνότητα, η οποία δύναται να επηρεάσει αρνητικά τη βιωσιμότητα και τη φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων **(Εικόνα 19)**.

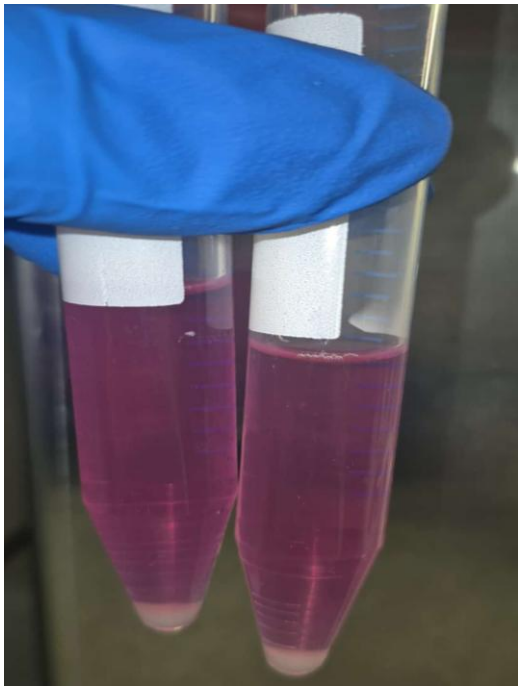
Εικόνα 19: Ταπήτιο κυττάρων MCF-7 (φωτογραφία σε ανάστροφο μικροσκόπιο).

<u>Πειραματική διαδικασία</u>

Τα κύτταρα, μετά την απόψυξή τους, επωάστηκαν έως ότου επιτύχουν την επιθυμητή συγκέντρωση ανάπτυξης (confluency) και στη συνέχεια παρατηρήθηκαν μικροσκοπικά για τον έλεγχο της μορφολογίας και της βιωσιμότητάς τους. Στη συνέχεια, το τρυβλίο μεταφέρεται σε θάλαμο νηματικής ροής – HOOD υπό άσηπτες συνθήκες και απομακρύνεται το παλαιό θρεπτικό υλικό. Ακολουθεί διπλή έκπλυση με PBS, με σκοπό την πλήρη απομάκρυνση υπολειμμάτων ορού που αναστέλλουν τη δράση της θρυψίνης.

Στη συνέχεια προστίθεται κατάλληλος όγκος θρυψίνης, ώστε να καλυφθεί η επιφάνεια ανάπτυξης, και τα κύτταρα επωάζονται για σύντομο χρονικό διάστημα στον incubator μέχρι την αποκόλλησή τους, η οποία επιτυγχάνεται «χτυπώντας» στα πλάγια το τρυβλίο. Η αποκόλληση επιβεβαιώνεται μικροσκοπικά, ενώ η δράση της θρυψίνης αδρανοποιείται με την προσθήκη πλήρους θρεπτικού υλικού. Το κυτταρικό αιώρημα συλλέγεται και φυγοκεντρείται, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ιζήματος κυττάρων. Το υπερκείμενο απομακρύνεται προσεκτικά και το ίζημα επαναδιαλύεται σε φρέσκο θρεπτικό υλικό **(Εικόνα 20)**.

Ακολούθως, πραγματοποιείται αραίωση των κυττάρων και επαναδιασπορά τους σε νέα τρυβλία με προκαθορισμένη αναλογία split. Τα καλλιεργητικά σκεύη ανακινούνται ήπια για την ομοιόμορφη κατανομή των κυττάρων και τοποθετούνται εκ νέου στον incubator.



Εικόνα 20: Ίζημα κυττάρων μετά τη φυγοκέντρηση.

5.4.γ Πάγωμα Κυττάρων

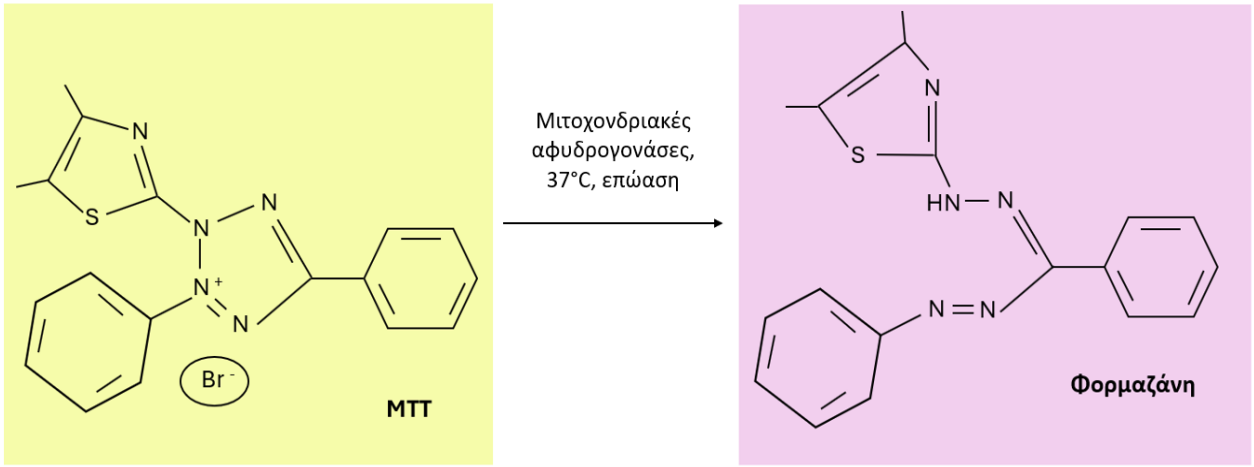
Για την κρυοσυντήρηση, τα κύτταρα συλλέχθηκαν μετά από διαδικασία αποκόλλησης και φυγοκέντρησης, με στόχο συγκέντρωση περίπου 2×10^6 κυττάρων ανά cryovial. Το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε πλήρες θρεπτικό υλικό και freezing medium. Το τελικό εναιώρημα κατανεμήθηκε σε cryovials, τα οποία τοποθετήθηκαν αρχικά σε ελεγχόμενη ψύξη και στη συνέχεια αποθηκεύτηκαν στους −80 °C. Για μακροχρόνια φύλαξη, τα cryovials μεταφέρθηκαν σε υγρό άζωτο.

5.4.δ Δοκιμασία κυτταρικής βιωσιμότητας MTT (MTT assay)

Αρχή της μεθόδου

Η δοκιμασία MTT αποτελεί μία από τις πλέον διαδεδομένες μεθόδους εκτίμησης της κυτταρικής βιωσιμότητας και βασίζεται στη μεταβολική δραστηριότητα των ζωντανών κυττάρων. Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην ικανότητα των μιτοχονδριακών ενζύμων να αναγάγουν την κίτρινη, υδατοδιαλυτή ένωση MTT, άλας τετραζολίου, [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] σε μωβ, αδιάλυτη φορμαζάνη **(Εικόνα 21)**. Η παραγόμενη φορμαζάνη συσσωρεύεται μόνο σε

βιώσιμα κύτταρα, γεγονός που επιτρέπει την έμμεση ποσοτικοποίηση του αριθμού τους. Στη συνέχεια, το προϊόν διαλυτοποιείται και η απορρόφησή του μετράται φασματοφωτομετρικά στα 570 nm. Η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη της κυτταρικής βιωσιμότητας και χρησιμοποιείται ευρέως σε καλλιέργειες κυττάρων σε πλάκες πολλαπλών φρεατίων (Kumar et al., 2018).



Εικόνα 21: Αντίδραση MTT.

Αντιδραστήρια και εξοπλισμός

- Κυτταρική σειρά MCF-7 σε πλήρες θρεπτικό υλικό
- Εκχυλίσματα φύλλων ελιάς (stock 10 mg/mL σε DMSO)
- Πλήρες - Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας – Dulbeccos Modified Eagle Medium/DMEM (Gibco, 41966-029)
- PBS - Phosphate Buffered Saline (Capricorn, CP24-7532)
- Trypan Blue (Sigma, T8154, USA)
- Αιθανόλη 70%- CH_3CH_2OH (Pan Reac Applichem, UN1170)
- MTT (Sigma-Aldrich/Merck, M2128, 158990010)
- Διμεθυλοσουλφοξείδιο - DMSO (C_2H_6OS, Thermo Fisher Scientific, D/4121/PB15)
- Πλάκες καλλιέργειας 96 θέσεων (SARSTEDT, 83.3924)
- Φυγόκεντρος πάγκου (ROTOFIX 32 Hettrich)

- Θάλαμος νηματικής ροής -hood (NUAIR, CLASS II)
- Επωαστικός θάλαμος κυττάρων - Incubator (Binder, 37°C, 5% CO_2)
- Οπτικό μικροσκόπιο (Olympus BX41)
- Πλάκα Neubauer
- Φωτόμετρο BIOTEK- EPOCH 2, microplate reader, Metrolad
- Ανάστροφο μικροσκόπιο (A.KRUSS, optonic)
- Υδατόλουτρο (memmert)
- Falcon σωληνάκια (Sarsterdt, 15mL-62554502, 50mL-62547255)
- Σιφώνια (Sarsterdt,5,10,25mL)
- Πολυπιπέτες και αποστειρωμένα tips
- Φίλτρο μικροδιήθησης (Membrane Solutions, 290119102)

Ετοιμασία εργαστηριακών διαλυμάτων:

➢ *Πλήρες θρεπτικό υλικό:*

Για την παρασκευή του πλήρους θρεπτικού υλικού, στο βασικό θρεπτικό μέσο προστέθηκε 10% (v/v) ορός εμβρύου μόσχου (Fetal Bovine Serum-FBS) και 1% (v/v) διάλυμα Penicillin–Streptomycin. Το διάλυμα ανακινήθηκε ελαφρώς για την ομογενοποίησή του και αποθηκεύτηκε στους 4 °C. Πριν από κάθε χρήση, το θρεπτικό υλικό θερμάνθηκε σε υδατόλουτρο στους 37 °C. Έγινε φιλτράρισμα στον ορό πριν την χρήση μέσω φίλτρων 0,22 μm.

- *Διάλυμα MTT – stock (5 mg/mL):*
  Παρασκευάστηκε διάλυμα stock MTT (5 mg/mL). Συγκεκριμένα ζυγίστηκαν 0,10mg MTT και διαλύθηκαν σε 20mL PBS 10mM (1X). Το τελικό διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C.
- *Διάλυμα εργασίας MTT:*
  Την ημέρα του πειράματος παρασκευάζεται διάλυμα εργασίας MTT με αραίωση του stock διαλύματος (5mg/mL) σε αναλογία 1:10 με πλήρες θρεπτικό υλικό. Για πλάκα 96 θέσεων παρασκευάζονται συνολικά 10mL διαλύματος εργασίας, με ανάμιξη 1mL MTT stock και 9mL πλήρους θρεπτικού υλικού.
- *Διαλύματα εργασίας εκχυλισμάτων:*
  Από stock διαλύματα συγκέντρωσης 10mg/mL για τα εκχυλίσματα GP-OL (1)–(7) παρασκευάστηκε διάλυμα 800μg/mL (διπλάσιας συγκέντρωσης από την τελική

μέγιστη συγκέντρωση που θα υπήρχε στα wells), για καθένα από τα εκχυλίσματα. Οι υπολογισμοί των όγκων πραγματοποιήθηκαν με βάση τον τύπο $C_1V_1 = C_2V_2$ και τα διαλύματα παρασκευάστηκαν σε αποστειρωμένα eppendorf με πλήρες θρεπτικό υλικό.

Πειραματική διαδικασία

1η ημέρα:

Στρώσιμο κυττάρων

Η διαδικασία ξεκίνησε με αποκόλληση και φυγοκέντρηση των κυττάρων, όπως κατά τη συνήθη διαδικασία splitting που περιγράφηκε προηγούμενα. Το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 1mL πλήρους θρεπτικού υλικού.

Μετρηση κυτταρων:

Για την καταμέτρηση των κυττάρων, 10μL κυτταρικού αιωρήματος αναμίχθηκαν με 10μL Trypan Blue και το μίγμα τοποθετήθηκε σε πλάκα Neubauer.

Η καταμέτρηση πραγματοποιήθηκε σε προκαθορισμένες περιοχές και ο αριθμός των κυττάρων/mL υπολογίστηκε σύμφωνα με τον τύπο:

$$Cells/mL = (\text{μέσος όρος κυττάρων / τετράγωνο}) \times 2 \times 10^4$$

(ο παράγοντας 2 αντιστοιχεί στην αραίωση με Trypan Blue)

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αραίωση ώστε να παρασκευαστεί διάλυμα εργασίας συγκέντρωσης 30.000 κύτταρα/mL, ώστε κάθε θέση της πλάκας να περιέχει 3.000 κύτταρα σε τελικό όγκο 100μL. Η αραίωση υπολογίστηκε με τον τύπο $C_1V_1 = C_2V_2$.

Σε πλάκα 96 θέσεων προστέθηκαν 100μL κυτταρικού αιωρήματος, ακολούθησε επώαση για 24 ώρες στους 37°C σε ατμόσφαιρα 5% CO_2 ώστε να επιτραπεί η προσκόλληση των κυττάρων.

2η ημέρα:

Προσθήκη δοκιμαζόμενων εκχυλισμάτων:

Τη δεύτερη ημέρα παρασκευάστηκαν τα διαλύματα εργασίας των εκχυλισμάτων.

Από το διάλυμα των 400μg/mL προστέθηκαν 100μL στα αντίστοιχα wells που περιείχαν ήδη 100μL κυττάρων. Ακολούθησε διαδοχική αραίωση εντός της πλάκας, με μεταφορά 100μL από well σε well, ώστε να προκύψουν οι τελικές συγκεντρώσεις: 400, 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,75 και 3,125μg/mL. Το υπόλοιπο διάλυμα απορρίφθηκε.

Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα χωρίς προσθήκη ουσίας, ενώ ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα με τον αντίστοιχο διαλύτη (DMSO) χωρίς ουσία. Ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε στην αποφυγή δημιουργίας φυσαλίδων κατά το πιπετάρισμα. Η πλάκα επωάστηκε εκ νέου.

3η ημέρα:

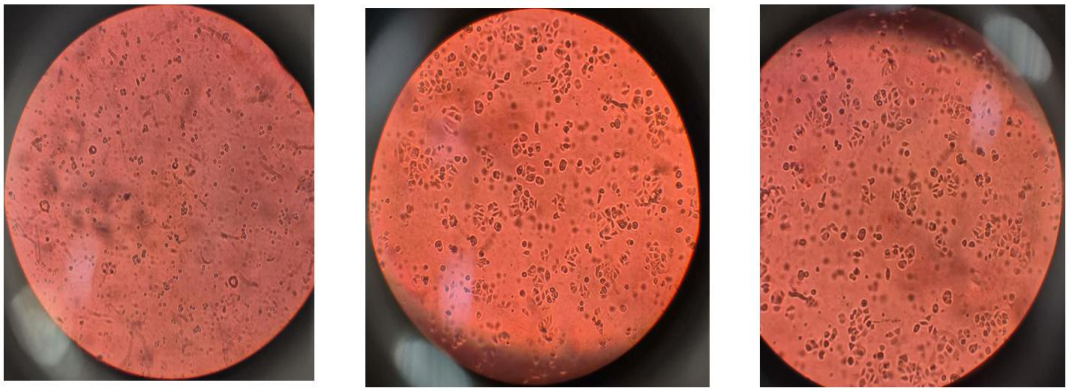
Προσθήκη MTT και μέτρηση

Την επόμενη μέρα παρασκευάστηκε διάλυμα εργασίας MTT σε αναλογία 1:10 με πλήρες θρεπτικό υλικό. Μετά την ολοκλήρωση της επώασης με τις ουσίες, το θρεπτικό υλικό αφαιρέθηκε από την πλάκα και τα κύτταρα εκπλύθηκαν μία φορά με PBS. Στη συνέχεια προστέθηκαν 100μL διαλύματος MTT σε κάθε θέση. Η πλάκα επωάστηκε για 4 ώρες στους 37°C. Μετά το πέρας της επώασης, το περιεχόμενο των wells απομακρύνθηκε και προστέθηκαν 100μL DMSO για τη διαλυτοποίηση των κρυστάλλων φορμαζάνης.

Η απορρόφηση μετρήθηκε σε μήκος κύματος 570nm. Η κυτταρική βιωσιμότητα εκφράστηκε ως ποσοστό (%) σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα, ο οποίος θεωρήθηκε ως 100%.

Ποσοστό βιωσιμότητας (%) = (Οπτική πυκνότητα δείγματος / Οπτική πυκνότητα μάρτυρα) × 100

Η αξιολόγηση της κυτταροτοξικότητας πραγματοποιήθηκε σε δύο χρονικά σημεία, στις 24 και 48 ώρες μετά την προσθήκη των υπό μελέτη εκχυλισμάτων, προκειμένου να εκτιμηθεί η χρονικά εξαρτώμενη επίδρασή τους στη βιωσιμότητα των κυττάρων μέσω της δοκιμασίας MTT **(Εικόνα 22)**.



Κύτταρα σε πλάκα 96 θέσεων – Έναρξη καλλιέργειας

Κύτταρα σε πλάκα 96 θέσεων – 24 ώρες επώασης

Κύτταρα σε πλάκα 96 θέσεων – 48 ώρες επώασης

Εικόνα 22: Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες κυττάρων αμέσως μετά την επίστρωσή τους στην πλάκα καλλιέργειας και μετά από 24 και 48 ώρες επώασης.

5.5 Νέτωση

Η νέτωση (NETosis) αποτελεί έναν αμυντικό μηχανισμό του ανοσοποιητικού συστήματος, κατά τον οποίο κυρίως τα ουδετερόφιλα απελευθερώνουν δομές γνωστές ως εξωκυττάριες παγίδες ουδετερόφιλων (NETs), με στόχο την ακινητοποίηση και εξουδετέρωση παθογόνων μικροοργανισμών, όπως βακτήρια, ιοί και μύκητες. Ο μηχανισμός αυτός έχει συσχετιστεί τόσο με φλεγμονώδεις όσο και με λοιμώδεις καταστάσεις, γεγονός που τον καθιστά σημαντικό πεδίο μελέτης για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών στρατηγικών. Παράλληλα, τα τελευταία χρόνια διερευνάται ο ρόλος φυσικών προϊόντων στη νέτωση, καθώς φαίνεται να μπορούν να τροποποιήσουν το σχηματισμό και την απελευθέρωση των NETs (Liu et al., 2024).

5.5.α Απομόνωση Ουδετερόφιλων

Αρχή της μεθόδου

Η διερεύνηση και ποσοτικοποίηση των εξωκυττάριων παγίδων ουδετερόφιλων (NETs) βασίζεται συνήθως στην *in vitro* διέγερση των ουδετερόφιλων υπό ορισμένες συνθήκες. Σε πρώτο στάδιο, τα ουδετερόφιλα απομονώνονται από ανθρώπινο περιφερικό αίμα, συνήθως με τεχνικές φυγοκέντρησης και διαχωρισμού μέσω

βαθμίδωσης πυκνότητας. Στη συνέχεια, τα κύτταρα διατηρούνται σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο ώστε να εξασφαλιστεί η βιωσιμότητά τους (Liu et al., 2024).

Έπειτα, επάγεται η ενεργοποίησή τους με τη χρήση συγκεκριμένων παραγόντων, όπως ο PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate,Φορβόλη 12-μυριστική 13-οξικό), ο οποίος προάγει το σχηματισμό NETs. Η ανίχνευση και αξιολόγηση των NETs πραγματοποιείται με διαφορετικές προσεγγίσεις, όπως η μικροσκοπία φθορισμού με χρήση ειδικών χρωστικών που δεσμεύονται στο DNA (π.χ. DAPI), καθώς και με ποσοτικές τεχνικές που μετρούν το εξωκυττάριο DNA ή ειδικούς βιοδείκτες των NETs, μέσω της μεθόδου ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) (Liu et al., 2024).

Αντιδραστήρια και εξοπλισμός

- Ηπαρίνη (LEO Pharma, 78918404/2)
- HistopaqueR-1119, Sigma11191-100 mL, sterile-Filtered, density d=1.119g/mL
- Ficoll-paque™ Cytiva Plus endotoxin tested (<0.12 Eu/mL), density 1.077±0.0001 g/mL
- Πιπέτα Pasteur (Celltreat Scientific, 229275)
- Χλωριούχο νάτριο - NaCl (Merck ,1.06404.1000)
- Μονοφωσφορικό νάτριο – Na_2HPO_4 (Merck, 1.06585.1000)
- Φωσφορικό κάλιο – KH_2PO_4 (Merck, 1.04873.1000)
- Διμεθυλοσουλφοξείδιο - DMSO (C_2H_6OS, Thermo Fisher Scientific, D/4121/PB15)
- Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA),Φορβόλη- $C_{36}H_{56}O_8$, (Merck, P8139)
- Φορμαλδεΰδη CH_2O (Merck, Z0347999519)
- Θρεπτικό υλικό - RPMI (Merck, R6504)
- Καλυπτρίδες-Glass Coverslips (ThermoFisher Scientific,CB00130RA1, 18×18mm)
- Πλάκες καλλιέργειας 24 θέσεων (SARSTEDT, 83.3922)
- Heating Serum (Thermo Fisher Scientific, 10082147)
- Πλάκα Neubauer
- Trypan Blue (Sigma, T8154, USA)
- Φυσιολογικός ορός (Clinofar, 0344)

- Οπτικό μικροσκόπιο (Olympus BX41)
- Ανάστροφο μικροσκόπιο (A.KRUSS, optonic)
- Υδατόλουτρο (memmert)
- Επωαστικός θάλαμος κυττάρων - Incubator (Binder, 37°C, 5% CO_2)
- Falcon σωληνάκια (Sarsterdt, 15mL-62554502, 50mL-62547255)
- Σιφώνια (Sarsterdt, 5,10mL)
- Φυγόκεντρος πάγκου (ROTOFIX 32 Hettrich)
- Θάλαμος νηματικής ροής -hood (NUAIR, CLASS II)
- Επωαστικός θάλαμος κυττάρων - Incubator (Binder, 37°C, 5% CO_2)
- Πολυπιπέτες και αποστειρωμένα tips

Ετοιμασία εργαστηριακών διαλυμάτων:

➢ *Ρυθμιστικό διάλυμα PBS 12,5mM*

Αρχικά παρασκευάζεται το συμπυκνωμένο διάλυμα PBS 100mM (10X) με τελικό pH 6,8. Για τον σκοπό αυτό διαλύονται σε 1L δις απεσταγμένου νερού (ddH_2O) τα εξής: 80g NaCl, 2g KCl, 17,8g Na_2HPO_4 και 2,7g KH_2PO_4. Το διάλυμα ομογενοποιείται πλήρως, αποστειρώνεται και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου.

Στη συνέχεια, για την παρασκευή του PBS 1X (12,5mM), πραγματοποιείται αραίωση του αποστειρωμένου PBS 10X σε αναλογία 1:10 (v/v) με ddH_2O υπό στείρες συνθήκες. Ενδεικτικά, για τελικό όγκο 50mL, αναμιγνύονται 5mL PBS 10X με 45mL ddH_2O, κατά προτίμηση εντός θαλάμου νηματικής ροής (hood).

➢ *Διάλυμα εργασίας PMA 0,0167mM*

Για την παρασκευή του διαλύματος εργασίας, αρχικά χρησιμοποιήθηκε Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) σε ποσότητα 1mg, από το οποίο παρασκευάστηκε διάλυμα stock συγκέντρωσης 1,67mM με διάλυση σε DMSO. Στη συνέχεια, το stock διάλυμα αραιώθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών PBS 1X (12,5mM), ώστε να προκύψει διάλυμα εργασίας τελικής συγκέντρωσης 0,0167mM.

➢ *Διάλυμα 1 % DMSO σε PBS 12,5Mm*

Για την παρασκευή διαλύματος DMSO 1% (v/v), χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένο PBS 1X (12,5mM) ως διαλύτης. Συγκεκριμένα, σε σωληνάριο των 50mL προστέθηκαν

49,5mL PBS και ακολούθως 500μL DMSO, υπό άσηπτες συνθήκες. Το διάλυμα αναμίχθηκε καλά και διατηρήθηκε σε στείρο περιβάλλον μέχρι τη χρήση.

- *Διάλυμα φορμαλδεΰδης 8 % v/v:*

Για την παρασκευή διαλύματος φορμαλδεΰδης τελικής συγκέντρωσης 8% v/v από αρχικό διάλυμα 37% v/v, πραγματοποιείται αραίωση σε συνολικό όγκο 7 mL με ανάμιξη 1,5 mL φορμαλδεΰδης 37% v/v και 5,5 mL απεσταγμένου νερού. Από το προκύπτον διάλυμα λαμβάνονται 500μL και προστίθενται σε κάθε συνθήκη του πειράματος, ώστε να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση φορμαλδεΰδης 4% v/v στο πειραματικό δείγμα.

Πειραματική διαδικασία

Η συλλογή αίματος πραγματοποιείται τις πρωινές ώρες από υγιή άτομα, τα οποία δεν έχουν λάβει αντιθρομβωτική ή αντιφλεγμονώδη αγωγή. Όλοι οι συμμετέχοντες έχουν ενημερωθεί πλήρως και έχουν συναινέσει στη διεξαγωγή των πειραμάτων. Το περιφερικό αίμα συλλέγεται από εμφανείς φλέβες με τη χρήση πεταλούδας, με ήπιους χειρισμούς ώστε να αποφεύγεται η στάση ή ο σχηματισμός αφρού.

Λαμβάνονται περίπου 10mL αίματος, τα οποία μεταφέρονται σε σωληνάριο που περιέχει ηπαρίνη (40μL), και ακολουθεί ήπια ανάδευση. Από το δείγμα αυτό, 4mL αραιώνονται με 2mL φυσιολογικού ορού και μεταφέρονται σε νέο σωληνάριο. Στη συνέχεια, προστίθενται τα αντιδραστήρια Histopaque και Ficoll-Paque (3mL από το καθένα) με τρόπο που επιτρέπει τη δημιουργία διακριτών στρωμάτων για τον διαχωρισμό των κυττάρων. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 2100 rpm για 30 λεπτά.

Μετά τη φυγοκέντρηση έχει γίνει διαχωρισμός και παρατηρούμε 6 φάσεις, τα ουδετερόφιλα εντοπίζονται ως υπόλευκη στιβάδα κοντά στον πυθμένα του σωληναρίου **(Εικόνα 23)**. Η στιβάδα αυτή συλλέγεται και μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο, όπου προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα PBS (pH 7,4), και πραγματοποιείται δεύτερη φυγοκέντρηση στις 1100 rpm για 10 λεπτά με σκοπό την έκπλυση των κυττάρων. Μετά το τέλος της απορρίπτεται το υπερκείμενο, το ίζημα αποτελούν τα ουδετερόφιλα.

Υπό στείρες συνθήκες, στον θάλαμο νηματικής ροής (hood), τα ουδετερόφιλα επαναδιασπείρονται σε θρεπτικό μέσο - RPMI (1mL). Ο αριθμός και η βιωσιμότητα των κυττάρων προσδιορίζονται με τη χρήση πλάκας Neubauer και χρώσης Trypan Blue σε οπτικό μικροσκόπιο. Συγκεκριμένα τοποθετείται σε Eppendorf 15μL από τα

ουδετερόφιλα μαζί με 15μL βαφής Trypan Blue, από αυτό λαμβάνονται 10μL και τοποθετούνται στην πλάκα Neubauer. Ακολουθεί μέτρηση σε οπτικό μικροσκόπιο. Η καταμέτρηση πραγματοποιήθηκε σε 4 προκαθορισμένες περιοχές και ο αριθμός των κυττάρων/mL υπολογίστηκε σύμφωνα με τον τύπο:

$$Cells/mL = (\text{μέσος όρος κυττάρων} / 4) \times 20000$$

Στη συνέχεια, πραγματοποιούνται οι κατάλληλοι υπολογισμοί και αραιώσεις ώστε η τελική συγκέντρωση να φτάσει τα 10^6 κύτταρα/mL.

Τα κύτταρα κατανέμονται σε τρυβλία 24 θέσεων που περιέχουν καλυπτρίδες και διαμορφώνονται οι πειραματικές συνθήκες ως εξής: τυφλά δείγματα, καθώς και συνθήκες ηρεμίας (resting) και ενεργοποίησης (activated), τόσο για τους μάρτυρες όσο και για τα υπό μελέτη εκχυλίσματα. Σε κάθε θέση προστίθενται 10μL θερμαινόμενου ορού (heating serum) και 390μL θρεπτικού υλικού RPMI, ενώ ακολουθεί η προσθήκη 100μL ουδετερόφιλων και επώαση για 1 ώρα σε επωαστικό θάλαμο - Incubator. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται προσθήκη των υπό μελέτη εκχυλισμάτων σε όγκο 1,25μL από διάλυμα stock συγκέντρωσης 10mg/mL, ώστε η τελική συγκέντρωση να διαμορφωθεί στα 25μg/mL, και τα κύτταρα επωάζονται για επιπλέον 10 λεπτά. Έπειτα, στις θέσεις resting προστίθεται ο διαλύτης του PMA (1% DMSO σε PBS 12mM) ως μάρτυρας ηρεμίας, ενώ στις θέσεις activated προστίθεται PMA ως παράγοντας ενεργοποίησης. Ακολουθεί επώαση για 4 ώρες στον επωαστικό θάλαμο - Incubator.

Μετά την επώαση, πραγματοποιείται σταθεροποίηση των κυττάρων με προσθήκη φορμαλδεΰδης 500μL σε κάθε συνθήκη με τελική συγκέντρωση 4% v/v. Τα δείγματα καλύπτονται με αλουμινόχαρτο και παραμένουν στους 4°C για 1 ώρα. Τέλος, η φορμαλδεΰδη απομακρύνεται, προστίθεται PBS 12mM (500μL σε κάθε θέση) και τα δείγματα διατηρούνται σε ψύξη καλυμμένα με αλουμινόχαρτο μέχρι να ετοιμαστούν για φθοριστικό μικροσκόπιο.

Εικόνα 23: Διαχωρισμός κυττάρων του αίματος σε βαθμίδωση πυκνότητας.

5.5.β Ανοσοφθορισμός και Μικροσκοπική Παρατήρηση Εξωκυττάριων Παγίδων Ουδετερόφιλων (Neutrophil Extracellular Traps)

Αρχή της μεθόδου

Ο ανοσοφθορισμός αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη εργαστηριακή μέθοδο για τον εντοπισμό συγκεκριμένων μορίων μέσα σε κύτταρα ή ιστούς, αξιοποιώντας αντισώματα που φέρουν φθορίζουσες ουσίες. Το φαινόμενο του φθορισμού αναφέρεται στην εκπομπή φωτός από μια ουσία όταν αυτή διεγείρεται από ακτινοβολία μικρότερου μήκους κύματος(Christie, 2011).

Στην τεχνική αυτή χρησιμοποιείται συνήθως υπεριώδης ακτινοβολία, η οποία αλληλεπιδρά με τα ηλεκτρόνια των μορίων του φθοριοχρώματος, προκαλώντας τη διέγερσή τους. Καθώς τα ηλεκτρόνια επιστρέφουν στη βασική τους κατάσταση, απελευθερώνουν την ενέργεια που απορρόφησαν με τη μορφή φωτός. Ωστόσο, μέρος της ενέργειας αυτής χάνεται κατά τη διαδικασία, με αποτέλεσμα το εκπεμπόμενο φως να έχει μεγαλύτερο μήκος κύματος (δηλαδή χαμηλότερη ενέργεια) σε σύγκριση με το αρχικό διεγείρον φως (Christie, 2011).

Τα φθοριοχρώματα, γνωστά και ως φθορίζουσες χρωστικές, είναι ειδικά μόρια με την ικανότητα να εκπέμπουν φως μετά από διέγερση. Στον ανοσοφθορισμό συνδέονται με αντισώματα, επιτρέποντας την ανίχνευση συγκεκριμένων στόχων. Κάθε φθοριόχρωμα χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένο φάσμα εκπομπής, το οποίο εξαρτάται από την ενέργεια που αποδίδεται κατά τη μετάβαση των ηλεκτρονίων από τη διεγερμένη στη θεμελιώδη κατάσταση (Christie, 2011).

Τα μικροσκόπια φθορισμού αποτελούνται από επιμέρους εξαρτήματα που συνεργάζονται για την παραγωγή και ανίχνευση του φθορισμού:

- *Πηγή φωτός* – παρέχει την απαραίτητη ενέργεια με τη μορφή φωτονίων. Συνήθως χρησιμοποιούνται ειδικές λυχνίες, όπως υδραργύρου ή αλογόνου.
- *Φίλτρο διέγερσης* – επιλέγει συγκεκριμένα μήκη κύματος, επιτρέποντας μόνο την ακτινοβολία που μπορεί να διεγείρει το φθοριόχρωμα (συχνά στην περιοχή του υπεριώδους ή του μπλε φωτός).
- *Σύστημα εστίασης (πυκνωτής)* – κατευθύνει και συγκεντρώνει το φως προς το δείγμα.
- *Αντικειμενικός φακός* – συλλέγει το φως που εκπέμπεται από το δείγμα και συμβάλλει στη δημιουργία της εικόνας.
- *Διχρωϊκός καθρέφτης* – λειτουργεί επιλεκτικά, επιτρέποντας τη διέλευση ορισμένων μηκών κύματος ενώ ανακλά άλλα, διαχωρίζοντας έτσι το διεγείρον φως από το εκπεμπόμενο.
- *Φίλτρο εκπομπής (ή φραγμού)* – επιτρέπει να περάσει μόνο το φθορίζον φως που προέρχεται από το δείγμα, αποκλείοντας την υπόλοιπη ακτινοβολία.
- *Προσοφθάλμιος φακός* – μεγεθύνει την τελική εικόνα, ώστε ο παρατηρητής να μπορεί να δει καθαρά το φθορισμό του δείγματος.

<u>*Αντιδραστήρια και εξοπλισμός*</u>

- Πρωτεύον αντίσωμα antiHuman MPO, 266-6K1 (μυελοϋπεροξειδάση, sc-52707, Santa Cruz), για πρόσδεση με αντισώματα και παρακολούθηση-μέτρηση του αντίστοιχου φθοριοχρώματος που θα συνδεθεί με το αντίσωμα
- Φθοριόχρωμα Alexa Fluor 488 (goat anti-rabbit IgG (HtL) 2 mg/mL/Molecular probes, κίτρινο χρώμα, A11034, Invitrogen), φθορίζουσα σήμανση για ανίχνευση ουδετερόφιλων

- Φθοριόχρωμα DAPI - 4',6-diamidino-2-phenylindole (Thermo Fisher Scientific, D1306), για παρατήρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων καθώς μπορεί να διέλθει μέσα από μεμβράνες του DNA
- Mowiol (Sigma, 81381), για σταθεροποίηση των κυττάρων πάνω στις αντικειμενοφόρες πλάκες
- Triton X-100 (Sigma, T8787), για να γίνουν διαπερατές οι κυτταρικές μεμβράνες
- Normal Goat Serum-NGS (231016015, Invitrogen, by Thermofisher Scientific)
- Χλωριούχο νάτριο - NaCl (Merck ,1.06404.1000)
- Χλωριούχο κάλιο - KCl (Merck, 1.04936.1000)
- Νάτριο-δι-υδρο-φωσφορικό οξύ - Na_2HPO_4 (Merck, 1.06586.1000)
- Κάλιο-δι-υδρο-φωσφορικό οξύ - KH_2PO_4 (Merck, 1.04873.1000)
- Φθοριστικό μικροσκόπιο Leica DFC 7000 GT (40αρης φακός, κατάλληλα φίλτρα: DAPI-διέγερση στα 350 nm συλλογή στα 450 nm &GFP- διέγερση στα 450-490 nm συλλογή στα 500-550 nm)
- Πιπέτες σταθερού όγκου (Costar)
- Parafilm (050.01.001)
- Αντικειμενοφόρες πλάκες

Ετοιμασία εργαστηριακών διαλυμάτων:

- *Διάλυμα PBS 1X (12.5 mM):*

Αρχικά παρασκευάζεται το συμπυκνωμένο διάλυμα PBS 10X με τελικό pH 6,8. Για τον σκοπό αυτό διαλύονται σε 1L δις απεσταγμένου νερού (ddH_2O) τα εξής: 80g NaCl, 2g KCl, 17,8g Na_2HPO_4 και 2,7g KH_2PO_4. Το διάλυμα ομογενοποιείται πλήρως, αποστειρώνεται και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου.

Στη συνέχεια, για την παρασκευή του PBS 1X (12,5mM), πραγματοποιείται αραίωση του αποστειρωμένου PBS 10X σε αναλογία 1:10 (v/v) με ddH_2O υπό στείρες συνθήκες. Ενδεικτικά, για τελικό όγκο 50mL, αναμιγνύονται 5mL PBS 10X με 45mL ddH_2O, κατά προτίμηση εντός θάλαμου νηματικής ροής (hood).

- *Διάλυμα 0.5 % v/v Triton X-100:*

  Σε τελικό όγκο 1500μL διαλύματος, προστέθηκαν 7,5μL Triton X-100 σε απιονισμένο νερό (H_2O)

- *Διάλυμα 5 % Blocking Buffer:*

  225μL NGS και 4.275μL PBS 1X (12.5mM), το οποίο χρησιμοποιήθηκε τόσο για την αραίωση των αντισωμάτων όσο και για την εμβάπτιση των καλυπτρίδων.

- *Διάλυμα αντισώματος MPO:*

  Το αντίσωμα MPO αραιώθηκε με την προσθήκη 2,6μL σε 1.297μL blocking buffer, αραίωση 1:500 v/v

- *Διάλυμα αντισώματος Alexa Fluor:*

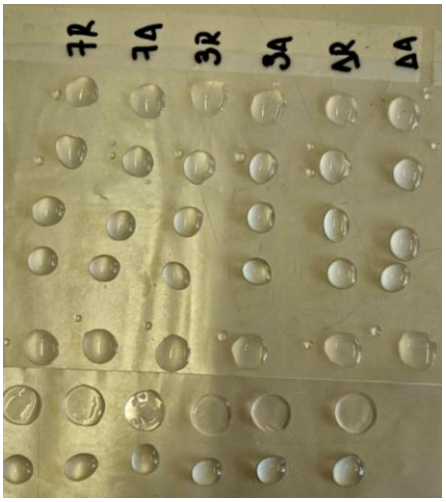
  Το αντίσωμα Alexa Fluor αραιώθηκε με 4,3μL σε 1.295μL blocking buffer, αραίωση 1:300 v/v

- *Διάλυμα DAPI:*

  Αρχικά παρασκευάστηκε διάλυμα με ανάμιξη 4μL διαλύματος DAPI (10μg/mL) και 36μL απιονισμένου νερού σε σωληνάριο Eppendorf. Στη συνέχεια, 2μL από το προκύπτον διάλυμα αραιώθηκαν έως τελικό όγκο 10mL με PBS 1X (12.5mM), επιτυγχάνοντας τελική συγκέντρωση 600nM.

Πειραματική διαδικασία

Την επόμενη ημέρα, όλες οι καλυπτρίδες που αντιστοιχούν στις πειραματικές συνθήκες, συμπεριλαμβανομένων τόσο των τυφλών όσο και των υπό μελέτη δειγμάτων, καθεμία εκ των οποίων εξετάζεται υπό συνθήκες ηρεμίας (resting) και ενεργοποίησης (activated), εμβαπτίζονται σε σταγονίδια κατάλληλων αντιδραστηρίων, τα οποία έχουν προηγουμένως τοποθετηθεί σε επιφάνεια Parafilm. Οι καλυπτρίδες τοποθετούνται ανεστραμμένες, έτσι ώστε η επιφάνεια με τα προσκολλημένα κύτταρα να έρχεται σε άμεση επαφή με τα σταγονίδια των αντιδραστηρίων, διασφαλίζοντας κατ' αυτόν τον τρόπο την αποτελεσματική και ομοιόμορφη έκθεση των κυττάρων στα αντιδραστήρια και την επακόλουθη επεξεργασία και επώαση των δειγμάτων **(Εικόνα 24)**.



Εικόνα 24: Εμβάπτιση καλυπτρίδων σε σταγόνες αντιδραστηρίων.

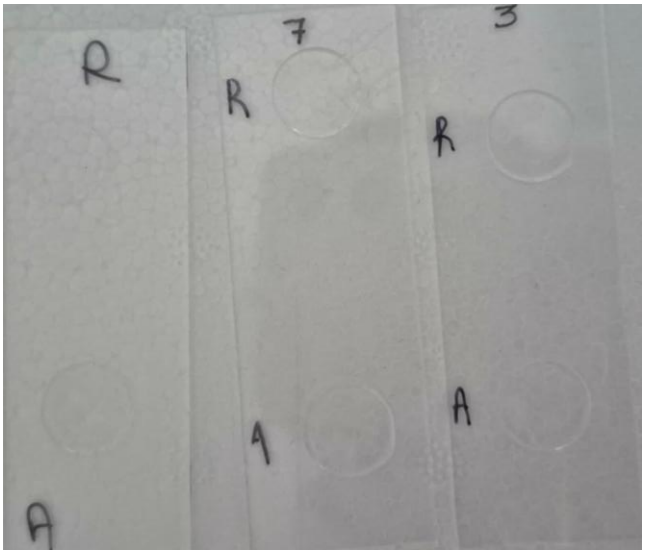
Η πειραματική διαδικασία αρχίζει με δύο διαδοχικές εκπλύσεις των δειγμάτων χρησιμοποιώντας PBS, ενώ στη συνέχεια πραγματοποιείται μία επιπλέον έκπλυση με Triton X-100. Έπειτα, οι καλυπτρίδες επωάζονται για 30 λεπτά σε διάλυμα Blocking Buffer.

Στη συνέχεια, οι καλυπτρίδες επωάζονται με το πρωτεύον αντίσωμα antiHuman MPO (αραιωμένο σε blocking buffer σε αναλογία 1:500 v/v) για 1 ώρα σε σκοτεινό περιβάλλον και ακολουθούν τρεις εκπλύσεις με PBS.

Αμέσως μετά, οι καλυπτρίδες επωάζονται για 1 ώρα με το φθοριόχρωμα Alexa Fluor 488 (σε αραίωση 1:300 v/v με blocking buffer), επίσης σε σκοτεινό χώρο λόγω της ευαισθησίας του στο φως.

Μετά την επώαση, πραγματοποιούνται τρεις ακόμη εκπλύσεις με PBS και κατόπιν οι καλυπτρίδες τοποθετούνται σε διάλυμα DAPI για 10 λεπτά.

Τέλος, οι καλυπτρίδες ξεπλένονται με PBS, στεγνώνονται με απορροφητικό χαρτί και τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρες πλάκες **(Εικόνα 25)** με τη χρήση του μέσου στερέωσης Mowiol. Οι πλάκες αφήνονται για τουλάχιστον 1 ώρα πριν την παρατήρηση στο μικροσκόπιο ή αποθηκεύονται στο ψυγείο καλυμμένες με αλουμινόχαρτο.



Εικόνα 25: Οι αντικειμενοφόρες πλάκες με τις καλυπτρίδες.

Κατά την παρατήρηση στο φθοριστικό μικροσκόπιο (Leica DFC 7000 GT – 40αρης φακός – κατάλληλα φίλτρα), εντοπίστηκαν και καταγράφηκαν κυτταρικές δομές που σχηματίζουν δίκτυα τύπου “νεφών”. Παράλληλα, υπολογίστηκε το ποσοστό των κυττάρων που παρουσίασαν αυτά τα δίκτυα (NETs) σε σχέση με το συνολικό αρχικό πλήθος των κυττάρων. Το ποσοστό αυτό, που εκφράζει την αύξηση της νέτωσης, υπολογίζεται ως εξής:

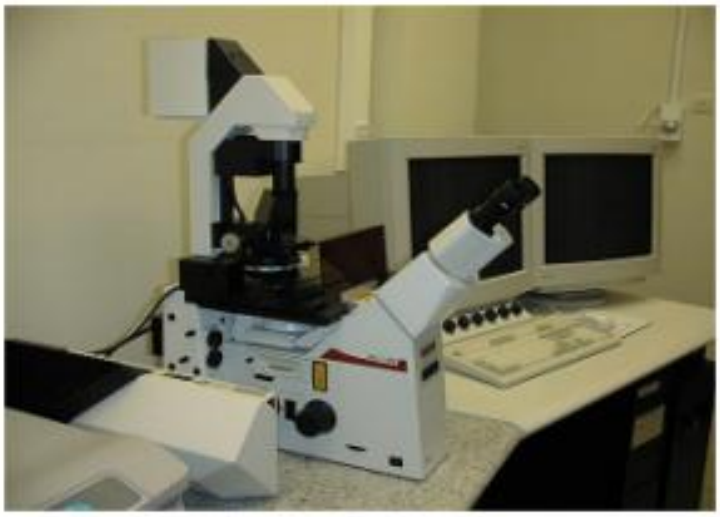
x = [(ποσοστό ενεργοποιημένων κυττάρων − A%) / (ποσοστό κυττάρων σε κατάσταση ηρεμίας − R%)] × 100%

όπου:

A = Activated (ενεργοποιημένα κύτταρα)

R = Resting (μη ενεργοποιημένα κύτταρα)

Η παρατήρηση και η λήψη εικόνων των δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν στη Μονάδα Συνεστιακής Μικροσκοπίας Σάρωσης Laser του Δίκτυο Εργαστηρίων Υποστήριξης Έρευνας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, με χρήση φθοριστικού μικροσκοπίου Leica DFC 7000 GT και αντικειμενικού φακού 40× **(Εικόνα 26)**. Η καταγραφή και επεξεργασία των εικόνων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό Leica LAS X.



Εικόνα 26: Το φθοριστικό μικροσκόπιο Leica DFC 7000 GT.

5.6 Στατιστική ανάλυση

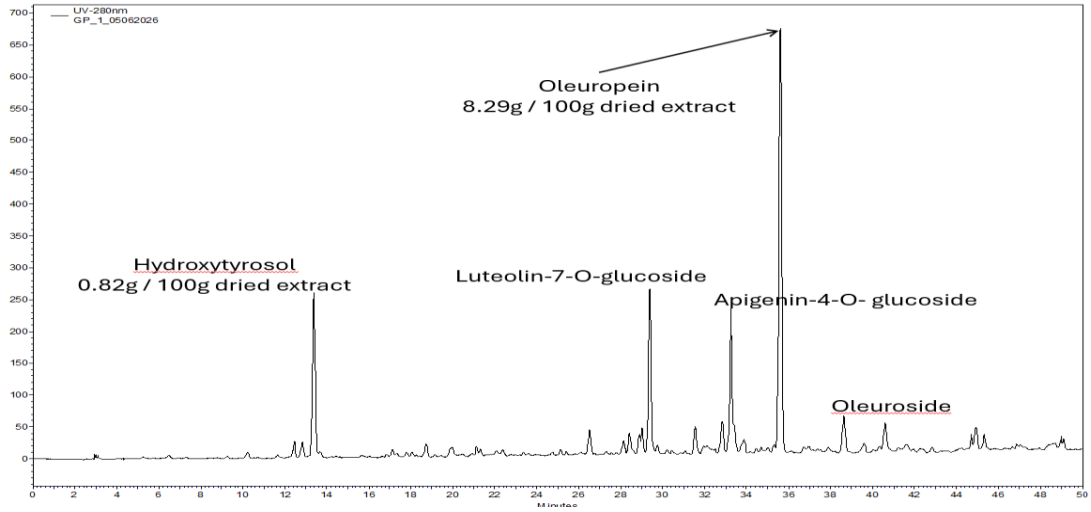
Τα πειραματικά δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση (mean ± SD). Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του ελέγχου Independent-Samples t-test, μέσω του λογισμικού IBM SPSS Statistics, έκδοση 29.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). Τα αποτελέσματα των εκχυλισμάτων συγκρίθηκαν με το αντίστοιχο τυφλό δείγμα, προκειμένου να αξιολογηθούν οι διαφορές μεταξύ των ομάδων. Ως όριο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε η τιμή $p < 0,05$. Οι τιμές IC_{50} υπολογίστηκαν με μη γραμμική παλινδρόμηση (nonlinear regression), μέσω προσαρμογής των καμπυλών δόσης–απόκρισης, χρησιμοποιώντας το λογισμικό GraphPad Prism, έκδοση 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6ο : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

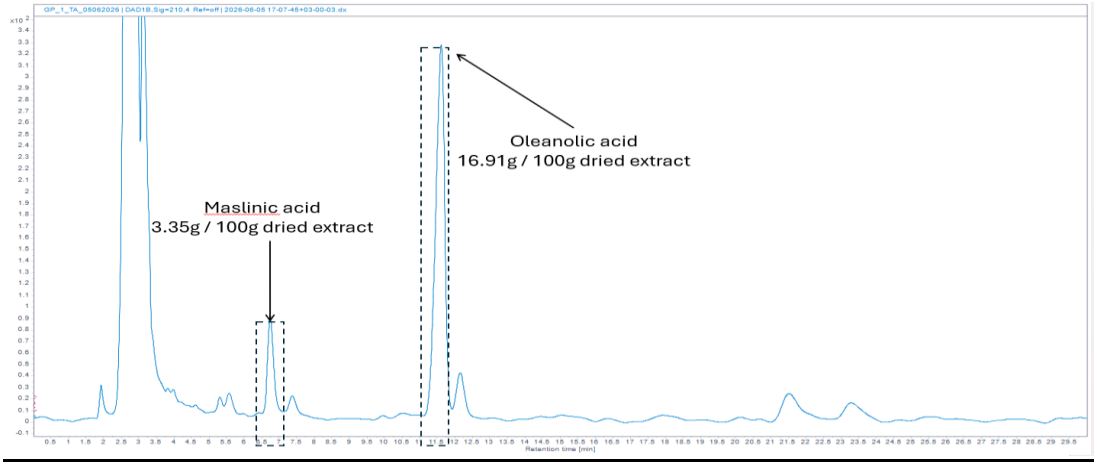
6.1 Αποτελέσματα χρωματογραφικής ανάλυσης

Εκχύλισμα 1 — Φαινολικά συστατικά (σεκοϊριδοειδή/φλαβονοειδή) και Τερπένια

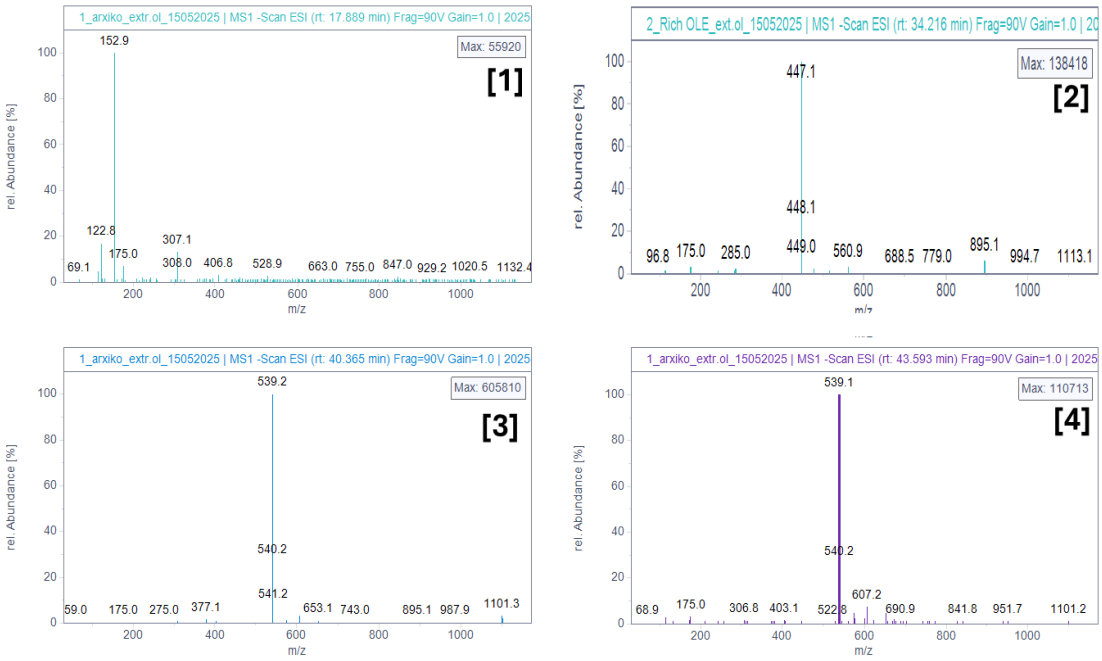
Πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις HPLC-DAD για την ανίχνευση και το διαχωρισμό των συστατικών του εκχυλίσματος και HPLC-MSQ για την ταυτοποίησή τους. Καταγράφηκαν οι χρόνοι κατακράτησης (retention time-Rt) και τα μοριακά ιόντα των κύριων κορυφών, ενώ για τις κορυφές 1–4 λήφθηκαν και αναλύθηκαν φάσματα μάζας. Τα φάσματα MSQ επιβεβαίωσαν την παρουσία των αντίστοιχων μοριακών ιόντων. Τα φάσματα DAD έδειξαν χαρακτηριστικά πρότυπα UV απορρόφησης με κύρια μέγιστα στην περιοχή ~230–280nm και επιπλέον απορρόφηση μεταξύ 280–330nm, γεγονός που υποδηλώνει την παρουσία μίγματος φαινολικών γλυκοσιδών και περισσότερο πολικών ενώσεων. Στα φάσματα μάζας σε αρνητικό ιονισμό ($[M-H]^-$) παρατηρήθηκαν πολλαπλά μοριακά ιόντα που αποδίδονται σε φαινολικούς γλυκοζίτες της οικογένειας ολευρωπεΐνη/λιγκστροσίδη, καθώς και μικρότερα ιόντα που μπορούν να συσχετιστούν με υδροξυτυροσόλη ή παράγωγά της **(Εικόνα 27,28,29)**.



Εικόνα 27: HPLC-DAD ανάλυση - εκχύλισμα 1.



Εικόνα 28: HPLC-MSQ ανάλυση - εκχύλισμα 1.



Εικόνα 29: Φάσματα Μάζας Κορυφών 1, 2, 3, 4 για εκχύλισμα 1.

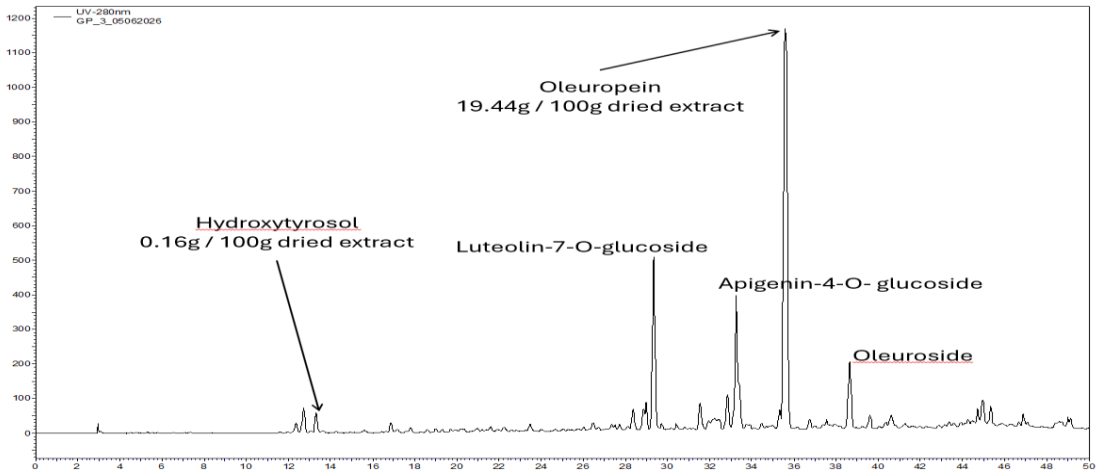
Συνολικά, τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι το ακετονικό εκχύλισμα περιέχει τόσο πολικά φαινολικά όσο και ορισμένα λιγότερο πολικά/πιο λιπόφιλα συστατικά **(Πίνακας 4)**.

Πίνακας 4: Αποτελέσματα/ταυτοποιήσεις για εκχύλισμα 1.

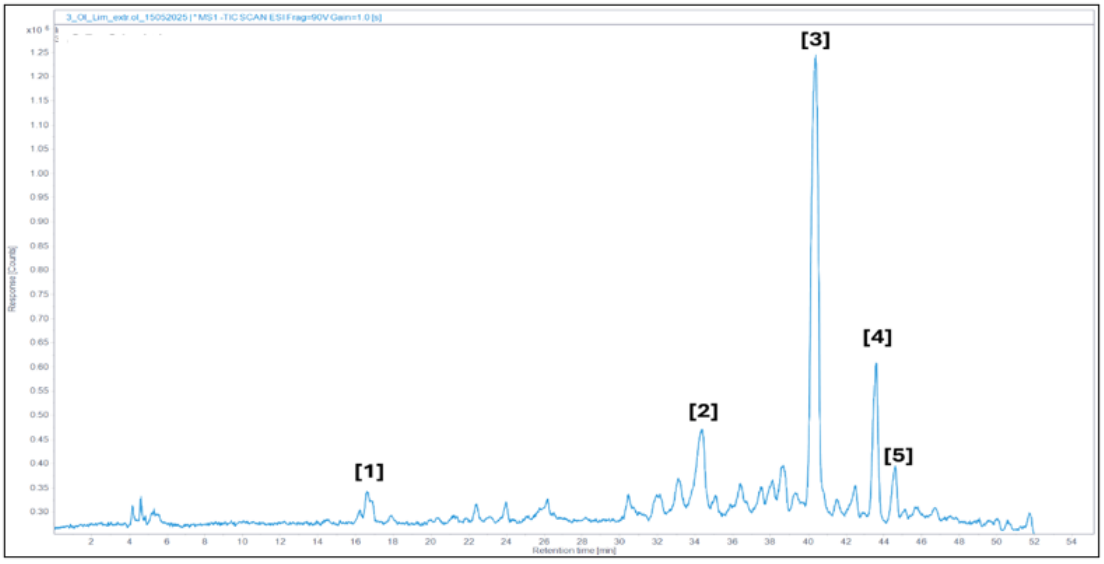
No	Rt (min)	$[M-H]^-$ m/z	Μοριακός Τύπος	Ονομασία Ένωσης
1	17.9	152.9	$C_8H_{10}O_3$	Υδροξυτυροσόλη
2	34.4	447.1	$C_{21}H_{20}O_{11}$	Λουτεολίνη-7-Ο-γλυκοζίτης
3	40.4	539.2	$C_{25}H_{32}O_{13}$	Ολευρωπεΐνη
4	43.6	539.1	$C_{25}H_{32}O_{13}$	Ολευρωσίδης

Εκχύλισμα 2 — Εμπλουτισμένο σε σεκοϊριδοειδή/φλαβονοειδή μετά από επεξεργασία με DCM

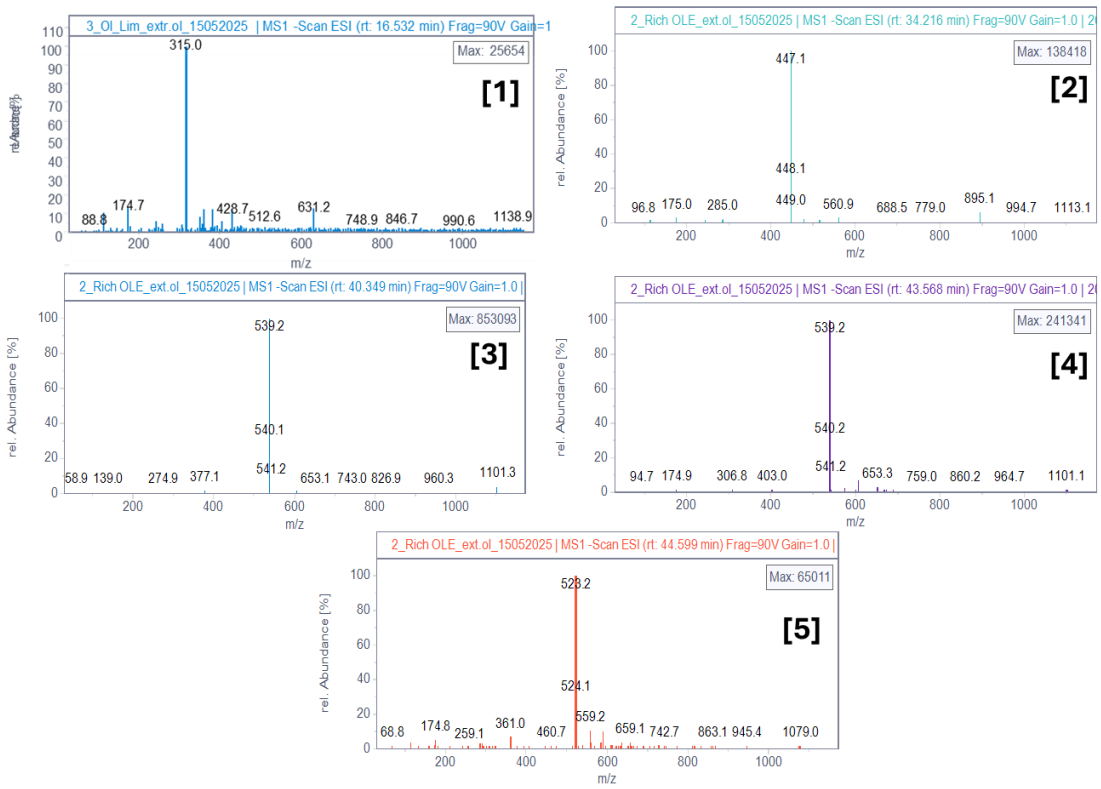
Πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις HPLC-DAD και HPLC-MSQ για το διαχωρισμό και τη διερεύνηση των συστατικών του δείγματος. Το χρωματογραφικό προφίλ του εκχυλίσματος χαρακτηρίστηκε από την παρουσία κυρίαρχων κορυφών που αντιστοιχούν σε φαινολικές γλυκοσιδικές ενώσεις. Τα φάσματα DAD παρουσίασαν χαρακτηριστικές ζώνες απορρόφησης στην περιοχή ~240–280 nm, συμβατές με ενώσεις της κατηγορίας των σεκοϊριδοειδών γλυκοσιδών. Παράλληλα, η ανάλυση HPLC-MS σε αρνητικό ιονισμό αποκάλυψε την παρουσία κύριων ιόντων με τιμές m/z που αντιστοιχούν σε αποπρωτονιωμένες μορφές ολευρωπεΐνης και λιγκστροσίδης, καθώς και συγγενών φαινολικών γλυκοσιδών όπως ο ολευρωσίδης. Από τα φάσματα διαπιστώνεται ότι το εκχύλισμα είναι πλούσιο σε σεκοϊριδοειδή παράγωγα, με κυρίαρχη παρουσία ενώσεων που σχετίζονται με την ολευρωπεΐνη **(Εικόνα 30,31,32)**.



Εικόνα 30: HPLC-DAD ανάλυση - εκχύλισμα 2.



Εικόνα 31: HPLC-MSQ ανάλυση εκχύλισμα - 2.



Εικόνα 32: Φάσματα Μάζας Κορυφών 1, 2, 3, 4,5 για εκχύλισμα 2.

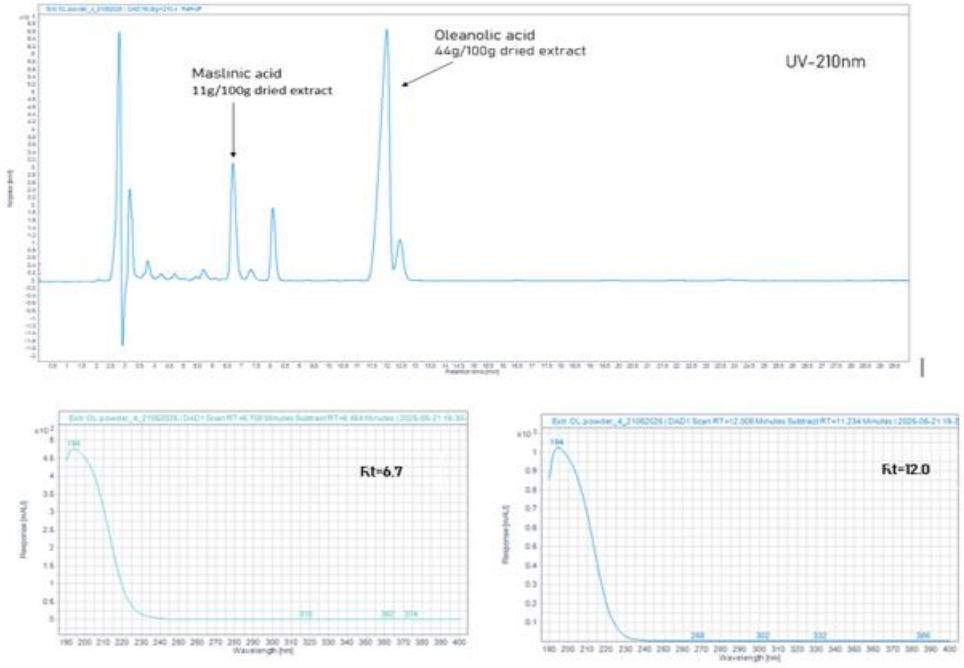
Συνολικά, τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι ο χρησιμοποιούμενος τρόπος εκχύλισης επηρεάζει κυρίως τη σχετική ένταση των κορυφών, χωρίς να μεταβάλλει ουσιαστικά την ταυτότητα των κύριων συστατικών του εκχυλίσματος **(Πίνακας 5).**

Πίνακας 5: Αποτελέσματα/ταυτοποιήσεις για εκχύλισμα 2.

No	Rt (min)	$[M-H]^-$ m/z	Μοριακός Τύπος	Ονομασία Ένωσης
1	16.6	315.0	$C_{14}H_{20}O_8$	Γλυκοζίτης της υδροξυτυροσόλης
2	34.4	447.1	$C_{21}H_{20}O_{11}$	Λουτεολίνη-7-Ο-γλυκοζίτης
3	40.2	539.1	$C_{25}H_{32}O_{13}$	Ολευρωπεΐνη
4	43.6	539.1	$C_{25}H_{32}O_{13}$	Ολευρωσίδης
5	44.6	523.2	$C_{25}H_{32}O_{12}$	Λιγκστροσίδη

Εκχύλισμα 3 — Εμπλουτισμένο σε Τερπένια

Πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις HPLC-DAD για την ανίχνευση και την καταγραφή των κορυφών τερπενικών συστατικών, σε συνδυασμό με φασματογραφική διερεύνηση των κορυφών. Στα χρωματογραφήματα εντοπίστηκαν σημαντικές τερπενικές στεροειδείς οξικές δομές, οι οποίες απεικονίζονται σαφώς **(Εικόνα 33).**



Εικόνα 33: HPLC-DAD Ανάλυση εκχύλισμα 3.

Στον **Πίνακα 6** παρουσιάζονται οι ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν, μαζί με τους χρόνους κατακράτησης (Rt) και τους μοριακούς τους τύπους.

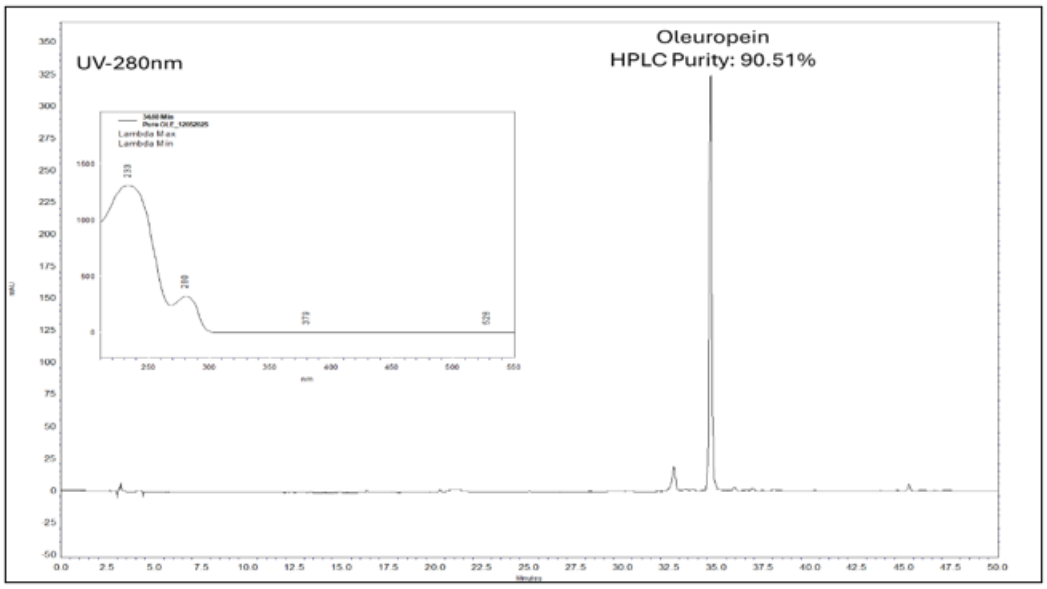
Πίνακας 6: Αποτελέσματα/ταυτοποιήσεις για εκχύλισμα 3.

Rt (min)	Μοριακός Τύπος	Ονομασία Ένωσης
6.7	$C_{30}H_{48}O_4$	Μασλινικό οξύ
12.0	$C_{30}H_{48}O_3$	Ολεανολικό οξύ

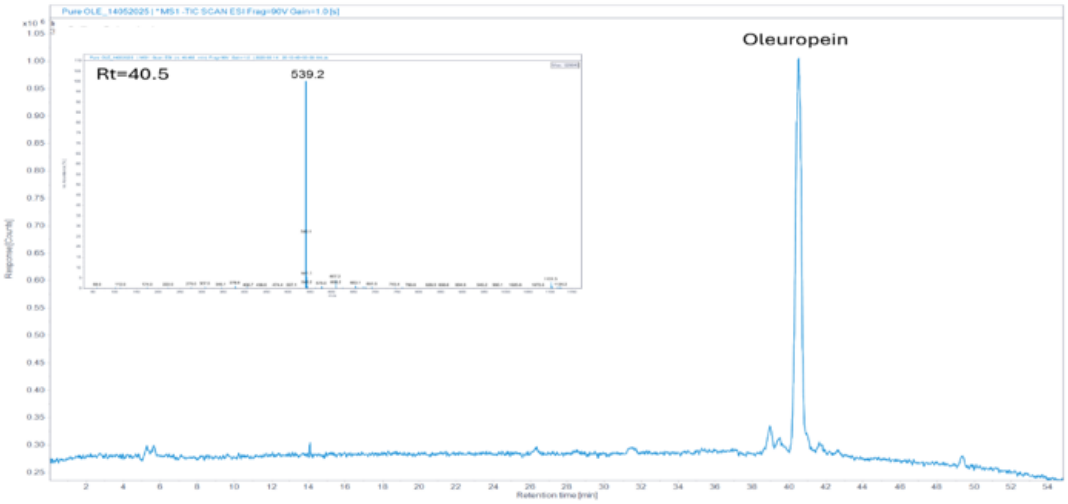
Εκχύλισμα 4 — Ολευρωπεΐνη

Η ανάλυση HPLC-DAD του δείγματος **(Εικόνα 34)** έδειξε μία κυρίαρχη κορυφή σε χρόνο κατακράτησης περίπου 40,5 min, η οποία αποδίδεται στην ολευρωπεΐνη, με καθαρότητα 90,51%, επιβεβαιώνοντας ότι το δείγμα αποτελεί κυρίως την υπό μελέτη ένωση με περιορισμένη παρουσία προσμίξεων. Το φάσμα UV (280 nm) είναι χαρακτηριστικό φαινολικής ένωσης, ενισχύοντας περαιτέρω την ταυτοποίηση.

Η ανάλυση HPLC-MSQ **(Εικόνα 35)** επιβεβαίωσε την ταυτότητα της ένωσης, παρουσιάζοντας ιοντικό σήμα στο m/z 539,1 υπό μορφή $[M–H]^-$, το οποίο αντιστοιχεί στον μοριακό τύπο $C_{25}H_{32}O_{13}$ της ολευρωπεΐνης.



Εικόνα 34: HPLC-DAD ανάλυση - εκχύλισμα 4.



Εικόνα 35: HPLC-MSQ ανάλυση - εκχύλισμα 4.

Συνολικά, τα αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι το εκχύλισμα 4 αποτελεί δείγμα υψηλής καθαρότητας σε ολευρωπεΐνη, κατάλληλο για χρήση ως πρότυπο αναφοράς σε συγκριτικές βιολογικές και χημικές μελέτες **(Πίνακας 7).**

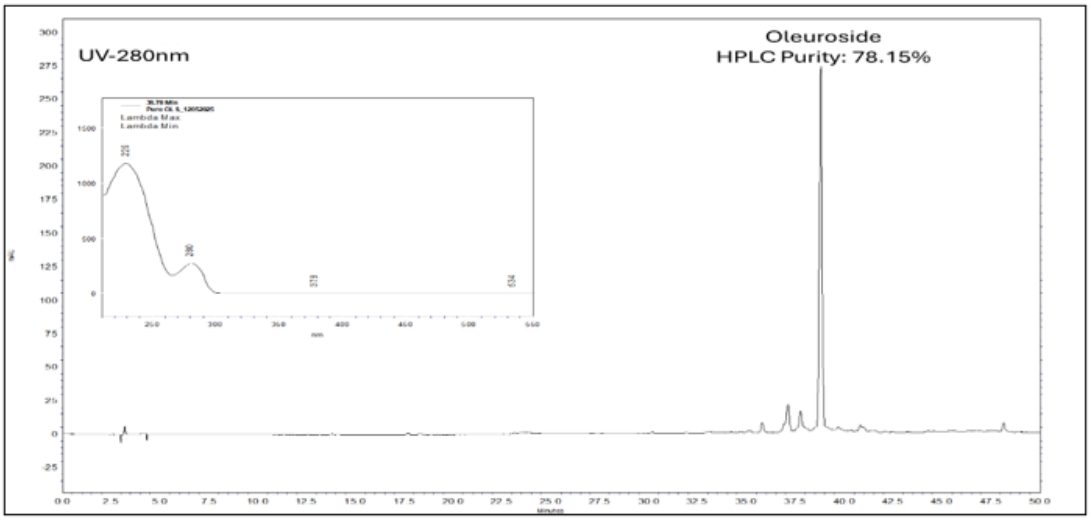
Πίνακας 7: Αποτελέσματα/ταυτοποιήσεις για εκχύλισμα 4.

Rt	$[M-H]^-$ m/z	Μοριακός Τύπος	Ονομασία Ένωσης
40.5	539.1	$C_{25}H_{32}O_{13}$	Ολευρωπεΐνη

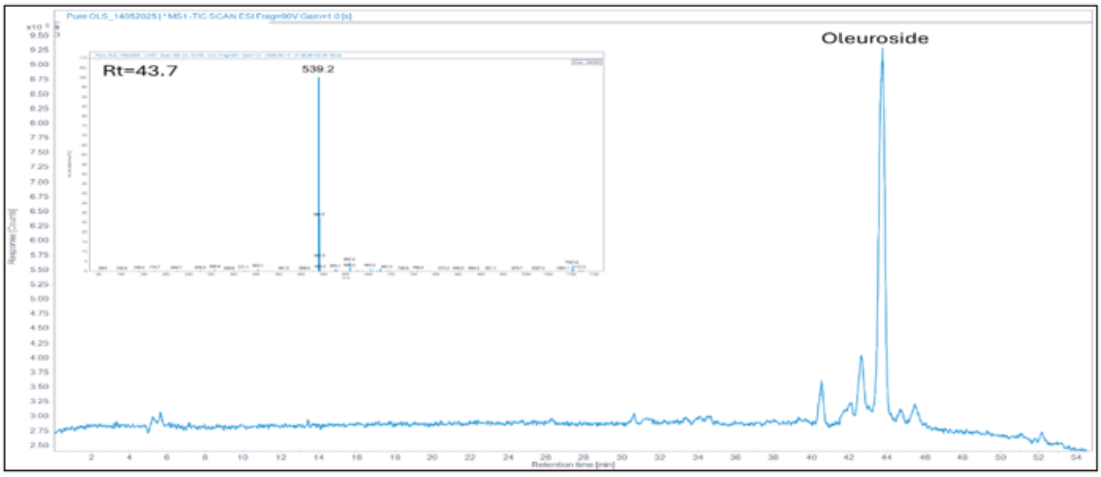
Εκχύλισμα 5 — Ολευρωσίδης

Η ανάλυση HPLC-DAD του δείγματος **(Εικόνα 36)** έδειξε μία κυρίαρχη κορυφή σε χρόνο κατακράτησης περίπου 43,7 min, η οποία αποδίδεται στον ολευρωσίδη, με καθαρότητα 78,15%, επιβεβαιώνοντας ότι το δείγμα αποτελείται κυρίως από την υπό μελέτη ένωση, με την παρουσία μικρού ποσοστού συνοδών συστατικών. Το φάσμα UV στα 280 nm είναι συμβατό με τη χημική δομή της ένωσης και υποστηρίζει περαιτέρω την ταυτοποίησή της.

Η ανάλυση HPLC-MSQ **(Εικόνα 37)** επιβεβαίωσε την ταυτότητα της ένωσης, παρουσιάζοντας χαρακτηριστικό ιοντικό σήμα στο m/z 539,1 υπό μορφή $[M-H]^-$, το οποίο αντιστοιχεί στον μοριακό τύπο $C_{25}H_{32}O_{13}$ του ολευρωσίδη.



Εικόνα 36: HPLC-DAD ανάλυση - εκχύλισμα 5.



Εικόνα 37: HPLC-MSQ ανάλυση - εκχύλισμα 5.

Συνολικά, τα αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι το εκχύλισμα 5 αποτελεί δείγμα υψηλής καθαρότητας σε ολευρωσίδη, κατάλληλο για χρήση ως πρότυπο αναφοράς σε συγκριτικές βιολογικές και χημικές μελέτες **(Πίνακας 8).**

Πίνακας 8: Αποτελέσματα/ταυτοποιήσεις για εκχύλισμα5.

Rt	**$[M-H]^-$ m/z**	**Μοριακός Τύπος**	**Ονομασία Ένωσης**
43.7	539.1	$C_{25}H_{32}O_{13}$	Ολευρωσίδης

6.2 Αποτελέσματα Οξείδωσης LDL

Μελέτη της επίδρασης εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς στην οξείδωση της LDL

Μελετήθηκε η επίδραση εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς σε τελικές συγκεντρώσεις 5, 10, 25, 50, 100 και 200μg/mL στην οξείδωση της LDL (100μg/mL), η οποία προκλήθηκε παρουσία θειικού χαλκού ($CuSO_4$, 0,1mM) στους 37 °C για χρονικό διάστημα 5 ωρών. Η εξέλιξη της οξείδωσης της LDL στο συγκεκριμένο χρονικό πλαίσιο παρακολουθήθηκε μέσω της καταγραφής του σχηματισμού συζυγών διενίων, ο οποίος αποδίδεται γραφικά ως σιγμοειδής καμπύλη της απορρόφησης σε συνάρτηση με τον χρόνο.

Η καμπύλη οξείδωσης διακρίνεται σε τρία διαδοχικά στάδια: τη λανθάνουσα φάση, τη φάση ταχείας παραγωγής και τη φάση αποικοδόμησης. Κάθε στάδιο περιγράφεται από χαρακτηριστικές παραμέτρους: ο λανθάνων χρόνος αντιστοιχεί στη διάρκεια της αρχικής φάσης, ο μέγιστος ρυθμός σχηματισμού συζυγών διενίων χαρακτηρίζει τη φάση παραγωγής, ενώ ο συνολικός αριθμός των συζυγών διενίων που σχηματίζονται αντιπροσωπεύει τη φάση αποικοδόμησης.

Ο προσδιορισμός του λανθάνοντος χρόνου πραγματοποιήθηκε με τη χάραξη της εφαπτομένης στο γραμμικό τμήμα της σιγμοειδούς καμπύλης, με την τιμή του να προκύπτει από το σημείο τομής της εφαπτομένης με τον άξονα του χρόνου. Ο ρυθμός παραγωγής των συζυγών διενίων υπολογίστηκε βάσει της σχέσης $[(A_2 - A_1)/(t_2 - t_1)] \times \varepsilon$, όπου A_1 και A_2 αντιστοιχούν στις τιμές απορρόφησης στην αρχή και στο τέλος της παραγωγικής φάσης, t_1 και t_2 στους αντίστοιχους χρόνους, και ε στον συντελεστή μοριακής απορρόφησης των συζυγών διενίων στα 234 nm (ε = 29.500 L/mol/cm). Επιπλέον, η συνολική ποσότητα των συζυγών διενίων που σχηματίστηκαν κατά τη φάση αποικοδόμησης υπολογίστηκε από το γινόμενο της τελικής απορρόφησης (A_2) με τον ίδιο συντελεστή μοριακής απορρόφησης.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε πίνακες, όπου αποτυπώνονται τα ποσοστά αναστολής της οξείδωσης της LDL για κάθε συγκέντρωση εκχυλίσματος, καθώς και οι αντίστοιχες τιμές του λανθάνοντος χρόνου, του ρυθμού σχηματισμού συζυγών διενίων και του συνολικού αριθμού τους κατά τη φάση αποικοδόμησης **(Πίνακες 9-13)**. Παράλληλα, παρατίθενται ενδεικτικές καμπύλες οξείδωσης για κάθε εκχύλισμα, οι οποίες απεικονίζουν την εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση ανασταλτική δράση τους έναντι της οξείδωσης της LDL **(Εικόνα 38)**. Τέλος, παρουσιάζονται οι τιμές IC_{50}

και threshold των εκχυλισμάτων, οι οποίες χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής τους αποτελεσματικότητας **(Πίνακας 14)** .

Πίνακας 9: Επίδραση εκχυλίσματος 1 στην οξείδωση της LDL. (n=10)

Εκχύλισμα 1	% Αναστολή	Αρ. Διενίων (nmol Διενίων/mg LDL)	Ρυθμός Διενίων (nmol Διενίων/mg LDL/min)	Λανθάνων Χρόνος (min)
Τυφλό		45570±5225	4±1	72±4
200 μg/mL	89±9*	9133±2865*	1,7±0,6*	68±6*
150 μg/mL	86±10*	10987±3021*	2±0,7*	60±12*
100 μg/mL	91±9*	7133±2430*	1,3±0,2*	38±4*
50 μg/mL	61±10*	25351±8189*	3,5±0,6*	32±6*
25 μg/mL	38±11*	46813±5430	4±0,3	25±6*
10 μg/mL	32±9*	52916±7332	4,3±0,5	25±9*
5 μg/mL	24±6*	69883±10587	5,7±0,4	24±7*

*Παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς το τυφλό (p<0,05).

Πίνακας 10: Επίδραση εκχυλίσματος 2 στην οξείδωση της LDL. (n=12)

Εκχύλισμα 2	% Αναστολή	Αρ. Διενίων (nmol Διενίων/mg LDL)	Ρυθμός Διενίων (nmol Διενίων/mg LDL/min)	Λανθάνων Χρόνος (min)
Τυφλό		45570±5225	4±1	72±4
200 μg/mL	85±8*	7971±2314*	1,3±0,5*	149±23
150 μg/mL	82±10*	12601±3168*	1,5±0,4*	64±12*
100 μg/mL	81±2*	11236±4733*	1,7±0,7*	63±9*
50 μg/mL	77±8*	23632±5098*	2,7±0,6*	40±11*
25 μg/mL	86±11*	63091±2431	1±0,02*	80±13*
10 μg/mL	24±8*	70521±7602	4,2±0,3	33±9*
5 μg/mL	16±6*	88349±10163	4,86±1,1	26±10*

*Παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς το τυφλό (p<0,05).

Πίνακας 11: Επίδραση εκχυλίσματος 3 στην οξείδωση της LDL (n=11).

Εκχύλισμα 3	% Αναστολή	Αρ. Διενίων (nmol Διενίων/mg LDL)	Ρυθμός Διενίων (nmol Διενίων/mg LDL/min)	Λανθάνων Χρόνος (min)
Τυφλό		45570±5225	4±1	72±4
200 μg/mL	84±1*	9717±4062*	1,6±0,8*	81±6
150 μg/mL	57±11*	27034±5412*	2,5±0,6*	79±9
100 μg/mL	30±7*	40142±8642*	3±0,7*	65±10*
50 μg/mL	27±10*	41896±2255*	4±0,6	50±7*
25 μg/mL	24±8*	46718±5012	4,4±0,5	46±9*
10 μg/mL	16±8*	54397±4437	5±0,2	31±6*
5 μg/mL	20±4*	51710±3214	4,8±0,3	45±7*

*Παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς το τυφλό ($p<0,05$).

Πίνακας 12: Επίδραση εκχυλίσματος ολευρωπεΐνης στην οξείδωση της LDL. (n=10)

Ολευρωπεΐνη	% Αναστολή	Αρ. Διενίων (nmol Διενίων/mg LDL)	Ρυθμός Διενίων (nmol Διενίων/mg LDL/min)	Λανθάνων Χρόνος (min)
Τυφλό		45570±5225	4±1	72±4
200 μg/mL	87±2*	20543±7281*	1,9±0,7*	81±5
150 μg/mL	79±8*	26257±2847*	2,5±0,9*	72±4
100 μg/mL	61±5*	30183±3947*	3,3±2*	67±6*
50 μg/mL	47±6*	38928±7191*	3,8±3*	55±6*
25 μg/mL	30±4*	42028±9238	4,2±1	40±4*
10 μg/mL	23±3*	50187±8732	4,4±2	33±3*
5 μg/mL	17±4*	57191±10282	5±1	29±5*

*Παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς το τυφλό ($p<0,05$).

Πίνακας 13: Επίδραση εκχυλίσματος ολευρωσίδη στην οξείδωση της LDL. (n=8)

Ολευρωσίδης	% Αναστολή	Αρ. Διενίων (nmol Διενίων/mg LDL)	Ρυθμός Διενίων (nmol Διενίων/mg LDL/min)	Λανθάνων Χρόνος (min)
Τυφλό		45570±5225	4±1	72±4*
200 μg/mL	100*	-	-	>360
150 μg/mL	100*	-	-	>360
100 μg/mL	99±7*	14567±1938*	0,2±0,1*	175±3
50 μg/mL	96±3*	2901±1299*	0,7±0,1*	170±4
25 μg/mL	91±3*	7077±2256*	0,2±0,2*	164±4
10 μg/mL	92±6*	6300±4170*	0,7±0,4*	153±5
5 μg/mL	90±5*	8244±4706*	0,5±0,3*	157±3

*Παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς το τυφλό ($p<0,05$).

Πίνακας 14: Τιμές IC_{50} (μg/mL) των εκχυλισμάτων - αναστολή.

ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ	IC_{50} (μg/mL)	Threshold (μg/mL)
1	$35±5^a$ (n=9)	100
2	$24±4^b$ (n=12)	25
3	$68±6^c$ (n=10)	200
Ολευρωπεΐνη	$50±4^d$ (n=9)	200
Ολευρωσίδης	$< 5^e$ (n=8)	5

a-d: Στατιστικά σημαντικές διαφορές στις τιμές IC_{50} μεταξύ των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων ($p < 0,05$).

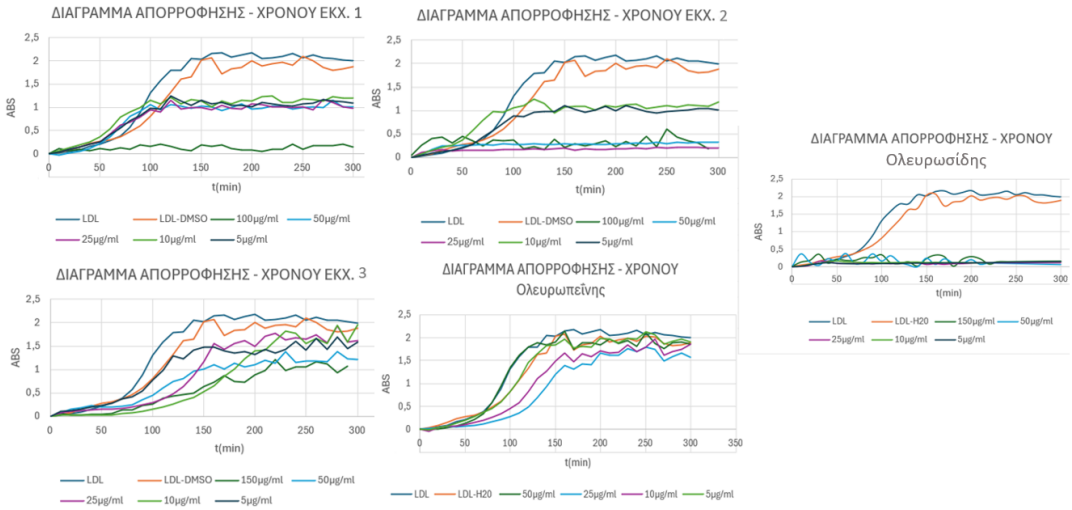
e: Ο ολευρωσίδης παρουσίασε πολύ υψηλή ανασταλτική δράση, καθώς η τιμή IC_{50} ήταν χαμηλότερη από τη μικρότερη συγκέντρωση που εξετάστηκε (< 5 μg/mL).

Η αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εξεταζόμενων δειγμάτων έδειξε ότι ο ολευρωσίδης παρουσίασε την ισχυρότερη ανασταλτική δράση έναντι της οξείδωσης της LDL. Παράλληλα, το εκχύλισμα 2, το οποίο ήταν εμπλουτισμένο σε σεκοϊριδοειδή και φλαβονοειδή, εμφάνισε ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση σε σύγκριση με την απομονωμένη ολευρωπεΐνη, καθώς εμφάνισε περίπου τη μισή τιμή IC_{50}. Το εύρημα αυτό υποδηλώνει ότι η παρουσία πολλαπλών φαινολικών συστατικών ενδέχεται να οδηγεί σε συνεργατικές αλληλεπιδράσεις, ενισχύοντας το συνολικό βιολογικό αποτέλεσμα. Το εκχύλισμα 1, που περιείχε τόσο φαινολικά συστατικά όσο και τερπένια, παρουσίασε επίσης αξιόλογη αντιοξειδωτική δράση,

ενώ το εκχύλισμα 3, το οποίο ήταν εμπλουτισμένο σε τερπένια, δεν εμφάνισε ουσιαστική ανασταλτική επίδραση στην οξείδωση της LDL.

Η στατιστική ανάλυση έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφοροποιήσεις στην ανασταλτική ικανότητα μεταξύ των διαφορετικών συγκεντρώσεων των εκχυλισμάτων σε σύγκριση με το τυφλό (LDL χωρίς επίδραση εκχυλίσματος), ($p<0,05$). Αυτό υποδηλώνει δοσοεξαρτώμενη συμπεριφορά. Τα αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι η αύξηση της συγκέντρωσης οδηγεί σε ενίσχυση της αντιοξειδωτικής δράσης των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων.

Παρατίθενται ενδεικτικές καμπύλες για κάθε εκχύλισμα:



Εικόνα 38: Ενδεικτικές καμπύλες οξείδωσης για κάθε εκχύλισμα.

6.3 Αποτελέσματα Συσσώρευσης Αιμοπεταλίων

Μελέτη της επίδρασης εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων.

Η επίδραση στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων αξιολογήθηκε παρουσία των εκχυλισμάτων μετά από ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων μέσω διαφορετικών αγωνιστών, συγκεκριμένα του αραχιδονικού οξέος (AA, 300μM), της διφωσφορικής αδενοσίνης (ADP, 10μM) και του TRAP-6 (10μM). Παρουσιάζονται αναλυτικοί πίνακες που αποτυπώνουν τα ποσοστά αναστολής της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης που παρατηρήθηκαν για κάθε εκχύλισμα **(Πίνακες 15-19)**.

Πίνακας 15: Επίδραση εκχυλίσματος 1 στη συσσώρευση αιμοπεταλίων.

	%Συσσώρευση	**%Αναστολή**	**N**
Control -ADP	89±6		
0,04 (mg/mL)	85±4	3±1	6
Control -TRAP-6	94±3		
0,04(mg/mL)	90±6	9±4	6
Control -AA	87±4		
0,04(mg/mL)	76±6	14±6	7

Πίνακας 16: Επίδραση εκχυλίσματος 2 στη συσσώρευση αιμοπεταλίων.

	%Συσσώρευση	**%Αναστολή**	**N**
Control -ADP	89±6		
0,04(mg/mL)	79±10	5±1	7
Control -TRAP-6	94±3		
0,04(mg/mL)	77±9	20±5	9
Control -AA	87±4		
0,04(mg/mL)	85±9	8±3	8

Πίνακας 17: Επίδραση εκχυλίσματος 3 στη συσσώρευση αιμοπεταλίων.

	%Συσσώρευση	%Αναστολή	N
Control -ADP	89±6		
0,04(mg/mL)	72±8	10±4	6
Control -TRAP-6	94±3		
0,04(mg/mL)	83±5	17±2	7
Control -AA	87±4		
0,04(mg/mL)	82±8	9±3	7

Πίνακας 18: Επίδραση εκχυλίσματος ολευρωπεΐνης στη συσσώρευση αιμοπεταλίων.

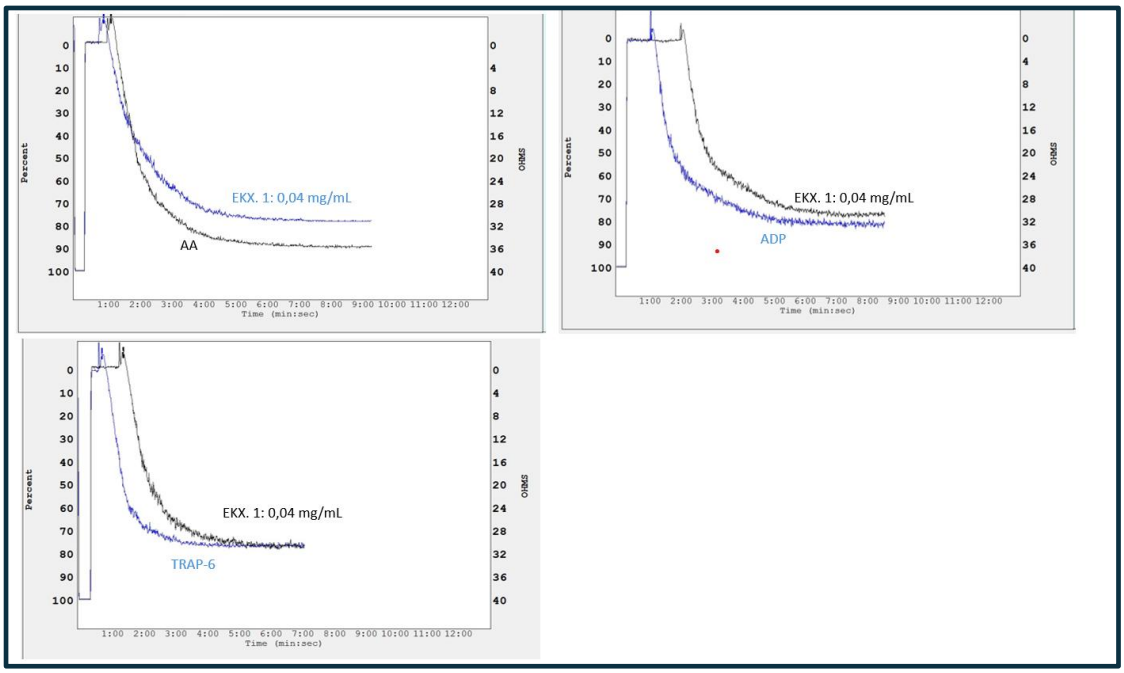
	%Συσσώρευση	%Αναστολή	N
Control -ADP	89±6		
0,04(mg/mL)	79±3	9±3	7
Control -TRAP-6	94±3		
0,04(mg/mL)	75±4	8±2	7
Control -AA	87±4		
0,04(mg/mL)	80±5	10±2	7

Πίνακας 19: Επίδραση εκχυλίσματος ολευρωσίδης στη συσσώρευση αιμοπεταλίων.

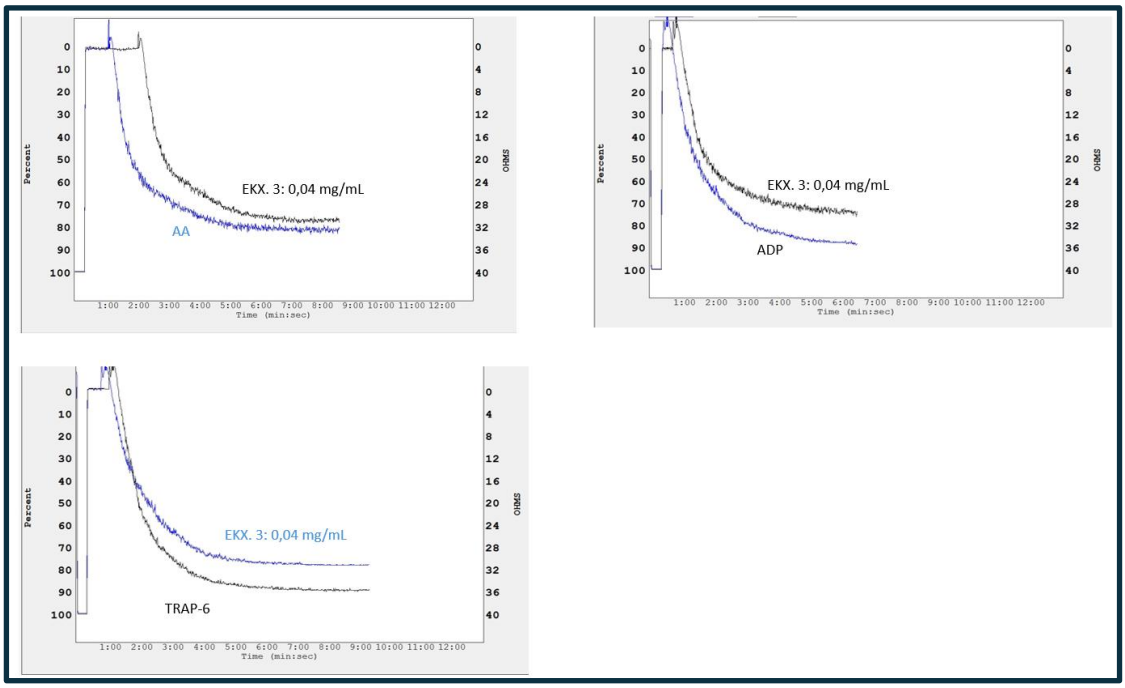
	%Συσσώρευση	%Αναστολή	N
Control -ADP	89±6		
0,04(mg/mL)	82±5	7±4	5
Control -TRAP-6	94±3		
0,04(mg/mL)	88±4	9±3	5
Control -AA	87±4		
0,04(mg/mL)	82±3	5±3	5

Κανένα από τα εκχυλίσματα φύλλων ελιάς που μελετήθηκαν δεν παρουσίασε ανασταλτική δράση έναντι της συσσώρευσης αιμοπεταλίων που επάγεται από τους αγωνιστές AA, ADP και TRAP-6. Όπως προκύπτει από τους παραπάνω πίνακες, η απόκριση των αιμοπεταλίων παρέμεινε συγκρίσιμη με εκείνη του μάρτυρα σε όλες τις πειραματικές συνθήκες. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι τα εκχυλίσματα δεν εμφανίζουν αντιαιμοπεταλιακή δράση.

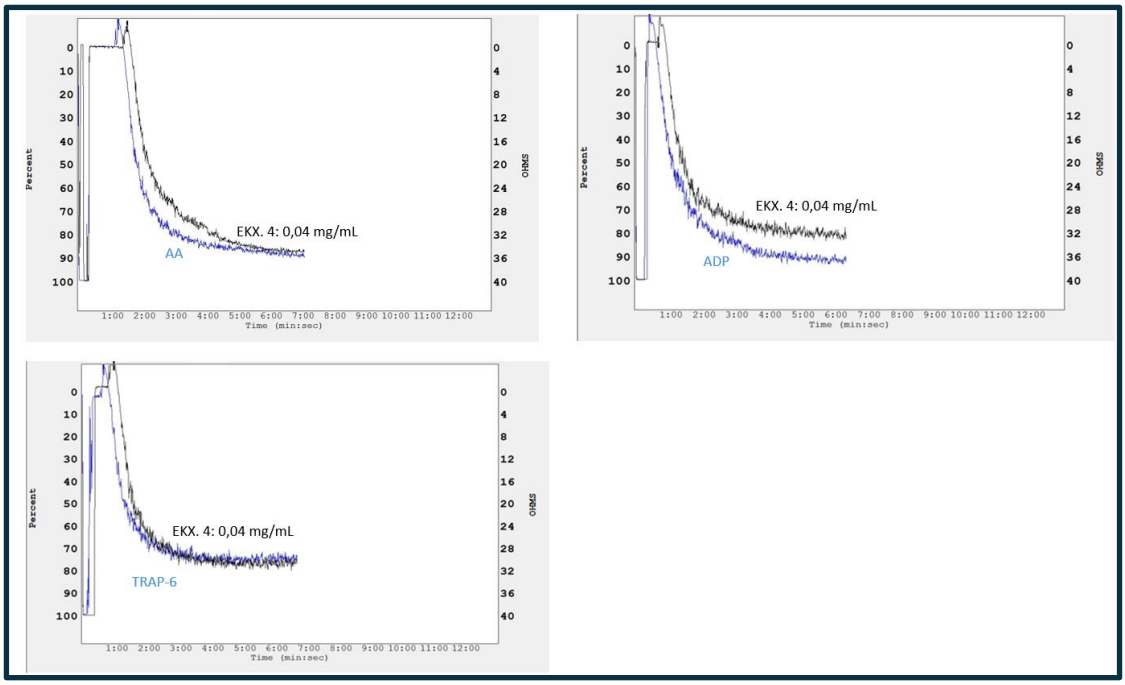
Ακολουθούν αντιπροσωπευτικές καμπύλες συσσώρευσης αιμοπεταλίων για κάθε εκχύλισμα **(Εικόνες 39-43)**.



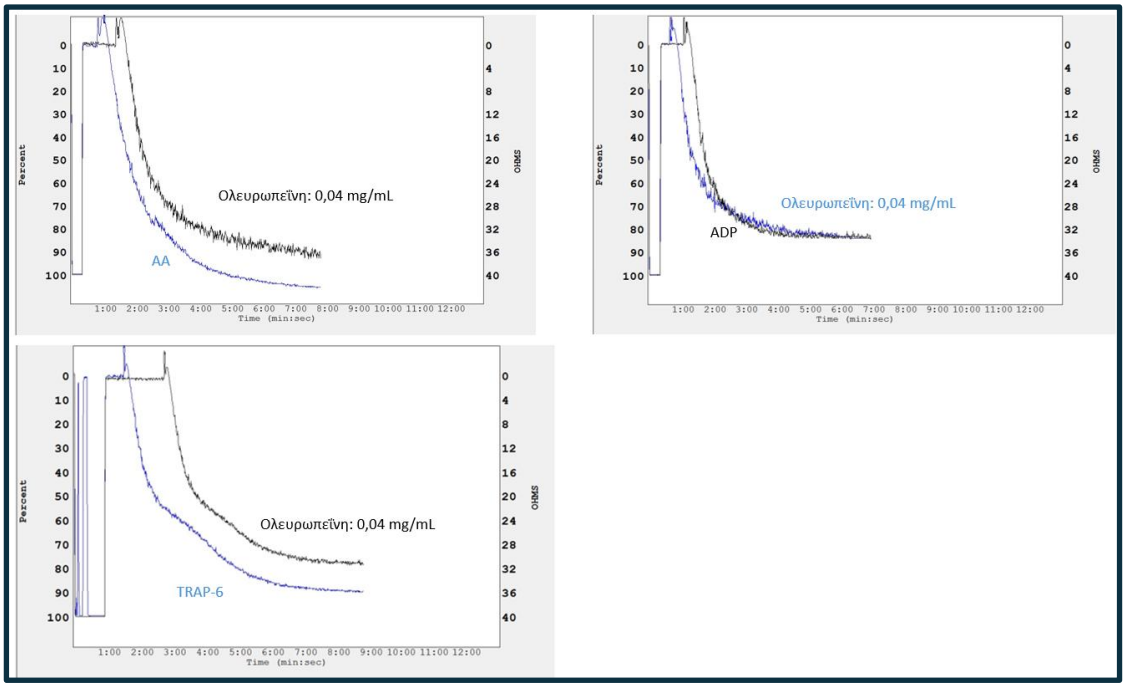
Εικόνα 39: Ενδεικτικές καμπύλες συσσώρευσης αιμοπεταλίων για το εκχύλισμα 1.



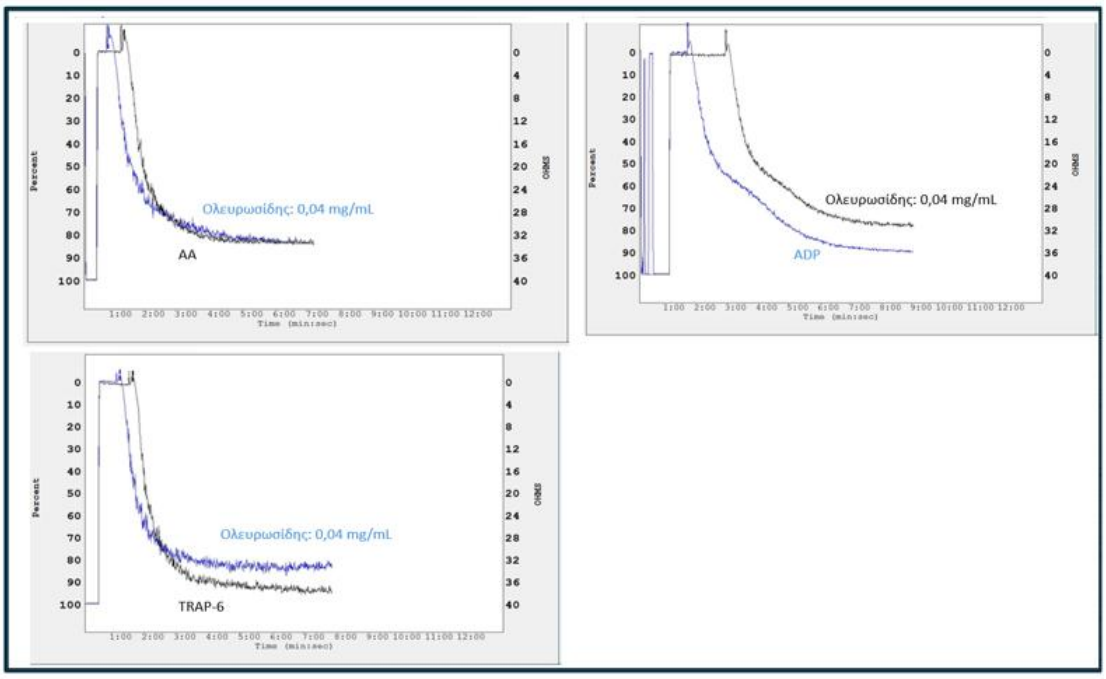
Εικόνα 40: Ενδεικτικές καμπύλες συσσώρευσης αιμοπεταλίων για το εκχύλισμα 2.



Εικόνα 41: Ενδεικτικές καμπύλες συσσώρευσης αιμοπεταλίων για το εκχύλισμα 3.



Εικόνα 42: Ενδεικτικές καμπύλες συσσώρευσης αιμοπεταλίων για την ολευρωπεΐνη.



Εικόνα 43: Ενδεικτικές καμπύλες συσσώρευσης αιμοπεταλίων για τον ολευρωσίδη.

6.4 Αποτελέσματα Κυτταροτοξικότητας

Μελέτη της επίδρασης εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς στην καρκινική κυτταρική σειρά MCF-7.

Η επίδραση των εκχυλισμάτων στην κυτταρική βιωσιμότητα αξιολογήθηκε με τη δοκιμασία MTT σε εύρος τελικών συγκεντρώσεων (400, 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,75 και 3,125 μg/mL), με σκοπό την αξιολόγηση της πιθανής δοσο- και χρονικά εξαρτώμενης επίδρασης των υπό μελέτη εκχυλισμάτων στη βιωσιμότητα της καρκινικής κυτταρικής σειράς MCF-7, έπειτα από 24 και 48 ώρες επώασης. Παράλληλα, μελετήθηκε και η επίδραση της ολευρωπεΐνης, η οποία σύμφωνα με τη βιβλιογραφία παρουσιάζει αντικαρκινική δράση και έχει αναφερθεί ότι μπορεί να μειώνει την κυτταρική βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων της σειράς MCF-7.

Η επιλογή των δειγμάτων για τη δοκιμή MTT βασίστηκε σε διαθέσιμα βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με την αντικαρκινική τους δράση. Δεδομένου ότι δεν εντοπίστηκαν σχετικές αναφορές για τον ολευρωσίδη, η ένωση αυτή δεν συμπεριλήφθηκε στη συγκεκριμένη αξιολόγηση στην παρούσα φάση.

Η απορρόφηση μετρήθηκε σε μήκος κύματος 570nm. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ποσοστό βιωσιμότητας σε σχέση με τον μάρτυρα και παρουσιάζονται σε αναλυτικούς πίνακες για κάθε εκχύλισμα **(Πίνακες 20-23)**.

Πίνακας 20: Επίδραση εκχυλίσματος 1 στην κυτταρική βιωσιμότητα, 24-48h.

Εκχύλισμα 1	% Κυτταρική Βιωσιμότητα - 24h	% Κυτταρική Βιωσιμότητα - 48h	N
Τυφλό	100±4	100±5	15
400μg/mL	44±2$^{\$}$	54±3$^{\$}$	11
200μg/mL	53±2$^{\$}$	57±3$^{\$}$	13
100μg/mL	57±3$^{\$}$	63±1$^{\$}$	13
50μg/mL	63±3$^{\$}$	68±3$^{\$}$	13
25μg/mL	74±3$^{\$}$	71±2$^{\$}$	7
12,5μg/mL	81±4$^{\$}$	85±3$^{\$}$	7
6,75μg/mL	90±2	92±4	7
3,125μg/mL	100±4	100±5	7

$^{\$}$ Καταγράφηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές συγκριτικά με το τυφλό ($p<0,05$).

Πίνακας 21: Επίδραση εκχυλίσματος 2 στην κυτταρική βιωσιμότητα, 24-48h.

Εκχύλισμα 2	% Κυτταρική Βιωσιμότητα - 24h	% Κυτταρική Βιωσιμότητα - 48h	N
Τυφλό	100±4	100±5	15
400μg/mL$^{\$}$	40±1$^{\$}$	49±3$^{\$}$	11
200μg/mL	48±2$^{\$}$	55±3$^{\$}$	13
100μg/mL	51±3$^{\$}$	60±3$^{\$}$	13
50μg/mL	57±3$^{\$}$	62±2$^{\$}$	13
25μg/mL	65±2$^{\$}$	72±2$^{\$}$	7
12,5μg/mL	71±3$^{\$}$	82±3$^{\$}$	7
6,75μg/mL	77±3$^{\$}$	90±4	7
3,125μg/mL	89±4	92±3	7

$^{\$}$ Καταγράφηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές συγκριτικά με το τυφλό ($p<0,05$).

Πίνακας 22: Επίδραση εκχυλίσματος 3 στην κυτταρική βιωσιμότητα, 24-48h.

Εκχύλισμα 3	% Κυτταρική Βιωσιμότητα - 24h	% Κυτταρική Βιωσιμότητα - 48h	N
Τυφλό	100±4	100±5	15
400μg/mL	42±1$^{\$}$	53±3$^{\$}$	11
200μg/mL	50±3$^{\$}$	56±3$^{\$}$	13
100μg/mL	62±3$^{\$}$	67±3$^{\$}$	13
50μg/mL	72±5$^{\$}$	74±3$^{\$}$	13
25μg/mL	76±3$^{\$}$	80±3$^{\$}$	7
12,5μg/mL	84±2$^{\$}$	82±3$^{\$}$	7
6,75μg/mL	91±2	94±1	7
3,125μg/ mL	100±5	100±4	7

$^{\$}$ Καταγράφηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές συγκριτικά με το τυφλό ($p<0,05$).

Πίνακας 23: Επίδραση ολευρωπεΐνης στην κυτταρική βιωσιμότητα, 24-48h.

Ολευρωπεΐνη	% Κυτταρική Βιωσιμότητα - 24h	% Κυτταρική Βιωσιμότητα - 48h	N
Τυφλό	100±4	100±5	15
400μg/mL	37±2$	45±3$	12
200μg/mL	44±2$	58±2$	12
100μg/mL	51±2$	63±3$	12
50μg/mL	64±3$	78±2$	12
25μg/mL	72±2$	80±3$	12
12,5μg/mL	83±2$	86±2$	12
6,75μg/mL	91±2	93±2	12
3,125μg/mL	94±3	98±3	12

$ Καταγράφηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές συγκριτικά με το τυφλό (p<0,05).

Πίνακας 24: Επίδραση συνδυασμού ολευρωπεΐνης και εκχυλίσματος 2 στην κυτταρική βιωσιμότητα, 24-48h.

Ολευρωπεΐνη και εκχύλισμα 2	% Κυτταρική Βιωσιμότητα - 24h	% Κυτταρική Βιωσιμότητα - 48h	N
Τυφλό	100±4	100±5	15
400μg/mL	51±3$	59±3$	10
200μg/mL	62±3$	69±2$	10
100μg/mL	72±2$	78±1$	10
50μg/mL	80±2$	85±3$	10

$ Καταγράφηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές συγκριτικά με το τυφλό (p<0,05).

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της δοκιμασίας MTT στην καρκινική κυτταρική σειρά μαστού MCF-7 έδειξε ότι τα εκχυλίσματα 1 και 3 - φαινολικά συστατικά (σεκοϊριδοειδή/φλαβονοειδή) και τερπένια και εμπλουτισμένο σε τερπένια μετά από επεξεργασία DCM, αντίστοιχα - παρουσίασαν κυτταροτοξικότητα μόνο σε υψηλές συγκεντρώσεις (400μg/mL).

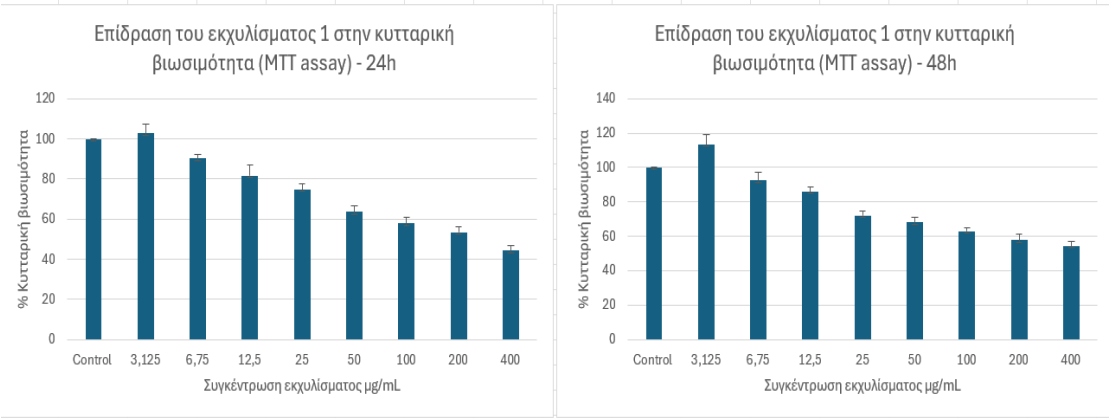
Το εκχύλισμα 2, εμπλουτισμένο σε φαινολικά συστατικά μετά από επεξεργασία με DCM και το εκχύλισμα 4 (ολευρωπεΐνη) παρουσίασαν παρόμοια επίπεδα κυτταρικής βιωσιμότητας, περίπου 40% και 37% αντίστοιχα στις 24 ώρες. Ωστόσο, διερευνήθηκε και ο συνδυασμός τους σε συγκεντρώσεις 400, 200, 100 και 50μg/mL, καθώς οι μικρότερες δεν θεωρήθηκαν επαρκώς δραστικές. Παρόλα αυτά, ο συνδυασμός τους

δεν οδήγησε σε συνεργατική ή ενισχυμένη κυτταροτοξική δράση. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η συγχορήγηση δε μεταβάλλει σημαντικά τη βιολογική απόκριση σε σχέση με τη μεμονωμένη δράση κάθε εκχυλίσματος **(Πίνακας 24)**.

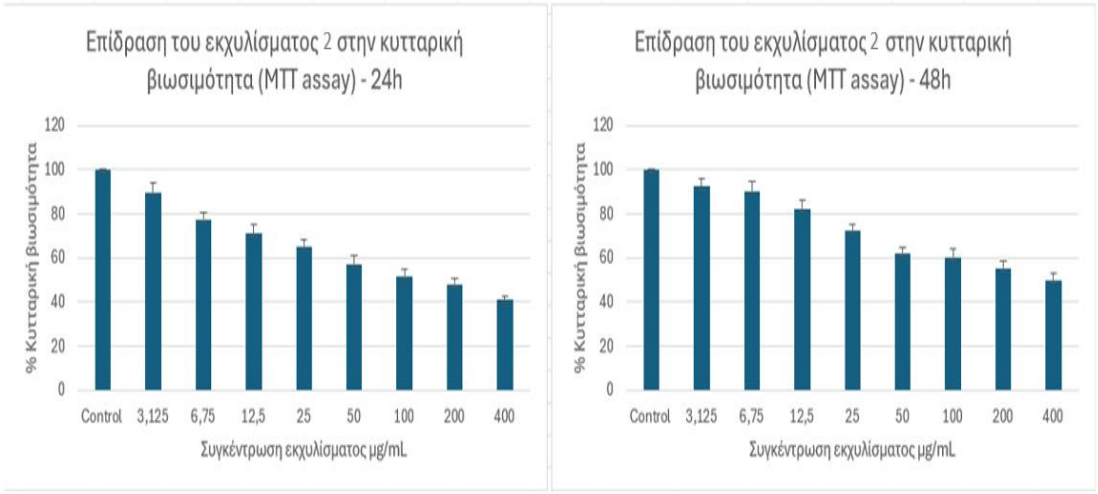
Επιπλέον, παρατηρήθηκε γενικά ότι η κυτταρική βιωσιμότητα στις 48 ώρες ήταν γενικά υψηλότερη σε σχέση με τις 24 ώρες, γεγονός που ενδέχεται να υποδηλώνει περιορισμένη και μη χρονικά εξαρτώμενη κυτταροτοξική δράση των εκχυλισμάτων. Για το λόγο αυτό, η πειραματική διαδικασία δεν επεκτάθηκε στις 72 ώρες, καθώς δεν αναμενόταν σημαντική περαιτέρω μεταβολή της κυτταρικής βιωσιμότητας.

Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι τα εκχυλίσματα παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με το τυφλό (κύτταρα χωρίς επίδραση εκχυλίσματος) και στα δύο χρονικά σημεία αξιολόγησης, στις 24 h και στις 48 h ($p<0,05$). Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ισχυρή και δοσοεξαρτώμενη επίδραση των εκχυλισμάτων στη βιωσιμότητα των κυττάρων, καθώς η μεταβολή της συγκέντρωσης συνοδεύτηκε από αντίστοιχη μεταβολή της κυτταρικής απόκρισης.

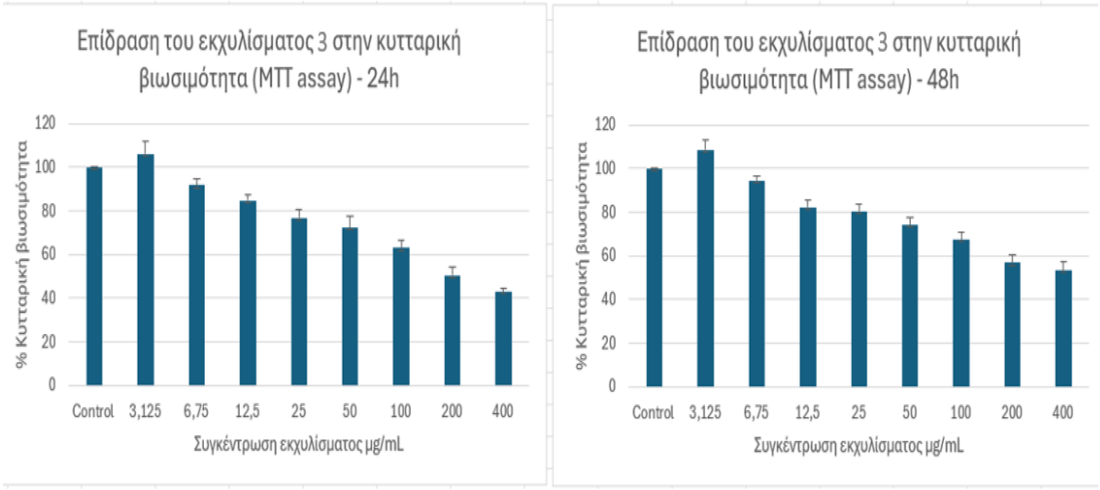
Η γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων για τα μεμονωμένα εκχυλίσματα καθώς και για τον συνδυασμό τους παρουσιάζεται στα χαρακτηριστικά διαγράμματα που ακολουθούν **(Εικόνες 44-48)**.



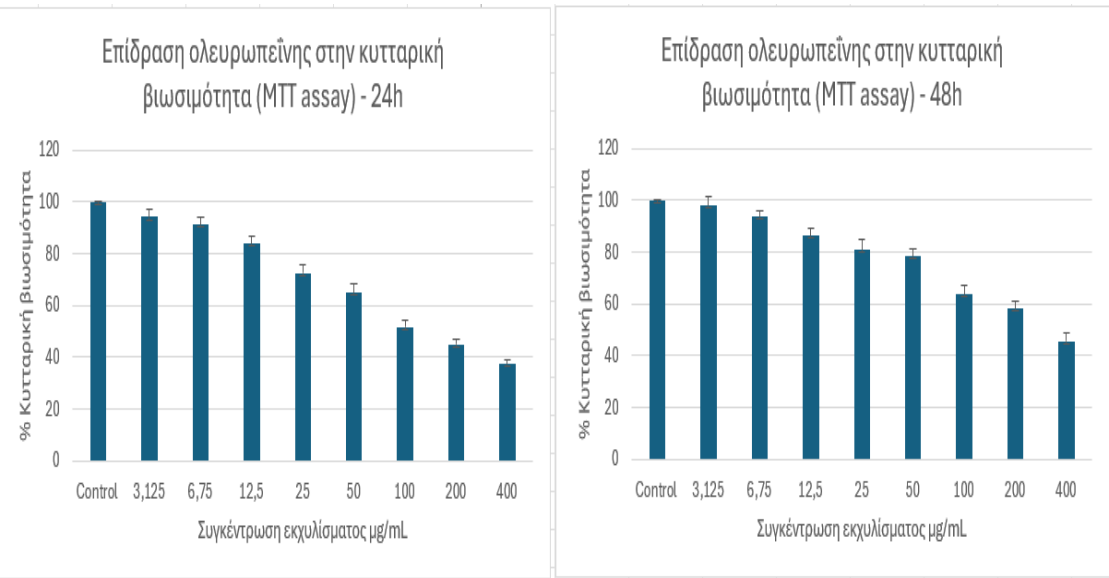
Εικόνα 44: Γραφική απεικόνιση επίδρασης εκχυλίσματος 1 στην κυτταρική βιωσιμότητα, 24-48h.



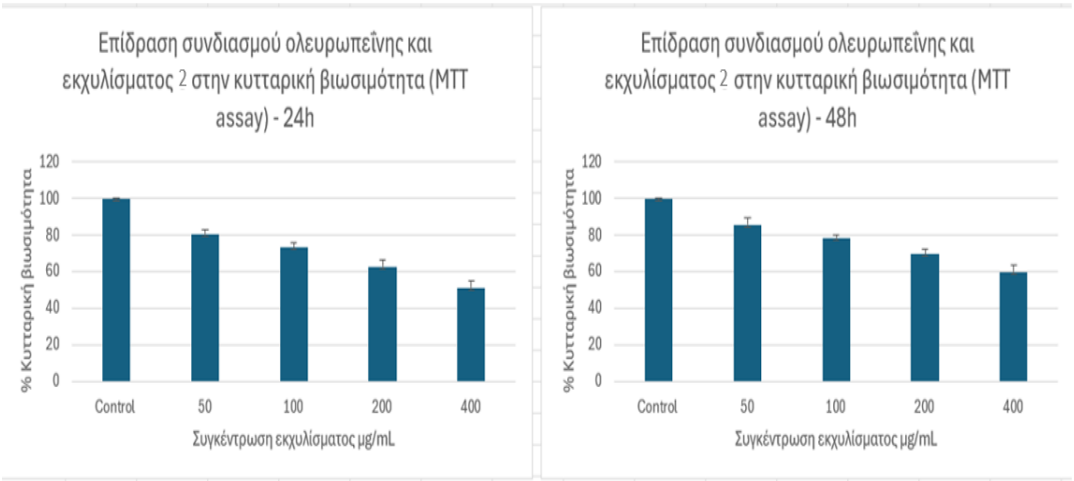
Εικόνα 45: Επίδραση εκχυλίσματος 2 στην κυτταρική βιωσιμότητα, 24-48h.



Εικόνα 46: Επίδραση εκχυλίσματος 3 στην κυτταρική βιωσιμότητα, 24-48h.



Εικόνα 47: Επίδραση ολευρωπεΐνης στην κυτταρική βιωσιμότητα, 24-48h.



Εικόνα 48: Επίδραση συνδυασμού ολευρωπεΐνης και εκχυλίσματος 2 στην κυτταρική βιωσιμότητα, 24-48h.

6.5 Αποτελέσματα Νέτωσης

Μελέτη της επίδρασης εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς στο σχηματισμό εξωκυττάριων παγίδων ουδετερόφιλων

Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από προηγούμενα πειραματικά δεδομένα, επιλέχθηκε για περαιτέρω διερεύνηση η δράση του εκχυλίσματος 2 στην αναστολή του σχηματισμού εξωκυττάριων παγίδων ουδετερόφιλων (NETs), το οποίο είναι πλούσιο σε φαινολικά συστατικά μετά από επεξεργασία με DCM. Παράλληλα, χρησιμοποιήθηκε και ολευρωπεΐνη (εκχύλισμα 4) ως μάρτυρας, προκειμένου να αξιολογηθεί συγκριτικά η δράση του εκχυλίσματος.

Η συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε ήταν τα 25μg/mL, καθώς αντιστοιχεί στην τιμή IC_{50} του εκχυλίσματος 2 από τη μελέτη της αντιοξειδωτικής του δράσης. Επιπλέον, η επιλογή της συγκεκριμένης συγκέντρωσης έγινε λαμβάνοντας υπόψη την πιθανή τοξικότητα του διαλύτη DMSO στα κύτταρα.

Μετά την επώαση, τα ουδετερόφιλα, τα οποία είχαν προσκολληθεί σε κατάλληλες καλυπτρίδες, υποβλήθηκαν σε χρώση και παρατηρήθηκαν με τη χρήση φθοριστικού μικροσκοπίου. Κατά την ανάλυση καταγράφηκε τόσο ο συνολικός αριθμός των ουδετερόφιλων όσο και ο αριθμός εκείνων που παρουσίασαν σχηματισμό εξωκυττάριων παγίδων (NETs).

Στη συνέχεια, υπολογίστηκε ο λόγος των κυττάρων που σχημάτισαν NETs προς τον συνολικό αριθμό ουδετερόφιλων, τόσο παρουσία όσο και απουσία του εκχυλίσματος. Με βάση τα δεδομένα αυτά, προσδιορίστηκε το ποσοστό αναστολής της νέτωσης που προκαλείται από τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα.

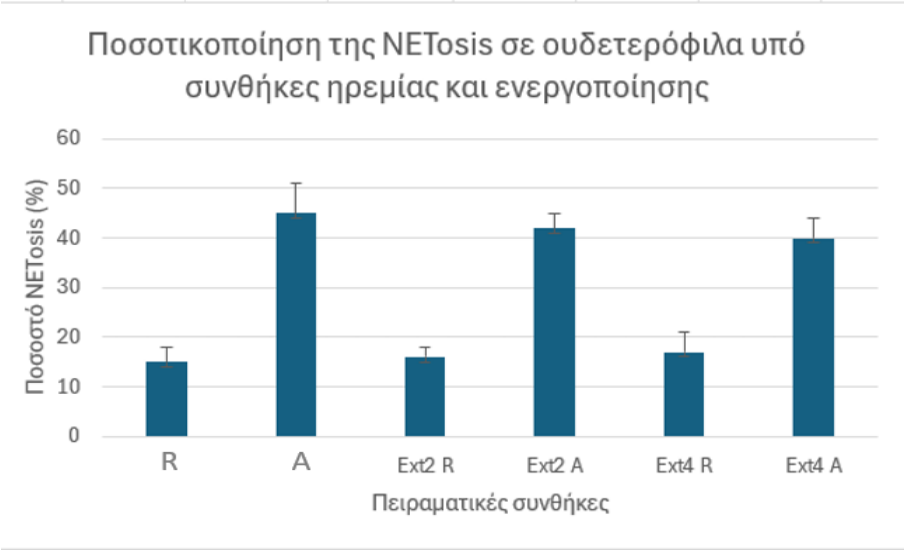
Τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης της NETosis στις εξεταζόμενες πειραματικές συνθήκες συνοψίζονται στον **Πίνακα 25**.

Πίνακας 25: Ποσοστό σχηματισμού εξωκυττάριων παγίδων ουδετερόφιλων (NETosis) σε συνθήκες ηρεμίας και ενεργοποίησης, παρουσία ή απουσία εκχυλίσματος 2 και ολευρωπεΐνης.

Πειραματικές Συνθήκες	**% NETosis**
Resting	15±3
Εκχύλισμα 2 (25μg/mL) Resting	16±2
Ολευρωπεΐνη (25μg/mL) Resting	17±4
Activated	45±6
Εκχύλισμα 2 (25μg/mL) Activated	42±3
Ολευρωπεΐνη (25μg/mL) Activated	40±4

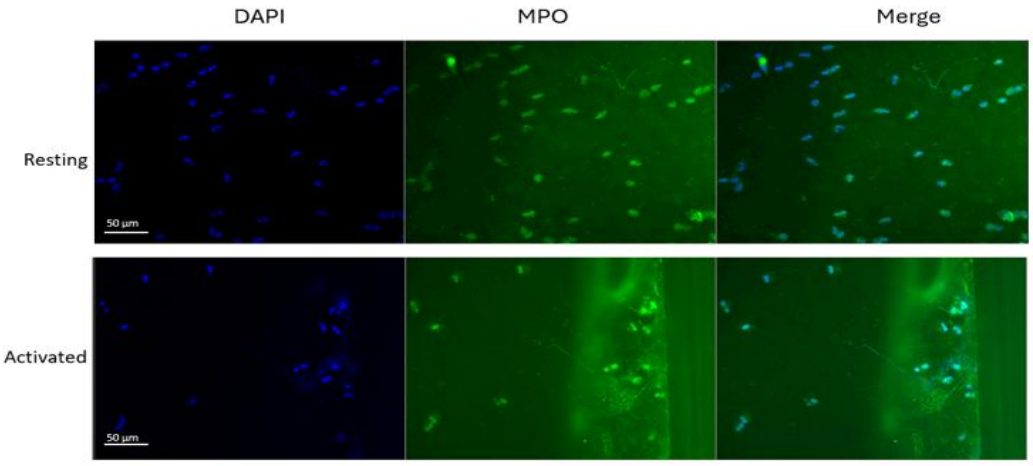
Η μελέτη της επίδρασης των δειγμάτων στο σχηματισμό εξωκυττάριων παγίδων ουδετερόφιλων (NETs) έδειξε ότι το εκχύλισμα εμπλουτισμένο σε σεκοϊριδοειδή και φλαβονοειδή, καθώς και η απομονωμένη ολευρωπεΐνη, δεν επηρέασαν σημαντικά τη διαδικασία της NETosis. Ειδικότερα, κανένα από τα δύο δείγματα δεν προκάλεσε ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων υπό συνθήκες ηρεμίας, ενώ στα ενεργοποιημένα κύτταρα παρατηρήθηκε μόνο ήπια τάση μείωσης του σχηματισμού NETs, η οποία δεν ήταν στατιστικά σημαντική.

Η γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων παρουσιάζεται στο διάγραμμα που ακολουθεί **(Εικόνα 49)**.

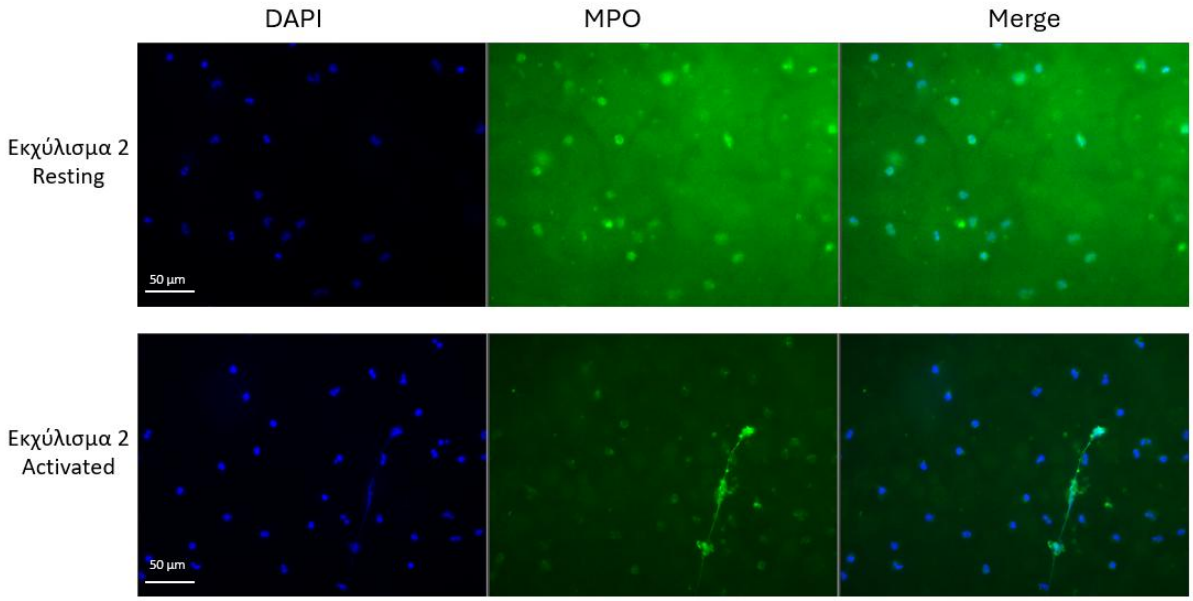


Εικόνα 49: Γραφική απεικόνιση του ποσοστού σχηματισμού εξωκυττάριων παγίδων ουδετερόφιλων (NETosis) σε συνθήκες ηρεμίας και ενεργοποίησης, παρουσία ή απουσία εκχυλίσματος 2 και ολευρωπεΐνης.

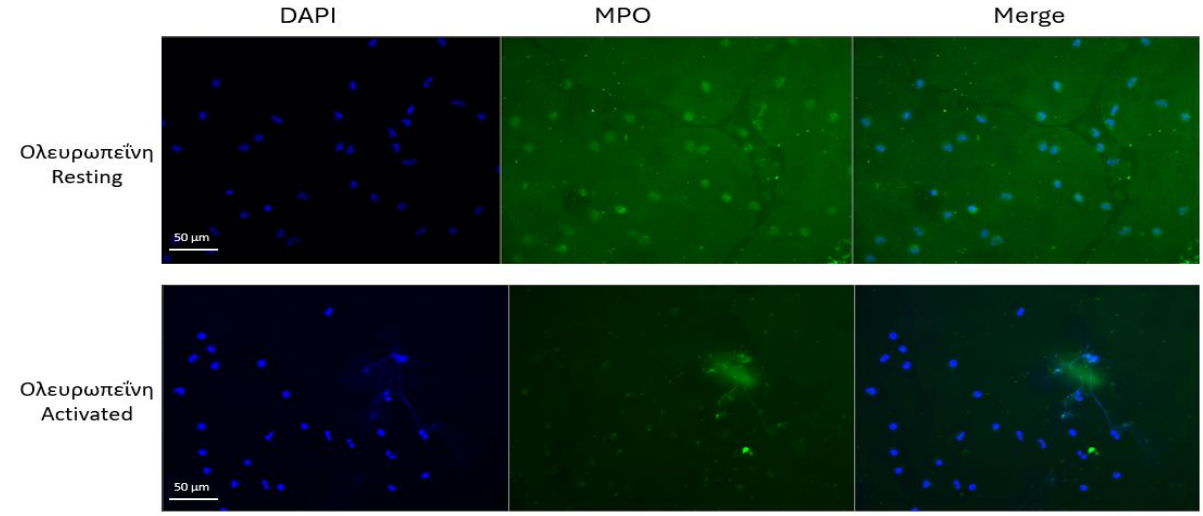
Ακολουθούν αντιπροσωπευτικές εικόνες από φθοριστικό μικροσκόπιο στις διαφορετικές πειραματικές συνθήκες **(Εικόνες 50,51,52)**.



Εικόνα 50: Αντιπροσωπευτικές εικόνες φθοριστικής μικροσκοπίας ουδετερόφιλων, Resting, Activated. Ο πυρήνας των κυττάρων ανιχνεύθηκε με χρώση DAPI (μπλε), ενώ η μυελοϋπεροξειδάση (MPO) ανιχνεύθηκε με ειδική φθορίζουσα χρώση (πράσινο). Η τρίτη στήλη παρουσιάζει τη συγχώνευση των καναλιών (merge). Οι εικόνες λήφθηκαν με φθοριστικό μικροσκόπιο Leica DFC 7000 GT χρησιμοποιώντας αντικειμενικό φακό 40×. Scale bar = 50 μm.



Εικόνα 51: Αντιπροσωπευτικές εικόνες φθοριστικής μικροσκοπίας ουδετερόφιλων, Εκχύλισμα 2 Resting, Activated. Ο πυρήνας των κυττάρων ανιχνεύθηκε με χρώση DAPI (μπλε), ενώ η μυελοϋπεροξειδάση (MPO) ανιχνεύθηκε με ειδική φθορίζουσα χρώση (πράσινο). Η τρίτη στήλη παρουσιάζει τη συγχώνευση των καναλιών (merge). Οι εικόνες λήφθηκαν με φθοριστικό μικροσκόπιο Leica DFC 7000 GT χρησιμοποιώντας αντικειμενικό φακό 40×. Scale bar = 50 μm.



Εικόνα 52: Αντιπροσωπευτικές εικόνες φθοριστικής μικροσκοπίας ουδετερόφιλων, Ολευρωπεΐνη Resting, Activated. Ο πυρήνας των κυττάρων ανιχνεύθηκε με χρώση DAPI (μπλε), ενώ η μυελοϋπεροξειδάση (MPO) ανιχνεύθηκε με ειδική φθορίζουσα χρώση (πράσινο). Η τρίτη στήλη παρουσιάζει τη συγχώνευση των καναλιών (merge). Οι εικόνες λήφθηκαν με φθοριστικό μικροσκόπιο Leica DFC 7000 GT χρησιμοποιώντας αντικειμενικό φακό 40×. Scale bar = 50 μm.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7ο : ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα μελέτη επικεντρώθηκε σε εκχυλίσματα φύλλων ελιάς, τα οποία παρασκευάστηκαν στο Εργαστήριο Αξιοποίησης Βιοδραστικών Φυσικών Προϊόντων του Τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, (ΕΥ καθηγητής κ. Α.-Λ. Σκαλτσούνης). Τα εκχυλίσματα φύλλων ελιάς παρασκευάστηκαν με εκχύλιση σε ακετόνη, ακολουθούμενη από συμπύκνωση και διαχωρισμό των συστατικών τους με διχλωρομεθάνιο (DCM). Με τη διαδικασία αυτή προέκυψαν ένα αρχικό ακετονικό εκχύλισμα (Εκχύλισμα 1), ένα κλάσμα εμπλουτισμένο σε φαινολικές ενώσεις (Εκχύλισμα 2) και ένα κλάσμα εμπλουτισμένο σε τερπένια (Εκχύλισμα 3), τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τη διερεύνηση της βιολογικής τους δράσης. Η ταυτοποίηση των κύριων συστατικών πραγματοποιήθηκε με συνδυασμό HPLC-DAD και HPLC-MSQ με αρνητικό ιοντισμό ($[M–H]^-$), επιτρέποντας τόσο τον χρωματογραφικό διαχωρισμό και τη καταγραφή στην περιοχή UV όσο και την επιβεβαίωση των μοριακών ιόντων βάσει του λόγου m/z. Η συνδυαστική αυτή αναλυτική προσέγγιση διασφάλισε την ταυτοποίηση και την επιβεβαίωση του κάθε μεταβολίτη.

Στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκαν τρία εκχυλίσματα φύλλων ελιάς διαφορετικής χημικής σύστασης, καθώς και δύο πρότυπες φαινολικές ενώσεις. Το Εκχύλισμα 1 αποτελούσε το αρχικό ακετονικό εκχύλισμα και περιείχε φαινολικά συστατικά, κυρίως σεκοϊριδοειδή και φλαβονοειδή, καθώς και τερπενικές ενώσεις. Το εκχύλισμα 2 προέκυψε μετά από επεξεργασία του αρχικού εκχυλίσματος με διχλωρομεθάνιο (DCM) και ήταν εμπλουτισμένο σε φαινολικά συστατικά, κυρίως σεκοϊριδοειδή και φλαβονοειδή. Το εκχύλισμα 3 αντιστοιχούσε στο κλάσμα που παραλήφθηκε μετά την απομάκρυνση του DCM και ήταν εμπλουτισμένο σε τερπένια. Επιπλέον, η ολευρωπεΐνη και ο ολευρωσίδης μελετήθηκαν ως πρότυπες ενώσεις αναφοράς, προκειμένου να διερευνηθεί η συμβολή τους στις βιολογικές δράσεις των εκχυλισμάτων.

Στο πλαίσιο της μελέτης, παρασκευάστηκαν αρχικά πυκνά διαλύματα (stock). Για τα εκχυλίσματα 1-3, τα stock διαλύματα είχαν συγκέντρωση 10mg/mL. Ενώ για τις ενώσεις 4,5 το stock διάλυμα είχε συγκέντρωση 56,32mg/mL και 51,88mg/mL

αντίστοιχα. Όλα τα διαλύματα φυλάχθηκαν υπό ατμόσφαιρα αζώτου, σφραγίστηκαν και αποθηκεύτηκαν στους −20°C. Μετά από κατάλληλες διαδοχικές αραιώσεις των αρχικών διαλυμάτων, παρασκευάστηκαν διαλύματα εργασίας σε εύρος συγκεντρώσεων 5–200 μg/mL, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των πειραμάτων.

Η επίδραση των εκχυλισμάτων στην οξείδωση της LDL με $CuSO_4$ παρακολουθήθηκε μέσω του σχηματισμού συζυγών διενίων. Η ανασταλτική δράση εκτιμήθηκε με βάση το λανθάνοντα χρόνο, τον ρυθμό σχηματισμού και τη συνολική ποσότητα διενίων, καθώς και τις τιμές IC_{50}. Η διερεύνηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εξεταζόμενων δειγμάτων ανέδειξε τον ολευρωσίδη ως την πιο δραστική ένωση έναντι της οξείδωσης της LDL (IC_{50} < 5μg/mL). Το εκχύλισμα 2, εμπλουτισμένο σε φαινολικά συστατικά μετά από επεξεργασία με DCM, εμφάνισε χαμηλότερη τιμή IC_{50} σε σχέση με την ολευρωπεΐνη. Πιο συγκεκριμένα, το εκχύλισμα 4, που αποτελεί ολευρωπεΐνη, παρουσίασε περίπου διπλάσια τιμή IC_{50} σε σχέση με το εκχύλισμα 2, ίση με 50μg/mL. Το εύρημα αυτό πιθανότατα να οφείλεται στην συνεργατική δράση των φαινολικών συστατικών, η οποία φαίνεται να βελτιώνει το βιολογικό αποτέλεσμα. Ακολουθεί σε αποτελεσματικότητα το εκχύλισμα 1, το οποίο περιέχει φαινολικά συστατικά (σεκοϊριδοειδή/φλαβονοειδή) και τερπένια, παρουσιάζοντας επίσης αξιόλογη αντιοξειδωτική δράση (IC_{50}=35μg/mL). Αντίθετα, το εκχύλισμα 3 (εμπλουτισμένο σε τερπένια μετά από επεξεργασία DCM) δεν εμφάνισε σημαντική ανασταλτική ικανότητα.

Η πιθανή αντιαιμοπεταλιακή δράση των εκχυλισμάτων διερευνήθηκε μετά από ενεργοποίηση αιμοπεταλίων με αραχιδονικό οξύ (AA), ADP και TRAP-6. Σε όλες τις πειραματικές συνθήκες, τα εκχυλίσματα δεν προκάλεσαν στατιστικά σημαντική αναστολή της συσσώρευσης, καθώς η απόκριση των αιμοπεταλίων παρέμεινε συγκρίσιμη με εκείνη του μάρτυρα. Συνεπώς, τα μελετώμενα εκχυλίσματα δεν παρουσιάζουν αντιαιμοπεταλιακή δράση υπό τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες, γεγονός που υποδηλώνει ότι δεν παρεμβαίνουν στους υποκείμενους μηχανισμούς ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων.

Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας MTT στην καρκινική κυτταρική σειρά μαστού MCF-7 έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα 1 και 3 παρουσίασαν μέτρια κυτταροτοξική δράση μόνο στη μέγιστη εξεταζόμενη συγκέντρωση των 400 μg/mL. Συνεπώς, τα υπό μελέτη

εκχυλίσματα δεν ασκούν αξιοσημείωτη κυτταροτοξική επίδραση στη συγκεκριμένη σειρά υπό τις παρούσες πειραματικές συνθήκες.

Το εκχύλισμα 2 - εμπλουτισμένο σε φαινολικά συστατικά μετά από επεξεργασία με DCM - παρουσίασε σχετικά καλύτερη κυτταροτοξική δράση, συγκριτικά με τα προηγούμενα εκχυλίσματα, με ποσοστό περίπου 40% στη μέγιστη συγκέντρωση των 400μg/mL στις 24 ώρες. Όμως ακόμη και στη μικρότερη συγκέντρωση η κυτταρική βιωσιμότητα, όπως παρατηρήθηκε και στα υπόλοιπα εκχυλίσματα, διατηρήθηκε σε σχετικά υψηλά επίπεδα. Η ολευρωπεΐνη παρουσίασε παρόμοια κυτταροτοξική δράση με το εκχύλισμα 2, καθώς στη μέγιστη συγκέντρωση κατέγραψε αναστολή της κυτταρικής βιωσιμότητας 37% στις 24 ώρες. Παρ' όλα αυτά, επιλέχθηκε να διερευνηθεί και ο συνδυασμός της ολευρωπεΐνης με το εκχύλισμα 2. Η μελέτη του συνδυασμού περιορίστηκε στις συγκεντρώσεις 400, 200, 100 και 50μg/mL, δεδομένου ότι οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις δεν θεωρήθηκαν επαρκώς δραστικές για περαιτέρω διερεύνηση. Ωστόσο, τα αποτελέσματα δεν ανέδειξαν πιθανή συνεργατική δράση ως προς τη μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας των καρκινικών κυττάρων μαστού, καθώς οι τιμές που παρατηρήθηκαν ήταν υψηλότερες σε σύγκριση με εκείνες που καταγράφηκαν όταν οι δύο παράγοντες μελετήθηκαν μεμονωμένα.

Παρατηρήθηκε γενικά ότι η κυτταρική βιωσιμότητα στις 48 ώρες ήταν υψηλότερη σε σχέση με τις 24 ώρες, γεγονός που ενδέχεται να υποδηλώνει περιορισμένη και μη χρονικά εξαρτώμενη κυτταροτοξική δράση των εκχυλισμάτων. Για το λόγο αυτό, η πειραματική διαδικασία δεν επεκτάθηκε σε χρονικό σημείο 72 ωρών, καθώς δεν αναμενόταν σημαντική περαιτέρω μεταβολή της κυτταρικής βιωσιμότητας.

Ο ολευρωσίδης δεν συμπεριλήφθηκε στη μελέτη κυτταροτοξικότητας (MTT), καθώς, σε αντίθεση με την ολευρωπεΐνη και τα τερπένια, δεν εντοπίστηκαν επαρκείς βιβλιογραφικές αναφορές που να τεκμηριώνουν πιθανή αντικαρκινική δράση της.

Τέλος, το εκχύλισμα 2, το οποίο χαρακτηρίζεται από υψηλή περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά μετά από επεξεργασία με DCM, επιλέχθηκε για περαιτέρω αξιολόγηση της επίδρασής του στο σχηματισμό εξωκυττάριων παγίδων ουδετερόφιλων (NETs), με χρήση ολευρωπεΐνης ως συγκριτικού μάρτυρα. Στη συγκέντρωση των 25 μg/mL, η οποία αντιστοιχεί στην τιμή IC_{50} του εκχυλίσματος από τη μελέτη της αντιοξειδωτικής του δράσης, τόσο το εκχύλισμα 2 όσο και η

ολευρωπεΐνη δεν προκάλεσαν μεταβολές στο σχηματισμό NETs υπό συνθήκες ηρεμίας. Τα επίπεδα της NETosis παρέμειναν συγκρίσιμα με εκείνα της συνθήκης ηρεμίας (resting), γεγονός που υποδηλώνει ότι τα δείγματα δεν προκαλούν αυθόρμητη ενεργοποίηση ή επαγωγή του φαινομένου. Επιπλέον, στα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα παρατηρήθηκε μικρή μείωση του ποσοστού της NETosis παρουσία των εξεταζόμενων δειγμάτων σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (control). Ωστόσο, η μείωση αυτή δεν ήταν επαρκώς έντονη ώστε να θεωρηθεί βιολογικά σημαντική, υποδεικνύοντας ότι, υπό τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες, τα δείγματα δεν ασκούν ουσιαστική ανασταλτική δράση στο σχηματισμό NETs.

Συνολικά, η στατιστική ανάλυση των πειραματικών δεδομένων, η οποία πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος SPSS Statistics (IBM) και του κριτηρίου Independent-samples t-test, ανέδειξε ότι τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα παρουσιάζουν βιολογική δράση με σαφή δοσοεξαρτώμενη συμπεριφορά. Ειδικότερα, παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των συγκεντρώσεων και των αντίστοιχων ομάδων ελέγχου ($p<0,05$), ως προς την αντιοξειδωτική δράση και ως προς την επίδραση στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Η αύξηση της συγκέντρωσης των εκχυλισμάτων συνοδεύτηκε από ενίσχυση της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας, υποδεικνύοντας σημαντική προστατευτική δράση έναντι οξειδωτικών μηχανισμών. Επιπλέον, τα αποτελέσματα της μελέτης της κυτταρικής βιωσιμότητας έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά συγκριτικά με το τυφλό (κύτταρα) τόσο στις 24 όσο και στις 48 ώρες, υποδηλώνοντας ότι η δράση τους διαφοροποιείται ανάλογα με τη συγκέντρωση και τον χρόνο έκθεσης. Συνεπώς, η παρούσα μελέτη παρέχει ενδείξεις ότι τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα διαθέτουν σημαντική αντιοξειδωτική δραστικότητα και επηρεάζουν την κυτταρική απόκριση με δοσοεξαρτώμενο τρόπο αλλά και τον χρόνο έκθεσης, αναδεικνύοντας την ανάγκη για περαιτέρω διερεύνηση των βιολογικών τους επιδράσεων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8ο : ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η μεσογειακή διατροφή έχει αναγνωριστεί διεθνώς για τα σημαντικά οφέλη της στην ανθρώπινη υγεία, με τα προϊόντα της ελιάς να αποτελούν έναν από τους βασικότερους παράγοντες που συμβάλλουν σε αυτήν τη θετική επίδραση. Τα φύλλα ελιάς, το ελαιόλαδο και άλλα παράγωγα της ελιάς περιλαμβάνουν πληθώρα βιοδραστικών συστατικών, τα οποία συμβάλλουν στη βιολογική τους δραστικότητα και τα καθιστούν αντικείμενο ιδιαίτερου επιστημονικού ενδιαφέροντος για την προαγωγή της υγείας. Παράλληλα, επιδημιολογικά δεδομένα έχουν δείξει ότι οι μεσογειακές χώρες παρουσίασαν αύξηση στο προσδόκιμο ζωής σε σύγκριση με άλλες δυτικές κοινωνίες, γεγονός που αποδίδεται σε μεγάλο βαθμό στην προσήλωση στο συγκεκριμένο διατροφικό πρότυπο. Συνεπώς, τα προϊόντα της ελιάς συνολικά θεωρείται ότι διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη θετική συσχέτιση της μεσογειακής διατροφής με τη μακροζωία και την προαγωγή της συνολικής υγείας (Perona & Botham, 2013).

Ειδικότερα, η ολευρωπεΐνη και τα παράγωγά της, εμφανίζουν έντονη αντιοξειδωτική δράση, η οποία εκδηλώνεται μέσω ποικίλων βιοχημικών μηχανισμών, συμβάλλοντας στη συνολική ενίσχυση της αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού (Barbaro et al., 2014). Η αντιοξειδωτική τους ικανότητα αποδίδεται κυρίως στη δυνατότητά της να σταθεροποιεί τις ελεύθερες ρίζες, διαδικασία που επιτυγχάνεται μέσω του σχηματισμού ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου ανάμεσα στο υδρογόνο της υδροξυλομάδας και τις φαινοξυλικές ρίζες του μορίου (Visioli et al., 1998). Πειραματικές μελέτες *in vitro*, χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία της ρίζας 2,2-διφαινυλ-1-πικρυλυδραζυλίου (DPPH), έχουν δείξει ότι η ολευρωπεΐνη είναι ικανή να περιορίζει το οξειδωτικό στρες, παρουσιάζοντας αντιοξειδωτική ισχύ συγκρίσιμη με εκείνη γνωστών αντιοξειδωτικών παραγόντων, όπως το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) και η α-τοκοφερόλη (βιταμίνη E) (Visioli et al., 1998). Επιπλέον, η ολευρωπεΐνη φαίνεται να ασκεί προστατευτική επίδραση έναντι της οξείδωσης των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL) (Barbaro et al., 2014). Συγκεκριμένα, μελέτες *in vitro* έχουν καταδείξει ότι αναστέλλει την οξείδωση της LDL που προκαλείται από ιόντα χαλκού, ενώ αντίστοιχα αποτελέσματα έχουν παρατηρηθεί

και σε *in vivo* πειραματικά μοντέλα. Σε μελέτες σε κουνέλια, η χορήγηση ολευρωπεΐνης συσχετίστηκε με μείωση των επιπέδων της χοληστερόλης στο πλάσμα (Barbaro et al., 2014).

Η ολευρωπεΐνη και παράγωγά της, παρουσιάζουν επίσης σημαντική προστατευτική δράση στο καρδιαγγειακό σύστημα, η οποία αποδίδεται στο συνδυασμό των αντιοξειδωτικών, αντιφλεγμονωδών και αντιαθηρογόνων ιδιοτήτων της. Πειραματικά δεδομένα αποδεικνύουν ότι περιορίζουν το οξειδωτικό στρες που προκαλείται κατά τη φάση της επαναφοράς της αιμάτωσης μετά από ισχαιμία, μειώνοντας την έκθεση του καρδιακού ιστού σε οξειδωτικές βλάβες. Παράλληλα, η ολευρωπεΐνη συμβάλλει στη βελτίωση της αγγειακής λειτουργίας μέσω αγγειοδιασταλτικών και αντιαιμοπεταλιακών μηχανισμών, καθώς και μέσω της ρύθμισης της αρτηριακής πίεσης. Σε κυτταρικό επίπεδο, αναστέλλει την παραγωγή προφλεγμονωδών και προθρομβωτικών μεσολαβητών, περιορίζοντας τη συσσώρευση αιμοπεταλίων και τη φλεγμονώδη ενεργοποίηση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι μειώνει τα επίπεδα λιπιδίων και αναστέλλει κρίσιμες διεργασίες που σχετίζονται με την οξείδωση της LDL και την εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης, υποδηλώνοντας τον πολυπαραγοντικό ρόλο της στην πρόληψη καρδιαγγειακών παθήσεων (Barbaro et al., 2014).

Η κατανάλωση ελιάς και προϊόντων της αποτελεί θεμελιώδες στοιχείο της μεσογειακής διατροφής και έχει συσχετιστεί με σημαντικά οφέλη για την ανθρώπινη υγεία, συμπεριλαμβανομένης της μειωμένης επίπτωσης ορισμένων μορφών καρκίνου. Επιδημιολογικές μελέτες καταδεικνύουν αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ της κατανάλωσης προϊόντων ελιάς και της συχνότητας εμφάνισης μορφών καρκίνου, όπως του παχέος εντέρου, του μαστού και του δέρματος. Οι αντικαρκινικές αυτές ιδιότητες αποδίδονται σε πολλαπλούς μηχανισμούς, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγεται η μείωση της δράσης περιβαλλοντικών και διατροφικών καρκινογόνων παραγόντων, καθώς και η προστασία των κυττάρων από το οξειδωτικό στρες (Barbaro et al., 2014). Ο ρόλος αυτός ενισχύεται τόσο από την παρουσία πολυφαινολικών ενώσεων με ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, όπως η υδροξυτυροσόλη, η ολευρωπεΐνη και παράγωγά τους (Tunca et al., 2012). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η ολευρωπεΐνη, βιοδραστική ένωση που συναντάται κυρίως στα φύλλα ελιάς, και έχει αναδειχθεί ως βασικός παράγοντας της

αντικαρκινικής δράσης, παρουσιάζοντας αντιπολλαπλασιαστική και προαποπτωτική δράση σε διάφορα καρκινικά κύτταρα *in vitro*, καθώς και ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη καρκινικών όγκων σε πειραματικά ζωικά μοντέλα (Casaburi et al., 2013).

Σε μελέτη από τους Han et al. αξιολογήθηκε η αντικαρκινική δράση της ολευρωπεΐνης σε κύτταρα καρκίνου μαστού MCF-7 σε συγκεντρώσεις 25, 50, 100 και 200μg/mL, όπου παρατηρήθηκε μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας με τρόπο εξαρτώμενο από τη δόση και τον χρόνο έκθεσης, με την ισχυρότερη επίδραση να καταγράφετε στα 200μg/mL. Η δράση αυτή επιβεβαιώθηκε τόσο με τη δοκιμασία MTT όσο και με κυτταρομετρία ροής, όπου παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση του κυτταρικού θανάτου. Αξιοσημείωτο είναι ότι η ολευρωπεΐνη δεν εμφάνισε κυτταροτοξικότητα σε φυσιολογικά κύτταρα στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις, γεγονός που υποδηλώνει πιθανή επιλεκτική αντικαρκινική δράση (Han et al., 2009).

Οι Elamin et al. μελέτησαν την αντικαρκινική δράση της ολευρωπεΐνης σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού, αξιοποιώντας τις MDA-MB-231 και MCF-7, καθώς και τη μη κακοήθη σειρά MCF-10A, προκειμένου να διερευνήσουν τόσο την αποτελεσματικότητα όσο και την εκλεκτικότητα της ένωσης. Η κυτταροτοξικότητα εκτιμήθηκε με τη χρωματομετρική δοκιμασία WST-1 (άλατος τετραζολίου) έπειτα από 24ωρη επώαση, σε εύρος συγκεντρώσεων 100–370μM. Τα αποτελέσματα ανέδειξαν ότι η ολευρωπεΐνη εμφανίζει εκλεκτική κυτταροτοξική δράση έναντι των καρκινικών κυττάρων, με εντονότερη επίδραση στη βασικού τύπου σειρά MDA-MB-231 συγκριτικά με τα κύτταρα MCF-7. Παράλληλα, διαπιστώθηκε ότι η ολευρωπεΐνη επάγει απόπτωση μέσω της μιτοχονδριακής οδού και καταστέλλει τη δράση του αντι-αποπτωτικού και προ-πολλαπλασιαστικού παράγοντα NF-κB, καθώς και του βασικού του στόχου, της κυκλίνης D1. Η αναστολή αυτών των μοριακών μηχανισμών φαίνεται να συμβάλλει καθοριστικά στη μείωση του πολλαπλασιασμού και στην ενίσχυση του κυτταρικού θανάτου στα καρκινικά κύτταρα του μαστού (Elamin et al., 2013).

Η αθηροσκλήρωση αποτελεί μια χρόνια φλεγμονώδη διαδικασία, στην οποία το οξειδωτικό στρες, η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και η ενεργοποίηση φλεγμονωδών μηχανισμών, όπως ο NF-κB, συμβάλλουν καθοριστικά στην εξέλιξη και αποσταθεροποίηση της αθηρωματικής πλάκας (Summerhill et al., 2018, D'Amore et al., 2016). Στο πλαίσιο αυτό, οι βιοδραστικές ενώσεις της ελιάς, κυρίως η ολευρωπεΐνη, η υδροξυτυροσόλη και παράγωγά τους, παρουσιάζουν σημαντικές

αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και αθηροπροστατευτικές ιδιότητες, καθώς μειώνουν τη φλεγμονή του ενδοθηλίου, την έκφραση μορίων προσκόλλησης και την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών, συμβάλλοντας στη διατήρηση της αγγειακής ομοιόστασης και στη σταθεροποίηση της αθηροσκληρωτικής πλάκας (Efentakis et al., 2015, Crespo et al., 2018, Lou-Bonafonte et al., 2012).

Επιπλέον, δεδομένου ότι τα NETs συμμετέχουν ενεργά στην ενίσχυση της αγγειακής φλεγμονής και στην αποσταθεροποίηση των αθηροσκληρωτικών πλακών, οι αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες των συστατικών της ελιάς ενδέχεται να παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως προς τη συνολική καρδιοπροστατευτική τους δράση (Adamidis et al., 2024). Σύμφωνα με μελέτη των Bedouhene et al., η ολευρωπεΐνη και η υδροξυτυροσόλη παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδη δράση μέσω της ρύθμισης της λειτουργίας των ουδετερόφιλων. Ειδικότερα, μειώνουν με δοσοεξαρτώμενο τρόπο την αποκοκκίωση των κυττάρων και την απελευθέρωση ενζύμων, όπως η μυελοϋπεροξειδάση (MPO) και η λακτοφερρίνη. Η δράση αυτή φαίνεται να συμβάλλει στον περιορισμό μηχανισμών που σχετίζονται με τον σχηματισμό των NETs και τη φλεγμονώδη απόκριση (Bedouhene et al., 2017).

Τα τερπένια αποτελούν και αυτά μια σημαντική κατηγορία φυτικών χημικών ενώσεων με βιολογική δράση που εκτείνεται πέρα από τις αρωματικές τους ιδιότητες (Sharma et al., 2025). Αποτελούν τις κύριες βιοδραστικές ενώσεις των αιθέριων ελαίων (Masyita et al., 2022) και τα τελευταία χρόνια έχουν προσελκύσει έντονο επιστημονικό ενδιαφέρον λόγω των πιθανών αντικαρκινικών, αντιβακτηριακών, αντιοξειδωτικών και αντιφλεγμονωδών τους ιδιοτήτων. Στο πλαίσιο αυτό, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα φύλλα της ελιάς (*Olea europaea*), τα οποία περιέχουν σημαντικές ποσότητες τριτερπενικών οξέων, με κυριότερα το ολεανολικό και το μασλινικό οξύ. Οι ενώσεις αυτές συμβάλλουν καθοριστικά στη βιοδραστικότητα του φυτικού υλικού, ενισχύοντας το ενδιαφέρον για τη μελέτη των τερπενίων φυτικής προέλευσης.

Η οξείδωση της LDL χοληστερόλης αποτελεί βασικό μηχανισμό στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης και, συνεπώς, στην εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων. Πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι ορισμένα αιθέρια έλαια μπορούν να αναστείλουν την οξείδωση της LDL, κυρίως λόγω της παρουσίας μη φαινολικών μονοτερπενίων. Ενσωματώνονται στα σωματίδια της LDL και αυξάνουν την αντοχή

στην οξείδωση, προστατεύοντας παράλληλα ενδογενή αντιοξειδωτικά όπως τα καροτενοειδή. Ο μηχανισμός δράσης τους διαφέρει από εκείνον της βιταμίνης Ε, καθώς παρεμβαίνει στην αλυσιδωτή υπεροξείδωση των λιπιδίων χωρίς να δρα ως χηλικοποιητής μετάλλων (copper-chelator) (Graßmann, 2005). Επίσης αιθέρια έλαια που περιέχουν υψηλά ποσοστά μονοτερπενίων, όπως το λιμονένιο, έχουν παρουσιαστεί στη βιβλιογραφία ως ουσίες με αξιοσημείωτη αντιοξειδωτική δράση, η οποία προσδιορίστηκε μέσω της δοκιμής δέσμευσης του DPPH (Roberto et al., 2010).

Πειραματικές μελέτες δείχνουν επίσης τα τερπενικά οξέα μπορούν να αναστείλουν τον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων, να επάγουν απόπτωση και να ενισχύσουν τη δράση της χημειοθεραπείας. Μονοτέρπενια, έχουν συσχετιστεί με αναστολή της αγγειογένεσης και καθυστέρηση της ανάπτυξης όγκων. Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις αποτελεσματικότητας έναντι διαφόρων μορφών καρκίνου, όπως του πνεύμονα, του προστάτη και του μαστού (Sharma et al., 2025).

Προκλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι μπορούν να αναστείλουν την ανάπτυξη και την εμφάνιση όγκων του μαστού. Σε κλινικές μελέτες σε γυναίκες με πρώιμο καρκίνο του μαστού, η χορήγησή τους οδήγησε σε σημαντική μείωση της έκφρασης της κυκλίνης D1, μιας βασικής ρυθμιστικής πρωτεΐνης του κυτταρικού κύκλου. Επιπλέον, παρατηρήθηκαν μεταβολές που σχετίζονται με το μεταβολισμό γλυκόζης, οι οποίες συνδέονται με τον περιορισμό του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Gbadebo et al., 2025).

Παράλληλα, έρευνες έχουν δείξει ότι τα τερπένια φαίνεται να ασκούν προστατευτική δράση έναντι της αθηροσκλήρωσης μέσω ρύθμισης του μεταβολισμού των λιπιδίων και ενεργοποίησης της οδού AMPK, οδηγώντας σε περιορισμό της συσσώρευσης λιπιδίων και του σχηματισμού αφρωδών κυττάρων στα μακροφάγα (Luo et al., 2025).

Στο πλαίσιο της παρούσας μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας διερευνήθηκε η βιολογική δράση εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς με διαφοροποιημένο περιεχόμενο σε φαινολικές ενώσεις και τριτερπενικά συστατικά. Ειδικότερα, μελετήθηκαν ένα εκχύλισμα που περιείχε σεκοϊριδοειδή, φλαβονοειδή και τριτερπένια, ένα εκχύλισμα εμπλουτισμένο σε φαινολικές ενώσεις και ένα εκχύλισμα εμπλουτισμένο σε τριτερπενικά συστατικά μετά από επεξεργασία με DCM. Επιπλέον, αξιολογήθηκε η βιολογική δράση της ολευρωπεΐνης και του ολευρωσίδη, δύο κύριων σεκοϊριδοειδών των φύλλων ελιάς, με σκοπό τη συσχέτιση της χημικής σύστασης με τις παρατηρούμενες βιολογικές αποκρίσεις. Η επιστημονική προσέγγιση της παρούσας μελέτης βασίστηκε στην υπόθεση ότι ο συνδυασμός αυτών των βιοδραστικών συστατικών ενδεχομένως να ενισχύει ή να διατηρεί τις αναφερόμενες ευεργετικές δράσεις τους.

Πιο συγκεκριμένα το εκχύλισμα 1 αντιστοιχούσε στο αρχικό ακετονικό εκχύλισμα των φύλλων ελιάς και περιείχε τόσο φαινολικές ενώσεις, κυρίως σεκοϊριδοειδή και φλαβονοειδή, όσο και τριτερπενικά συστατικά. Το εκχύλισμα 2 προέκυψε μετά από επεξεργασία του αρχικού εκχυλίσματος με διχλωρομεθάνιο (DCM) και χαρακτηριζόταν από αυξημένη περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις, με κυρίαρχες την ολευρωπεΐνη και άλλα σεκοϊριδοειδή και φλαβονοειδή. Αντίθετα, το εκχύλισμα 3 αποτελούσε το τριτερπενικό κλάσμα που απομονώθηκε κατά την ίδια διαδικασία και ήταν εμπλουτισμένο σε πεντακυκλικά τριτερπένια, κυρίως μασλινικό και ολεανολικό οξύ. Επιπλέον, η ολευρωπεΐνη και ο ολευρωσίδης μελετήθηκαν ως μεμονωμένες πρότυπες ενώσεις, αντιπροσωπευτικές της κατηγορίας των σεκοϊριδοειδών των φύλλων ελιάς.

Από τα εκχυλίσματα που μελετήθηκαν, ο ολευρωσίδης παρουσίασε την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση και τη μεγαλύτερη αναστολή της οξείδωσης της LDL. Το εκχύλισμα που ήταν εμπλουτισμένο σε φαινολικά συστατικά μετά από επεξεργασία με DCM εμφάνισε βελτιωμένη αντιοξειδωτική δράση σε σύγκριση με την ολευρωπεΐνη μόνη της, καθώς η τιμή IC_{50} ήταν περίπου η μισή, το εύρημα αυτό ενδέχεται να αποδίδεται σε συνεργατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των φαινολικών συστατικών, οι οποίες ενισχύουν τη συνολική βιολογική τους δράση. Το εκχύλισμα που περιείχε φαινολικά συστατικά (σεκοϊριδοειδή/φλαβονοειδή) και τερπένια παρουσίασε επίσης αξιόλογη αντιοξειδωτική δράση. Τα αποτελέσματα αυτά

συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες που αποδίδουν σημαντική αντιοξειδωτική δράση τόσο στην ολευρωπεΐνη όσο και στα τριτερπενικά συστατικά των φύλλων ελιάς. Παράλληλα, η αυξημένη δραστικότητα του φαινολικά εμπλουτισμένου εκχυλίσματος υποστηρίζει την ύπαρξη πιθανών συνεργατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των επιμέρους φαινολικών ενώσεων.

Αντίθετα, παρά την εκτενή βιβλιογραφία που αναδεικνύει πιθανές αντιαιμοπεταλιακές ιδιότητες συναφών ενώσεων, κανένα από τα εκχυλίσματα που μελετήθηκαν δεν παρουσίασε ανασταλτική δράση στη συσσώρευση αιμοπεταλίων έναντι των τριών αγωνιστών που χρησιμοποιήθηκαν (αραχιδονικό οξύ-AA, TRAP-6 και ADP). Το εύρημα αυτό υποδηλώνει απουσία αντιαιμοπεταλιακής δράσης υπό τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες, δεν μπορεί όμως να αποκλειστεί το ενδεχόμενο οι υπό μελέτη ενώσεις να εμφανίζουν επιλεκτική δράση σε διαφορετικά μονοπάτια ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων. Συνεπώς, τα αποτελέσματα αναδεικνύουν την ανάγκη για περαιτέρω διερεύνηση, με χρήση εναλλακτικών πειραματικών προσεγγίσεων.

Η αξιολόγηση της κυτταροτοξικής δράσης των δειγμάτων με τη μέθοδο MTT στην καρκινική κυτταρική σειρά μαστού MCF-7 έδειξε ότι τόσο το εκχύλισμα που περιείχε φαινολικά συστατικά (σεκοϊριδοειδή και φλαβονοειδή) και τερπένια όσο και το εκχύλισμα εμπλουτισμένο σε τερπένια μετά από επεξεργασία με DCM παρουσίασαν περιορισμένη αντικαρκινική δράση. Η επίδραση αυτή παρατηρήθηκε κυρίως στις υψηλότερες συγκεντρώσεις των δειγμάτων, υποδηλώνοντας σχετικά ασθενή κυτταροτοξική δραστικότητα έναντι των κυττάρων MCF-7. Το εκχύλισμα πλούσιο σε φαινολικά συστατικά μετά από επεξεργασία με DCM και η ολευρωπεΐνη παρουσίασαν συγκρίσιμη κυτταροτοξική συμπεριφορά στις 24 ώρες. Η περαιτέρω διερεύνηση του συνδυασμού τους δεν ανέδειξε συνεργατικό αποτέλεσμα, καθώς η κυτταρική βιωσιμότητα παρέμεινε σε επίπεδα υψηλότερα από εκείνα που παρατηρήθηκαν με κάθε παράγοντα ξεχωριστά. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες που έχουν αναδείξει τη δοσοεξαρτώμενη αντικαρκινική δράση της ολευρωπεΐνης σε κύτταρα MCF-7. Παράλληλα, η βιβλιογραφία αναφέρει ότι τριτερπενικά συστατικά των φύλλων ελιάς, όπως το μασλινικό και το ολεανολικό οξύ, εμφανίζουν αντικαρκινικές ιδιότητες μέσω μηχανισμών που περιλαμβάνουν την αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και την επαγωγή απόπτωσης. Ωστόσο,

στην παρούσα μελέτη τα τερπενικά εκχυλίσματα παρουσίασαν περιορισμένη κυτταροτοξική δράση έναντι των κυττάρων MCF-7, γεγονός που ενδέχεται να σχετίζεται με τη συγκέντρωση των δραστικών συστατικών, τη σύνθεση του εκχυλίσματος ή τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες που εφαρμόστηκαν.

Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι η κυτταρική βιωσιμότητα στις 48 ώρες ήταν γενικά υψηλότερη σε σχέση με τις 24 ώρες, γεγονός που δεν δικαιολογούσε την περαιτέρω επέκταση της μελέτης στο χρονικό σημείο των 72 ωρών, καθώς δεν αναμενόταν ουσιαστική μεταβολή της απόκρισης. Τέλος, ο ολευρωσίδης δεν εξετάστηκε στη δοκιμασία MTT, καθώς η επιλογή των υπό μελέτη δειγμάτων βασίστηκε στην ύπαρξη βιβλιογραφικών ενδείξεων για πιθανή αντικαρκινική δράση, οι οποίες δεν ήταν διαθέσιμες για τη συγκεκριμένη ένωση κατά την πειραματική εκτέλεση αυτής της εργασίας.

Η διερεύνηση της επίδρασης της ολευρωπεΐνης, καθώς και του εμπλουτισμένου σε φαινολικά συστατικά εκχυλίσματος μετά από επεξεργασία με DCM, στο σχηματισμό NETs έδειξε ότι τα εξεταζόμενα δείγματα δεν επηρεάζουν τη φυσιολογική κατάσταση των ουδετερόφιλων υπό συνθήκες ηρεμίας (resting), τα ποσοστά NETosis δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου (control). Το εύρημα αυτό υποδηλώνει ότι ούτε το υπό μελέτη εκχύλισμα ούτε η ολευρωπεΐνη είναι ικανά να διεγείρουν την ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων ή να επάγουν σχηματισμό NETs αυθόρμητα. Επιπλέον, στα ενεργοποιημένα κύτταρα καταγράφηκε περιορισμένη μείωση του σχηματισμού NETs μετά από προσθήκη των δειγμάτων σε σύγκριση με την ενεργοποιημένη μορφή (activated). Παρότι η τάση αυτή ενδέχεται να υποδηλώνει ήπια ανασταλτική δράση, η έκταση της μείωσης δεν ήταν σημαντική, γεγονός που υποστηρίζει ότι στις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες τα δείγματα δεν εμφανίζουν ισχυρή ικανότητα τροποποίησης της διαδικασίας NETosis. Αν και η ολευρωπεΐνη έχει συσχετιστεί με αντιφλεγμονώδεις δράσεις στη βιβλιογραφία, στην παρούσα μελέτη δεν παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή στο σχηματισμό NETs. Το εύρημα αυτό υποδηλώνει ότι η επίδρασή της στη διαδικασία της NETosis είναι πιθανόν περιορισμένη υπό τα δεδομένα της παρούσας μελέτης.

Συνολικά, τα αποτελέσματα των πειραμάτων καταδεικνύουν ότι ο ολευρωσίδης παρουσιάζει πολύ ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, ενώ το εκχύλισμα εμπλουτισμένο σε σεκοϊριδοειδή και φλαβονοειδή να εμφανίζει αυξημένη δραστικότητα σε σχέση με την απομονωμένη ολευρωπεΐνη. Παράλληλα, το εκχύλισμα αυτό παρουσίασε παρόμοια επίπεδα κυτταρικής βιωσιμότητας στην καρκινική κυτταρική σειρά μαστού MCF-7 σε σύγκριση με την ολευρωπεΐνη. Επιπλέον, η συνδυαστική χορήγηση των εκχυλισμάτων δεν ανέδειξε συνεργατικό αποτέλεσμα, καθώς δεν παρατηρήθηκε βελτίωση της βιολογικής τους δράσης σε σχέση με τη μεμονωμένη εφαρμογή τους. Επίσης, κανένα από τα εκχυλίσματα που μελετήθηκαν δεν επέδειξε ανασταλτική δράση στη συσσώρευση αιμοπεταλίων, γεγονός που υποδηλώνει απουσία αντιαιμοπεταλιακής επίδρασης υπό τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες. Τέλος, δεν παρατηρήθηκε ουσιαστική επίδραση στο σχηματισμό εξωκυττάριων παγίδων ουδετερόφιλων (NETs), καθώς τα εξεταζόμενα δείγματα δεν προκάλεσαν σημαντική μεταβολή στα επίπεδα NETosis, τόσο σε συνθήκες ηρεμίας όσο και σε συνθήκες ενεργοποίησης.

Η αυξημένη αντιοξειδωτική δράση που παρατηρήθηκε στον ολευρωσίδη συγκριτικά με την ολευρωπεΐνη ενδέχεται να αποδίδεται σε διαφοροποιήσεις της σχέσης δομής–δραστικότητας των δύο ενώσεων, οι οποίες μπορούν να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητά τους έναντι συγκεκριμένων οξειδωτικών διεργασιών. Το εύρημα αυτό δεν αναιρεί την εκτενώς τεκμηριωμένη αντιοξειδωτική δράση της ολευρωπεΐνης, αλλά υποδηλώνει ότι η βιολογική δραστικότητα των φαινολικών συστατικών της ελιάς μπορεί να διαφοροποιείται ανάλογα με το υπό μελέτη σύστημα.

Αντίστοιχα, η απουσία βιολογικής δράσης που παρατηρήθηκε σε ορισμένα εκχυλίσματα υπό τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες δεν αναιρεί τα εκτενή βιβλιογραφικά δεδομένα που τεκμηριώνουν τις βιολογικές ιδιότητες των επιμέρους συστατικών τους. Αντίθετα, τα ευρήματα αυτά αναδεικνύουν την πολυπλοκότητα των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ φυσικών ενώσεων και υπογραμμίζουν ότι η συνολική βιολογική απόκριση ενός σύνθετου μίγματος δεν αποτελεί κατ’ ανάγκη το άθροισμα των επιμέρους δράσεων των συστατικών του. Η ταυτόχρονη παρουσία πολλαπλών βιοδραστικών μορίων μπορεί να οδηγήσει σε φαινόμενα συνεργισμού ή ανταγωνισμού, καθώς και σε μεταβολές της

σταθερότητας, της βιοδιαθεσιμότητας και της δραστικότητάς τους, επηρεάζοντας τελικά το παρατηρούμενο βιολογικό αποτέλεσμα.

Παράλληλα, παράγοντες που σχετίζονται με τη διαδικασία παρασκευής και χαρακτηρισμού των εκχυλισμάτων, όπως οι μέθοδοι επεξεργασίας, οι συνθήκες εκχύλισης, η χρήση διαλυτών και η σύσταση των τελικών κλασμάτων, είναι δυνατόν να επηρεάσουν σημαντικά τη συμπεριφορά των δραστικών ενώσεων. Υπό το πρίσμα αυτό, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δεν έρχονται σε αντίθεση με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, αλλά αναδεικνύουν ότι η εκδήλωση βιολογικής δράσης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το εκάστοτε πειραματικό περιβάλλον, τη χημική σύσταση των εκχυλισμάτων και τις μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις. Η καταγραφή τέτοιων ευρημάτων συμβάλλει στη βαθύτερη κατανόηση της συμπεριφοράς σύνθετων φυσικών μιγμάτων και υπογραμμίζει την ανάγκη περαιτέρω διερεύνησης των μηχανισμών που διέπουν τις αλληλεπιδράσεις των φυσικών βιοδραστικών ενώσεων.

Στο πλαίσιο αυτό, μελλοντικές μελέτες θα μπορούσαν να εστιάσουν σε μια πιο συστηματική και διευρυμένη διερεύνηση των εκχυλισμάτων υπό τροποποιημένες πειραματικές συνθήκες, με στόχο την πληρέστερη κατανόηση της βιολογικής τους δράσης. Ειδικότερα, η εξέταση ευρύτερου φάσματος συγκεντρώσεων ενδέχεται να αναδείξει πιθανές δοσοεξαρτώμενες επιδράσεις που δεν κατέστησαν εμφανείς στην παρούσα μελέτη, ενώ η διαφοροποίηση του χρόνου έκθεσης θα μπορούσε να συμβάλει στην αποσαφήνιση της χρονικής δυναμικής της δράσης τους. Παράλληλα, η αξιολόγηση των εκχυλισμάτων σε επιπλέον κυτταρικές σειρές, πέραν της MCF-7, θα παρείχε σημαντικές πληροφορίες σχετικά με την εκλεκτικότητα των αντικαρκινικών τους ιδιοτήτων. Όσον αφορά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, η διερεύνηση εναλλακτικών μονοπατιών ενεργοποίησης με τη χρήση διαφορετικών αγωνιστών θα μπορούσε να αποκαλύψει πιθανές επιλεκτικές επιδράσεις που δεν ανιχνεύθηκαν με τους αρχικά χρησιμοποιούμενους αγωνιστές. Επιπλέον, η εφαρμογή συμπληρωματικών βιολογικών δοκιμών, σε συνδυασμό με την απομόνωση και το συνδυασμό εκνέου των επιμέρους συστατικών, αναμένεται να συμβάλει στην κατανόηση των πιθανών συνεργατικών ή ανταγωνιστικών αλληλεπιδράσεων που διέπουν τη δράση των εκχυλισμάτων.

Συνεπώς, τα ευρήματα της παρούσας εργασίας μπορούν να αποτελέσουν τη βάση για περαιτέρω, πιο εξειδικευμένη και μηχανιστικά προσανατολισμένη έρευνα στον τομέα των φυσικών προϊόντων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Acín, S., Navarro, M. A., Arbonés-Mainar, J. M., Guillén, N., Sarría, A. J., Carnicer, R., Surra, J. C., Orman, I., Segovia, J. C., Torre, R. D. L., Covas, M.-I., Fernández-Bolaños, J., Ruiz-Gutiérrez, V., & Osada, J. (2006). Hydroxytyrosol Administration Enhances Atherosclerotic Lesion Development in Apo E Deficient Mice. *The Journal of Biochemistry*, *140*(3), 383–391. https://doi.org/10.1093/jb/mvj166

Adamidis, P., Pantazi, D., Moschonas, I., Liberopoulos, E., & Tselepis, A. (2024). Neutrophil Extracellular Traps (NETs) and Atherosclerosis: Does Hypolipidemic Treatment Have an Effect? *Journal of Cardiovascular Development and Disease*, *11*(3), 72. https://doi.org/10.3390/jcdd11030072

Ajoolabady, A., Pratico, D., Lin, L., Mantzoros, C. S., Bahijri, S., Tuomilehto, J., & Ren, J. (2024). Inflammation in atherosclerosis: Pathophysiology and mechanisms. *Cell Death & Disease*, *15*(11), 817. https://doi.org/10.1038/s41419-024-07166-8

Akl, M. R., Ayoub, N. M., Mohyeldin, M. M., Busnena, B. A., Foudah, A. I., Liu, Y.-Y., & Sayed, K. A. E. (2014). Olive Phenolics as c-Met Inhibitors: (-)-Oleocanthal Attenuates Cell Proliferation, Invasiveness, and Tumor Growth in Breast Cancer Models. *PLoS ONE*, *9*(5), e97622. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097622

Antoniou, C., & Hull, J. (2021). The Anti-cancer Effect of Olea europaea L. Products: A Review. *Current Nutrition Reports*, *10*(1), 99–124. https://doi.org/10.1007/s13668-021-00350-8

Badimon, L., Padró, T., & Vilahur, G. (2012). Atherosclerosis, platelets and thrombosis in acute ischaemic heart disease. *European Heart Journal: Acute Cardiovascular Care*, *1*(1), 60–74. https://doi.org/10.1177/2048872612441582

Basatemur, G. L., Jørgensen, H. F., Clarke, M. C. H., Bennett, M. R., & Mallat, Z. (2019). Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. *Nature Reviews Cardiology*, *16*(12), 727–744. https://doi.org/10.1038/s41569-019-0227-9

Barbaro, B., Toietta, G., Maggio, R., Arciello, M., Tarocchi, M., Galli, A., & Balsano, C. (2014). Effects of the Olive-Derived Polyphenol Oleuropein on Human Health. *International Journal of Molecular Sciences*, *15*(10), 18508–18524. https://doi.org/10.3390/ijms151018508

Bedouhene, S., Moulti-Mati, F., Dang, P. M.-C., & El-Benna, J. (2017). Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit the N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced neutrophil degranulation and chemotaxis via AKT, p38, and ERK1/2 MAP-Kinase inhibition. *Inflammopharmacology*, *25*(6), 673–680. https://doi.org/10.1007/s10787-017-0367-7

Ben Othman, N., Roblain, D., Thonart, P., & Hamdi, M. (2008). Tunisian Table Olive Phenolic Compounds and Their Antioxidant Capacity. *Journal of Food Science*, *73*(4). https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00711.x

Bentzon, J. F., Otsuka, F., Virmani, R., & Falk, E. (2014). Mechanisms of Plaque Formation and Rupture. *Circulation Research*, *114*(12), 1852–1866. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.302721

Björkegren, J. L. M., & Lusis, A. J. (2022). Atherosclerosis: Recent developments. *Cell*, *185*(10), 1630–1645. https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.04.004

Blankenberg, S., Barbaux, S., & Tiret, L. (2003). Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, *170*(2), 191–203. https://doi.org/10.1016/S0021-9150(03)00097-2

Bojić, M., Maleš, Ž., Antolić, A., Babić, I., & Tomičić, M. (2019). Antithrombotic activity of flavonoids and polyphenols rich plant species. *Acta Pharmaceutica*, *69*(4), 483–495. https://doi.org/10.2478/acph-2019-0050

Born, G. V. R. (1962). Aggregation of Blood Platelets by Adenosine Diphosphate and its Reversal. *Nature*, *194*(4832), 927–929. https://doi.org/10.1038/194927b0

Boss, A., Bishop, K., Marlow, G., Barnett, M., & Ferguson, L. (2016). Evidence to Support the Anti-Cancer Effect of Olive Leaf Extract and Future Directions. *Nutrients*, *8*(8), 513. https://doi.org/10.3390/nu8080513

Burke-Gaffney, A., Brooks, A. V. S., & Bogle, R. G. (2002). Regulation of chemokine expression in atherosclerosis. *Vascular Pharmacology*, *38*(5), 283–292. https://doi.org/10.1016/S1537-1891(02)00253-7

C. Carrillo, M. del M. C. and S. A.-T., -. (2012). Papel del ácido oleico en el sistema inmune; mecanismos de acción; revisión científica. *nutricion hospitalaria*, (4), 978–990. https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.4.5783

Casaburi, I., Puoci, F., Chimento, A., Sirianni, R., Ruggiero, C., Avena, P., & Pezzi, V. (2013). Potential of olive oil phenols as chemopreventive and therapeutic agents against cancer: A review of *in vitro* studies. *Molecular Nutrition & Food Research*, *57*(1), 71–83. https://doi.org/10.1002/mnfr.201200503

Chistiakov, D. A., Melnichenko, A. A., Grechko, A. V., Myasoedova, V. A., & Orekhov, A. N. (2018). Potential of anti-inflammatory agents for treatment of atherosclerosis. *Experimental and Molecular Pathology*, *104*(2), 114–124. https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2018.01.008

Christie, R. M. (2011). Fluorescent dyes. In *Handbook of Textile and Industrial Dyeing* (pp. 562–587). Elsevier. https://doi.org/10.1533/9780857093974.2.562

Christodoulou, A., Nikolaou, P.-E., Symeonidi, L., Katogiannis, K., Pechlivani, L., Nikou, T., Varela, A., Chania, C., Zerikiotis, S., Efentakis, P., Vlachodimitropoulos, D., Katsoulas, N., Agapaki, A., Dimitriou, C., Tsoumani, M., Kostomitsopoulos, N., Davos, C. H., Skaltsounis, A. L., Tselepis, A., … Andreadou, I. (2024). Cardioprotective potential of oleuropein, hydroxytyrosol, oleocanthal and their combination: Unravelling complementary effects on acute myocardial infarction and metabolic syndrome. *Redox Biology*, *76*, 103311. https://doi.org/10.1016/j.redox.2024.103311

Chrysikopoulou, V., Rampaouni, A., Adamantidi, T., Pantazi, D., Ofrydopoulou, A., & Tsoupras, A. (2026). Beneficial Synergistic Roles of Flavonoids and Vitamin C Against Inflammatory Complications, Cancer, and Cardiovascular Diseases: A Comprehensive Review. *Applied Sciences*, *16*(4), 1838. https://doi.org/10.3390/app16041838

Cox, G. C. (2012). *Optical Imaging Techniques in Cell Biology* (2nd ed). Taylor & Francis Group.

Crespo, M., Tomé-Carneiro, J., Dávalos, A., & Visioli, F. (2018). Pharma-Nutritional Properties of Olive Oil Phenols. Transfer of New Findings to Human Nutrition. *Foods*, *7*(6), 90. https://doi.org/10.3390/foods7060090

Cruz-Lozano, M., González-González, A., Marchal, J. A., Muñoz-Muela, E., Molina, M. P., Cara, F. E., Brown, A. M., García-Rivas, G., Hernández-Brenes, C., Lorente, J. A., Sanchez-Rovira, P., Chang, J. C., & Granados-Principal, S. (2019). Hydroxytyrosol inhibits cancer stem cells and the metastatic capacity of triple-negative breast cancer cell lines by the simultaneous targeting of epithelial-to-mesenchymal transition, Wnt/β-catenin and TGFβ signaling pathways. *European Journal of Nutrition*, *58*(8), 3207–3219. https://doi.org/10.1007/s00394-018-1864-1

D'Amore, S., Vacca, M., Cariello, M., Graziano, G., D'Orazio, A., Salvia, R., Sasso, R. C., Sabbà, C., Palasciano, G., & Moschetta, A. (2016). Genes and miRNA expression signatures in

peripheral blood mononuclear cells in healthy subjects and patients with metabolic syndrome after acute intake of extra virgin olive oil. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1861*(11), 1671–1680. https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.07.003

De Roos, B., Zhang, X., Rodriguez Gutierrez, G., Wood, S., Rucklidge, G. J., Reid, M. D., Duncan, G. J., Cantlay, L. L., Duthie, G. G., & O'Kennedy, N. (2011). Anti-platelet effects of olive oil extract: *In vitro* functional and proteomic studies. *European Journal of Nutrition*, *50*(7), 553–562. https://doi.org/10.1007/s00394-010-0162-3

Dell'Agli, M., Fagnani, R., Galli, G. V., Maschi, O., Gilardi, F., Bellosta, S., Crestani, M., Bosisio, E., De Fabiani, E., & Caruso, D. (2010). Olive Oil Phenols Modulate the Expression of Metalloproteinase 9 in THP-1 Cells by Acting on Nuclear Factor-κB Signaling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(4), 2246–2252. https://doi.org/10.1021/jf9042503

Dell'Agli, M., Maschi, O., Galli, G. V., Fagnani, R., Dal Cero, E., Caruso, D., & Bosisio, E. (2008). Inhibition of platelet aggregation by olive oil phenols via cAMP-phosphodiesterase. *British Journal of Nutrition*, *99*(5), 945–951. https://doi.org/10.1017/S0007114507837470

Di Francesco, A., Falconi, A., Di Germanio, C., Micioni Di Bonaventura, M. V., Costa, A., Caramuta, S., Del Carlo, M., Compagnone, D., Dainese, E., Cifani, C., Maccarrone, M., & D'Addario, C. (2015). Extravirgin olive oil up-regulates CB1 tumor suppressor gene in human colon cancer cells and in rat colon via epigenetic mechanisms. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *26*(3), 250–258. https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.10.013

Di Taranto, M. D., Giacobbe, C., & Fortunato, G. (2020). Familial hypercholesterolemia: A complex genetic disease with variable phenotypes. *European Journal of Medical Genetics*, *63*(4), 103831. https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2019.103831

Eddin, L. B., Jha, N. K., Meeran, M. F. N., Kesari, K. K., Beiram, R., & Ojha, S. (2021). Neuroprotective Potential of Limonene and Limonene Containing Natural Products. *Molecules*, *26*(15), 4535. https://doi.org/10.3390/molecules26154535

Efentakis, P., Iliodromitis, E., Mikros, E., Papachristodoulou, A., Dagres, N., Skaltsounis, A.-L., & Andreadou, I. (2015). Effects of the Olive Tree Leaf Constituents on Myocardial Oxidative Damage and Atherosclerosis. *Planta Medica*, *81*(08), 648–654. https://doi.org/10.1055/s-0035-1546017

Elamin, M. H., Daghestani, M. H., Omer, S. A., Elobeid, M. A., Virk, P., Al-Olayan, E. M., Hassan, Z. K., Mohammed, O. B., & Aboussekhra, A. (2013). Olive oil oleuropein has anti-breast cancer properties with higher efficiency on ER-negative cells. *Food and Chemical Toxicology*, *53*, 310–316. https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.12.009

Erbay, Z., & Icier, F. (2010). The Importance and Potential Uses of Olive Leaves. *Food Reviews International*, *26*(4), 319–334. https://doi.org/10.1080/87559129.2010.496021

Erdogan, S., Doganlar, O., Doganlar, Z. B., Serttas, R., Turkekul, K., Dibirdik, I., & Bilir, A. (2016). The flavonoid apigenin reduces prostate cancer CD44 + stem cell survival and migration through PI3K/Akt/NF-κB signaling. *Life Sciences*, *162*, 77–86. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.08.019

Fazlollahi, A., Motlagh Asghari, K., Aslan, C., Noori, M., Nejadghaderi, S. A., Araj-Khodaei, M., Sullman, M. J. M., Karamzad, N., Kolahi, A.-A., & Safiri, S. (2023). The effects of olive oil consumption on cognitive performance: A systematic review. *Frontiers in Nutrition*, *10*, 1218538. https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1218538

Fragopoulou, E., Nomikos, T., Karantonis, H. C., Apostolakis, C., Pliakis, E., Samiotaki, M., Panayotou, G., & Antonopoulou, S. (2007). Biological Activity of Acetylated Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(1), 80–89. https://doi.org/10.1021/jf0627221

Fülöp, T., Larbi, A., & Witkowski, J. M. (2019). Human Inflammaging. *Gerontology*, *65*(5), 495–504. https://doi.org/10.1159/000497375

Ge, J., Liu, Z., Zhong, Z., Wang, L., Zhuo, X., Li, J., Jiang, X., Ye, X.-Y., Xie, T., & Bai, R. (2022). Natural terpenoids with anti-inflammatory activities: Potential leads for anti-inflammatory drug discovery. *Bioorganic Chemistry*, *124*, 105817. https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2022.105817

Gbadebo, O. S., Oke, E. D., & Ajibuwa, F. A. (2025). Anticancer properties of beta-caryophyllene and d-limonene terpenes: A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, *15*(4), 129–140. https://doi.org/10.4103/apjtb.apjtb_7_25

Ghanbari, R., Anwar, F., Alkharfy, K. M., Gilani, A.-H., & Saari, N. (2012). Valuable Nutrients and Functional Bioactives in Different Parts of Olive (Olea europaea L.)—A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, *13*(3), 3291–3340. https://doi.org/10.3390/ijms13033291

Gofman, J. W., Glazier, F., Tamplin, A., Strisower, B., & de Lalla, O. (1954). Lipoproteins, coronary heart disease, and atherosclerosis. Physiological Reviews, 34(3), 589–607. https://doi.org/10.1152/physrev.1954.34.3.589 .

Gonzalez-Burgos, E., & Gomez-Serranillos, M. P. (2012). Terpene Compounds in Nature: A Review of Their Potential Antioxidant Activity. *Current Medicinal Chemistry*, *19*(31), 5319–5341. https://doi.org/10.2174/092986712803833335

González-Santiago, M., Martín-Bautista, E., Carrero, J. J., Fonollá, J., Baró, L., Bartolomé, M. V., Gil-Loyzaga, P., & López-Huertas, E. (2006). One-month administration of hydroxytyrosol, a phenolic antioxidant present in olive oil, to hyperlipemic rabbits improves blood lipid profile, antioxidant status and reduces atherosclerosis development. *Atherosclerosis*, *188*(1), 35–42. https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2005.10.022

Gorzynik-Debicka, M., Przychodzen, P., Cappello, F., Kuban-Jankowska, A., Marino Gammazza, A., Knap, N., Wozniak, M., & Gorska-Ponikowska, M. (2018). Potential Health Benefits of Olive Oil and Plant Polyphenols. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(3), 686. https://doi.org/10.3390/ijms19030686

Graßmann, J. (2005). Terpenoids as Plant Antioxidants. In *Vitamins & Hormones* (Vol. 72, pp. 505–535). Elsevier. https://doi.org/10.1016/S0083-6729(05)72015-X

Grainger, D. J., Wakefield, L., Bethell, H. W., Farndale, R. W., & Metcalfe, J. C. (1995). Release and activation of platelet latent TGF–β in blood clots during dissolution with plasmin. *Nature Medicine*, *1*(9), 932–937. https://doi.org/10.1038/nm0995-932

Gusev, E., & Sarapultsev, A. (2023). Atherosclerosis and Inflammation: Insights from the Theory of General Pathological Processes. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(9), 7910. https://doi.org/10.3390/ijms24097910

Haris Omar, S. (2010). Oleuropein in Olive and its Pharmacological Effects. *Scientia Pharmaceutica*, *78*(2), 133–154. https://doi.org/10.3797/scipharm.0912-18

Havel, R. J., Eder, H. A., & Bragdon, J. H. (1955). The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *Journal of Clinical Investigation*, *34*(9), 1345–1353. https://doi.org/10.1172/JCI103182

Han, J., Talorete, T. P. N., Yamada, P., & Isoda, H. (2009). Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells. *Cytotechnology*, *59*(1), 45–53. https://doi.org/10.1007/s10616-009-9191-2

He, F. (2011). BCA (Bicinchoninic Acid) Protein Assay. *bio-protocol*, *1*(5). https://doi.org/10.21769/BioProtoc.44

Hei, B., Wang, J., Wu, G., Ouyang, J., & Liu, R. (2019). Verbascoside suppresses the migration and invasion of human glioblastoma cells via targeting c-Met-mediated epithelial-mesenchymal transition. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *514*(4), 1270–1277. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.05.096

Hidi, L., Kovács, G. I., Szabó, D., Makra, N., Pénzes, K., Juhász, J., Sótonyi, P., & Ostorházi, E. (2022). Human blood vessel microbiota in healthy adults based on common femoral arteries of brain-dead multi-organ donors. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *12*, 1056319. https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1056319

Ibáñez, M. D., Sanchez-Ballester, N. M., & Blázquez, M. A. (2020). Encapsulated Limonene: A Pleasant Lemon-Like Aroma with Promising Application in the Agri-Food Industry. A Review. *Molecules*, *25*(11), 2598. https://doi.org/10.3390/molecules25112598

Jebari-Benslaiman, S., Galicia-García, U., Larrea-Sebal, A., Olaetxea, J. R., Alloza, I., Vandenbroeck, K., Benito-Vicente, A., & Martín, C. (2022). Pathophysiology of Atherosclerosis. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(6), 3346. https://doi.org/10.3390/ijms23063346

Jia, J., Zang, E., Lv, L., Li, Q., Zhang, C., Xia, Y., Zhang, L., Dang, L., & Li, M. (2021). Flavonoids in myocardial ischemia-reperfusion injury: Therapeutic effects and mechanisms. *Chinese Herbal Medicines*, *13*(1), 49–63. https://doi.org/10.1016/j.chmed.2020.09.002

Jiang, Z., Kempinski, C., & Chappell, J. (2016). Extraction and Analysis of Terpenes/Terpenoids. *Current Protocols in Plant Biology*, *1*(2), 345–358. https://doi.org/10.1002/cppb.20024

Katsa, M. E., & Nomikos, T. (2022). Olive Oil Phenolics and Platelets—From Molecular Mechanisms to Human Studies. *Reviews in Cardiovascular Medicine*, *23*(8), 255. https://doi.org/10.31083/j.rcm2308255

Kaufman, M., & Keyserling, T. C. (2023). The Mediterranean Diet (MedDiet): There's more to it than olives and grape leaves. *Open Access Government*, *40*(1), 234–235. https://doi.org/10.56367/OAG-040-11087

Kong, P., Cui, Z.-Y., Huang, X.-F., Zhang, D.-D., Guo, R.-J., & Han, M. (2022). Inflammation and atherosclerosis: Signaling pathways and therapeutic intervention. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *7*(1), 131. https://doi.org/10.1038/s41392-022-00955-7

Kourti, M., Skaperda, Z., Tekos, F., Stathopoulos, P., Koutra, C., Skaltsounis, A. L., & Kouretas, D. (2024). The Bioactivity of a Hydroxytyrosol-Enriched Extract Originated after Direct Hydrolysis of Olive Leaves from Greek Cultivars. *Molecules*, *29*(2), 299. https://doi.org/10.3390/molecules29020299

Koutsaliaris, I. K., Pantazi, D., Tsouka, A. N., Argyropoulou, O., Tellis, C. C., & Tselepis, A. D. (2024). Differential Effect of Omega-3 Fatty Acids on Platelet Inhibition by Antiplatelet Drugs In Vitro. *International Journal of Molecular Sciences*, *25*(18), 10136. https://doi.org/10.3390/ijms251810136

Kumar, P., Nagarajan, A., & Uchil, P. D. (2018). Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2018*(6), pdb.prot095505. https://doi.org/10.1101/pdb.prot095505

Lahoz, C., Alonso, R., Ordovás, J. M., López-Farré, A., De Oya, M., & Mata, P. (1997). Effects of dietary fat saturation on eicosanoid production, platelet aggregation and blood pressure. *European Journal of Clinical Investigation*, *27*(9), 780–787. https://doi.org/10.1046/j.1365-2362.1997.1860735.x

Lalas, S., Athanasiadis, V., Gortzi, O., Bounitsi, M., Giovanoudis, I., Tsaknis, J., & Bogiatzis, F. (2011). Enrichment of table olives with polyphenols extracted from olive leaves. *Food Chemistry*, *127*(4), 1521–1525. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.009

Lamponi, S. (2021). Bioactive Natural Compounds with Antiplatelet and Anticoagulant Activity and Their Potential Role in the Treatment of Thrombotic Disorders. *Life*, *11*(10), 1095. https://doi.org/10.3390/life11101095

Lebedev, A. T., Detenchuk, E. A., Latkin, T. B., Bavcon Kralj, M., & Trebše, P. (2022). Aqueous Chlorination of D-Limonene. *Molecules*, *27*(9), 2988. https://doi.org/10.3390/molecules27092988

Lei, W., Li, X., Li, S., Zhou, F., Guo, Y., Zhang, M., Jin, X., & Zhang, H. (2024). Targeting neutrophils extracellular traps, a promising anti-thrombotic therapy for natural products from traditional Chinese herbal medicine. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *179*, 117310. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.117310

Li, T., Wu, W., Zhang, J., Wu, Q., Zhu, S., Niu, E., Wang, S., Jiang, C., Liu, D., & Zhang, C. (2023). Antioxidant Capacity of Free and Bound Phenolics from Olive Leaves: In Vitro and In Vivo Responses. *Antioxidants*, *12*(12), 2033. https://doi.org/10.3390/antiox12122033

Libby, P. (2013). Mechanisms of Acute Coronary Syndromes and Their Implications for Therapy. *New England Journal of Medicine*, *368*(21), 2004–2013. https://doi.org/10.1056/NEJMra1216063

Libby, P. (2021). The changing landscape of atherosclerosis. *Nature*, *592*(7855), 524–533. https://doi.org/10.1038/s41586-021-03392-8

Liu, Y., Qu, Y., Liu, C., Zhang, D., Xu, B., Wan, Y., & Jiang, P. (2024). Neutrophil extracellular traps: Potential targets for the treatment of rheumatoid arthritis with traditional Chinese medicine and natural products. *Phytotherapy Research*, *38*(11), 5067–5087. https://doi.org/10.1002/ptr.8311

López-Acosta, O., Ruiz-Ramírez, A., Barrios-Maya, M.-Á., Alarcon-Aguilar, J., Alarcon-Enos, J., Céspedes Acuña, C. L., & El-Hafidi, M. (2023). Lipotoxicity, glucotoxicity and some strategies to protect vascular smooth muscle cell against proliferative phenotype in metabolic syndrome. *Food and Chemical Toxicology*, *172*, 113546. https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.113546

López-Salas, L., Expósito-Almellón, X., Valencia-Isaza, A., Fernández-Arteaga, A., Quirantes-Piné, R., Borrás-Linares, I., & Lozano-Sánchez, J. (2025). Eco-Friendly Extraction of Olive Leaf Phenolics and Terpenes: A Comparative Performance Analysis Against Conventional Methods. *Foods*, *14*(17), 3030. https://doi.org/10.3390/foods14173030

Lopez-Segura, F., Velasco, F., Lopez-Miranda, J., Castro, P., Lopez-Pedrera, R., Blanco, A., Jimenez-Pereperez, J., Torres, A., Trujillo, J., Ordovas, J. M., & Pérez-Jiménez, F. (1996). Monounsaturated Fatty Acid–Enriched Diet Decreases Plasma Plasminogen Activator Inhibitor Type 1. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *16*(1), 82–88. https://doi.org/10.1161/01.ATV.16.1.82

Lou-Bonafonte, J. M., Arnal, C., Navarro, M. A., & Osada, J. (2012). Efficacy of bioactive compounds from extra virgin olive oil to modulate atherosclerosis development. *Molecular Nutrition & Food Research*, *56*(7), 1043–1057. https://doi.org/10.1002/mnfr.201100668

Luo, G., Fang, F., Guo, Y., Li, Y., & Luo, X. (2025). D-limonene modulates AMPK signaling to inhibit ox-LDL-induced foam cell formation. *Scientific Reports*, *16*(1), 22. https://doi.org/10.1038/s41598-025-29351-1

Malarczyk, D., & Odnoczko, E. (2023). Light transmission aggregometry in the diagnosis of thrombocytopathy. *Journal of Transfusion Medicine*, *16*(3), 117–125. https://doi.org/10.5603/JTM.2023.0006

Malheiro, R., Casal, S., Teixeira, H., Bento, A., & Pereira, J. A. (2013). Effect of Olive Leaves Addition during the Extraction Process of Overmature Fruits on Olive Oil Quality. *Food and Bioprocess Technology*, *6*(2), 509–521. https://doi.org/10.1007/s11947-011-0719-z

Markhali, F. S., Teixeira, J. A., & Rocha, C. M. R. (2020). Olive Tree Leaves—A Source of Valuable Active Compounds. *Processes*, *8*(9), 1177. https://doi.org/10.3390/pr8091177

Masyita, A., Mustika Sari, R., Dwi Astuti, A., Yasir, B., Rahma Rumata, N., Emran, T. B., Nainu, F., & Simal-Gandara, J. (2022). Terpenes and terpenoids as main bioactive compounds of essential oils, their roles in human health and potential application as natural food preservatives. *Food Chemistry: X*, *13*, 100217. https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100217

Melo Ferreira, D., Oliveira, M. B. P. P., & Alves, R. C. (2025). A Comprehensive Review of the Antitumor Activity of Olive Compounds: The Case of Olive Oil, Pomace, and Leaf Extracts, Phenolic Alcohols, Secoiridoids, and Triterpenes. *Antioxidants*, *14*(2), 237. https://doi.org/10.3390/antiox14020237

Miller, J. A., Thompson, P. A., Hakim, I. A., Chow, H.-H. S., & Thomson, C. A. (2011). d-Limonene: A bioactive food component from citrus and evidence for a potential role

in breast cancer prevention and treatment. *Oncology Reviews*, *5*(1), 31–42. https://doi.org/10.1007/s12156-010-0066-8

Miller, M. R. (2020). Oxidative stress and the cardiovascular effects of air pollution. *Free Radical Biology and Medicine*, *151*, 69–87. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.01.004

Mohamed Abdoul-Latif, F., Ainane, A., Houmed Aboubaker, I., Mohamed, J., & Ainane, T. (2023). Exploring the Potent Anticancer Activity of Essential Oils and Their Bioactive Compounds: Mechanisms and Prospects for Future Cancer Therapy. *Pharmaceuticals*, *16*(8), 1086. https://doi.org/10.3390/ph16081086

Mourtzinos, I., Salta, F., Yannakopoulou, K., Chiou, A., & Karathanos, V. T. (2007). Encapsulation of Olive Leaf Extract in β-Cyclodextrin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(20), 8088–8094. https://doi.org/10.1021/jf0709698

Mukhtar, Y. M., Adu-Frimpong, M., Xu, X., & Yu, J. (2018). Biochemical significance of limonene and its metabolites: Future prospects for designing and developing highly potent anticancer drugs. *Bioscience Reports*, *38*(6), BSR20181253. https://doi.org/10.1042/BSR20181253

Mutha, R. E., Tatiya, A. U., & Surana, S. J. (2021). Flavonoids as natural phenolic compounds and their role in therapeutics: An overview. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, *7*(1), 25. https://doi.org/10.1186/s43094-020-00161-8

Nayer, A. (2013). Idiopathic membranous nephropathy and anti-phospholipase A2 receptor antibodies. *Idiopathic Membranous Nephropathy and Anti-Phospholipase A2 Receptor Antibodies*, (4). https://doi.org/10.12860/JNP.2013.35

Padro, T., Muñoz-Garcia, N., Peña, E., & Badimon, L. (2021). Sex Differences and Emerging New Risk Factors for Atherosclerosis and Its Thrombotic Complications. *Current*

Pharmaceutical Design, *27*(29), 3186–3197. https://doi.org/10.2174/1381612826666201118094209

Pérez-Jiménez, F., Lista, J. D., Pérez-Martínez, P., López-Segura, F., Fuentes, F., Cortés, B., Lozano, A., & López-Miranda, J. (2006). Olive oil and haemostasis: A review on its healthy effects. *Public Health Nutrition*, *9*(8A), 1083–1088. https://doi.org/10.1017/S1368980007668566

Pérez-Jiménez, F., López-Miranda, J., & Mata, P. (2002). Protective effect of dietary monounsaturated fat on arteriosclerosis: Beyond cholesterol. *Atherosclerosis*, *163*(2), 385–398. https://doi.org/10.1016/S0021-9150(02)00033-3

Perona, J. S., & Botham, K. M. (2013). Olive Oil as a Functional Food: Nutritional and Health Benefits. In R. Aparicio & J. Harwood (Eds.), *Handbook of Olive Oil* (pp. 677–714). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7777-8_18

Petroni, A., Blasevich, M., Salami, M., Papini, N., Montedoro, G. F., & Galli, C. (1995). Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil. *Thrombosis Research*, *78*(2), 151–160. https://doi.org/10.1016/0049-3848(95)00043-7

Qian, B., Zhang, K., Li, Y., & Sun, K. (2022). Update on gut microbiota in cardiovascular diseases. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *12*, 1059349. https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1059349

Rafieian-Kopaei, M. (2013). Combination of metformin with other antioxidants may increase its renoprotective efficacy. *Combination of Metformin with Other Antioxidants May Increase Its Renoprotective Efficacy*, (2). https://doi.org/10.12861/jrip.2013.13

Rafieian-Kopaei, M., Setorki, M., Doudi, M., Baradaran, A., & Nasri, H. (2014). Atherosclerosis: Process, indicators, risk factors and new hopes. *International Journal of Preventive Medicine*, *5*(8), 927–946.

Rani, V., Deep, G., Singh, R. K., Palle, K., & Yadav, U. C. S. (2016). Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. *Life Sciences*, *148*, 183–193. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.02.002

Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, *20*(7), 933–956. https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02227-9

Ridker, P. M., Howard, C. P., Walter, V., Everett, B., Libby, P., Hensen, J., & Thuren, T. (2012). Effects of Interleukin-1β Inhibition With Canakinumab on Hemoglobin A1c, Lipids, C-Reactive Protein, Interleukin-6, and Fibrinogen: A Phase IIb Randomized, Placebo-Controlled Trial. *Circulation*, *126*(23), 2739–2748. https://doi.org/10.1161/circulationaha.112.122556

Roberto, D., Micucci, P., Sebastian, T., Graciela, F., & Anesini, C. (2010). Antioxidant Activity of Limonene on Normal Murine Lymphocytes: Relation to H_2 O_2 Modulation and Cell Proliferation. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, *106*(1), 38–44. https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2009.00467.x

Romani, A., Ieri, F., Urciuoli, S., Noce, A., Marrone, G., Nediani, C., & Bernini, R. (2019). Health Effects of Phenolic Compounds Found in Extra-Virgin Olive Oil, By-Products, and Leaf of Olea europaea L. *Nutrients*, *11*(8), 1776. https://doi.org/10.3390/nu11081776

Ross, R. (1993). The pathogenesis of atherosclerosis: A perspective for the 1990s. *Nature*, *362*(6423), 801–809. https://doi.org/10.1038/362801a0

Scoditti, E., Calabriso, N., Massaro, M., Pellegrino, M., Storelli, C., Martines, G., De Caterina, R., & Carluccio, M. A. (2012). Mediterranean diet polyphenols reduce inflammatory angiogenesis through MMP-9 and COX-2 inhibition in human vascular endothelial cells: A potentially protective mechanism in atherosclerotic vascular disease and cancer. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *527*(2), 81–89. https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.05.003

Selim, S., Albqmi, M., Al-Sanea, M. M., Alnusaire, T. S., Almuhayawi, M. S., AbdElgawad, H., Al Jaouni, S. K., Elkelish, A., Hussein, S., Warrad, M., & El-Saadony, M. T. (2022). Valorizing the usage of olive leaves, bioactive compounds, biological activities, and food applications: A comprehensive review. *Frontiers in Nutrition*, *9*, 1008349. https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1008349

Sharma, A., Mittal, V., & Sharma, D. (2025). An Introduction: Terpenes as Anticancer. In B. Chopra, A. K. Dhingra, P. Kriplani, & R. Ojha (Eds.), *Analyzing Terpenes' Role in Cancer Treatment* (pp. 1–30). IGI Global. https://doi.org/10.4018/979-8-3693-6972-2.ch001

Shamshoum, H., Vlavcheski, F., & Tsiani, E. (2017). Anticancer effects of oleuropein. *BioFactors*, *43*(4), 517–528. https://doi.org/10.1002/biof.1366

Sirianni, R., Chimento, A., De Luca, A., Casaburi, I., Rizza, P., Onofrio, A., Iacopetta, D., Puoci, F., Andò, S., Maggiolini, M., & Pezzi, V. (2010). Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit MCF-7 breast cancer cell proliferation interfering with ERK1/2 activation. *Molecular Nutrition & Food Research*, *54*(6), 833–840. https://doi.org/10.1002/mnfr.200900111

Slager, C., Wentzel, J., Gijsen, F., Schuurbiers, J., Van Der Wal, A., Van Der Steen, A., & Serruys, P. (2005). The role of shear stress in the generation of rupture-prone vulnerable plaques. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*, *2*(8), 401–407. https://doi.org/10.1038/ncpcardio0274

Soehnlein, O., & Libby, P. (2021). Targeting inflammation in atherosclerosis—From experimental insights to the clinic. *Nature Reviews Drug Discovery*, *20*(8), 589–610. https://doi.org/10.1038/s41573-021-00198-1

Soler-Rivas, C., Esp﷿n, J. C., & Wichers, H. J. (2000). Oleuropein and related compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *80*(7), 1013–1023. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7%253C1013::AID-JSFA571%253E3.0.CO;2-C

Stagos, D. (2019). Antioxidant Activity of Polyphenolic Plant Extracts. *Antioxidants*, *9*(1), 19. https://doi.org/10.3390/antiox9010019

Stefanadis, C., Antoniou, C., Tsiachris, D., & Pietri, P. (2017). Coronary Atherosclerotic Vulnerable Plaque: Current Perspectives. *Journal of the American Heart Association*, *6*(3), e005543. https://doi.org/10.1161/JAHA.117.005543

Steinbrecher, U. P., Parthasarathy, S., Leake, D. S., Witztum, J. L., & Steinberg, D. (1984). Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *81*(12), 3883–3887. https://doi.org/10.1073/pnas.81.12.3883

Summerhill, V., Karagodin, V., Grechko, A., Myasoedova, V., & Orekhov, A. (2018). Vasculoprotective Role of Olive Oil Compounds via Modulation of Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, *5*, 188. https://doi.org/10.3389/fcvm.2018.00188

Sun, W., Frost, B., & Liu, J. (2017). Oleuropein, unexpected benefits! *Oncotarget*, *8*(11), 17409–17409. https://doi.org/10.18632/oncotarget.15538

Swirski, F. K., Nahrendorf, M., & Libby, P. (2016). Mechanisms of Myeloid Cell Modulation of Atherosclerosis. *Microbiology Spectrum*, *4*(4), 4.4.60. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MCHD-0026-2015

Talhaoui, N., Taamalli, A., Gómez-Caravaca, A. M., Fernández-Gutiérrez, A., & Segura-Carretero, A. (2015). Phenolic compounds in olive leaves: Analytical determination, biotic and abiotic influence, and health benefits. *Food Research International*, *77*, 92–108. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.09.011

Tangney, C. C., & Rasmussen, H. E. (2013). Polyphenols, Inflammation, and Cardiovascular Disease. *Current Atherosclerosis Reports*, *15*(5), 324. https://doi.org/10.1007/s11883-013-0324-x

Tarchoune, I., Sgherri, C., Eddouzi, J., Zinnai, A., Quartacci, M. F., & Zarrouk, M. (2019). Olive Leaf Addition Increases Olive Oil Nutraceutical Properties. *Molecules*, *24*(3), 545. https://doi.org/10.3390/molecules24030545

Tunca, B., Tezcan, G., Cecener, G., Egeli, U., Ak, S., Malyer, H., Tumen, G., & Bilir, A. (2012). Olea europaea leaf extract alters microRNA expression in human glioblastoma cells. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, *138*(11), 1831–1844. https://doi.org/10.1007/s00432-012-1261-8

Tavafi, M. (2013). Complexity of diabetic nephropathy pathogenesis and design of investigations. *Complexity of Diabetic Nephropathy Pathogenesis and Design of Investigations*, (2). https://doi.org/10.12861/jrip.2013.20

Tunca, B., Tezcan, G., Cecener, G., Egeli, U., Ak, S., Malyer, H., Tumen, G., & Bilir, A. (2012). Olea europaea leaf extract alters microRNA expression in human glioblastoma cells. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, *138*(11), 1831–1844. https://doi.org/10.1007/s00432-012-1261-8

Togna, G. I., Togna, A. R., Franconi, M., Marra, C., & Guiso, M. (2003). Olive Oil Isochromans Inhibit Human Platelet Reactivity. *The Journal of Nutrition*, *133*(8), 2532–2536. https://doi.org/10.1093/jn/133.8.2532

Ullah, A., Munir, S., Badshah, S. L., Khan, N., Ghani, L., Poulson, B. G., Emwas, A.-H., & Jaremko, M. (2020). Important Flavonoids and Their Role as a Therapeutic Agent. *Molecules*, *25*(22), 5243. https://doi.org/10.3390/molecules25225243

Vieira, A. J., Beserra, F. P., Souza, M. C., Totti, B. M., & Rozza, A. L. (2018). Limonene: Aroma of innovation in health and disease. *Chemico-Biological Interactions*, *283*, 97–106. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.02.007

Visioli, F., Bellomo, G., & Galli, C. (1998). Free Radical-Scavenging Properties of Olive Oil Polyphenols. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *247*(1), 60–64. https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8735

Vissers, M. N., Zock, P. L., & Katan, M. B. (2004). Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenols in humans: A review. *European Journal of Clinical Nutrition*, *58*(6), 955–965. https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601917

Wisniak, J. (2013). Thomas Graham. II. Contributions to diffusion of gases and liquids, colloids, dialysis, and osmosis. *Educación Química*, *24*, 506–515. https://doi.org/10.1016/S0187-893X(13)72521-7

Witztum, J. L., & Steinberg, D. (1991). Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *Journal of Clinical Investigation*, *88*(6), 1785–1792. https://doi.org/10.1172/JCI115499

Xavier, V., Spréa, R., Finimundy, T. C., Heleno, S. A., Amaral, J. S., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2023). Terpenes. In M. Carocho, S. A. Heleno, & L. Barros (Eds.), *Natural Secondary*

Metabolites (pp. 107–156). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-031-18587-8_5

Yang, J., Fa, J., & Li, B. (2018). Apigenin exerts anticancer effects on human cervical cancer cells via induction of apoptosis and regulation of Raf/MEK/ERK signalling pathway. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, *17*(8), 1615. https://doi.org/10.4314/tjpr.v17i8.21

Yun, S.-H., Sim, E.-H., Goh, R.-Y., Park, J.-I., & Han, J.-Y. (2016). Platelet Activation: The Mechanisms and Potential Biomarkers. *BioMed Research International*, *2016*, 1–5. https://doi.org/10.1155/2016/9060143

Zhu, Y., Xian, X., Wang, Z., Bi, Y., Chen, Q., Han, X., Tang, D., & Chen, R. (2018). Research Progress on the Relationship between Atherosclerosis and Inflammation. *Biomolecules*, *8*(3), 80. https://doi.org/10.3390/biom8030080

Žugčić, T., Abdelkebir, R., Alcantara, C., Collado, M. C., García-Pérez, J. V., Meléndez-Martínez, A. J., Režek Jambrak, A., Lorenzo, J. M., & Barba, F. J. (2019). From extraction of valuable compounds to health promoting benefits of olive leaves through bioaccessibility, bioavailability and impact on gut microbiota. *Trends in Food Science & Technology*, *83*, 63–77. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.11.005

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ

Η διαθέσιμη βιβλιογραφία και οι σύγχρονες ερευνητικές εξελίξεις στον τομέα των βιοδραστικών φυσικών προϊόντων και της επίδρασής τους στο καρδιαγγειακό σύστημα, με έμφαση στα θρομβωτικά επεισόδια, παρουσιάζονται στην ανασκόπηση με τίτλο “Bioactive natural products in cardiovascular disease: focus on thrombotic events”, η οποία δημοσιεύθηκε (29/6/2026) στο διεθνές επιστημονικό περιοδικό Phytotherapy Research (Q1, IF=8.1), από τον εκδοτικό οίκο Wiley. https://doi.org/10.1002/ptr.70415

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- Κασσιανή Λαλεχού, Μαρία-Νεκταρία Μαγκούλια, Γεωργία Παπαδοπούλου, Παναγιώτης Σταθόπουλος, Αλέξιος-Λέανδρος Σκαλτσούνης, Αλέξανδρος Δ. Τσελέπης, Δέσποινα Πανταζή. «Διερεύνηση της αντιαιμοπεταλιακής δράσης εκχυλισμάτων από φύλλα ελιάς: Μελέτη συνεργατικής δράσης με ιματινίβη». Προφορική ανακοίνωση στο 13ο Πανελλήνιο Συνέδριο Θρόμβωσης – Αντιθρομβωτικής Αγωγής, Ινστιτούτο Μελέτης και Εκπαίδευσης στη Θρόμβωση και την Αντιθρομβωτική Αγωγή (Ι.Μ.Ε.Θ.Α.), Ιωάννινα, 2–4 Οκτωβρίου 2025.
- Μαγκούλια Μαρία-Νεκταρία, Κασσιανή Λαλεχού, Γεωργία Παπαδοπούλου, Παναγιώτης Σταθόπουλος, Αλέξιος-Λέανδρος Σκαλτσούνης, Αλέξανδρος Δ. Τσελέπης, Δέσποινα Πανταζή. «Διερεύνηση της αντιοξειδωτικής και αντιαιμοπεταλιακής δράσης εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς εμπλουτισμένων με τερπένια». Προφορική ανακοίνωση στο 11ο Πανελλήνιο Συνέδριο των Ομάδων Εργασίας της Ελληνικής Εταιρείας Αθηροσκλήρωσης, Αθήνα, 5–6 Δεκεμβρίου 2025.
- Maria-Nektaria Magkoulia, Kassiani Lalechou, Georgia Papadopoulou, Panagiotis Stathopoulos, Alexios-Leandros Skaltsounis, Alexandros D. Tselepis, Despoina Pantazi. «Evaluation of the Antioxidant and Antiplatelet Properties of Olive Leaf Extracts Enriched with Terpenes». e-poster presentation at the 94th Congress of the European Atherosclerosis Society (EAS), Athens, Greece, 24–27 May 2026.