



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

Διδακτορική διατριβή

Προσδιορισμός και ποσοτικοποίηση φαινολικών ενώσεων σε επεξεργασμένους καρπούς ελιάς (*Olea europaea* subsp. *europaea*), συσχέτιση φαινολικών ενώσεων με νευροεκφυλιστικές ασθένειες και πολυδιάστατη φυλογενετική ανάλυση γονιδιωματικών δεδομένων της *Olea europaea* L.

Κωνσταντίνος Σ. Σαλής

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:
Μαριάννα Χατζηδημητρίου, Καθηγήτρια ΓΠΑ

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:
Μαριάννα Χατζηδημητρίου, Καθηγήτρια ΓΠΑ
Χρήστος Χατζησαββίδης, Καθηγητής ΔΠΘ
Ιωάννης Παπαδάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ



ΑΘΗΝΑ
2024

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

Διδακτορική διατριβή

Προσδιορισμός και ποσοτικοποίηση φαινολικών ενώσεων σε επεξεργασμένους καρπούς ελιάς (*Olea europaea* subsp. *europaea*), συσχέτιση φαινολικών ενώσεων με νευροεκφυλιστικές ασθένειες και πολυδιάστατη φυλογενετική ανάλυση γονιδιωματικών δεδομένων της *Olea europaea* L.

Identification and quantification of phenolic compounds in processed olive (*Olea europaea* subsp. *europaea*) fruits, association of phenolic compounds with neurodegenerative diseases and multidimensional phylogenetic analysis of genomic data of *Olea europaea* L.

Κωνσταντίνος Σ. Σαλής

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Μαριάννα Χατζηδημητρίου, Καθηγήτρια Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Χρήστος Χατζησαββίδης, Καθηγητής Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης
Ιωάννης Παπαδάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Ανδρέας Κατσιώτης, Καθηγητής Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο Κύπρου
Δημήτριος Βλαχάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Γεώργιος Κουμπούρης, Ερευνητής Β' Ελληνικός Γεωργικός Οργανισμός ΔΗΜΗΤΡΑ
Βασίλειος Ζιώγας, Ερευνητής Γ' Ελληνικός Γεωργικός Οργανισμός ΔΗΜΗΤΡΑ

Προσδιορισμός και ποσοτικοποίηση φαινολικών ενώσεων σε επεξεργασμένους καρπούς ελιάς (*Olea europaea* subsp. *europaea*), συσχέτιση φαινολικών ενώσεων με νευροεκφυλιστικές ασθένειες και πολυδιάστατη φυλογενετική ανάλυση γονιδιωματικών δεδομένων της *Olea europaea* L.

Τμήμα Βιοτεχνολογίας
Εργαστήριο Γενετικής

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη της επίδρασης της επεξεργασίας των καρπών στην συγκέντρωση των σημαντικότερων φαινολικών ενώσεων του καρπού της ελιάς, ποικιλίας ‘Καλαμών’, ο σχεδιασμός μίας πρότυπης *in silico* προσέγγισης με σκοπό την προσπάθεια ομαδοποίησης και ανακάλυψης σχεσιακών κόμβων εντός του γένους *Olea* και η συσχέτιση μίας από τις σημαντικότερες φαινολικές ενώσεις του καρπού της ελιάς με πρωτεΐνη που σχετίζεται με νευροεκφυλιστική ασθένεια.

Στο πρώτο κεφάλαιο, μελετήθηκαν οι αλλαγές στην συγκέντρωση των σημαντικότερων φαινολικών ενώσεων στον καρπό της ελιάς, ποικιλίας ‘Καλαμών’, μέσω ανάλυσης σε φρέσκους καρπούς και καρπούς με τις μεθόδους επεξεργασίας καρπών ελληνικού και ισπανικού τύπου. Για την υλοποίηση της μελέτης χρησιμοποιήθηκαν δύο αναλυτικές μέθοδοι, η μέθοδος παράταξης φωτοδιόδων (HPLC-DAD) και η μέθοδος δίδυμης φασματομετρίας μάζας (LC-(ESI)-MS/MS). Οι φαινολικές ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν ήταν η υδροξυτυροσόλη, η τυροσόλη, ο βερμπασκοζίτης, η ρουτίνη, η ελευρωπαΐνη και η λουτεολίνη. Και οι δύο μέθοδοι επεξεργασίας που χρησιμοποιήθηκαν άλλαξαν τη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων στους καρπούς της ελιάς, ποικιλίας ‘Καλαμών’, σε σύγκριση με τους μη επεξεργασμένους καρπούς. Κυρίαρχη φαινολική ένωση στους φρέσκους καρπούς ήταν η ρουτίνη, ενώ στους επεξεργασμένους καρπούς ο βερμπασκοζίτης. Και με τις δύο μεθόδους επεξεργασίας καρπού, παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση στη συγκέντρωση του βερμπασκοζίτη και της υδροξυτυροσόλης, και στατιστικώς σημαντική μείωση στη συγκέντρωση της ρουτίνης, ανεξάρτητα από την αναλυτική μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε.

Στο δεύτερο κεφάλαιο (πείραμα Α) περιγράφεται μία *in silico* προσέγγιση που συνδυάζει υπολογιστικές μεθόδους και εργαλεία από την εξόρυξη γονιδιακών δεδομένων ως την ταξινόμηση οντολογιών και την γενετική συσχέτιση, με σκοπό την προσπάθεια ομαδοποίησης και ανακάλυψης σχεσιακών κόμβων εντός του γένους *Olea*. Η σύντηξη και η ανάλυση όλων των διαθέσιμων νουκλεοτιδικών δεδομένων της ελιάς, είναι ένα βήμα υψηλής σημασίας για την ταξινόμηση και τον χαρακτηρισμό των ποικιλιών ελιάς, προς μία ολοκληρωμένη προσέγγιση στα πλαίσια της ασφάλειας τροφίμων και της δημόσιας υγείας. Η παρούσα μελέτη είναι ένα πρώτο βήμα για τον χειρισμό και την ανάλυση ακατέργαστων νουκλεοτιδικών δεδομένων φυτών. Ο στόχος του πειράματος ήταν η κάλυψη κενών σε τέτοιου είδους αναλύσεις μέσω φιλτραρίσματος, ομαδοποίησης, ταξινόμησης και γενετικής συσχέτισης των διαθέσιμων γονιδιακών πληροφοριών. Πραγματοποιήθηκε μία μεθοδολογία εξόρυξης και ανάλυσης των διαθέσιμων γονιδιωματικών δεδομένων του γένους *Olea* που μπορεί να βοηθήσει επιπλέον στην καλύτερη κατανόηση των γονιδιωματικών αλληλουχιών των φυτών. Στο πείραμα Β του δευτέρου κεφαλαίου, μελετήθηκε η σχέση της φαινολικής ένωσης τυροσόλης με την πρωτεΐνη τυροσινάση, η οποία σχετίζεται με την νευροεκφυλιστική νόσο Parkinson. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε μέσω υπολογιστικού μοριακού περιβάλλοντος, ως παράδειγμα της κατανόησης του ευεργετικού ρόλου των φαινολικών ενώσεων στην αντιμετώπιση ασθενειών.

Επιστημονική περιοχή: Αλλαγή συγκέντρωσης φαινολικών ενώσεων και *in silico* πολυδιάστατη ανάλυση νουκλεοτιδικών δεδομένων και πρωτεϊνών

Λέξεις κλειδιά: Ελιά, φαινολικές ενώσεις, επεξεργασία καρπού, νουκλεοτιδικές αλληλουχίες, πρωτεΐνη

Identification and quantification of phenolic substances in processed olive (*Olea europaea* subsp. *europaea*) fruits, association of phenolic compounds with neurodegenerative diseases and multidimensional phylogenetic analysis of genomic data of *Olea europaea* L.

Department of Biotechnology
Laboratory of Genetics

ABSTRACT

The purpose of the dissertation was to study the effect of fruit processing on the concentration of the most important phenolic compounds present in the olive fruit of 'Kalamon' variety, to design an *in-silico* model approach in order to group and discover relational nodes within the genus *Olea* and to correlate one of the major phenolic compounds of the olive fruit with a protein associated with a neurodegenerative disease.

In the first chapter, changes in the concentration of the most important phenolic compounds were quantified in fresh, Greek-style and Spanish-style processed olive fruits of cv. 'Kalamon', using two different analytical methods for identification and quantification: high-performance liquid chromatography diode array detector (HPLC-DAD) and ultrahigh-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-(ESI)-MS/MS). The phenolic compounds that were identified and quantified were hydroxytyrosol, tyrosol, verbascoside, rutin, oleuropein and luteolin. Both processing methods used altered the phenolic compounds concentration in 'Kalamon' olive fruits compared to untreated fruits. The dominant phenolic compound in fresh fruits was rutin, while verbascoside was the dominant phenolic compound in the processed fruits. In both analytical methods, a statistically significant increase in verbascoside and hydroxytyrosol concentration and a statistically significant decrease in rutin concentration was observed in both, Greek-style and Spanish-style, processed olive fruits.

In the second chapter, an *in-silico* approach was used that combines methods from data mining and machine learning pipelines to ontology classification and semantic annotation. Fusing and analysing all available olive tree data is a step of uttermost importance in classifying and characterising the various cultivars, towards a comprehensive approach under the context of food safety and public health. The present study is an important precursor for handling and analysing raw genomics and genetics data from plants. The aim is to fill in the gaps in such analysis through filtering, clustering and classification with the use of ontology terms to discover the relational nodes of the available information. A data mining pipeline was performed in available genomic data of several species of the *Olea* genus, and we have developed an approach that may help to annotate plant genomic sequences better. In experiment B of the second chapter, the association of the phenolic compound tyrosol with the protein tyrosinase, which is associated with the neurodegenerative disease Parkinson's, was carried out. The experiment was carried out through a computational molecular environment, as an example of understanding the beneficial role of phenolic compounds in the treatment of diseases.

Scientific area: Change in phenolic compound concentration and *in-silico* multidimensional analysis of nucleotide and protein data

Keywords: Olive, phenolic compounds, olive fruit processing, nucleotide sequences, protein

*Στους ανθρώπους που πόνεσαν
για να φτάσουμε εκεί που είμαστε σήμερα.....*

Αντί Προλόγου,

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γενετικής, του Τμήματος Βιοτεχνολογίας, υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας Μαριάννας Χατζηδημητρίου.

Καταρχάς θα ήθελα να εκφράσω στις θερμές μου ευχαριστίες στην Δρ. Μαριάννα Χατζηδημητρίου, υπό την καθοδήγηση στις οποίες εκπονήθηκε η μεταπτυχιακή μου αλλά και η παρούσα διδακτορική διατριβή, για την πολύτιμη και καθοριστική συνδρομή στις, στις συμβουλές αλλά και την εμπιστοσύνη που επέδειξε στο πρόσωπο μου, αναθέτοντας μου ένα τόσο καινοτόμο και απαιτητικό θέμα.

Στις θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη στις τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, τόσο για το ενδιαφέρον που επέδειξαν όσο και για στις χρήσιμες υποδείξεις στις, που συνέβαλλαν στην ολοκλήρωση στις παρούσας διατριβής. Ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να απευθύνω στα μέλη στις επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, για το χρόνο που αφιέρωσαν στη μελέτη στις διατριβής μου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό του εργαστηρίου για την συνεργασία στις και ιδιαίτερα τον Αναπληρωτή Καθηγητή Δημήτριο Βλαχάκη για την καθοδήγηση του σε νέα και ποικίλα επιστημονικά πεδία.

Ευχαριστώ θερμά την οικογένεια μου για την αγάπη και την υποστήριξη στις σε όλους στις τομείς, στις γονείς μου Σωτήρη και Σοφία. Χωρίς την υπομονή και την υποστήριξη στις δεν θα ήταν δυνατή η ολοκλήρωση στις παρούσας διατριβής.

Με την άδειά μου, η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από την Εξεταστική Επιτροπή μέσα από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής που διαθέτει το ΓΠΑ και διασταυρώθηκε η εγκυρότητα και η πρωτοτυπία στις

Περίεχόμενα

ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	14
Βοτανική ταξινόμηση – Καλλιέργεια και οικονομική σημασία της ελιάς –Βοτανικά χαρακτηριστικά – Ποικιλίες ελιάς – Ανάπτυξη ελαιόκαρπου.....	14
I. Προέλευση και εξάπλωση της ελιάς.....	14
II. Καλλιέργεια και οικονομική σημασία της ελιάς.....	15
III. Βοτανική Ταξινόμηση και βοτανικά χαρακτηριστικά της ελιάς.....	18
IV. Ποικιλίες ελιάς και αγρονομικά χαρακτηριστικά ποικιλίας ‘Καλαμών’	19
V. Ανάπτυξη Ελαιόκαρπου.....	20
VI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	26
Προσδιορισμός και ποσοτικοποίηση φαινολικών ενώσεων σε φρέσκους και επεξεργασμένους καρπούς ελιάς ποικιλίας ‘Καλαμών’.....	26
Περίληψη	26
1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	27
1.1.1. Φαινολικές Ενώσεις – Ορισμός και βιοσύνθεση.....	27
1.1.2. Κατηγορίες φαινολικών ενώσεων.....	28
1.1.2.1. Απλές φαινολικές ενώσεις.....	29
1.1.2.2. Φαινολικά Οξέα	30
1.1.2.3. Σύνθετες φαινολικές ενώσεις.....	31
1.1.2.4. Φλαβονοειδή	31
1.1.2.5. Τανίνες	33
1.1.2.6. Σεκοϊριδοειδείς Ενώσεις	33
1.1.2.7. Κύριες φαινολικές ενώσεις στην ελιά.....	33
1.1.3. Ο ρόλος των φαινολικών ενώσεων στα ανώτερα φυτά.....	35
1.1.3.1. Δομικός Ρόλος.....	35
1.1.3.2. Λειτουργικός ρόλος.....	36
1.1.3.3. Αμυντικός ρόλος	36
1.1.3.4. Αναπαραγωγικός ρόλος.....	36
1.1.3.5. Άλλοι ρόλοι.....	37
1.1.4. Ο ρόλος των φαινολικών ενώσεων στην ανθρώπινη υγεία.....	37
1.1.4.1. Ελεύθερες ρίζες.....	38
1.1.4.2. Οξειδωτικό στρες	39
1.1.4.3. Μηχανισμός δράσης ελεύθερων ριζών	40
1.1.4.4. Αντιοξειδωτικές ουσίες.....	40
1.1.4.5. Αντιοξειδωτική ικανότητα φαινολικών ενώσεων	42
1.1.4.6. Προ οξειδωτική δράση φαινολικών ενώσεων.....	43
1.1.4.7. Επίδραση φαινολικών ενώσεων στην ανθρώπινη υγεία	44
1.1.5.1. Παράγοντες που επηρεάζουν τη βιοσύνθεση των φαινολικών ενώσεων.....	77
1.1.5.2. Επεξεργασία προϊόντων επιτραπέζιας ελιάς	78
1.1.6. Ανάλυση φαινολικών ενώσεων.....	82
1.1.6.1. Ταυτοποίηση και ποσοτικός προσδιορισμός ενώσεων	82
1.1.6.2. Φασματομετρία μάζας (mass spectrometry - MS)	86
1.1.7. Σκοπός του πειράματος	96
1.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	97
1.2.1. Φυτικό υλικό	97
1.2.2. Προεργασία – Προετοιμασία δείγματος.....	98

1.2.3.	Ανάλυση φαινολικών ενώσεων με την HPLC-DAD μέθοδο προσδιορισμού και ποσοτικοποίησης (Α μέθοδος).....	99
1.2.4.	Ανάλυση φαινολικών ενώσεων με την LC-(ESI)-MS/MS μέθοδο προσδιορισμού και ποσοτικοποίησης (Β μέθοδος)	101
1.2.5.	Παρασκευή πρότυπων φαινολικών διαλυμάτων	103
1.2.6.	Στατιστική ανάλυση	104
1.3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	105
1.3.1.	Αποτελέσματα ανάλυσης φαινολικών ενώσεων με την HPLC-(DAD) μέθοδο προσδιορισμού και ποσοτικοποίησης (Α μέθοδος).....	105
1.3.2.	Ανάλυση φαινολικών ενώσεων με LC-(ESI)-MS/MS μέθοδο προσδιορισμού και ποσοτικοποίησης (Β μέθοδος)	116
1.4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	132
1.4.1.	Η σημασία των φαινολικών ενώσεων στα προϊόντα της ελιάς	132
1.4.2	Συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων στους επεξεργασμένους καρπούς ποικιλίας ‘Καλαμών’.....	134
1.4.2.1	Συγκέντρωση Βερμπασκοζίτη.....	134
1.4.2.2	Συγκέντρωση Υδροξυτυροσόλης.....	135
1.4.2.3	Συγκέντρωση Λουτεολίνης.....	137
1.4.2.4	Συγκέντρωση Ρουτίνης.....	138
1.4.2.5	Συγκέντρωση Τυροσόλης.....	139
1.4.2.6.	Συγκέντρωση Ελευρωπαϊνης.....	141
1.4.3	Η σημασία της μεθόδου επεξεργασίας καρπού στη φαινολικό προφίλ και τη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων στον ελαιόκαρπο	142
1.4.4.	Η σημασία μεθόδου προσδιορισμού και ποσοτικοποίησης στην ανάλυση φαινολικών ενώσεων στα προϊόντα της ελιάς	143
1.4.5	Η σημασία του γονότυπου στη σύνθεση των φαινολικών ενώσεων της ελιάς	144
1.4.6.	Συμπεράσματα.....	145
1.5.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	147
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	180
Πολυδιάστατη φυλογενετική ανάλυση γονιδιωματικών δεδομένων της <i>Olea europaea</i> L. και συσχέτιση φαινολικής ένωσης με νευροεκφυλιστικές ασθένειες		180
Περίληψη.....		180
2.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ		182
2.1.1.	Πληθυσμιακή γενετική.....	182
2.1.1.1.	Γενετική Ποικιλομορφία	182
2.1.1.2.	Μελέτη εξελικτικών σχέσεων των οργανισμών	183
2.1.2.	Ερευνητικό πεδίο	184
2.1.2.1	Βιοπληροφορική.....	184
2.1.3	Οργάνωση δεδομένων.....	185
2.1.3.1	Μεθοδολογία ερμηνείας βιολογικών αποτελεσμάτων	187
2.1.3.2	Ανάλυση – Κατηγοριοποίηση δεδομένων.....	187
2.1.1.	Συστοίχιση δεδομένων βιολογικών ακολουθιών	189
2.1.4.1.	Προοδευτική συστοίχιση δεδομένων	192
2.1.4.2.	Δένδρο οδηγός.....	193
2.1.4.3.	Επαναληπτική προσέγγιση.....	193
2.1.4.4.	Συστοίχιση βασισμένη σε κρυφά μοντέλα Markov	193
2.1.4.5.	Τεχνικές περικοπών.....	194
2.1.4.6.	Τεχνική σκοραρίσματος συστοίχισης.....	194
2.1.4.7.	Στοχαστικές προσεγγίσεις	196
2.1.4.8.	Συγκριτική αξιολόγηση	201
2.1.5.	Φυλογενετική ανάλυση	201
2.1.5.1	Φυλογενετικό δένδρο	202
2.1.5.2.	Μοριακές μέθοδοι για την κατασκευή φυλογενετικού δένδρου	203
2.1.5.3.	Ανακατασκευή φυλογένεσης	205

2.1.6.	Εργαλείο βασικής τοπικής αναζήτησης συστοίχισης (Basic local alignment search tool - BLAST) και γρήγορης συστοίχισης (Fast alignment – FASTA).....	209
2.1.6.1.	Γονιδιακές και πρωτεϊνικές ακολουθίες.....	209
2.1.6.2.	Συστοίχιση ακολουθιών και εργαλεία αναζήτησης βάσεων δεδομένων.....	210
2.1.7	Σύγχρονη υπολογιστική βιολογία.....	213
2.1.7.1.	Δεδομένα – Τύποι – Προκλήσεις	214
2.1.7.2.	Αλγόριθμοι συμπίεσης	218
2.1.7.	Ανάλυση μεγάλων δεδομένων	218
2.1.8.1.	Εφαρμογή δεδομένων μεγάλου όγκου	222
2.1.8.2.	Δεδομένα μεγάλου όγκου μεγέθους δείγματος και υψηλής διαστατικότητας (Μεγάλα δεδομένα).....	225
2.1.8.3.	Επίδραση μεγάλων δεδομένων στις υπολογιστικές δομές.....	227
2.1.9.	Μοριακό λειτουργικό περιβάλλον – Ποσοτικές σχέσεις δομής / λειτουργίας – Μοριακή σύνδεση	228
2.1.10.	Σκοπός έρευνας.....	231
2.2.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	233
2.2.1.	Συλλογή δεδομένων	233
2.2.2.	Πρώτο επίπεδο ανάλυσης – Φιλτράρισμα δεδομένων	233
2.2.3.	Δεύτερο επίπεδο ανάλυσης – Εξόρυξη δεδομένων και σημασιολογία	234
2.2.4.	Τρίτο επίπεδο ανάλυσης – Ανάλυση γενετικής πληροφορίας	235
2.2.5.	Μελέτη μοριακής σύνδεσης.....	236
2.3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	237
2.3.1.	Συλλογή δεδομένων	237
2.3.2.	Πρώτο επίπεδο ανάλυσης.....	237
2.3.3.	Δεύτερο επίπεδο ανάλυσης	240
2.3.4.	Τρίτο επίπεδο ανάλυσης.....	246
2.3.5.	Μελέτη μοριακής σύνδεσης φαινολικής ένωσης – πρωτεΐνης.....	252
2.4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	253
2.4.1.	Συλλογή δεδομένων	254
2.4.2.	Πρώτο επίπεδο ανάλυσης.....	254
2.4.3.	Δεύτερο επίπεδο ανάλυσης	256
2.4.4.	Τρίτο επίπεδο ανάλυσης.....	261
2.4.5.	Μοριακή σύνδεση φαινολικής ένωσης – πρωτεΐνης.....	265
2.4.6.	Συμπεράσματα.....	266
2.5.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	268

Ευρετήριο Πινάκων

Πίνακας Π.1. Παραγωγή, εξαγωγές και κατανάλωση ελαιόλαδου και βρώσιμης ελιάς, παγκοσμίως, στην Ευρωπαϊκή Ένωση και την Ελλάδα, κατά το έτος 2017/2018, σύμφωνα με το Παγκόσμιο Συμβούλιο Ελαιόλαδου (International Olive Council, IOC).

Πίνακας 1.1. Κατηγοριοποίηση των φαινολικών ενώσεων με βάση τον αριθμό ατόμων άνθρακα στο μόριο τους (Urquiaga & Leighton, 2000).

Πίνακας 1.2. Οι κυριότερες φαινολικές ενώσεις στα προϊόντα της ελιάς.

Πίνακας 1.3. Οι σημαντικότερες δραστικές μορφές οξυγόνου (Jacob, 1995).

Πίνακας 1.4. Σχετικές μελέτες και λειτουργικά μονοπάτια της υδροξυτυροσόλης (PubChem database).

Πίνακας 1.5. Σχετικές μελέτες και λειτουργικά μονοπάτια της ελευρωπαϊνης (PubChem database).

Πίνακας 1.6. Σχετικές μελέτες και λειτουργικά μονοπάτια της τυροσόλης (PubChem database).

Πίνακας 1.7. Σχετικές μελέτες και λειτουργικά μονοπάτια της λουτεολίνης (PubChem database).

Πίνακας 1.8. Σχετικές μελέτες και λειτουργικά μονοπάτια της ρουτίνης (PubChem database).

Πίνακας 1.9. Σχετικές μελέτες και λειτουργικά μονοπάτια του βερμπασκοζίτη (PubChem database).

Πίνακας 1.10. Διακύμανση της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών στους ιστούς των καρπών της ποικιλίας 'Καλαμών', ανά τύπο επεξεργασίας του καρπού, εκφρασμένη σε μg ανά g σάρκα καρπού, με την αναλυτική μέθοδο HPLC-(DAD).

Πίνακας 1.11. Σύγκριση των καρπών χωρίς επεξεργασία, των καρπών με επεξεργασία τύπου GR και των καρπών με επεξεργασία τύπου SP, με Tukey HSD Post-hoc Test (One-Way Analysis of Variance ANOVA), με την αναλυτική μέθοδο HPLC-(DAD).

Πίνακας 1.12. Βελτιστοποιημένες συνθήκες MS/MS για τον προσδιορισμό των φαινολικών της ελιάς.

Πίνακας 1.13. Διακύμανση της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών στους ιστούς των καρπών της ποικιλίας Καλαμών, ανά τύπο επεξεργασίας του καρπού, εκφρασμένη σε μg ανά g σάρκα καρπού, με την αναλυτική μέθοδο LC-MS/MS.

Πίνακας 1.14. Σύγκριση των καρπών χωρίς επεξεργασία, των καρπών με επεξεργασία τύπου GR και των καρπών με επεξεργασία τύπου SP, με Tukey HSD Post-hoc Test (One-Way Analysis of Variance ANOVA), με την αναλυτική μέθοδο LC-MS/MS.

Πίνακας 2.1. Είδη και υπό-είδη του γένους *Olea* που αναγνωρίστηκαν στο σύνολο δεδομένων ολοκληρωμένων ακολουθιών.

Πίνακας 2.2. Υπό-σύνολα δεδομένων, αριθμός ακολουθιών των υπό-συνόλων δεδομένων και μέσο μήκος ακολουθίας των υπό-συνόλων δεδομένων που δημιουργήθηκαν από τα αρχικά σύνολα δεδομένων.

Πίνακας 2.3. Υπό-σύνολα δεδομένων που δημιουργήθηκαν από τις οντολογίες που εμφάνισαν υψηλή επαναληψιμότητα στο υπό-σύνολο δεδομένων πρωτεΐνης και το ποσοστό επαναληψιμότητας εντός του υπό-συνόλου δεδομένων πρωτεΐνης.

Πίνακας 2.4. Καλλιεργήσιμες ποικιλίες του είδους *Olea europaea* subsp. *europaea*, με τη μεγαλύτερη επαναληψιμότητα ακολουθίας, που εντοπίστηκαν στο σύνολο δεδομένων του γένους *Olea*.

Πίνακας 2.5. Σύνολο νουκλεοτιδικών ακολουθιών στο υπό-σύνολο δεδομένων θορύβου και κύρια υπό-σύνολα δεδομένων που αναγνωρίστηκαν μέσα σε αυτό.

Πίνακας 2.6. Ομαδοποίηση νουκλεοτιδικών ακολουθιών με βάση τη γενετική ομοιότητα στο υπό-σύνολο δεδομένων ‘*trn*’, ο αριθμός ακολουθιών που περιλάμβανε κάθε ομάδα και τα είδη που συμπεριλαμβάνονταν σε κάθε ομάδα.

Πίνακας 2.7. Ομαδοποίηση νουκλεοτιδικών ακολουθιών με βάση τη γενετική ομοιότητα στο υπό-σύνολο δεδομένων ‘*microsatellite*’, ο αριθμός ακολουθιών που περιλάμβανε κάθε ομάδα και τα είδη που συμπεριλαμβάνονταν σε κάθε ομάδα.

Πίνακας 2.8. Ομαδοποίηση νουκλεοτιδικών ακολουθιών με βάση τη γενετική ομοιότητα στα υπό-σύνολα δεδομένων ‘*chloroplast*’, ‘*mitochondrial*’, ο αριθμός ακολουθιών που περιλάμβανε κάθε ομάδα και τα είδη που συμπεριλαμβάνονταν σε κάθε ομάδα.

Πίνακας 2.9. Ομαδοποίηση νουκλεοτιδικών ακολουθιών με βάση τη γενετική ομοιότητα στο υπό-σύνολο δεδομένων που αφορούσε καλλιεργήσιμες ποικιλίες της *Olea europaea* subsp. *europaea*, ο αριθμός ακολουθιών που περιλάμβανε κάθε ομάδα και τα είδη που συμπεριλαμβάνονταν σε κάθε ομάδα.

Ευρετήριο Γραφημάτων

Γράφημα Π.1. Ποσοστό καλλιεργούμενων εκτάσεων ελιάς με βάση την έκταση σε εκτάρια εντός της Ευρωπαϊκής Ένωσης, κατά το έτος 2017, σύμφωνα με τη στατιστική υπηρεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης.

Γράφημα 1.1. HPLC χρωματογράφημα των δειγμάτων καρπών χωρίς επεξεργασία, για τις φαινολικές υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη, βερμπασκοζίτη, ρουτίνη, ελευρωπαΐνη, λουτεολίνη.

Γράφημα 1.2. HPLC χρωματογράφημα των δειγμάτων καρπών με επεξεργασία τύπου GR, για τις φαινολικές υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη, βερμπασκοζίτη, ρουτίνη, ελευρωπαΐνη, λουτεολίνη.

Γράφημα 1.3. HPLC χρωματογράφημα των δειγμάτων καρπών με επεξεργασία τύπου SP, για τις φαινολικές υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη, βερμπασκοζίτη, ρουτίνη, ελευρωπαΐνη, λουτεολίνη.

Γράφημα 1.4. Μέση συγκέντρωση υδροξυτυροσόλης (HTYR) σε μg/g σάρκας καρπού, των δειγμάτων καρπών σε όλα τα στάδια, με την αναλυτική μέθοδο HPLC-(DAD).

Γράφημα 1.5. Μέση συγκέντρωση υδροξυτυροσόλης (HTYR) και συγκρίσεις μεταξύ των διαφορετικών μεθόδων επεξεργασίας των καρπών, με την αναλυτική μέθοδο HPLC-(DAD).

Γράφημα 1.6. Μέση συγκέντρωση τυροσόλης (TYR) σε μg/g σάρκας καρπού, των δειγμάτων καρπών σε όλα τα στάδια, με την αναλυτική μέθοδο HPLC-(DAD).

Γράφημα 1.7. Μέση συγκέντρωση τυροσόλης (TYR) και συγκρίσεις μεταξύ των διαφορετικών μεθόδων επεξεργασίας των καρπών, με την αναλυτική μέθοδο HPLC-(DAD).

Γράφημα 1.8. Μέση συγκέντρωση βερμπασκοζίτη (VER) σε μg/g σάρκας καρπού, των δειγμάτων καρπών σε όλα τα στάδια, με την αναλυτική μέθοδο HPLC-(DAD).

Γράφημα 1.9. Μέση συγκέντρωση βερμπασκοζίτη (VER) και συγκρίσεις μεταξύ των διαφορετικών μεθόδων επεξεργασίας των καρπών, με την αναλυτική μέθοδο HPLC-(DAD).

Γράφημα 1.10. Μέση συγκέντρωση ρουτίνης (RUT) σε μg/g σάρκας καρπού, των δειγμάτων καρπών σε όλα τα στάδια, με την αναλυτική μέθοδο HPLC-(DAD).

Γράφημα 1.11. Μέση συγκέντρωση ρουτίνης (RUT) και συγκρίσεις μεταξύ των διαφορετικών μεθόδων επεξεργασίας των καρπών, με την αναλυτική μέθοδο HPLC-(DAD).

Γράφημα 1.12. Μέση συγκέντρωση λουτεολίνης (LUT) σε μg/g σάρκας καρπού, των δειγμάτων καρπών σε όλα τα στάδια, με την αναλυτική μέθοδο HPLC-(DAD).

Γράφημα 1.13. Μέση συγκέντρωση λουτεολίνης (LUT) και συγκρίσεις μεταξύ των διαφορετικών μεθόδων επεξεργασίας των καρπών, με την αναλυτική μέθοδο HPLC-(DAD).

Γράφημα 1.14. SRM χρωματογράφημα εκχυλισμάτων των δειγμάτων για τις φαινολικές υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη, βερμπασκοζίτη, ρουτίνη, ελευρωπαΐνη, λουτεολίνη.

Γράφημα 1.15. Μέση συγκέντρωση υδροξυτυροσόλης (HTYR) σε μg/g σάρκας καρπού, των δειγμάτων καρπών σε όλα τα στάδια, με την αναλυτική μέθοδο LC-MS/MS.

Γράφημα 1.16. Μέση συγκέντρωση υδροξυτυροσόλης (HTYR) και συγκρίσεις μεταξύ των διαφορετικών μεθόδων επεξεργασίας των καρπών, με την αναλυτική μέθοδο LC-MS/MS.

Γράφημα 1.17. SRM χρωματογράφημα, της υδροξυτυροσόλης (HTYR) για τα δείγματα του καρπού ελιάς με όλες τις μεθόδους επεξεργασίας.

Γράφημα 1.18. Μέση συγκέντρωση τυροσόλης (TYR) σε $\mu\text{g/g}$ σάρκας καρπού, των δειγμάτων καρπών σε όλα τα στάδια, με την αναλυτική μέθοδο LC-MS/MS.

Γράφημα 1.19. Μέση συγκέντρωση υδροξυτυροσόλης (TYR) και συγκρίσεις μεταξύ των διαφορετικών μεθόδων επεξεργασίας των καρπών, με την αναλυτική μέθοδο LC-MS/MS.

Γράφημα 1.20. SRM χρωματογράφημα της τυροσόλης (TYR), για τα δείγματα του καρπού με όλες τις μεθόδους επεξεργασίας.

Γράφημα 1.21. Μέση συγκέντρωση βερμπασκοζίτη (VER) σε $\mu\text{g/g}$ σάρκας καρπού, των δειγμάτων καρπών σε όλα τα στάδια, με την αναλυτική μέθοδο LC-MS/MS.

Γράφημα 1.22. Μέση συγκέντρωση βερμπασκοζίτη (VER) και συγκρίσεις μεταξύ των διαφορετικών μεθόδων επεξεργασίας των καρπών, με την αναλυτική μέθοδο LC-MS/MS.

Γράφημα 1.23. SRM χρωματογράφημα του βερμπασκοζίτη (VER), για τα δείγματα του καρπού με όλες τις μεθόδους επεξεργασίας.

Γράφημα 1.24. Μέση συγκέντρωση λουτεολίνης (LUT) σε $\mu\text{g/g}$ σάρκας καρπού, των δειγμάτων καρπών σε όλα τα στάδια, με την αναλυτική μέθοδο LC-MS/MS.

Γράφημα 1.25. Μέση συγκέντρωση λουτεολίνης (LUT) και συγκρίσεις μεταξύ των διαφορετικών μεθόδων επεξεργασίας των καρπών, με την αναλυτική μέθοδο LC-MS/MS.

Γράφημα 1.26. SRM χρωματογράφημα της λουτεολίνης (LUT), για τα δείγματα του καρπού με όλες τις μεθόδους επεξεργασίας.

Γράφημα 1.27. Μέση συγκέντρωση ρουτίνης (RUT) σε $\mu\text{g/g}$ σάρκας καρπού, των δειγμάτων καρπών σε όλα τα στάδια, με την αναλυτική μέθοδο LC-MS/MS.

Γράφημα 1.28. Μέση συγκέντρωση ρουτίνης (RUT) και συγκρίσεις μεταξύ των διαφορετικών μεθόδων επεξεργασίας των καρπών, με την αναλυτική μέθοδο LC-MS/MS.

Γράφημα 1.29. SRM χρωματογράφημα της ρουτίνης (RUT), για τα δείγματα του καρπού με όλες τις μεθόδους επεξεργασίας.

Γράφημα 1.30. Μέση συγκέντρωση ελευρωπαΐνης (OLE) σε $\mu\text{g/g}$ σάρκας καρπού, των δειγμάτων καρπών σε όλα τα στάδια, με την αναλυτική μέθοδο LC-MS/MS.

Γράφημα 1.31. Μέση συγκέντρωση ελευρωπαΐνης (OLE) και συγκρίσεις μεταξύ των διαφορετικών μεθόδων επεξεργασίας των καρπών, με την αναλυτική μέθοδο LC-MS/MS.

Γράφημα 1.32. SRM χρωματογράφημα της ελευρωπαΐνης (OLE), για τα δείγματα του καρπού με όλες τις μεθόδους επεξεργασίας.

Γράφημα 2.1. Ποσοστό αριθμού ακολουθιών, επί του συνόλου δεδομένων του γένους *Olea*, των υπό-συνόλων ομάδων δεδομένων, που διαχωρίστηκαν με βάση το μήκος της ακολουθίας.

Γράφημα 2.2. Ποσοστό νουκλεοτιδικών ακολουθιών που αναφέρονται στο είδος *Olea europaea*, στα επιμέρους υπό-σύνολα δεδομένων που δημιουργήθηκαν

Ευρετήριο Σχημάτων

Σχήμα 1.1. Απλές φαινολικές ενώσεις

Σχήμα 1.2. Παράγωγα βενζοϊκού οξέος

Σχήμα 1.3. Παράγωγα υδροξυκιναμωμικού οξέος

Σχήμα 1.4. Κατηγορίες, ταξινόμηση και πηγές φλαβονοειδών.

Σχήμα 1.5. Σύστημα χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC).

Σχήμα 1.6. Διαγραμματική απεικόνιση ενός συστήματος DAD.

Σχήμα 1.7. Σχηματική απεικόνιση των βασικών συστατικών ενός φασματόμετρου μάζας.

Σχήμα 1.8. Διαγραμματική απεικόνιση ενός φασματόμετρου μάζας.

Σχήμα 1.9. Σχηματική απεικόνιση τριπλού τετραπολικού αναλυτή μάζας.

Σχήμα 1.10. Διαγραμματική απεικόνιση δίδυμης φασματομετρίας μάζας.

Σχήμα 1.11. Σχηματική απεικόνιση δίδυμης φασματομετρίας μάζας.

Ευρετήριο Εικόνων

Εικόνα III.1. Καρπός ελιάς ποικιλίας ‘Καλαμών’ από την επιχείρηση πολλαπλασιαστικού Υλικού Hellenic Plants.

Εικόνα 1.1. Δυσδιάστατη δομή της υδροξυτυροσόλης (PubChem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)

Εικόνα 1.2. Δυσδιάστατη δομή της ελευρωπαΐνης (PubChem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)

Εικόνα 1.3. Δυσδιάστατη δομή της τυροσόλης (PubChem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)

Εικόνα 1.4. Δυσδιάστατη δομή της ρουτίνης (PubChem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)

Εικόνα 1.5. Δυσδιάστατη δομή της λουτεολίνης (PubChem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)

Εικόνα 1.6. Δυσδιάστατη δομή βερμπασκοζίτη (PubChem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)

Εικόνα 2.1. Αναπαράσταση της κρυσταλλικής δομής (PDB ID: 4P6T) της τυροσινάσης σε δέσμευση της τυροσόλης (σε πράσινο χρώμα), στην ενεργή της τοποθεσία.

ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Βοτανική ταξινόμηση – Καλλιέργεια και οικονομική σημασία της ελιάς – Βοτανικά χαρακτηριστικά – Ποικιλίες ελιάς – Ανάπτυξη ελαιόκαρπου

I. Προέλευση και εξάπλωση της ελιάς

Για χιλιάδες χρόνια το δέντρο της ελιάς (*Olea europaea* L.) αποτελεί μία από τις πιο σημαντικές και ίσως την πιο διαδεδομένη καλλιέργεια στην περιοχή της μεσογείου. Η ελιά είναι στενά συνυφασμένη με πολιτιστικούς, θρησκευτικούς, κοινωνικούς, οικονομικούς σκοπούς αλλά και με θέματα ανθρώπινης υγείας και ευεξίας. Σχεδόν όλοι οι αρχαίοι πολιτισμοί έχουν χρησιμοποιήσει την ελιά και τα προϊόντα της, από τους αρχαίους Έλληνες ως τους αρχαίους Αιγύπτιους. Έχει αναφερθεί εκτεταμένα στην Βίβλο και το Κοράνι, και από τα αρχαία χρόνια η χρήση των προϊόντων της έχει συνδεθεί με θεραπευτικές και μακροβιοτικές ιδιότητες. Ως καλλιέργεια, ειδικότερα για τις Μεσογειακές χώρες, αποτέλεσε ορόσημο της εξέλιξης του πολιτισμού.

Ως πιθανότερος τόπος καταγωγής της ελιάς από τους περισσότερους συγγραφείς, θεωρείται η ευρύτερη γεωγραφική περιοχή από τα ανατολικά παράλια της Μεσογείου, τη Μέση Ανατολή, το Ιράν και τους πρόποδες του Νότιου Καυκάσου. Η ύπαρξη στην περιοχή της Μεσογείου πιστοποιείται από αρχαιολογικά ευρήματα από την εποχή του χαλκού, περίπου το 3000 π.Χ. (**Bartolucci and Dhakal, 1999; Fabbri et al., 2004**). Αναφορές για την εκτεταμένη καλλιέργεια της ελιάς και εμπορία των προϊόντων της υπάρχουν από το 2000 π.Χ. στην Συρία και από το 1700 π.Χ. στη Μινωική Κρήτη. Από την Ανατολική Μεσόγειο και τη Μέση Ανατολή η ελιά μεταφέρθηκε και καλλιεργήθηκε στην Κρήτη και την Νότια Ελλάδα. Με βάση τα ιστορικά στοιχεία και αρχαιολογικά ευρήματα, η καλλιέργεια της ελιάς στην Ελλάδα χρονολογείται από τα Μινωικά και Μυκηναϊκά χρόνια (**Fooks, 1995**). Στον Ελλαδικό χώρο, οι αρχαιότερες ενδείξεις ύπαρξης της ελιάς προέρχονται από απολιθώματα φύλλων στις Μυκήνες, τη Θήρα, και την Κνωσό. Σύμφωνα με τους **Friedrich & Velitzelos (1986)**, τα απολιθώματα φύλλων χρονολογούνται πριν από 60.000 χρόνια.

Πιθανολογείται ότι η καλλιέργεια της ελιάς εξαπλώθηκε από τους Φοίνικες και τους Κρήτες στις υπόλοιπες χώρες της Μεσογείου. Η εντατικοποίηση της καλλιέργειας πραγματοποιήθηκε από την Ρωμαϊκή αυτοκρατορία και διαδόθηκε σε κάθε περιοχή επέκτασης της. Κατά την περίοδο της Ρωμαϊκής αυτοκρατορίας η Ιβηρική χερσόνησος και τα παράλια της Βόρειας Αφρικής αποτελούσαν τα σημαντικότερα κέντρα καλλιέργειας της ελιάς. Ως ένδειξη του τόπου καταγωγής της ελιάς μπορεί να χρησιμοποιηθεί η ύπαρξη μεγάλης γενετικής παραλλακτικότητας που εμφανίζεται κυρίως στις περιοχές της Συρίας και της Παλαιστίνης, καθώς και της Ελλάδας ως δευτερογενούς περιοχής

καταγωγής της ελιάς (**Μπαλατσούρας, 1994; Damania, 1995**). Η παρουσία άγριων ελαιόδεντρων θεωρείται ο καλύτερος βιοδείκτης προσδιορισμού των περιοχών που καλύπτονται από τη μεσογειακή χλωρίδα (**Rubio et al., 2002**).

Από τους κατοίκους της Ιβηρικής χερσονήσου η καλλιέργεια της ελιάς διαδόθηκε στην Αμερική, όπου πλέον χαίρει ιδιαίτερης οικονομικής σημασίας και χώρες όπως οι ΗΠΑ, η Αργεντινή, η Χιλή και η Αυστραλία εξελίσσονται σε μεγάλες ελαιοπαραγωγές χώρες (**Coni et al., 2000; Covas, 2007; Nanos et al., 2002; Visioli et al., 1998**). Στις ημέρες μας, από τα μέσα του 20ου αιώνα, η καλλιέργεια της ελιάς έχει μεταφερθεί και δοκιμάζεται σε περιοχές που δεν αυτοφύεται, εκτός της λεκάνης της Μεσογείου, όπως οι Κίνα, Ιαπωνία, Νότια Αμερική, Νότια Αφρική, Πακιστάν κ.α. Η καλλιέργεια της ελιάς φαίνεται πως έχει επεκταθεί σχεδόν σε όλα τα μήκη και πλάτη της γης.

II. Καλλιέργεια και οικονομική σημασία της ελιάς

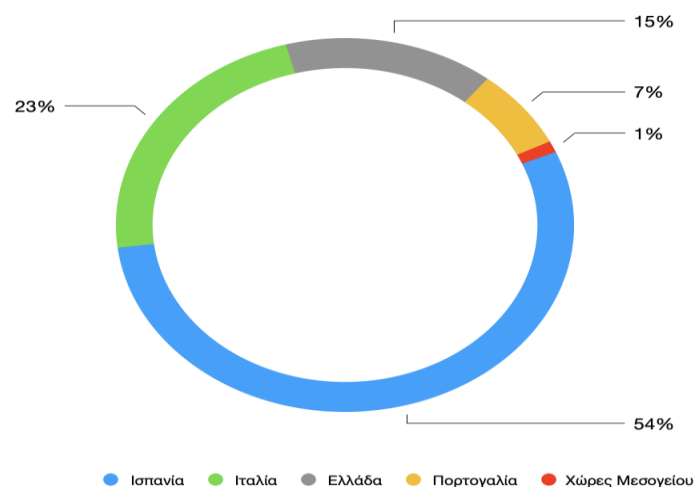
Η ελιά καλλιεργείται κυρίως στην περιοχή της Μεσογείου, στην οποία παράγεται περίπου το 90% των προϊόντων ελιάς τα οποία καταναλώνονται παγκοσμίως και κατέχει σχεδόν το 80% των εξαγωγών της αγοράς για αυτά τα προϊόντα (**Bartolini and Petruccelli, 2002; Vasto et al., 2014**).

Η ζώνη καλλιέργειας της ελιάς εκτείνεται μεταξύ 30^ο και 45^ο βόρεια και νότια γεωγραφικά πλάτη, σε θερμές εύκρατες και υποτροπικές περιοχές, όπου επικρατούν υψηλές θερμοκρασίες κατά το καλοκαίρι και κατά τη χειμερινή περίοδο η θερμοκρασία πέφτει λίγο κάτω από τους 0^ο C. Η ελιά σαν δέντρο παρουσιάζει μεγάλη προσαρμοστικότητα σε πολλά είδη εδαφών και μεγάλη αντοχή σε συνθήκες έλλειψης νερού. Η καλλιέργεια της ελιάς μπορεί να αξιοποιήσει άγονα και επικλινή εδάφη όπου οι δυνατότητες άρδευσης είναι περιορισμένες και η καλλιέργεια άλλων οπωροφόρων δέντρων θα ήταν αδύνατη (**Loumou and Giourga, 2003; Luchetti, 2002; Therios, 2009; Ποντίκης, 2000**).

Το ελαιόλαδο και οι βρώσιμες ελιές είναι η κυρίαρχη πηγή υγιεινών λιπαρών οξέων της Μεσογειακής κουζίνας και θεωρούνται ‘υπερ-τροφές’, πλούσιες σε ευεργετικές ουσίες (**Vasto et al., 2014; Gerber and Hoffman, 2015; Martinez-Gonzalez et al., 2015**). Η αφθονία σε φαινολικές ενώσεις, όπως οι πολυφαινόλες (**Barbaro et al., 2014; Rigacci and Stefani, 2016**), είναι το επίκεντρο εκτενούς μελέτης για την αντιμικροβιακή, αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση τους (**Cicerale et al., 2012**). Επίσης, η κατανάλωση προϊόντων που προέρχονται από την ελιά έχουν συνδεθεί με το μειωμένο ρίσκο διαφόρων ασθενειών. Πολλές μελέτες έχουν αναδείξει τις προστατευτικές ιδιότητες των προϊόντων της ελιάς για καρδιαγγειακά νοσήματα (**Estruch et al., 2006; Estruch et al., 2013**), νευροεκφυλιστικές ασθένειες και ασθένειες που σχετίζονται με τη γήρανση (**Khalatbary 2013; Rodriguez-Morato et al., 2015**), και το διαβήτη (**Salas-Salvado et al.,**

2011, Salas-Salvado et al., 2014). Έχει επίσης παρατηρηθεί, ότι οι φαινολικές ενώσεις αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό και προάγουν την απόπτωση καρκινικών κυττάρων. Λόγω της αυξανόμενης γνώσης για τις προστατευτικές ιδιότητες του ελαιόλαδου η παγκόσμια κατανάλωση του έχει αυξηθεί περίπου 6 φορές τα τελευταία 30 χρόνια (Coni et al., 2000).

Το μεγαλύτερο ποσοστό των ελαιώνων παγκοσμίως καλλιεργείται στην λεκάνη της Μεσογείου κυρίως λόγω των άριστων εδαφοκλιματικών συνθηκών που επικρατούν στην περιοχή, οι οποίες και ευνοούν την ανάπτυξη του υποτροπικού είδους της ελιάς (Ποντίκης, 2000). Σύμφωνα με τη στατιστική υπηρεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης, το 2017 η περιοχή που καταλαμβάνει η καλλιέργεια της ελιάς εντός του χώρου της Ευρωζώνης ήταν 4,6 εκατομμύρια εκτάρια. Από αυτά το 55% καταλαμβάνει η Ισπανία, το 23% η Ιταλία, το 15% η Ελλάδα, το 7% η Πορτογαλία και οι Γαλλία, Κροατία, Κύπρος και Σλοβενία μοιράζονται 1% (Γράφημα II.1). Η Ελλάδα, προς το παρόν, κατέχει μία από τις πρώτες θέσεις τόσο στην παραγωγή όσο και στην κατανάλωση ελαιόλαδου και βρώσιμων ελιών, καθώς είναι η τρίτη παραγωγός χώρα μετά την Ισπανία και την Ιταλία, όσον αφορά το ελαιόλαδο και δεύτερη παραγωγός χώρα όσον αφορά τις επιτραπέζιες ελιές.



Γράφημα II.1. Ποσοστό καλλιεργούμενων εκτάσεων ελιάς με βάση την έκταση σε εκτάρια εντός της Ευρωπαϊκής Ένωσης, κατά το έτος 2017, σύμφωνα με τη στατιστική υπηρεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης.

Σύμφωνα με το Παγκόσμιο Συμβούλιο Ελαιόλαδου, την περίοδο 2017/2018 η παραγωγή ελαιόλαδου ήταν 2.949.000 τόνοι, με τους 2.219.000 τόνους να παράγονται εντός της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Πίνακας II.1.). Αντίστοιχα, η παραγωγή βρώσιμης ελιάς παγκοσμίως ήταν 2.616.000 τόνοι, με 865.000 τόνους να παράγονται εντός της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Οι εξαγωγές ελαιόλαδου, την ίδια περίοδο έφτασαν τους 796.000 τόνους παγκοσμίως, με 573.000 τόνους να προέρχονται από την Ε.Ε

(Πίνακας II.1.). Οι εξαγωγές βρώσιμης ελιάς έφτασαν τους 605.000 τόνους, με την Ε.Ε. να εξάγει 292.000 από αυτούς.

Η Ελλάδα την περίοδο 2017/2018 παρήγαγε 346.000 τόνους ελαιόλαδου και 261.000 τόνους βρώσιμης ελιάς. Από τους παραπάνω τόνους, 18.600 τόνοι ελαιόλαδου χρησιμοποιήθηκαν για εξαγωγή, ενώ για βρώσιμη ελιά 83.400 τόνοι (Πίνακας II.1.). Στην χώρα μας η καλλιέργεια της ελιάς καλύπτει ένα σημαντικό ποσοστό των δενδρωδών καλλιεργειών, γεγονός το οποίο την κάνει ιδιαίτερα σημαντική, αφού συμμετέχει σημαντικά στο Α.Ε.Π. της χώρας και προσφέρει ικανοποιητικό εισόδημα σχεδόν στο 1/3 του αγροτικού πληθυσμού της χώρας.

Η υψηλή διατροφική αξία των ελαιοκομικών προϊόντων, οι ευεργετικές τους ιδιότητες στην υγεία καθώς και η ευχάριστη κατανάλωσή τους, οδηγούν σε έντονα ανοδική τάση της κατανάλωσης τους σε παγκόσμιο επίπεδο. Όλο και περισσότερες χώρες εκτός της Μεσογειακής ζώνης εντάσσουν τα προϊόντα ελιάς στην διατροφή τους, όπως η Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής, ο Καναδάς, η Κίνα, χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης κ.α. Σύμφωνα με το Παγκόσμιο Συμβούλιο Ελαιόλαδου, την περίοδο 2017/2018, η κατανάλωση ελαιόλαδου παγκοσμίως έφτασε τους 2.084.000 τόνους, με 1.529.000 τόνους να καταναλώνονται εντός της Ε.Ε (Πίνακας II.1.). Αντίστοιχα η κατανάλωση βρώσιμης ελιάς έφτασε τους 1.970.000 τόνους σε όλο τον κόσμο, με 588.000 τόνους να καταναλώνονται εντός της Ε.Ε. Στη χώρα μας, την ίδια περίοδο, καταναλώθηκαν 130.000 τόνοι ελαιόλαδου και 16.000 τόνοι βρώσιμης ελιάς ((Πίνακας II.1.).

Η παγκόσμια αγορά για τα προϊόντα της ελιάς διευρύνεται, καθιστώντας την ελαιοκαλλιέργεια σαν σημαντική πηγή εσόδων για τις χώρες της μεσογείου και όχι μόνο. Η παραγωγή της ελιάς έχει επεκταθεί σε περιοχές εκτός της Ευρωπαϊκής ζώνης, αυξάνοντας την παραγωγή και τις καλλιεργούμενες εκτάσεις παγκοσμίως. Παρόλα αυτά, δεν είναι μόνο ο καρπός της ελιάς που την κάνει τόσο σημαντική και πολύτιμη για τον άνθρωπο. Για παράδειγμα, το ξύλο της θεωρείται ένα από τα καλύτερα καύσιμα, για την παραγωγή ξυλανθράκων. Ακόμα και το φύλλωμα του δέντρου είναι χρήσιμο, αφού αποτελεί δελεαστική τροφή για μηρυκαστικά ζώα.

Πίνακας Π.1. Παραγωγή, εξαγωγές και κατανάλωση ελαιόλαδου και βρώσιμης ελιάς, παγκοσμίως, στην Ευρωπαϊκή Ένωση και την Ελλάδα, κατά το έτος 2017/2018, σύμφωνα με το Παγκόσμιο Συμβούλιο Ελαιόλαδου (International Olive Council, IOC).

	Παραγωγή ελαιολάδου (τόνοι)	Παραγωγή βρώσιμης ελιάς (τόνοι)	Εξαγωγές ελαιολάδου (τόνοι)	Εξαγωγές βρώσιμης ελιάς (τόνοι)	Κατανάλωση ελαιολάδου (τόνοι)	Κατανάλωση βρώσιμης ελιάς (τόνοι)
Παγκοσμίως	2.949.000	2.616.000	796.000	605.000	2.084.000	1.970.000
Ευρωπαϊκή Ένωση	2.219.000	865.000	573.000	292.000	1.529.000	588.000
Ελλάδα	346.000	261.000	18.600	83.400	130.000	16.000

III. Βοτανική Ταξινόμηση και βοτανικά χαρακτηριστικά της ελιάς

Η ελιά είναι αιωνόβιο, αγγειόσπερμο, δικότυλο, αειθαλές δέντρο της τάξης των Scrophulariales και ανήκει στην οικογένεια *Oleaceae* και στο γένος *Olea*. Τα χαρακτηριστικά της οικογένειας των *Oleaceae* είναι ο μικρός ή ελλείπων κάλυκας, η άστροφη στεφάνη, οι δύο στήμονες και η δίχωρη ωοθήκη. Τα άνθη βρίσκονται σε ταξιανθία βότρυς (**Στεφανάκη - Νικηφοράκη, 1999**). Η καλλιεργούμενη ελιά ανήκει στο είδος *Olea europaea*, υποείδος *europaea*. Πιστεύεται ότι προήλθε από το είδος της *Olea europaea*, υποείδος *Sylvestris* (άγρια ελιά) και πλέον περιλαμβάνει ένα μεγάλο αριθμό βελτιωμένων ποικιλιών (**Therios, 2009; Ποντίκης, 2000**). Τα υποείδη το είδους *Olea europaea* που αναγνωρίζονται είναι 6 συνολικά (**Green, 2002**): α) *Olea europaea* subsp. *cuspidata*, το οποίο είναι ευρέως διαδεδομένο στη Νότια Αφρική, την Νότια Αίγυπτο και από το Πακιστάν ως την Κίνα, β) *Olea europaea* subsp. *laperrinei*, το οποίο βρίσκεται στους ορεινούς όγκους της Σαχάρας, γ) *Olea europaea* subsp. *maroccana*, που συναντάται στο Νότιο-Δυτικό Μαρόκο, δ) *Olea europaea* subsp. *guanchika*, που συναντάται στις Κανάριες Νήσους, ε) *Olea europaea* subsp. *cerasiformis*, που βρίσκεται στη Μαδέιρα, και στ) η καλλιεργήσιμη ελιά που είναι κοινή στην περιοχή της Μεσογείου, *Olea europaea* subsp. *europaea*. Τα περισσότερα υποείδη είναι διπλοειδή με $2n = 46$ χρωμοσώματα. Όμως, το είδος *O. europaea* subsp. *laperrinei* είναι κυρίως διπλοειδές με σχετικά συχνή τριπλοειδία, ενώ το subsp. *cerasiformis* είναι τετραπλοειδές και το subsp. *maroccana* είναι εξαπλοειδές (**Besnard et al., 2008; Besnard and Baali-Cherif, 2009**). Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά όπως ο καρπός, το ενδοκάρπιο και τα χαρακτηριστικά του φύλλου έχουν χρησιμοποιηθεί για την διαφοροποίηση μεταξύ ποικιλιών και άγριων μορφών (**Abdul Sadeg, 2014; Besnard et al., 2018**).

Η ελιά είναι ανθεκτική στην ξηρασία, αειθαλής, συνήθως με πολλούς βλαστούς και μπορεί να φτάσει τα 3 με 15 μέτρα ύψος. Η ανάπτυξη και το ύψος εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως

η ποικιλία, η ζωηρότητα του υποκειμένου, οι εδαφοκλιματικές συνθήκες και οι καλλιεργητικές τεχνικές. Έχει κυλινδρικό κορμό, ομαλό στα νεαρά δένδρα και ανώμαλο στα μεγαλύτερης ηλικίας. Ο φλοιός στα νεαρά ελαιόδεντρα είναι λείος και τεφροπράσινος, ενώ στα ενήλικα ρυτιδωμένος, φελλοειδής και χρώματος τεφρού ή σκοτεινού. Το ριζικό σύστημα μέχρι τον τρίτο ή τέταρτο χρόνο αναπτύσσεται κάθετα, αλλά αργότερα το αρχικό ριζικό σύστημα αντικαθίσταται από ένα άλλο θυσσανώδες που παράγεται από τους σφαιροβλάστες ή γόγγρους που σχηματίζονται στη βάση του κορμού των ελαιόδεντρων, στον λαιμό. Τα φύλλα της ελιάς είναι απλά, βραχύμισχα, λογχοειδή, λειοχέιλα, παχιά, δερματώδη και διατηρούνται πάνω στο δένδρο 2-3 χρονιά. Στην άνω επιφάνειά τους καλύπτονται από χυτίνη, ενώ στην κάτω φέρουν μεγάλο αριθμό τριχών, σχήματος ομπρέλας, οι οποίες τα προστατεύουν από την υπερβολική απώλεια νερού. Οι οφθαλμοί διακρίνονται σε ξυλοφόρους και μικτούς. Τα άνθη της ελιάς φέρονται κατά βοτρυώδεις ταξιανθίες. Ο καρπός είναι δρύπη σφαιρική ή ελλειψοειδής (Therios, 2009; Ποντίκης, 2000). Το είδος έχει μικρά άνθη λευκού χρώματος και μικρούς καρπούς (Kaniewski et al., 2012). Εκτός των καρπών, τα διαφορετικά υποείδη της ελιάς μπορούν να διαχωριστούν μορφολογικά από το μέγεθος και σχήμα του φύλου (Green, 2002).

IV. Ποικιλίες ελιάς και αγρονομικά χαρακτηριστικά ποικιλίας 'Καλαμών'

Υπολογίζεται ότι υπάρχουν σχεδόν 600 διαφορετικές καλλιεργήσιμες ποικιλίες του είδους *Olea europaea* L. subsp. *Europaea* και περίπου 1000 γονότυποι του είδους *Olea europaea* subsp. *sylvestris*. Η διαφοροποίηση και οι μέθοδοι κατηγοριοποίησης ποικίλουν ανάμεσα στους επιστημονικούς κύκλους. Οι γονότυποι της ελιάς διαφέρουν ως προς τα χαρακτηριστικά των κορμών και φύλλων, αλλά και ως προς τη μορφολογία καρπού-πυρήνα. Η διαφοροποίηση των γονοτύπων εξαρτάται επίσης σε μεγάλο βαθμό από τις επιδράσεις του εδάφους και του τοπικού μικροκλίματος.

Ο **Αναγνωστόπουλος (1939)** κατηγοριοποίησε τις διάφορες ελληνικές ποικιλίες ελιάς με βάση το βάρος των καρπών στις εξής κατηγορίες:

- Μικρόκαρπες (1,2 - 2,6 γραμμάρια)
- Μεσόκαρπες (2,7 - 4,2 γραμμάρια)
- Μεγαλόκαρπες (4,6 - 10,5 γραμμάρια)

Οι καρποί της πρώτης κατηγορίας συνήθως προορίζονται για παραγωγή ελαιόλαδου. Οι καρποί της δεύτερης κατηγορίας μπορούν να χρησιμοποιούν για παραγωγή ελαιόλαδου αλλά και ως βρώσιμοι και ονομάζονται διπλής χρήσης. Οι καρποί της τρίτης κατηγορίας χρησιμοποιούνται κυρίως ως βρώσιμες ελιές, γνωστές και ως επιτραπέζιες. Οι επιτραπέζιες ελιές διακρίνονται για το λεπτό φλοιό του καρπού τους, το σχετικά μεγάλο μέγεθός τους και την μεγάλη αναλογία σάρκας πυρήνα.

Μία από τις σημαντικότερες ποικιλίες αυτής της κατηγορίας είναι η ποικιλία ‘Καλαμών’. Η ποικιλία αυτή είναι μεγαλόκαρπη, και συναντάται με πολλές συνωνυμίες όπως: ‘Καλαματιανή’, ‘Αετονυχολιά’, ‘Χονδρολιά’ κ.α. Καλλιεργείται κυρίως στη Μεσσηνία, όπου θεωρείται ένα από τα σημαντικότερα κέντρα παρασκευής βρώσιμης ελιάς. Αναπτύσσεται σε δέντρο μεγάλου μεγέθους, είναι ορθόκλαδο και τα φύλλα της είναι πλατιά και σκληρά, με ισχυρό μίσχο μήκους 0.6-1 εκ., βαθυπράσινα, μήκους 8,48 εκ. περίπου και πλάτους 1,65 εκ. περίπου. Ο καρπός είναι επιμήκης και αιχμηρός, στενούμενος προς την κορυφή και με κύρτωση προς τη μία πλευρά, με μέσο βάρος 5,6 γρ. Ο πυρήνας έχει σχήμα παρόμοιο με τον καρπό, μέσο βάρος 0,60 γρ. και φέρει εννιά ως δέκα αβαθείς γλυφές. Η σχέση σάρκας-πυρήνα είναι 8,3:1 και η περιεκτικότητα του καρπού σε ελαιόλαδο κυμαίνεται γύρω στο 17% (Ποντίκης, 2000). Έχει υψηλές απαιτήσεις σε νερό και για αυτό ευδοκίμει σε περιοχές υψηλής ατμοσφαιρικής υγρασίας. Θεωρείται ποικιλία ανθεκτική στο *Verticillium dahliae* και στις προσβολές από *Bactrocera oleae*. Παρουσιάζει μέση ανθεκτικότητα στο ψύχος. Οι καρποί της ωριμάζουν από τον Νοέμβριο έως τον Δεκέμβριο. Η κύρια χρήση της είναι η παραγωγή επιτραπέζιας ελιάς πολύ υψηλής ποιότητας.



Εικόνα III.1. Καρπός ελιάς ποικιλίας ‘Καλαμών’, από την επιχείρηση πολλαπλασιαστικού Υλικού Hellenic Plants.

V. Ανάπτυξη Ελαιόκαρπου

Οι καρποί της ελιάς ταξινομούνται βοτανικά ως δρύπη και αποτελούνται από το περικάρπιο, το μεσοκάρπιο και το ενδοκάρπιο. Το συνολικό βάρος του καρπού καταλαμβάνεται κατά 70-90% από το μεσοκάρπιο, κατά 10-20% από το ενδοκάρπιο και 2-3% από το περικάρπιο. Κατά την διαδικασία της ανάπτυξης του καρπού πραγματοποιούνται μεταβολές στην σύσταση, το χρώμα, την υφή, το μέγεθος και την γεύση. Η ωρίμανση πραγματοποιείται με την συνδυαστική δράση βιοχημικών και φυσιολογικών μεταβολών, υπό γενετικό και περιβαλλοντικό έλεγχο (Connor and

Fereres, 2005). Ο καρπός της ελιάς αυξάνεται με διπλή σιγμοειδή καμπύλη και διαρκεί σχεδόν έξι μήνες. Τα στάδια ανάπτυξης του καρπού είναι: α) γονιμοποίηση και καρπόδεση, από την άνθηση και για περίπου 30 μέρες, β) ανάπτυξη σπέρματος, που πραγματοποιούνται έντονες κυτταροδιαίρεσεις, γ) σκλήρυνση ενδοκαρπίου, όπου πραγματοποιείται σκλήρυνση πυρήνα, δ) ανάπτυξη μεσοκαρπίου, όπου πραγματοποιείται μεγέθυνση του μεσοκαρπίου και συσσώρευση ελαίων, ε) ωρίμανση καρπού, όπου πραγματοποιούνται οι αλλαγές χρώματος και υφής και περαιτέρω συσσώρευση ελαίου (**Conde et al., 2008; Lavee, 1996; Therios, 2009; Ποντίκης, 2000**). Τη μεγαλύτερη διάρκεια καταλαμβάνει το πέμπτο στάδιο. Η κατάλληλη εποχή συγκομιδής, η ποικιλία καθώς και η χρήση τους καθορίζονται από τα χαρακτηριστικά του καρπού. Κατά την έναρξη της ωρίμανσης, ο καρπός αλλάζει χρώμα από σκούρο σε ανοιχτό πράσινο, ξεκινά η διαδικασία γαλακτώματος και ξεκινά η μείωση συνεκτικότητας. Σε αυτό το στάδιο συγκομίζονται οι καρποί που θα χρησιμοποιηθούν για επιτραπέζια χρήση. Στη συνέχεια συσσωρεύονται ανθοκυάνες που αλλάζουν το χρώμα του περικαρπίου σχηματίζοντας περιοχές κόκκινου χρώματος και έπειτα ιώδες και μαύρο χρώμα. Ταυτόχρονα η συνεκτικότητα του καρπού μειώνεται. Πριν την αλλαγή της σάρκας από λευκό σε ιώδες χρώμα συγκομίζονται οι ελιές που προορίζονται για παραγωγή ελαιόλαδου. Εάν συγκομιστούν μετά από αυτό το στάδιο η ποιότητα του ελαιόλαδου υποβαθμίζεται σημαντικά. Στο ίδιο στάδιο, πραγματοποιείται και η συγκομιδή καρπών που προορίζονται για επιτραπέζια χρήση όπως η ‘Καλαμών’ και επεξεργάζονται με την μέθοδο Ελληνικού τύπου. Για τον καθορισμό του κατάλληλου σταδίου ωριμότητας, ανάλογα με τη χρήση και την διατήρηση της μέγιστης ποιότητας προϊόντος χρησιμοποιείται ο δείκτης ωριμότητας (MI, Maturity Index). Σύμφωνα με το δείκτη ωριμότητας, οι καρποί ελιάς χωρίζονται σε οκτώ κατηγορίες με βάση το χρώμα περικαρπίου και σάρκας (**Vossen, 2006**). 1) Κατηγορία 0, σκούρο πράσινο χρώμα καρπού και συνεκτική υφή, 2) Κατηγορία 1, σκούρο πράσινο χρώμα καρπού και έναρξη μαλακώματος, 3) Κατηγορία 2, Κόκκινο ή ανοιχτό ιώδες χρώμα καρπού στο 50% της επιφάνειας, 4) Κατηγορία 3, Κόκκινο ή ανοιχτό ιώδες χρώμα σε περισσότερο του 50% του καρπού, 5) Κατηγορία 4, Μαύρο ή ιώδες χρώμα φλοιού και λευκό χρώμα σάρκας, 6) Κατηγορία 5, μαύρο χρώμα φλοιού και ιώδες χρώμα σάρκας σε λιγότερο του 50% του καρπού, 7) Κατηγορία 6, μαύρο χρώμα φλοιού και ιώδες χρώμα σάρκας σε περισσότερο του 50% της σάρκας και 8) Κατηγορία 7, μαύρο χρώμα καρπού και ιώδες χρώμα σάρκας.

Στο στάδιο συγκομιδής η σύσταση του μεσοκαρπίου είναι περίπου 60% νερό, 30% λάδι, 4% σάκχαρα, 3% πρωτεΐνες και το υπόλοιπο ποσοστό αποτελείται από φυτικές ίνες και ανόργανα στοιχεία. Στο στάδιο της πλήρους ωρίμανσης το ενδοκάρπιο είναι περίπου 10% υγρασία, 30% κυτταρίνες, 40% λιγνίνη και δομικοί υδατάνθρακες και 1% έλαια. Το σπέρμα αντίστοιχα είναι περίπου 30% υγρασία, 25% έλαια, 25% υδατάνθρακες και 10% πρωτεΐνες (**Connor and Fereres, 2005; Ποντίκης, 2000**). Η ελιά μπορεί να συνθέσει πολυόλες (όπως μανιτόλη), και ολιγοσακχαρίτες

(όπως ραφινόζη) και σακχαρόζη, μέσω της διαδικασίας της φωτοσύνθεσης. Οι υδατάνθρακες αυτοί μεταφέρονται από τα φύλλα στον καρπό για την πραγματοποίηση μεταβολικών αναγκών που είναι απαραίτητες για τη βιοσύνθεση του ελαίου (**Sanchez and Hardwood, 2002**). Τα σάκχαρα αποτελούν τις πρόδρομες ουσίες για τη βιοσύνθεση λιπιδίων και προϊόντων δευτερογενούς μεταβολισμού, όπως οι φαινολικές και οι πτητικές ουσίες, οι οποίες είναι υπεύθυνες, εν μέρη, για τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των προϊόντων και τις ευεργετικές τους ιδιότητες στην ανθρώπινη υγεία (**Conde et al, 2008**).

VI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 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.
- Bartolucci, P., Dhakal, B.R., (1999).** Prospects for olive growing in Nepal. Olive production development project (TCP/NEP/6713), Field document 1.
- Bartolini, G., & Petruccelli, R. (2002).** *Classification, origin, diffusion and history of the olive*. Food & Agriculture Org.
- Bekele, T. (2005).** Recruitment, survival and growth of *Olea europaea* subsp. *cuspidata* seedlings and juveniles in dry Afromontane forests of northern Ethiopia. *Tropical Ecology*, *46*(1), 113-126.
- Besnard, G., Garcia-Verdugo, C., Rubio de Casas, R., Treier, U. A., Galland, N., & Vargas, P. (2008).** Polyploidy in the olive complex (*Olea europaea*): evidence from flow cytometry and nuclear microsatellite analyses. *Annals of Botany*, *101*(1), 25-30.
- Besnard, G., Baali-Cherif, D., Bettinelli-Riccardi, S., Parietti, D., & Bouguedoura, N. (2009).** Pollen-mediated gene flow in a highly fragmented landscape: consequences for defining a conservation strategy of the relict Laperrine's olive. *Comptes rendus biologiques*, *332*(7), 662-672.
- Besnard, G., Terral, J. F., & Cornille, A. (2018).** On the origins and domestication of the olive: a review and perspectives. *Annals of botany*, *121*(3), 385-403.
- Cicerale, S., Lucas, L. J., & Keast, R. S. J. (2012).** Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory phenolic activities in extra virgin olive oil. *Current opinion in biotechnology*, *23*(2), 129-135.
- Conde, C., Delrot, S., & Gerós, H. (2008).** Physiological, biochemical and molecular changes occurring during olive development and ripening. *Journal of plant physiology*, *165*(15), 1545-1562.
- Coni, E., Di Benedetto, R., Di Pasquale, M., Masella, R., Modesti, D., Mattei, R., & Carlini, E. A. (2000).** Protective effect of oleuropein, an olive oil biophenol, on low density lipoprotein oxidizability in rabbits. *Lipids*, *35*(1), 45-54.
- Connor, D. J., & Fereres, E. (2005).** The physiology of adaptation and yield expression in olive. *Horticultural reviews*, *31*, 155-229.
- Covas, M. I. (2007).** Olive oil and the cardiovascular system. *Pharmacological Research*, *55*(3), 175-186.
- Damania, A.B. (1995).** Olive, the plant of peace, reigns throughout Mediterranean. *Diversity*, *11*: 131-132.
- Estruch, R., Martínez-González, M. A., Corella, D., Salas-Salvadó, J., Ruiz-Gutiérrez, V., Covas, M. I., ... & Arós, F. (2006).** Effects of a Mediterranean-style diet on cardiovascular risk factors: a randomized trial. *Annals of internal medicine*, *145*(1), 1-11.
- Estruch, R., Ros, E., Salas-Salvadó, J., Covas, M. I., Corella, D., Arós, F., ... & Lamuela-Raventos, R. M. (2018).** Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet supplemented with extra-virgin olive oil or nuts. *New England journal of medicine*, *378*(25), e34.
- Fooks, R. (1995).** *Το βιβλίο της ελιάς*. Εκδόσεις Ψύχαλου, Αθήνα.
- Friedrich, W.L. & Velitzelos, E. (1986).** Bemerkungen zur spatquartaren flora von Santorin (Griechenland). *Cour. Forsch. Inst. Senckenberg*, *86*: 387-395. Frankfurt.

- Gerber, M., & Hoffman, R.** (2015). The Mediterranean diet: health, science and society. *British Journal of Nutrition*, 113(S2), S4-S10.
- Green, P. S.** (2002). A revision of *Olea L.* (Oleaceae). *Kew Bulletin*, 91-140.
- Kaniewski, D., Van Campo, E., Boiy, T., Terral, J. F., Khadari, B., & Besnard, G.** (2012). Primary domestication and early uses of the emblematic olive tree: palaeobotanical, historical and molecular evidence from the Middle East. *Biological Reviews*, 87(4), 885-899.
- Khalatbary, A. R.** (2013). Olive oil phenols and neuroprotection. *Nutritional neuroscience*, 16(6), 243-249.
- Lavee, S.**, (1996). Biology and physiology of the olive, World Olive Encyclopedia, pp. 59-106.
- Loumou, A., & Giourga, C.** (2003). Olive groves: ``The life and identity of the Mediterranean''. *Agriculture and Human Values*, 20(1), 87-95.
- Luchetti, F.**, 2002. Importance and future of olive oil in the world market — an introduction to olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology* 104, 559-563.
- Martínez-González, M. A., Salas-Salvadó, J., Estruch, R., Corella, D., Fitó, M., Ros, E., & Predimed Investigators.** (2015). Benefits of the Mediterranean diet: insights from the PREDIMED study. *Progress in cardiovascular diseases*, 58(1), 50-60.
- Nanos, G. D., Kiritsakis, A. K., & Sfakiotakis, E. M.** (2002). Preprocessing storage conditions for green ‘Conservolea’ and ‘Chondrolia’ table olives. *Postharvest biology and technology*, 25(1), 109-115.
- Rigacci, S., & Stefani, M.** (2016). Nutraceutical properties of olive oil polyphenols. An itinerary from cultured cells through animal models to humans. *International journal of molecular sciences*, 17(6), 843.
- Rodríguez-Morató, J., Xicota, L., Fitó, M., Farre, M., Dierssen, M., & De la Torre, R.** (2015). Potential role of olive oil phenolic compounds in the prevention of neurodegenerative diseases. *Molecules*, 20(3), 4655-4680.
- Rubio, R., Balaguer, L., Manrique, E., Pérez, M. E., & Vargas, P.** (2002). On the historical presence of the wild olive [*Olea Europaea L. var. Sylvestris* (Miller): Lehr. (Oleaceae)] in the Eurosiberian region of the Iberian Peninsula. In *Anales del Jardín Botánico de Madrid* (Vol. 59, No. 2, pp. 342-344). Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
- Sadeg, S. A.** (2014). *Morphological and molecular characterization of Libyan olive, Olea europaea L., cultivars (42 local and 16 wild type) in comparison to 41 introduced (world) cultivars* (Doctoral dissertation, Colorado State University).
- Salas-Salvadó, J., Bulló, M., Babio, N., Martínez-González, M. Á., Ibarrola-Jurado, N., Basora, J., ... & Ruiz-Gutiérrez, V.** (2011). Reduction in the incidence of type 2 diabetes with the Mediterranean diet: results of the PREDIMED-Reus nutrition intervention randomized trial. *Diabetes care*, 34(1), 14-19.
- Salas-Salvadó, J., Bulló, M., Estruch, R., Ros, E., Covas, M. I., Ibarrola-Jurado, N., ... & Romaguera, D.** (2014). Prevention of diabetes with Mediterranean diets: a subgroup analysis of a randomized trial. *Annals of internal medicine*, 160(1), 1-10.
- Sanchez, J., Harwood, J.**, (2002). Biosynthesis of triacylglycerols and volatiles in olives. *European Journal of Lipid Science and Technology* 104, 564 - 573.
- Therios, I.N.**, (2009). Olives. CABI.
- Vasto, S., Barera, A., Rizzo, C., Di Carlo, M., Caruso, C., & Panotopoulos, G.** (2014). Mediterranean diet and longevity: an example of nutraceuticals?. *Current vascular pharmacology*, 12(5), 735-738.

Visioli, F., Bellomo, G., & Galli, C. (1998). Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochemical and biophysical research communications*, 247(1), 60-64.

Vossen, P., (2006). Olive Maturity Index. University of California, UC Cooperative Extension Sonoma County, Berkeley, California.

Αναγνωστόπουλος, (1939). *Αι ποικιλίαι και η οικολογία της Ελληνικής Ελαίας*. Εκδόσεις Λαμπρόπουλος. Αθήνα.

Μπαλατσούρας, Γ.Δ. (1994). *Το ελαιόδενδρο*. Τόμος, Εκδόσεις Πελεκάνος, Αθήνα.

Ποντίκης, Κ.Α., (2000). Ειδική Δενδροκομία. Ελαιοκομία, Ειδική Δενδροκομία, Β' Έκδοση ed. Εκδόσεις Σταμούλης, Αθήνα.

Στεφανάκη-Νικηφοράκη, . (1999). *Συστηματική Βοτανική*. Εκδόσεις Σταμούλης. Αθήνα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Προσδιορισμός και ποσοτικοποίηση φαινολικών ενώσεων σε φρέσκους και επεξεργασμένους καρπούς ελιάς ποικιλίας ‘Καλαμών’.

Περίληψη

Η Μεσογειακή διατροφή είναι σχεδόν συνώνυμη με τον υγιεινό τρόπο ζωής και διατροφής στις μέρες μας. Μερικά από τα κύρια συστατικά της διατροφής, είναι τα προϊόντα της ελιάς, οι καρποί και το ελαιόλαδο, τα οποία ταξινομούνται ως ευεργετικές για την ανθρώπινη υγεία τροφές, λόγω των θρεπτικών πλεονεκτημάτων και των προστατευτικών τους ιδιοτήτων κατά του καρκίνου, των καρδιαγγειακών παθήσεων, των ασθενειών που σχετίζονται με την ηλικία, των νευροεκφυλιστικών διαταραχών και πολλών ασθενειών. Οι κύριες ενώσεις που συνεισφέρουν σε αυτές τις ιδιότητες και στην πικράδα της ελιάς είναι οι φαινολικές ενώσεις και τα σχετικά προϊόντα υδρόλυσης τους, όπως η υδροξυτυροσόλη, η τυροσόλη και η ελευρωπαΐνη. Σκοπός της έρευνας ήταν ο προσδιορισμός και η ποσοτικοποίηση των κύριων φαινολικών ενώσεων σε φρέσκους και επεξεργασμένους καρπούς ελιάς ποικιλίας ‘Καλαμών’. Οι φαινολικές ενώσεις μετρήθηκαν σε δείγματα φρέσκων καρπών, σε δείγματα επεξεργασμένων καρπών με την ισπανική μέθοδο επεξεργασίας και σε δείγματα επεξεργασμένων καρπών με την ελληνική μέθοδο επεξεργασίας. Οι μέθοδοι επεξεργασίας του καρπού της ελιάς έχουν στόχο τη μείωση της συγκέντρωσης της ελευρωπαΐνης, η επίδραση όμως της επεξεργασίας των καρπών στο προφίλ και στη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων και των προϊόντων υδρόλυσης τους δεν έχει μελετηθεί εκτενώς και σε όλες τις ποικιλίες. Η ποσοτικοποίηση των φαινολικών ενώσεων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση δύο διαφορετικών αναλυτικών μεθόδων με υψηλή ευαισθησία και επιλεκτικότητα, τις LS-MS/MS και HPLC-(DAD). Η ποσοτικοποίηση των κύριων φαινολικών ενώσεων, όπως και των προϊόντων υδρόλυσης τους, ως απόκριση στον τρόπο επεξεργασίας, έχει τη δυνατότητα να παράσχει μεγαλύτερη κατανόηση των μεταβολών των φαινολικών ενώσεων κατά την επεξεργασία του ελαιόκαρπου. Οι φαινολικές ενώσεις που μελετήθηκαν ήταν οι: υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη, λουτεολίνη, ρουτίνη, ελευρωπαΐνη, βερμπασκοζίτης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η επεξεργασία του ελαιόκαρπου, και με τις δύο μεθόδους, επηρέασε τη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων που μελετήθηκαν. Η συγκέντρωση της υδροξυτυροσόλης και του βερμπασκοζίτη αυξήθηκε σημαντικά κατά την επεξεργασία των καρπών και με τους δύο τρόπους επεξεργασίας ενώ η συγκέντρωση της ρουτίνης μειώθηκε σημαντικά. Οι επεξεργασμένοι με την Ελληνική μέθοδο επεξεργασίας καρποί παρουσίασαν υψηλότερη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων υδροξυτυροσόλης και βερμπασκοζίτη, σε σύγκριση με τους επεξεργασμένους με την Ισπανική μέθοδο επεξεργασίας καρπούς. Στους φρέσκους

καρπούς, σε υψηλότερη συγκέντρωση βρέθηκε η ρουτίνη, ενώ στους επεξεργασμένους καρπούς ο βερμπασκοζίτης.

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1.1. Φαινολικές Ενώσεις – Ορισμός και βιοσύνθεση

Τα φυτικά προϊόντα είναι αστείρευτη πηγή βιοενεργών ουσιών που τα τελευταία χρόνια έχουν αποκτήσει τεράστιο ενδιαφέρον για τη θεραπευτική τους χρήση. Η επιστημονική κοινότητα έχει επικεντρωθεί στην αναζήτηση ουσιών από φυτικά εκχυλίσματα για την πρόληψη και καταπολέμηση μεγάλου αριθμού ασθενειών. Ενδεικτικά, αναφέρεται ότι το 50% των φαρμάκων που στοχεύουν στην καταπολέμηση του καρκίνου προέρχονται άμεσα ή έμμεσα από φυτικά προϊόντα (**Kingston, 2011**). Από τα εκατοντάδες χιλιάδες είδη ανώτερων φυτών, υπολογίζεται ότι μόνο ένα μικρό μέρος, περίπου 10%, έχει μελετηθεί ως προς τη σύστασή του. Από τα χιλιάδες φυτικά προϊόντα, τα προϊόντα της ελιάς, καρποί και ελαιόλαδο, κατέχουν ιδιαίτερα σημαντικό κοινωνικό και οικονομικό ρόλο στις χώρες της μεσογείου και αποτελούν βασικό συστατικό της Μεσογειακής διατροφής, η οποία έχει υψηλή περιεκτικότητα σε ουσίες όπως βιταμίνες και πολυφαινόλες. Από τις βιοενεργές ουσίες, οι φαινολικές ενώσεις τα τελευταία χρόνια έχουν κερδίσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, κυρίως λόγω της αντιοξειδωτικής και αντιφλεγμονώδους δράσης τους. Οι φαινολικές ενώσεις προέρχονται βιοσυνθετικά από τον μεταβολισμό πρωτογενών προϊόντων, όπως υδατάνθρακες, λίπη, αμινοξέα. Ονομάζονται δευτερογενή προϊόντα λόγω της βιοσύνθεσης τους μέσω του δευτερογενούς μεταβολισμού και συνδέονται στενά με την λειτουργία βασικών αμυντικών μηχανισμών των φυτών, και την αλληλεπίδραση τους με το περιβάλλον.

Το σύνολο των φαινολικών ενώσεων που εμφανίζονται στα φυτικά προϊόντα είναι τεράστιο και αξίζει να σημειωθεί πως, μόνο στην κατηγορία των φλαβονοειδών, έχουν ταυτοποιηθεί από φυτά πάνω από 8.000 ενώσεις (**Lattanzio et al., 2006**). Ως φαινολική ένωση, χαρακτηρίζεται μια κατηγορία χημικών ενώσεων που η δομή τους χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη ενός αρωματικού δακτυλίου, ο οποίος φέρει μία ή περισσότερες προς αντικατάσταση υδροξυλομάδες συμπεριλαμβανομένων και των παραγόντων τους (εστέρες, μεθυλεστέρες κ.α.). Έτσι ως φαινολικές ενώσεις χαρακτηρίζονται οι ενώσεις που προέρχονται από μεταβολικά μονοπάτια του σικιμικού οξέος και του φαινυλοπροπανίου (**Ryan et al., 1999**). Η χημική τους δομή κυμαίνεται από πολύ απλές ενώσεις όπως το καφεϊκό οξύ, μέχρι υψηλού πολυμερισμού και μεγάλου μοριακού βάρους ενώσεις όπως οι τανίνες. Απαντώνται συνήθως με μορφή γλυκοζιτών, με ένα ή περισσότερα σάκχαρα σαν υποκαταστάτες υδροξυλομάδας ή άμεσα συνδεδεμένες με άτομο άνθρακα του αρωματικού δακτυλίου ή ως αγλυκόνες. Το τμήμα υδατάνθρακα μπορεί να είναι μονοσακχαρίτης, δισακχαρίτης

ή ολιγοσακχαρίτης. Το σάκχαρο που συναντάται πιο συχνά σαν υποκαταστάτης είναι η γλυκόζη, αλλά απαντώνται επίσης τα σάκχαρα γαλακτόζη, ραμνόζη, ξυλόζη, αραβινόζη, γλυκουρονικό και γαλακτουρονικό οξύ. Επίσης, οι πολυφαινόλες μπορεί να είναι ενωμένες με καρβοξυλικά και οργανικά οξέα, αμίνες και λιπίδια.

Το πρόδρομο μόριο των περισσότερων φαινολικών ενώσεων είναι η φαινυλαλανίνη, που συντίθεται μέσω της βιοσυνθετικής οδού του σικιμικού οξέος. Ο σκελετός άνθρακα πολυπλοκότερων φαινολικών μορίων συναρμολογείται από απλούστερες δομικές μονάδες που προέρχονται από διαφορετικές βιοσυνθετικές οδούς του πρωτογενούς μεταβολισμού. Στη βιοσύνθεση των φλαβονοειδών και συναφών μορίων, συνεργάζονται οι βιοσυνθετικές οδοί του σικιμικού και μαλονικού οξέος. Η οξύτητα των φαινολικών υδροξυλομάδων, που οφείλεται στην τάση διάσπασης του δεσμού οξυγόνου και υδρογόνου με σχηματισμό αρνητικά φορτισμένου ιόντος φαινοξειδίου, είναι μία από τις πιο σημαντικές ιδιότητες των φαινολικών υδροξυλομάδων. Επιπλέον, εξίσου σημαντικές ιδιότητες των φαινολικών είναι:

α. Η δυνατότητα απεντοπισμού του ιόντος φαινοξειδίου, δηλαδή η κίνηση του αρνητικού φορτίου στον αρωματικό δακτύλιο και ο σχηματισμός ημικινονικών ανιόντων όπου το φορτίο βρίσκεται σε άτομο άνθρακα αντί σε άτομο οξυγόνου. Τέτοια αρνητικά φορτισμένα κέντρα μπορούν να έλκουν θετικά φορτισμένες αλκυλικές ομάδες.

β. Η δυνατότητα του ιόντος φαινοξειδίου να αποβάλει ένα ακόμα ηλεκτρόνιο και να σχηματίσει μια ρίζα που επίσης εμφανίζει το φαινόμενο του απεντοπισμού. Δύο τέτοιες ρίζες μπορούν να ακολουθήσουν μια διαδικασία γνωστή ως οξειδωτική σύζευξη όπου σχηματίζονται ομοιοπολικοί δεσμοί άνθρακα - άνθρακα ή άνθρακα - υδρογόνου.

γ. Η ικανότητα της φαινολικής να σχηματίσει δεσμούς υδρογόνου με άλλα μόρια με αλληλεπίδραση του όξινου (θετικά φορτισμένου) φαινολικού υδρογόνου και βασικών (αρνητικά φορτισμένων) κέντρων των άλλων μορίων.

1.1.2. Κατηγορίες φαινολικών ενώσεων

Η βιβλιογραφία περιλαμβάνει αρκετούς τρόπους διαφοροποίησης των φαινολικών ενώσεων. Έχουν κατηγοριοποιηθεί με βάση τα άτομα άνθρακα στο μόριο τους (**Urquiaga and Leighton, 2000**), αλλά και με βάση τη χημική δομή του μορίου τους και το είδος του ανθρακικού σκελετού (**Scalbert and Williamson, 2000**). Ακόμη έχουν κατηγοριοποιηθεί με βάση τον αριθμό αρωματικών δακτυλίων που περιέχουν. Με βάση αυτό τον τρόπο διαφοροποίησης, διακρίνονται σε απλές φαινόλες, με έναν φαινολικό δακτύλιο ή σε πολυφαινόλες, με περισσότερους από έναν φαινολικούς δακτυλίους. Είναι

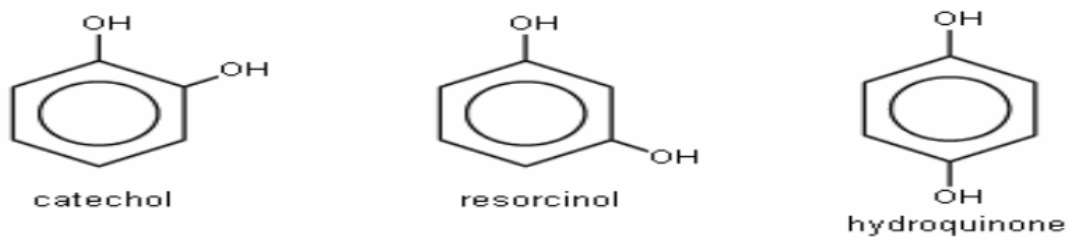
μόρια που έχουν μια ή περισσότερες υδροξυλικές ομάδες σε δεσμό με το άτομο του άνθρακα του φαινολικού δακτύλιου. Οι απλές φαινόλες διαχωρίζονται σε φαινολικά οξέα και κουμαρίνες. Οι πολυφαινόλες σε φλαβονοειδή (δύο αρωματικοί δακτύλιοι) και τανίνες (τρεις ή περισσότεροι αρωματικοί δακτύλιοι) (Robbins, 2003; Lee and Widmer, 1996). Επιπλέον, διαχωρίζονται σε σεκοϊριδοειδείς ενώσεις, οι οποίες απαντώνται αποκλειστικά σε φυτά της οικογένειας *Oleaceae* (Soler-Rivas et al., 2000).

Πίνακας 1.1. Κατηγοριοποίηση των φαινολικών ενώσεων με βάση τον αριθμό ατόμων άνθρακα στο μόριο τους (Urquiaga & Leighton, 2000).

Αριθμός ατόμων άνθρακα	Βασικός ανθρακικός σκελετός	Κατηγορία φαινολικών ενώσεων	Παραδείγματα ενώσεων
6	C6	Απλές φαινολικές ενώσεις	Catechol, hydroquinone 2,6-Dimethoxybenzoquinone
7	C6-C1	Φαινολικά οξέα και αλδεύδες	Gallic, salicylic
8	C6-C2	Ακετοφαινόλες, Παράγωγα οξικού φαινυλίου	-Acetyl-6- methoxybenzaldehyde Tyrosol, p-Hydroxyphenylacetic
9	C6-C3	Παράγωγα υδροξυκιναμικού φαινυλοπροπανίου	Caffeic, ferulic Myristicin, eugenol Umbelliferone, aesculetin Bergenon Eugenin
10	C6-C4	Ναφθοκινόνες	Juglone, plumbagin
13	C6-C1-C6	Ξανθόνες	Mangiferin
14	C6-C2-C6	Στιλβένια, Ανθρακινόνες	Resveratrol Emodin
15	C6-C3-C6	Φλαβονοειδή	Quercetin, cyanidin Genistein
18	(C6-C3) ₂	Λιγνάνες, Νεολιγνάνες	Pinoresinol Eusiderin
30	(C6-C3-C6) ₂	Διφλαβονοειδή	Amentoflavone
N	(C6) _n	Μελανίνες της κατεχόλης	
N	(C6-C3) _n	Λιγνίνες	
N	(C6-C3-C6) _n	Τανίνες	

1.1.2.1. Απλές φαινολικές ενώσεις

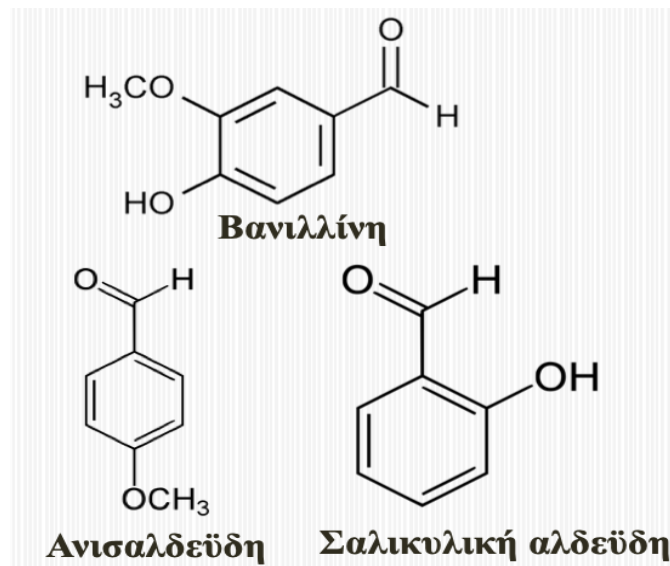
Οι απλές φαινολικές ενώσεις αποτελούνται από ένα αρωματικό δακτύλιο που φέρει μία ή περισσότερες υδροξυλικές ομάδες (Σχήμα 1). Στην κατηγορία αυτή ανήκουν η υδροκινόνη και η κατεχόλη. Η υδροκινόνη είναι αξιόλογος λευκαντικός, φαρμακευτικός και καλλυντικός παράγοντας, ενώ η κατεχόλη αποτελεί συχνά μέρος πιο σύνθετων μορίων.



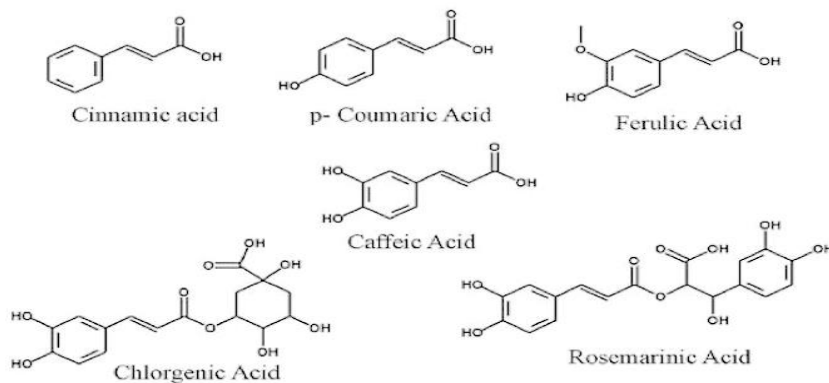
Σχήμα 1.1. Απλές φαινολικές ενώσεις

1.1.2.2. Φαινολικά Οξέα

Στα φαινολικά οξέα ο αρωματικός δακτύλιος φέρει ως υποκαταστάτες καρβοξυλικό οξύ (παράγωγα βενζοϊκού οξέος με σκελετό C₆-C₁), προπενικό οξύ (παράγωγα κινναμωμικού οξέος με σκελετό C₆-C₃) ή αλδευδομάδα. Υδροβενζοϊκά παράγωγα, όπως γαλλικό, σαλικυλικό ή βανιλλικό οξύ, είναι απλές φαινολικές ενώσεις που φέρουν μία καρβοξυλική ομάδα. Από τις πιο σημαντικές φαινολικές αυτής της κατηγορίας είναι το γαλλικό οξύ (**Vermerris and Nicholson, 2008**) και αποτελεί το κύριο συστατικό των υδρολυώμενων τανινών (**Strack, 1997**). Τα φαινολικά οξέα μπορούν να ενωθούν με ενώσεις που περιέχουν υδροξυλομάδες (φαινόλες ή αλκοόλες) και να σχηματίσουν εστέρες (**Shahidi, 2000**). Τα παράγωγα C₆-C₃ και C₆-C₁ βρίσκονται είτε σε ελεύθερη μορφή, λιγότερο συχνά, ή δεσμευμένα με συστατικά του φυτού όπως πρωτεΐνες, κυτταρίνη, και οργανικά μόρια όπως γλυκόζη, οργανικά οξέα και τερπένια. Συναντώνται σε όλα τα μέρη του φυτού, σπόρους, άνθη, φύλλα, βλαστό κτλ (**Strack, 1997**). Τα παράγωγα C₆-C₃ φέρουν ένα αρωματικό σύστημα στο οποίο είναι προσκολλημένη μία πλευρική αλυσίδα από τρία άτομα άνθρακα. Σε αυτά ανήκουν τα κινναμωμικά οξέα, κινναμωμικές αλδεύδες, κινναμωμικές αλκοόλες. Οι ενώσεις της κατηγορίας αυτής ονομάζονται φαινυλοπροπένια ή φαινυλοπροπάνια, ανάλογα με την ύπαρξη ή απουσία διπλού δεσμού στον τρίτο άνθρακα. Στην κατηγορία των υδροξυκινναμωμικών οξέων (**Σχήμα 1.3.**), περιλαμβάνεται το καφεϊκό, το π-κουμαρικό και το φερουλικό οξύ. Το καφεϊκό οξύ απαντάται κυρίως με την εστεροποιημένη του μορφή και καλείται χλωρογενικό οξύ, ενώ το π-κουμαρικό αποτελεί την πρόδρομη ένωση για τη δημιουργία φλαβονοειδών (**Σχήμα**). Από τα υδροξυκινναμωμικά οξέα προκύπτουν ενώσεις όπως η κονιφερυλική αλκοόλη και ευγενόλη. Η κονιφερυλική αλκοόλη αποτελεί τον πυρήνα για το σχηματισμό λιγνίνης ή φαινολικών πολυμερών υψηλού μοριακού βάρους. Τα υδροξυβενζοϊκά και τα υδροξυκινναμωμικά οξέα μπορούν να εστεροποιούν φαινόλες (**Shahidi, 2000**).



Σχήμα 1.2. Παράγωγα βενζοϊκού οξέος



Σχήμα 1.3. Παράγωγα υδροξυκιναμμωμικού οξέος

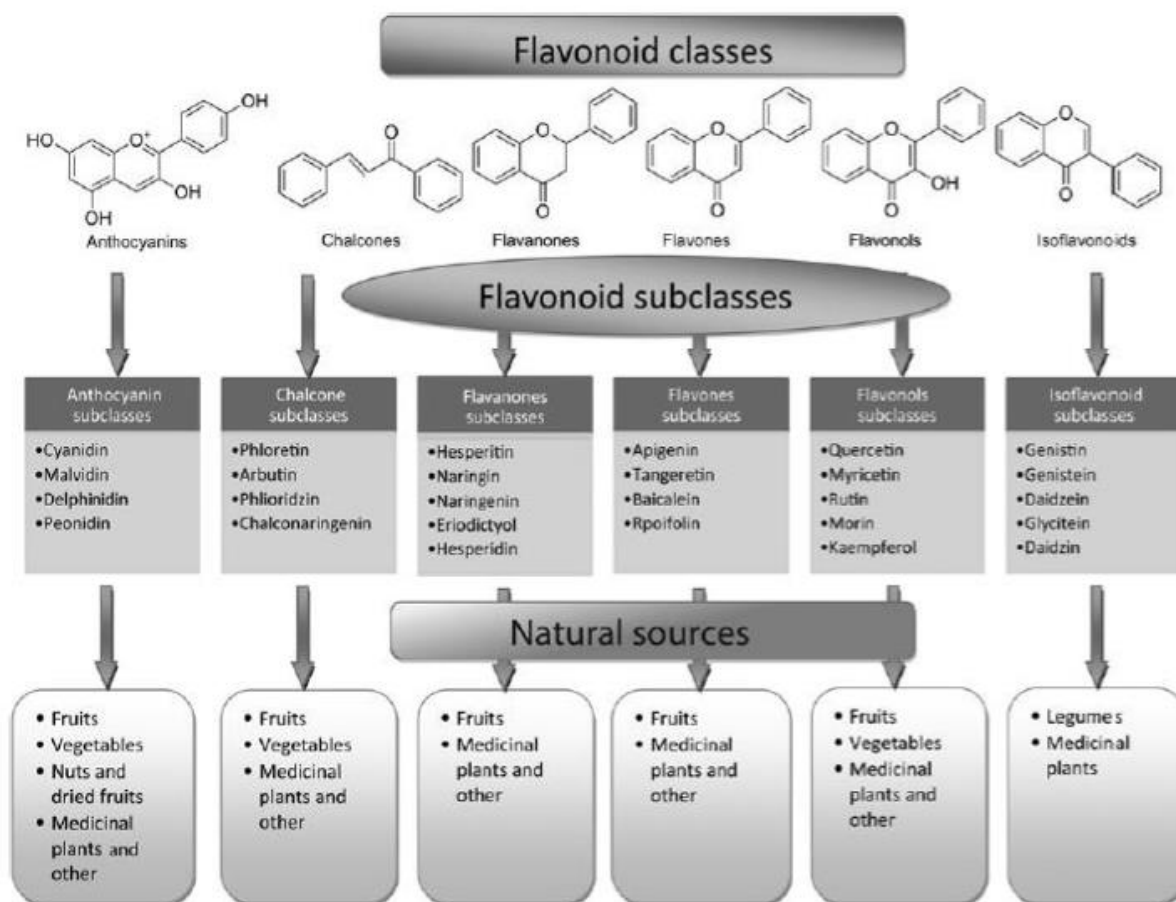
1.1.2.3. Σύνθετες φαινολικές ενώσεις

Στις σύνθετες φαινολικές ενώσεις περιλαμβάνονται: οι λιγνάνες, οι οποίες είναι προϊόντα διμερισμού δύο πρόδρομων ενώσεων φαινυλοπροπανίων, οι κουμαρίνες, οι οποίες θεωρούνται παράγωγα της βενζο-α-πυρόνης ή λακτόνες του 0-υδροξυκιναμμωμικού οξέος και οι χρωμόνες, που θεωρούνται παράγωγα της βενζο-4-πυρόνης.

1.1.2.4. Φλαβονοειδή

Η πιο κοινή και διαδεδομένη ομάδα φαινολικών στο φυτικό βασίλειο είναι τα φλαβονοειδή. Τα φλαβονοειδή θεωρούνται παράγωγα της βενζο-γ-πυρόνης (Heim et al., 2002). Φέρουν ένα αρωματικό δακτύλιο A, έναν αρωματικό δακτύλιο B και έναν κεντρικό ετεροδακτύλιο C, που αποτελείται από τρεις άνθρακες και φέρει οξυγόνο (Harborne, 1980). Η συνένωση δύο προϊόντων, προερχόμενων από δύο διαφορετικά μονοπάτια, αποτελεί την δομή των φλαβονοειδών. Ο

αρωματικός δακτύλιος B και η γέφυρα τριών ατόμων άνθρακα είναι μια φαινυλοπροπανική μονάδα που προέρχεται από το μονοπάτι του σικιμικού οξέος ενώ τα έξι άτομα άνθρακα του δακτυλίου A προέρχονται από το μονοπάτι του μαλονικού οξέος (Crozier et al., 2000). Τα φλαβονοειδή ταξινομούνται σε κατηγορίες ανάλογα με το βαθμό οξειδωσης του ετεροκυκλικού δακτυλίου και τη θέση των υποκατεστημένων υδροξυλομάδων στους δακτυλίους (Heim et al., 2002). Η συνηθέστερη μορφή που συναντώνται τα φλαβονοειδή είναι υπό τη μορφή γλυκοζιτών. Με τη μορφή γλυκοζιτών, τα φλαβονοειδή είναι περισσότερο υδατοδιαλυτά και λιγότερο ενεργά απέναντι στις ελεύθερες ρίζες. Το σάκχαρο με το οποίο τα φλαβονοειδή αντιδρούν και σχηματίζουν γλυκοζίτες συνηθέστερα είναι η γλυκόζη. Επίσης σάκχαρα όπως η γαλακτόζη, η ραμνόζη, η ξυλόζη και η αραβινόζη και δισακχαρίτες όπως η ρουτινόζη εμπλέκονται συνήθως στο σχηματισμό γλυκοζιτών (Cook and Samman, 1996; Urquiza and Leighton, 2000). Επιπλέον, δρουν ως ισχυρά αντιοξειδωτικά απέναντι στις ελεύθερες ρίζες λόγω παρουσίας ιδανικής χημικής δομής. Σε μοριακή βάση, έχει αποδειχθεί *in vitro* τα φλαβονοειδή έχουν πιο αποτελεσματική αντιοξειδωτική δράση από τις βιταμίνες E και C (Rice-Evans et al., 1997). Η συσσώρευση των φλαβονοειδών προκύπτει κυρίως στα επιδερμικά κύτταρα των φυτικών οργάνων όπως τα φύλλα, τα άνθη, οι καρποί, οι ρίζες κ.α., με ποικίλες δραστηριότητες όπως ο χρωματισμός των ανθέων από τις ανθοκυάνες ή η άμυνα του φυτού έναντι εχθρών και μικροοργανισμών.



Σχήμα 1.4. Κατηγορίες, ταξινόμηση και πηγές φλαβονοειδών.

1.1.2.5. Τανίνες

Τα κύρια είδη τανινών είναι οι φλοροτανίνες, οι υδρολυώμενες τανίνες και οι συμπυκνωμένες τανίνες. Ο σχηματισμός των φλοροτανινών γίνεται με πολυμερισμό της φλορογλυκινόλης ή από μονάδες φλορογλυκινόλης που έχουν υποκατασταθεί από αλογόνα. Ο πολυμερισμός απλών κατεχινών ή γαλλοκατεχινών δίνει συμπυκνωμένες τανίνες. Οι υδρολυώμενες τανίνες περιλαμβάνουν δύο τάξεις, τους εστέρες γλυκόζης με γαλλικό οξύ και εστέρες γλυκόζης με ένα διμερές γαλλικού οξέος. Οι τανίνες χαρακτηρίζονται για την ιδιότητα δέσμευσης πρωτεϊνών με αποτέλεσμα την μείωση της βιοδιαθεσιμότητας των πρωτεϊνών.

1.1.2.6. Σεκοϊριδοειδείς Ενώσεις

Ο δευτερογενής μεταβολισμός των τερπενίων δίνει γλυκοζυλιόμενες ενώσεις, πρόδρομες πολλών αλκαλοειδών, τα σεκοϊριδοειδή (Soler-Rivas et al., 2000). Μία από τις κυριότερες ενώσεις αυτής της κατηγορίας είναι η ελευρωπαϊνή η οποία είναι παρούσα σε όλα τα φυτά της οικογένειας Oleaceae. Αποτελεί την κύρια πολυφαινολική ένωση της ελιάς, ως σεκοϊριδοειδής γλυκοζίτη, από όπου πήρε και την ονομασία της. Υδρολύεται σε υδροξυτυροσόλη και γλυκοζίτη του ελενολικού οξέος ή σε άγλυκο της ελευρωπαϊνης και γλυκόζη (Manna et al., 2004). Ο ρόλος της στο φυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικός, κυρίως λόγω της προστατευτικής αντιοξειδωτικής δράσης της, προστατεύει τις ελιές από παθογόνα και έντομα, με διάφορους μηχανισμούς. Η βιοσύνθεση της ελευρωπαϊνης γίνεται μέσω διακλάδωσης στο μονοπάτι του μεβαλονικού οξέος του δευτερογενούς μεταβολισμού.

1.1.2.7. Κύριες φαινολικές ενώσεις στην ελιά

Οι πιο σημαντικές φαινολικές ομάδες στον καρπό της ελιάς είναι τα φαινολικά οξέα, οι φαινολικές αλκοόλες, τα φλαβονοειδή και τα σεκοϊριδοειδή (Macheix et al., 1990; Ryan and Robards, 1998; Soler-Rivas et al., 2000). Πιο συγκεκριμένα οι φαινολικές αλκοόλες του καρπού της ελιάς είναι (Macheix et al., 1990; Mazza and Miniati, 1993; Romero et al., 2002a; Ryan and Robards, 1998) οι:

τυροσόλη (2-(4-Hydroxyphenyl)ethanol (tyrosol- TYR))

υδροξυτυροσόλη (4-(2-hydroxyethyl)benzene-1,2-diol (hydroxytyrosol - HTYR))

Από τα πιο συχνά αναφερόμενα και σημαντικά φλαβονοειδή στον καρπό της ελιάς είναι (Amiot et al., 1989; Esti et al., 1998; Romani et al., 1999; Ryan and Robards., 1998):

η λουτεολίνη (2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxychromen-4-one – (luteolin – LUT))

η ρουτίνη (2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-3-(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(((2R,3R, 4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl)oxymethyl)oxan-2-yl)oxychromen-4-one (rutin – RU)).

Το επικρατέστερο σεκοϊριδοειδές που βρίσκεται στον καρπό της ελιάς είναι η ελευρωπαϊνή (4S, 5E, 6S)-4-(2-(2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethoxy)-2-oxoethyl)-5-ethylidene-6-((2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)-2-tetrahydropyranyl)oxy)-4H-pyran-3-carboxylic acid methyl ester, oleuropein – OLE) , ενώ ο βερμπασκοζίτης ([6-[2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethoxy]-5-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-4-(3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl)oxyoxan-3-yl]3-(3,4-dihydroxyphenyl)prop-2-enoate, verbascoside – (VER)) είναι το επικρατέστερο φαινολικό οξύ στον καρπό της ελιάς και είναι παράγωγο του υδροξικυκναιμικού οξέος.

Ομοίως, οι πέντε κυριότερες ομάδες φαινολικών ουσιών που παρουσιάζονται στα φύλλα της ελιάς είναι (**Benavente-Garcia et al., 2000**): α) ελευρωπαϊνή, βερμπασκοσίτης (Oleuropeosides), β) λουτεολίνη (Flavones), γ) ρουτίνη (Flavonols), δ) Flavan-3-ols, στ) τυροσόλη, υδροξυτυροσόλη (Substituted phenols).

Οι παραπάνω ενώσεις και ιδιαίτερα τα σεκοϊριδοειδή, επηρεάζουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του καρπού της ελιάς, και κατά συνέπεια του ελαιολάδου και ευθύνονται για τις μεταβολές που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας των επιτραπέζιων ελιών (**Brenes et al., 1995**). Όσον αφορά το ελαιόλαδο, ιδιαίτερα τα σεκοϊριδοειδή δρουν ανασταλτικά στην αυτοοξειδωση και φωτοοξειδωση του λαδιού (**Botia et al., 2001; Papadopoulos and Boskou, 1999; Romani et al., 1999**). Οι ιδιότητες των φύλλων της ελιάς αποδίδονται κυρίως στα σεκοϊριδοειδή ελευρωπαϊνή και υδροξυτυροσόλη (**Ghisalberti, 1998; Le Tutour and Guedon, 1992**). Οι δύο αυτές φαινολικές ουσίες είναι ευρέως γνωστές για τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες (**Owen et al., 2000**), ενώ παράλληλα αποδίδουν στην ελιά αντοχή κατά των βλαβών από έντομα και βακτήρια.

Πίνακας 1.2. Οι κυριότερες φαινολικές ενώσεις στα προϊόντα της ελιάς.

A/A	Φαινολικές ενώσεις προϊόντων ελιάς	IUPAC ονομασία	Μοριακός τύπος
1	Τυροσόλη (TYR)	4-(2-hydroxyethyl) phenol	C ₈ H ₁₀ O ₂
2	Υδροξυτυροσόλη (HTYR)	4-(2-hydroxyethyl) benzene-1,2-diol	C ₈ H ₁₀ O ₃
3	Ελευρωπαΐνη (OLE)	methyl (4 <i>S</i> ,5 <i>E</i> ,6 <i>S</i>)-4-[2-[2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethoxy]-2-oxoethyl]-5-ethylidene-6-[(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy-4 <i>H</i> -pyran-3-carboxylate	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₃
4	Βερμπασκοζίτης (VER)	[(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)-6-[2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethoxy]-5-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-4-[(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>S</i>)-3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxyoxan-3-yl] (<i>E</i>)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)prop-2-enoate	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅
5	Λουτεολίνη (LUT)	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxychromen-4-one	C ₁₅ H ₁₀ O ₆
6	Ρουτίνη (RU)	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-3-[(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-3,4,5-trihydroxy-6-[[[(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>S</i>)-3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl]oxychromen-4-one	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆

1.1.3. Ο ρόλος των φαινολικών ενώσεων στα ανώτερα φυτά

1.1.3.1. Δομικός Ρόλος

Το κυτταρικό τοίχωμα των φυτών περιλαμβάνει φαινολικά συστατικά με διάφορες δομές και τρόπο σύνδεσης. Η λιγνίνη, ένα φαινολικό πολυμερές, άφθονο στα ανώτερα φυτά και δεύτερο σε διάδοση πολυμερές μόριο στη βιόσφαιρα μετά την κυτταρίνη, είναι το κυρίαρχο συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος. Τα μονομερή της λιγνίνης αποτελούνται από φαινολικές αλκοόλες όπως η κονιφερυλική αλκοόλη, η σιναυλική αλκοόλη και η π-κουμαρουλκή αλκοόλη (**Whetten and Sederoff, 1995**). Στο κυτταρικό τοίχωμα απαντώνται επίσης φαινολικά οξέα με κυρίαρχα το π-κουμαρικό και φερουλικό οξύ, τα οποία προσδένονται εστερικά σε υπολείμματα υδατανθράκων της πηκτίνης (**Lavigne et al., 2004**). Η παρουσία των φαινολικών οξέων στα κυτταρικά συστατικά έχει ως φυσιολογικό ρόλο, μεταξύ άλλων, την εμπόδιση της υδρόλυσης των ενζύμων των ημικυτταρινών και την μηχανική ενίσχυση των κυτταρικών τοιχωμάτων (**Ishii, 1997**), και ίσως αποτελούν θέσεις έναρξης εναπόθεσης λιγνίνης ή δευτερογενούς πάχυνσης των κυτταρικών τοιχωμάτων (**Wallace and Fry, 1994**). Επιπλέον, τα φαινολικά συστατικά συμμετέχουν στη δομή μιας άλλης κατηγορίας υλικών, όπως η κουτίνη (**Kolattukudy, 1981**), η σουβερίνη (**Wallace and Fry, 1994**) και οι κηροί της εφυμενίδας. Στη σύσταση των κηρών της εφυμενίδας συμμετέχουν επίσης τερπένια, φαινολικά οξέα και φλαβονοειδή, τα οποία συνήθως ενώνονται ομοιοπολικά με άλλα υλικά της εφυμενίδας (**Kolattukudy, 1981; Jetter et al., 2000; Riley and Kolattukudy, 1975**).

1.1.3.2. Λειτουργικός ρόλος

Ορισμένοι δευτερογενείς μεταβολίτες, όπως οι φαινολικές ενώσεις, έχουν άμεση ή έμμεση επίδραση στην αύξηση ή διαφοροποίηση του φυτικού ιστού. Αναφέρεται χαρακτηριστικά ότι το σινναμικό και το π-κουμαρικό οξύ έχουν τη δυνατότητα να δράσουν σαν ρυθμιστές αύξησης (**Harborne, 1993**). Επιπλέον, το σαλικυλικό οξύ εμπλέκεται σε μεγάλο αριθμό φυσιολογικών λειτουργιών. Από το μόριο αυτό επάγεται η άνθηση σε είδη του φυτικού βασιλείου, και επίσης σε περιπτώσεις προσβολών από παθογόνα μπορεί να λειτουργήσει ως δια συστηματικό σήμα συναγερμού (**Scott et al., 1999**).

1.1.3.3. Αμυντικός ρόλος

Η άμυνα του φυτού έναντι των αντίξοων συνθηκών του βιοτικού και αβιοτικού περιβάλλοντος εξαρτάται σημαντικά από τα φαινολικά συστατικά. Τα φλαβονοειδή, με την παρουσία τους στο κυτταρικό τοίχωμα του επιδερμικού κυττάρου, έχουν προστατευτική δράση έναντι της υπεριώδους ακτινοβολίας (UV), μέσω της έντονης απορρόφησης της ακτινοβολίας στην υπεριώδη περιοχή και της ανοχής στην είσοδο του ορατού μήκους κύματος (**Markham et al., 2000a; Karabourniotis et al., 1998**). Επίσης, οι ανθοκυάνες με την παρουσία τους στα χυμοτόπια επιδερμικών κυττάρων έχουν όμοια δράση προστασίας έναντι της υψηλής έντασης της ορατής ακτινοβολίας, μέσω της δυνατότητας υψηλή απορρόφησης σε αυτά τα μήκη κύματος (**Neill and Gould, 1999; Field et al., 2001; Steyn et al., 2002**). Ακόμα, οι φαινολικές ενώσεις έχουν σημαντική θέση στον αμυντικό μηχανισμό του φυτού εναντίον εχθρών και ασθενειών. Οι εντομοαποθητικές ικανότητες της ελευρωπαΐνης και των παράγωγών της, φαίνονται στην εμπόδιση του δάκου της ελιάς στο να εναποθέσει τα αυγά του στους καρπούς. Έχουν αποδειχθεί και οι αντιβακτηριακές ιδιότητες άλλων φαινολικών ουσιών όπως η τυροσόλη, η υδροξυτυροσόλη, το πρωτοκατεχικό οξύ και το χλωρογενικό οξύ (**Soler-Rivas et al., 2000; Vermerris and Nicholson, 2008**). Εκτός των άλλων, η τοποθέτηση της λιγνίνης ή της σουβερίνης σε περιοχή που έχει τραυματιστεί η προσβληθεί, αναστέλλει την εξάπλωση παθογόνων οργανισμών (**Whetten and Sederoff, 1995; Dixon and Paiva, 1995**). Η ελευρωπαΐνη, επίσης, παίζει ρόλο στην σύνθεση φυτοαλεξινών στα φυτά της οικογένειας Oleaceae (**Soler-Rivas et al., 2000**).

1.1.3.4. Αναπαραγωγικός ρόλος

Οι φαινολικές ενώσεις παίζουν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην λειτουργία της αναπαραγωγής των φυτών. Μερικά φλαβονοειδή έχουν τη δυνατότητα να απορροφήσουν πολύ μικρά μήκη κύματος του φωτός, που δεν μπορούν να γίνουν αντιληπτά από το ανθρώπινο μάτι. Την ίδια ιδιότητα έχουν και οι βλαβόνες και οι φλαβονόλες, η οποία τους επιτρέπει να συμμετάσχουν στην δημιουργία συμμετρικών ακτινωτών ή κυκλικών σχημάτων, τα οποία λειτουργούν ως οδηγοί νέκταρος. Τα

έντομα με δυνατότητα οράσεως σε αυτά τα μήκη κύματος μπορούν να αντιληφθούν τα σχήματα αυτά, με τα οποία γίνεται ο εντοπισμός για την τοποθεσία γύρης και νέκταρος (Seigler, 1998). Ακόμα, οι ανθοκυανίνες, έχουν τη δυνατότητα διαμόρφωσης χρωματισμών των φυτικών επιφανειών, όπως τα πέταλα, ώστε να ελκύσουν τους φορείς γύρης (Markham et al., 2000b).

1.1.3.5. Άλλοι ρόλοι

Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των φυτικών προϊόντων επηρεάζονται σημαντικά από τις φαινολικές ενώσεις. Ειδικότερα, στα προϊόντα της ελιάς, η χαρακτηριστική πικρή γεύση και το χρώμα ωρίμανσης των καρπών οφείλεται στην ελευρωπαΐνη και τα παράγωγά της (Ryan and Robards, 1998). Στο στάδιο της πράσινης ελιάς, ο καρπός είναι πάρα πολύ πικρός και τα επίπεδα της ελευρωπαΐνης ιδιαίτερα υψηλά. Με την σταδιακή ωρίμανση του καρπού και την αλλαγή του χρώματός του, τα ποσοστά της ελευρωπαΐνης μειώνονται αισθητά. Επίσης, η γεύση και το άρωμα του ελαιόλαδου οφείλεται σε ουσίες όπως οι φαινολικές ενώσεις (Benavante-Garcia et al., 2000).

1.1.4 Ο ρόλος των φαινολικών ενώσεων στην ανθρώπινη υγεία

Η Μεσογειακή διατροφή η οποία είναι πλούσια σε φρούτα και λαχανικά με υψηλή περιεκτικότητα σε βιταμίνες, φλαβονοειδή και φαινολικές ουσίες είναι ένας από τους λόγους για την παρουσία χαμηλού ποσοστού καρδιαγγειακών παθήσεων και καρκίνου στη λεκάνη της μεσογείου. Η πρώτη επίσημη αναφορά χρήσης προϊόντων της ελιάς για ιατρικούς σκοπούς χρονολογείται από το 1954, όταν ο αναφέρθηκε η χρήση εκχυλίσματος φύλλων ελιάς ως αντιπυρετικό. Έκτοτε τα προϊόντα της ελιάς έχουν μελετηθεί εκτενώς ως προς τις θεραπευτικές τους ιδιότητες. Συνοπτικά, οι κυριότερες δράσεις των φαινολικών ενώσεων είναι:

- Επίδραση στην πέψη μακροθρεπτικών συστατικών, μέσω της ικανότητας δέσμευσης και καταβύθισης πρωτεϊνών, η οποία είναι εντονότερη σε φαινολικές μεγάλου μοριακού βάρους, με μεγάλο βαθμό υδροξυλίωσης.
- Παρεμπόδιση απορρόφησης μεταλλικών κατιόντων Fe, Cu, Zn, Na, Al, τα οποία υποβοηθούν τη δημιουργία ελευθέρων ριζών από τα φλαβονοειδή.
- Μείωση σακχάρου και χοληστερόλης στο αίμα, αύξηση των επιπέδων καλής χοληστερόλης (HDL) και μείωση κακής χοληστερόλης (LDL).
- Προστασία επιθηλιακών κυττάρων αναπνευστικού συστήματος.
- Αντικαρκινική, αντιμικροβιακή και αντιβακτηριακή δράση.
- Αντιαλλεργική ιδιότητα, μέσω αναστολής συσσώρευσης αιμοπεταλίων.
- Αγγειοδιασταλτική δράση.
- Προστασία του DNA.

1.1.4.1 Ελεύθερες ρίζες

Μερικές από τις κύριες αιτίες θανάτου του δυτικού κόσμου είναι οι καρδιαγγειακές παθήσεις, οι νευροεκφυλιστικές παθήσεις και ο καρκίνος. Εκτός από τους βασικούς λόγους εμφάνισης και ανάπτυξης των παραπάνω παθήσεων, σημαντικό ρόλο παίζει ο τρόπος ζωής και η διατροφή, με μεγάλο ποσοστό από αυτές να αποδίδεται στην διατροφή. Η ανάπτυξη των βιολογικών γνώσεων σχετικά με τις ελεύθερες ρίζες και δραστικά είδη οξυγόνου βοήθησε σε μέγιστο βαθμό στην κατανόηση και την ανάπτυξη προσεγγίσεων των παθήσεων.

Ελεύθερη ρίζα (free radical) καλείται ένα άτομο ή ομάδα ατόμων που φέρει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα (unpaired) ηλεκτρόνια. Ασύζευκτο ηλεκτρόνιο είναι το ηλεκτρόνιο που καταλαμβάνει μόνο του ένα ατομικό ή μοριακό τροχιακό (**Gutteridge and Halliwell, 1994**). Οι ελεύθερες ρίζες πολύ γρήγορα αντιδρούν μεταξύ τους ή με άλλες ρίζες, με σκοπό να σχηματίσουν ζεύγος. Η δράση των μορίων αυτών είναι πολύ έντονη πάνω σε πρωτεΐνες ιστών, ένζυμα, λιπίδια, κυτταρικές μεμβράνες και στο DNA. Από τη δράση τους προκαλείται οξείδωση η οποία μπορεί να προκαλέσει καταστροφή μεμβρανών και DNA και μεταβολές πρωτεϊνών-ενζύμων, που έχουν ως αποτέλεσμα την πρόκληση διαφόρων παθήσεων. Ο σχηματισμός των ελεύθερων ριζών μπορεί να γίνει με: α) απώλεια ενός ηλεκτρονίου από ένα άτομο ή μόριο, β) με προσθήκη ενός ηλεκτρονίου από ένα άτομο ή μόριο, γ) με ομολυτική σχάση ομοιοπολικού δεσμού. Η δράση της ελεύθερης ρίζας εξαρτάται από την ίδια τη ρίζα αλλά και από το μόριο με το οποίο αντιδρά. Η αντίδραση αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί με: α) Σύνδεση μιας ρίζας με ένα μόριο ή άτομο, β) δράση αναγωγικού παράγοντα, παραχωρώντας το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο σε ένα μόριο ή άτομο, γ) Δράση οξειδωτικού παράγοντα με αποδοχή ενός ηλεκτρονίου από ένα άτομο ή μόριο, δ) Απόσπαση ατόμου υδρογόνου από τον σκελετό μιας ένωσης.

Τα πιο ισχυρά οξειδωτικά σε σχέση με το μοριακό οξυγόνο είναι οι δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS). ROS καλούνται οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και τα παράγωγά οξυγόνου που δεν είναι ελεύθερες ρίζες και προκύπτουν δευτεροταγώς με διάφορες χημικές αντιδράσεις με στοιχεία του κυτταρικού περιβάλλοντος. Η παραγωγή τους γίνεται ενδογενώς στον οργανισμό ως υποπροϊόντα κανονικής κυτταρικής δραστηριότητας, όπως με αντίδραση αναγωγής του οξυγόνου σε νερό ή από την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων των μιτοχονδρίων, με αναγωγή του οξυγόνου ώστε δύο ηλεκτρόνια να γίνονται αποδεκτά από κάθε άτομο οξυγόνου, σχηματίζονται το μόριο του νερού. Την ίδια ώρα όμως ένα ποσοστό ηλεκτρονίων διαφεύγει από την κύρια οδό αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων, με αποτέλεσμα την μονοσθενή αναγωγή του μοριακού οξυγόνου και τον τελικό σχηματισμό ανιόντος του υπεροξειδίου. Επιπλέον, ελεύθερες ρίζες σχηματίζονται καθημερινά στον οργανισμό από εξωτερικούς παράγοντες, όπως η υψηλή συγκέντρωση οξυγόνου, το κάπνισμα, το όζον, χημικά και φάρμακα, έκθεση σε ακτινοβολία κ.α.

Πίνακας 1.3. Οι σημαντικότερες δραστικές μορφές οξυγόνου (**Jacob, 1995**).

A/A	Είδη	Κοινή ονομασία
1	$\square\text{OH}^\bullet$	Hydroxyl radical
2	HO_2^*	Hydroxyperoxyl radical
3	$\square\text{O}_2^{*-}$	Superoxide anion radical
4	$^1\text{O}_2$	Singlet oxygen
5	$\text{RO}\square^\bullet$	Alkoxy radical
6	$\text{ROO}\square\square^\bullet$	Peroxy radical
7	$\square\square\text{NO}^\bullet$	Nitric oxide radical
8	$\square\square\text{NO}_2^\bullet$	Nitrogen dioxide radical
9	H_2O_2	Hydrogen peroxide
10	HOCl	Hypochlorous acid

Η χρήσιμη δράση των ελεύθερων ριζών περιλαμβάνει ενεργό ρόλο στην αποδόμηση φαρμάκων, στη διαδικασία φαγοκυττάρωσης ανοσοποιητικού και στη σύνθεση προσταγλανδινών. Η ρίζα του υπεροξειδίου, για παράδειγμα, βρίσκει χρήση στην μεταφορά ηλεκτρονίων, στην υδροξυλίωση και την ανοσολογική απόκριση. Η έντονη δραστηριότητα τους όμως δεν τις κάνει ανεκτές σε υψηλή συγκέντρωση στους ζωντανούς ιστούς. Αύξηση των επιπέδων τους από εξωτερικές αιτίες μπορούν να οξειδώσουν και να προκαλέσουν βλάβες σε ζωτικά βιολογικά μόρια του κυττάρου όπως λίπη, πρωτεΐνες και DNA. Τα προϊόντα της οξείδωσης ευθύνονται για αρκετές παθήσεις όπως καρκίνος, καρδιοπάθειες, νευροπάθειες κα.

1.1.4.2 Οξειδωτικό στρες

Τα επίπεδα ελεύθερων ριζών υπερβαίνουν τα φυσιολογικά όρια όταν οι οξειδωτικοί μηχανισμοί του οργανισμού υπερτερούν έναντι των αντιοξειδωτικών (**Aruoma, 1998**). Η διατάραξη αυτής της ισορροπίας προκαλεί οξειδωτικό στρες. Το οξειδωτικό στρες έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή δράσης ορισμένων ενζύμων, την οξείδωση λιπιδίων, την καταστροφή της δομής του DNA και άλλες κυτταροτοξικές δράσεις. Η αυξημένη παραγωγή ROS και άλλων ριζών, πέραν των φυσιολογικών επιπέδων, ή η ανεπάρκεια αντιοξειδωτικής δράσης ευθύνονται για έναν μεγάλο αριθμό παθήσεων όπως ο καρκίνος, η αθηροσκλήρωση, η υπέρταση, η φλεγμονή, η αρθρίτιδα, οι νευροκεφυλιστικές ασθένειες κ.α. (**Aruoma, 1998**). Η αύξηση των ριζών και κατά συνέπεια του οξειδωτικού στρες, οφείλεται κατά κύριο λόγο στο άγχος, στην περιβαλλοντική ρύπανση, την ηλιακή

ακτινοβολία, την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, το κάπνισμα, την κακή διατροφή, τα φάρμακα, τις ασθένειες, το αλκοόλ, κ.α. (Masella et al., 2005).

1.1.4.3 Μηχανισμός δράσης ελεύθερων ριζών

Ο μηχανισμός δράσης των ελεύθερων ριζών πραγματοποιείται σε τρία στάδια, την έναρξη (initiation), τη διάδοση (propagation), και τον τερματισμό (termination). Στο πρώτο στάδιο συντελείται αυτοοξειδωση ακόρεστων λιπαρών οξέων και κάθε αντίδραση ελεύθερων ριζών που έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία ριζών. Στο δεύτερο στάδιο, γίνεται η πρόσθεση ατμοσφαιρικού οξυγόνου στο ενεργοποιημένο μεθυλένιο, με αποτέλεσμα ένα υδροϋπεροξειδίο και μια νέα ρίζα λιπαρού οξέος, που μπορεί να προκαλέσει καινούρια οξείδωση. Τα υδροϋπεροξειδία που δημιουργούνται έχουν μεγάλη αστάθεια και διασπώνται προς νέες δραστικές ρίζες. Στο τρίτο στάδιο γίνεται ο σχηματισμός σταθερών προϊόντων, μέσω της αντίδρασης δύο ελεύθερων ριζών ή μέσω της δέσμησης των ριζών από αντιοξειδωτικά. Η παραπάνω αλυσιδωτή αντίδραση είναι κατά πάσα πιθανότητα υπεύθυνη για την αυτοοξειδωση λιπών και ελαίων (Μπόσκου, 1997; Zhu et al., 2001). Τα αντιοξειδωτικά διακρίνονται σε αυτά που παρεμποδίζουν τον σχηματισμό ελεύθερων ριζών και ονομάζονται παρεμποδιστικά αντιοξειδωτικά και σε αυτά που ανακόπτουν την αλυσιδωτή αντίδραση και ονομάζονται αντιοξειδωτικά διάσπασης αλυσίδας. Αντιοξειδωτική δράση μπορεί να επιτευχθεί και με παροχή ηλεκτρονίων και διακοπή δράσης του οξυγόνου στην απλή κατάσταση.

1.1.4.4 Αντιοξειδωτικές ουσίες

Μία ουσία μπορεί να χαρακτηριστεί ως αντιοξειδωτική, όταν είναι παρούσα σε χαμηλές συγκεντρώσεις σε σχέση με τη συγκέντρωση ενός υποστρώματος, καθυστερεί σημαντικά ή αναστέλλει την οξείδωση αυτού του υποστρώματος (Percival, 1998; Young and Woodside, 2001). Υπόστρωμα είναι κάθε μόριο, όπως πρωτεΐνες, λίπη κ.α. που μπορεί να οξειδωθεί.

Οι αερόβιοι οργανισμοί χρησιμοποιούν αμυντικό σύστημα το οποίο λειτουργεί στον χώρο μέσα και έξω από το κύτταρο και στις κυτταρικές μεμβράνες, με σκοπό την αποφυγή της συσσώρευσης ROS. Οι μηχανισμοί αυτοί έχουν ως στόχο τα πρώιμα στάδια σχηματισμού ριζών και την αλυσίδα μετασχηματισμών που υφίστανται και πετυχαίνει στο να ισορροπήσει τις αντιοξειδωτικές και οξειδωτικές ουσίες του κυττάρου (Saffari and Sadrzadeh, 2004). Η απουσία ενός τέτοιου οργανισμού, οι οξειδωτικές βλάβες στον οργανισμό θα ήταν σε τέτοιο βαθμό ώστε η επιβίωση του οργανισμού θα ήταν αδύνατη (Liu et al., 2000). Συνοπτικά, τα αντιοξειδωτικά συλλέγουν τις παραγόμενες ελεύθερες ρίζες. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, παρέχεται στον οργανισμό προστασία από τις ελεύθερες ρίζες, από ορισμένα ένζυμα και αντιοξειδωτικά μόρια. Στα φυτά, κάτω από συνθήκες καταπόνησης η περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις αυξάνεται, πιθανότατα λόγω

της αντιοξειδωτικής δράσης τους. Η υπερβολική παραγωγή αντιοξειδωτικών όμως δεν προστατεύει τα φυτικά κύτταρα γιατί σε μεγάλες συγκεντρώσεις εμφανίζουν προοξειδωτική δράση.

Μια φαινολική ένωση για να μπορεί να χαρακτηριστεί ως αντιοξειδωτικό θα πρέπει να: α) όταν είναι παρούσα σε χαμηλή συγκέντρωση συγκριτικά με το υπόστρωμα προς οξείδωση, να μπορεί να αναστείλει ή να εμποδίσει την αυτοοξείδωση ή την οξείδωση από ελεύθερες ρίζες και β) Η νέα ελεύθερη ρίζα που θα σχηματιστεί από την δράση της να είναι σταθερή σε μετέπειτα οξείδωση (**Vinson, 1998**). Επιπλέον θα πρέπει να ανταγωνίζεται αποτελεσματικά για την ενεργή ενδιάμεση ουσία, να επαναγεννάται γρήγορα από το βιολογικό σύστημα και να έχει πρόσβαση στην ενεργή διάμεση ουσία στο περιβάλλον. Το αντιοξειδωτικό πρέπει να βρίσκεται στον ίδιο χώρο με το προς οξείδωση υπόστρωμα (**Bravo, 1998**). Μπορεί να ειπωθεί ότι τα αντιοξειδωτικά είναι μια ανομοιογενής ομάδα χημικών με κανένα κοινό χαρακτηριστικό, εκτός της ιδιότητας τους να συνδέονται με ελεύθερες ρίζες ή ενώσεις που δημιουργούν ρίζες, με σκοπό την προστασία του οργανισμού από την οξείδωση (**Horiuch et al., 1992**). Σύμφωνα με τους **Γάλαρης και Δούλιας (2001)**, τα αντιοξειδωτικά έχουν τις εξής ιδιότητες: α) Η δράση του κυμαίνεται κυρίως εντός του κυτταρικού χώρου. Παρουσιάζουν την ικανότητα να διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες και βρίσκονται την κατάλληλη στιγμή, στο κατάλληλο σημείο με την κατάλληλη συγκέντρωση, β) Έχουν την ικανότητα να βοηθήσουν τον κυτταρικό αμυντικό μηχανισμό, γ) δρουν ως χηλικοί παράγοντες δεσμεύοντας οξειδωαναγωγικά ενεργά ιόντα μετάλλων, αναστέλλοντας την συμμετοχή τους σε αντιδράσεις παραγωγής προϊόντων τοξικών για το κύτταρο, δ) έχουν την ικανότητα να βοηθήσουν στην βιοσύνθεση νέων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην άμυνα ή σε διορθωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου, ε) Συμβάλλουν στην προστασία του κυττάρου, με την αναστολή διαδικασιών μεταγωγής της σηματοδότησης που προκαλεί ο οξειδωτικός παράγοντας.

Ένα συνθετικό αντιοξειδωτικό πρέπει να συνδυάζει τις παρακάτω ιδιότητες για να είναι λειτουργικό (**Μπόσκου, 1997**): α) αποτελεσματικότητα με μικρή περιεκτικότητα, β) δεν αποδίδει βλαβερή επίδραση στον οργανισμό, γ) δεν προσδίδει στο προϊόν δυσάρεστη οσμή ή γεύση, δ) είναι λιποδιαλυτό, ε) σταθερότητα στα στάδια επεξεργασίας του προϊόντος. Επιπλέον θα πρέπει (**Βαφοπούλου - Μαστογιαννάκη, 2003**): α) να μην αλλάζει το χρώμα των προϊόντων, β) να είναι εύκολο στην παρασκευή, γ) να έχει μικρό κόστος.

Τα αντιοξειδωτικά διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, τα πρωτοταγή και τα δευτεροταγή. Τα πρώτα προκαλούν διακοπή στην αντίδραση διάδοσης των ριζών παρέχοντας του άτομα υδρογόνου. Οι φαινολικές ενώσεις ανήκουν σε αυτή την κατηγορία. Άλλα παραδείγματα αυτής της ομάδας είναι η ΒΗΑ (βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη), το ΒΗΤ (βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο), η ΤΒΗQ (διτριβουτυλουδροκινόνη), ο ΡG (προπυλικός εστέρας γαλλικού οξέος), οι φυσικές και συνθετικές

τοκοφερόλες, καφεϊκό οξύ, καρνοσόλη, ροσμαρινικό οξύ κ.α. (**Γάλαρης και Δούλιας, 2001**). Στα δευτερογενή αντιοξειδωτικά ανήκουν αρκετές ομάδες αντιοξειδωτικών με διαφορετικές ιδιότητες. Ενώσεις που μπορούν να δράσουν ως δεσμευτές οξυγόνου, οι οποίες αντιδρούν με το οξυγόνο, σχηματίζουν ενώσεις με αυτό και μειώνουν τη συγκέντρωσή του. Την ικανότητα αυτή την έχουν αντιοξειδωτικά όπως το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) και οι εστέρες του, το θειώδες οξύ και τα άλατά του και τα καροτενοειδή (**Polorny et al., 2001**). Ενώσεις που σχηματίζουν χηλικά σύμπλοκα με μεταλλικά ιόντα, όπως αυτά του χαλκού και του σιδήρου, οι οποίες δεσμεύουν τα μέταλλα που δημιουργούν ελεύθερες ρίζες. Τέτοιες ενώσεις είναι τα οξέα ή τα παράγωγά τους που σχηματίζουν χηλικές ενώσεις όπως το EDTA (αιθυλενοδιαμινοτετραοϊκό οξύ), το κιτρικό οξύ, το φωσφορικό οξύ κ.α. (**Gordon, 1990; Jadhav, 1996**). Επιπλέον, οι αποσβεστές διηγεμένου οξυγόνου, οι οποίοι απενεργοποιούν το μονήρες οξυγόνο, όπως οι τοκοφερόλες και το β-καροτένιο. Ακόμα, ένζυμα τα οποία δρουν απομακρύνοντας το εν διαλύσει οξυγόνο ή απομακρύνοντας συστατικά του τρόφιμου που είναι ευοξειδωτά, όπως η οξειδάση της γλυκόζης, η υπεροξειδάση της δισμουτάσης, η κατάλυση και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (**Roberfroid, 1995**). Τέλος, αντιοξειδωτικά με μη γνωστή δράση, όπως τα φωσφολιπίδια και τα προϊόντα αντιδράσεων Maillard (**Μπόσκου, 1997**).

1.1.4.5 Αντιοξειδωτική ικανότητα φαινολικών ενώσεων

Οι φαινολικές ενώσεις λόγω της αντιοξειδωτικής τους δράσης είναι στο επίκεντρο του ερευνητικού ενδιαφέροντος τα τελευταία χρόνια. Η δράση παρέμβασης και αναστολής της οξειδωσης μέσω των ελεύθερων ριζών πραγματοποιείται με 3 τρόπους.

Πρώτον, έχουν την ικανότητα να δράσουν ως δεσμευτές των ριζών ή ως αποδομητές των αλυσιδωτών αντιδράσεων εξουδετερώνοντας τις ρίζες που δημιουργούνται. Τα αντιοξειδωτικά από φαινολικές ενώσεις είναι άριστοι δότες υδρογόνου ή ηλεκτρονίου σε ρίζες λιπιδίων (**Shahidi and Wanasundara, 1992**). Σημαντικός παράγοντας χαρακτηρισμού της δραστηρότητας τους είναι η ευκολία απόσπασης του φαινολικού τους υδρογόνου. Όσο πιο ασθενής είναι ο δεσμός -H, τόσο λιγότερη ενέργεια απαιτείται για τη διάσπαση του και τόσο πιο εύκολα αντιδρά με τις ελεύθερες ρίζες (**Wright et al., 2001**). Έτσι, καθίστανται οι ίδιες ρίζες, οι οποίες είναι πολύ σταθερές λόγω της φαινολικής δομής που μέσω συντονισμού σταθεροποιείται σημαντικά (**Halliwell, 2008**). Επιπλέον, τα ενδιάμεσα της φαινοξυρίζας έχουν τη δυνατότητα να τερματίζουν τον πολλαπλασιασμό των ριζών αντιδρώντας με άλλες ελεύθερες ρίζες.

Δεύτερον, έχουν την ικανότητα να δράσουν ως δεσμευτές μεταλλικών ιόντων τα οποία συχνά είναι εκκινητές μιας οξειδωσης, μέσω της δημιουργίας ενός χηλικού συμπλόκου (**Mira et al, 2002**).

Τρίτον, έχουν την ικανότητα να αναγεννήσουν άλλα αντιοξειδωτικά τα οποία είναι απαραίτητα για τον ανθρώπινο οργανισμό, όπως η βιταμίνη E, μέσω της μείωσης της ρίζας α-τοκοφερόλης (Natella et al, 1999).

Η ικανότητά τους να δράσουν ως αντιοξειδωτικά εξαρτάται σημαντικά από τη χημική τους δομή. Η φαινόλη είναι ανενεργή ως αντιοξειδωτικό, αλλά τα ορθοδιφαινολικά και τα παραδιφαινολικά παράγωγά έχουν αντιοξειδωτική ικανότητα η οποία αυξάνει με την αντικατάσταση ατόμων με αιθυλικές ή n-βουτυλικές ομάδες (Shahidi and Wanasundara, 1992). Η παρουσία σακχάρου στο μόριο της φαινολικής ένωσης μειώνει την αντιοξειδωτική ικανότητα. Κατά συνέπεια, ενώ κάποιοι γλυκοζίτες δεν είναι αντιοξειδωτικές ενώσεις, οι αντίστοιχες αγλυκογόνες μπορεί να είναι (Ratty and Das, 1988). Ενώ αρχικά η αντιοξειδωτική ικανότητα είχε αποδοθεί μόνο στις εκχυλιζόμενες φαινολικές ενώσεις, φαίνεται πως οι μη εκχυλιζόμενες είναι αρκετά ισχυρότερα αντιοξειδωτικά από τις εκχυλιζόμενες. Λόγω της μη απορρόφησης, οι εκχυλιζόμενες φαινολικές ενώσεις μπορούν να εμφανίσουν αντιοξειδωτική ικανότητα μέσα στο γαστρεντερικό σωλήνα προστατεύοντας τα λιπίδια, τις πρωτεΐνες και τους υδατάνθρακες από την οξειδωτική βλάβη κατά την πέψη (Hagerman et al., 1998).

1.1.4.5.1. Αντιοξειδωτική ικανότητα φλαβονοειδών

Τα φλαβονοειδή είναι από τα πιο ισχυρά φυσικά αντιοξειδωτικά, λόγω του ότι έχουν ένα ή περισσότερα δομικά στοιχεία τα οποία εμπλέκονται στην αντιοξειδωτική ικανότητα με μία Ο-διφαινολική ομάδα στο δακτύλιο B, η οποία προσφέρει υψηλή σταθερότητα στο σχηματισμό ριζών και συμμετέχει στον εκτοπισμό ηλεκτρονίων, με έναν 2-3 διπλό δεσμό σε συζυγία με την 4-οξο δράση στον C δακτύλιο, υπεύθυνο για τον εκτοπισμό ηλεκτρονίων από B δακτύλιο και με υδροξυλάσεις στις θέσεις 3 και 5 μαζί με την 4-οξο δράση στους A και C δακτύλιους για μέγιστη δυνατότητα δέσμευσης των ριζών (Heim et al., 2002; Ratty and Das, 1988). Η αυξημένη αντιοξειδωτική ικανότητα των φλαβονοειδών οφείλεται επίσης στο ότι είναι πολύ καλοί δέκτες υδροξυλικών και υπεροξυλικών ριζών (Afanas et al., 1989). Η αντιοξειδωτική δράση τους επηρεάζει τον βαθμό υδροξυλίωσης των φλαβονοειδών, συνεπώς οι ενώσεις με πολλές ομάδες υδροξυλίου έχουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα. Η αντιοξειδωτική ικανότητα της κατεχίνης για παράδειγμα για παράδειγμα είναι τουλάχιστον δύο φορές πιο ισχυρή από την αντιοξειδωτική ικανότητα της βιταμίνης E (Rice-Evans and Miller, 1995).

1.1.4.6. Προ οξειδωτική δράση φαινολικών ενώσεων

Κάτω από ορισμένες συνθήκες όπως η υψηλή συγκέντρωση φαινολικών αντιοξειδωτικών, το υψηλό pH ή η παρουσία σιδήρου, τα φαινολικά αντιοξειδωτικά έχουν την ικανότητα να ξεκινήσουν

πορεία αυτοοξειδωσης και να συμπεριφερθούν σαν προοξειδωτικά (επιτάχυνση οξειδωσης) (**Shahidi and Wanasundara, 1992**). Η προ οξειδωτική δράση τους είναι ανάλογη με τον αριθμό υδροξυλομάδων που φέρουν (**Heim et al., 2002; Simic et al., 2007**). Η διαδικασία στην οποία αυξάνεται η δράση των φαινολικών όταν χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό ονομάζεται συνέργεια ή συνεργός δράση (**Moure et al., 2001**). Η συνεργός δράση των φαινολικών έχει μελετηθεί σε διάφορες έρευνες όπως σε μελέτη που έγινε για τη συνέργεια του π-κουμαρικού με το φερουλικό οξύ κατά την οξειδωση του λινολεϊκού οξέος (**Maillard and Berset, 1995**), ή σε έρευνα που έγινε για τη συνέργεια μίγματος τεσσάρων φαινολικών στην παρεμπόδιση μετατροπής LDL (**Cirico and Omaye, 2006**) κ.α.

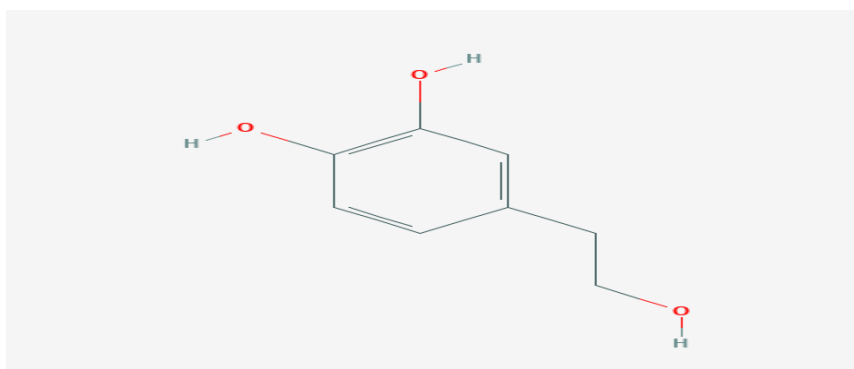
1.1.4.7. Επίδραση φαινολικών ενώσεων στην ανθρώπινη υγεία

Τα προϊόντα της ελιάς θεωρούνται ως μία πολύτιμη πηγή θρεπτικών, με αφθονία σε ακόρεστα λιπαρά οξέα και δευτερεύοντα στοιχεία όπως λιποδιαλυτές βιταμίνες, χλωροφύλλες, φυτοστερόλες και πολυφαινόλες (**Piroddi et al., 2017; Ghanbari et al., 2012**). Ωστόσο, όσον αφορά τις ιδιότητες υγειονομικού ενδιαφέροντος, οι πολυφαινόλες της ελιάς φαίνεται πως είναι το επίκεντρο του ερευνητικού ενδιαφέροντος (**Rodriguez-Morato et al., 2015; Rigacci et al., 2016; Parkinson et al., 2016; Jakobušić Brala et al., 2017**). Τα προϊόντα της ελιάς διαθέτουν αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, καρδιοπροστατευτικές, νευροπροστατευτικές, αντικαρκινικές, αντιπαχυσαρκικές, αντισπασμωδικές, αντιμικροβιακές και άλλες ιδιότητες (**Cicerale et al., 2012; Rigacci et al., 2016; Fabiani et al., 2016**). Σύμφωνα με πολυάριθμες μελέτες, αυτές οι ιδιότητες οφείλονται κυρίως σε κύρια παράγωγα σεκοϊριδοειδών, όπως η ελευρωπαΐνη (OLE), αλλά και σε απλές φαινολικές ουσίες όπως η υδροξυτυροσόλη (HTYR) και η τυροσόλη (TYR) (**Rigacci et al., 2016, Piroddi et al., 2017**);).

1.1.4.7.1. Υδροξυτυροσόλη (HTYR)

Η υδροξυτυροσόλη είναι μία φαινολική αλκοόλη, που περιλαμβάνει ένα μεγάλο εύρος βιολογικών επιδράσεων, καρδιοπροστατευτικών, αντικαρκινικών, νευροπροστατευτικών, αντιμικροβιακών, ωφέλιμων ενδοκρινικών και άλλων επιδράσεων (**Rodriguez-Morato et al., 2015; Parkinson et al., 2016; Visioli et al., 2002; Tome-Carneiro et al., 2016; Echeverria et al., 2017; Robles-Almazan et al., 2018**). Παρόλο που έχει μελετηθεί εκτενώς, οι ακριβείς μοριακοί μηχανισμοί που βασίζονται πολλές από αυτές τις επιδράσεις δεν έχουν ακόμα διευκρινιστεί πλήρως. Καταρχάς, μία μεγάλη ποικιλία από βιολογικές διεργασίες της υδροξυτυροσόλης συνδέεται με την ισχυρή αντιοξειδωτική της δράση. Η υψηλή αντιοξειδωτική της αποδοτικότητα οφείλεται στην παρουσία μέρους *o*-dihydroxyphenyl. Δρα κυρίως σαν διασπαστής αλυσίδας, δίνοντας ένα άτομο

υδρογόνου σε ρίζες υπεροξυλίων (ROO). Με αυτό τον τρόπο η αρκετά δραστήρια ROO αντικαθίσταται με ρίζα υδροξυτυροσόλης, η οποία είναι αδρανής λόγω της παρουσίας ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου στις φαινοξυ-ρίζες.



Εικόνα 1.1. Δυσδιάστατη δομή της υδροξυτυροσόλης (PubChem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)

Ωστόσο, έχει αναφερθεί πως η υδροξυτυροσόλη μπορεί να προσφέρει επιπλέον αντιοξειδωτική προστασία, μέσω αύξησης του ενδογενούς συστήματος άμυνας απέναντι στο οξειδωτικό στρες, με την ενεργοποίηση διαφορετικών μονοπατιών κυτταρικής σηματοδότησης (Bayram et al., 2012). Ένας από τους προτεινόμενους μηχανισμούς, περιλαμβάνει την ΗTYR-μεσολαβούμενη επαγωγή της δεύτερης φάσης αποτοξίνωσης ενζύμων μέσω της ενεργοποίησης του πυρηνικού παράγοντα E2-related factor 2 (Nrf2) σε διαφορετικούς ιστούς. Επίσης, η αλληλεπίδραση της υδροξυτυροσόλης με microRNAs (miRNAs) θα μπορούσε να είναι πιθανός μοριακός στόχος για την εξαγωγή βιολογικών δράσεων (Rigacci et al., 2016; Tome-Carneiro et al., 2016). Τα miRNAs ασκούν σημαντικές ρυθμιστικές διεργασίες στην γονιδιακή έκφραση, όχι μόνο κάτω από φυσιολογικές συνθήκες αλλά και κάτω από συνθήκες ασθένειας. Πράγματι, τα miRNAs συχνά στοχεύουν πολλαπλά λειτουργικά γονίδια και εμπλέκονται εκτενώς σε βιολογικές διαδικασίες. Αυτό τα καθιστά καλούς υποψήφιους για θεραπευτικές ή φαρμακευτικές παρεμβάσεις. Η υδροξυτυροσόλη διαμορφώνει την έκφραση αρκετών miRNAs. Επίσης, η υδροξυτυροσόλη, κατέχει σημαντικές αντι-φλεγμονώδεις δράσεις. *In vitro* και *in vivo* στοιχεία δείχνουν την ελάττωση προ-φλεγμονωδών παραγόντων συνθάσης νιτρικού οξειδίου (iNOS), κυκλοοξυγενάσης-2 (COX-2), νέκρωσης όγκου παράγοντα-α (TNF-α) και έκφρασης ιντερλευκίνης (IL)-1β, αναχαίτησης των κοκκιοκυττάρων και ενεργοποίησης μονοκύτταρων από την υδροξυτυροσόλη (Parkinson et al., 2016 ; Scoditti et al., 2014; Bigagli et al., 2014).

1.1.4.7.1.2. Αντιαθηρογόνα και καρδιοπροστατευτική δράση

Έχει βρεθεί ότι η υδροξυτυροσόλη ίσως έχει θεραπευτικές δυνατότητες για την αντιμετώπιση της αθηροσκλήρωσης. Η αθηροσκλήρωση είναι φλεγμονώδης νόσος. Το αγγειακό ενδοθήλιο

εμπλέκεται σε πολλές από τις διαδικασίες οι οποίες σχετίζονται με την ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης. Οι παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν την ενδοθηλιακή λειτουργία είναι η παρουσία αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (ROS), υπερχοληστερολαιμία, μεταπρωτεϊνική λιπιδαιμία κ.α. (Perona et al., 2006). Η οξείδωση της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (LDL) είναι ένα από τα βήματα κλειδιά για την έναρξη της αθηροσκλήρωσης. Η υδροξυτυροσόλη είναι πολύ αποτελεσματική στην εμπόδιση υπεροξείδωσης των λιπιδίων και στην προστασία της LDL από την οξείδωση (Rietjens et al., 2007). Η Ευρωπαϊκή Αρχή Προστασίας Τροφίμων έχει εκδώσει υγειονομικό ισχυρισμό για τον ρόλο των προϊόντων ελιάς στην προστασία της LDL από την οξείδωση *in vivo*: “Ημερήσια δόση 20 g ελαιόλαδου περιέχει το λιγότερο 5 mg υδροξυτυροσόλης, ελευρωπαϊκής και τυροσόλης και παρέχει επιθυμητές ευεργετικές ιδιότητες” (EFSA Panel on Dietetic Products, 2010). Η υδροξυτυροσόλη έχει επίσης ευεργετικό ρόλο στην υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (HDL) (Berrougui et al., 2015). Οι HDLs παίζουν πρωταρχικό ρόλο στην αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης. Απομακρύνουν την περίσσεια χοληστερόλης από τα περιφερειακά κύτταρα, όπου προβλέπεται η εμφάνιση στεφανιαίων περιστατικών και σχετίζεται με την ανάπτυξη πρώιμης αθηροσκλήρωσης. Μία αύξηση στους μεταβολίτες υδροξυτυροσόλη δεσμευμένους στις HDL έχει παρατηρηθεί. Αυτές οι ουσίες ασκούν τοπική αντιοξειδωτική προστασία στην HDL και ίσως παρεμποδίζουν οξειδωτικές τροποποιήσεις της απολιποπρωτεΐνης A-I (ApoA-I), της κύριας HDL πρωτεΐνης που συμμετέχει στην ικανότητα εκροής χοληστερόλης και άλλων HDL πρωτεϊνών. Επιπλέον, έχει παρουσιαστεί πως η υδροξυτυροσόλη ενισχύει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την εκροή χοληστερόλης. Η υδροξυτυροσόλη είναι επίσης ένα πιθανό αντιοξειδωτικό στόχευσης μιτοχονδρίων σε φλεγμονές του ενδοθηλίου. Η προ-μεταχείριση των ενδοθηλιακών κυττάρων με υδροξυτυροσόλη καταστέλλει την φλεγμονώδη αγγειογένεση, μειώνει την παραγωγή μιτοχονδριακών υπεροξειδίων και την υπεροξείδωση των λιπιδίων και αυξάνει την δραστηριότητα του υπεροξειδίου της δυσμουτάσης (SOD) (Calabriso et al., 2018). Έχει επίσης ευεργετική επίδραση στην αθηροσκλήρωση από τις αντιφλεγμονώδεις δράσεις της. Η υδροξυτυροσόλη μπορεί να ελαφρύνει την φλεγμονώδη αντίδραση της φλαβίνης που περιέχει μονοοξυγενάση 3, ένα ένζυμο που ίσως οδηγεί την ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης, σε κύτταρα με εξαιρετικά τοξική ατμοσφαιρική ρύπανση ακρολεΐνης (Wu, X, 2019). *In vivo* στοιχεία επιβεβαιώνουν ότι η χορήγηση υδροξυτυροσόλης εμπόδισε την επίδραση του λιποσακχαρίτη (LPS) και βελτίωσε την αντιοξειδωτική δυναμική του πλάσματος (Fuccelli, 2018). Κλινικές δοκιμές έχουν δείξει πως η τακτική κατανάλωση 15 mg ανά μέρα υδροξυτυροσόλη άλλαξε τις παραμέτρους σωματικής σύνθεσης και διαμόρφωσε το αντιοξειδωτικό προφίλ, των γονιδίων έκφρασης φλεγμονής και οξειδωτικού στρες στην αθηροσκλήρωση (Colica, 2017). Όμως, σε άλλη κλινική δοκιμή με υγιείς εθελοντές, η κατανάλωση εκχυλισμάτων προϊόντων ελαιολάδου, επιλεκτικά εμπλουτισμένα με δύο δόσεις υδροξυτυροσόλης (5 και 25 mg/μέρα) για μία εβδομάδα, είχαν ως αποτέλεσμα καμία σημαντική διαφορά στους φλεγμονώδεις δείκτες, όπως η πολύ ευαίσθητη

C-reactive protein (hs-CRP), η ιντερλευκίνη 6, (IL-6), IL-8, IL-10, IL-17, η μονοκυτταρική χημειοελκυστική πρωτεΐνη 1 (MCP-1), ο παράγοντας νέκρωσης όγκου άλφα (TNF-α) και ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) (Crespo, 2015). Επιπλέον, η υδροξυτυροσόλη ασκεί αγγειακή προστατευτική επίδραση μέσω ρύθμισης των μορίων προσκόλλησης των αγγειακών κυττάρων που εμπλέκονται στην πρόιμη αθηροσκλήρωση (Scoditti et al., 2014). Η λιπιδαιμία μετά το γεύμα θεωρείται παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης και αναφέρεται πως η υδροξυτυροσόλη βελτιώνει το προφίλ των λιπιδίων του αίματος, μέσω της δυνατότητας μείωσης της ολικής χοληστερόλης (TC), των τριγλυκερίδιων (TG), και των LDL επιπέδων (Gonzalez-Santiago, 2006). Πρόσληψη 5 και 25 mg/μέρα για μία εβδομάδα σε υγιείς εθελοντές είχε ως αποτέλεσμα την απουσία σημαντικών επιδράσεων σε παραμέτρους των λιπιδίων αίματος (Tomé-Carneiro; Visoli, 2016). Από την άλλη, όταν υδροξυτυροσόλη χορηγήθηκε ως ημερήσια δόση των 45mg για 8 εβδομάδες σε εθελοντές με ήπια υπερλιπιδαιμία, η δόση αυτή δεν επηρέασε τα λιπίδια του αίματος, αλλά αύξησε τα επίπεδα της ενδογενούς βιταμίνης C (Lopez-Huertas et al., 2017). Επίσης, η υδροξυτυροσόλη και η οξική-HTYR, αποδείχθηκε πως εμποδίζουν τη συσσώρευση αιμοπεταλίων, έναν από τους παράγοντες που εμπλέκονται στις θρομβωτικές διεργασίες, με επίδραση παρόμοια με του Ακετυλοσαλκυλικού οξέος (Gonzalez-Correa et al., 2008). Αποδείχθηκε ακόμα, πως η υδροξυτυροσόλη έχει καρδιοπροστατευτική δράση, μέσω της απορρύθμισης των πρωτεϊνών που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων, την απόφραξη αιμοφόρων αγγείων στην αορτή, και πρωτεΐνες που σχετίζονται με καρδιακή ανεπάρκεια τους καρδιακούς ιστούς (Catalan et al., 2016).

1.1.4.7.1.3. Αντικαρκινική δράση

Τα τελευταία χρόνια, ένας εντυπωσιακός αριθμός *in vitro* and *in vivo* μελετών έχουν δείξει την σημαντική αντικαρκινική δράση της υδροξυτυροσόλης εναντίον διαφόρων τύπων κακοηθών κυττάρων, με διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης (Rigacci et al., 2016; Parkinson et al., 2016; Fabiani et al, 2012.; Imran et al., 2018). Μεγάλο μέρος αυτών των ερευνών έχουν επικεντρωθεί στον καρκίνο του παχέος εντέρου, τον τρίτο πιο διαδεδομένο καρκίνο παγκοσμίως. Η υδροξυτυροσόλη, παρόλο που παρουσιάζεται σε σχετικά χαμηλή περιεκτικότητα στα προϊόντα ελιάς, φτάνει σε σημαντικά επίπεδα στο παχύ έντερο λόγω της γαστρικής υδρόλυσης και κολονικής ζύμωσης των σεκοϊριδοειδών που υπάρχουν στα προϊόντα ελιάς, όπως το ελαιόλαδο (Corona et al., 2006). Μαζί με τους ενεργούς μεταβολίτες, η υδροξυτυροσόλη εμφανίζεται ως ένας σημαντικός πιθανός παράγοντας βιολογικής δραστηριότητας των προϊόντων ελιάς σε κύτταρα ανθρώπινου αδενοκαρκινώματος του εντέρου (Corona et al., 2009; De las Hazas et al., 2017). Η συσσώρευση H₂O₂ , κυρίως λόγω της αυτοοξειδωσης του, αποτελεί τον πιο αντικαρκινικό μηχανισμό της

υδροξυτυροσόλης (Fabiani et al., 2012). Ωστόσο, αρκετές έρευνες έχουν τονίσει διάφορους αντί-πολλαπλασιαστικούς και αποπτωτικούς μηχανισμούς της υδροξυτυροσόλης, ανάλογα με τον τύπο του καρκίνου που μελετάται (Rigacci et al., 2016). Μέχρι τώρα, οι ευεργετικές αντικαρκινικές ιδιότητες της υδροξυτυροσόλης, έχουν μελετηθεί σε τύπους καρκίνου του μαστού, της ουροδόχου κύστης, του αίματος, του γαστρικού, του ηπατικού, του δέρματος, του προστάτη, του τραχήλου της μήτρας, του εγκεφάλου, του πνεύμονα και του θυροειδούς, επιδεικνύοντας την πιθανή ευρεία χρήση στην πρόληψη και θεραπεία του καρκίνου (Imran et al., 2018).

Η υδροξυτυροσόλη έχει αντί-πολλαπλασιαστική δράση και προκαλεί αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο μέσω δημιουργίας ROS, η οποία ακολουθείται από την ενεργοποίηση της PI3K/Akt/FOXO3a οδού και μία μείωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας άμυνας σε DLD1 ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του εντέρου (Sun et al., 2014). Αντί-πολλαπλασιαστική και προαποπτωτική δράση της υδροξυτυροσόλης μέσω της ενεργοποίησης σηματοδότησης κασπάσης, επιδείχθηκε στα καρκινικά κύτταρα του εντέρου Caco-2 και HT-29 (De las Hazas et al., 2017). Ακόμα, αποδείχθηκε πως η υδροξυτυροσόλη απορυθμίζει σημαντικά την έκφραση του υποδοχέα του επιδερμικού παράγοντα (EGFR), ο οποίος σχετίζεται με μειωμένο πολλαπλασιασμό ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων του εντέρου και μείωση ανάπτυξης όγκου και επίπεδα έκφρασης του EGFR σε ξενομοσχεύματα HT-29 (Terzuoli et al., 2016). Λιποφιλισμένα φυσικά εκχυλίσματα που περιέχουν υδροξυτυροσόλη έδειξαν αντί-πολλαπλασιαστική δράση επί των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων του εντέρου, με τη μεγαλύτερη δράση να εμφανίζεται στο κλάσμα του HTYR-ελαϊκού, πιθανότατα λόγω της μεγάλης λιποφιλικότητας της ελαϊκής αλυσίδας (Bernini et al., 2017).

Η έρευνα της δράσης της υδροξυτυροσόλης σε καρκινικές σειρές του μαστού, του προστάτη και του εντέρου αποκάλυψαν πως η αντί-πολλαπλασιαστική δράση της υδροξυτυροσόλης ήταν αντιστρόφως ανάλογη της ικανότητας των διαφορετικών κυτταρικών σειρών να απομακρύνουν H₂O₂ από το μέσο καλλιέργειας, με τα καρκινικά κύτταρα του προστάτη να είναι τα πιο ανθεκτικά στην αναχαίτηση αύξησης, συγκριτικά με τα καρκινικά κύτταρα του μαστού και του εντέρου (Rosignoli et al., 2016). Ακόμα, η έρευνα σε εξαρτώμενα από ανδρογόνο (AR) καρκινικά κύτταρα του προστάτη, έδειξε πως η υδροξυτυροσόλη εμποδίζει την έκφραση AR και την έκκριση αντιγόνου ειδικού για τον προστάτη το οποίο ανταποκρίνεται στο AR (Zubair et al., 2017).

Η αντικαρκινική δράση της υδροξυτυροσόλης σε ανθρώπινα κύτταρα υπατοκυτταρικού καρκινώματος (HCC) μελετήθηκε, και τα αποτελέσματα έδειξαν εμπόδιση του πολλαπλασιασμού, διακοπή του κυτταρικού κύκλου των G2/M κυττάρων και *in vitro* απόπτωση. Παρεμπόδιση της ανάπτυξης όγκου και αγγειογένεσης αποδείχθηκε *in vivo*, με καταστολή της ενεργοποίησης των οδών της πρωτεΐνης κινάσης B (Akt) και του πυρηνικού παράγοντα-κάππα B (NF-κB) (Zhao et al., 2014).

Σε ανθρώπινα κύτταρα ηπατώματος, η υδροξυτυροσόλη έδειξε αντί-πολλαπλασιαστική και αποπτωτική δράση μέσω εμπόδισης των λιπογόνων ενζύμων συνθάσης λιπαρού οξέος (FAS) και δισφωφορικής συνθάσης φαρνεσυλίου (FPPS), των οποίων τα υψηλότερα επίπεδα μπορεί να σχετίζονται με επιθετική συμπεριφορά ανάπτυξης όγκου (Tutino et al., 2012). Επίσης, σε πείραμα που έγινε σε ποντίκια, η υδροξυτυροσόλη εμπόδισε τον πολλαπλασιασμό ανθρώπινου χολαγγειοκαρκινώματος (CCA) και ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών της ουροδόχου κύστης, και ανέστειλε σημαντικά την ανάπτυξη CCA ξενομοσχευμάτων (Li et al., 2014). Η υδροξυτυροσόλη συνέλαβε τον κυτταρικό κύκλο, αύξησε την αναλογία Bax/Bcl-2, αύξησε την ενεργοποίηση κασπάσης 3/7 και προκάλεσε απόπτωση στα παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα MIA PaCa-2 (Goldsmith et al., 2018).

Η πρώτη έρευνα των αντικαρκινικών δράσεων της υδροξυτυροσόλης σε ανθρώπινα διαφοροποιημένα καρκινώματα θυροειδούς, έδειξε πως η υδροξυτυροσόλη αύξησε την απόπτωση μέσω της ενεργοποίησης μιτοχονδριακών αποπτωτικών μηχανισμών σε θηλοειδή και ωοθυλακικά καρκινικά κύτταρα. Παράλληλα, σημειώθηκε σημαντική αντίσταση καρκινικών κυττάρων του θυροειδούς στην υδροξυτυροσόλη, με αποτέλεσμα να χρειάζονται υψηλότερες δόσεις για παρόμοια αντί-πολλαπλασιαστική δράση, συγκριτικά με άλλους τύπους καρκίνου, όπως του μαστού ή του εντέρου (Toteda et al., 2017).

1.1.4.7.1.3. Νευροπροστατευτική δράση

Η νευροπροστατευτική δράση της υδροξυτυροσόλης έχει μελετηθεί σε μεγάλο αριθμό *in vitro* και *ex vivo* ερευνών, με διαφορετικές στρατηγικές, μερικές από τις οποίες έχουν χρησιμοποιήσει χημικά χορηγούμενες νευροτοξίνες ή βασίζονταν σε βιοχημικές διαφοροποιήσεις οι οποίες λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια της διαδικασίας υποξίας-επανοξυγόνωσης (Rodriguez-Morato et al., 2015). Η συσσώρευση υδροξυτυροσόλης στον εγκέφαλο υποδηλώνει την νευροπροστατευτική δράση της, με την μείωση του οξειδωτικού στρες σε νευρωνικό επίπεδο (De las Hazas et al., 2017). Μία από τις κυριότερες νευροεκφυλιστικές ασθένειες, οι οποίες σχετίζονται με την ηλικία, είναι το Alzheimer (AD), μία αμυλοειδής ασθένεια η οποία χαρακτηρίζεται από την εκθρόνιση των συνήθως συσσωματωμένων πρωτεϊνών στους ιστούς που συνδέονται με τον εκφυλισμό του εγκεφάλου και την προοδευτική γνωστική εξασθένηση. Σε μελέτη σε *in vitro* AD υποκείμενα, η υδροξυτυροσόλη προστάτευσε τα νευρικά κύτταρα από την αμυλοειδή-β τοξίνη (Rodriguez-Morato et al., 2015). Η υδροξυτυροσόλη εμφανίζεται ως ένας αποτελεσματικός αναστολέας συσσώρευσης λυσοζύμης, και ως εκ τούτου προτείνεται η πιθανή μελλοντική εφαρμογή της για την πρόληψη ή θεραπεία των αμυλοειδών ασθενειών (Orsini et al., 2018).

Η υδροξυτυροσώλη είναι μια υποσχόμενη ουσία για την φαρμακευτική αγωγή της ασθένειας του Parkinson (PD), καθώς αναστέλλει την ενζυματική και τυχαία οξειδωση της ενδογενούς ντοπαμίνης, μετριάζει την αύξηση της τυχαίας οξειδωσης κατά τη διάρκεια της αναστολής MAO, έχει προστατευτική δράση έναντι της ντοπαμίνης και του 6-υδροξυντοπαμίνης (6-OHDA)-παρακινούμενου θανάτου των κυττάρων και εξουδετερώνει την τοξικότητα της 6-OHDA (**Goldstein et al., 2016; Hornedo-Ortega et al., 2018**). Επίσης, η HTYR-βουτυράτη αναστέλλει την απόπτωση που προκαλείται από το 6-OHDA, μέσω της ενεργοποίησης του Nrf2/HO-1 άξονα στα νευρωνικά κύτταρα (**Funakohi-Tago et al., 2017**).

In vivo έρευνες έχουν δείξει ότι η υδροξυτυροσώλη εξασθενεί τα χωρο-γνωστικά ελλείματα, αντικαθιστά την δυνατότητα μάθησης και την απόδοση της μνήμης και προάγει τη γνωστική λειτουργία (**Zheng et al., 2015; Davinelli et al., 2015**). Επιπλέον, ο συνδυασμός υδροξυτυροσώλης και ολεικού οξέος έχει δείξει πως αναστέλλει την σύνθεση χοληστερόλης και λιπαρών οξέων σε C6 κύτταρα γλοιώματος (**Priore et al., 2017**). Τέλος, η υδροξυτυροσώλη ίσως προσφέρει προστασία από το οξειδωτικό στρες το οποίο προκαλείται από την αιθανόλη (**Carito et al., 2017**).

1.1.4.7.1.4. Αντιδιαβητική, Λιπιδό-ρυθμιστική και αντί-παχυσαρκική δράση

Η υδροξυτυροσώλη παρουσιάζει υπογλυκεμική δραστηριότητα σε διάφορα διαβητικά ζωικά υποκείμενα, μέσω του επηρεασμού των κύριων βιοχημικών διαδικασιών που οδηγούν σε διαβητική αγγειοπάθεια (**Jemai et al., 2007; Antonio Lopez-Villodres et al., 2016**). Πειραματικές μελέτες έδειξαν πως η Υδροξυτυροσώλη μπορούσε αποτελεσματικά να εμποδίσει τη διαβητική νευροπάθεια (**Reyes et al., 2017; Suribabu et al., 2017**). Αποδείχθηκε επίσης, πως η υδροξυτυροσώλη βελτιώνει την ευαισθησία στην ινσουλίνη και αποκαθιστά την κατάλληλη σηματοδότηση ινσουλίνης (**Carmen Crespo et al., 2017**).

Η υδροξυτυροσώλη ασκεί προστατευτική δράση στο συκώτι (**Soto-Alarcon et al., 2017**), κυρίως στην μη αλκοολούχα ασθένεια λιπαρού συκωτιού (NAFLD), μία πάθηση που χαρακτηρίζεται από αύξηση της περιεκτικότητας λίπους στο συκώτι, με συνακόλουθη μείωση της περιεκτικότητας της *n*-3-long αλυσίδας σε πολυακόρεστα λιπαρά. Ταΐζοντας ζώα με διατροφή με υψηλά λιπαρά για την μελέτη της πρόληψης ή θεραπείας της NAFLD, η υδροξυτυροσώλη αύξησε σημαντικά τη μεταβολική βλάβη που προήλθε από διατροφή υψηλή σε λιπαρά (**Pirozzi et al., 2016; Valenzuela et al., 2017**). Η υδροξυτυροσώλη παρεμποδίζει τα πρώιμα φλεγμονώδη συμπτώματα τα οποία είναι υπεύθυνα για την έναρξη αντοχής στην ινσουλίνη, μέσω μείωσης της ηπατικής φλεγμονής και του οξειδωτικού στρες και επαναφέρει την ομοιοστασία της γλυκόζης και την ακεραιότητα του εντερικού φράγματος (**Pirozzi et al., 2016**). Ενεργοποιεί τους παράγοντες μεταγραφής ως υποδοχέας που

ενεργοποιείται από τους PPAR)-α and Nrf2 και απενεργοποιεί τον NF-κB (Valenzuela et al., 2017). Άλλη έρευνα έδειξε πως η συνδυαστική δράση της EPA (50 mg/kg/μέρα) και της Υδροξυτυροσόλη (5 mg/kg/μέρα) μειώνει δραστικά την ανάπτυξη της NAFLD, κυρίως λόγω της δράσης της Υδροξυτυροσόλη (Lemonakis et al., 2017).

Αποδείχθηκε πως η υδροξυτυροσόλη έχει ευεργετική δράση στην υπερλιπιδαιμία καθώς ρυθμίζει τα γονίδια τα οποία σχετίζονται με την ωρίμανση και διαφοροποίηση των λιποκυττάρων και αναστέλλει τον σχηματισμό λιπιδίων (Dagla et al., 2018). Επίσης, φαίνεται πως η υδροξυτυροσόλη είναι αποτελεσματική στην κινητοποίηση των λιπιδίων (Stefanon et al., 2016). Ακόμα, η υδροξυτυροσόλη έχει ευεργετική δράση στην παχυσαρκία, μέσω καταστολής της ενδοκυτταρικής συσσώρευσης TG και της έκφρασης των παραγόντων διέγερσης κατά τη διαδικασία διαφοροποίησης των λιποκυττάρων, και προάγει την λιπόλυση σε ανθρώπινα πρωτογενή σπλαχνικά λιποκύτταρα της διαφοροποίησης και μειώνει την ηπατική στεάτωση (Wang et al., 2018; Illesca et al., 2019).

Η υδροξυτυροσόλη δρα επίσης ως μιμητής περιορισμού θερμίδων (CR). Η αποτελεσματικότητα του CR να παρατείνει τη διάρκεια ζωής και να μειώνει τον κίνδυνο ασθενειών που σχετίζονται με την ηλικία, είναι ευρέως αναγνωρισμένη. Όμως, ένα καθεστώς CR μπορεί πολύ δύσκολα να διατηρηθεί για μεγάλες χρονικές περιόδους. Γι' αυτό η ενσωμάτωση διατροφής με παράγοντες που μπορούν να μιμηθούν τις ευεργετικές ιδιότητες της μείωσης πρόσληψης θερμίδων μπορεί να εκτιμηθεί ιδιαίτερα. Η υδροξυτυροσόλη προκαλεί συμπτώματα παρόμοια με CR στους μύες, στον εγκέφαλο, στους ιστούς λίπους και στα νεφρά με διάφορους τρόπους, ιδιαίτερα μέσω της ενεργοποίησης και της αύξησης των επιπέδων σιρτουινών, των οποίων η δράση διαμορφώνεται από τη μεταβολική κατάσταση των κυττάρων και προκαλείται από τον CR (Rigacci et al., 2016).

1.1.4.7.1.5. Αντί-μικροβιακή και αντί-ική δράση

Έχει αποδειχθεί πως η υδροξυτυροσόλη έχει *in vitro* αντιμικροβιακές ιδιότητες έναντι μολυσματικών παραγόντων των αναπνευστικών και των γαστρεντερικών οδών όπως οι *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, or *Moraxella catarrhalis*, σε χαμηλές ανασταλτικές συγκεντρώσεις (Bisignano et al., 1999), αλλά και εναντίον ευεργετικών μικροοργανισμών όπως οι *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* και διατροφικών παθογόνων όπως τα *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, *Yersinia* (Medina et al., 2006). Επίσης, έχει μελετηθεί η αντιμικροβιακή δράση των ουσιών HTyr-Ac και HTyr-oleate εναντίον των *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* (Wu et al., 2017; Ghalandari, 2018). Η υδροξυτυροσόλη αναστέλλει την αιμολυτική δραστηριότητα της στρεπτολυσίνης O που παράγεται από τον

Streptococcus pyogenes (Sogawa et al., 2018). Επιπλέον, η υδροξυτυροσώλη έχει αντιβακτηριακή δράση εναντίον του *Propionibacterium acnes* (Eilami et al., 2017) και είναι επίσης αποτελεσματική εναντίον του μυκοπλάσματος *Mycoplasma pneumoniae* (Furneri et al., 2004).

Η υδροξυτυροσώλη αναγνωρίστηκε επίσης ως μοναδική κλάση αναστολέων του HIV-1 που εμποδίζουν τον HIV από το να εισέλθουν στο κύτταρο ξενιστή και δεσμεύουν την καταλυτική θέση του HIV-1, με αναστολή της εισόδου και ενσωμάτωσης του ιού (Bedoya et al., 2016). Ακόμα, αναφέρεται πως η υδροξυτυροσώλη αδρανοποιεί ιούς γρίπης Α, υπονοώντας πως ο μηχανισμός αντικής δράσης υδροξυτυροσώλη, ίσως απαιτεί την παρουσία ιικού καψιδίου (Yamada et al., 2009).

Η αντιμυκητιακή δράση μιας σειράς χημικά παρασκευασμένων Υδροξυτυροσώλης αναλόγων μελετήθηκε. Χρησιμοποιώντας τον *Aspergillus nidulans* αποδείχθηκε πως ανάλογα της υδροξυτυροσώλης έχουν μια πρωτοφανή αποτελεσματικότητα στην καταστροφή της μεμβράνης του μυκητιακού πλάσματος (Diallinas et al., 2018). Αποδείχθηκε ακόμα πως η υδροξυτυροσώλη έχει αντιτρυπανοσωμική και αντιλειτουργική δράση (Belmonte-Rech et al., 2016). Η Τρυπανοσωμώση και η Λειτουργική είναι μεταδοτικές ασθένειες που προκαλούνται από πρωτόζωα παράσιτα, και προσβάλλουν εκατομμύρια ανθρώπους ανά τον κόσμο, κυρίως σε τροπικές και υποτροπικές περιοχές και είναι μία από τις κύριες αιτίες πείνας και φτώχειας στην υπό Σαχάρια Αφρική.

1.1.4.7.1.6. Άλλες δράσεις

Έχει παρατηρηθεί πως η υδροξυτυροσώλη έχει οστεοπροστατευτικές ιδιότητες. Έχει ευεργετική δράση στον σχηματισμό και την συντήρηση του οστού, καθώς μπορεί να διεγείρει την εναπόθεση του ασβεστίου, να αναστείλει τον σχηματισμό πολυπυρηνικών οστεοκλαστών και να καταστείλει την απώλεια οστού του σπογγώδους οστού, όπως παρατηρήθηκε σε μηριαία οστά ποντικών (Hagiwara et al., 2011). Επίσης, η υδροξυτυροσώλη διεγείρει τον πολλαπλασιασμό ανθρώπινων οστεβλαστικών κυττάρων (García-Martínez et al., 2016). Σε πείραμα υγείων υποκειμένων αποδείχθηκε η δυνατότητα της υδροξυτυροσώλη να επηρεάσει μια αλλεργιογόνα ανοσολογική αντίδραση μέσω ενίσχυσης της κατασταλτικής ανοσοαπόκρισης έναντι ενός αλλεργιογόνου (Bonura et al., 2016). Επίσης, αποδείχθηκε ότι η υδροξυτυροσώλη έχει προστατευτική δράση σε κύτταρα ακτινοβολημένα με UV-B (Salucci et al., 2016; Avola et al., 2019). Η ακτινοβολία UV-B αποτελεί την κύρια αιτία σημαντικών δερματικών διαταραχών και γενετοξικών βλαβών.

1.1.4.7.1.7. Μεταβολισμός

Η βιοδιαθεσιμότητα και η απέκκριση της Υδροξυτυροσόλης στους ανθρώπους αρχικά προσδιορίστηκε από τους **Visioli et al. (2000)**. Η φτωχή βιοδιαθεσιμότητα της υδροξυτυροσόλης παρατηρείται σε διαφορετικές μελέτες σχετικά με την χαμηλή συγκέντρωση υδροξυτυροσόλης λόγω του εκτεταμένου μεταβολισμού στο έντερο και το ήπαρ (**DelasHazas, 2018**). Μερικές έρευνες έχουν δείξει πως το φύλο είναι κρίσιμος παράγοντας για την τελική βιοδιαθεσιμότητα της υδροξυτυροσόλης. Αποδείχθηκε πως η υδροξυτυροσόλη και τα προϊόντα της παραμένουν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στα σώματα θηλυκών ποντικών (**Domínguez-Perles et al., 2017**). Επομένως, οι πρόδρομοι της υδροξυτυροσόλης, όπως η ελευρωπαΐνη υδρολύονται κυρίως κατά την γαστρεντερική πέψη, δίνοντας τελικώς υδροξυτυροσόλη σαν μεταβολίτης τους (**Domínguez-Perles et al., 2017**).

Ο πολικός χαρακτήρας της υδροξυτυροσόλης εμποδίζει την διαλυτότητά του και εμποδίζει τη διέλευση του από το εντερικό επίπεδο. Η υδροξυτυροσόλη απορροφάτε φυσικώς από το έντερο μέσω μηχανισμού παθητικής διάχυσης διπλής κατεύθυνσης (**Manna et al., 2000**). με απόδοση 75 έως 100%. Η διαδικασία απορρόφησης εξαρτάται από τη σύνθεση της τροφής με την οποία χορηγείται. Η σταθερότητα της Υδροξυτυροσόλης είναι υψηλότερη όταν χορηγείται σαν φυσικό συστατικό ειδικά στο έξτρα παρθένο ελαιόλαδο, παρά σαν πρόσθετο επεξεργασμένου ελαιόλαδου (**Pastor et al., 2016; Tuck et al., 2002; Visioli et al., 2003**). Αφού απορροφηθεί, η υδροξυτυροσόλη γρήγορα ενσωματώνεται σε πλασματικά HDLs και δρα σαν αντιοξειδωτικό και σαν καρδιοαγγειακό προστατευτικό. Η υδροξυτυροσόλη και οι μεταβολίτες της έχουν πολύ καλές ικανότητες διανομής στους ιστούς των μυών, όρχεων, συκωτιού και εγκεφάλου, εκτός από αυτά που συσσωρεύονται στα νεφρά και στο συκώτι (**Serra et al., 2012; D'Angelo et al., 2001**). Το γεγονός ότι μπορεί να ανιχνευτεί σε ιστούς του εγκεφάλου και λόγω της πιθανής αλληλεπίδρασης της με οδούς ντοπαμίνης, θεωρείται ντοπαμινεργικός νευρωνικός προστάτης (**Schaffer et al., 2012; Schaffer et al., 2010**).

Πίνακας 1.4. Σχετικές μελέτες και λειτουργικά μονοπάτια της υδροξυτυροσόλης (PubChem database).

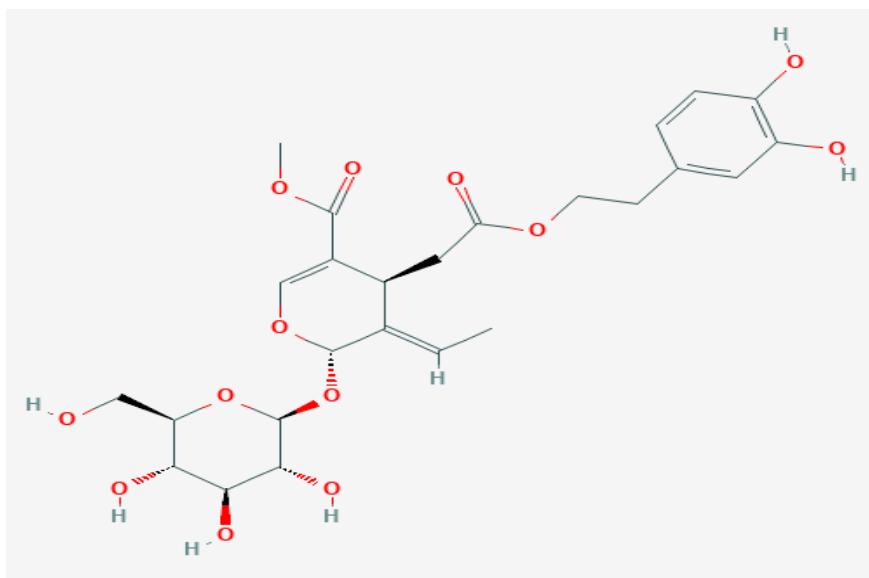
A/A	Αποτελέσματα βιολογικών δοκιμασιών όπου η ουσία που ελέγχθηκε είναι ενεργή
1	Inhibition of NADPH oxidase in Homo sapiens (human) HUVEC cells
2	Inhibition of human recombinant 5-lipoxygenase using arachidonic acid as substrate
3	Antioxidant activity assessed as DPPH free radical scavenging activity
4	Antiviral activity against Influenza A virus (A/Vietnam/1194/2004(H5N1)) infected in MDCK cells
5	Inhibition of ADP-induced platelet aggregation in human platelet rich plasma
6	Antioxidant activity against ferrous ion-induced oxidative stress in human HeLa cells
7	Inhibition of human recombinant SIRT2
8	Antioxidant activity assessed as ferric ion reducing activity by FRAP assay
9	Antiviral activity against Influenza A virus (A/Vietnam/1194/2004(H5N1)) infected in MDCK cells
10	Antioxidant activity against ferrous ion-induced oxidative stress in human DG75 cells
11	Cytotoxicity against primary human blood macrophages

1.1.4.7.2. Ελευρωπαΐνη (OLE)

Η ελευρωπαΐνη, είναι μία πολυφαινόλη των προϊόντων ελιάς με λειτουργία κατεχόλης, και έχει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, η οποία είναι ευρέως αναγνωρισμένη και με αναφορές στη βιβλιογραφία (Hassen et al., 2015; Visioli et al., 2002). Οι αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της ελευρωπαΐνης θεωρούνται πως είναι οι βάσεις των φαρμακολογικών της δράσεων όπως αντικαρκινική δράση, καρδιοπροστατευτική, νευροπροστατευτική, γαστροπροστατευτική, ηπατοπροστατευτική, αντιδιαβητική, αντιπαχυσαρκική, ραδιοπροστατευτική και άλλες δράσεις (Hassen et al., 2015).

Πολλές από τις αναγνωρισμένες ιδιότητες της ελευρωπαΐνης μπορούν να αποδοθούν στην αντιφλεγμονώδη δράση της. Πράγματι, έχει αναφερθεί η αναστολή σημαντικών φλεγμονικών διαμεσολαβητών από την ελευρωπαΐνη. Πιθανότατα η πρώτη απόδειξη για την αντιφλεγμονώδη δράση της στα ανθρώπινα κύτταρα ήταν η μείωση της συγκέντρωσης IL-1β σε καλλιέργεια ανθρώπινου αίματος, με την πρόσθεση ελευρωπαΐνης (Miles et al., 2005). Μία *in vivo* έρευνα σε οξεία κολίτιδα σε ποντικούς έδειξε μειωμένη παραγωγή IL-1β και IL-6, NO και TNF-α, και έκφραση iNOS, COX-2, και MMP-9, μετά από εφαρμογή ελευρωπαΐνης, κυρίως μέσω της μείωσης της δραστηριότητας του NF-κB (Giner et al., 2011). Η αντιφλεγμονώδης δράση της ελευρωπαΐνης αποδείχθηκε σε βιοψίες ασθενών με ελκώδη κολίτιδα και τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντικά χαμηλότερη έκφραση του COX-2 και IL-17 στα δείγματα στα οποία είχε χορηγηθεί ελευρωπαΐνη (Larussa et al., 2017).

Πρόσφατα, η προστατευτική δράση της ελευρωπαΐνης εναντίον της προκαλούμενης από H₂O₂ απόπτωσης επιβεβαιώθηκε σε ανθρώπινα κύτταρα του συκωτιού όπου παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της έκφρασης του SOD1, της καταλάσης και υπεροξειδάση2 γλουταθιόνης 1 (Shi et al., 2017). Η ελευρωπαΐνη επέδειξε προστασία των νεφρών εξασθενώντας την νεφρική βλάβη *in vivo*, μέσω της αναστολής σηματοδότησης της ERK (Potocnjak et al., 2016). Επίσης, η ελευρωπαΐνη μείωσε την απόπτωση μέσω διαμόρφωσης της αναλογίας Bcl-2/Bax και των οδών MAPK σε ανθρώπινα εμβρυονικά νεφρικά κύτταρα με οξειδωτική βλάβη από H₂O₂ (Maalej et al., 2016). Η έρευνα για την αντιαρθρική δράση της ελευρωπαΐνης σε αρθρικούς ινοβλάστες έδειξε πως η ελευρωπαΐνη έχει αντιφλεγμονώδη και αντιοξειδωτική δράση, μέσω της ρύθμισης των οδών σηματοδότησης MAPK και NF-κB, ελέγχοντας την παραγωγή πολλών φλεγμονωδών διαμεσολαβητών (Castejon et al., 2017).



Εικόνα 1.2. Δυσδιάστατη δομή της ελευρωπαΐνης (PubChem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)

1.1.4.7.2.1. Αντιαθηρογόνα και καρδιοπροστατευτική δράση

Η αντιαθηρογόνα δράση των προϊόντων της ελιάς έχει καταγραφεί και επικυρωθεί από πολλές έρευνες (Lou-Bonafonte et al., 2012). Ανάμεσα τους, η ελευρωπαΐνη θεωρείται πως έχει την μεγαλύτερη δράση σαν αντι-αθηροσκληρωτικός παράγοντας (Visioli et al., 1998). Οι ελευρωπαΐνη και υδροξυτυροσόλη έδειξαν πως εμποδίζουν την ενδοθηλιακή ενεργοποίηση και την μονοκυττοειδή κυτταρική προσκόλληση μετά από φαρμακευτική χορήγηση MD (Carluccio et al., 2003; Dell’Agli et al., 2006). Αυτές οι επιδράσεις προκύπτουν από την διακεκριμένη αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση τους, και αντιπροσωπεύουν τους πιθανούς μοριακούς μηχανισμούς με τους οποίους η ελευρωπαΐνη και άλλες φυσικές πολυφαινόλες ίσως αναστέλλουν την πρόιμη αθηρογένεση. Πειραματική παρέμβαση σε υγιείς εθελοντές οι οποίοι κατανάλωσαν εκχύλισμα

φύλλων ελιάς (51 mg OLE, 10 mg HTYR) σε μία περίπτωση έδειξε θετική ρύθμιση της αγγειακής λειτουργίας και παραγωγή IL-8 (Lockyer et al., 2015). Τυχαιοποιημένη μελέτη με εικονικό φάρμακο έδειξε πως η συμπλήρωση διατροφής με πολυφαινόλες (51mg OLE και 9,7 mg HTYR ημερησίως) για δύο εβδομάδες οδήγησε στην αύξηση νηστείας από ιντερλευκίνη IL-6 σε μεσήλικες υπέρβαρους άντρες, αλλά δεν είχε καμία επίδραση στα IL-8, TNF- α , ultra-sensitive-CRP (us-CRP) (De Bock et al., 2013). Μία τυχαιοποιημένη, ελεγχόμενη δοκιμή σε προ-υπερτασικούς άντρες, οι οποίοι κατανάλωσαν εκχύλισμα φύλων ελιάς πλούσιο σε φαινολικά για 6 εβδομάδες (136 mg OLE, 6 mg HTYR) έδειξε σημαντικά χαμηλότερα BP, πλάσμα TC, LDL χοληστερόλη και TG συγκριτικά με το μάρτυρα (Lockyer et al., 2017). Μια άλλη δοκιμή σε άτομα με υπέρταση σταδίου 1 έδειξε ότι τα εκχυλίσματα φύλλων ελιάς με δοσολογία 500 mg δύο φορές τη μέρα, χαμήλωσαν αποτελεσματικά τη συστολική και διαστολική BP (Susalit et al., 2011). Η συσσώρευση των αιμοπεταλίων φαίνεται πως είναι ένας από τους υποκείμενους μηχανισμούς παθογένειας της ασθένειας της στεφανιαίας αρτηρίας. Φαινολικά εκχυλίσματα και ειδικά η ελευρωπαΐνη ανέστειλαν την cAMP-φωσφοδιεστεράση, ένα από τα ένζυμα στόχους που συμπεριλαμβάνονται στην συσσώρευση αιμοπεταλίων (Dell’Agli et al., 2008).

Η καρδιοπροστατευτική δράση της ελευρωπαΐνης έχει διερευνηθεί σε πολλά *in vivo* μοντέλα. Η ελευρωπαΐνη μείωσε την απελευθέρωση της οξειδωμένης γλουταθιόνης, ενός ευαίσθητου δείκτη του οξειδωτικού στρες, σε μετα-ισχαιμική οξειδωτική έξαρση (Manna et al., 2004). Σε λαγούς, η πρόσληψη ελευρωπαΐνης για 3 με 6 εβδομάδες έδειξε μειωμένη βλάβη του μυοκαρδίου μετά από εμφάνιση ισχαιμίας, μειωμένη χοληστερόλη και επίπεδα TG, μειωμένη περιεκτικότητα σε πρωτεϊνικό καρβονύλιο και ενισχυμένη SOD δραστηριότητα (Andreadou et al., 2006). Πρόσφατη έρευνα δηλώνει την προστατευτική δράση της ελευρωπαΐνης στην μυοκαρδιακή ισχαιμία, σε καρδιομυοκύτταρα νεογνών ποντικών, μέσω της αναστολής της απόπτωσης (Zhao et al., 2017). Επίσης, η ελευρωπαΐνη ανέστειλε το μέγεθος του εμφράγματος του μυοκαρδίου και μείωσε την κρεατινίνη κινάση-MB και τα επίπεδα ορού LDH σε δείγμα ποντικού με μυοκαρδιακή ισχαιμία (Jin et al., 2018). Ακόμα, αποδείχθηκε πως η ελευρωπαΐνη δρα καρδιοπροστατευτικά σε ζώα με διατροφή χοληστερόλης, μέσω ενεργοποίησης ενδοκυτταρικής σηματοδότης, μειώνει την ανακυκλώμενη χοληστερόλη και τα επίπεδα LDL και αυξάνει το περιεχόμενο μυοκαρδιακού ATP (Andreadou et al., 2015). Η ελευρωπαΐνη εμπόδισε την ανάπτυξη μυοκαρδίτιδας σε υποκείμενα ποντικών, μέσω αναστολής των φλεγμονωδών αποκρίσεων των καρδιακών MAPK και NF- κ B (Zhang et al., 2017).

1.1.4.7.2. Αντικαρκινική Δράση

Η αντικαρκινική δράση της ελευρωπαΐνης συνδέεται με την ικανότητα της να ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων και τη δράση της σε διαφορετικές πρωτεΐνες σηματοδότησης που παίζουν ρόλο

στον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων (**Rigacci and Stefani, 2016; Imran et al., 2018; Shamsoum et al., 2017**). Η δράση της ελευρωπαΐνης κατά του καρκίνου του μαστού, έχει επανειλημμένα επιβεβαιωθεί σε μεγάλο αριθμό ερευνών στους υποδοχείς οιστρογόνου (ER)-positive and ER-negative καρκινικών κυττάρων του μαστού, επιδεικνύοντας την αντιπολλαπλασιαστική και προαποπτωτική δράση αυτής της ουσίας (**Shamsoum et al., 2017; Liu et al., 2019**). Η ικανότητα της ελευρωπαΐνης να προκαλέσει αντιμεταστατική δράση σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του μαστού, μέσω της ρύθμισης συγκεκριμένων γονιδίων έχει επίσης επιβεβαιωθεί (**Hassan et al., 2012**). Επιπλέον, *in vitro* έρευνες εισηγούνται την σημαντική αντικαρκινική δράση της ελευρωπαΐνης σε καρκινικά κύτταρα του εντέρου, του συκωτιού, του προστάτη, του πάγκρεος, του θυροειδούς, του πνεύμονα, της λευχαιμίας και του νευροβλαστώματος (**Imran et al., 2018; Shamsoum et al., 2017**). *In vivo* μελέτη σε ζωικά υποκείμενα έδειξαν την αναστολή της ανάπτυξης του ανθρώπινου MCF-7 καρκινικού όγκου του μαστού σε ξενομοσχεύματα και τη σημαντική μείωση της δυνατότητας εισβολής στον πνεύμονα (**Sepporta et al., 2014**). Μερικές ευεργετικές ιδιότητες παρατηρήθηκαν *in vivo* στο καρκίνο έντερου, γλώσσας, σαρκώματος και δέρματος δείχνοντας δυνητικά ισχυρές αντικαρκινικές ιδιότητες της ελευρωπαΐνης (**Shamsoum et al., 2017**). Μία πρόσφατη έρευνα έδειξε πως η ελευρωπαΐνη θα μπορούσε να δυναμώσει την αντινεοπλασματική δράση της σισπλατίνης σε ανθρώπινο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (HCC) και να βελτιώσει τις παρενέργειες της σισπλατίνης με μείωση της χορηγούμενης δόσης (**Sherif and Al-Gayyar, 2018**). Άλλη έρευνα έδειξε την προστατευτική δράση της ελευρωπαΐνης σε υψηλές δόσεις (200mg/kg) από την τοξικότητα του πάγκρεος από σισπλατίνη, προτείνοντας ότι ο συνδυασμός σισπλατίνης και ελευρωπαΐνης μπορεί να βελτιώσει την αποτελεσματικότητα της χημειοθεραπείας στο κοντινό μέλλον (**Bakir et al., 2018**). Ακόμα, η ελευρωπαΐνη επέδειξε κυτταροτοξική δράση σε κύτταρα μελανώματος BRAF και αύξησε την κυτταροτοξική δράση των Dacarbazine και Everolimus, συμβατικών φαρμάκων που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση του μελανώματος (**Ruzzolini et al., 2018**). Γενικά, η ελευρωπαΐνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν φαρμακευτικό για την βελτίωση των παρενεργειών των αντικαρκινικών χημειοθεραπευτικών αλλά η συνολική της φαρμακευτική δυνατότητα ακόμα δεν έχει καθοριστεί (**Shamsoum et al., 2017**).

1.1.4.7.2.3. Αντιδιαβητική, λιπιδό-ρυθμιστική και αντι-παχυσαρκική δράση

Πολλές *in vivo* έρευνες σε ζωικά διαβητικά υποκείμενα έχουν ήδη εδραιώσει την ευεργετική επίδραση της ελευρωπαΐνης σε ασθένειες DM τύπου 2. Μείωση του ορού γλυκόζης και των επιπέδων χοληστερόλης καθώς και του οξειδωτικού στρες έχει παρατηρηθεί σε διαβητικά ζώα που τους έχει χορηγηθεί ελευρωπαΐνη (**Jemai et al., 2009; Al-Azzawie et al., 2006; Murotomi et al., 2015**). Έχει αποδειχθεί πως η ελευρωπαΐνη προωθεί έκκριση ινσουλίνης που προκαλείται από την γλυκόζη σε β-κύτταρα και αναστέλλει την κυτοτοξικότητα που προκαλείται από αμυλοειδή αμυλίνη (**Wu et al.,**

2017). Η ελευρωπαΐνη ήταν ικανή να επιδράσει με την συσσώρευση αμυλίνης και να εμποδίσει την τοξικότητα της αμυλίνης σε παγκρεατικά β-κύτταρα *in vitro* (Rigacci and Stefani, 2016). Αυτός ο μηχανισμός θα μπορούσε να παρουσιάσει μια μοριακή βάση για τις ευεργετικές ιδιότητες της Ελευρωπαΐνης και των προϊόντων ελιάς σε τύπου 2 DM. *In vivo* μελέτες έδειξαν πως εκχυλίσματα φύλλων ελιάς μπορεί να εξασθενήσουν την αντίσταση ινσουλίνης, μέσω καταστολής της έκφρασης mRNA προ-φλεγμονοδών κυτοκινών και να αυξήσουν την έκφραση mRNA υποδοχέων ινσουλίνης (Liu et al., 2014). Σε κλινικές δοκιμές σε ασθενείς DM τύπου 2, η μεταχείριση με εκχυλίσματα φύλλων ελιάς με 500 mg ημερησίως για 14 εβδομάδες έδειξε σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα HbA1c και πλάσματος ινσουλίνης (Wainstein et al, 2012). Επίσης, άλλη δοκιμή σε μεσήλικες υπέρβαρους άντρες έδειξε πως η μεταχείριση με εκχυλίσματα φύλλων ελιάς (51 mg OLE, 9,7 mg HTYR ημερησίως) για 12 εβδομάδες συνδεόταν με τη βελτίωση ευαισθησίας στην ινσουλίνη και στην ανταπόκριση κυττάρων-β του παγκρέατος (De Bock et al., 2013). Πρόσφατη μελέτη σε 20 υγιή υποκείμενα απέδειξε πως η ελευρωπαΐνη βελτίωσε το γλυκαιμικό προφίλ μετά τα γεύματα, μέσω παρεμπόδισης οξειδωτικού στρες που προκαλείται από την NADPH οξειδάση 2 (Carnevale et al., 2018).

Εκχυλίσματα ελιάς πλούσια σε ελευρωπαΐνη και υδροξυτυροσώλη μείωσαν τα επίπεδα ορών TC, TG και LDL χοληστερόλης και αύξησαν τα επίπεδα HDL χοληστερόλης, επιβράδυναν τη διαδικασία υπεροξειδωσης των λιπιδίων και ενίσχυσαν την αντιοξειδωτική δράση των ενζύμων σε ποντίκια (Jemai et al., 2008). Σε έρευνα που έγινε σε γουρούνια στα οποία χορηγήθηκε συμπλήρωμα διατροφής από εκχυλίσματα φύλλου ελιάς παρουσιάστηκε μείωση του πλάσματικού TG, της σωματικής μάζας και της αποθήκευσης λίπους, χωρίς σημαντική μείωση της LDL χοληστερόλης και της οξειδωμένης LDL (Paiva-Martins et al., 2014). *In vitro* μελέτη σε κύτταρα συκωτιού ποντικίων, έδειξε πιθανό μηχανισμό μείωσης λιπιδίων από εκχυλίσματα ελιάς, που ίσως περιλαμβάνουν γρήγορη και άμεση ανασταλτική δράση σε ρυθμιστικά ένζυμα που εμπλέκονται στη σύνθεση λιπαρών οξέων, χοληστερόλης και TG στο συκώτι (Priore et al., 2017). Επίσης, έχει αναφερθεί η ικανότητα της ελευρωπαΐνης στην προαγωγή της αυτοφαγίας, ένα μηχανισμό προστασίας που εμπλέκεται στην αποδόμηση της ενδοκυτταρικής πρωτεΐνης, στο συκώτι NAFLD ποντικού (Porcu et al., 2018).

Ένα από τα πιο σημαντικά προβλήματα υγείας στις μέρες μας είναι η παχυσαρκία, μία σύνθετη διαταραχή που χαρακτηρίζεται από αύξηση του αριθμού και του μεγέθους των λιποκυττάρων στον λιπώδη ιστό, και αν μείνει χωρίς θεραπεία μπορεί να οδηγήσει σε DM τύπου 2, καρδιαγγειακές ασθένειες και υπερλιπιδαιμία. Η ελευρωπαΐνη έχει αντι-αδипογονική δράση μέσω της αναστολής της έκφρασης και της δραστηριότητας του PPARγ, το οποίο είναι βασικό για τον σχηματισμό και την λειτουργία των λιποκυττάρων (Drira et al., 2011; Svobodova et al., 2014). Σε

ποντίκια φάνηκε πως η ελευρωπαϊνή είναι συνδέτης του PPAR α και η δράση της συνδεόταν με σημαντική μείωση του ορού TG και των επιπέδων χοληστερόλης (Malliou et al., 2018). Πειράματα *in vitro* έδειξαν πως η ελευρωπαϊνή έχει αντι-παχυσαρκικές ιδιότητες, μέσω της ρύθμισης των γονιδίων τα οποία εμπλέκονται στην λιπογένεση στο σπλαχνικό λιπώδη ιστό ποντικών (Kuem et al., 2014). Έχει προταθεί πως η δράση της ελευρωπαϊνης στην λιπαρότητα ποντικών ίσως περιλαμβάνει ένα σύντομο μηχανισμό που επηρεάζει την πέψη και την πρόσληψη ενέργειας και μία μακροπρόθεσμη ομοιοστατική προσαρμογή, που έχει ως αποτέλεσμα υψηλότερο κορεσμό (Van der Stelt et al., 2015). Η ελευρωπαϊνή φαίνεται πως είναι αγωνιστής μερικών καναλιών μεταβατικών υποδοχέων τα οποία είναι σημαντικά για την συντήρηση του μεταβολισμού ολόκληρου του σώματος (Oi-Kano et al., 2017). Επιπλέον, τα αποτελέσματα έρευνας σε ποντικούς με ανεπτυγμένα σημάδια μεταβολικού συνδρόμου υποθέτουν πως εκχυλίσματα ελιάς με ελευρωπαϊνή και υδροξυτυροσώλη ίσως αντιστρέφουν τη χρονική φλεγμονή και το οξειδωτικό στρες και βελτιώνουν καρδιαγγειακά, ηπατικά και μεταβολικά συμπτώματα (Poudyal et al., 2010).

1.1.4.7.2.4. Νευροπροστατευτική δράση

Η νευροπροστατευτική δράση της ελευρωπαϊνης και άλλων προϊόντων της ελιάς στις νευροεκφυλιστικές ασθένειες έχει εκτενώς ερευνηθεί τα τελευταία χρόνια (Rodriguez-Morato et al., 2015; Rigacci and Stefani, 2016; Casamenti, F et al., 2015). Αποδείχθηκε πως η ελευρωπαϊνή έχει νευροπροστατευτικές ιδιότητες απέναντι στην εγκεφαλική ισχαιμία και στη βλάβη επαναιμάτωσης, μέσω μείωσης του όγκου εμφράγματος και της νευρικής απόπτωσης σε δείγματα ποντικών (Yu et al., 2016). Η ελευρωπαϊνή επίσης έδειξε ευεργετική δράση στον παρακοιλιακό πυρήνα του υποθαλάμου σε υπερτασικά ποντίκια, όπου ανέστειλε την ROS και αύξησε το οξειδωτικό αμυντικό σύστημα (Sun et al., 2017). Η νευροπροστατευτική δράση της OLE, λόγω της αντιοξειδωτικής της δράσης, επιδείχθηκε επίσης σε περίπτωση νοητικής δυσλειτουργίας και οξειδωτικού στρες προκαλούμενου από αναισθητικά φάρμακα στην περιοχή του ιππόκαμπου ποντικών (Alirezai et al., 2017). Ακόμα, η εφαρμογή ελευρωπαϊνης πριν την αναισθησία μείωσε τον αριθμό φλεγμονωδών κυττάρων και εμπόδισε την αποκοκκίωση σε λαγούς (Simsek et al., 2018).

Έρευνα σε δείγματα ποντικών με εκθρόνιση αμυλοειδούς- β έδειξε βελτίωση της γνωστικής απόδοσης σε νεαρά και μεσήλικα ποντίκια και μείωσε σημαντικά τα επίπεδα αμυλοειδούς- β στον εγκεφαλικό ιστό μετά από χορήγηση OLE. Ακόμα, οι εγκέφαλοι των ποντικών που χορηγήθηκε ελευρωπαϊνή έδειξαν έντονη αυτοφαγική αντίδραση, όμοια με των υγείων ποντικών. *In vitro* μελέτη επιβεβαίωσε την προηγούμενη υπόθεση πως η ενεργοποίηση της αυτοφαγίας από την ελευρωπαϊνή προχωρά μέσω των οδών σηματοδότησης AMPK/mTOR (Rigacci and Stefani, 2016).

Ακόμα, η ελευρωπαϊνή ίσως παρεμπόδισε τον νευρικό εκφυλισμό σε ένα κυτταρικό ντοπαμινεργικό δείγμα PD, με σημαντική αύξηση του νευρικού θανάτου και μείωσε την μιτοχονδριακή παραγωγή του ROS (Achour et al., 2016). Η ελευρωπαϊνή επέδειξε αντι-αμυλοειδογόνα δράση, μέσω αλληλεπίδρασης και σταθεροποίησης των α-συνουκλεικών μονομερών, βασικές πρωτεΐνες στην παθογένεση του PD. Επιπλέον, μείωσε την κυτταροτοξικότητα της συσσωμάτωσης α-συνουκλείνης εμποδίζοντας την δέσμευση της στην κυτταρική μεμβράνη και αποτρέποντας την οξειδωτική βλάβη των κυττάρων (Palazzi et al., 2018). Πρόσφατη έρευνα επιβεβαίωσε η ελευρωπαϊνή έχει προσεκτική δράση ενάντια στη συσσωμάτωση πρωτεϊνών και την κυτταροτοξικότητα σε περιπτώσεις συστημικής αμυλοείδωσης (Leri et al., 2018).

Μεταχείριση με ελευρωπαϊνή επέδειξε ανακούφιση από νευρολογικό έλλειμα και εγκεφαλικό οίδημα με ενδοεγκεφαλική αιμορραγία (ICH) σε δείγματα ποντικών. Επιπλέον, διατήρησε τη δομή του αιματοεγκεφαλικού φράγματος και εξασθένησε το οξειδωτικό στρες όπως και την ενεργοποίηση MAPK από ICH στον εγκεφαλικό ιστό (Shi et al., 2017). Ακόμα, βελτίωσε νευρολογικά και γνωστικά αποτελέσματα, ανακούφισε από εγκεφαλικό οίδημα, αύξησε τους νευροτροφικούς παράγοντες και μείωσε την απόπτωση των νευρονικών κυττάρων μετά από βλάβη ισχαιμίας σε δείγματα ποντικών με εγκεφαλική ισχαιμία (Zhang et al., 2018).

Η ελευρωπαϊνή εξασθένησε σημαντικά μία γνωστική δυσλειτουργία που προκαλείται από στρες, μέσω παρεμπόδισης της έκφρασης προ-φλεγμονοδών μεσολαβητών σε εγκεφάλους ποντικών και είχε αγχολυτική δράση στα συμπεριφορικά και βιοχημικά συμπτώματα διαταραχών μετατραυματικού στρες (Lee, B et al., 2018; Lee et al., 2018). Βρέθηκε πως η ελευρωπαϊνή παρουσιάζει σημαντική αντικαταθλιπτική δράση στα ποντίκια, πιθανότατα από τη μείωση των παραμέτρων οξειδωτικού στρες, αλλά χρειάζονται περισσότερες έρευνες για να στηρίξουν τον ακριβή μηχανισμό δράσης (Rabiei,Z et al, 2018).

1.1.4.7.2.5. Αντι-μικροβιακή και αντι-ικκή δράση

Αποδείχθηκε πως η ελευρωπαϊνή έχει αντιμικροβιακή δράση απέναντι σε Gram-αρνητικά και Gram-θετικά βακτήρια, παρόλο που η ελευρωπαϊνή φάνηκε λιγότερο τοξική στα βακτηριακά κύτταρα από την υδροξυτυροσόλη, πιθανότατα λόγω της γλυκοσιδικής ομάδας που ίσως καθιστά το φάρμακο ανίκανο να εισέλθει στην μεμβράνη του κυττάρου ή να φτάσει το σημείο στόχο (Bisignano et al., 1999). Η ελευρωπαϊνή επέδειξε επίσης ισχυρή ανάπτυξη αναστολής εναντίον του *Salmonella enteritidis*, αλλά γενικά, καλύτερα αποτελέσματα επιτεύχθηκαν με το συνδυασμό φαινολικών από εκχυλίσματα φύλων ελιάς (Lee et al., 2010). Πράγματι, τα εκχυλίσματα ελαιοτριβείων που είναι πλούσια σε φαινολικά έδειξαν ευρύ φάσμα σε αντιβακτηριακή δράση εναντίον των *Staphylococcus*

aureus, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* και *Pseudomonas aeruginosa* (Obied et al., 2007). Άλλη έρευνα για την δράση των εκχυλισμάτων από φύλλα ελιάς έδειξαν συγκεκριμένη αντιμικροβιακή δράση εναντίον του *Helicobacter pylori* και *Campylobacter jejuni*, αλλά δεν υποστηρίζεται ο ευρύς ισχυρισμός αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων (Sudjana et al., 2009). Η ελεωρωπαΐνη φαίνεται πως έχει αντική δράση στην μόλυνση και αναπαραγωγή από HIV-1, εμποδίζοντας την μετάδοση του ιού από κύτταρο σε κύτταρο και την παραγωγή ιικού πυρηνικού αντιγόνου p24 (Lee-Huang et al., 2007).

1.1.4.7.2.6. Οστεοπροστατευτική δράση

Παρόλο που η ευεργετική δράση της κατανάλωσης καρπών ελιάς και ελαιόλαδου στην υγεία των οστών είναι ευρέως γνωστή, οι βασικοί μηχανισμοί λειτουργίας παραμένουν ασαφείς. Πολλές μοριακές, ζωικές και ανθρώπινες έρευνες διεξάγονται για να απαντήσουν σε αυτό το ερώτημα, με την προσοχή στραμμένη στις ιδιότητες των προϊόντων ελιάς (Chin et al., 2016). Η ελεωρωπαΐνη μπόρεσε να προσφέρει προστατευτική δράση στην απώλεια οστών σε ζωικά δείγματα με οστεοπενία, πιθανότατα ρυθμίζοντας τις παραμέτρους της φλεγμονής (Puel et al., 2006). *In vitro* έρευνα για την οστεοβλαστογένεση και αδιπογένεση σε βλαστοκύτταρα από ανθρώπινο μυελό των οστών έδειξε πως η ελεωρωπαΐνη μπορούσε να εμποδίσει την απώλεια οστού που σχετίζεται με την γήρανση και την οστεοπόρωση, άμεσα, ενισχύοντας την διαφοροποίηση των βλαστοκυττάρων στους οστεοβλάστες και εμποδίζοντας την διαφοροποίηση των λιποκυττάρων, αλλά και έμμεσα, ρυθμίζοντας την οστεοκλαστική διαφοροποίηση (Santiago-Mora et al., 2011). Ο σχηματισμός οστεοβλαστών στο μυελό των οστών φαίνεται πως συνδέεται με την λιπογένεση, και οι αλλαγές που σχετίζονται με τη γήρανση θα μπορούσαν να ευθύνονται για την προοδευτική λιπαρογένεση του μυελού των οστών, που προκύπτει με οστεοπόρωση. Μία πολύ πρόσφατη τρανσκριπτομική ανάλυση έδειξε πως η ελεωρωπαΐνη μπορούσε να ρυθμίσει την έκφραση του 60% των γονιδίων που καταπιέζονται από την λιπαρογένεση, γεγονός το οποίο κάνει την ελεωρωπαΐνη πιθανό υποψήφιο για την πρόληψη και αντιμετώπιση ασθενειών όπως η παχυσαρκία και η οστεοπόρωση (Casado-Díaz et al., 2017). Η ελεωρωπαΐνη ανέστειλε την έκφραση των φλεγμονωδών μεσολαβητών καταστέλλοντας την ενεργοποίηση των οδών σηματοδότησης NF-κB και MAPK σε ανθρώπινα OA χονδροκύτταρα, υποδεικνύοντας ότι η ελεωρωπαΐνη μπορεί να λειτουργήσει σαν πιθανός αντί-φλεγμονώδης παράγοντας στην αντιμετώπιση της OA (Feng et al., 2017).

1.1.4.7.2.7. Άλλες δράσεις

Η μελέτη για την επούλωση τραυμάτων του δέρματος σε ζωικά υποκείμενα έδειξε ότι η ελεωρωπαΐνη επιτάχυνε τη διαδικασία επανεπιθηλίωσης, ενίσχυσε την παραγωγή ινών κολλαγόνου

και αύξησε την παροχή αίματος στην τραυματισμένη περιοχή, μέσω ρύθμισης της έκφρασης της VEGF πρωτεΐνης (Mehraein et al., 2014). Η ελευρωπαϊνή επέδειξε πως εμποδίζει την αυτό-συναρμολόγηση του κολλαγόνου στις ίνες, παρουσιάζοντας μία νέα δυνατότητα στην αντιμετώπιση ινωτικών ασθενειών (Bharathy et al., 2017). Αποτελέσματα μελέτης με βλαστοκύτταρα, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για μεταφύτευση μετά από ισχαιμικό αγγειακό επεισόδιο, δείχνει πως η σύντομη γόμωση των ανθρώπινων βλαστοκυττάρων με OLE, ίσως είναι υποσχόμενη θεραπευτική στρατηγική εναντίον ισχαιμικών αγγειακών παθήσεων (Ji et al., 2018). Μια πολύ πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι η ελευρωπαϊνή μπορεί να ρυθμίσει την αγγειογένεση έμμεσα, δρώντας σαν τοπικός ινοβλάστης, μειώνοντας την σηματοδότηση του NF-κB και την έκφραση σε διάφορους παράγοντες εκκριτικών φαινοτύπων (Margheri et al., 2019).

Πίνακας 1.5. Σχετικές μελέτες και λειτουργικά μονοπάτια της ελευρωπαϊνης (PubChem database).

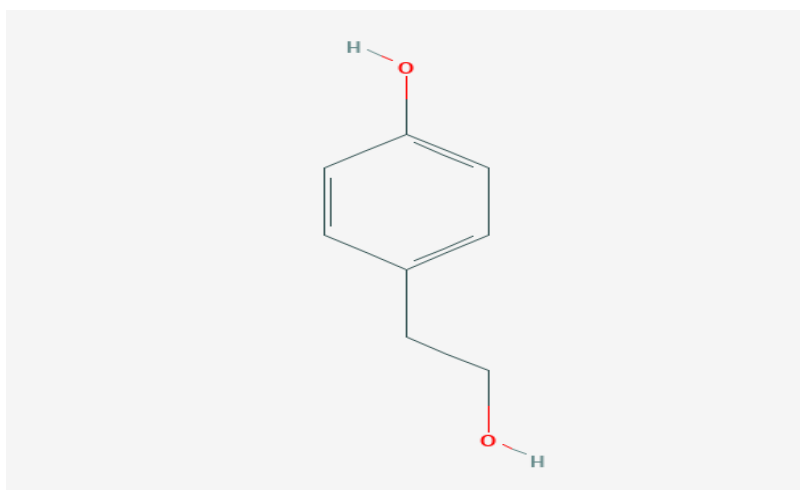
A/A	Αποτελέσματα βιολογικών δοκιμασιών όπου η ουσία που ελέγχθηκε είναι ενεργή
1	Antioxidant activity assessed as superoxide radical scavenging activity
2	Antioxidant activity assessed as DPPH radical scavenging activity
3	Antiinflammatory activity in C57BL/6 mouse DSS-induced chronic colitis model assessed
4	Inhibition of LPS-induced p38 MAPK phosphorylation in rat IEC-18 cells
5	Antiinflammatory activity in C57BL/6 mouse DSS-induced chronic colitis model
	Receptor Activity Assay: The disclosed compounds and compositions can be evaluated for their ability to act as a potentiator of metabotropic glutamate receptor activity, in particular mGluR4 activity
9	Cell Free Inhibition Assay: The inhibitory concentrations (IC ₅₀ , [μM]) of the beta -lactamase inhibitors against purified TEM-1, SHV-1 and AmpC beta -lactamases are assessed by determining the concentration of inhibitor at which 50% of the nitrocefin hydr

1.1.4.7.2.8. Μεταβολισμός

Η ελευρωπαϊνή διαχέεται στο στομάχι και είναι σταθερή στο γαστρικό επίπεδο κατά τη διάρκεια της πέψης (2 και 4 ώρες μετά την επώαση στα γαστρικά υγρά) (Vissers et al., 2002; Gikas et al., 2006). Επομένως, η βιοδιαθεσιμότητα του κύριου μεταβολίτη της υδροξυτυροσόλης είναι υψηλότερη (Corona et al., 2006; De las Hazas et al., 2017). Ο σχηματισμός διαφορετικών μεταβολιτών και η κατανομή και συγκέντρωσή τους σχετίζονται με το pH του μέσου και τον χρόνο σταθερότητας του μορίου στο στομάχι. Η OLE-aglycone που σχηματίζεται από την υδρόλυση της ελευρωπαϊνης και η OLE-a που είναι ιθαγενής παρουσία στα προϊόντα ελιάς, υδρολύονται σε υδροξυτυροσόλη ελενολικό οξύ και μεταβολίζονται περαιτέρω (De las Hazas et al., 2017). Όλες οι παραπάνω ουσίες είναι λιγότερο ανθεκτικές στην υδρόλυση του γαστρικού οξέος σε σύγκριση με

την ελευρωπαϊνή και φαίνεται πως είναι πιο ευαίσθητες στην θερμοκρασία, το pH και την ενζυμική δραστηριότητα (De las Hazas et al., 2017; Briante et al., 2002). Κατά την μεταχείριση με οξική υδρόλυση, η υδροξυτυροσόλη απελευθερώνεται από την ελευρωπαϊνή με μια μέση ανάκτηση της υδροξυτυροσόλης της τάξης του 33% περίπου συγκριτικά με την αρχική ποσότητα ελευρωπαϊνης (Miró-Casas et al., 2003). Στο παχύ έντερο, η ελευρωπαϊνή υποβαθμίζεται από τη μικροχλωρίδα η οποία παράγει υδροξυτυροσόλη που εκφράζει βιολογική δραστηριότητα προς τα μεγάλα εντερικά κύτταρα (Imran et al., 2018; De las Hazas et al., 2016).

1.1.4.7.3. Τυροσόλη (TYR)



Εικόνα 1.3. Δυσδιάστατη δομή της τυροσόλης (PubChem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)

Η τυροσόλη, φαίνεται πως είναι αποτελεσματικό κυτταρικό αντιοξειδωτικό, πιθανότατα λόγω ενδοκυτταρικής συσσώρευσης, παρά την ασθενή αντιοξειδωτική της δράση (Di Benedetto et al., 2007). Η τυροσόλη είναι μία σταθερή ουσία, επομένως, συγκριτικά με άλλες πολυφαινόλες λιγότερο υποκείμενη σε αυτοοξείδωση. Διατηρεί επίσης την αντιοξειδωτική της δράση κάτω υπό κρίσιμες συνθήκες. Σε παρουσία οξειδωμένης LDL, όταν τα φαινόμενα αυτοοξείδωσης έχουν αρχίσει, η τυροσόλη διατήρησε μία αμετάβλητη αντιοξειδωτική δράση, ενώ άλλα, πιο ενεργά φλαβονοειδή έδειξαν δραστική μείωση της αντιοξειδωτικής τους δράσης και μερικές φορές έγιναν προ-αντιοξειδωτικά (Perona et al., 2006). Αναφέρεται πως η τυροσόλη είναι αποτελεσματική στην αναστολή οξειδωτικής βλάβης των μυϊκών κυττάρων L6 μέσω αναστολής του κυτταρικού θανάτου από H₂O₂ εν μέρη μέσω ρύθμισης εξωκυτταρικής κινάσης (ERK), κινάσης JNK, και p38 MAPK και μέσω αύξησης της παραγωγής ATP (Lee et al., 2018). Μελέτη έχει επιβεβαιώσει πως η τυροσόλη κατέχει ευεργετική δράση εναντίον της υπέρτασης, της αθηροσκλήρωσης, της στεφανιαίας νόσου, της χρόνιας καρδιακής ανεπάρκειας, της αντίστασης στην ινσουλίνη και της παχυσαρκίας (Chang et al., 2019). Η τυροσόλη μειώνει τις οξειδωτικές τροποποιήσεις στην HDL και διατηρώντας τις

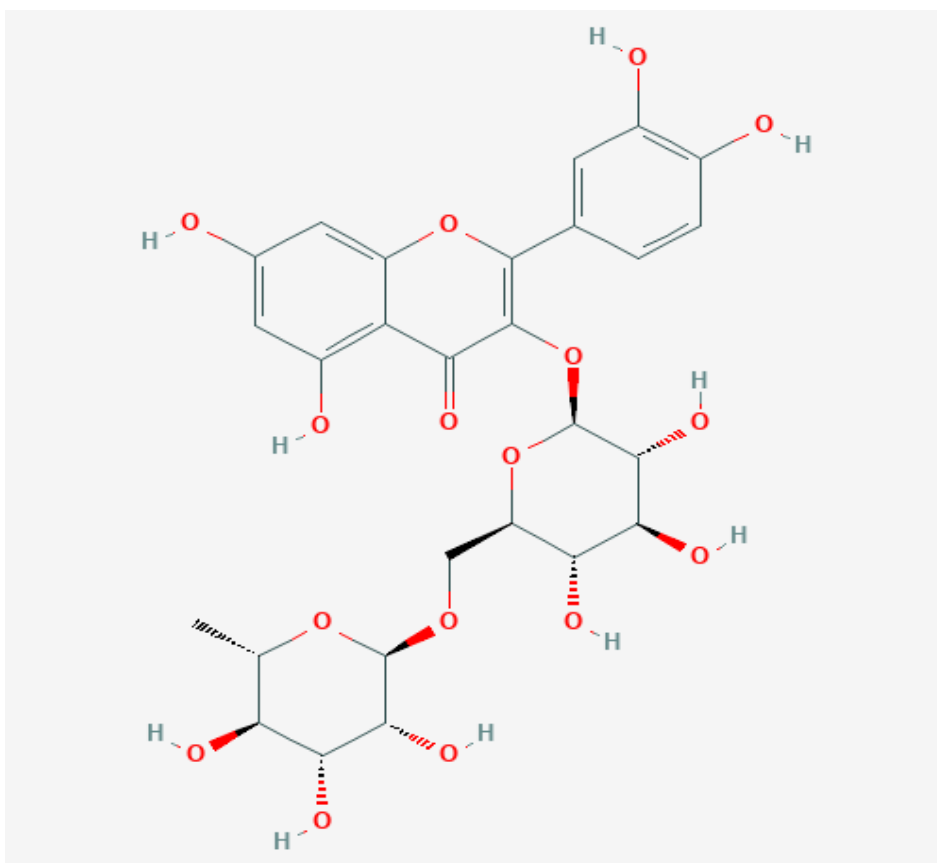
φυσικοχημικές ιδιότητες της HDL, βελτιώνει την λειτουργία της HDL, ειδικά την δυνατότητα εκροής χοληστερόλης (Berrougui et al., 2015). Κατέχει επίσης αντιαθηρογόνα δράση μέσω της αναστολής της παραγωγής λευκοτριενίου B4 που επηρεάζει την ενδοθηλιακή λειτουργία (Perona et al., 2006). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί πως η τυροσόλη προάγει μυοκαρδιακή προστασία ενάντια σε στρες που σχετίζονται με την ισχαιμία και θα μπορούσε να θεωρηθεί αντιγηραντική θεραπεία (Samuel et al., 2008). Η τυροσόλη έχει αξιολογηθεί ως υποσχόμενη ουσία που επηρεάζει την μικροκυκλοφορία, λαμβάνοντας υπόψη την αιμορρολογική της δραστηριότητα. Για παράδειγμα, πειράματα *in vitro* έδειξαν ότι η τυροσόλη περιορίζει την αύξηση ιξώδους του αίματος. Ακόμα, η επίδραση της τυροσόλη σε αιμορρολογικούς παραμέτρους και εγκεφαλική μικροαγγειοποίηση σε υπερτασικούς ποντικούς ερευνήθηκε στο επίπεδο αύξησης της πίεσης του αίματος (BP), και φάνηκε πως η τυροσόλη περιορίζει την ανάπτυξη συνδρόμου υπερβόσκησης, βελτιώνει την δυνατότητα μεταφοράς οξυγόνου και εξαφανίζει την μικροαγγειακή αρραίωση στον εγκεφαλικό φλοιό (Plotnikov et al., 2018). Σε οξεία εγκεφαλική ισχαιμία, η τυροσόλη μειώνει το ιξώδες του αίματος και την ένταση του οξειδωτικού στρες στον ιστό του εγκεφάλου (Atochin et al., 2016). Η μεταχείριση με τυροσόλη βελτίωσε την υπεργλυκαιμία ρυθμίζοντας ένζυμα κλειδιά του μεταβολισμού υδατανθράκων σε διαβητικούς ποντικούς. Η τυροσόλη ίσως παίζει σημαντικό ρόλο στην αντιμετώπιση της DM, αφού έχει αντιφλεγμονώδη δράση στο συκώτι και το πάγκρεας διαβητικών ποντικών (Chandramohan and Pari, 2016), και αναστέλλει την απόπτωση ενδοπλασματικού δικτύου στο παγκρεατικό β-κύτταρο (Lee et al., 2016), όπου η δυσλειτουργία του παγκρεατικού β-κυττάρου είναι καθοριστικός παράγοντας για την ανάπτυξη DM τύπου 2. Η τυροσόλη επίσης έχει ευεργετική επίδραση στην NAFLD, όπου το οξειδωτικό στρες είναι ένας από τους κύριους παράγοντες για την ανάπτυξη και πορεία της ασθένειας (Sarna et al., 2016). Η τυροσόλη έχει ακόμα νευροπροστατευτική δράση εναντίον της τοξικότητας στην AD (St-Laurent-Thibault et al., 2011). Επιπλέον, κατέχει ισχυρή δράση εναντίον διαφόρων βακτηριακών στελεχών, τα οποία είναι υπεύθυνα για εντερικές και αναπνευστικές μολύνσεις (Medina et al., 2006). Οι αντιβακτηριακές ιδιότητες της τυροσόλης μπορούν να συνδεθούν με την δέσμευση και αναστολή της βακτηριακής ATP συνθάσης (Amini et al., 2017). Αντιτρυπανοσωμική δράση της έχει επίσης παρατηρηθεί (Fernandez-Pastor et al., 2018). Η τυροσόλη εμπόδισε την οστεοπενία, αυξάνοντας τον σχηματισμό οστών, πιθανότατα λόγω των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων της (Puel et al., 2008). Ακόμα, η τυροσόλη επέδειξε αντιγενοτοξική δράση και μπορεί να εμποδίζει την απόπτωση κερατινοκυττάρων (Salucci et al., 2016).

Πίνακας 1.6. Σχετικές μελέτες και λειτουργικά μονοπάτια της τυροσόλη (PubChem database).

A/A	Αποτελέσματα βιολογικών δοκιμασιών όπου η ουσία που ελέγχθηκε είναι ενεργή
1	Inhibition of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> recombinant Rv1284 beta-carbonic anhydrase
2	Inhibition of <i>Cryptococcus neoformans</i> recombinant Can2 beta-carbonic anhydrase
3	Inhibition of <i>Candida albicans</i> recombinant Nce103 beta-carbonic anhydrase
4	Inhibition of NADPH oxidase in human HUVEC cells
5	Inhibition of human recombinant alpha-carbonic anhydrase 2
6	Inhibition of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> recombinant Rv3273 beta-carbonic anhydrase
7	Toxicity against <i>Choristoneura fumiferana</i>
8	Toxicity against <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
9	Inhibition of human recombinant carbonic anhydrase 2, 5A, 5B
10	Antioxidant activity assessed as oxygen radical scavenging activity
11	Activity at mushroom tyrosinase assessed as decrease in absorbance

1.1.4.7.4. Ρουτίνη (RU)

Η ρουτίνη είναι ένα φλαβονοειδές, που βρίσκεται σε αφθονία στα φυτά, όπως η ελιά. Χημικά, είναι ένας γλυκοζίτης που περιλαμβάνει φαινολονόλη αγλυκόνη κουερσετίνη και διζακχαρίτη ρουτινόζη. Έχει επιδείξει διάφορες φαρμακολογικές ιδιότητες όπως αντιοξειδωτικές, κυτταροπροστατευτικές, αγγειοπροστατευτικές, αντικαρκινικές, νευροπροστατευτικές και καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες (Javed et al., 2012; Richetti et al., 2011; Nassiri-Asl et al., 2010; Mellou et al., 2006; Trumbeckaite et al., 2006; Schwedhelm et al., 2003; Janbaz et al., 2002; La Casa et al., 2000).



Εικόνα 1.4. Δυσδιάστατη δομή της ρουτίνης (PubChem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)

1.1.4.7.4.1. Νεύρο-προστατευτική δράση

Η ρουτίνη έχει επιδείξει νευροπροστατευτική δράση στην εγκεφαλική ισχαιμία. Χορήγηση ρουτίνης προκάλεσε αραίωση την ισχαιμικής νευρωνικής απόπτωσης, μέσω της αδυναμίας έκφρασης του p53 και υπεροξειδωσής των λιπιδίων, με ταυτόχρονη αύξηση των ενδογενών αντιοξειδωτικών ενζύμων (Khan et al., 2009). Έχει βρεθεί πως είναι χρήσιμη στα υποξικά, γλουταμινικά και οξειδωτικά στρες (Pu et al., 2007). Επίσης, μετά από χορήγηση ρουτίνης παρατηρήθηκε μείωση φλεγμονές νευρών σε υποκείμενα ποντικών με σποραδική άνοια τύπου AD (Javed et al., 2012) και νευροπροστατευτική δράση σε ποντίκια με αγωγή δεξαμεθαδόνης (Tongjaroenbuangam et al., 2011). Η νευρική ακρολοφία είναι πρόγονος που αποτελείται από νευρωνικά και μεσεγγυματικά δυναμικά. Μεταχείριση με ρουτίνη σε κύτταρα του νευρικού ακρολοφίου αύξησε την ζωτικότητα τους χωρίς να αλλάξει την κυτταρική διαφοροποίηση και πολλαπλασιασμό (Nones et al., 2012). Η ρουτίνη επίσης κατέχει αντισπασμωδική δράση και φαίνεται πως είναι ασφαλής για ασθενείς με επιληψία, εφόσον δεν επηρεάζει την δράση χορηγούμενων αντιεπιληπτικών φαρμάκων ή παρουσιάζει δυσμενείς επιδράσεις (Nieoczym et al., 2014).

Η ρουτίνη κατέστειλε την δράση προφλεγμονοδών κυτοκινικών, με την ελάττωση της παραγωγής TNF-a και IL-1b στα μικρογλοία. Αυτή η δράση φαίνεται πως είναι χρήσιμη στην αντιμετώπιση του AD όπως προκύπτει από την εμπόδιση της β-αμυλοειδούς ολιγομετρικής κυπαροτοξικότητας (Wang et al., 2012). Επίσης σε υποκείμενα ποντικού, η ρουτίνη προκάλεσε αραίωση της φλεγμονής από στρεπτοζοτοκίνη και εμπόδισε μεγάλες ανατομικές μεταβολές του ιππόκαμπου. Αυτή η δράση ίσως είναι χρήσιμη σε διαγνωστικά ελλείμματα και ίσως είναι ευεργετική στην αντιμετώπιση του AD (Javed et al., 2012). Σε έρευνα για την οροφατική δυσκινησία που προκαλείται από αλοπεριδολή, η ρουτίνη ανέστρεψε τις αλλαγές συμπεριφοράς, όπως οροφατικές δυσκινητικές κινήσεις, κινητική δραστηριότητα, ποσοστιαία διατήρηση, καθώς και αποκατέστησε βιοχημικές και νευροχημικές παραμέτρους, δείχνοντας πως είναι σημαντικό μόριο για την θεραπεία υπερκινητικών κινησιακών διαταραχών (Bishnoi et al., 2007). Επιπλέον, έρευνα έδειξε την αντικαταθλιπτική δράση της ρουτίνης μέσω αύξησης της διαθεσιμότητας σεροτονίνης και νορεναδρεναλίνης στη συναπτική σχισμή (Machado et al., 2008).

1.1.4.7.4.2. Κάρδιο-προστατευτική δράση

Μείωση του οξειδωτικού στρες εκαιτίας της ρουτίνης, όταν χορηγήθηκε με κατάποση, ήταν σημαντικός λόγος για την επαναφορά ευαισθησίας στην αρτηριακή υπέρταση και αγγειακής αντιδραστικότητας σε υπερτασικούς ποντικούς (Mendes-Junior et al., 2013). Μέσω αύξησης της παραγωγής NO σε ανθρώπινα ανδοθηλιακά κύτταρα, η ρουτίνη αύξησε την ενδοθηλιακή λειτουργία (Ugusman et al., 2014). Επίσης σε έρευνα που έγινε σε ποντικούς, η ρουτίνη μείωσε την αντιπηκτική δράση της ρακεμικής βαρφαρίνης όταν συγχρηγήθηκε με άλλες φαινολικές (Chan et al., 2009). Επιπλέον, σε *in vitro* μελέτη φαίνεται πως η ρουτίνη προκάλεσε αναχαίτηση του παράγοντα ενεργοποίησης που προκαλεί συσσώρευση αιμοπεταλίων και αύξηση συγκέντρωσης ασβεστίου εντός των αιμοπεταλίων από παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (Chen et al., 2002).

1.1.4.7.4.3. Αντικαρκινική δράση

Ο καρκίνος περιλαμβάνει μια ομάδα ασθενειών οι οποίες χαρακτηρίζονται από την ανάπτυξη κυττάρων τα οποία λανθάνων επιτίθενται ή εξαπλώνονται σε διαφορετικά μέρη του σώματος. Τα φλαβονοειδή είναι γνωστά για την επίδειξη βιολογικών δράσεων. Η ρουτίνη έχει εκτενώς μελετηθεί για την αντικαρκινογόνα δράση της. Σε έρευνα, ανθρώπινης λευχαιμίας, η ρουτίνη (120 mg/kg) προκάλεσε σημαντική μείωση του μεγέθους του όγκου, επιδεικνύοντας αντιλευχαιμική δυναμική (Lin et al., 2012). Σε άλλη έρευνα, όταν χορηγήθηκε σε καρκινικά κύτταρα του εντέρου, παρατηρήθηκαν λιγότερο επιβλαβείς δράσεις στο σώμα και τα σχετικά όργανα, καθώς και αύξηση

του μέσου χρόνου επιβίωσης κατά 50 μέρες σε ποντίκια (Alonso-Castro et al., 2013). Η αντινευροβλαστωμική δράση της ρουτίνης επιδείχθηκε όταν ανέστειλε σημαντικά την ανάπτυξη LAN-5 κυττάρων και την χημειοτακτική δραστηριότητα (Chen et al., 2013). Η ρουτίνη είναι επίσης γνωστή για την αναστολή της ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων, διακόπτοντας τον κυτταρικό κύκλο ή την απόπτωση, καθώς και αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό, την αγγειογένεση και την μετάσταση σε κυτταρικές σειρές του εντέρου (Araujo et al., 2011). Ακόμα, φαίνεται πως η ρουτίνη μπορεί να δράσει ως ανοσοενισχυτικό σε θεραπείες με ραδιενεργό ιώδιο (Goncalves et al., 2013).

1.1.4.7.4.4. Άλλες δράσεις

Σε έρευνα, η χρόνια χορήγηση ρουτίνης σε διαβητικούς ποντικούς προκάλεσε μείωση της γλυκόζης στο πλάσμα, αύξηση στα επίπεδα ινσουλίνης και αποκατάσταση της περιεκτικότητας σε γλυκογόνο και γλυκολυτικά ένζυμα. Παρατηρήθηκε σημαντική ανανέωση των παγκρεατικών νησιδίων μαζί με μειωμένη λιπώδη διήθηση (Stanley Mainzen Prince and Kamalakkannan, 2006; Srinivasan et al., 2005). Η ρουτίνη απέτρεψε τα επίπεδα ενζύμων ALT, AST, και LDH στον ορό, στο ήπαρ και στην καρδιά, επιδεικνύοντας προστατευτική δράση στην ηπατική και καρδιακή τοξικότητα που σχετίζεται με την στρεπτοζοκίνη (Fernandes et al., 2010; Krishna et al., 2005). Σε άλλη μελέτη η ρουτίνη διέγειρε την πρόσληψη γλυκόζης στους πελματικούς μύες, πιθανότατα από την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης κινάσης 2 και του εξωκυτταρικού ασβεστίου (Kappel et al., 2013). Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε ποντίκια με υπερχοληστερολαιμική διατροφή, η ρουτίνη μείωσε σημαντικά τα επίπεδα τριγλυκεριδίων πλάσματος (Kanashiro et al., 2009). Ταυτόχρονα, η ρουτίνη προκαλεί μείωση στα επίπεδα ολική χοληστερόλης και HDL (Da Silva et al., 2001). Σε ποντίκια με διατροφή υψηλή σε χοληστερόλη, η χορήγηση ρουτίνης επέδειξε προστατευτική δράση έναντι της ηπατοτοξικότητας, μέσω μείωσης των επιπέδων τρανσαμινάσης, αμινοτρασφεράσης, τριγλυκεριδίων, συνολικής χοληστερόλης και LDL χοληστερόλης (Al-Rejaie et al., 2013).

Σε οστεογονική έρευνα, η ρουτίνη προκάλεσε πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση των ανθρώπινων οστεοβλαστικών κυττάρων MG-63 και αύξηση της αλκαλικής φωσφατάσης και της έκφρασης κολλαγόνου τύπου 1 (Hyun et al., 2014). Όμοια δράση παρατηρήθηκε και σε κρανιακά οστεοβλαστικά κύτταρα (Yang et al., 2006). Η ρουτίνη ανέστειλε τον σχηματισμό οστεοκλαστών (Kyung et al., 2008), και την οστεοπενία σε ποντικούς μέσω της μείωσης απορρόφησης και αύξησης δραστηριότητας οστεοβλαστών (Horcajada-Molteni et al., 2000).

Μελετήθηκε επίσης η αντιασθματική δραστηριότητα της Ρουτίνης και αποδείχθηκε πως ανέστειλε σημαντικά την αντίσταση συγκεκριμένων αεραγωγών και η απόκριση άμεσης φάσης με ταυτόχρονη διατήρηση ισταμίνης, φωσφολιπάσης A2 και υπεροξειδάσης ηωσινόφιλων. Υπήρξε

μειωμένη προσθήκη ουδετερόφιλων και ηωσινόφιλων στον πνεύμονα (Jung et al., 2007). Η χρήση της ρουτίνης επίσης προτείνεται για τον κοκίτη μαζί με βιταμίνη C και K (De Sarmento and Kimura, 1957). Σε μελέτη σε γάτες, η ρουτίνη χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς για την ιδιοπαθούς χυλοτορικού (Kopko, 2005; Gould, 2004; Schuller et al., 2011).

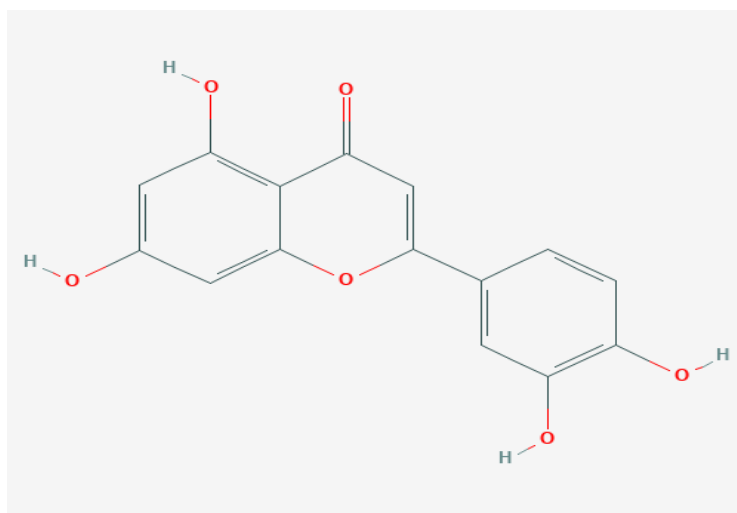
Η ρουτίνη έχει επίσης μελετηθεί ως προς την αντιμικροβιακή δράση της εναντίον διαφόρων στελεχών βακτηρίων. Έχει αποδειχθεί πως εμποδίζει την ανάπτυξη του βακτηρίου *Escherichia coli* (Araruna et al., 2012) και έχει ανασταλτική δράση στα *Proteus vulgaris*, *Shigella sonnei* και *Klebsiella sp.* (de Queiroz Pimentel et al., 2013). Αντιμικροβιακή δράση έχει επίσης καταγραφεί εναντίον των *Pseudomonas auruginossa* και *Bacillus subtilis* (Dubey et al., 2013a,b). Σε άλλη έρευνα, η ρουτίνη επέδειξε συνεργιστική αντιβακτηριακή δράση, μαζί με άλλα φλαβονοειδή, εναντίον του *Bacillus cereus* και *Salmonella enteritidis*. Η ρουτίνη έχει επίσης επιδείξει σοβαρή αντική δράση κατά τους στελέχους γρίπης H5N1 (Ibrahim et al., 2013).

Πίνακας 1.7. Σχετικές μελέτες και λειτουργικά μονοπάτια της ρουτίνης (PubChem database).

A/A	Αποτελέσματα βιολογικών δοκιμασιών όπου η ουσία που ελέγχθηκε είναι ενεργή
1	Inhibition of AChE (unknown origin)
2	Antioxidant activity in BALB/c mouse BM cells assessed as inhibition of ROS production
3	Antioxidant activity assessed as nitric oxide scavenging activity by fluorescent triazofluorescein formation assay
4	Agonist activity at human NMU2R transfected in HEK293 cells
5	Antiviral activity against Dengue virus assessed as inhibition of viral replication
6	Inhibition of beef heart mitochondrial NADH oxidase
7	Antioxidant activity assessed as nitric oxide scavenging activity
8	Antioxidant activity assessed as inhibition of superoxide production
9	Antioxidant activity assessed as DPPH radical scavenging activity
10	Binding affinity to adrenergic alpha2A receptor
11	Antioxidant activity assessed as reduction of Cu ²⁺ to Cu ⁺

1.1.4.7.5. Λουτεολίνη (LUT)

Η λουτεολίνη είναι μία σημαντική φλαβονοειδής ουσία, η οποία βρίσκεται σε διάφορα φυτικά είδη (Kim et al., 2000; Peters et al., 1986). Μία αυξανόμενη βιβλιογραφία δείχνει ότι η λουτεολίνη κατέχει αντιοξειδωτικές, αντικαρκινικές, αντιφλεγμονώδεις και νευροπροστατευτικές ιδιότητες (Chen et al., 2008; Cheng et al., 2010; Dirscherl et al., 2010; Kang et al., 2004; Lin et al., 2008; Pandurangan and Esa, 2014; Qiao et al., 2012; Theoharides et al., 2015; Zhang et al., 2013).



Εικόνα 1.5. Δυσδιάστατη δομή της λουτεολίνης (PubChem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)

1.1.4.7.5.1. Νεύρο-προστατευτική δράση

Συνεχής χορήγηση λουτεολίνης έχει δείξει πως εξασθενεί το οξειδωτικό στρες στα κύτταρα νευροπλάσματος (Zhou et al., 2011). Αγγολυτικές δράσεις της λουτεολίνης έχουν αναφερθεί μετά από στοματική χορήγηση, αναφέροντας ότι μπορεί να διαπεράσει το φράγμα αίματος εγκεφάλου (Coleta et al., 2008).

Εκτός την πιθανής αντιφλεγμονώδους και αντιοξειδωτικής της δράσης, η λουτεολίνη φαίνεται πως αναστέλλει την απελευθέρωση φλεγμονικών ρυθμιστών από ανθρώπινα μαστοκύτταρα (Kempuraj et al., 2005). Επίσης μπορεί να μειώσει συμπεριφορικές ελλείψεις λόγω αυτισμού, σε κοινωνικές αλληλεπιδράσεις σε έρευνα που έγινε σε ποντίκια (Kempuraj et al., 2005), υποδεικνύοντας ότι βελτιωμένα σκευάσματα ίσως να είναι χρήσιμα κατά του αυτισμού. Ομοίως, σε έρευνα που περιλάμβανε 50 παιδιά με αυτισμό, αναφέρεται ότι υπήρξε σημαντική βελτίωση στις προσαρμοστικές λειτουργίες, όταν ακολουθήθηκε συμπλήρωση της διατροφής με συνδυασμό λουτεολίνης και κουερτσίνης για 26 εβδομάδες (Taliou et al., 2013).

Έρευνα έδειξε ότι η λουτεολίνη μπορεί να βελτιώσει την νευροτοξικότητα σε τεμάχιο του νευρώνα του φλοιού σε ποντίκια λόγω της πιθανής αντιοξειδωτικής δράσης (Choi et al., 2014). Αποδείχθηκε πως είχε καλύτερη δράση από άλλα φλαβονοειδή που συγκρίθηκε, αλλά χαμηλότερη από τη ρουτίνη, υποδεικνύοντας ότι θα μπορούσε να αναπτυχθεί ως νευροπροστατευτικός παράγοντας κατά του AD. Άλλη πρόσφατη έρευνα έδειξε πως η συνδυαστική θεραπεία με PEA και λουτεολίνης μπορούσε να εξασθενήσει την νευροφλεγμονή σε πειραματικά υποκείμενα AD, βελτίωσε την κυτταρική βιωσιμότητα, μείωσε σημαντικά την έκφραση συνθάσης νιτρικού οξειδίου και γλουκικής όξινης πρωτεΐνης και μείωσε την απόπτωση διαφοροποιημένων κυτταρικών σειρών νευροβλαστώματος.

Οι νευροτοξίνη 6-OHDA έχει όμοια δομικά χαρακτηριστικά με την ντοπαμίνη και την νοραδρεναλίνη και προκαλεί τον κυτταρικό θάνατο μέσω γενεών ελεύθερων ριζών και κυτταροτοξικών κινίνων. Πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι χορήγηση λουτεολίνης μπορούσε να εξασθενήσει την παραγωγή οξειδωτικού στρες από 6-OHDA, την κυτταροτοξικότητα και την ενεργοποίηση κασπάσης-3 στα PC12 κύτταρα (Hu et al, 2014). Άλλη έρευνα έδειξε πως χορήγησε λουτεολίνη (10 και 20 mg/kg) μπόρεσε να βελτιώσει κινητικές και μυϊκές αλλαγές σε ποντίκια, που έχουν προκληθεί από MPTP, πρόδρομου της νευροτοξίνης MPP⁺ (Patil et al, 2014). Αυτές οι αλλαγές συνέβησαν με παράλληλη μείωση νευροτροφικών παραγόντων, ινώδους οξικής πρωτεΐνης (GFAP) και νευροτροφικού παράγοντα του εγκεφάλου (BDNF). Στα ποντίκια, τα επίπεδα BDNF βελτιώθηκαν σημαντικά με την χορήγηση λουτεολίνης και απιγενίνης, συγκριτικά με χορήγηση μόνο MPTP. Τα παραπάνω ευρήματα υποδεικνύουν πως η λουτεολίνη μπορεί να προστατεύσει τους ντοπαμινεργικούς νευρώνες από οξειδωτικό στρες, νευρογλεγμονή, γλοιακή ενεργοποίηση.

Αναδυόμενα στοιχεία δείχνουν ότι τα Φλαβονοειδή μπορούν ίσως να βελτιώσουν τη γνωστική εξασθένηση μέσω της ισχυρής αντιοξειδωτικής και αντιφλεγμονώδης δράσης τους. Αρκετές έρευνες έχουν δείξει ότι η λουτεολίνη μπορεί να βελτιώσει τη χωρική μάθηση και μνήμη σε ποντίκια με αμνησία, μέσω της ρύθμισης της μικροαγγειακής λειτουργίας και της νευρικής δραστηριότητας (Liu et al., 2009). Επίσης, έρευνα έδειξε ότι η χορήγηση λουτεολίνης (50 και 100 mg/kg) μπόρεσε να αποδυναμώσει τη γνωστική εξασθένηση, μειώνοντας τη νευρική βλάβη, την υπεροξείδωση των λιπιδίων και την AChE δραστηριότητα (Liu et al., 2013). Επίσης, μελέτη έδειξε πως η χορήγηση λουτεολίνης (30 και 50 mg/kg) μπορεί να εξασθενήσει την εγκεφαλική βλάβη που προκαλείται από νευρολογικά ελλείμματα, περιεχόμενο νερού στον εγκέφαλο και νευρική απόπτωση (Xu et al., 2014).

Πίνακας 1.8. Σχετικές μελέτες και λειτουργικά μονοπάτια της ρουτίνη (PubChem database).

A/A	Αποτελέσματα βιολογικών δοκιμασιών όπου η ουσία που ελέγχθηκε είναι ενεργή
1	Inhibition of human recombinant carbonic anhydrase 7
2	Inhibition of CYP1B1 EROD activity assessed as inhibition of deethylation of 7-ethoxyresorufin to resorufin
3	Inhibition of human recombinant carbonic anhydrase 12
4	Binding affinity to TTR (unknown origin) by isothermal titration calorimetric analysis
5	Inhibition of human CYP1B1 by EROD assay
6	qHTS for Inhibitors of Polymerase Kappa
7	Inhibition of human recombinant carbonic anhydrase 4
8	Inhibition of human recombinant aldose reductase
9	Inhibition of Xanthomonas oryzae pv. oryzae KS-1-21 uridyltransferase domain of GlmU activity
10	Inhibition of recombinant human CK2 expressed in Escherichia coli
11	Inhibition of human CYP1A2

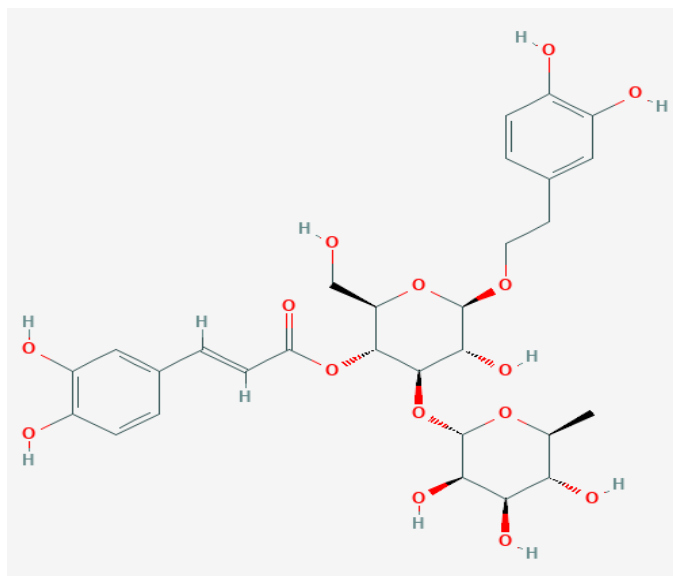
1.1.4.7.5.2. Αντι-καρκινική δράση

Η λουτεολίνη προκαλεί αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο σε μια ποικιλία καρκίνων (**Cheng et al., 2005; Lee et al., 2005; Monasterio et al., 2004; Chiang et al., 2007**), αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων (**Lim et al., 2007; Fang et al., 2007; Kandaswami et al., 2005**), και καταστέλλει την ογκική αγγειογένεση (**Bagli et al., 2004**). *In vivo* πειράματα σε ποντίκια με όγκους ξενομοσχεύματα έδειξαν ότι η λουτεολίνη κατέστειλε την ανάπτυξη των όγκων από ανθρώπινο καρκίνωμα δέρματος, ηπατώματος και καρκινικά κύτταρα ωσθήκης (**Selvendiran et al., 2006; Bagli et al., 2004; Chiang CT et al., 2007**). Σε άλλη έρευνα με ποντίκια, η λουτεολίνη μείωσε το ποσοστό περιστατικών όγκων και μείωσε την μάζα του όγκου σημαντικά χωρίς να επηρεάσει το συνολικό σωματικό βάρος του υποκειμένου. Η μακροπρόθεσμη χορήγησή της επίσης δεν έδειξε κάποια τοξικότητα (30 mg/kg, 20 μέρες) (**Samy et al., 2006**), δείχνοντας ότι είναι ασφαλής όταν χρησιμοποιείται σαν αντικαρκινικός παράγοντας.

1.1.4.7.6. Βερμπασκοζίτης (VER)

Ο βερμπασκοζίτης είναι ανάμεσα τους πιο διαδεδομένους δισακχαρίτες καφεολικούς εστέρες. Κυρίως εμφανίζεται σε είδη *Verbascum* (**Alipieva et al., 2014**), αλλά υπάρχει σε πάνω από

200 φυτικά είδη (Deepak et al., 1999; Schlauer et al., 2004; Taskova et al., 2005) που ανήκουν σε 23 διαφορετικές οικογένειες φυτών. Έχει ανιχνευτεί σε υπόγεια φυτικά μέρη, όπως ρίζες και σε υπέργεια μέρη του φυτού όπως φύλλα, καρποί, άνθη, κ.α., αλλά ανάλογα με το φυτικό μέρος τα επίπεδα συγκέντρωσης διαφέρουν σημαντικά. Παραδοσιακά, φυτά με υψηλή συγκέντρωση βερμπασκοζίτη έχουν χρησιμοποιηθεί για την αντιμετώπιση φλεγμονωδών και μικροβιακών λοιμώξεων (Georgiev et al., 2012). Συνεπώς έχουν γίνει διάφορες έρευνες για την αντιμικροβιακή και αντιμυκητιακή δράση τους.



Εικόνα 1.6. Δυσδιάστατη δομή του βερμπασκοζίτη (PubChem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)

Έρευνες που έχουν περιγράψει την αντιφλεγμονώδη δράση του βερμπασκοζίτη εστιάζουν στην αναστολή της ισταμίνης και την απελευθέρωση ραχιδονικού οξέος από κύτταρα του μαστού (Lee et al., 2006). Η ανασταλτική δράση του βερμπασκοζίτη εξαρτάται από την παρουσία Ca^{2+} και σχετίζεται με την αναστολή της φωσφολιπάσης A2 (Song et al., 2012). Η αντιγλεμμονώδης και αντιερεθιστική δράση του βερμπασκοζίτη έχει αποδοθεί στην ικανότητα του να αναστείλει την απελευθέρωση συνθάσης νιτρικού οξειδίου (iNOS) και NO από μακροφάγα που διεγείρονται από βακτηριακούς λιποπολυσακχαρίτες (Picerno et al., 2005). Επίσης η αναστολή του iNOS έχει αποδειχθεί *in vivo* και *in vitro* (Marzocco et al., 2007). Παράλληλα με την αναστολή του iNOS, ο βερμπασκοζίτης παρακίνησε την οξυγενάση 1, ενώ κατέστειλε την απελευθέρωση του υψηλής κινητικότητας πλαισίου ομάδας 1 σε *in vitro* και *in vivo* πειράματα (Seo et al., 2013). Ο αντι-iNOS μηχανισμός του Βερμπασκοζίτη έχει συνδεθεί με την καταστολή δύο παραγόντων μεταγραφής (NFkB και AP-1) (Lee et al., 2005). Η ενεργοποιός πρωτεΐνη 1 (AP-1) είναι ένας μεταγραφικός ρυθμιστής της έκφρασης κυτοκίνης στα οστά, το δέρμα, τα ανοσοκύτταρα και ένας σημαντικός ρυθμιστής την αντιφλεγμονώδους διαδικασίας σε χρόνιες φλεγμονώδεις ασθένειες, όπως η αρθρίτιδα, η ψωρίαση και η νόσος του Κρον (Zenz et al., 2008) και έχει επίσης αναγνωριστεί ο ρόλος της στον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, τη νεοπλασματική μεταμόρφωση και απόπτωση (Saulian and Karin, 2001), κάνοντάς την στόχο για θεραπευτικές διεργασίες. Ο βερμπασκοζίτης

είναι το μόνο καθιερωμένο παράδειγμα της συνδυαστικής αναστολής της έκφρασης και δέσμευσης DNA και των δύο αντιφλεγμονικών μεταγραφικών παραγόντων AP-1 και NFκB (Pastore et al., 2009;2012a). Υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν τον ρυθμιστικό ρόλο του βερμπασκοζίτη στην αγγειακή φλεγμονή, η οποία προκαλείται από χαμηλής πυκνότητας οξειδωμένες πρωτεΐνες που οδηγούν σε αθηροσκλήρωση. Ο βερμπασκοζίτης επιλεκτικά εμποδίζει την οξείδωση αυτών των πρωτεϊνών και απορυθμίζει γονίδια που συνδέονται με το οξειδωτικό στρες και τις φλεγμονές. Ο βερμπασκοζίτης επίσης μπορεί να επιδράσει στην έκφραση γονιδίων μέσω μιας ποικιλίας διαφορετικών οδών σηματοδότησης με αποτέλεσμα την αναστολή προγλεγμονοδών κυτοκινών και παραγόντων ανάπτυξης (Korkina et al., 2011; Potapovich et al., 2011). Έρευνα σε εντερική φλεγμονή που προκαλείται από θεική δεξτράνη έδειξε πως η χορήγηση βερμπασκοζίτη βελτίωσε τα ιστολογικά σχήματα και τα συμπτώματα κολίτιδας, απορύθμισε την έκκριση προ-φλεγμονόδους IFN-γ και ανέστειλε την οξειδωτική έκρηξη σε εντερικά μακροφάγα (Hausmann et al., 2007; Lenoir et al., 2011). Διαιτητικής παρέμβαση με βερμπασκοζίτη αποδείχθηκε πως αποτρέπει εντερικές βλάβες και την νιτροζυλίωση πρωτεΐνης σε έρευνα που έγινε σε γουρούνια (Di Giancamillo et al., 2013). Άλλη μελέτη έδειξε πως ο η χορήγηση βερμπασκοζίτη έδειξε την υψηλότερη συνδυαστική δράση επούλωσης πληγών, αντιφλεγμονώδης όταν συγκρίθηκε με άλλους γλυκοζίτες, ενώ παράλληλα δεν παρουσίασε καμία τοξικότητα ή γαστρική βλάβη (Akdemir et al., 2011). Η ισχυρή αντιφλεγμονώδης και επούλωτική δράση έχει αποδειχθεί επίσης σε τομές και πληγές ζωικών μοντέλων (Korkina et al., 2007).

Πίνακας 1.9. Σχετικές μελέτες και λειτουργικά μονοπάτια του βερμπασκοζίτη (PubChem database).

A/A	Αποτελέσματα βιολογικών δοκιμασιών όπου η ουσία που ελέγχθηκε είναι ενεργή
1	Cytotoxicity against human HCT15 cells assessed as inhibition of cell growth
2	Inhibitors of T. brucei phosphofructokinase
3	Cytotoxicity against human A549 cells assessed as inhibition of cell growth
4	Inhibitory activity against HIV-1 integrase
5	Inhibition of human recombinant PKCalpha
6	Inhibition of rat brain PKC by mixed micellar assay
7	Cytotoxicity against human LoVo cells
8	Antiinflammatory activity against mouse J774A1 macrophages assessed as inhibition of LPS-induced iNOS expression
9	Antioxidant activity assessed as DPPH radical scavenging activity
10	Primary biochemical fluorescence polarization-based high throughput screening assay to identify inhibitors of protein arginine methyltransferase 1 (PRMT1)

Για το ανθρώπινο δέρμα, η ακτινοβολία UV αντιπροσωπεύει ένα δραματικό περιβαλλοντικό ερέθισμα το οποίο ευθύνεται για μεγάλο αριθμό παθολογικών εκδηλώσεων τα οποία οδηγούν σε γήρανση και καρκίνο. Θεωρητικά, οι φυτικοί δευτερογενείς μεταβολίτες για την προστασία από την ακτινοβολία UV έπρεπε να είναι φωτοσταθεροί και να μην προωθούν φωτοχημικές αντιδράσεις στα συστατικά του δέρματος. Θα μπορούσαν να μετατρέψουν της αλληλεπιδράσεις UV-δέρματος σε διαφορετικά σημεία όπως η απορρόφηση UVA, UVB, η διακοπή αντιδράσεων που προκαλούνται από την UV ακτινοβολία στα συστατικά του δέρματος, η προστασία ενδογενών αντιοξειδωτικών, η προαγωγή ενδογενών αντιοξειδωτικών συστημάτων στα κερατινοκύτταρα, η εξασθένιση φλεγμονώδους απόκρισης στα ερατινοκύτταρα, και η διαμόρφωση μεταβολικών και πολλαπλασιαστικών αντιδράσεων στο στρες. Η αντίδραση πολυφαινόλων, συμπεριλαμβανομένων του βερμπασκοζίτη και της ρουτίνης, ερευνήθηκε στις παραπάνω διεργασίες (**Kostyuk et al., 2013**). Φάνηκε πως ο βερμπασκοζίτης ήταν η καλύτερη πολυφαινόλη για τοπική φωτοπροστασία και κατά συνέπεια προστασία από καρκίνους δέρματος. Γενικά, οι κυτταρικές διαδικασίες που προκαλούνται από τη UV ακτινοβολία μπορούν να χωριστούν σε δύο φάσεις. Η πρώτη περιλαμβάνει φωτοφυσικά και φωτοχημικά γεγονότα που συμβαίνουν κατά την διάρκεια και ακολουθούν την έκθεση σε UV. Αυτά τα γεγονότα προκαλούν την δεύτερη φάση που περιλαμβάνει μοριακές, βιοχημικές και κυτταρικές αλλαγές. Νέα δεδομένα υποστηρίζουν πως ο βερμπασκοζίτης είναι αποτελεσματικός στην αναστολή της δεύτερης φάσης των φλεγμονοδών και μεταβολικών αντιδράσεως στην UV ακτινοβολία σε ανθρώπινα κερατινοκύτταρα (**Potapovich et al., 2013**). Έχει αποδειχθεί πως ο βερμπασκοζίτης αναστέλλει αποτελεσματικά την παραγωγή μελανίνης, η οποία προκαλείται από το UV και την διεγερτική ορμόνη α-μελανοκυτταρική, σε κύτταρα μελανώματος, μέσω απορρύθμισης της τυροσινάσης, η οποία είναι βασικό ένζυμο που εμπλέκεται στη διαδικασία σύνθεσης μελανίνης (**Munoz et al., 2013; Son et al., 2011**). Επίσης, ο βερμπασκοζίτης προστάτευσε τα κύτταρα επιτυχώς από νέκρωση που προκαλείται από το UV (**Kostyuk et al., 2008; Pastore et al., 2009**).

Σε πρόσφατες έρευνες που διερεύνησαν την κυτταροπροστατευτική δράση του βερμπασκοζίτη, μεταξύ άλλων φαινολικών ενώσεων, έδειξαν πως οι ουσίες αυτές προστατεύουν τα ανθρώπινα κύτταρα όχι μόνο λόγω της απευθείας αντιοξειδωτικής τους δράσης και της δράσης δέσμευσης ελεύθερων ριζών, αλλά και λόγω της αναπροσαρμογής ενδογενών συστημάτων αποτοξίνωσης (**Sgarbossa et al., 2012**). Οι νευροπροστατευτικές δράσεις του βερμπασκοζίτη έχουν μελετηθεί σε διάφορα πειραματικά μοντέλα. Σε έρευνα που μελετήθηκε η προστατευτική δράση του βερμπασκοζίτη στην απόπτωση και το οξειδωτικό στρες σε νευρικά κύτταρα, αποδείχθηκε πως ο βερμπασκοζίτης μείωσε σημαντικά των αποπτωτικό θάνατο των κυττάρων, ενώ ταυτόχρονα αύξησε τα επίπεδα εξωκυτταρικού υπεροξειδίου του υδρογόνου. Συνεπώς, εξήχθη το συμπέρασμα της ευεργετικής δράσης στις νευροκεφελιστικές ασθένειες. Σε παρόμοια έρευνα των ίδιων ερευνητών,

μελετήθηκε η δράση του βερμπασκοζίτη σε νευρικά κύτταρα, αποδείχθηκε πως η χορήγηση βερμπασκοζίτη (0,1, 1, 10 mg/l) μπόρεσε να μειώσει το εύρος απόπτωσης από 38,9% σε 29,5% και να απενεργοποιήσει την κασπάση-3. Ως αποτέλεσμα, η ουσία προτείνεται από τους ερευνητές ως χρήσιμη ουσία για την θεραπεία της PD. Επιπλέον, σε άλλη μελέτη, αποδείχθηκε πως ο βερμπασκοζίτης μπόρεσε να αναστείλει την νευροτοξικότητα σε νευρώνες της παραγκεφαλίδας, μέσω αναστολής οδών που σχετίζονται με την απόπτωση (**Pu et al., 2003**). Σε έρευνα για την δράση του βερμπασκοζίτη στο AD, φάνηκε πως αναστέλλει την συσσωμάτωση αμυλοειδούς-β πρωτεΐνης με δοσοεξαρτώμενο τρόπο, υποδηλώνοντας ότι το τμήμα κατεχόλης της ένωσης ίσως ευθύνεται για την αναστολή αυτή (**Kurisu et al., 2013**). Η αναστολή της συσσωμάτωσης από μικρά μόρια φαίνεται πως είναι υποσχόμενη στρατηγική για την αντιμετώπιση του AD. Ο βερμπασκοζίτης είναι πιθανός αναστολέας της συσώρευσης αμυλοειδούς πρωτεΐνης, καθώς προστατεύει τα νευρικά κύτταρα από τραυματισμούς που προκαλούν οι αμυλοειδής πρωτεΐνες. Νευρικά κύτταρα τα οποία υποβλήθηκαν σε Αβ-προκαλούμενη κυτταροτοξικότητα *in vitro* χρησιμοποιώντας HO-1, ένα ένζυμο που συμμετέχει στην νευρική προστασία, όταν χορηγήθηκε βερμπασκοζίτης έδειξαν πως προστατεύονται μέσω ενεργοποίησης του HO-1 και της μετατόπισης του παράγοντα μεταγραφής Nrf2 (**Wang et al., 2012**). Σε άλλη μελέτη, που αξιολογήθηκε η ανασταλτική δράση του βερμπασκοζίτη κατά της ολιγοπεπτιδάσης (POP) που συμμετέχει στην παθογένεια του AD, φάνηκε πως ανέστειλε επιτυχώς την POP (**Filho et al., 2012**). Η ενισχυτική δράση μνήμης του βερμπασκοζίτη καθιερώθηκε επίσης σε πειράματα που έγιναν σε ποντίκια (**Lee et al., 2006; Lin et al., 2012**). Η οξειδωτική δράση που προκαλείται από ROS θεωρείται ένας από τους ενεργοποιητικούς παράγοντες του νευροεκφυλισμού και της γήρανσης και συμμετέχει σε αρκετές νευροεκφυλιστικές ασθένειες. Ο βερμπασκοζίτης αποδείχθηκε ότι ασκεί ισχυρή αντιοξειδωτική δράση σε πολλά πειραματικά υποκείμενα (**Korkina, 2007**). Επιπλέον, έχει αναφερθεί η αντιοξειδωτική ικανότητα, μέσω στοματικής χορήγησης, στην ενδυνάμωση των ενδογενών αμυνών σε διάφορα ζωικά υποκείμενα, χωρίς να αναφερθεί τοξικότητα σε δόσεις μέχρι 2000 mg/kg (**Funes et al., 2009; Quirantes-Pine et al., 2013**).

Έχει υποτεθεί ότι ο βερμπασκοζίτης θα μπορούσε να έχει αντικαρκινικές, κυτταροτοξικές και αντιμεταστατικές ιδιότητες λόγω των οιστρογονικών και αντιοιστρογονικών λειτουργιών του (**Korkina et al., 2007; Papoutsi et al., 2006**). Πρόσφατες δημοσιεύσεις δείχνουν ότι ο βερμπασκοζίτης μπορεί να θεωρηθεί ως πιθανός χημειοθεραπευτικός παράγοντας που είναι ικανός να αναστείλει τον πολλαπλασιασμό κυττάρων όγκων και να επηρεάσει την διαφοροποίηση και απόπτωσή τους. *In vitro*, έχει φανεί πως ο βερμπασκοζίτης δρα αντι-πολλαπλασιαστικά εναντίον ογκικών κυττάρων (**Wartenberg et al., 2013**), επηρεάζει την κυτταρική διαφοροποίηση ανθρώπινου γαστρικού καρκινώματος (**Zhang et al., 2002**) και επιδιορθώνει βλάβες του DNA από οξειδωτικό στρες (**Li et al., 2000**). Σε έρευνες έχει αποδειχθεί ότι ο βερμπασκοζίτης είναι ισχυρός επαγωγέας

τερματικής διαφοροποίησης κυττάρων λευχαιμίας (**Wartenberg et al., 2003; Zhang et al., 2002**), συνεπώς προτείνεται η διερεύνηση του για την αντιμετώπιση ασθενών με λευχαιμία.

1.1.5.1 Παράγοντες που επηρεάζουν τη βιοσύνθεση των φαινολικών ενώσεων

Η ηλικία του ιστού, το στάδιο ανάπτυξης, οι βιοτικοί παράγοντες, ο γονότυπος, οι εδαφικοί παράγοντες, το μικροκλίμα και οι καλλιεργητικές φροντίδες είναι από της σημαντικότερους παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν τη βιοσύνθεση του φαινολικών ενώσεων, γιατί επηρεάζουν το μεταβολισμό τους και αλλάζουν τις ποσοτικές σχέσεις των ομάδων μεταξύ τους (**Karakaya and Nehir, 1999**). Το στάδιο ανάπτυξης και τα μέρη του φυτού επηρεάζουν τη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων (**Wand and Lin, 2000**). Το φαινόμενο της παρενιαυτοφορίας, που συναντάται στην ελιά, επιδρά στη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων (**Ryan et al., 2003**). Διαφορετικές συγκεντρώσεις των φαινολικών ενώσεων παρουσιάζονται όχι μόνο σε διαφορετικές ποικιλίες ίδιου είδους αλλά και στην ίδια ποικιλία ανάλογα με την εποχή συγκομιδής (**Ryan et al., 1999**). Η έλλειψη ή η περίσσεια ενός θρεπτικού στοιχείου μπορεί επίσης να προκαλέσει αλλαγές στις συγκεντρώσεις φαινολικών ενώσεων. Για παράδειγμα, η έλλειψη αζώτου μπορεί να οδηγήσει σε σύνθεση μεταβολιτών που περιέχουν αποκλειστικά άτομα άνθρακα στο μόριο τους (**Hamilton et al., 2001; Gershenzon, 1984**). Σημαντικοί παράγοντες που ορίζουν το προφίλ των φαινολικών ενώσεων σε ένα είδος καλλιέργειας είναι η γεωγραφική διαφοροποίηση των φυτών, η γενετική ιδιοσυστασία τους, το στάδιο ανάπτυξης ανάλογα με την εποχή του χρόνου και η έκθεση σε παθογόνα (**Appel, 1993**). Επίσης, ο σχηματισμός φλαβονών και φλαβονολών προάγεται από την παρουσία φωτός, έτσι τα εξωτερικά μέρη του φυτού παρουσιάζουν υψηλότερη συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων συγκριτικά με τα πιο σκιερά μέρη του φυτού (**Kubasek et al., 1998**). Στην ελιά ειδικότερα, μέσω της μείωσης δραστηριότητας της οξειδάσης σε συνθήκες ξηρασίας πραγματοποιείται αύξηση των φαινολικών ενώσεων στους ιστούς (**Sofa et al., 2005**). Επιπλέον, η ρύπανση του περιβάλλοντος, το έδαφος και οι θερμοκρασίες αποθήκευσης επηρεάζουν τη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων στο φυτό (**Figueiredo et al., 2008; Wang and Stretch, 2001**).

Η προσβολή από εχθρούς και ασθένειες και κάθε είδους βλάβη προκαλεί αύξηση των επιπέδων των φαινολικών ενώσεων, λόγω της σημαντικής συμμετοχής των φαινολικών ενώσεων στους μηχανισμούς άμυνας των φυτών. Ακόμα, η γεωγραφική τοποθεσία επηρεάζει τη σύνθεση των φαινολικών ενώσεων, επηρεάζοντας έτσι το τελικό προϊόν.

Τέλος, σημαντική επίδραση στο φαινολικό περιεχόμενο έχει ο τρόπος επεξεργασίας του τελικού προϊόντος.

1.1.5.2. Επεξεργασία προϊόντων επιτραπέζιας ελιάς

Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του καρπού πραγματοποιείται υδρόλυση των φαινολικών ενώσεων. Η υδρόλυση των φαινολικών ενώσεων μπορεί να συνεχιστεί και μετά την συγκομιδή του καρπού λόγω της δραστηριότητας ενζύμων από βακτήρια γαλακτικού οξέος (Nychas et al., 2002). Με σκοπό τη δημιουργία βρώσιμων προϊόντων και για την ελάττωση της πικρότητας του καρπού, οι ελιές υπόκεινται σε επεξεργασία. Οι μέθοδοι επεξεργασίας του καρπού της ελιάς επηρεάζουν τη γεύση και μπορούν να αυξήσουν ή να μειώσουν σημαντικά τις υγειονομικές ιδιότητες του καρπού (Zoidou et al., 2010), επειδή διαφορετικές μέθοδοι επεξεργασίας του καρπού μπορεί να οδηγήσουν σε αντίθετη ικανότητα βιοενεργών προϊόντων υδρόλυσης (Marsilio et al., 2005; Charoenprasert et al., 2012). Οι κύριες μέθοδοι επεξεργασίας των εμπορικών προϊόντων είναι: α) η επεξεργασία ελιάς με τη μέθοδο Ισπανικού τύπου, η οποία έχει και το μεγαλύτερο μερίδιο της αγοράς, β) η επεξεργασία ελιάς με τη μέθοδο ελληνικού τύπου, και γ) η επεξεργασία ελιάς τύπου Καλιφόρνιας (Karkoula et al., 2012). Όλες οι παραπάνω μέθοδοι σχεδιάστηκαν με σκοπό τη μείωση της ελευρωπαΐνης, αλλά κατά συνέπεια επηρεάζονται και οι υπόλοιπες φαινολικές ενώσεις στο τελικό προϊόν οδηγώντας σε ένα διαφορετικό φαινολικό προφίλ, το οποίο διαφέρει ανάλογα με τον τρόπο επεξεργασίας. Οι μέθοδοι Ελληνικού και Ισπανικού τύπου παρέχουν υψηλότερα επίπεδα φαινολικών ενώσεων στις βρώσιμες ελιές (Charoenprasert et al., 2012). Στην επεξεργαστική μέθοδο ελληνικού τύπου χρησιμοποιούνται κυρίως άλμη, ξηρό άλας και διάλυμα υδροξυδείου του νατρίου και μερικές φορές επεξεργασία με λάδι ή και ηλιακή ακτινοβολία (Doulgeraki et al., 2013; Panagou, 2006). Στην επεξεργαστική μέθοδο Ισπανικού τύπου, οι καρποί επεξεργάζονται με υδροξείδιο του νατρίου, ξεπλένονται, υπόκεινται σε ζύμωση με γαλακτικό οξύ και τελικώς παστεριώνονται (Brenes et al., 1995; Ambra, 2017). Οι περισσότερες έρευνες έχουν εστιάσει στο ελαιόλαδο, ενώ πρέπει να σημειωθεί πως η φαινολική σύνθεση των επιτραπέζιων ελιών είναι διαφορετική από τη φαινολική σύνθεση ελαιόλαδου (Boskou et al., 2005). Μέχρι σήμερα, δεν έχει ακόμα καθοριστεί πως οι τροποποιητικές μέθοδοι επεξεργασίας επηρεάζουν το προφίλ φαινολικών ενώσεων των καρπών σε διάφορες ελιές.

1.1.5.2.1. Επεξεργασία επιτραπέζιας ελιάς με τη μέθοδο ελληνικού τύπου (GR)

Η συλλογή των καρπών γίνεται όταν οι καρποί φτάσουν το στάδιο της πλήρους ωριμότητας, πριν από τις χαμηλές θερμοκρασίες του χειμώνα. Μετά τη συγκομιδή τους μεταφέρονται στη μονάδα επεξεργασίας όπου γίνεται η διαλογή και το πλύσιμο. Στη συνέχεια γίνεται εμβάπτιση με διάλυμα πυκνής άλμης. Η ελιές τοποθετούνται σε άλμη με μαγειρικό αλάτι συγκέντρωση 8-10% w/v, ενώ σε μερικές περιπτώσεις χρησιμοποιείται χαμηλότερη συγκέντρωση περίπου 6%. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης οι καρποί παραμένουν σε συνθήκες απουσίας αέρα. Λόγω του ότι η διάχυση των

συστατικών ζύμωσης είναι διαμέσου της επιδερμίδας του καρπού είναι μια αργή διαδικασία, η ζύμωση διαρκεί αρκετό καιρό. Κατά τη διαδικασία, επιταχύνεται η μεταφορά υδατοδιαλυτών συστατικών, όπως η ελευρωπαΐνη, από τη σάρκα στην άλμη, μέσω της άλμης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την εκπίκρωση του καρπού με σταδιακή υδρόλυση της υδατοδιαλυτής ουσίας στην άλμη. Η διαδικασία υδρόλυσης μπορεί να διαρκέσει από 8 έως 12 μήνες. Παράλληλα, μέσω της εκχύλισης των συστατικών η άλμη μετατρέπεται σε θρεπτικό υπόστρωμα κατάλληλο για την ανάπτυξη μικροοργανισμών (**Κυριτσάκης, 2007**). Τις πρώτες μέρες εμφανίζονται τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια, τα οποία φτάνουν τον πληθυσμό τους στο μέγιστο στις 3 με 4 μέρες και στη συνέχεια εξαφανίζονται μετά από 10 με 15 μέρες. Τα κυριότερα γένη βακτηρίων που εμφανίζονται είναι: *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Achromobacter*, *Aeromonas* και *Escherichia*. Η μικροχλωρίδα που εμφανίζεται αποτελείται κυρίως από ζυμομύκητες, οι οποίοι φτάνουν στο μέγιστο του πληθυσμού τους σε 15-25 μέρες και παραμένουν στο διάλυμα μέχρι να ολοκληρωθεί η διαδικασία. Μερικοί από τους αντιπροσωπευτικούς μύκητες είναι: *Saccharomyces oleaginosus*, *Hansenula anomala*, *Torulopsis candida*, *Debaryomyces hansenii*, *Candida didensii* και *Picchia membranefaciens*. Σε ορισμένες ποικιλίες παρατηρείται ανάπτυξη θετικών μυκήτων κατά Gram όταν η περιεκτικότητα άλατος είναι πολύ χαμηλή, περίπου 5% και σε μερικές περιπτώσεις αν η συγκέντρωση του άλατος είναι πάνω από 8% υπάρχει η δυνατότητα ανάπτυξης γαλακτοβακίλων στη διάρκεια της ζύμωσης (**Garrido et al., 1985**). Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης μεταφέρεται και άλας στον καρπό μειώνοντας έτσι την περιεκτικότητα του διαλύματος, η οποία οφείλει να αυξηθεί με την ταυτόχρονη αύξηση της θερμοκρασίας για την αποφυγή αλλοιώσεων στον καρπό.

Επίσης κατά τη διάρκεια της ζύμωσης οι καρποί μπορεί να εμφανίσουν αλλοιώσεις και ανάπτυξη μικροοργανισμών, όπως η αεριοπάθηση, η οποία οφείλεται στην συσσώρευση CO₂, λόγω της αναπνοής των καρπών. Για αυτό το λόγο, γίνεται παροχή αέρος 0,1 έως 0,3 λίτρα ανά ώρα, με φυσαλίδες αέρα οι οποίες διατηρούν τη συγκέντρωση οξυγόνου, που υπό άλλες συνθήκες ευνοεί την ανάπτυξη αναερόβιων, αντί ζυμοτικών μικροοργανισμών. Με την παραπάνω διαδικασία επιτυγχάνεται μικρότερο ποσοστό εμφάνισης αεριοπάθησης, απουσία συρρικνωμένων καρπών, μείωση χρόνου ζύμωσης και βελτίωση γεύσης, χρώματος και υφής. Επίσης, η αρχική συγκέντρωση χλωριούχου νατρίου και το pH επηρεάζουν τη διαδικασία της ζύμωσης. Για την περαιτέρω αποτροπή ανάπτυξης αρνητικών βακτηρίων προστίθεται οξικό οξύ για την μείωση του pH. Σε αντίθετη περίπτωση, το υψηλό pH αυξάνει τον όγκο του CO₂ λόγω υπερβολικής ανάπτυξης μικροοργανισμών, προκαλώντας αλλοιώσεις (**Fernandez et al., 1985**). Μετά το τέλος της ζύμωσης, οι καρποί εκτίθενται σε ατμοσφαιρικό αέρα για 24 με 48 ώρες για την επαναφορά του χρώματος, το οποίο έχει απολεσθεί λόγω του χαμηλού pH της άλμης. Στη συνέχεια οι καρποί είναι έτοιμοι για συσκευασία σε νέα συσκευασία με άλμη.

1.1.5.2.2. Επεξεργασία επιτραπέζιας ελιάς με τη μέθοδο ισπανικού τύπου (SP)

Η επεξεργασία του καρπού της ελιάς με τη μέθοδο SP κατέχει το μεγαλύτερο μερίδιο αγοράς σήμερα, περίπου το 50% του συνόλου των βρώσιμων ελιών που παρασκευάζονται και περιλαμβάνει τα στάδια της εκτίκρανσης, έκπλυσης και ζύμωσης.

Για την εκτίκρανση του καρπού χρησιμοποιείται υδατικό διάλυμα καυστικού νατρίου, στο οποίο ο καρπός παραμένει μέχρι το διάλυμα να εισχωρήσει σχεδόν μέχρι τον πυρήνα του καρπού. Σκοπός είναι η όσο το δυνατόν συντομότερη υδρόλυση της ελευρωπαϊνης, με την οποία απελευθερώνονται και ποσότητα σακχάρων, η οποία ενισχύει τη γαλακτική ζύμωση με την απορρόφηση της από του μικροοργανισμούς που είναι υπεύθυνοι για την γαλακτική ζύμωση. Ιδανική διείδυση θεωρείται όταν το καυστικό νάτριο έχει φτάσει σε βάθος έως 3/4 της απόστασης από την επιδερμίδα μέχρι τον πυρήνα. Οι παράγοντες που επηρεάζουν το στάδιο της εκτίκρανσης είναι η συγκέντρωση του αλκαλικού διαλύματος, η θερμοκρασία, η ποικιλία της ελιάς, και το μέγεθος του καρπού (Αλυγιζάκης, 1982).

Αμέσως μετά την εκτίκρανση πραγματοποιείται έκπλυση του καρπού για την απομάκρυνση του αλκαλικού διαλύματος και την αφαίρεση του καυστικού νατρίου που έχει εισχωρήσει στην σάρκα του καρπού. Μετά την απομάκρυνση του καυστικού νατρίου, ο καρπός τοποθετείται σε νερό, και τα ιόντα OH και Na που βρίσκονται στην σάρκα του καρπού μεταφέρονται στο νερό μέχρι να αποκτηθεί ισορροπία ιόντων μεταξύ της σάρκας και του νερού. Η επιτυχής ισορροπία εξαρτάται από την θερμοκρασία, το μέγεθος καρπού, τη συνεκτικότητα της σάρκας, την ποιότητα νερού, την έκθεση στον ατμοσφαιρικό αέρα και την τεχνική έκπλυσης (Αλυγιζάκης, 1982).

Στο στάδιο της ζύμωσης ο καρπός τοποθετείται σε διάλυμα άλμης (NaCl 5-6%). Βασικός παράγοντας που επηρεάζει τη διαδικασία και την συντήρηση του καρπού είναι η συγκέντρωση της άλμης. Απαραίτητη προϋπόθεση επίσης για την επιτυχία της διαδικασίας είναι η σταθεροποίηση του χλωριούχου νατρίου σε επιθυμητά επίπεδα. Η ζύμωση του καρπού πραγματοποιείται σε αεροστεγείς συνθήκες για την αποφυγή δευτερευόντων ζυμώσεων. Σε μερικές περιπτώσεις και ειδικότερα όταν η διαδικασία δεν πραγματοποιείται ομαλά, το διάλυμα εμβολιάζεται με καθαρές καλλιέργειες γαλακτοβακίλλων. Ανάλογα με την ποσότητα σακχάρων που μετατρέπουν σε γαλακτικό οξύ, οι μύκητες διακρίνονται σε ομοζυγωτικούς και ετεροζυγωτικούς (Αλυγιζάκης, 1982). Σύμφωνα με τον **Κυριτσάκη (1982)**, οι ομοζυγωτικοί μύκητες μετατρέπουν όλα τα σάκχαρα, ενώ οι ετεροζυγωτικοί μύκητες σχεδόν τα μισά σε γαλακτικό οξύ. Η γαλακτική ζύμωση επηρεάζεται κυρίως από το pH, την περιεκτικότητα σε NaCl, το είδος των μικροοργανισμών που αναπτύσσονται και την θερμοκρασία. Επιπλέον, επηρεάζεται από τον στάδιο ωριμότητας του καρπού και την σακχαροπεριεκτικότητα κατά

την συγκομιδή. Επίσης, μπορεί να επηρεαστεί από την τεχνολογία που χρησιμοποιείται, από τις κλιματολογικές συνθήκες, την ποικιλία κτλ.

Η διάρκεια της ζύμωσης λαμβάνει χώρα σε τέσσερις φάσεις, οι οποίες χαρακτηρίζονται από την ανάπτυξη του πληθυσμού μικροοργανισμών που θα αναπτυχθούν και θα επηρεάσουν τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του μέσου. Η διάρκεια και η ανάπτυξη των μικροοργανισμών εξαρτάται από προηγούμενες εργασίες που έχουν υποστεί οι καρποί, από τη δυναμικότητα του ζυμωτήρα και τον εξοπλισμό, από την ποικιλία και τις κλιματολογικές συνθήκες. Η πρώτη φάση διαρκεί από την έναρξη της ζύμωσης μέχρι την ανάπτυξη των γαλακτοβακίλλων. Λόγω της μεγάλης σημασίας για την πορεία της συνολικής ζύμωσης, οι συνθήκες και οι αλλαγές σε αυτή την φάση ελέγχονται αυστηρά. Τα κυριότερα είδη μικροοργανισμών που συμμετέχουν σε αυτή τη διαδικασία είναι τα *Bacillus*, *Micrococcus*, ενώ τα πιο αντιπροσωπευτικά είδη αρνητικών κατά Gram βακτηρίων ανήκουν στην οικογένεια *Enterobacteriaceae*. Ταυτόχρονα παρατηρείται και αύξηση θετικών βακτηρίων. Οι συνθήκες υγιεινής παίζουν σημαντικό ρόλο για την αποφυγή μολύνσεων. Υπάρχει όμως και ανάπτυξη αρνητικού βακτηρίου η οποία λειτουργεί θετικά και θεωρείται φυσιολογική γιατί βοηθά στην μείωση του pH (**Fernandez et al., 1997**). Η δεύτερη φάση ξεκινά όταν το pH του διαλύματος έχει μειωθεί και διαρκεί συνήθως δύο εβδομάδες. Κατά την δεύτερη φάση αυξάνεται ο πληθυσμός των γαλακτοκόκκων και η παρουσία των αρνητικών βακτηρίων μειώνεται μέχρι την πλήρη εξαφάνισή τους, η οποία σηματοδοτεί το τέλος αυτής της φάσης. Οι γαλακτοκόκκοι που χαρακτηρίζουν αυτή τη φάση είναι του γένους *Pediococcus* και *Streptococcus* (ομοζυγωτικοί) και *Leuconostoc* (ετεροζυγωτικοί). Η οξύτητα του τελικού προϊόντος επηρεάζεται από την ανάπτυξη των παραπάνω μικροοργανισμών. Η τρίτη φάση περιλαμβάνει την ανάπτυξη του γαλακτοβακίλλου *Lactobacillus plantarum*, που υπό κανονικές συνθήκες είναι υπεύθυνος για την ζύμωση. Παρουσιάζονται επίσης και άλλα είδη, μερικά από τα οποία είναι *L. casei*, *L. fermentum*, *L. cellobiosus*, *L. coryniformis* και *L. brevis*. Η ανάπτυξη του *Lactobacillus plantarum* συνοδεύεται από σταθερή αύξηση της οξύτητας καθόλη τη διάρκεια της ζύμωσης, η οποία ακολουθείται από μείωση του pH στο 4 ή χαμηλότερα. Ο *Lactobacillus plantarum* μειώνεται όταν τα θρεπτικά συστατικά του υποστρώματος εξαντληθούν ή όταν το pH φτάσει σε ιδιαίτερα χαμηλές τιμές που δεν ευνοούν την επιβίωση του (**Fernandez et al, 1997**). Στην τέταρτη και τελευταία φάση αναπτύσσεται το είδος *Propionibacterium*. Στην φάση αυτή έχει ολοκληρωθεί η κύρια ζύμωση και το pH αυξάνεται, ενώ το γαλακτικό οξύ μειώνεται. Έχουν απομονωθεί τα βακτήρια *Propionibacterium acnes* και *P. acidipropioni*, τα οποία μεταβολίζουν το γαλακτικό οξύ σε προπιονικό και οξικό οξύ. Κατά την διάρκεια της τελευταίας φάσης το pH αυξάνεται κατά 0,1 με 0,2 μονάδες. Για την αποφυγή αλλοιώσεων συνίσταται η διατήρηση συγκέντρωσης του άλατος στο 8% και το pH σε τιμές κάτω του 4 (**Fernandez et al., 1997**).

Η συνύπαρξη ζυμών και γαλακτικών βακτηρίων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης συνεισφέρει στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος. Κάποια είδη ζυμών παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη γαλακτικών βακτηρίων, μέσω της παραγωγής βιταμινών συμπλέγματος Β, οι οποίες είναι θρεπτικά συστατικά για αυτά τα είδη μυκήτων (**Ruiz-Barba and Diaz, 1995**). Επίσης, συμβάλουν στην διαμόρφωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του τελικού προϊόντος με την παραγωγή αρωματικών ουσιών (**Ciafardini et al., 2005**). Ακόμα έχει αποδειχθεί ότι προκαλούν επιβλαβείς επιδράσεις όπως μαλάκωμα του καρπού (**Vaughn et al., 1972**). Επίσης, μπορεί να προκαλέσουν αλλοίωση των προϊόντων μέσω αύξησης του pH. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι ζύμες που υπήρχαν σε άλμη παρουσίασαν λιπολυτική δράση (**Marquina et al., 1992**). Τέλος, για την μικροβιολογική εκπίκρυνση του καρπού της ελιάς, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ζύμες που παράγουν το ένζυμο β-γλυκοσιδάση, όπως το στέλεχος *Candida wickerhami* 1542 λόγω του ότι οδηγεί σε προϊόντα άριστης ποιότητας (**Ciafardini et al., 2005**).

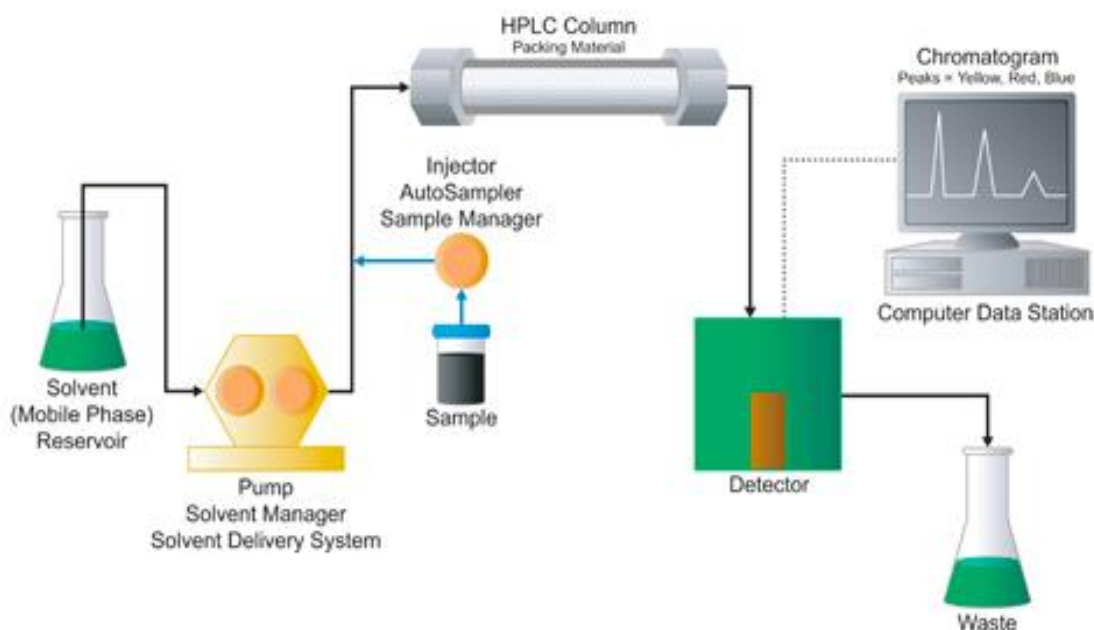
Κατά τη διάρκεια της πορείας της ζύμωσης πραγματοποιούνται αναλύσεις για την μέτρηση του pH, την περιεκτικότητα άλατος, την τιτλοδοτούμενη οξύτητα, την συνολική οξύτητα και τα σάκχαρα, καθώς και μικροβιολογικές αναλύσεις. Από τα παραπάνω, η ελεύθερη οξύτητα και το pH είναι ιδιαίτερα σημαντικά διότι ελέγχουν τη ζύμωση από την έναρξη της διαδικασίας.

1.1.6. Ανάλυση φαινολικών ενώσεων

1.1.6.1. Ταυτοποίηση και ποσοτικός προσδιορισμός ενώσεων

Για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό φαινολικών ενώσεων χρησιμοποιείται η τεχνική διαχωρισμού υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC). Τα τελευταία χρόνια αυτή η τεχνική χρησιμοποιείται ευρέως, και από πολλούς θεωρείται ως η καταλληλότερη για την προσδιορισμό ακριβείας για μεγάλο αριθμό χημικών ενώσεων. Προέρχεται από την εξέλιξη της κλασικής χρωματογραφίας στήλης. Μέσω της εξέλιξης της τεχνολογίας κατέστη εφικτή η παρασκευή στηλών από χάλυβα, οι οποίες είναι ανθεκτικές στις υψηλές πιέσεις και αντλιών υψηλής πίεσης και σταθερής παροχής. Έτσι με την πάροδο του χρόνου, η HPLC κατάφερε να επιτύχει διαχωρισμούς μιγμάτων ταχύτερα και πιο αποδοτικά από την χρωματογραφία στήλης. Ο διαχωρισμός που επιτυγχάνεται από την τεχνική, είναι αποτέλεσμα του συνδυασμού δύο φάσεων, της στατικής και της κινητής φάσης. Λόγω του καθορισμού της ποιότητας και της απόδοσης του χρωματογραφικού διαχωρισμού από την αλληλεπίδραση της ουσίας με την στήλη και την κινητή φάση, η επιλογή του κατάλληλου συνδυασμού στατικής και κινητής φάσης είναι ιδιαίτερα σημαντική για την επιτυχία του διαχωρισμού και ανάλυσης των μιγμάτων φαινολικών ενώσεων (**Harnly et al., 2007**). Το υπό ανάλυση δείγμα, στην HPLC, εισέρχεται υπό πίεση στην κορυφή της στήλης και με

την συμμετοχή της κινητής φάσης τα συστατικά διέρχονται μέσα από αυτή με τη μορφή ζωνών και εκκλύονται το ένα μετά το άλλο. Ο διαχωρισμός τους επηρεάζεται από τον βαθμό αλληλεπίδρασης των συστατικών του δείγματος με τη στατική φάση. Η μετακίνηση των υπό ανάλυση ουσιών γίνεται με διαφορετική ταχύτητα κατά το μήκος της στήλης και κατά συνέπεια η έκλυση πραγματοποιείται σε διαφορετικό χρόνο. Κάθε φορά που εκλύεται ένα συστατικό παράγεται ένα σήμα από ανιχνευτή, που τοποθετείται συνήθως στο τέλος της στήλης. Από το σήμα αυτό παράγεται ένα διάγραμμα ως συνάρτηση του χρόνου συγκράτησης (t_R), το οποίο ονομάζεται χρωματογράφημα.



Σχήμα 1.5. Σύστημα χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC).

1.1.6.1.2. Μηχανισμοί και ορολογία

Η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης, με βάση τον μηχανισμό αλληλεπίδρασης συστατικών δείγματος και στατικής φάσης, διακρίνεται σε:

- i. Χρωματογραφία προσρόφησης (adsorption chromatography). Η στατική φάση είναι ένας προσροφητής. Ο διαχωρισμός βασίζεται στην προσρόφηση συστατικών σε διαφορετικό βαθμό. Η εφαρμογή του γίνεται κυρίως σε ενώσεις με όμοια δομή αλλά διαφορετική πολικότητα και με βάση την πολικότητα κινητής και στατικής φάσης μπορεί να διαχωριστεί σε: α) Χρωματογραφία κανονικής φάσης, όπου η κινητή φάση είναι λιγότερο πολική από την στατική και χρησιμοποιούνται άπολοι διαλύτες όπως το εξάνιο. Τέτοιου είδους στήλες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για το διαχωρισμό μη πολικών φαινολικών όπως οι αγλυκόνες φλαβονοειδών (Prior et al., 2005), β) Χρωματογραφία Αντίστροφης φάσης, η οποία είναι η πιο διαδεδομένη τεχνική και αντιπροσωπεύει το 80% των ερευνών. Η κινητή φάση είναι περισσότερο πολική από την στατική. Για την κινητή φάση

χρησιμοποιούνται κυρίως μίγματα πολικών οργανικών διαλυτών, όπως η μεθανόλη ή το ακετονιτρίλιο, με υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα ή νερό.

ii. Χρωματογραφία ιονοανταλλαγής (ion-exchange chromatography): Με αυτό το μηχανισμό ο διαχωρισμός πραγματοποιείται λόγω των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ιόντων που αναλύονται και φορτισμένων ομάδων της στατικής φάσης. Όσο μεγαλύτερο είναι το φορτίο ιονικών συστατικών του μίγματος, τόσο περισσότερο συγκρατούνται ηλεκτροστατικά στην επιφάνεια της στατικής φάσης. Η κινητή φάση είναι ρυθμιστικό διάλυμα, όπου ο χρόνος έκλουσης εξαρτάται από το pH και την ιοντική ισχύ (**Skoog, 1985**).

iii. Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (Size exclusion chromatography): Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται με βάση το σχήμα και το μέγεθος των μορίων της ένωσης που αναλύεται. Πραγματοποιείται ροή της κινητής φάσης μέσα από πορώδη ποκτή, όπου το μέγεθος των πόρων ορίζει την είσοδο των μορίων, επιτρέποντας την είσοδο στα μόρια μικρού μεγέθους, αποκλείοντας τα μόρια με μεγάλο μέγεθος. Με αυτό τον τρόπο τα μόρια με μεγαλύτερο μέγεθος εξέρχονται αμέσως από τη στήλη, ενώ τα μικρότερου μεγέθους μόρια καθυστερούν την εξαγωγή τους, αφού για να παρασυρθούν χρειάζονται μεγαλύτερο όγκο κινητής φάσης (**Skoog, 1985**).

Τα όργανα που περιλαμβάνονται σε ένα σύστημα HPLC είναι: α) Φιάλες αποθήκευσης διαλυτών, β) Σύστημα παροχής κινητής φάσης (pump), γ) Μονάδα εισαγωγής του δείγματος (injector), δ) Χρωματογραφική στήλη (Column), ε) Ανιχνευτής (detector), στ) Σύστημα συλλογής δεδομένων και καταγραφής αποτελεσμάτων (recorder or data collecting system).

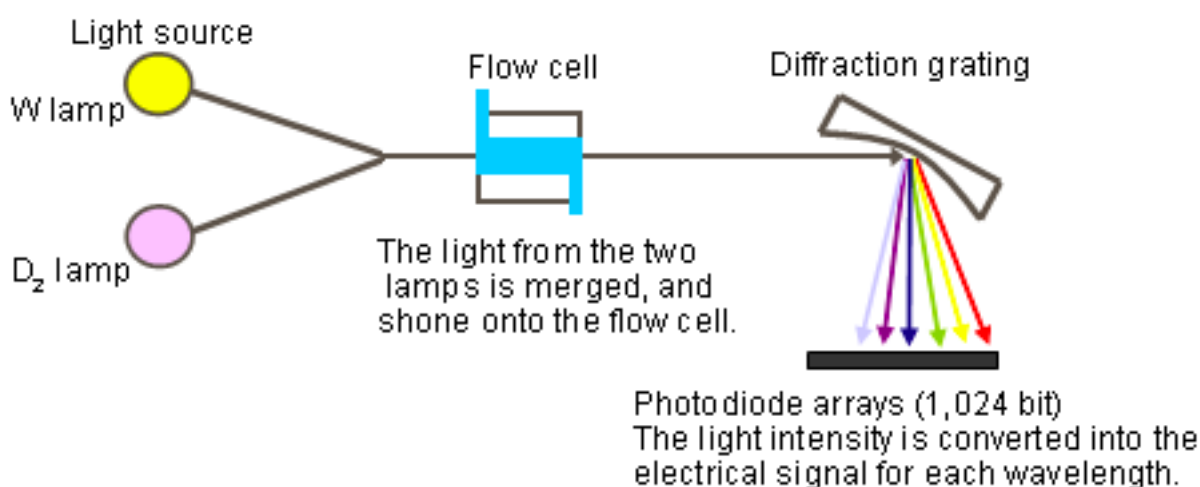
Ο διαχωρισμός των συστατικών πραγματοποιείται στην αναλυτική στήλη και χρησιμοποιείται αντλία υψηλής πίεσης για την προώθηση της κινητής φάσης. Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός ξεκινά με την εισαγωγή του δείγματος εντός της στήλης με τη βοήθεια ειδικής βαλβίδας. Όλα τα συστατικά εκκλύονται και εμφανίζονται στο σύστημα καταγραφής ως κορυφές. Σημαντική παράμετρος είναι η ανίχνευση των εκκλούμενων συστατικών, η οποία μπορεί να είναι εκλεκτική ή όχι, ανάλογα με τον ανιχνευτή που χρησιμοποιείται. Το αποτέλεσμα κάθε συστατικού από τον ανιχνευτή εμφανίζεται ως χρωματογράφημα. Η κινητή φάση είναι μίγματα με διαφορετική αναλογία κατ' όγκο, οργανικού διαλύτη και νερού ή ρυθμιστικού διαλύματος με κατάλληλη τιμή pH στην διαδικασία της HPLC αντίστροφης φάσης ή μίγματα από όλους τους διαλύτες στην διαδικασία HPLC κανονικής φάσης. Η χαμηλή τοξικότητα, η χαμηλή τιμή, η πτητικότητα, το χαμηλό ιξώδες και η μη αντίδραση με τα υπό ανάλυση συστατικά είναι οι σημαντικότερες ιδιότητες που πρέπει να έχουν οι χρησιμοποιούμενοι διαλύτες. Για την ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων, η επιλογή κινητής φάσης αποτελεί μία από τις σημαντικότερες παραμέτρους. Η βελτίωση της σύστασης της κινητής φάσης είναι μία διαδικασία η οποία απαιτεί πολύ χρόνο και κόπο, για αυτό το λόγο ο επιτυχής διαχωρισμός

των συστατικών του μίγματος σε λογικά χρονικά πλαίσια είναι κριτήριο για την επιλογή της πλέον κατάλληλης κινητής φάσης.

Η έκλυση των συστατικών που αναλύονται είναι είτε ισοκρατική, είτε βαθμωτή. Στην πρώτη η σύσταση της κινητής φάσης διατηρείται σταθερή καθόλη τη διάρκεια της κινητής φάσης. Κατά την δεύτερη επιτρέπεται η γρηγορότερη ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων, το κόστος είναι χαμηλότερο και βασική γραμμή πιο σταθερή. Η σύσταση κινητής φάσης, με τη βαθμωτή έκλυση, επιτρέπει ταχύτερη μετακίνηση συστατικών που συγκρατούνται από τη στήλη ισχυρώς, ενώ ο διαχωρισμός συστατικών με ελάχιστη συγκράτηση είναι ικανοποιητικός. Στην HPLC αντίστροφης φάσης, το ποσοστό οργανικού διαλύτη είναι μικρό για να επιτρέπεται ο διαχωρισμός των συστατικών που συγκρατούνται ελαφρώς στην στατική φάση. Τα συστατικά με ισχυρότερη συγκράτηση μετακινούνται όταν ο διαλύτης κινητής φάσης αυξηθεί αρκετά. Αναμιγνύοντας δύο ή περισσότερους διαλύτες είναι εφικτή η μεταβολή της συγκέντρωσης στην κινητή φάση (Skoog, 1985).

Κατά τον διαχωρισμό με βαθμωτή έκλυση πραγματοποιούνται τα στάδια: Καθορισμός αρχικής και τελικής σύστασης της κινητής φάσης, καθορισμός χρόνου ανάλυσης, επιλογή τρόπου μεταβολής σύστασης κινητής φάσης, βελτιστοποίηση ταχύτητας ροής, επαναφορά στήλης στις αρχικές συνθήκες ισορροπίας. Για τον διαχωρισμό φαινολικών οξέων και φλαβονοειδών εφαρμόζονται συστήματα βαθμωτής έκλυσης, λόγω της ικανότητας διαχωρισμού περισσότερων συστατικών (Ong, 2004). Τα συστήματα παροχής της κινητής φάσης που χρησιμοποιούνται είναι υψηλής πίεσης και ο σκοπός τους είναι ή άντληση κινητής φάσης και η διαβίβαση της στην στήλη υπό υψηλή πίεση. Από τις αντλίες λαμβάνεται ακριβής όγκος διαλύτη με σταθερή πίεση, ροή και ταχύτητα. Η διατήρηση της θερμοκρασίας της στήλης είναι σταθερή ανάλογα με τις ανάγκες της ανάλυσης. Στην HPLC χρησιμοποιούνται ανιχνευτές, οι οποίοι μπορεί να είναι είτε γενικοί δηλαδή μετρούν την μεταβολή μιας αλλαγής της κινητής φάσης, είτε ειδικοί δηλαδή μετρούν την μεταβολή μια φυσικοχημικής ιδιότητας των συστατικών υπό ανάλυση η οποία μετατρέπεται σε ηλεκτρικό σήμα. Το σήμα είναι ανάλογο της συγκέντρωσης, της μάζας ή της ροής της ουσίας. Οι ανιχνευτές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην HPLC είναι: Υπεριώδους-ορατού, παράταξης φωτοδιόδων, αγωγιμομετρικοί, δείκτη διάθλασης, φασματογράφοι μάζας, ηλεκτροχημικοί, φθορισμομετρικοί, ραδιομετρικοί, σκεδασμού φωτός και φλόγας. Οι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται πιο συχνά είναι οι ανιχνευτές υπεριώδους-ορατού (UV-Vis). Με αυτού του είδους τον ανιχνευτή η ταυτοποίηση της ουσίας βασίζεται στον χρόνο κατακράτησης της. Όμως λόγω του ότι μια κορυφή κρύβει παρεμποδίζουσες ενώσεις που συνεκλούνται, αυτός ο τρόπος μπορεί να οδηγήσει συχνά σε λάθος εκτιμήσεις. Για αυτό το λόγο, αναπτύχθηκε νέου είδους ανιχνευτής UV-Vis, ο ανιχνευτής παράταξης φωτοδιόδων (diode array detector, DAD), με τον οποίο γίνεται συλλογή των δεδομένων της απορρόφησης της υπό ανάλυσης ουσίας σε όλο το φάσμα του ορατού ή του υπεριώδους. Οι δύο

ανιχνευτές διαφέρουν στην παρουσία ολογραφικού φράγματος στη θέση του μονοχρωμάτορα. Ακτινοβολία ολόκληρου φάσματος ακτινοβολεί το δείγμα, η οποία εξέρχεται της κυψελίδας, εφόσον έχει γίνει ανάλυση στο ολογραφικό φράγμα, προσπίπτει σε παράταξη φωτοδίοδων με φωτοευαίσθητα στοιχεία. Τα κύρια πλεονεκτήματα του DAD είναι η ανάλυση μιγμάτων με απορρόφηση σε διαφορετικά μήκη κύματος και η δυνατότητα εκτίμησης της ποσότητας σε περισσότερα από ένα δείγματα, ενώ το κύριο μειονέκτημα είναι η μειωμένη ευαισθησία (**Dorsey et al., 1994; Papadogiannis et al., 2000; McMaster, 1994**). Η μέθοδος DAD επιτρέπει τη συλλογή φασμάτων, με ταυτόχρονη ποσοτικοποίηση φαινολικών ενώσεων σε πολλά μήκη κύματος, γεγονός ιδιαίτερα σημαντικό αφού τα φαινολικά παρουσιάζουν μέγιστα απορρόφησης σε διάφορα μήκη κύματος (**Rice-Evans et al., 1996**).



Σχήμα 1.6. Διαγραμματική απεικόνιση ενός συστήματος DAD.

1.1.6.2. Φασματομετρία μάζας (mass spectrometry - MS)

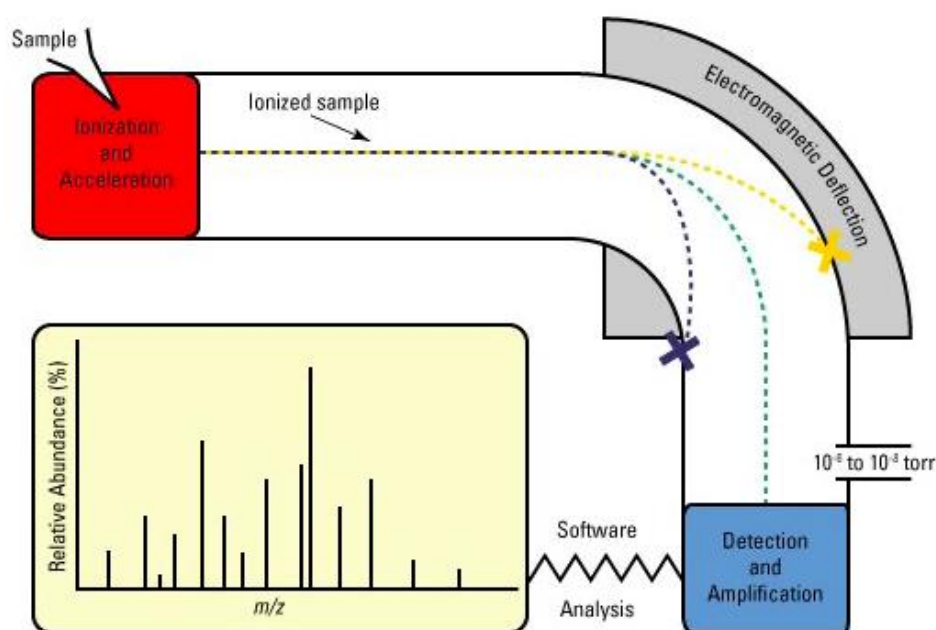
Η MS είναι αναλυτική τεχνική, η οποία βασίζεται στο σχηματισμό και την αναγνώριση ιόντων που ορίζονται και ταυτοποιούνται με βάση τον λόγο της μάζας ως προς το φορτίο τους (m/z). Χρησιμοποιείται για την διερεύνηση της δομής των οργανικών ενώσεων, την ποσοτικοποίηση ενώσεων και τον ακριβή προσδιορισμό μοριακού βάρους των ενώσεων. Διακρίνεται για τα πλεονεκτήματα της σαν μέθοδος, μερικά από τα οποία είναι η υψηλή διαχωριστική ικανότητα, η μεγάλη εξειδίκευση, η αξιοσημείωτη ευαισθησία της, ο πολύ σύντομος χρόνος ανάλυσης, η εφαρμογή σε εκτεταμένη περιοχή μαζών. Ένα άλλο αξιοσημείωτο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η δυνατότητα συνδυασμού της μεθόδου με άλλες αναλυτικές μεθόδους, όπως η αέριος χρωματογραφία, η υγρή χρωματογραφία και η τριχοειδής ηλεκτρόφορηση. Στα λίγα μειονεκτήματα που έχει η μέθοδος συγκαταλέγεται το υψηλό κόστος αγοράς και λειτουργίας (**Chiap et al., 2001**).



Σχήμα 1.7. Σχηματική απεικόνιση των βασικών συστατικών ενός φασματομέτρου μάζας.

1.1.6.2.1. Οργανικά μέρη

Τα κύρια μέρη του MS είναι το τμήμα εισαγωγής δείγματος, η πηγή ιοντισμού, ο αναλυτής μαζών και ο ανιχνευτής (Van Bramer, 1997). Στα δευτερεύοντα τμήματα περιλαμβάνονται τα συστήματα δημιουργίας υψηλού κενού για την διατήρηση χαμηλής πίεσης, συστήματα καταγραφής φάσματος, καταγραφείς, παλμογράφοι και λογισμικό επεξεργασίας, ερμηνείας φασμάτων και δεδομένων.



Σχήμα 1.8. Διαγραμματική απεικόνιση ενός φασματομέτρου μάζας.

1.1.6.2.2. Εισαγωγή δείγματος

Η εισαγωγή των δειγμάτων στο MS γίνεται με δύο κύριους τρόπους, οι οποίοι είναι είτε με άμεση εισαγωγή του δείγματος στο φασματομέτρο, είτε με συνδυασμένη τεχνική. Ο τρόπος που θα χρησιμοποιηθεί εξαρτάται από το μητρικό υλικό, τη φύση της ουσίας και την πτητικότητα της ουσίας (Marquet and Lachatre, 1999; Van Bramer, 1997; Johnstone and Rose, 1996; Siuzdak, 1996). Με τον πρώτο τρόπο, το δείγμα, ανεξαρτήτου της φάσης της οποίας βρίσκεται, δηλαδή αέρια, υγρή χαμηλής ή μηδενικής τάσης ατμών, εισάγεται μέσω της τριχοειδούς βαλβίδας απ' ευθείας στην πηγή

ιοντισμού. Όταν πρόκειται για συνδυασμό τεχνικών, αέριας ή υγρής χρωματογραφίας, η εισαγωγή του δείγματος πραγματοποιείται μέσω αυτόματου δειγματολήπτη.

1.1.6.2.3 Ιοντισμός

Ο ιοντισμός του υπό προσδιορισμό αναλύτη πραγματοποιείται εντός της πηγής ιοντισμού, με διάφορους τρόπους. Ο ιοντισμός πραγματοποιείται με αποβολή ή πρόσληψη ηλεκτρονίων και αντίστροφα, ή με σχηματισμό ιόντων προσθήκης όπου ένα ουδέτερο μόριο ενώνεται με το ιόν. Έχουν ερευνηθεί ποικίλες τεχνικές ιοντισμού, πολλές από τις οποίες έχουν αποτύχει ή προκαλέσει καταστροφή στο δείγμα και πολλές που θεωρούνται ήπιες και ασφαλείς, εξαρτώμενες από την ένταση της ενέργειας ιοντισμού. Παράδειγμα τεχνικών ιοντισμού που προκαλούν καταστροφή στο δείγμα είναι ο ιοντισμός με πρόσκρουση δέσμης ηλεκτρονίων (Electron Ionization, EI). Οι περισσότερες τεχνικές ανήκουν στις ήπιες τεχνικές ιοντισμού. Οι κύριες κατηγορίες αναφοράς τους είναι: ο χημικός ιοντισμός (Chemical Ionization, CI), ο ιοντισμός βομβαρδισμού με ταχέως κινούμενα σωματίδια (Fast Atom Bombardment, FAB), ο Ιοντισμός με εκ ρόφηση υποβοηθούμενος από το μητρικό υλικό (Matrix-assisted Laser Desorption Ionization, MALDI) και τεχνικές ιοντισμού σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης (Atmospheric Pressure Ionization, API).

1.1.6.2.4 Αναλυτής μάζας

Ο διαχωρισμός των ιόντων που παράγονται στην πηγή ιοντισμού είναι η βασική λειτουργία των αναλυτών μαζών. Τα ιόντα διαχωρίζονται με βάση τις διαφορετικές τιμές του λόγου m/z . Τα ιόντα είναι απαραίτητο να διαχωριστούν ώστε το μετρούμενο ιοντικό ρεύμα στον ανιχνευτή να αντιστοιχεί σε συγκεκριμένο λόγο m/z . Ο διαχωρισμός των ιόντων πραγματοποιείται με τη βοήθεια μαγνητικών ή ηλεκτρικών πεδίων ή με την μέτρηση του χρόνου που χρειάζεται ένα ιόν για να διασχίσει μία συγκεκριμένη απόσταση. Τα βασικά ποιοτικά χαρακτηριστικά ενός αναλυτή μαζών είναι η ακρίβεια μάζας, η ικανότητα διαχωρισμού, το εύρος μάζας, το γραμμικό δυναμικό εύρος, η ταχύτητα σάρωσης και η απόδοση εκπομπής (**Van Bramer, 1997**). Οι αναλυτές μαζών διακρίνονται σε συνεχείς και παλμικούς. Στην πρώτη κατηγορία συμπεριλαμβάνονται οι τετραπολικοί γραμμικοί αναλυτές και οι αναλυτές μαγνητικής εκτροπής. Οι ιδιότητες των αναλυτών είναι όμοιες με τις ιδιότητες των μονοχρωματόρων που χρησιμοποιούνται στα φασματομέτρα οπτικών τεχνικών, καθώς μεταφέρουν στον ανιχνευτή ένα επιλεγμένο m/z . Όταν ανιχνευτούν συγκεκριμένα ιόντα, παρατηρείται μειωμένος λόγος σήματος προς θόρυβο (Signal/Noise). Οι αναλυτές μαζών της δεύτερης κατηγορίας συλλέγουν ένα ολοκληρωμένο φάσμα μαζών από ένα παλμό ιόντων, και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παροχή μεγαλύτερου S/N. Οι αναλυτές κυκλοτρονιακού συντονισμού ιόντος με μετασχηματισμό κατά Fourier, οι τετραπολικές παγίδες ιόντων και οι αναλυτές χρόνου πτήσης

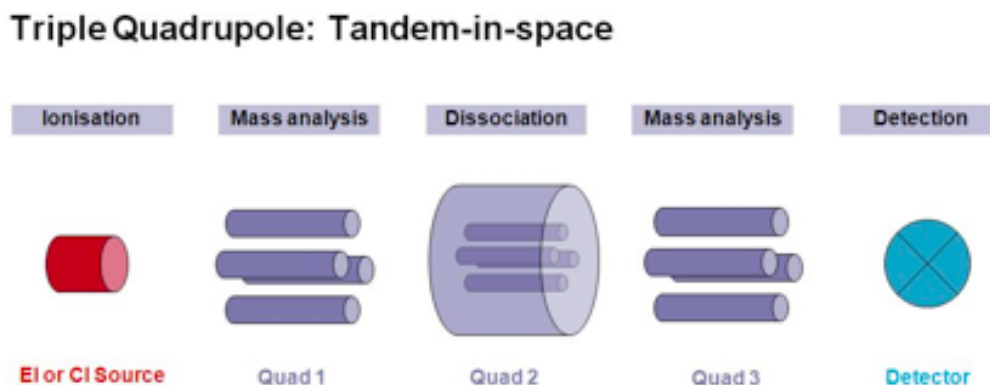
ανήκουν στην κατηγορία των παλμικών αναλυτών (**McLuckey and Wells, 2001**). Οι αναλυτές μαζών διακρίνονται σε διάφορους τύπους κατηγοριών (**Korfmaier, 2005**), όπως:

- Τετραπολικός αναλυτής μάζας (Quadropole)
- Τετραπολική παγίδα ιόντων (Quadropole Ion Trap, QIT)
- Αναλυτής χρόνου πτήσης (Time of Flight, TOF)
- Αναλυτής κυκλοτρονιακού συντονισμού ιόντων με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance, FT-ICR)
- Αναλυτές μαγνητικής εκτροπής (απλής ή διπλής εστίασης) (Magnetic Focusing Sector)
- Δίδυμη φασματομετρία μάζας (Tandem Mass Spectrometry, MS/MS), η οποία αναφέρεται στην διαδοχική σύνδεση τριών τετραπολικών αναλυτών
- Υβριδικοί Αναλυτές, οι οποίοι είναι συνδυασμός δύο εκ των παραπάνω αναλυτών

1.1.6.2.4.1. Τετραπολικός αναλυτής μάζας (Quadropole)

Οι αναλυτές αυτής της κατηγορίας αποτελούνται από τέσσερις παράλληλες μεταλλικές ράβδους με κυκλική ή υπερβολική διατομή. Οι ράβδοι τοποθετούνται συμμετρικά σε ζεύγη ως προς τη διερχόμενη δέσμη ιόντων και διαγωνίως συνδεδεμένες ηλεκτρικά. Κάθε ζεύγος είναι συνδεδεμένο με τον πόλο πηγής τάσης από όπου παρέχεται συνεχής και εναλλασσόμενη υψίσυχη, στην περιοχή των ραδιοσυχνοτήτων συνιστώσα (**Van Bramer, 1997; Ardrey, 2003**). Τα ιόντα έξω από την περιοχή πηγής ιοντισμού και εντός του τετραπολικού αναλυτή επιταχύνονται από ένα ηλεκτρικό πεδίο. Ιόντα ενός συγκεκριμένου λόγου m/z ακολουθούν μία σταθερή τροχιά διαμέσου των ράβδων έως ότου φτάσουν στον ανιχνευτή. Πιο συγκεκριμένα, για ορισμένα δυναμικά RF και DC προωθούνται ορισμένα ιόντα, ορισμένου λόγου m/z , με την ταυτόχρονη απόρριψη των υπολοίπων τα οποία αποκτούν μεγαλύτερο ρυθμό επιτάχυνσης, με αποτέλεσμα την πρόσκρουση τους στα ηλεκτρόδια και την αποφόρτισή τους. Το δυναμικό DC συνδυαζόμενο με το RF δυναμικό λειτουργούν σαν φίλτρο με σκοπό την απόρριψη των ιόντων με μεγάλο m/z . Η εξίσωση $V(t) = \pm (U + V\cos(\omega t))$ δίνει το δυναμικό των δύο ζευγών ηλεκτρονίων, όπου U είναι το σταθερό δυναμικό DC και $V\cos(\omega t)$ είναι το εφαρμοζόμενο δυναμικό RF με ένταση V και συχνότητα ω . Οι αναλυτές αυτής της κατηγορίας παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε συνθήκες υψηλού κενού ($\sim 10^{-5}$ Torr) και για αυτό το λόγο έχουν την ικανότητα να συνδυάζονται με ηλεκτροψεκασμό, αφού η παραγωγή ιόντων γίνεται σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης. Επιπλέον, μπορούν να αναλύσουν λόγους m/z μέχρι και 3000-4000 και χρησιμεύουν ιδιαίτερα στον ιοντισμό πρωτεϊνών και άλλων βιομορίων, όπου άλλες τεχνικές ιοντισμού δεν μπορούν να φτάσουν αυτά τα επίπεδα ανάλυσης. Επίσης, διαθέτουν υψηλές ταχύτητες σάρωσης, όπου η λήψη φάσματος είναι εφικτή σε χιλιοστά του δευτερολέπτου. Ακόμα, ένα άλλο πλεονέκτημα είναι το σχετικά χαμηλό κόστος, το οποίο τα κάνει προσιτά ως αναλυτές σε συνδυασμό

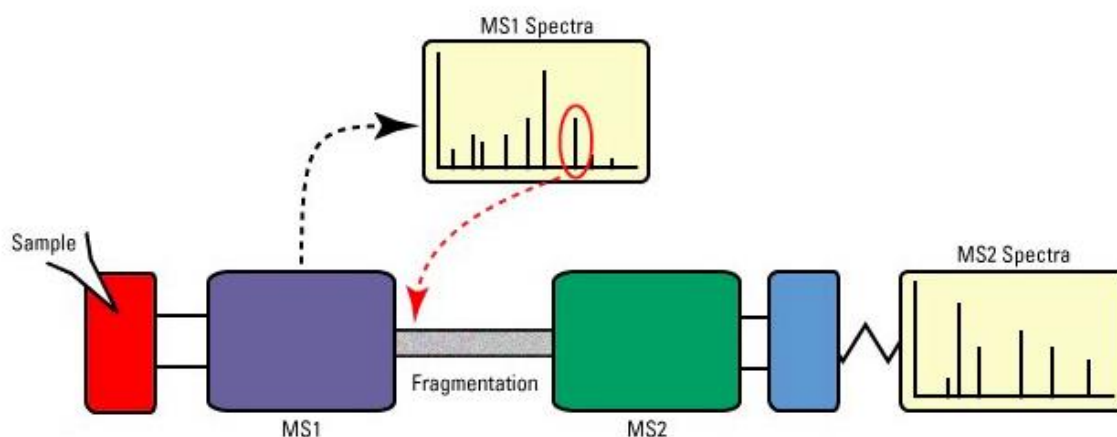
με ιοντισμό με ηλεκτροψεκασμό. Όμως, έχουν χαμηλή διαχωριστική ικανότητα, μικρή μέγιστη τιμή λόγου m/z και μειωμένη συμβατότητα με παλμικές τεχνικές ιοντισμού. Είναι εφικτός ο συνδυασμός τους με αέρια ή υγρή χρωματογραφία, με πιο κοινό συνδυασμό τον συνδυασμό τριπλού τετραπολικού (QQQ) φασματομέτρου μαζών (MS/MS).



Σχήμα 1.9. Σχηματική απεικόνιση τριπλού τετραπολικού αναλυτή μάζας.

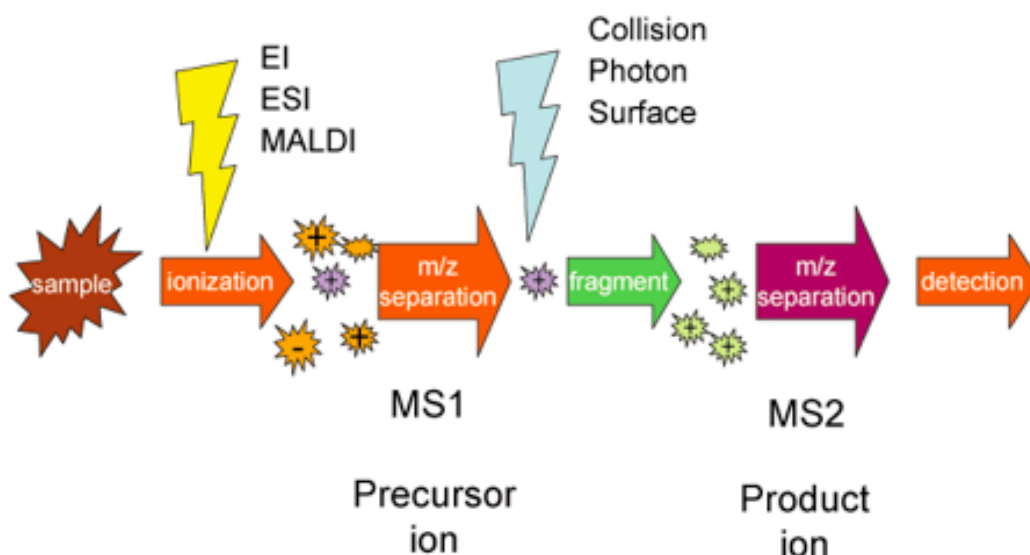
1.1.6.2.4.2. Δίδυμη φασματομετρία μάζας (Tandem mass spectrometry, MS/MS)

Σε τεχνικές ιοντισμού, όπως η ESI ή η MALDI, το ιοντισμένο μητρικό μόριο έχει μικρό ποσοστό θραυσματοποίησης, και ως εκ τούτου οι πληροφορίες για τα δομικά χαρακτηριστικά της ένωσης που μπορούν να συλλεχθούν είναι περιορισμένες. Για αυτό το λόγο με την τεχνική MS/MS πραγματοποιείται επαγόμενη θραυσματοποίηση. Η MS/MS στην απλούστερη μορφή της έχει όμοια δομή με την τεχνική τριπλού τετραπόλου (QQQ). Σε αυτή την τεχνική, το πρώτο τετράπολο δραστηριοποιείται στην συλλογή ιόντων με συγκεκριμένο λόγο m/z , τα οποία χαρακτηρίζουν ένα συγκεκριμένο αναλύτη. Μέσα από το δεύτερο τετράπολο περνούν τα ιόντα της επιλεγμένης μάζας, όπου ενεργοποιούνται και θραυσματοποιούνται. Το τρίτο τετράπολο υποδέχεται τα χαρακτηριστικά θραυσματοποιημένα ιόντα της πρόδρομης ένωσης (**McLucky and Wells, 2001**). Η επαγόμενη διάσπαση μέσω σύγκρουσης (Collision Induced Dissociation, CID) είναι η πιο κοινή μέθοδος θραυσματοποίησης. Στην CID το ιόν μπαίνει σε χώρο σύγκρουσης με αδρανές αέριο, όπως Ar, He, N₂, CO₂. Στη συνέχεια πραγματοποιούνται συγκρούσεις, που επαναλαμβάνονται, με το αέριο σύγκρουσης με σκοπό τον σχηματισμό θυγατρικών ιόντων. Το καλύτερο ποσοστό θραυσματοποίησης επιτυγχάνεται με έλεγχο των δυναμικών και της πυκνότητας του αερίου στο θάλαμο σύγκρουσης. Το δεύτερο τετράπολο ή ο ενδιάμεσος χώρος θραυσματοποίησης ονομάζεται κυψελίδα σύγκρουσης. Ο διαχωρισμός των θραυσμάτων ανάλογα με το λόγο μάζας/φορτίου πραγματοποιείται στο τρίτο τετράπολο ή δεύτερο φασματογράφο μαζών. Στο τελικό φάσμα MS/MS, περιλαμβάνονται μόνο τα ιόντα που έχουν παραχθεί από την ένωση που έχει επιλεγθεί, με απουσία του χημικού περιβάλλοντος και άλλων μορίων.



Σχήμα 1.10. Διαγραμματική απεικόνιση δίδυμης φασματομετρίας μάζας.

Μια σειρά διαφορετικών πειραμάτων μπορούν να εκτελεστούν με την MS/MS, ανάλογα τις ανάγκες και τις απαιτήσεις κάθε έρευνας. Α) Στην σάρωση θυγατρικού ιόντος το ιόν συγκεντρώνεται στο τετράπολο 1 και θραυσματοποιείται στο τετράπολο 2. Στο τετράπολο 3 διαχωρίζονται τα θραύσματα σύμφωνα με το λόγο m/z και λαμβάνεται το φάσμα μάζας του παραγόμενου ιόντος. Αυτή η εκτέλεση προτιμάται για το δομικό καθορισμό σημαντικών θραυσματοποιημένων ιόντων για ένα επιλεγμένο πρόδρομο ιόν, Β) Στην σάρωση πρόδρομου ιόντος λαμβάνεται το φάσμα μάζας στο τετράπολο 1, πραγματοποιείται θραυσματοποίηση και γίνεται επιλογή συγκεκριμένου ιόντος στο τετράπολο 2 και στο τετράπολο 3 εξέρχεται το προεπιλεγμένο ιόν. Αυτή η εκτέλεση προτιμάται όταν χαρακτηριστικό ιόν ενώσεων μιας τάξης ταυτοποιείται με μίγμα συστατικών ανάλογο της τάξης αυτής, Γ) Στην προσθήκη ουδέτερου θραύσματος, η διαδικασία στο τετράπολο 1 και 2 είναι όμοια της σάρωσης πρόδρομου ιόντος, αλλά στο τετράπολο 3 γίνεται σάρωση για την παραγωγή φάσματος πρόδρομου ιόντος που υπολείπεται συγκεκριμένα ουδέτερα μόρια. Αυτή η διαδικασία προτιμάται όταν μία τάξη ενώσεων υφίσταται απώλεια συγκεκριμένης μάζας κατά την θραυσματοποίηση, Δ) Κατά την παρακολούθηση προεπιλεγμένου ιόντος (SRM/SRM), ένα συγκεκριμένο ιόν προεπιλέγεται στο τετράπολο 1, θραυσματοποιείται στο τετράπολο 2 και γίνεται επιλογή συγκεκριμένου ιόντος το οποίο εξέρχεται από το δεύτερο αναλυτή. Αυτή η λειτουργία κάνει την MS/MS την πιο ευαίσθητη και εκλεκτική τεχνική όπου στόχος είναι η ταυτοποίηση και η ποσοτική ανάλυση των ενώσεων στόχων.



Σχήμα 1.11. Σχηματική απεικόνιση δίδυμης φασματομετρίας μάζας.

1.1.6.2.5. Ανιχνευτής ιόντων – Ηλεκτροψεκασμός

Η λειτουργία του ανιχνευτή ιόντων είναι να δημιουργεί ηλεκτρικά σήματα ανάλογα με τον αριθμό και το φορτίο των ιόντων που καταλήγουν σε αυτόν. Είναι βασικό μέρος της λειτουργίας του φασματομέτρου μάζας. Το είδος του πειράματος που θα πραγματοποιηθεί και η διάταξη του οργάνου κρίνουν την επιλογή του ανιχνευτή. Οι ανιχνευτές ιόντος διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, στους ανιχνευτές που επιτρέπεται η άμεση μέτρηση φορτίου και στους ανιχνευτές που ενισχύεται η ένταση του σήματος. Ανιχνευτής που ανήκει στην πρώτη κατηγορία είναι το φαρανταϊκό κύπελλο ενώ ανιχνευτές που ανήκουν στην δεύτερη κατηγορία είναι ο ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής και ο φωτοπολλαπλασιαστής (Siuzdak, 1996).

Ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (Electron Ionization, ESI) αναφέρεται στην παραγωγή ιόντων ενός διαλύματος υπό αέρια φάση. Σύμφωνα με αυτή την τεχνική, το δείγμα μετατρέπεται σε αερόλυμα που αποτελείται από φορτισμένα σταγονίδια, τα οποία με την εξάτμιση του της ουσίας συρρικνώνονται αυξάνοντας ταυτόχρονα τη συγκέντρωση του φορτίου τους. Όταν οι δυνάμεις μεταξύ των ιόντων και του φορτίου υπερβούν τις δυνάμεις που συγκρατούν το σταγονίδιο, τα ιόντα μετακινούνται σε αέρια φάση και εστιάζουν στην ουσία υπό ανάλυση μέσω διαχωριστικών κατόπτρων. Η τεχνική αυτή έχει τη δυνατότητα να αναλύσει μόρια μικρού μοριακού βάρους, μη πτητικές ή ασταθείς ενώσεις και βιολογικές ενώσεις. Λόγω της σημαντικότητας της μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην μελέτη δομής βιομορίων (DNA, πρωτεΐνες), μη ομοιοπολικών συμπλόκων και στην ανάλυση και ποσοτικοποίηση χημικών ενώσεων και των μεταβολιτών τους. Στο φάσμα ESI εμφανίζεται κατανομή μοριακών ιόντων αναλογικά με διαφορετικούς αριθμούς φορτίων. Τα φορτισμένα ιόντα στο φάσμα μάζας δημιουργούνται συχνά με την πρόσθεση κατιόντων ή ανιόντων

ή μόνιμα φορτισμένων σωματιδίων. Μπορούν επίσης να σχηματιστούν ενώσεις μεταξύ των ανιόντων διαλύματος και ουδέτερων ουσιών υπό ανάλυση (Dooley, 2003; Blades et al., 1991).

Για την παραγωγή ιόντων πραγματοποιούνται τρία βήματα: α) παραγωγή φορτισμένων σωματιδίων στο τριχοειδές, β) σμίκρυνση φορτισμένων σταγονιδίων με εξάτμιση του διαλύτη και διάσπαση που οδηγεί σε φορτισμένα σωματίδια και γ) παραγωγή ιόντος αερίου φάσης. Κατά το πρώτο βήμα, οι μέθοδος λαμβάνει χώρα σε ένα σύστημα δύο ηλεκτροδίων, ένα μεταλλικό τριχοειδές, όπου πραγματοποιούνται οι αντιδράσεις αναλυτικής σημασίας και ένα αντισταθμιστικό ηλεκτρόδιο που δρα ως πλάκα δειγματοληψίας. Το διάλυμα εισάγεται στην πηγή, περνάει από το τριχοειδές ηλεκτροψεκασμού και ψεκάζεται προς το αντισταθμιστικό ηλεκτρόδιο. Με αυτή τη διαδικασία πραγματοποιείται διαχωρισμός φορτίων όπου ιόντα με ίδια πολικότητα κινούνται προς την επιφάνεια του υγρού, ενώ τα αρνητικά ιόντα προς τα τοιχώματα του τριχοειδούς. Το ηλεκτρικό πεδίο μεταξύ των ηλεκτροδίων, η διάμετρος του τριχοειδούς, η ταχύτητα ροής και η αγωγιμότητα του διαλύματος επηρεάζουν την ταχύτητα διαχωρισμού των φορτίων και τη διάμετρο των σταγονιδίων που σχηματίζονται (De la Mora et al., 2000; Gaskell, 1997; Wilm and Mann, 1994). Κατά την επαφή του διαλύματος με το τριχοειδές πραγματοποιούνται αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων μεταξύ του διαλύματος και του ηλεκτροδίου, όπως οξείδωση της ουσίας διαλύτη και του ουσίας αναλύτη. Αντιδράσεις εμφανίζονται και όταν τα ηλεκτρόνια μεταφερθούν στο αντισταθμιστικό ηλεκτρόδιο και ολοκλήρωση των αντιδράσεων σηματοδοτεί την ολοκλήρωση του ηλεκτρικού κύκλου. Ουσιαστικά, η μέθοδος ηλεκτροψεκασμού λειτουργεί ως κελί που διατηρεί την ισορροπία φορτίου, όπου επιτρέπεται η συνεχής παραγωγή φορτισμένων σταγονιδίων (Kebarle and Tang, 1993). Κατά το δεύτερο βήμα πραγματοποιείται εξάτμιση του διαλύτη με τη βοήθεια θέρμανσης. Στη συνέχεια πραγματοποιείται έκρηξη συνιστά ακανόνιστη διάσπαση από όπου παράγονται σωματίδια διαφορετικού μεγέθους, γνωστή ως Κουλομπική έκρηξη (Coulombic explosion) (Gaskell, 1997; Kebarle and Tang, 1993). Αυτή η διαδικασία έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή μικρότερων φορτισμένων σωματιδίων με όμοια πολικότητα, με μορφή αερολύματος. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται με σκοπό την περαιτέρω σμίκρυνση τους και την αποδιαλύτωση τους. Το τρίτο βήμα είναι συνδυασμός μηχανισμού όπου σχηματίζονται πολύ μικρά σταγονίδια με ένα ιόν που περιβάλλεται από πολλά μόρια διαλύτη (Μοντέλο Φορτισμένου Υπολοίπου, CRM), και ενός μηχανισμού όπου το σταγονίδιο συρρικνώνεται από την εξάτμιση του διαλύτη (Μοντέλο Εξάτμισης Ιόντος, IEM). Στη συνέχεια, πραγματοποιείται μεταφορά του ιόντος στην περιοχή υψηλού κενού ($\sim 10^{-4}$ – 10^{-5} Torr). Οι μηχανισμοί της διαδικασίας και ο τρόπος εφαρμογής παίζει σημαντικό ρόλο στις ιδιότητες του παραγόμενου ιόντος. Η εμφάνιση πολλαπλώς φορτισμένων ιόντων οφείλεται στο γεγονός όπου η κατάσταση του φορτίου των αερίων μπορεί να διαφοροποιηθεί εξαιτίας της σύγκρουσης ιόντων και μορίων. Η εξάπλωση στην χρήση ταυτοποίησης και προσδιορισμό ουσιών

αυτής της διαδικασίας εν μέρη οφείλεται στην εμφάνιση πολλαπλώς φορτισμένων σωματιδίων κατά την διάρκεια της. Επίσης, η μέθοδος αυτή μπορεί να διασπάσει τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις του αναλύτη με τα μόρια του διαλύτη. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές αποδίδονται σε αλληλεπίδραση μεταξύ ομοειδών ή όμοιες δομικά ενώσεις αλλά και σε αλληλεπίδραση μεταξύ μη όμοιων δομικά ενώσεων (**Gaskell, 1997**).

Μια πηγή ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό διακρίνεται για τα εξής χαρακτηριστικά: α) Τριχοειδές: όταν το τριχοειδές είναι τοποθετημένο σε θέση παράλληλα μετατοπισμένη με την οπή εισόδου ιόντων το σήμα που λαμβάνεται έχει μεγαλύτερη σταθερότητα χωρίς την μεταφορά σταγονιδίων προς τον αναλυτή μάζας. Ακόμα για την μείωση μεταφοράς σταγονιδίων στο φασματόμετρο η τοποθέτηση του γίνεται σε διαγώνια θέση προς την οπή εισόδου (**Gaskell, 1997; Cole, 1997**), β) Διαφορά δυναμικού. Η διαφορά δυναμικού εξαρτάται από την κατάσταση του φορτίου, την ταχύτητα ροής του διαλύματος, τη σύσταση του διαλύτη και την απόσταση τριχοειδούς και αντισταθμιστικού ηλεκτροδίου (**Cole, 1997; Cole, 2000**), γ) Αέριο εκ νέφωσης, το οποίο βοηθά στην σταθεροποίηση της διαδικασίας σε ταχύτητες ροής μεγαλύτερες των 0,2 ml/min. Στις περισσότερες περιπτώσεις χρησιμοποιείται άζωτο, λόγω της ομοαξονικής ροής του με το διάλυμα (**Whitehouse et al., 1985**), δ) Αέριο προστασίας, που έχει ως στόχο την απομάκρυνση ουδέτερων μορίων από τα φορτισμένα σταγονίδια, ε) Μορφολογία αερολύματος. Η συγκέντρωση του διαλύτη, η διάμετρος τριχοειδούς, η ταχύτητα ροής, το δυναμικό τριχοειδούς επηρεάζουν τον τρόπο ψεκασμού. Ο τρόπος ψεκασμού έχει τη δυνατότητα να εξασφαλίσει το πλέον καλύτερο σήμα (**Cole, 2000**).

1.1.6.2.6. Προετοιμασία δειγμάτων προς ανάλυση

Για την ανάλυση δειγμάτων με σκοπό τον προσδιορισμό χημικών ενώσεων, η χρήση τεχνικών με υψηλές αποδόσεις όπως η LC-MS/MS, κρίνεται απαραίτητη. Σε σύγκριση με τις ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους, όπως η UV μέθοδος, η χρήση της LC-MS/MS, παρουσιάζει βελτιωμένη εξειδίκευση, ευαισθησία και ταχύτητα στις βιοαναλυτικές μεθόδους, ενώ έχει τη δυνατότητα να εφαρμοστεί για τον προσδιορισμό περισσότερων από μία ενώσεις σε μία χρωματογραφική ανάλυση, με ταυτόχρονη χρήση απλών χρωματογραφικών μεθόδων και μικρού μήκους στήλης. Κάθε ουσία που αναλύεται, στην πολλαπλή ανάλυση, έχει μοναδικό αναλυτικό παράθυρο που αντιστοιχεί σε μία καμπύλη βαθμονόμησης (**Xu et al., 2007**). Ταυτόχρονα όμως με την ανάλυση, το στάδιο της προ κατεργασίας είναι ιδιαίτερα σημαντικό, καθώς σε περίπτωση μη σωστής εφαρμογής του, το αποτέλεσμα θεωρείται αναξιόπιστο, ανεξάρτητα από την ακρίβεια της αναλυτικής συσκευής που θα αναλύσει τα δείγματα. Όταν τα βιολογικά δείγματα δεν μπορούν να αναλυθούν απ' ευθείας στη μορφή που είναι, πραγματοποιείται κατεργασία των δειγμάτων, η οποία

πραγματοποιείται με τρόπους όπως κατακρήμνιση πρωτεϊνών, εκχύλιση υγρού-υγρού ή εκχύλιση στερεάς φάσης. Λόγω του χρόνου και της χειρωνακτικής εργασίας που χρειάζεται για την προετοιμασία των δειγμάτων αναπτύχθηκαν άλλες μέθοδοι όπως οι διατάξεις 96 θέσεων σε συνδυασμό με ρομποτικά συστήματα. Η φύση της ουσίας που θα αναλυθεί, η απαιτούμενη ευαισθησία, το μητρικό υλικό, ο αριθμός των δειγμάτων, καθώς και ο χρόνος και οι πόροι που είναι διαθέσιμοι καθορίζουν την μέθοδο που θα χρησιμοποιηθεί για την προσδιορισμό των ουσιών. Ο κύριος σκοπός της μεθόδου που χρησιμοποιείται είναι η εξυπηρέτηση του σκοπού για τον οποίο αναπτύσσεται και η απλότητα της εφαρμογής του (Watson, 2005; Moldoveanu and David, 2002).

Στα βιολογικά δείγματα περιλαμβάνονται συχνά πρωτεΐνες, λιπίδια, άλατα, οξέα, οργανικές ενώσεις, των οποίων οι ιδιότητες είναι όμοιες με των ουσιών που θα αναλυθούν, κάνοντας τη σύσταση του δείγματος ιδιαίτερα πολύπλοκη. Ταυτόχρονα η ουσία ως προς ανάλυση είναι στις περισσότερες περιπτώσεις σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις, συγκριτικά με τα υπόλοιπα συστατικά. Για αυτό το λόγο στις περισσότερες περιπτώσεις η προετοιμασία των δειγμάτων κρίνεται απαραίτητη για τον μηδενισμό των παρεμποδίσεων και τη βελτιστοποίηση της αξιοπιστίας της ανάλυσης. Η προετοιμασία του δείγματος κρίνεται απαραίτητη για: α) Απελευθέρωση και απομόνωση αναλύτη από το μητρικό υλικό, β) Απομάκρυνση ανεπιθύμητων ουσιών που ίσως παρεμποδίζουν τον προσδιορισμό της ουσίας υπό ανάλυση, δημιουργώντας ισχυρό σήμα ή καταστολή σήματος συγκαλύπτοντας το σήμα του διαλύτη, αλλοιώνοντας έτσι το σχήμα των κορυφών. γ) Απομάκρυνση ουσιών που ίσως επηρεάσουν τη διαχωριστική ικανότητα της χρωματογραφίας, την επαναληψιμότητα, την ευαισθησία, την ειδικότητα και την αξιοπιστία της ανάλυσης, δ) Απομάκρυνση ουσιών που ίσως φράσσουν τις σωληνώσεις, τη βαλβίδα και τη στήλη του υγρού χρωματογράφου, ε) Απομάκρυνση αλάτων που ίσως προκαλέσουν διαταράξεις όπως αποεστίαση ιόντων στο φασματόμετρο μαζών, στ) Σταθεροποίηση της ουσίας υπό ανάλυση για την αποφυγή υδρολυτικής ή ενζυματικής αποσύνθεσης. Όλα τα παραπάνω πρέπει να λαμβάνονται υπόψη για την αποτελεσματική προετοιμασία του δείγματος (Kataoka, 2003). Επίσης, η απώλειες στο δείγμα θα πρέπει να είναι στα ελάχιστα δυνατά επίπεδα, όπως επίσης και συγκράτηση συστατικών που παρεμποδίζουν την ανάλυση του δείγματος, ο χρόνος προετοιμασίας και το κόστος της ανάλυσης.

Η κατακρήμνιση πρωτεϊνών, η εκχύλιση υγρό-υγρό και η εκχύλιση στερεάς φάσης είναι οι πιο συνηθισμένες μέθοδοι προετοιμασίας βιολογικών δειγμάτων. Οι παραπάνω μέθοδοι πραγματοποιούνται εκτός του φασματόμετρου μάζας. Πλέον όμως είναι εφικτός ο καθαρισμός του δείγματος σε σειρά με το φασματόμετρο μάζας, διαδικασία η οποία καλείται καθαρισμός ταυτόχρονος με την ανάλυση. Επίσης, αναπτύσσονται συνεχώς μέθοδοι καθαρισμού με στόχο την απλοποίηση της κατεργασίας του δείγματος, όπως η μικροεχύλιση υγρής φάσης (liquid-phase microextraction, LPME) (Ho et al., 2003; Kuuranne et al., 2003). Αυτός ο τρόπος είναι τρόπος

εκχύλισης υγρό-υγρό, με τη διαφορά ότι ο όγκος της υπό ανάλυσης ουσίας είναι πολύ μικρότερος, μόλις μερικά μικρόλιτρα. Άλλη μια νέα μέθοδος είναι εκχύλιση υποβοηθούμενη με εξαλάτωση (Salting-out Assisted Liquid/Liquid Extraction, SALLE) (Wu et al., 2008), η οποία είναι επίσης παραλλαγή της εκχύλισης υγρό-υγρό με προσθήκη διαλύματος άλατος, η οποία είναι εύκολη στην αυτοματοποίηση, φιλική προς το περιβάλλον και ταχύτατη. Όπου κρίνεται απαραίτητο είναι εφικτός ο συνδυασμός δύο μεθόδων για καλύτερα αποτελέσματα.

1.1.7. Σκοπός του πειράματος

Τα φυτά παράγουν ένα ευρύ φάσμα χημικών ουσιών, μεταξύ των οποίων είναι και οι φαινολικές ενώσεις που είναι δευτερογενείς μεταβολίτες. Το φαινολικό περιεχόμενο του καρπού της ελιάς είναι πολύπλοκο και διαφέρει τόσο ποιοτικά, όσο και ποσοτικά σε ότι αφορά τις φαινολικές ενώσεις, καθώς εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως ο γονότυπος, το κλίμα, ο βαθμός ωρίμανσης και η διαδικασία επεξεργασίας του καρπού. Είναι γεγονός ότι υπάρχει σχετικά ικανοποιητικός αριθμός επιστημονικών εργασιών που μελετά την αλλαγή του φαινολικού προφίλ του ελαιόκαρπου κατά την ωρίμανση ή την επεξεργασία του καρπού. Ο μεγαλύτερος αριθμός ερευνών εστιάζουν στο φαινολικό προφίλ του ελαιόλαδου, ενώ η φαινολική σύνθεση του καρπού είναι διαφορετική, αλλάζει μετά την επεξεργασία και παραμένει ανεπαρκώς διερευνώμενη. Ωστόσο, δεν υπάρχει μελέτη που να συνδυάζει την μελέτη των φαινολικών ενώσεων, του καρπού της ποικιλίας 'Καλαμών', σε φρέσκους αλλά και επεξεργασμένους καρπούς, καθώς ο γονότυπος είναι από τους κυριότερους παράγοντες έκφρασης φαινολικών ενώσεων.

Ο σκοπός του πειράματος ήταν να μελετηθούν οι αλλαγές στη συγκέντρωση των κυριότερων φαινολικών ενώσεων του καρπού της ελιάς ποικιλίας 'Καλαμών', κατά την διαδικασία επεξεργασίας του καρπού με ευρέως χρησιμοποιούμενες διαφορετικές μεθόδους. Η ταυτοποίηση και ο ποσοτικός προσδιορισμός των κυριότερων φαινολικών ενώσεων σε φρέσκους και επεξεργασμένους καρπούς πραγματοποιήθηκε με δύο διαφορετικές αναλυτικές μεθόδους. Οι φαινολικές ενώσεις είναι βασικοί παράγοντες που συμβάλουν στις αντιοξειδωτικές ιδιότητες του καρπού της ελιάς και τα αποτελέσματα της έρευνας μπορούν να είναι χρήσιμα για την παραγωγή εμπορικών προϊόντων με καλά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και ευεργετικές ιδιότητες για την υγεία του καταναλωτή.

1.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1.2.1. Φυτικό υλικό

Στην έρευνα αυτή χρησιμοποιήθηκαν καρποί ελιάς ποικιλίας ‘Καλαμών’ (*Olea europaea* subsp. *Europaea*, var. ‘Kalamon’). Μελετήθηκαν τρία διαφορετικά είδη καρπών α) καρποί χωρίς επεξεργασία β) καρποί επεξεργασμένοι και τυποποιημένοι, έτοιμοι προς κατανάλωση, σύμφωνα με την μέθοδο επεξεργασίας ελληνικού τύπου (GR) και γ) καρποί επεξεργασμένοι και τυποποιημένοι, έτοιμοι προς κατανάλωση, σύμφωνα με την ισπανική μέθοδο επεξεργασίας (SP).

Οι καρποί συλλέχθηκαν στο στάδιο πλήρους ωριμότητας και χρώματος μαύρου. Οι καρποί συλλέχθηκαν από υγιή δέντρα της ποικιλίας ‘Καλαμών’, στις αρχές Νοεμβρίου, κατά τις πρωινές ώρες από ελαιώνα που βρίσκεται στον Άγιο Βλάσσιο, Βοιωτίας. Δόθηκε ιδιαίτερη προσοχή στην συλλογή υγιούς ιστού απαλλαγμένου από οποιοδήποτε είδος ασθένειας.

Μετά την συλλογή τα δείγματα φρέσκων καρπών τοποθετήθηκαν σε πλαστικά σακουλάκια με κατάλληλη σήμανση και στη συνέχεια αποθηκεύτηκαν σε καταψύκτη με θερμοκρασία -80°C , μέχρι την μελέτη τους ως μη επεξεργασμένοι καρποί. Για την μελέτη των καρπών με επεξεργασία έγινε προετοιμασία τριών συσκευασιών για κάθε μέθοδο επεξεργασίας, βάρους 500 γραμμαρίων.

Για την ανάλυση των καρπών σύμφωνα με την ελληνική μέθοδο επεξεργασίας, μετά την συλλογή τους, οι καρποί τοποθετήθηκαν σε διάλυμα χλωριούχου νατρίου με περιεκτικότητα 8-10% και προστέθηκε οξικό οξύ (0,5% v/v). Παρέμειναν στο διάλυμα για περίπου 7 με 8 μήνες έως ότου ολοκληρωθεί η ζύμωση. Στη συνέχεια αφαιρέθηκαν από το διάλυμα και παρέμειναν σε συνθήκες δωματίου με οξυγόνο για 24 ώρες. Τέλος, παρασκευάστηκαν στην τελική τους συσκευασία, με χλωριούχο νάτριο συγκέντρωσης 8% και pH 4.

Για την ανάλυση των καρπών με την σύμφωνα με την ισπανική μέθοδο επεξεργασίας, οι καρποί τοποθετήθηκαν σε διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου 2%, μέχρι τον χρόνο εισχώρησης του διαλύματος στα 2/3 της απόστασης της επιφάνειας από τον πυρήνα. Στη συνέχεια οι καρποί εξήχθησαν από το διάλυμα και πλύθηκαν για την αφαίρεση υπολειμμάτων. Έπειτα, τοποθετήθηκαν σε διάλυμα χλωριούχου νατρίου με γαλακτικό οξύ (1% v/v). Η συγκέντρωση άλατος στο διάλυμα ήταν 6% w/v. Μετά το τέλος της γαλακτικής ζύμωσης, όταν το pH έπεσε στο 4, αυξήθηκε η συγκέντρωση άλατος στο 8%. Τέλος, οι καρποί συσκευάστηκαν στην τελική τους συσκευασία σε άλμη με περιεκτικότητα 8%.

1.2.2. Προεργασία – Προετοιμασία δείγματος

Από το σύνολο των καρπών κάθε δείγματος, χρησιμοποιήθηκαν 6 καρποί για την παρασκευή και προετοιμασία του κάθε δείγματος προς ανάλυση. Δημιουργήθηκαν συνολικά 9 δείγματα καρπών, τρία για κάθε είδος καρπών. Πιο συγκεκριμένα δημιουργήθηκαν τρία δείγματα (1,2,3) προς ανάλυση για τους φρέσκους – μη συσκευασμένους καρπούς, τρία δείγματα (A1, A2, A3) για τους συσκευασμένους καρπούς με την GR μέθοδο επεξεργασίας και τρία δείγματα (B1, B2, B3) για τους συσκευασμένους καρπούς με την SP μέθοδο επεξεργασίας.

Πριν την εκχύλιση των φαινολικών ενώσεων από τους καρπούς πραγματοποιήθηκε αφαίρεση του πυρήνα. Μετά την αφαίρεση του πυρήνα, η σάρκα του καρπού τεμαχίστηκε σε πολύ μικρά κομμάτια και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ζύγιση για την εξαγωγή 1 γραμμαρίου ιστού για κάθε δείγμα. Η εκχύλιση των φαινολικών ενώσεων από τα δείγματα πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τους **Ryan et al, (2002)**, με μικρές τροποποιήσεις. Ακολούθησε ομογενοποίηση των δειγμάτων με ομογενοποιητή IKA Ultra Turrax T25 Basic, με 25 mL εξανίου (n-hexane). Η διαδικασία ομογενοποίησης επαναλήφθηκε δύο φορές. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε φυγοκέντριση των δειγμάτων για 10 λεπτά σε 2.500 xg σχετικής φυγόκεντρου δύναμης (Relative Centrifugal Force – RCF – το σωματίδιο υφίσταται επιτάχυνση ίση με 2.500 φορές την επιτάχυνση της βαρύτητας), σε φυγόκεντρο τύπου Labofuge 400 Functionline, με σκοπό την απομάκρυνση του στρώματος εξανίου. Αμέσως μετά την φυγοκέντριση, η υγρή φάση των δειγμάτων τοποθετήθηκε στο σκοτάδι σε falcons των 15 mL. Η στερεή φάση των δειγμάτων εκχυλίστηκε για 30 λεπτά σε λουτρό υπερήχων 25 mL, με 80% μεθανόλη. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε τέσσερις φορές. Σε κάθε επανάληψη της διαδικασίας τα δείγματα υπέστησαν φυγοκέντριση για 10 λεπτά σε 2.500 xg σχετικής φυγόκεντρου δύναμης. Το εκχύλισμα που παράχθηκε μεταφέρθηκε σε φιάλες των 100 mL, με ρύθμιση του όγκου με 80% μεθανόλη. Το παραγόμενο εκχύλισμα αποθηκεύτηκε στην κατάψυξη (-19 °C) με σκοπό τον προσδιορισμό και την ποσοτικοποίηση των φαινολικών ενώσεων.

Η διαδικασία προετοιμασίας των δειγμάτων ήταν κοινή για τις δύο διαφορετικές μεθόδους ανάλυσης που πραγματοποιήθηκαν

Συνοπτικά, για την προετοιμασία των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν:

- Φυτικά δείγματα ιστών καρπού, της ποικιλίας ‘Καλαμών’, σε τρία διαφορετικά είδη δειγμάτων, ένα δείγμα χωρίς επεξεργασία και δύο δείγματα με διαφορετική μέθοδο επεξεργασίας και τρεις επαναλήψεις για κάθε είδος δείγματος,
- Διαλύτες, μεθανόλη με βαθμό καθαρότητας HPLC της Sigma-Aldrich, εξάνιο αναλυτικής καθαρότητας, το οποίο είναι οργανική ένωση που χρησιμοποιήθηκε για την απομάκρυνση ελαίων και παρόμοιων ουσιών από τα δείγματα και την προετοιμασία τους για ανάλυση,

- Ζυγός ακριβείας, για τη ζύγιση δειγμάτων και αντιδραστηρίων. Χρησιμοποιήθηκε αναλυτικός ζυγός με ακρίβεια ανάγνωσης τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων,
- Ομογενοποιητής IKA Ultra Turrax T25 (IKA LABORRTECHNIK), για την παραγωγή ομοιογενών, ομοιόμορφων παρασκευασμάτων των δειγμάτων,
- Λουτρό υπερήχων, για τον καθαρισμό των δειγμάτων,

1.2.3. Ανάλυση φαινολικών ενώσεων με την HPLC-DAD μέθοδο προσδιορισμού και ποσοτικοποίησης (Α μέθοδος)

Για την εφαρμογή της χρωματογραφικής ανάλυσης και για την αποφυγή τυχόν φραξίματος των μηχανικών τμημάτων του αναλυτικού συστήματος από στερεά σωματίδια που βρίσκονται στο εκχύλισμα, προηγήθηκε φιλτράρισμα των εκχυλισμάτων των δειγμάτων, πριν την εφαρμογή την ανάλυσης, με φίλτρο σύριγγας PTFE, 25 mm, 45 μm διαμέτρου. Από το φιλτραρισμένο δείγμα χρησιμοποιήθηκαν 20 mL δείγματος για την ανάλυση.

Η ταυτοποίηση και ο ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων της σάρκας του καρπού της ελιάς, έγινε με την χρήση της τεχνικής αντίστροφης Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography – HPLC). Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τη συσκευή HPLC Agilent Technologies series 1200. Ο διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος πραγματοποιήθηκε με στήλη ταχείας ανάλυσης Zorbax Eclipse XDB-C18, 1.8 mm, διαστάσεων 50 x 4,6 mm, στους 45°C. Ο ανιχνευτής ορατού-υπεριώδους (UV-Vis) που χρησιμοποιήθηκε, ήταν ανιχνευτής διοδικής συστοιχίας (Diode-Array Detector – DAD). Η εισαγωγή του δείγματος στην αναλυτική στήλη πραγματοποιήθηκε μέσω βαλβίδας Rheodyne model 7725i, με κυκλική διαδρομή όγκου 20 mL. Η λειτουργία του συστήματος ελεγχόταν από υπολογιστικό σύστημα, στο οποίο καταγράφονταν οι μετρήσεις. Η καταγραφή και επεξεργασία των μετρήσεων έγινε με το πρόγραμμα Agilent Technologies MassHunter Workstation Software – Data Acquisition.

Ο όγκος έκχυσης του δείγματος (injection volume) στην αναλυτική στήλη ήταν 5 mL.

Οι ενώσεις διαχωρίστηκαν με την εφαρμογή συστήματος έκλουσης με χρονική διαβάθμιση σύστασης της κινητής φάσης (gradient elution). Η κινητή φάση αποτελείτο από τους εξής διαλύτες:

- 0,05% v/v φορμικό οξύ (formic acid) σε απιονισμένο νερό (HPLC grade) (διαλύτης A) και
- Μεθανόλη (HPLC gradient grade). (διαλύτης B).

Το πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης που εφαρμόστηκε, περιγράφεται ως εξής:

- 0 λεπτά: 25% Διαλύτης B
- 12 λεπτά: 70% Διαλύτης B
- 18 λεπτά: 100% Διαλύτης B
- 24 λεπτά: 100% Διαλύτης B

Μεταξύ των αναλύσεων πραγματοποιείται ξέπλυμα της στήλης με διάλυμα οξικού οξέος 2,2% v/v. Για τον καθαρισμό της στήλης ανά τακτά χρονικά διαστήματα χρησιμοποιήθηκε πρόγραμμα καθαρισμού διάρκειας 30 λεπτών ως εξής: 10 λεπτά – διάλυμα 100% οξικού οξέος, 10 λεπτά – διάλυμα 100% Ακετονιτριλίου, 10 λεπτά – διάλυμα 100% οξικού οξέος.

Η ανίχνευση των φαινολικών ενώσεων στα δείγματα έγινε φασματοσκοπικά στις περιοχές UV-Vis, διαμέσου του συστήματος DAD της HPLC. Το πρόγραμμα εναλλαγής του μήκους κύματος ρυθμίστηκε στον ανιχνευτή DAD, βάση των φασμάτων UV των φαινολικών συστατικών που ανιχνεύτηκαν στο δείγμα. Η ταυτοποίηση του κάθε συστατικού έγινε κατόπιν σύγκρισης των κορυφών του δείγματος με πρότυπες φαινολικές ενώσεις. Η σύγκριση αυτή βασίστηκε στο χρόνο κατακράτησης/έκλουσης (Retention time, tR), στο φάσμα απορρόφησης UV και στην αναλογική αύξηση της κορυφής μετά την προσθήκη γνωστής πρότυπης ουσίας στο δείγμα. Στον ιστό των καρπών της ποικιλίας ‘Καλαμών’, προσδιορίστηκαν οι φαινολικές ενώσεις υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη, ελευρωπαΐνη, λουτεολίνη, ρουτίνη και βερμπασκοζίτης. Οι εκλούμενες φαινολικές ενώσεις ανιχνεύτηκαν στην περιοχή 280 με 340 nm. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των παραπάνω φαινολικών ενώσεων που προσδιορίστηκαν στα δείγματα, πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας εμπορικά πρότυπα αυτών των ενώσεων, με χρήση πρότυπης καμπύλης φαινολικής ένωσης, για κάθε μία από τις ενώσεις που χρησιμοποιήθηκε. Ο ποσοτικός προσδιορισμός εκφράστηκε ως μg φαινολικής ένωσης ανά γραμμάριο σάρκας καρπού. Η ποσοτικοποίηση των φαινολικών ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο του εξωτερικού προτύπου. Η ποσοτικοποίηση βασίστηκε στο εμβαδόν της κορυφής. Η κάθε φαινολική ένωση, σε κάθε δείγμα, ποσοτικοποιήθηκε βάση των εξισώσεων των προτύπων καμπυλών αναφοράς.

Συνοπτικά, για τον προσδιορισμό και την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων με HPLC-DAD μέθοδο, χρησιμοποιήθηκαν:

- Οργανικά εκχυλίσματα των καρπών,
- Οξικό οξύ (HPLC grade), για το ξέπλυμα και τον καθαρισμό της στήλης,
- Μεθανόλη (HPLC grade), για το πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης,
- Απιονισμένο νερό (HPLC grade),
- Φορμικό οξύ, ως πτητικός ρυθμιστής pH στην βαθμιδωτή έκλουση της HPLC,
- Ακετονιτρίλιο (HPLC grade), για τον καθαρισμό της στήλης,

- Πρότυπες φαινολικές ενώσεις,
- Αναλυτικό σύστημα HPLC,
- Ζυγός ακριβείας,
- Μικροπιπέτες,
- Αναδευτήρας (Vortex).

1.2.4. Ανάλυση φαινολικών ενώσεων με την LC-(ESI)-MS/MS μέθοδο προσδιορισμού και ποσοτικοποίησης (B μέθοδος)

Για την εφαρμογή της ανάλυσης και για την αποφυγή τυχόν φραξίματος των μηχανικών τμημάτων του αναλυτικού συστήματος από στερεά σωματίδια που βρίσκονται στο εκχύλισμα, προηγήθηκε φιλτράρισμα των εκχυλισμάτων των δειγμάτων, πριν την εφαρμογή την ανάλυσης, με φίλτρο σύριγγας PTFE, 25 mm, 45 μm διαμέτρου. Από το φιλτραρισμένο δείγμα χρησιμοποιήθηκαν 20 mL δείγματος για την ανάλυση.

Η ταυτοποίηση και ο ποσοτικός προσδιορισμός των φαινολικών ενώσεων του ελαιόκαρπου έγιναν με τη χρήση της τεχνικής αντίστροφης Δίδυμης Φασματομετρίας Μάζας με ιοντισμό με ηλεκτροψεκασμό (LC-(ESI)-MS/MS). Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το σύστημα Agilent Technologies series 1260 HPLC Agilent Technologies 6460 Triple-Quad Mass Detector, με πηγή ιόντων ηλεκτροψεκασμού. Η χρωματογραφική στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν αντίστροφης φάσης, η οποία φέρει ως υλικό πλήρωσης ομάδες σιλανόλης χημικά συνδεδεμένες με αλυσίδες 18 ατόμων άνθρακα. Συγκεκριμένα, ο διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος πραγματοποιήθηκε με στήλη ταχείας ανάλυσης Zorbax Eclipse XDB-C18, διατάσεων 50 x 4,6 mm, διαμέτρου σωματιδίων 1,8 mm. Το πολύ μικρό πορώδες της στήλης συνέβαλε στο σχηματισμό πολύ στενών κορυφών κατά την έκλυση των ενώσεων, γεγονός που είχε ως αποτέλεσμα τον καλύτερο χρωματογραφικό διαχωρισμό και το μεγάλο ύψος κορυφής για κάθε ένωση που αναλύθηκε. Η στήλη ταχείας ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκε διατηρείτο στους 50°C. Η εισαγωγή του δείγματος έγινε με ειδική σύριγγα Hamilton HPLC στον δειγματολήπτη (injector) και ο όγκος του ενέσιμου δείγματος ήταν 5 mL. Η λειτουργία του συστήματος ελεγχόταν από υπολογιστικό σύστημα, στο οποίο καταγράφονταν οι μετρήσεις. Η καταγραφή και επεξεργασία των μετρήσεων έγινε με το πρόγραμμα Agilent Technologies MassHunter Workstation Software – Data Acquisition (ver. B.03.01).

Οι ενώσεις διαχωρίστηκαν με την εφαρμογή συστήματος έκλυσης με χρονική διαβάθμιση σύστασης κινητής φάσης (gradient elution). Η κινητή φάση περιλάμβανε τους εξής διαλύτες:

- 0,05% v/v φορμικό οξύ (formic acid) σε απιονισμένο νερό (HPLC grade) (διαλύτης A)
- Μεθανόλη (HPLC gradient grade). (διαλύτης B).

Το πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλυσης που χρησιμοποιήθηκε, περιγράφεται ως εξής:

- 0 λεπτά: 25% Διαλύτης B,
- 12 λεπτά: 70% Διαλύτης B,
- 18 λεπτά: 100% Διαλύτης B
- 24 λεπτά: 100% Διαλύτης B

Ο βαθμός ροής της λειτουργίας διαβάθμισης ήταν 0,5 mL ανά λεπτό και ο χρόνος επανεξισορρόπησης ήταν 6 λεπτά.

Μεταξύ των αναλύσεων πραγματοποιήθηκε ξέπλυμα της στήλης με διάλυμα οξικού οξέος 2,2% v/v. Για τον καθαρισμό της στήλης ανά τακτά χρονικά διαστήματα χρησιμοποιήθηκε πρόγραμμα καθαρισμού διάρκειας 30 λεπτών, ως εξής: 10 λεπτά - διάλυμα 100% Οξικού οξέος, 10 λεπτά - διάλυμα 100% Ακετονιτριλίου, 10 λεπτά - διάλυμα 100% οξικού οξέος.

Η ανίχνευση των εκλούμενων ενώσεων στα δείγματα πραγματοποιήθηκε διαμέσου του συστήματος (ESI)-MS/MS, χρησιμοποιώντας τις παραμέτρους πηγής ιόντος, ως εξής:

- Πίεση αερίου νεφελοποίησης (N₂): 50 psi
- Ροή αερίου Ξήρανσης (N₂): 10 λίτρα ανά λεπτό
- Θερμοκρασία: 350 οC
- Τριχοειδής Τάση: 4 KV
- Αρνητική πολικότητα

Τα δεδομένα αποκτήθηκαν σε δυναμική λειτουργία παρακολούθησης προεπιλεγμένου ιόντος (SRM). Για την απόκτηση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεκριμένες βελτιστοποιημένοι παράμετροι για τις φαινολικές ενώσεις: πρόδρομο ιόν, παραγόμενο ιόν, τάση θραυσματοποίησης, τάση σύγκρουσης.

Η τάση του κάθε συστατικού έγινε κατόπιν σύγκρισης των κορυφών του δείγματος με τις κορυφές πρότυπων φαινολικών ενώσεων. Για όλες τις ενώσεις, οι περιοχές κορυφών προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό Agilent MassHunter Workstation Software – Qualitative Analysis (ver. B.06.01). Στον ιστό των καρπών της ποικιλίας ‘Καλαμών’ προσδιορίστηκαν οι φαινολικές ενώσεις ελευρωπαϊνή, υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη, λουτεολίνη, ρουτίνη, και βερμπασκοζίτης. Οι καμπύλες βαθμονόμησης σχεδιάστηκαν και οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό Microsoft Excel Software. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των παραπάνω ενώσεων, πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας εμπορικά πρότυπα αυτών των ενώσεων, με χρήση πρότυπης καμπύλης πολλαπλών σημείων

αναφοράς της πρότυπης φαινολικής ένωσης, για κάθε μία από τις ενώσεις που χρησιμοποιήθηκε. Ο ποσοτικός προσδιορισμός εκφράστηκε ως µg φαινολικής ένωσης ανά γραµµάριο καρπού ελιάς χωρίς πυρήνα. Η ποσοτικοποίηση των φαινολικών ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν πραγματοποιήθηκε σύµφωνα µε τη µέθοδο του εξωτερικού προτύπου. Η ποσοτικοποίηση βασίστηκε στο εµβαδόν της κορυφής. Η κάθε φαινολική ένωση, σε κάθε δείγµα, ποσοτικοποιήθηκε µε βάση τις εξισώσεις των προτύπων καµπυλών αναφοράς.

Συνοπτικά, για τον προσδιορισµό και την ποσοτικοποίηση των δειγµάτων µε τη µέθοδο LC-MS/MS, χρησιµοποιήθηκαν:

- Οργανικά εκχυλίσµατα καρπού,
- Μεθανόλη (HPLC grade), για το πρόγραµµα βαθµιδωτής έκλουσης,
- Απιονισµένο νερό (HPLC grade),
- Οξικό οξύ (HPLC grade), για το ξέπλυµα και τον καθαρισµό της στήλης,
- Φορµικό οξύ (HPLC grade), για το πρόγραµµα βαθµιδωτής έκλουσης,
- Ακετονιτρίλιο (HPLC grade), για τον καθαρισµό της στήλης,
- Πρότυπες φαινολικές ενώσεις,
- Αναλυτικό σύστηµα HPLC,
- Αναλυτικό σύστηµα MS
- Σύστηµα ιοντισµού µε ηλεκτροψεκασµό,
- Ζυγός ακριβείας,
- Μικροπιπέτες,
- Αναδευτήρας (Vortex)

1.2.5. Παρασκευή πρότυπων φαινολικών διαλυµάτων

Ο χρόνος κατακράτησης και το φάσµα απορρόφησης έξι προτύπων φαινολικών ενώσεων, οι οποίες σύµφωνα µε τη διεθνή βιβλιογραφία συναντώνται κατά κύριο λόγο σε φυτικά εκχυλίσµατα ελιάς, υπολογίστηκαν µε τις µεθόδους HPLC-(DAD) και LC-MS/MS. Οι πρότυπες ενώσεις διαλύθηκαν σε μεθανόλη χρωµατογραφικής καθαρότητας και παρασκευάστηκαν διαλύµατα από αυτές, σε συγκέντρωση 1000 ppm. Από τα αρχικά διαλύµατα πραγµατοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις σε διάφορες συγκεντρώσεις, όπως 20, 50, 100, 200 και 500 ppm για κάθε πρότυπη ουσία. Στη συνέχεια κατασκευάστηκαν οι πρότυπες καµπύλες βαθµονόµησης µε βάση το εµβαδόν των κορυφών των προτύπων ενώσεων, µετά από εισαγωγή των δειγµάτων αυτών στα συστήµατα ανάλυσης. Οι εξισώσεις των γραµµών (Εξισώσεις γραµµικής παλινδρόµησης), βάση των οποίων

επιτεύχθηκε ο προσδιορισμός των περιεχόμενων φαινολικών συστατικών των δειγμάτων δίνονται στον παρακάτω πίνακα. Αποδεκτές έγιναν οι εξισώσεις με συντελεστή προσδιορισμού $r^2 \geq 0,96$.

Πρότυπες ουσίες	Εξίσωση
Υδροξυτυροσολη	$y=15621x-31,435$
Τυροσόλη	$y=14683x-28,434$
Βερμπασκοζίτης	$y=2557,1x-12,589$
Ελευρωπαΐνη	$y=48117x-106,97$
Ρουτίνη	$y=4160,9x-67,164$
Λουτεολίνη	$y=1220,2x-3248$

Όλα τα πρότυπα διαλύματα αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη, στους -20°C .

1.2.6. Στατιστική ανάλυση

Η επίδραση της επεξεργασίας των καρπών στην συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων αναλύθηκε με τη μέθοδο στατιστικής ανάλυσης διακύμανσης ενός παράγοντα (One-Way analysis of Variance ANOVA).

Οι συγκρίσεις των φαινολικών ενώσεων για όλα τα δείγματα, φρέσκων και επεξεργασμένων καρπών, έγιναν με βάση τη μέθοδο της έντιμης σημαντικής διαφοράς (HSD, Post-hoc Test) της μεθόδου Tukey – HSD.

Οι αναλύσεις των κύριων συνιστωσών (PCA, Principal Component Analysis) και οι συσχετίσεις ζευγών, εφαρμόστηκαν με σκοπό να γίνει γενική εκτίμηση της παραλλακτικότητας και να διερευνηθούν οι σχέσεις μεταξύ των μεταβλητών. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων των κύριων συνιστωσών πραγματοποιήθηκε με βάση την eigenvalue και το ποσοστό διακύμανσης που εξηγείται από κάθε συνιστώσα ή από το σύνολο συνιστωσών. Από το γράφημα της θέσης των τιμών των κύριων συνιστωσών πραγματοποιήθηκε η ερμηνεία ομαδοποίησης των δειγμάτων. Από το γράφημα των συντελεστών των κύριων συνιστωσών πραγματοποιήθηκε η ερμηνεία της σχέσης μεταξύ των μεταβλητών. Πιο συγκεκριμένα, εξετάστηκε η γωνία που ορίζεται από τη θέση δύο μεταβλητών με βάση το κέντρο των συντελεστών των κύριων συνιστωσών, αλλά και η θέση τους ως προς τις ακραίες τιμές (-1 και 1) των αξόνων x και y . Ισχυρή θετική συσχέτιση μεταξύ των μεταβλητών υποστηρίζεται όταν οι γωνίες μεταξύ τους τείνουν στην τιμή 0° και η θέση τους είναι εγγύς στην ακραία τιμή ενός από τους άξονες x και y . Αντίστροφα, όταν η γωνία τείνει στις 180° υποστηρίζεται αρνητική συσχέτιση. Οι σχέσεις μεταξύ των μεταβλητών εξετάστηκαν και με βάση την πιθανότητα (P) και το συντελεστή συσχέτισης (r) που προέκυψαν από την ανάλυση των συσχετίσεων ανά ζεύγη.

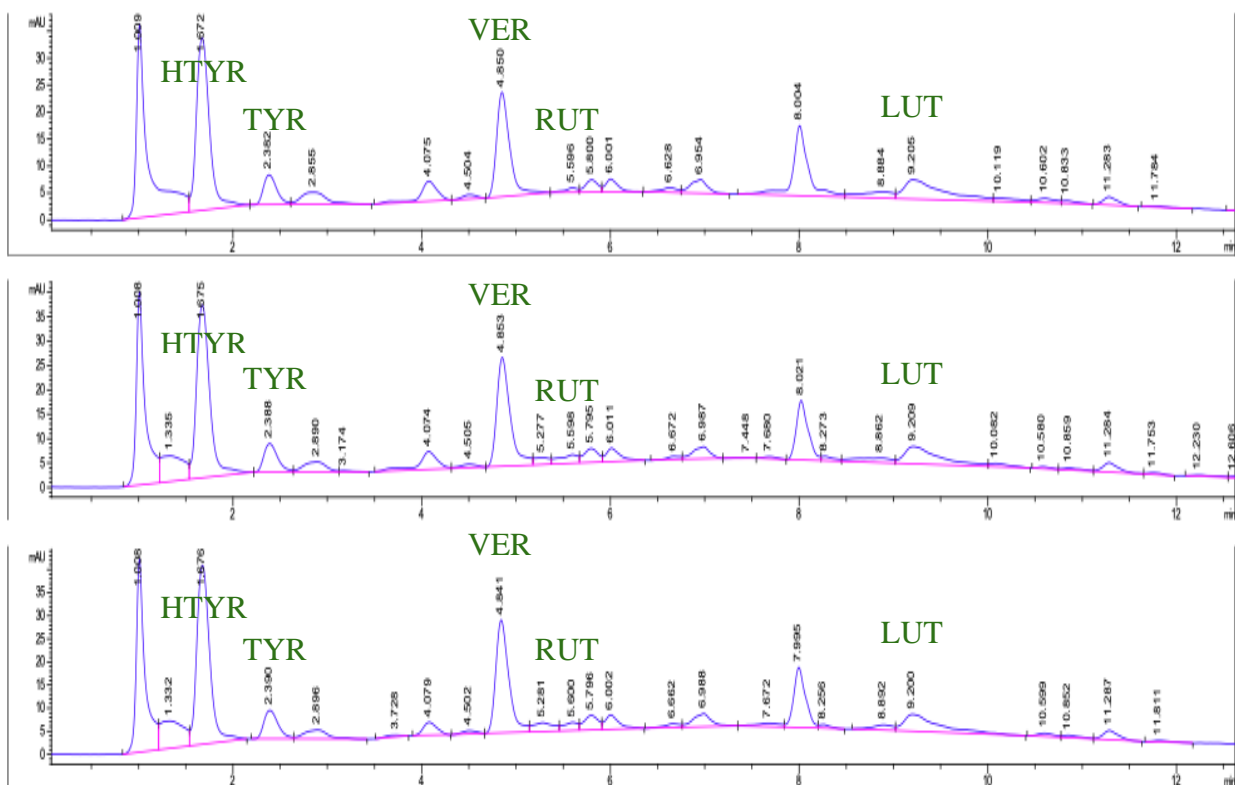
Οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό JMP 15.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA) και το λογισμικό XLSTAT 2020.3.1. (Addinsoft).

1.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1.3.1. Αποτελέσματα ανάλυσης φαινολικών ενώσεων με την HPLC-(DAD) μέθοδο προσδιορισμού και ποσοτικοποίησης (Α μέθοδος)

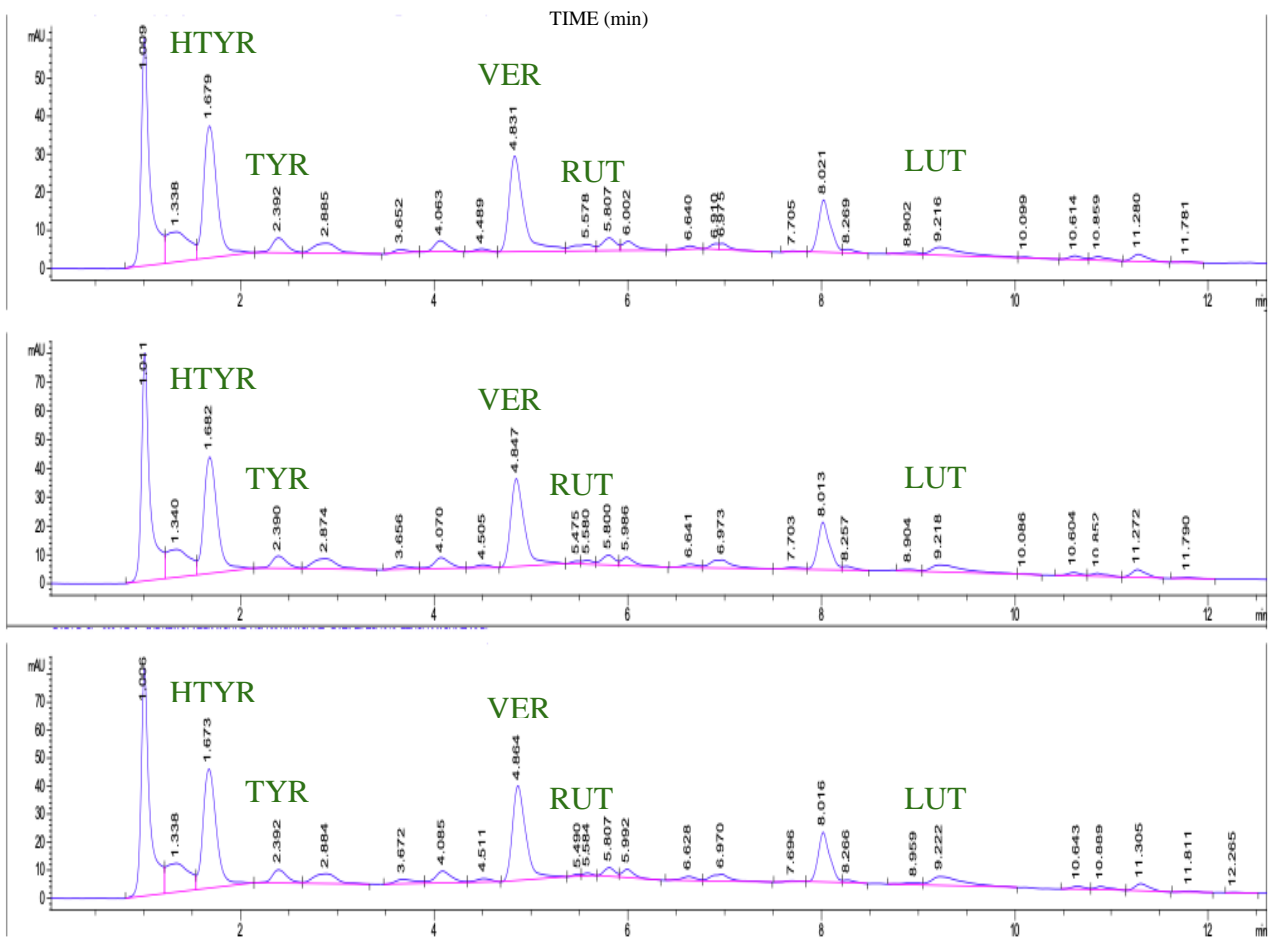
Για την εκχύλιση των φαινολικών ενώσεων από καρπούς ελιάς εφαρμόστηκε η μέθοδος **Ryan et al, (2002)**, με διαφοροποιήσεις. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των επιμέρους βιοενεργών φαινολικών ενώσεων υδροξυτυροσόλη, ελευρωπαϊνή, τυροσόλη, βερμπασκοζίτης, λουτεολίνη και ρουτίνη, οι οποίες ταυτοποιήθηκαν στον καρπό της ελιάς ποικιλίας 'Καλαμών'. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε δείγματα φρέσκων καρπών, σε δείγματα καρπών επεξεργασμένων με την Ελληνική μέθοδο επεξεργασίας και σε δείγματα καρπών επεξεργασμένων με την Ισπανική μέθοδο επεξεργασίας. Για την ανάλυση εφαρμόστηκε η τεχνική HPLC-(DAD). Τα αποτελέσματα της μεθόδου επέτρεψαν το πρώτο φιλτράρισμα ενώσεων σχετικά με τον καθορισμό και την ποσοτικοποίησή τους. Αναπαράχθηκαν φάσματα UV-Vis, επιτρέποντας την ταξινόμηση τους. Τα δείγματα των καρπών, παρουσίασαν ικανοποιητικό φαινολικό κλάσμα για όλες τις φαινολικές ενώσεις εκτός της ελευρωπαϊνής. Η συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων σε όλα τα δείγματα μετρήθηκε σε μικρογραμμάρια (μg) ανά γραμμάριο (g) σάρκας καρπού. Οι εκλούμενες φαινολικές ενώσεις ανιχνεύτηκαν στην περιοχή 280 με 340 nm (Γράφημα 1.1, 1.2, 1.3)

Στους μη επεξεργασμένους καρπούς η φαινολική ένωση που παρουσίασε τη μεγαλύτερη συγκέντρωση ήταν η ρουτίνη, της οποίας η μέση τιμή της συγκέντρωσης ήταν 653,8 μg/g (η συγκέντρωση κυμάνθηκε από 574,8 έως 745,3 μg/g) (Πίνακας 1.10). Η υδροξυτυροσόλη παρουσίασε την αμέσως επόμενη μεγαλύτερη μέση τιμή συγκέντρωσης, 273,43 μg/g (η συγκέντρωση κυμάνθηκε από 255,2 έως 278,7 μg/g), ακολουθούμενη από την τυροσόλη, της οποίας η μέση τιμή συγκέντρωσης ήταν 215,56 μg/g (το εύρος των τιμών της συγκέντρωσης κυμάνθηκε από 188,3 έως 236,7 μg/g) (Πίνακας 1.10). Σε μικρότερες συγκεντρώσεις ανιχνεύτηκαν οι ενώσεις λουτεολίνη και βερμπασκοζίτης, ο οποίος παρουσίασε τη μικρότερη μέση τιμή συγκέντρωσης, 31,50 μg/g (η συγκέντρωση κυμάνθηκε από 8,7 έως 47,9 μg/g) (Πίνακας 1.10). Τα επίπεδα συγκέντρωσης της ελευρωπαϊνής ήταν κάτω από το επίπεδο ποσοτικοποίησης, σε όλα τα δείγματα των μη επεξεργασμένων καρπών, συνεπώς δεν συμπεριλαμβάνεται η ποσοτικοποίηση της στην έρευνα με την μέθοδο HPLC-(DAD).



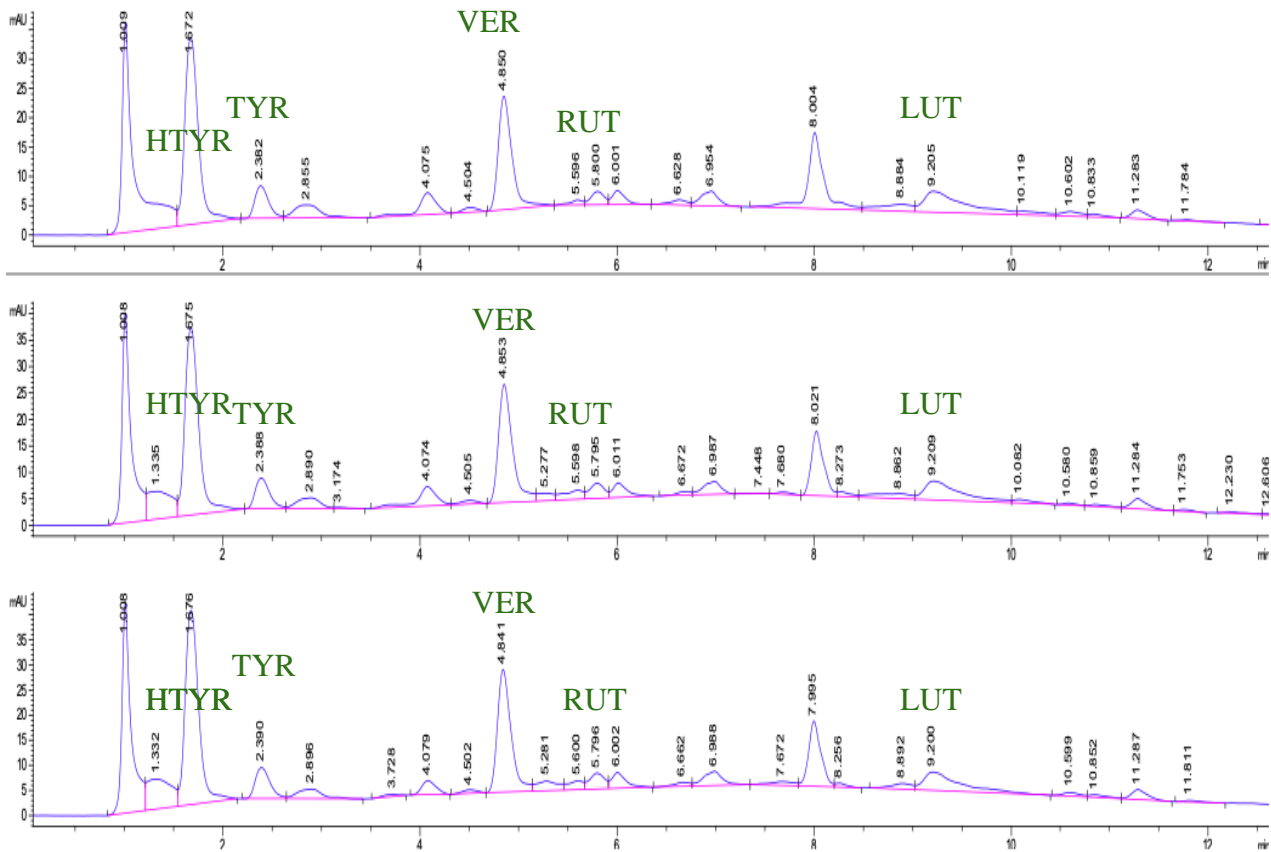
Γράφημα 1.1. HPLC χρωματογράφημα των δειγμάτων καρπών χωρίς επεξεργασία, για τις φαινολικές ενώσεις υδροξυτυροσόλη (HTYR), τυροσόλη (TYR), βερμπασκοζίτη (VER), ρουτίνη (RUT), λουτεολίνη (LUT).

Στους επεξεργασμένους με την Ελληνική μέθοδο επεξεργασίας καρπούς η φαινολική ένωση που παρουσίασε την μεγαλύτερη μέση τιμή συγκέντρωσης ήταν ο βερμπασκοζίτης, 504,26 μg/g (η συγκέντρωση κυμάνθηκε από 431,8 έως 567,7 μg/g) (Πίνακας 1.10). Η υδροξυτυροσόλη παρουσίασε την αμέσως επόμενη υψηλότερη μέση τιμή συγκέντρωσης, η οποία ήταν 367,83 (το εύρος των τιμών της συγκέντρωσης κυμάνθηκε από 315,9 έως 353,3 μg/g). Σε μικρότερα επίπεδα συγκέντρωσης παρουσιάστηκαν οι φαινολικές ενώσεις λουτεολίνη και τυροσόλη, με μέση τιμή συγκέντρωσης 92,4 μg/g (και οι τιμές κυμάνθηκαν από 85,9 έως 101,5 μg/g) και 84,33 μg/g (και το εύρος των τιμών κυμάνθηκε από 80,4 έως 86,9 μg/g) αντίστοιχα (Πίνακας 1.10). Την χαμηλότερη συγκέντρωση παρουσίασε η ρουτίνη, με μέση τιμή συγκέντρωσης, 5,50 μg/g (οι τιμές της συγκέντρωσης κυμάνθηκαν από 4,1 έως 6,8 μg/g). Ομοίως, το επίπεδο συγκέντρωσης της ελευρωπαΐνης ήταν κάτω από το επίπεδο ποσοτικοποίησης σε όλα τα δείγματα, συνεπώς δεν ήταν εφικτή η ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης της.



Γράφημα 1.2. HPLC χρωματογράφημα των δειγμάτων καρπών επεξεργασμένων με Ελληνικού τύπου επεξεργασία για τις φαινολικές ενώσεις υδροξυτυροσόλη (HTYR), τυροσόλη (TYR), βερμπασκοζίτη (VER), ρουτίνη (RUT), λουτεολίνη (LUT).

Στους επεξεργασμένους με την Ισπανική μέθοδο επεξεργασίας καρπούς, ο βερμπασκοζίτης και η υδροξυτυροσόλη παρουσίασαν τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε όλα τα δείγματα. Η μέση τιμή συγκέντρωσης του βερμπασκοζίτη ήταν 453,66 $\mu\text{g/g}$ (οι τιμές κυμάνθηκαν από 347,3 έως 523,6 $\mu\text{g/g}$) και η μέση τιμή συγκέντρωσης της Υδροξυτυροσόλης ήταν 333,96 (το εύρος των τιμών κυμάνθηκε από 304,7 έως 413,0 $\mu\text{g/g}$) (Πίνακας 1.10). Σε χαμηλότερα επίπεδα συγκέντρωσης κυμάνθηκαν η λουτεολίνη και η τυροσόλη, με μέση τιμή συγκέντρωσης 118,16 $\mu\text{g/g}$ (οι τιμές της συγκέντρωσης κυμάνθηκαν από 103,5 έως 132,8 $\mu\text{g/g}$) και 123,66 $\mu\text{g/g}$ (οι τιμές της συγκέντρωσης κυμάνθηκαν από 106,9 έως 136,8 $\mu\text{g/g}$) αντίστοιχα (Πίνακας 1.10). Την χαμηλότερη συγκέντρωση παρουσίασε η ρουτίνη με μέση τιμή συγκέντρωσης 3,4 $\mu\text{g/g}$ (το εύρος των τιμών κυμάνθηκε από 2,5 έως 4,9 $\mu\text{g/g}$). Και στους επεξεργασμένους με την Ισπανική μέθοδο επεξεργασίας καρπούς, η ποσοτικοποίηση της ελευρωπαΐνης δεν κατέστη δυνατή, καθώς το επίπεδο συγκέντρωσης της, σε όλα τα δείγματα, ήταν κάτω του επιπέδου ποσοτικοποίησης.



Γράφημα 1.3. HPLC χρωματογράφημα των δειγμάτων καρπών επεξεργασμένων με την Ισπανική μέθοδο επεξεργασίας για τις φαινολικές ενώσεις υδροξυτυροσώλη (HTYR), τυροσώλη (TYR), βερμπασκοζίτη (VER), ρουτίνη (RUT), λουτεολίνη (LUT).

Στον Πίνακα 1.10 παρουσιάζεται το σύνολο των δειγμάτων και η μέση τιμή της συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων που παρουσίασε κάθε δείγμα. Στα γραφήματα 1.1, 1.2, 1.3 παρουσιάζονται ενδεικτικά τα HPLC χρωματογραφήματα για το σύνολο των δειγμάτων, όπου απεικονίζεται η σειρά έκλουσης των φαινολικών ενώσεων.

Πίνακας 1.10. Μέση τιμή συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων (μg/g) σε καρπούς ελιάς ποικιλίας ‘Καλαμών’, σε μη επεξεργασμένους (Control) και επεξεργασμένους με τον Ελληνικό (GR) και Ισπανικό (SP) τύπο επεξεργασίας, με την αναλυτική μέθοδο HPLC-(DAD).

	<i>CONTROL</i>	<i>GR</i>	<i>SP</i>
<i>HYDROXYTYROSOL</i>	273,43±8,72	367,83±32,53	333,96±10,82
<i>TYROSOL</i>	215,56±14,30	84,33±1,99	123,66±8,82
<i>OLEUROPEIN</i>	nd	nd	nd
<i>RUTIN</i>	653,80±49,51	5,50±0,78	3,40±0,75
<i>LUTEOLIN</i>	106,06±9,12	92,40±4,68	118,16±8,45
<i>VERBASCOSIDE</i>	31,50±11,76	504,26±39,49	453,66±54,06

nd = non detected

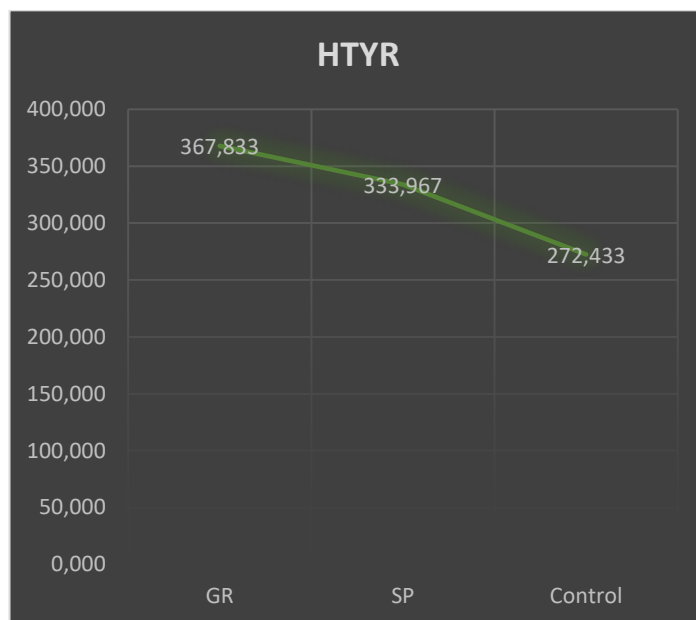
Πίνακας 1.11. Σύγκριση των καρπών χωρίς επεξεργασία (Control), των καρπών με επεξεργασία Ελληνικού τύπου (GR) και των καρπών με επεξεργασία Ισπανικού τύπου (SP), με Tukey HSD Post-hoc Test (One-Way Analysis of Variance ANOVA), με την αναλυτική μέθοδο HPLC-(DAD).

<i>Compound</i>	<i>SP-GR</i>	<i>SP-Control</i>	<i>Gr-Control</i>
hydroxytyrosol	ns	*	*
tyrosol	ns	**	***
oleuropein	-	-	-
rutin	ns	***	***
luteolin	ns	ns	ns
verbascocide	ns	**	***

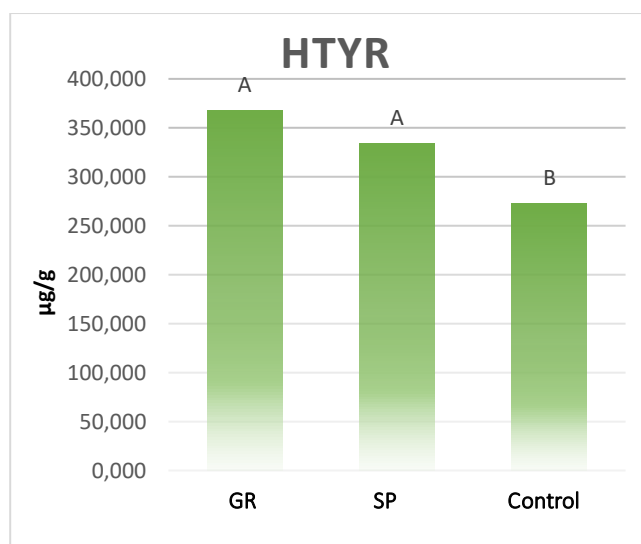
^aΣτατιστική σημαντικότητα ορίζεται σε $\alpha < 0,05$. ns, όχι στατιστικώς σημαντικό και επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας * $< 0,05$, ** $< 0,01$, *** $< 0,001$.

Ο χρόνος έκλουσης της υδροξυτυροσόλης, κυμάνθηκε από 1,673 έως 1,691 min (Γράφημα 1.1, 1.2, 1.3). Υψηλότερη συγκέντρωση υδροξυτυροσόλης παρουσίασαν οι επεξεργασμένοι με Ελληνικού τύπου επεξεργασία καρποί με μέση τιμή συγκέντρωσης 367,83 μg/g (το εύρος των τιμών κυμάνθηκε από 304,7 έως 413,0 μg/g), ενώ μικρότερη μέση τιμή συγκέντρωσης παρουσίασαν οι μη

επεξεργασμένοι καρποί, 273,43 $\mu\text{g/g}$ (το εύρος των τιμών κυμάνθηκε από 278,7 έως 283,4 $\mu\text{g/g}$) (Πίνακας 1.10). Η μέση τιμή της συγκέντρωσης της υδροξυτυροσόλης στους επεξεργασμένους με Ισπανικό τύπο επεξεργασία καρπούς ήταν 333,96 $\mu\text{g/g}$ (το εύρος τιμών κυμάνθηκε από 315,9 έως 353,3 $\mu\text{g/g}$). Η διαφορά στη συγκέντρωση της υδροξυτυροσόλης ήταν στατιστικώς σημαντική μεταξύ των επεξεργασμένων και των μη επεξεργασμένων καρπών (Πίνακας 1.11).

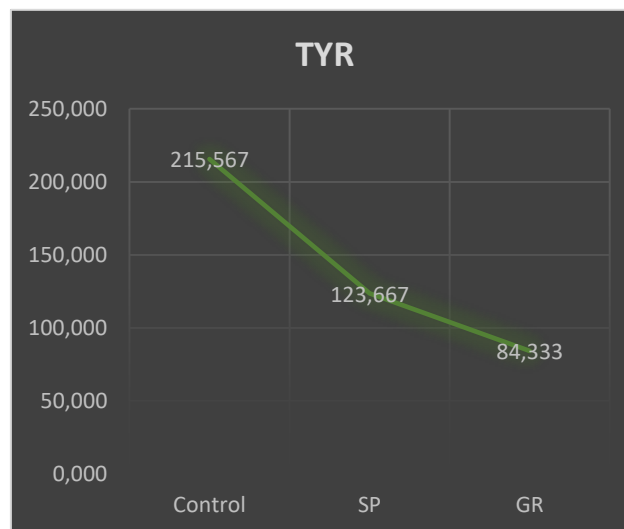


Γράφημα 1.4. Μέση τιμή συγκέντρωση υδροξυτυροσόλης (HTYR) σε $\mu\text{g/g}$ σάρκας καρπού, των δειγμάτων καρπών, με την αναλυτική μέθοδο HPLC-(DAD).

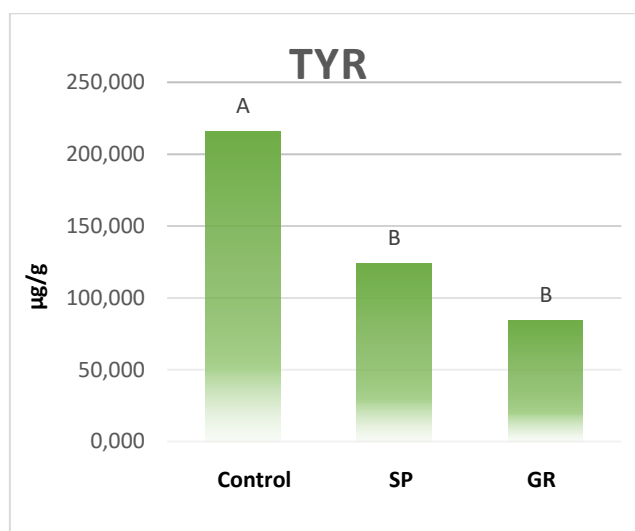


Γράφημα 1.5. Μέση τιμή συγκέντρωσης υδροξυτυροσόλης (HTYR) και συγκρίσεις μεταξύ των διαφορετικών μεθόδων επεξεργασίας των καρπών, με την αναλυτική μέθοδο HPLC-(DAD). Διαφορετικά γράμματα (A,B) υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($P < 0,05$).

Ο χρόνος έκλυσης της τυροσόλης ήταν από 2,166 έως 2,392 min (Γράφημα 1.1, 1.2, 1.3). Στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση τυροσόλης παρουσίασαν οι μη επεξεργασμένοι καρποί, σε σύγκριση με τους επεξεργασμένους, και με τους δύο τύπους επεξεργασίας καρπούς. Η μέση τιμή συγκέντρωσης της τυροσόλης στους μη επεξεργασμένους καρπούς ήταν 215,56 μg/g το εύρος τιμών κυμάνθηκε από 188,3 έως 236,7 μg/g) (Πίνακας 1.10). Χαμηλότερη συγκέντρωση τυροσόλης παρουσίασαν οι επεξεργασμένοι με Ελληνικό τύπο επεξεργασίας καρποί με μέση τιμή συγκέντρωσης 84,33 μg/g (το εύρος τιμών κυμάνθηκε από 80,4 έως 86,9 μg/g), ενώ στους επεξεργασμένους με την Ισπανική μέθοδο επεξεργασίας καρπούς η μέση τιμή συγκέντρωσης της τυροσόλης ήταν 123,66μg/g (το εύρος των τιμών κυμάνθηκε από 106,9 έως 136,8 μg/g) (Πίνακας 1.10). Η συγκέντρωση της τυροσόλης στους επεξεργασμένους με τον Ελληνικό και με τον Ισπανικό τύπο επεξεργασίας δεν παρουσίασε στατιστικώς σημαντική διαφορά (Πίνακας 1.11).

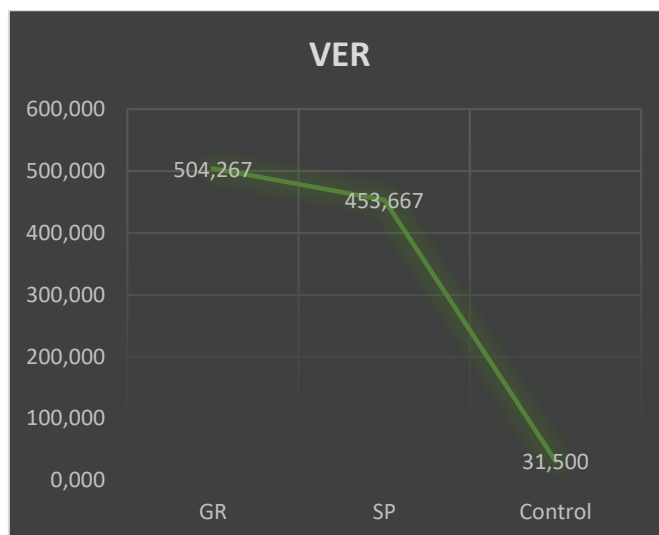


Γράφημα 1.6. Μέση τιμή συγκέντρωσης τυροσόλης (TYR) σε μg/g σάρκας καρπού, των δειγμάτων καρπών, με την αναλυτική μέθοδο HPLC-(DAD).

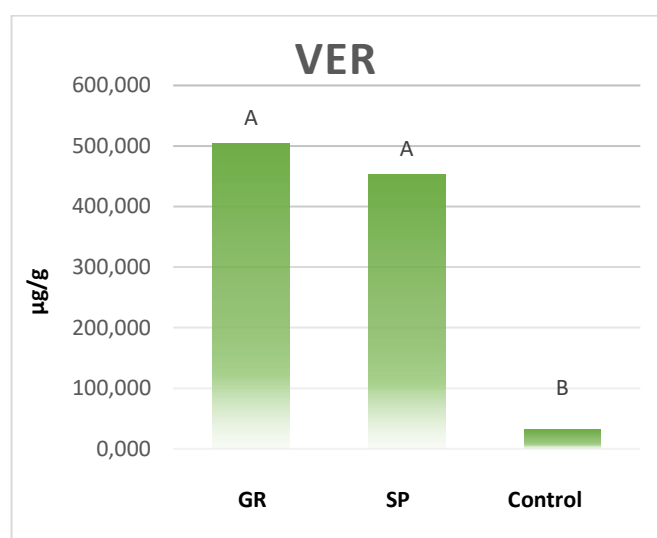


Γράφημα 1.7. Μέση τιμή συγκέντρωσης τυροσόλης (TYR) και συγκρίσεις μεταξύ των διαφορετικών μεθόδων επεξεργασίας των καρπών, με την αναλυτική μέθοδο HPLC-(DAD). Διαφορετικά γράμματα (A,B) υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($P < 0,05$).

Ο χρόνος έκλουσης του βερμπασκοζίτη κυμάνθηκε από 4,831 έως 4,864 min (Γράφημα 1.1, 1.2, 1.3). Υψηλότερη μέση τιμή συγκέντρωσης βερμπασκοζίτη παρουσίασαν οι επεξεργασμένοι με Ελληνικό τύπο επεξεργασίας καρποί, 504,26 μg/g (το εύρος τιμών κυμάνθηκε από 431,8 έως 567,7 μg/g) (Πίνακας 1.10). Η συγκέντρωση του βερμπασκοζίτη στους επεξεργασμένους με Ισπανικό τύπο επεξεργασία καρπούς ήταν 453,66 μg/g (το εύρος τιμών κυμάνθηκε από 347,3 έως 523,6 μg/g). Τα δείγματα καρπών χωρίς επεξεργασία παρουσίασαν το χαμηλότερο επίπεδο συγκέντρωσης με μέση τιμή συγκέντρωσης 31,5 μg/g (το εύρος τιμών κυμάνθηκε από 8,7 έως 47,9 μg/g). Η συγκέντρωση του βερμπασκοζίτη αυξήθηκε στατιστικώς σημαντικά με την επεξεργασία του καρπού, ανεξάρτητα από τη μέθοδο επεξεργασίας, συγκριτικά με τους καρπούς χωρίς επεξεργασία (Γράφημα 1.8). Η μεγαλύτερη συγκέντρωση παρατηρήθηκε στην ομάδα καρπών τύπου GR, αλλά η διαφορά μεταξύ των μεθόδων επεξεργασίας δεν ήταν στατιστικώς σημαντική (Γράφημα 1.9).



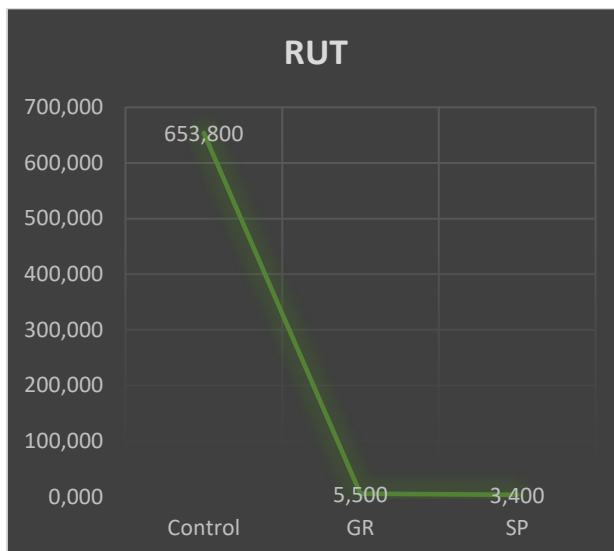
Γράφημα 1.8. Μέση τιμή συγκέντρωσης βερμπασκοζίτη (VER) σε μg/g σάρκας καρπού, των δειγμάτων καρπών, με την αναλυτική μέθοδο HPLC-(DAD).



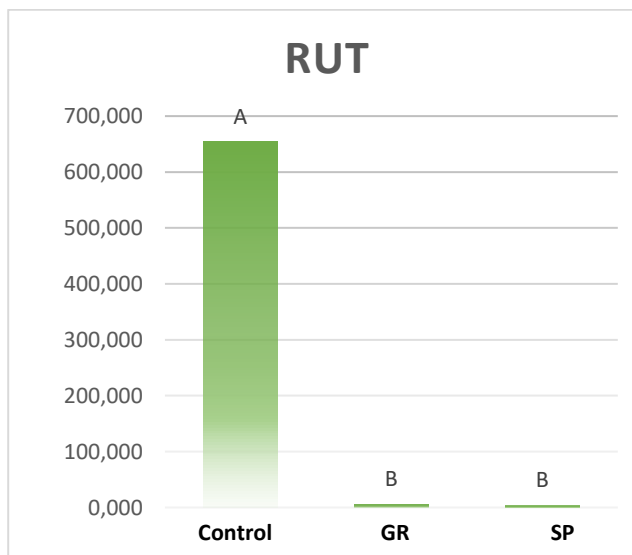
Γράφημα 1.9. Μέση τιμή συγκέντρωσης βερμπασκοζίτη (VER) και συγκρίσεις μεταξύ των διαφορετικών μεθόδων επεξεργασίας των καρπών, με την αναλυτική μέθοδο HPLC-(DAD). Διαφορετικά γράμματα (A,B) υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($P < 0,05$).

Ο χρόνος έκλουσης των δειγμάτων όσον αφορά τη ρουτίνη, κυμάνθηκε από 5,462 έως 5,807 min (Γράφημα 1.1, 1.2, 1.3). Η υψηλότερη μέση τιμή της συγκέντρωσης της συγκεκριμένης φαινολικής ένωσης (745,3 μg/g), παρουσιάστηκε σε δείγμα των καρπών χωρίς επεξεργασία. Το επίπεδο συγκέντρωσης της ρουτίνης στους καρπούς χωρίς επεξεργασία κυμάνθηκε από 574,8 έως 745,3 μg/g (Πίνακας 1.10), με μέση συγκέντρωση 653,8 μg/g (Γράφημα 1.10). Αντιθέτως, η χαμηλότερη μέση τιμή συγκέντρωσης παρουσιάστηκε στην ομάδα καρπών με επεξεργασία τύπου SP (3,4 μg/g) (Γράφημα 1.10) και συνολικά τα δείγματα κυμάνθηκαν από 2,5 έως 4,9 μg/g (Πίνακας 1.10). Η μέση συγκέντρωση των καρπών με επεξεργασία τύπου GR ήταν 5,5 μg/g (Γράφημα 1.10).

Η συγκέντρωση της ρουτίνης στους καρπούς μειώθηκε στατιστικώς σημαντικά με την επεξεργασία των καρπών συγκριτικά με τους καρπούς χωρίς επεξεργασία, ανεξάρτητα τη μέθοδο επεξεργασίας (Γράφημα 1.11). Οι δύο μέθοδοι επεξεργασίας δεν παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους, ενώ η μέθοδος GR παρουσίασε μεγαλύτερη συγκέντρωση της ρουτίνης από την μέθοδο SP (Πίνακας 1.11).

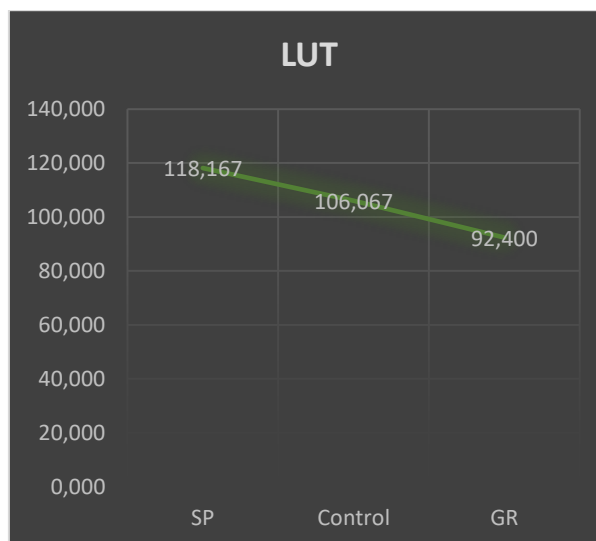


Γράφημα 1.10. Μέση τιμή συγκέντρωσης ρουτίνης (RUT) σε mg/g σάρκας καρπού, των δειγμάτων καρπών, με την αναλυτική μέθοδο HPLC-(DAD).

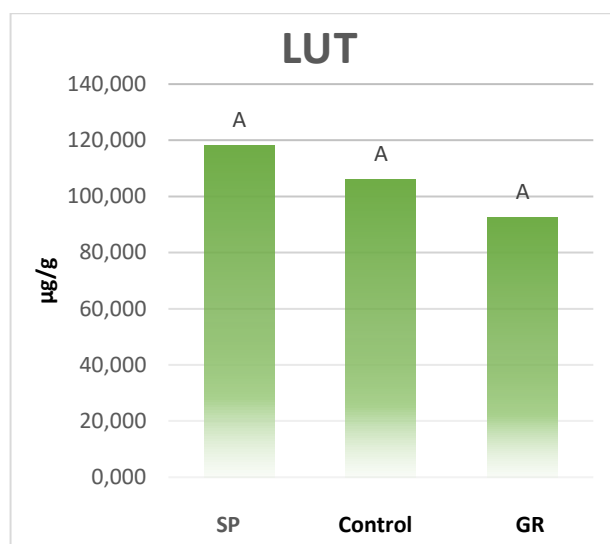


Γράφημα 1.11. Μέση τιμή συγκέντρωσης ρουτίνης (RUT) και συγκρίσεις μεταξύ των διαφορετικών μεθόδων επεξεργασίας των καρπών, με την αναλυτική μέθοδο HPLC-(DAD). Διαφορετικά γράμματα (A,B) υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($P < 0,05$).

Τα δείγματα που αναλύθηκαν παρουσίασαν χρόνο έκλουσης της λουτεολίνης 9,181 έως 9,222 min (Γράφημα 1.1, 1.2, 1.3). Δείγματα που ανήκαν στην ομάδα καρπών με επεξεργασία τύπου SP παρουσίασαν την υψηλότερη συγκέντρωση (132,8 µg/g), με την μέση συγκέντρωση των δειγμάτων να είναι 118,1 µg/g. Αντίθετα, το μικρότερο επίπεδο συγκέντρωσης (85,9 µg/g), παρουσιάστηκε σε δείγμα καρπών με επεξεργασία τύπου GR. Σε αυτή την ομάδα καρπών η μέση συγκέντρωση λουτεολίνης ήταν 92,4 µg/g. Στα δείγματα καρπών χωρίς επεξεργασία, η μέση συγκέντρωση ήταν 106,06 µg/g. Παρά τις διαφορές που σημειώθηκαν ανάμεσα στα δείγματα και τις μεθόδους επεξεργασίας, τα επίπεδα συγκέντρωσης δεν διέφεραν στατιστικώς σημαντικά ανάμεσα στις μεθόδους επεξεργασίας ή ανάμεσα στους φρέσκους και επεξεργασμένους καρπούς (Πίνακας 1.11).



Γράφημα 1.12. Μέση τιμή συγκέντρωσης λουτεολίνης (LUT) σε µg/g σάρκας καρπού, των δειγμάτων καρπών, με την αναλυτική μέθοδο HPLC-(DAD).



Γράφημα 1.13. Μέση τιμή συγκέντρωσης λουτεολίνης (LUT) και συγκρίσεις μεταξύ των διαφορετικών μεθόδων επεξεργασίας των καρπών, με την αναλυτική μέθοδο HPLC-(DAD). Δεν υπάρχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές.

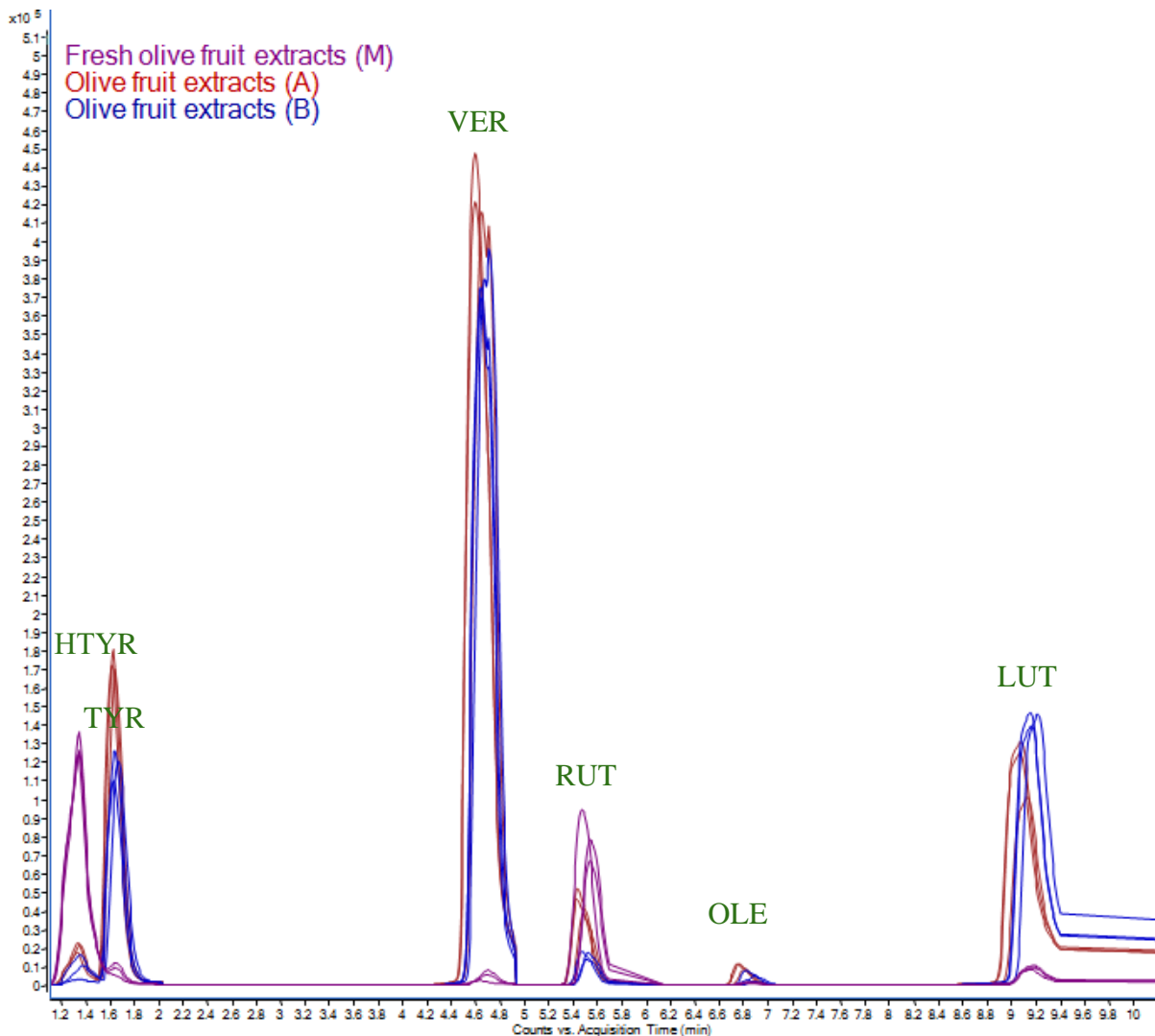
1.3.2. Ανάλυση φαινολικών ενώσεων με την LC-(ESI)-MS/MS μέθοδο προσδιορισμού και ποσοτικοποίησης (B μέθοδος)

Για την εκχύλιση των φαινολικών ενώσεων εφαρμόστηκε η μέθοδος των **Ryan et al., (2002)**, με διαφοροποιήσεις. Στην μέθοδο εξαγωγής δόθηκε ιδιαίτερη προσοχή για τη μείωση του ρίσκου ενζυματικού υποβιβασμού ευαίσθητων ουσιών. Για τον προσδιορισμό και την ποσοτικοποίηση των επιμέρους βιολογικών ενεργών φαινολικών ενώσεων υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη, βερμπασκοζίτη, ελευρωπαΐνη, ρουτίνη και λουτεολίνη, σε φρέσκους και επεξεργασμένους με δύο μεθόδους (GR και SP) καρπούς, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος LC-MS/MS. Οι συνθήκες της τεχνικής ανάλυσης ρυθμίστηκαν χρησιμοποιώντας δυναμική λειτουργία παρακολούθησης προεπιλεγμένου ιόντος (SRM). Η στρατηγική ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκε βασίστηκε στην αναπαραγωγή χρωματογραφημάτων, λαμβάνοντας σήματα ιοντισμού από ανιχνευτή ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI). Ο προσδιορισμός των ενώσεων επικυρώθηκε με βάση την ακριβή μάζα των ενώσεων και το προφίλ θραυσματοποίησης. Ένα συνολικό χρωματογράφημα ιόντος για τις ενώσεις που μελετήθηκαν δείχνουν καθαρές εκλούμενες κορυφές. Τα εκχυλίσματα των καρπών παρουσίασαν ικανοποιητικό φαινολικό κλάσμα για όλες τις φαινολικές ενώσεις, σε όλες τις κατηγορίες δειγμάτων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται παρακάτω, η συγκέντρωση των ενώσεων παρουσίασε διαφορές, αλλά και ομοιότητες, ανάλογα με την φαινολική ένωση και την μέθοδο επεξεργασίας. Η συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων σε όλα τα δείγματα μετρήθηκε σε μικρογραμμάρια (μg) ανά γραμμάριο (g) σάρκας καρπού. Τα αποτελέσματα με την B μέθοδο ανάλυσης επέτρεψαν την αναγνώριση των ενώσεων με μια δεύτερη μεθοδολογία και την ποσοτικοποίησή τους.

Πίνακας 1.12. Βελτιστοποιημένες συνθήκες MS/MS για τον προσδιορισμό των φαινολικών ενώσεων της ελιάς.

Compound	molecular weight (Mw)	fragmentor voltage (vf)	precursor ions (m/z)	product ions (m/z)	collision energy (vcol)
hydroxytyrosol	154	130	153	123	11
tyrosol	138	120	137	106	13
oleuropein	540	180	539	275	19
rutin	610	135	609	300	42
luteolin	286	135	285	133	25
verbascoside	624	116	623	161	33

Η πρώτη ομάδα καρπών προς ανάλυση περιλάμβανε εκχυλίσματα σάρκας καρπού, οι οποίοι δεν έχουν υποστεί επεξεργασία. Μεταξύ των φαινολικών ενώσεων που αναλύθηκαν, η ρουτίνη παρουσίασε την υψηλότερη μέση τιμή συγκέντρωσης, 296,03 μg/g (το εύρος τιμών κυμάνθηκε από 255,9 έως 339,1 μg/g) (Πίνακας 1.13). Την αμέσως μετά υψηλότερη μέση τιμή συγκέντρωσης παρουσίασε η Λουτεολίνη, 144,23 μg/g (το εύρος των τιμών κυμάνθηκε από 129,8 έως 161,7 μg/g) (Πίνακας 1.13). Ακολούθησαν οι μέσες τιμές συγκέντρωσης της τυροσόλης, 37,23 μg/g και του βερμπασκοζίτη, 28,33 μg/g (το εύρος των τιμών κυμάνθηκαν από 28,8 έως 43,6 μg/g και 17,3 έως 40,3 μg/g, αντίστοιχα) (Πίνακας 1.13). Η ελευρωπαϊνή παρουσίασε τη χαμηλότερη μέση τιμή συγκέντρωσης, 7,66 μg/g (το εύρος των τιμών κυμάνθηκε από 5,6 έως 9,6 μg/g) (Πίνακας 1.13). Στα δείγματα αυτής της ομάδας καρπών, το επίπεδο συγκέντρωσης της υδροξυτυροσόλης ήταν κάτω από το επίπεδο ποσοτικοποίησης, συνεπώς δεν περιλαμβάνεται η ποσοτικοποίηση της στα αποτελέσματα.



Γράφημα 1.14. SRM χρωματογράφημα εκχυλισμάτων των δειγμάτων για τις φαινολικές ενώσεις υδροξυτυροσόλη (HTYR), τυροσόλη (TYR), βερμπασκοζίτης (VER), ρουτίνη (RUT), ελευρωπαΐνη (OLE), λουτεολίνη (LUT).

Η δεύτερη ομάδα καρπών που μελετήθηκε περιλάμβανε δείγματα καρπών οι οποίοι είχαν υποστεί επεξεργασία σύμφωνα με την Ελληνική μέθοδο επεξεργασίας. Από τις φαινολικές ενώσεις που προσδιορίστηκαν, τη μεγαλύτερη μέση τιμή συγκέντρωσης παρουσίασε ο βερμπασκοζίτης, 332,03 $\mu\text{g/g}$ (το εύρος των τιμών κυμάνθηκε από 319,3 έως 342,8 $\mu\text{g/g}$) (Πίνακας 1.13). Η λουτεολίνη παρουσίασε τα αμέσως επόμενα υψηλότερα επίπεδα μέσης συγκέντρωσης, 228,2 $\mu\text{g/g}$ (το εύρος των τιμών κυμάνθηκε από 201,1 έως 249,0 $\mu\text{g/g}$). Οι υπόλοιπες φαινολικές ενώσεις ποσοτικοποιήθηκαν σε μικρότερες μέσες τιμές συγκέντρωσης, με την ελευρωπαΐνη να παρουσιάζει την χαμηλότερη μέση τιμή συγκέντρωσης, 5,80 $\mu\text{g/g}$ (το εύρος των τιμών της συγκέντρωσης κυμάνθηκε από 4,7 έως 6,3 $\mu\text{g/g}$) (Πίνακας 1.13). Οι μέσες τιμές συγκέντρωσης της ρουτίνης ήταν 17,7 $\mu\text{g/g}$ και της τυροσόλης ήταν 18,26 $\mu\text{g/g}$ (το εύρος κυμάνθηκε από 14,3 έως 20,4 $\mu\text{g/g}$) (Πίνακας 1.13).

Η τρίτη ομάδα καρπών που ερευνήθηκε ως προς το συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων περιλάμβανε δείγματα καρπών, οι οποίοι επεξεργάστηκαν σύμφωνα με την μέθοδο ισπανικού τύπου. Από το σύνολο των δειγμάτων, η μεγαλύτερη μέση τιμή συγκέντρωσης παρουσιάστηκε από τον βερμπασκοζίτη, 283,8 µg/g (το εύρος των τιμών κυμάνθηκε από 270,0 έως 291,6 µg/g), και από την λουτεολίνη, 245,46 µg/g (το εύρος των τιμών κυμάνθηκε από 241,2 έως 247,8 µg/g) (Πίνακας 1.13). Σε χαμηλότερα επίπεδα συγκέντρωσης κυμάνθηκαν οι υπόλοιπες φαινολικές ενώσεις που προσδιορίστηκαν. Η χαμηλότερη μέση τιμή συγκέντρωσης παρουσιάστηκε από την ελευρωπαΐνη, 2,90 µg/g (το εύρος των τιμών κυμάνθηκε από 1,5 έως 4,6 µg/g) (Πίνακας 1.13). Η αμέσως επόμενη χαμηλότερη μέση τιμή συγκέντρωσης εμφανίστηκε από την ρουτίνη, 6,63 µg/g (της οποίας το εύρος των τιμών κυμάνθηκε από 5,9 έως 7,2 µg/g) (Πίνακας 1.13).

Στον Πίνακα 1.13 παρουσιάζεται το σύνολο των δειγμάτων και οι μέσες τιμές συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων για κάθε ομάδα δειγμάτων. Παρουσιάζονται επίσης, στον Πίνακα 1.12 η τάση θραυσματοποίησης (Fragmentor Voltage - V_f), το πρόδρομο ιόν (Precursor ion - m/z precursor), το παράγωγο ιόν (Product ion - m/z product), η ενέργεια σύγκρουσης (Collision energy - V_{col}) και το μοριακό βάρος της κάθε ένωσης (M_w). Στο γράφημα 1.14 παρουσιάζεται ενδεικτικά το SRM χρωματογράφημα για το σύνολο των δειγμάτων καρπών, όπου απεικονίζεται η σειρά έκλυσης των φαινολικών ενώσεων.

Πίνακας 1.13. Μέση τιμή συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων (µg/g) σε καρπούς ελιάς ποικιλίας ‘Καλαμών’, σε μη επεξεργασμένους (Control) και επεξεργασμένους με τον Ελληνικό (GR) και Ισπανικό (SP) τύπο επεξεργασίας, με την αναλυτική μέθοδο LC-MS/MS.

	<i>CONTROL</i>	<i>GR</i>	<i>SP</i>
<i>HYDROXYTYROSOL</i>	nq	90,66±1,94	63,10±2,62
<i>TYROSOL</i>	37,23±4,39	18,26±0,97	27,93±0,76
<i>OLEUROPEIN</i>	7,66±1,13	5,80±0,55	2,90±0,90
<i>RUTIN</i>	296,03±24,06	17,70±1,79	6,63±0,38
<i>LUTEOLIN</i>	144,23±9,33	228,2±14,18	245,46±2,13
<i>VERBASCOSIDE</i>	28,33±6,65	332,03±6,85	283,80±6,92

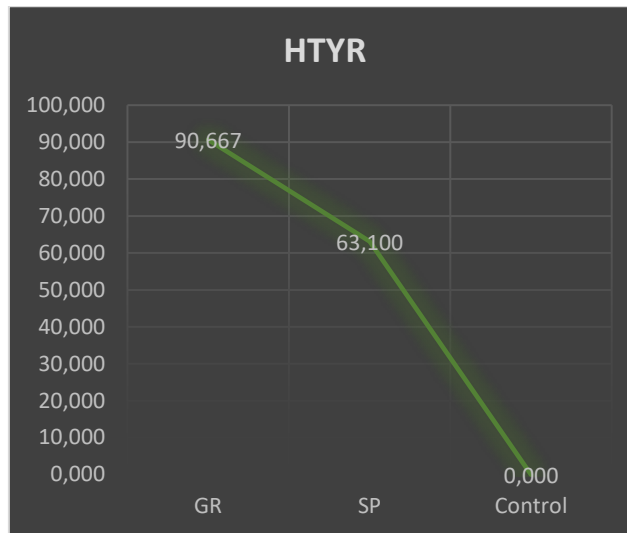
nq = non quantifiable

Πίνακας 1.14. Σύγκριση των καρπών χωρίς επεξεργασία (Control), των καρπών με επεξεργασία ελληνικού τύπου (GR) και των καρπών με επεξεργασία ισπανικού τύπου (SP), με Tukey HSD Post-hoc Test (One-Way Analysis of Variance ANOVA), με την αναλυτική μέθοδο LC-MS/MS.

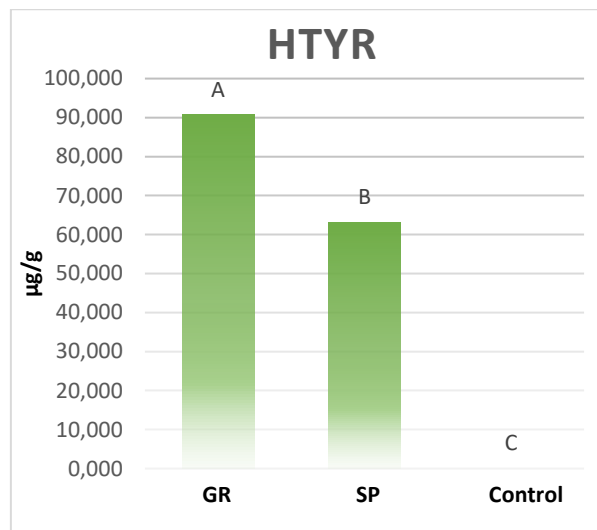
<i>Compound</i>	<i>SP-GR</i>	<i>SP-Control</i>	<i>Gr-Control</i>
hydroxytyrosol	***	***	***
tyrosol	ns	ns	**
oleuropein	ns	*	ns
rutin	ns	***	***
luteolin	ns	**	**
verbascocide	**	***	***

^aΣτατιστική σημαντικότητα ορίζεται σε $\alpha < 0,05$. ns, όχι στατιστικώς σημαντικό και επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας * $< 0,05$, ** $< 0,01$, *** $< 0,001$.

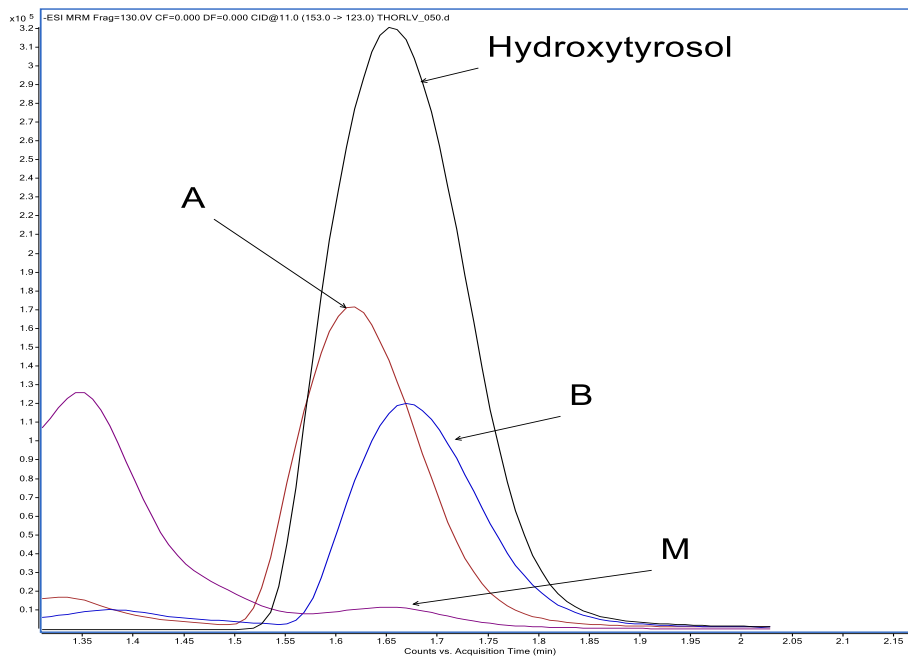
Το μοριακό βάρος της υδροξυτυροσόλης είναι 154. Η V_f , η τάση θραυσματοποίησης ήταν 120 V, το πρόδρομο ιόν της ήταν 153 m/z, το παραγόμενο ιόν 123 m/z και η ενέργεια σύγκρουσης 11 V (Πίνακας 1.12). Η μεγαλύτερη μέση τιμή συγκέντρωσης της υδροξυτυροσόλης, 90,6 $\mu\text{g/g}$ παρουσιάστηκε σε δείγμα της ομάδας καρπών τύπου GR (το εύρος τιμών κυμάνθηκε από 87,0 έως 93,6 $\mu\text{g/g}$ (Πίνακας 1.13). Η χαμηλότερη μέση τιμή συγκέντρωσης της υδροξυτυροσόλης παρουσιάστηκε στους καρπούς χωρίς επεξεργασία, όπου η μέση τιμή συγκέντρωσης ήταν κάτω από το επίπεδο δυνατότητας ακριβούς ποσοτικοποίησης της φαινολικής ένωσης. Στα δείγματα καρπών με την μέθοδο τύπου SP η μέση τιμή συγκέντρωσης ήταν 63,1 $\mu\text{g/g}$ (το εύρος τιμών κυμάνθηκε από 58,6 έως 67,7 $\mu\text{g/g}$) (Πίνακας 1.13). Τα επίπεδα συγκέντρωσης της υδροξυτυροσόλης παρουσίασαν στατιστικώς σημαντική αύξηση όταν οι καρποί υπέστησαν επεξεργασία και με τις δύο μεθόδους (Πίνακας 1.14). Μεταξύ των δύο μεθόδων επεξεργασίας, ο τύπος GR παρουσίασε στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση από τα δείγματα του SP τύπου (Γράφημα 1.16).



Γράφημα 1.15. Μέση συγκέντρωση υδροξυτυροσόλης (HTYR) σε μg/g σάρκας καρπού, των δειγμάτων καρπών, με την αναλυτική μέθοδο LC-MS/MS.

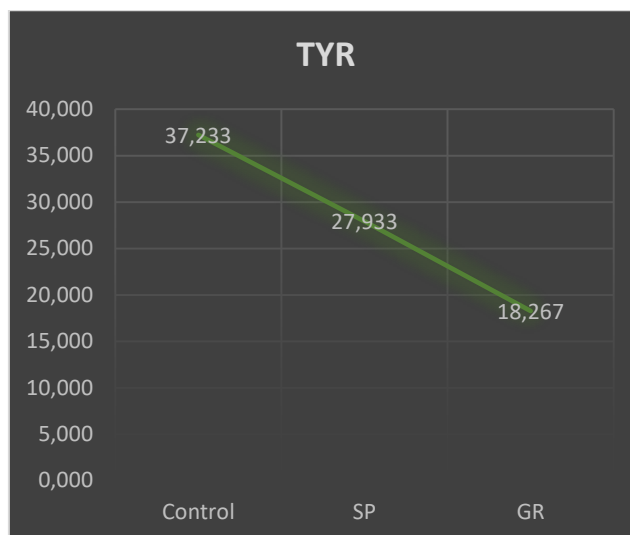


Γράφημα 1.16. Μέση συγκέντρωση υδροξυτυροσόλης (HTYR) και συγκρίσεις μεταξύ των διαφορετικών μεθόδων επεξεργασίας των καρπών, με την αναλυτική μέθοδο LC-MS/MS. Διαφορετικά γράμματα (A,B,C) υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($P < 0,05$).

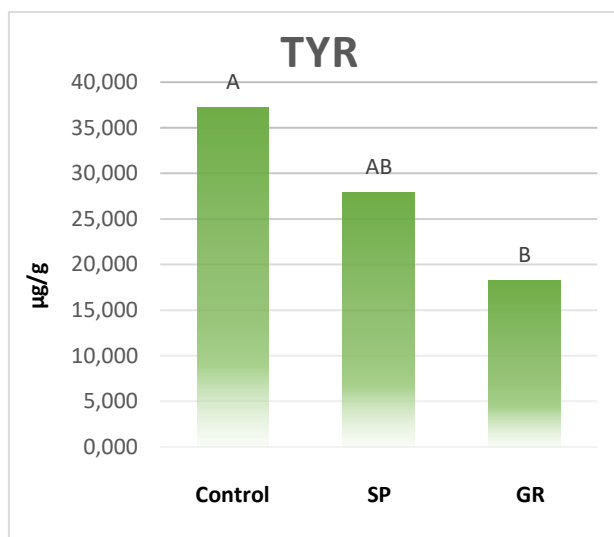


Γράφημα 1.17. SRM χρωματογράφημα, της υδροξυτυροσόλης (HTYR) για τα δείγματα του καρπού ελιάς με όλες τις μεθόδους επεξεργασίας. M = control, A = GR, B = SP, Hydroxytyrosol = καμπύλη πρότυπης ουσίας

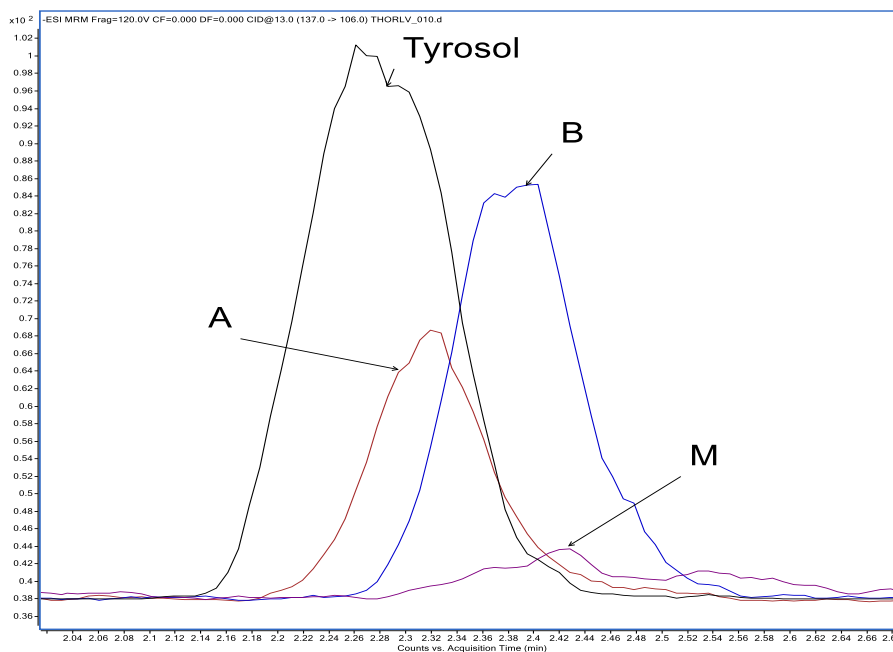
Η τυροσόλη έχει μοριακό βάρος 138, τάση θραυσματοποίησης 120 V, πρόδρομο ιόν 137 m/z, παραγόμενο ιόν 106 m/z και ενέργεια σύγκρουσης 13 V (Πίνακας 1.12). Η μεγαλύτερη μέση τιμή συγκέντρωσης τυροσόλης, 37,23 μg/g παρουσιάστηκε σε δείγμα της ομάδας καρπών χωρίς επεξεργασία. Το εύρος των τιμών της συγκέντρωσης αυτής της ομάδας καρπών κυμάνθηκαν από 28,8 έως 43,6 μg/g (Πίνακας 1.13), (Γράφημα 1.18). Αντίθετα, η χαμηλότερη μέση τιμή συγκέντρωσης 18,26 μg/g παρουσιάστηκε στα δείγματα τύπου GR, (όπου οι τιμές κυμάνθηκαν από 17,1 έως 20,2 μg/g) (Πίνακας 1.13). Η μέση συγκέντρωση των δειγμάτων με επεξεργασία τύπου SP ήταν 27,9 μg/g (Πίνακας 1.13). Η συγκέντρωση της τυροσόλης μειώθηκε με την επεξεργασία των καρπών, συγκριτικά με τους φρέσκους καρπούς. Όμως, στατιστικώς σημαντική μείωση παρουσιάστηκε μόνο με την μέθοδο τύπου GR (Πίνακας 1.14). Η συγκέντρωση τυροσόλης με την SP μέθοδο επεξεργασίας ήταν υψηλότερη, συγκριτικά με την μέθοδο GR, χωρίς όμως η διαφορά μεταξύ των τύπων επεξεργασίας να είναι στατιστικώς σημαντική (Γράφημα 1.19).



Γράφημα 1.18. Μέση συγκέντρωση τυροσόλη (TYR) σε μg/g σάρκας καρπού, των δειγμάτων καρπών, με την αναλυτική μέθοδο LC-MS/MS.

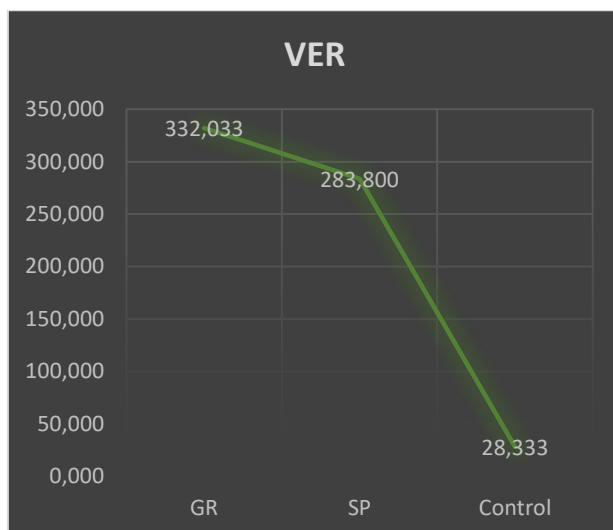


Γράφημα 1.19. Μέση συγκέντρωση τυροσόλης (TYR) και συγκρίσεις μεταξύ των διαφορετικών μεθόδων επεξεργασίας των καρπών, με την αναλυτική μέθοδο LC-MS/MS. Διαφορετικά γράμματα (A,B,C) υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($P < 0,05$).

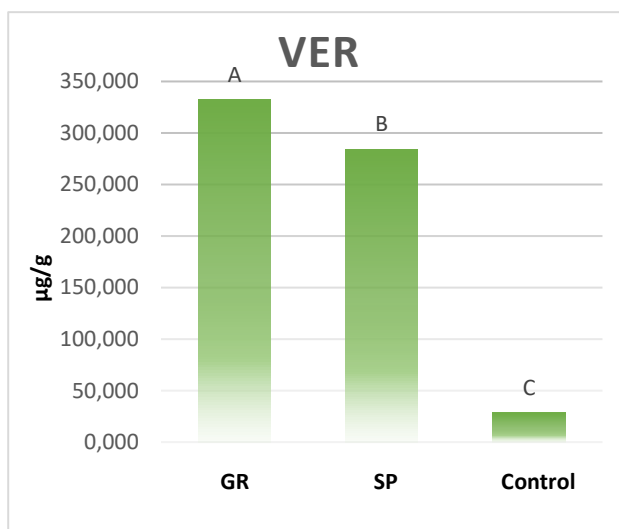


Γράφημα 1.20. SRM χρωματογράφημα της τυροσόλης (TYR), για τα δείγματα του καρπού με όλες τις μεθόδους επεξεργασίας. M = control, A = GR, B = SP, Tyrosol = καμπύλη πρότυπης ουσίας

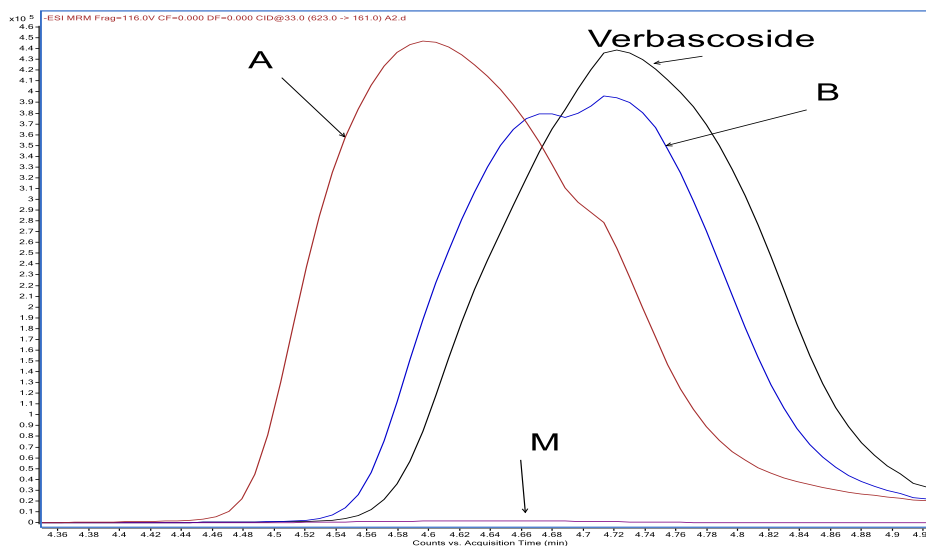
Το μοριακό βάρος του βερμπασκοζίτη είναι 624. Η τάση θραυσματοποίησης του ήταν 116 V, το πρόδρομο ιόν 623 m/z, το παραγόμενο ιόν 161 m/z, και η ενέργεια σύγκρουσης 33 V (Πίνακας 1.12). Η χαμηλότερη μέση τιμή συγκέντρωσης 28,3 μg/g της ουσίας παρουσιάστηκε σε δείγμα καρπών που δεν έχουν υποστεί επεξεργασία (το εύρος τιμών της συγκέντρωσης κυμάνθηκε από 17,3 έως 40,3 μg/g)(Πίνακας 1.13), (Γράφημα 1.21). Αντίθετα, το υψηλότερο επίπεδο συγκέντρωσης παρουσιάστηκε στα δείγματα καρπών με επεξεργασία τύπου GR, όπου η μέση τιμή συγκέντρωσης ήταν 332,03 μg/g (και το εύρος των τιμών της συγκέντρωσης κυμάνθηκε από 319,3 έως 334,0 μg/g) (Πίνακας 1.13) (Γράφημα 1.21). Τα δείγματα τύπου SP είχαν μέση συγκέντρωση 283,8 μg/g, (και κυμάνθηκαν από 270,0 έως 291,6 μg/g) (Πίνακας 1.13). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η συγκέντρωση του βερμπασκοζίτη αυξήθηκε στατιστικά σημαντικά όταν τα δείγματα υπέστησαν επεξεργασία, ανεξάρτητα από τη μέθοδο επεξεργασίας (Πίνακας 1.14). Μεταξύ των μεθόδων επεξεργασίας, η μέθοδος GR τύπου παρουσίασε στατιστικά σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση από τη μέθοδο τύπου SP (Γράφημα 1.22).



Γράφημα 1.21. Μέση συγκέντρωση βερμπασκοζίτη (VER) σε µg/g σάρκας καρπού, των δειγμάτων καρπών, με την αναλυτική μέθοδο LC-MS/MS.

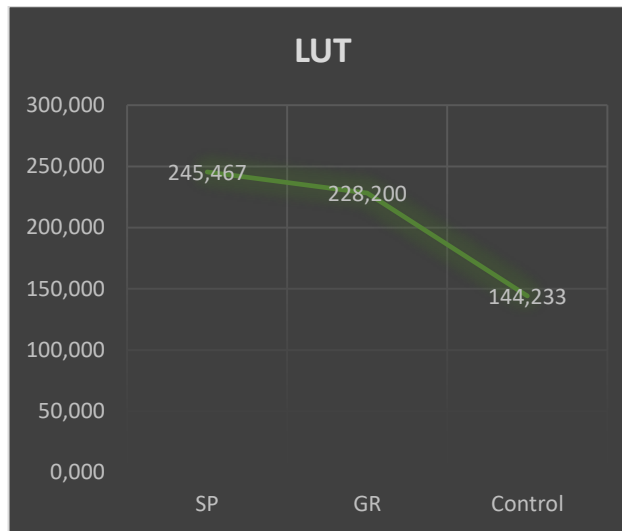


Γράφημα 1.22. Μέση συγκέντρωση βερμπασκοζίτη (VER) και συγκρίσεις μεταξύ των διαφορετικών μεθόδων επεξεργασίας των καρπών, με την αναλυτική μέθοδο LC-MS/MS. Διαφορετικά γράμματα (A,B,C) υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($P < 0,05$).

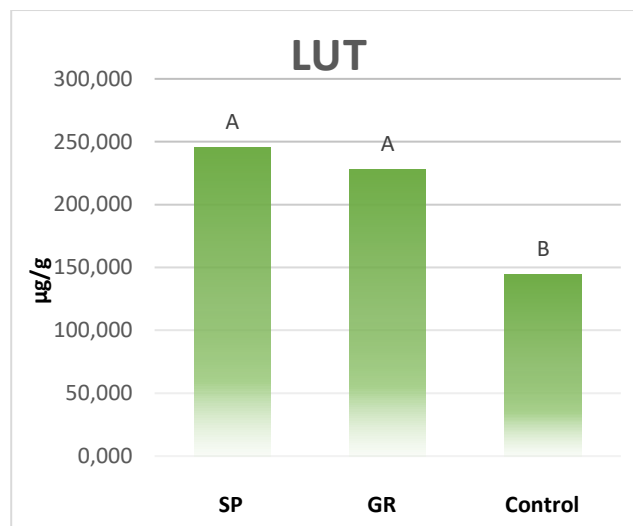


Γράφημα 1.23. SRM χρωματογράφημα του βερμπασκοζίτη (VER), για τα δείγματα του καρπού με όλες τις μεθόδους επεξεργασίας. M = control, A = GR, B = SP, Verbascoside = καμπύλη πρότυπης ουσίας

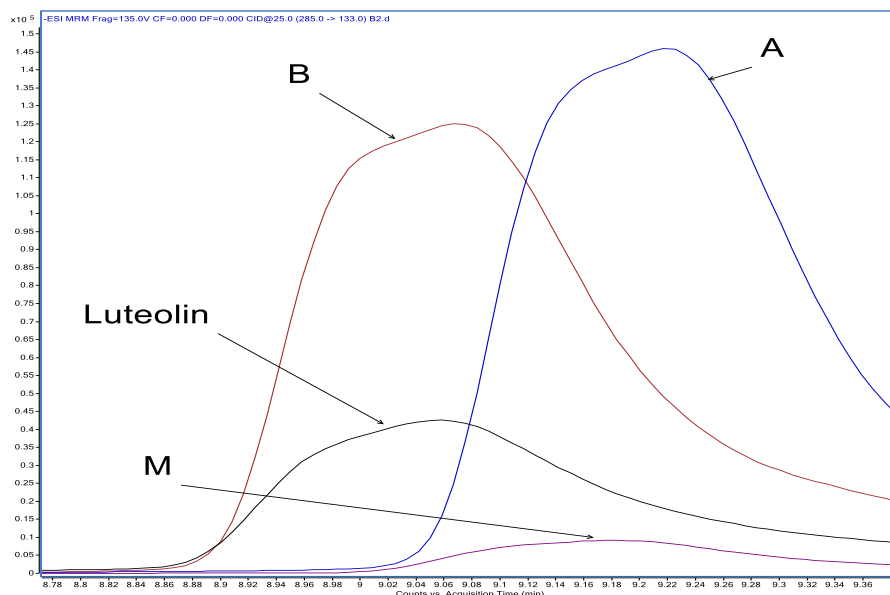
Η λουτεολίνη έχει μοριακό βάρος 286, τάση θραυσματοποίησης 135 V, πρόδρομο ιόν 285 m/z, παραγόμενό ιόν 133 m/z, και ενέργεια σύγκρουσης 25 V (Πίνακας 1.12). Η μεγαλύτερη μέση τιμή συγκέντρωσης της λουτεολίνης 245,4 µg/g παρουσιάστηκε σε δείγμα καρπού, το οποίο ανήκε στους καρπούς με επεξεργασία τύπου SP (ενώ συνολικά το εύρος των τιμών κυμάνθηκε από 241,2 έως 247,8 µg/g) (Γράφημα 1.24), (Πίνακας 1.13). Η μέση τιμή συγκέντρωσης των καρπών GR τύπου ήταν 228,2 µg/g (Γράφημα 1.24), (ενώ στο σύνολο τους το εύρος των τιμών κυμάνθηκαν από 201,1 έως 249,0 µg/g) (Πίνακας 1.13). Η χαμηλότερη μέση τιμή συγκέντρωσης ήταν 144,2 µg/g στα δείγματα καρπών χωρίς επεξεργασία, (όπου το εύρος των τιμών συγκέντρωσης κυμάνθηκε από 129,8 έως 161,7 µg/g) (Πίνακας 1.13), (Γράφημα 1.24). Φαίνεται πως με την επεξεργασία η συγκέντρωση των καρπών αυξήθηκε στατιστικώς σημαντικά, ανεξάρτητα από τη μέθοδο επεξεργασίας, ενώ μεταξύ των μεθόδων επεξεργασίας δεν παρουσιάστηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά (Πίνακας 1.14), παρόλο που η συγκέντρωση ήταν μεγαλύτερη στα δείγματα τύπου GR.



Γράφημα 1.24. Μέση συγκέντρωση λουτεολίνης (LUT) σε μg/g σάρκας καρπού, των δειγμάτων καρπών, με την αναλυτική μέθοδο LC-MS/MS.

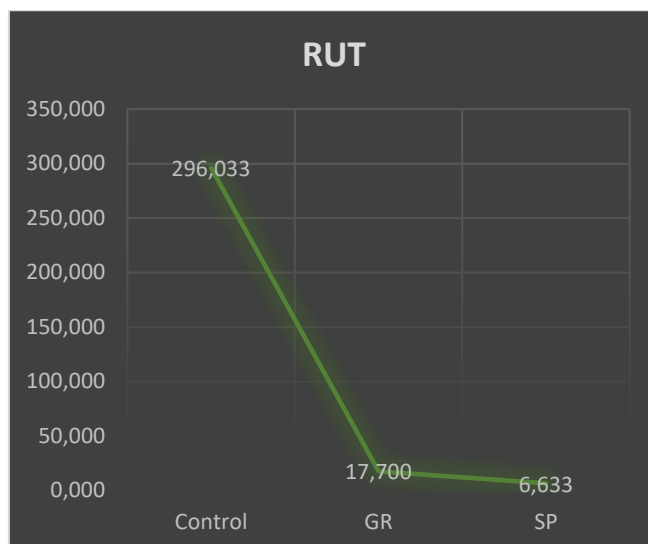


Γράφημα 1.25. Μέση συγκέντρωση λουτεολίνης (LUT) και συγκρίσεις μεταξύ των διαφορετικών μεθόδων επεξεργασίας των καρπών, με την αναλυτική μέθοδο LC-MS/MS. Διαφορετικά γράμματα (A,B) υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($P < 0,05$).

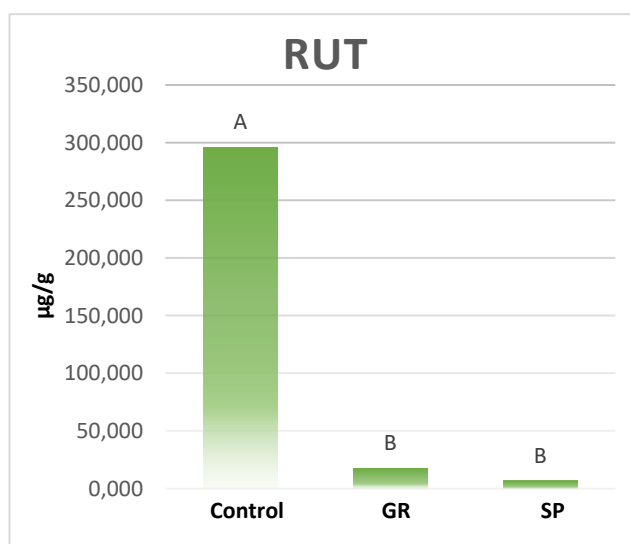


Γράφημα 1.26. SRM χρωματογράφημα της λουτεολίνης (LUT), για τα δείγματα του καρπού με όλες τις μεθόδους επεξεργασίας. M = control, A = GR, B = SP, Luteolin = καμπύλη πρότυπης ουσίας

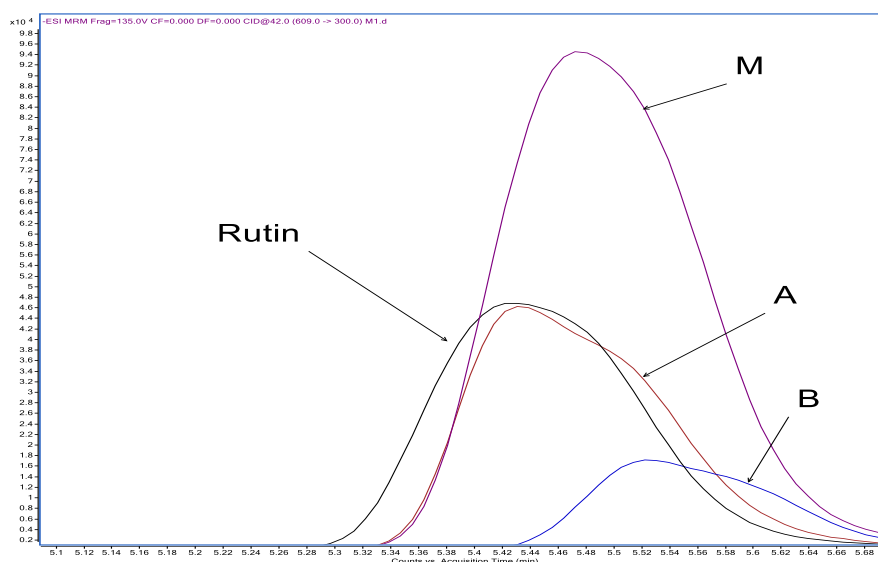
Το μοριακό βάρος της ρουτίνης είναι 610, η τάση θραυσματοποίησης της ήταν 135 V, το πρόδρομο ιόν 609 m/z, το παραγόμενο ιόν 300 m/z, και η ενέργεια σύγκρουσης 42 V (Πίνακας 1.12). Η μεγαλύτερη μέση τιμή συγκέντρωσης ήταν 296,03 μg/g και παρουσιάστηκε σε δείγμα καρπών χωρίς επεξεργασία (ενώ το εύρος των τιμών κυμάνθηκε από 255,9 έως 339,1 μg/g) (Πίνακας 1.13), (Γράφημα 1.27). Αντιθέτως, η χαμηλότερη μέση τιμή συγκέντρωσης 6,63 μg/g παρουσιάστηκε σε δείγμα καρπών τύπου SP (και συνολικά οι τιμές κυμάνθηκαν από 5,9 έως 7,2 μg/g) (Πίνακας 1.13) (Γράφημα 1.27). Στα δείγματα με επεξεργασία τύπου GR, η μέση τιμή συγκέντρωσης της ουσίας ήταν 17,7 μg/g (και το εύρος κυμάνθηκε από 14,3 έως 20,4 μg/g) (Πίνακας 1.13), (Γράφημα 1.27). Φαίνεται πως με την επεξεργασία των καρπών, η συγκέντρωση της ρουτίνης μειώνεται στατιστικώς σημαντικά, ανεξάρτητα από τη μέθοδο επεξεργασίας (Πίνακας 1.14). Μεταξύ των μεθόδων, ο τύπος GR παρουσίασε υψηλότερη συγκέντρωση, αλλά οι τύποι επεξεργασίας δεν σημείωσαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές (Γράφημα 1.28).



Γράφημα 1.27. Μέση συγκέντρωση ρουτίνης (RUT) σε μg/g σάρκας καρπού, των δειγμάτων καρπών, με την αναλυτική μέθοδο LC-MS/MS.



Γράφημα 1.28. Μέση συγκέντρωση ρουτίνης (RUT) και συγκρίσεις μεταξύ των διαφορετικών μεθόδων επεξεργασίας των καρπών, με την αναλυτική μέθοδο LC-MS/MS. Διαφορετικά γράμματα (A,B) υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($P < 0,05$).

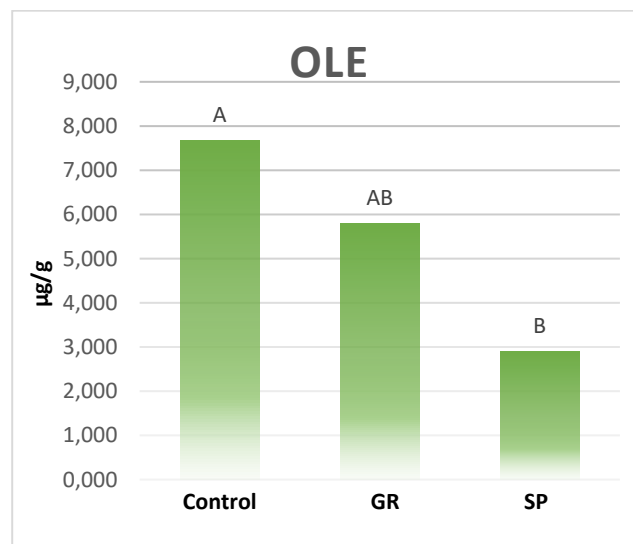


Γράφημα 1.29. SRM χρωματογράφημα της ρουτίνης (RUT), για τα δείγματα του καρπού με όλες τις μεθόδους επεξεργασίας. M = control, A = GR, B = SP, Rutin = καμπύλη πρότυπης ουσίας

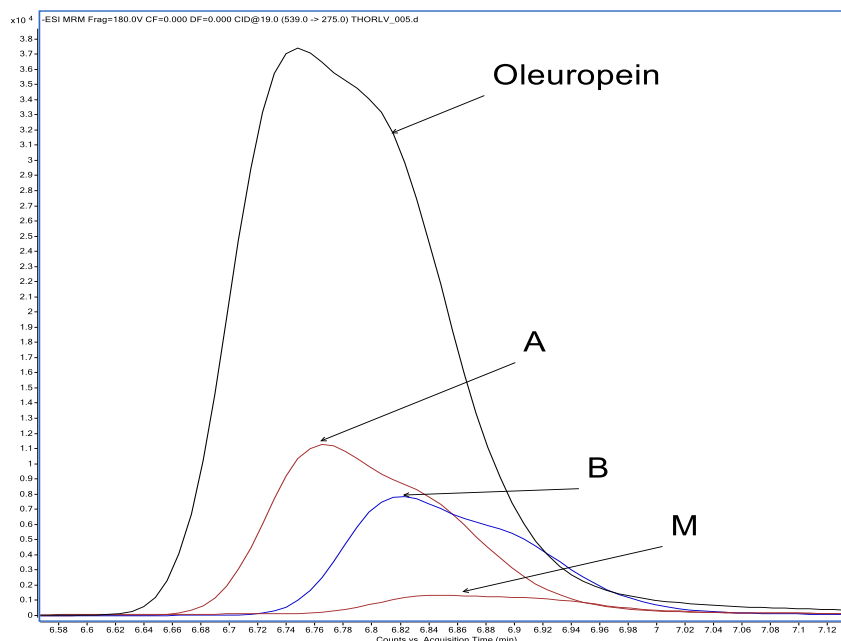
Η ελευρωπαϊνή έχει μοριακό βάρος 540, τάση θραυσματοποίησης, 180 V, πρόδρομο ιόν 539 m/z, παραγόμενο ιόν 275 m/z, και ενέργεια σύγκρουσης 19 V (Πίνακας 1.12). Η μεγαλύτερη μέση τιμή συγκέντρωσης της ελευρωπαϊνης, 7,66 $\mu\text{g/g}$ σημειώθηκε σε δείγμα το οποίο ανήκε στην ομάδα δειγμάτων φρέσκων καρπών (και το εύρος κυμάνθηκε από 5,6 έως 9,5 $\mu\text{g/g}$) (Πίνακας 1.13), (Γράφημα 1.30). Αντίθετα, η χαμηλότερη μέση τιμή συγκέντρωσης, 2,9 $\mu\text{g/g}$ σημειώθηκε σε δείγμα το οποίο ανήκει στα δείγματα καρπών SP τύπου (ενώ συνολικά κυμάνθηκαν από 1,5 έως 4,6 $\mu\text{g/g}$) (Πίνακας 1.13) (Γράφημα 1.30). Στα δείγματα καρπών τύπου GR η μέση συγκέντρωση των δειγμάτων ήταν 5,8 $\mu\text{g/g}$ (Γράφημα 1.30), ενώ στο σύνολο των δειγμάτων η συγκέντρωση κυμάνθηκε από 4,7 έως 6,3 $\mu\text{g/g}$ (Πίνακας 1.13). Φαίνεται πως τα επίπεδα συγκέντρωσης της ελευρωπαϊνης μειώνονται όταν οι καρποί υποστούν επεξεργασία, αλλά η μείωση αυτή είναι στατιστικώς σημαντική μόνο μεταξύ της μεθόδου SP και των φρέσκων καρπών (Πίνακας 1.14). Μεταξύ των μεθόδων επεξεργασίας δεν παρουσιάζεται στατιστικώς σημαντική διαφορά (Γράφημα 1.31).



Γράφημα 1.30. Μέση συγκέντρωση ελευρωπαΐνης (OLE) σε μg/g σάρκας καρπού, των δειγμάτων καρπών, με την αναλυτική μέθοδο LC-MS/MS.



Γράφημα 1.31. Μέση συγκέντρωση ελευρωπαΐνης (OLE) και συγκρίσεις μεταξύ των διαφορετικών μεθόδων επεξεργασίας των καρπών, με την αναλυτική μέθοδο LC-MS/MS. Διαφορετικά γράμματα (A,B) υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($P < 0,05$).



Γράφημα 1.32. SRM χρωματογράφημα της ελευρωπαΐνης (OLE), για τα δείγματα του καρπού με όλες τις μεθόδους επεξεργασίας. M = control, A = GR, B = SP, Rutin = καμπύλη πρότυπης ουσίας

1.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1.4.1. Η σημασία των φαινολικών ενώσεων στα προϊόντα της ελιάς

Η Μεσογειακή διατροφή είναι συνυφασμένη με τον υγιεινό τρόπο ζωής και διατροφής στις μέρες μας. Θεωρείται ως ένα από τα πιο υγιεινά και θρεπτικά αρχέτυπα και φαίνεται πως συνδέεται με την μείωση του κινδύνου διαφόρων χρόνιων παθήσεων, συμπεριλαμβανομένων του καρκίνου, των καρδιαγγειακών παθήσεων, του AD και άλλων παθήσεων που σχετίζονται με τη γήρανση (Estruch et al., 2013; Frisardi et al., 2010; Feart et al., 2013; Lucas et al., 2011; Schwingshackl et al., 2017; Carlos et al., 2018). Η Μεσογειακή διατροφή περιλαμβάνει ένα μεγάλο εύρος ευεργετικών για την ανθρώπινη υγεία τροφίμων, με τα πιο σταθερά βασικά στοιχεία να είναι τα προϊόντα της *Olea europaea* L. Τα προϊόντα της ελιάς δεν είναι μόνο σημαντική πηγή θρεπτικών στοιχείων, αλλά και συστατικών με φαρμακοτροφική αξία, λόγω της υψηλής σύνθεσης σε ακόρεστα λιπαρά, καροτενοειδή, μέταλλα, τριτερπένια και πολυφαινόλες (Ghanbari et al., 2012). Αρκετές ερευνητικές εργασίες τα τελευταία χρόνια έχουν επικεντρωθεί σε παράγωγα της *Olea europaea* L., όπως οι καρποί, το ελαιόλαδο, τα φύλλα και τα απόβλητα, ελκύοντας την προσοχή ως μία από τις πιο άφθονες πηγές βιοενεργών φαινολών ενώσεων (Obied et al., 2007; Niaounakis and Halvadakis, 2006). Ανάμεσα στα προϊόντα της ελιάς, οι επιτραπέζιες ελιές και το ελαιόλαδο είναι θεμελιώδη συστατικά της Μεσογειακής διατροφής. Οι ελιές έχουν γίνει κυρίαρχο συστατικό της

Μεσογειακής διατροφής, όχι μόνο για τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, αλλά και για τις φαινολικές ενώσεις που υπάρχουν στον καρπό της ελιάς (**Franconi et al., 2006**). Οι ελιές περιλαμβάνουν μία ευρεία σύνθεση αυτών των φυσικών αντιοξειδωτικών. Τα προηγούμενα χρόνια ένα συνεχώς αυξανόμενο ενδιαφέρον για τις φαινολικές ενώσεις έχει παρατηρηθεί λόγω των ευεργετικών ιδιοτήτων τους, με έμφαση στην πρόληψη εκφυλιστικών ασθενειών, στις αντιγηραντικές ιδιότητες και τον καρκίνο. Οι φαινολικές ενώσεις αποδεικνύεται πως παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανθρώπινη υγεία μέσω της ρύθμισης των οδών που συνδέονται με τη φλεγμονή, την ενζυμική επαγωγή και τη ικανότητα τους να ρυθμίζουν το οξειδωτικό στρες (**De la Puerta et al., 1999; Visioli and Galli, 1994; De la Puerta et al., 2001; Andjelkovic et al., 2006; Martinez-Dominguez et al., 2001**). Οι φαινολικές ενώσεις παρουσιάζουν, σε μεγάλο βαθμό, ένα ευρύ φάσμα βιοενεργών χαρακτηριστικών, όπως αντιοξειδωτική, αντικαρκινική, αντιφλεγμονώδη, αντιμικροβιακή, αντιπολλαπλασιαστική, αντιαρρυθμική, αντισυσσωρευτική αιμοπεταλίων και αγγειοδιασταλτική δράση (**Scalbert et al., 2005; Franconi et al., 2006; Han et al., 2009; Lucas et al., 2011; Warleta et al., 2011**). Επομένως, η κατανάλωση επιτραπέζιων ελιών και ελαιόλαδου αυξάνεται σταθερά σε όλο τον κόσμο, από έναν αυξανόμενο αριθμό καταναλωτών. Η φυσιολογική κατανάλωση επιτραπέζιων ελιών θα μπορούσε να είναι ουσιώδης για την ανθρώπινη υγεία εξαιτίας των πολυάριθμων βιολογικών δράσεων της (**Malheiro et al., 2014; Reboredo-Rodriguez et al., 2018**). Όσον αφορά τις ιδιότητες που προάγουν την υγεία, φαίνεται πως οι πολυφαινόλες της ελιάς είναι το κέντρο του επιστημονικού ενδιαφέροντος (**Rodriguez-Morato et al., 2015; Rigacci and Stefani, 2016; Parkinson and Cicerale, 2016; Jakobusic Brala et al., 2017**).

Οι φαινολικές ενώσεις στην ελιά αποτελούν το 1-3% νωπού βάρους της σάρκας του καρπού (**Servili et al., 2004**). Οι κύριες κλάσεις φαινολικών ενώσεων στον καρπό της ελιάς είναι φαινολικά οξέα, φαινολικές αλκοόλες, φλαβονοειδή και σεκοϊριδοειδή (**Silva et al., 2006**). Η φαινολική ένωση που συναντάται πιο συχνά στις ελιές είναι η ελευρωπαΐνη, της οποίας η συγκέντρωση μπορεί να φτάσει σε επίπεδα έως 140 mg/g ξηρού βάρους (**Walter et al., 1973**). Ως γενικός κανόνας ισχύει ότι τα επίπεδα ελευρωπαΐνης στον καρπό μειώνονται κατά την ωρίμανση των καρπών (**Esti et al., 1998; Sivakumar et al., 2005; Malik and Bradford, 2006; Damak et al., 2008**). Οι φαινολικές αλκοόλες που συναντώνται σε αφθονία στον καρπό της ελιάς είναι οι υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη και οι γλυκοζιτικές μορφές τους (**Campestre et al., 2002; Marsilio et al., 2001; Pereira et al., 2006; Blekas et al., 2002; Alagna et al., 2012**), από τις οποίες η πρώτη παράγεται από την υδρόλυση της Ελευρωπαΐνης (**Brenes et al., 1995**). Εκτός της ελευρωπαΐνης, της υδροξυτυροσόλης και της τυροσόλης, άλλες σημαντικές φαινολικές ενώσεις που υπάρχουν στον καρπό της ελιάς είναι η ρουτίνη, ο βερμπασκοζίτης και αρκετά φλαβονοειδή (**Benavante-Garcia et al., 2000; Briante et al., 2002; Chiou et al., 2007; Pereira et al., 2007; Salta et al., 2007; Mylonaki et al., 2008**).

1.4.2 Συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων στους επεξεργασμένους καρπούς της ποικιλίας 'Καλαμών'

Και οι δύο μέθοδοι επεξεργασίας που χρησιμοποιήθηκαν, ελληνικός και ισπανικός τύπος, άλλαξαν την συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων στους καρπούς ελιάς της ποικιλίας 'Καλαμών', συγκριτικά με τους μη επεξεργασμένους καρπούς. Και στις δύο μεθόδους ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκαν, παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση στην συγκέντρωση του βερμπασκοζίτη και της υδροξυτυροσόλης και στατιστικώς σημαντική μείωση στην συγκέντρωση της ρουτίνης και στις δύο μεθόδους επεξεργασίας του καρπού. Η συγκέντρωση τυροσόλης μειώθηκε στατιστικώς σημαντικά σε όλους τους επεξεργασμένους καρπούς, με την χρήση της αναλυτικής τεχνικής HPLC-(DAD), ενώ η μείωση ήταν στατιστικώς σημαντική μόνο σε επεξεργασμένους καρπούς με επεξεργασία ελληνικού τύπου με την χρήση της αναλυτικής τεχνικής LC-MS/MS. Η συγκέντρωση λουτεολίνης αυξήθηκε στατιστικώς σημαντικά σε όλους τους επεξεργασμένους καρπούς ελιάς όταν χρησιμοποιήθηκε η αναλυτική τεχνική LC-MS/MS ενώ δεν υπήρξε στατιστικώς σημαντική αλλαγή στην συγκέντρωση της κατά την χρήση της αναλυτικής τεχνικής HPLC-(DAD). Η ελευρωπαΐνη εντοπίστηκε, σε χαμηλές ποσότητες, μόνο όταν χρησιμοποιήθηκε η αναλυτική τεχνική LC-(ESI)-MS/MS και παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική μείωση της συγκέντρωσης μόνο σε καρπούς με επεξεργασία ισπανικού τύπου. Ο βερμπασκοζίτης ήταν η κυρίαρχη φαινολική ένωση σε όλους τους επεξεργασμένους καρπούς, ενώ η ρουτίνη ήταν η κυρίαρχη φαινολική ένωση στους φρέσκους καρπούς. Η συγκέντρωση του βερμπασκοζίτη και της υδροξυτυροσόλης ήταν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη στους καρπούς με επεξεργασία ελληνικής μεθόδου όταν χρησιμοποιήθηκε η αναλυτική μέθοδος LC-(ESI)-MS/MS, ενώ δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στη συγκέντρωση άλλων φαινολικών ενώσεων μεταξύ του ελληνικού και ισπανικού τύπου επεξεργασίας, ανεξάρτητα από την αναλυτική μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε.

1.4.2.1 Συγκέντρωση Βερμπασκοζίτη

Ο βερμπασκοζίτης είναι κύριο παράγωγο του υδροκινναμικού οξέος στον πολτό της ελιάς και η παρουσία του σχετίζεται με την ποικιλία και τον χρόνο συγκομιδής (**Chaeroprasert and Mitchell, 2012**). Στην παρούσα έρευνα, η συγκέντρωση του βερμπασκοζίτη στους καρπούς αυξήθηκε στατιστικώς σημαντικά κατά την διάρκεια της επεξεργασίας των καρπών, και με τις δύο αναλυτικές μεθόδους. Η συγκέντρωση του κυμάνθηκε από 31,50 μg/g στους μη επεξεργασμένους καρπούς έως 504,26 μg/g στους καρπούς τύπου GR με την αναλυτική μέθοδο HPLC-(DAD) και από 28,33 μg/g στους μη επεξεργασμένους καρπούς έως 332,03 μg/g στους καρπούς τύπου GR με την αναλυτική μέθοδο LC-MS/MS. Η συγκέντρωση του βερμπασκοζίτη ήταν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη στους καρπούς με επεξεργασία τύπου GR (332,03 μg) συγκριτικά με τους καρπούς επεξεργασίας

τύπου SP (283,8 µg), μόνο με την χρήση της αναλυτικής μεθόδου LC-MS/MS. Η χαμηλότερη συγκέντρωση παρατηρήθηκε στα δείγματα φρέσκων καρπών, της παρούσας μελέτης, με την HPLC-DAD μέθοδο να εμφανίζει μέση συγκέντρωση 31,5 µg/g και την LC-MS/MS 28,3 µg/g.

Αύξηση στην συγκέντρωση βερμπασκοζίτη μετά την επεξεργασία των καρπών με ξηρό άλας παρατηρήθηκε σε παρόμοια έρευνα (**Sahan et al., 2013**), ενώ τονίστηκε ότι ο βερμπασκοζίτης ήταν ανάμεσα στις κύριες φαινολικές ενώσεις που ταυτοποίησαν. Ομοίως, σε επεξεργασία καρπών της ποικιλίας ‘Gemlik’, παρατηρήθηκε υψηλή συγκέντρωση βερμπασκοζίτη (**Selli et al., 2018**). Υψηλότερη συγκέντρωση βερμπασκοζίτη σε επεξεργασμένους καρπούς έναντι φρέσκων παρατήρησαν και οι **Melliou et al., (2015)**. Αντιθέτως, οι **Ramirez et al. (2013)**, παρατήρησαν πως η συγκέντρωση βερμπασκοζίτη μειώθηκε κατά την επεξεργασία των καρπών με ξηρό άλας, και συνέχισε να μειώνεται κατά την διαδικασία της επεξεργασίας. Επίσης, οι **D’Antuono et al., (2016)**, υποστηρίζουν πως σε καρπούς της ποικιλίας ‘Bella di Cerignola’, η συγκέντρωση του βερμπασκοζίτη ήταν 27,9 µg/g, η οποία παρέμεινε σταθερή και μετά την αποθήκευση των καρπών σε άλμη.

Σε έρευνα που έγινε μελετώντας φρέσκους καρπούς 18 ποικιλιών από την Πορτογαλία παρατηρήθηκε ότι οι καρποί παρουσίασαν χαμηλή συγκέντρωση βερμπασκοζίτη (0,7 – 209 mg/kg) (**Vinha et al., 2004**), και χαμηλότερη από ιταλικές (**Romani et al., 1999**) ή γαλλικές (**Amiot et al., 1986**) ποικιλίες. Στην ίδια έρευνα παρατηρήθηκε ότι οι ποικιλίες με υψηλή συγκέντρωση ελευρωπαΐνης ήταν αυτές με την χαμηλότερη συγκέντρωση βερμπασκοζίτη. Χαμηλή συγκέντρωση (0,9 – 3,2 µg/g) παρατηρήθηκε επίσης σε φρέσκους καρπούς τριών ιταλικών ποικιλιών (**Sivakumar et al., 2005**), ενώ οι **Mitsopoulos et al., (2016)**, παρατήρησαν ότι η συγκέντρωση βερμπασκοζίτη ήταν από τις υψηλότερες συγκεντρώσεις φαινολικών που αναλύθηκαν σε φρέσκους καρπούς δέκα ελληνικών ποικιλιών.

1.4.2.2 Συγκέντρωση Υδροξυτυροσόλης

Η υδροξυτυροσόλη ήταν από τις κύριες φαινολικές ενώσεις που ανιχνεύτηκαν στην παρούσα έρευνα. Η παραγωγή της υδροξυτυροσόλης μπορεί να αποδοθεί στην υδρόλυση της ελευρωπαΐνης, της κύριας φαινολικής ένωσης στους φρέσκους καρπούς, της οποίας η συγκέντρωση μειώνεται κατά την επεξεργασία της επιτραπέζιας ελιάς (**Pereira et al., 2006; Amiot et al., 1990; Brenes et al., 1995**).

Η συγκέντρωση υδροξυτυροσόλης, στην παρούσα έρευνα, κυμάνθηκε από 273,43 µg/g στους μη επεξεργασμένους καρπούς έως 367,83 µg/g στους επεξεργασμένους καρπούς με την ελληνική μέθοδο επεξεργασίας, χρησιμοποιώντας της αναλυτική μέθοδο HPLC-(DAD). Χρησιμοποιώντας την αναλυτική μέθοδο LC-MS/MS, η υδροξυτυροσόλη ανιχνεύτηκε σε μικρές, μη μετρήσιμες ποσότητες στους φρέσκους καρπούς, ενώ η συγκέντρωση της αυξήθηκε στους επεξεργασμένους καρπούς σε 63,10 µg/g και 90,66 µg/g με τον Ισπανικό και Ελληνικό τύπο επεξεργασίας, αντίστοιχα. Κατά την

επεξεργασία των καρπών παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης της υδροξυτυροσόλης, ανεξάρτητα από την μέθοδο επεξεργασίας. Η συγκέντρωση ήταν υψηλότερη στους καρπούς επεξεργασία ελληνικού τύπου έναντι των καρπών με επεξεργασία ισπανικού τύπου, αλλά η διαφορά αυτή ήταν στατιστικώς σημαντική μόνο με την αναλυτική μέθοδο LC-MS/MS.

Η επίδραση της επεξεργασίας των καρπών στην συγκέντρωση υδροξυτυροσόλης επιβεβαιώνεται από αρκετές έρευνες. Σε ανάλυση με UHPLC-(ESI)-MS/MS (**Johnson et al., 2018**), όπου ερευνήθηκε η συγκέντρωση υδροξυτυροσόλης κατά την επεξεργασία καρπών της ποικιλίας ‘Manzanillo’ με την ισπανική μέθοδο και την επεξεργασία καρπών της ποικιλίας ‘Καλαμών’ με την ελληνική μέθοδο, παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης υδροξυτυροσόλης κατά την επεξεργασία των καρπών, με την μεγαλύτερη μέση συγκέντρωση της φαινολικής να παρατηρείται στους καρπούς με ελληνική μέθοδο επεξεργασίας (134,329 µg/g). Σύμφωνα με τους ίδιους ερευνητές, παρατηρήθηκε πως η αγωγή των καρπών με υδροξείδιο του νατρίου, είναι πιθανό να προκαλέσει διάχυση των φαινολικών ενώσεων στην άλμη, με την υδροξυτυροσόλη να δρα ως υπόστρωμα για διάφορα βακτήρια και ζύμες που συνδέονται με την ζύμωση. Αύξηση της συγκέντρωσης υδροξυτυροσόλης κατά την επεξεργασία των καρπών με άλμη και υδροξείδιο του νατρίου, παρατήρησαν και οι **Marsilio et al., (2001)**, στην ποικιλία ‘Intosso’, με την μεγαλύτερη συγκέντρωση να παρατηρείται στους καρπούς με επεξεργασία υδροξειδίου του νατρίου. Ακόμα, αύξηση της συγκέντρωσης υδροξυτυροσόλης παρατηρήθηκε και σε έρευνα της επεξεργασίας των καρπών της ποικιλίας ‘Nocellara del Belice’, με την μέθοδο Castelvetro (**Ambra et al., 2017**), τονίζοντας παράλληλα πως η υδροξυτυροσόλη που παράχθηκε κατά την επεξεργασία των καρπών αντιστοιχεί σε 715,8 µg/g, ενάντια στην υδρόλυση με αναλογικής ποσότητας ελευρωπαΐνης, γεγονός που υποδεικνύει πως κατά την αλκαλική μεταχείριση υποβαθμίζονται άλλοι εστέρες της υδροξυτυροσόλης. Σε άλλη μελέτη (**Blekas et al., 2002**), σε καρπούς της ποικιλίας ‘Χαλκιδικής’ με επεξεργασία ισπανικής μεθόδου, της ποικιλίας ‘Κονσερβολιάς’ με επεξεργασία ελληνικής μεθόδου και της ποικιλίας ‘Καλαμών’ με επεξεργασία σε άλμη, παρατηρήθηκε πως η υψηλότερη συγκέντρωση υδροξυτυροσόλης σημειώθηκε στους καρπούς της ποικιλίας ‘Καλαμών’.

Αντίθετα, σε άλλες έρευνες παρατηρήθηκε μείωση της υδροξυτυροσόλης κατά την επεξεργασία των καρπών. Σε καρπούς της ποικιλίας ‘Ascolana tenera’, με επεξεργασία υδροξειδίου του νατρίου, με άλμη και χωρίς επεξεργασία, παρατηρήθηκε πως η συγκέντρωση της υδροξυτυροσόλης μειώθηκε κατά την επεξεργασία των καρπών, με την επεξεργασία με υδροξείδιο του νατρίου να παρουσιάζει την χαμηλότερη συγκέντρωση (**Brenes-Babuena et al., 1992**). Μείωση της υδροξυτυροσόλης παρατηρήθηκε με την επεξεργασία καρπών με ξηρό άλας από τους **Melliou et al., (2019)**, οι οποίοι ανέλυσαν διαφορετικές ποικιλίες (‘Manzanilla’, ‘Mission’, ‘Θάσου’), με επεξεργασία ξηρού αλάτος. Με τον ίδιο τρόπο επεξεργασίας, παρατηρήθηκε επίσης μείωση της υδροξυτυροσόλης στην ποικιλία ‘Θρούμπα Θάσου’ από τους **Zoidou et al., (2010)**.

Αξίζει να σημειωθεί πως οι διαφορές που παρουσιάζονται λόγω της διαφορετικής ποικιλίας δεν μπορούν να μην λαμβάνονται υπόψιν στα αποτελέσματα, ακόμα και για την ανάλυση καρπών με την ίδια μέθοδο επεξεργασίας (D'Antuono et al., 2016). Οι Vinha et al., (2004), οι οποίοι μελετώντας το φαινολικό περιεχόμενο σε φρέσκους καρπούς 18 πορτογαλικών ποικιλιών, με HPLC-DAD μέθοδο, παρατήρησαν ότι η υδροξυτυροσόλη κυμάνθηκε από 1.477 έως 15.763 $\mu\text{g/g}$, αλλά τα δείγματα με υψηλό δείκτη ωριμότητας δεν είχαν υψηλή αναλογία υδροξυτυροσόλης/ελευρωπαΐνης, συνεπώς δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ ωριμότητας και υδροξυτυροσόλης. Η συγκέντρωση της φαίνεται πως παρουσιάζει έντονη διακύμανση ανάμεσα στις διαφορετικές ποικιλίες ελιάς, καθώς κάποιες από τις συγκεντρώσεις που αναφέρονται στη βιβλιογραφία, κυμαίνονται από 300 έως 8.000 $\mu\text{g/g}$.

Τέλος, σε ώριμους φρέσκους καρπούς τριών ιταλικών ποικιλιών ('Coratina', 'Carolea', 'Cassanese'), τον μήνα Νοέμβριο, η υδροξυτυροσόλη δεν ανιχνεύτηκε σε καμία από τις τρεις ποικιλίες που μελετήθηκαν (Sivakumar et al., 2005). Σε άλλες έρευνες σε καρπούς με επεξεργασία ελληνικού τύπου, όπως η ανάλυση καρπών της ποικιλίας 'Bella di Cergnola', ποικιλία με Προστασία Ονομασίας Προέλευσης από την Apulia της Ιταλίας, η συγκέντρωση υδροξυτυροσόλης ήταν 356,6 $\mu\text{g/g}$ (D'Antuono et al, 2016), ή η ανάλυση καρπών της ποικιλίας 'Marfil' η συγκέντρωση ήταν 390 $\mu\text{g/g}$ (Moreno-Gonzalez et al, 2019). Σε παρόμοιες μελέτες καρπών, με μέθοδο επεξεργασίας ξηρού άλατος σε τούρκικες ποικιλίες, η συγκέντρωση της υδροξυτυροσόλης ήταν 221 $\mu\text{g/g}$ (Selli et al, 2018) και 318 $\mu\text{g/g}$ (Sahan et al, 2013).

1.4.2.3 Συγκέντρωση Λουτεολίνης

Στο παρών πείραμα, η συγκέντρωση της λουτεολίνης κυμάνθηκε από 92,40 $\mu\text{g/g}$ στους καρπούς με ελληνική μέθοδο επεξεργασίας έως 118 $\mu\text{g/g}$ στους καρπούς με ισπανική μέθοδο επεξεργασίας όταν χρησιμοποιήθηκε η αναλυτική μέθοδος HPLC-(DAD), και από 144,23 $\mu\text{g/g}$ στους φρέσκους καρπούς έως 245,46 $\mu\text{g/g}$ στους καρπούς με ισπανική μέθοδο επεξεργασίας όταν χρησιμοποιήθηκε η αναλυτική μέθοδος LC-MS/MS. Η συγκέντρωση της λουτεολίνης αυξήθηκε στατιστικώς σημαντικά με την επεξεργασία των καρπών, χρησιμοποιώντας την αναλυτική μέθοδο LC-MS/MS, ενώ δεν παρουσιάστηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο μεθόδων επεξεργασίας καρπού. Χρησιμοποιώντας την μέθοδο ανάλυσης HPLC-(DAD), δεν παρουσιάστηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των φρέσκων και των επεξεργασμένων καρπών, αλλά ούτε και μεταξύ των μεθόδων επεξεργασίας. Η υψηλότερη μέση συγκέντρωση λουτεολίνης παρατηρήθηκε στους καρπούς με την ισπανική μέθοδο επεξεργασίας, η οποία ήταν 118,16 $\mu\text{g/g}$ όταν χρησιμοποιήθηκε η αναλυτική μέθοδος HPLC-(DAD) και 245,46 $\mu\text{g/g}$ όταν χρησιμοποιήθηκε η αναλυτική μέθοδος LC-MS/MS. Η χαμηλότερη μέση συγκέντρωση λουτεολίνης παρατηρήθηκε στους καρπούς με την ελληνική μέθοδο επεξεργασίας, η οποία ήταν 92,5 $\mu\text{g/g}$ όταν χρησιμοποιήθηκε

η αναλυτική μέθοδος HPLC-(DAD), ενώ όταν χρησιμοποιήθηκε η αναλυτική μέθοδος LC-MS/MS η χαμηλότερη μέση συγκέντρωση παρουσιάστηκε στους φρέσκους καρπούς (144,23 μg/g).

Σε παρόμοια έρευνα, τα αποτελέσματα έδειξαν πως σε καρπούς της ποικιλίας ‘Nocellara del Belice’, χρησιμοποιώντας της αναλυτική μέθοδο HPLC-MS, η υψηλότερη συγκέντρωση λουτεολίνης παρουσιάστηκε σε καρπούς με επεξεργασία ισπανικής μεθόδου, συγκριτικά με φρέσκους καρπούς και με καρπούς επεξεργασμένους με την μέθοδο Castelvetro (Ambra et al., 2017), ενώ αναφέρεται επίσης ότι η συγκεκριμένη φαινολική ένωση ήταν το φλαβονοειδές που ήταν σε αφθονία. Σε άλλη έρευνα (Melliou et al., 2015), παρατηρήθηκε πως η συγκέντρωση λουτεολίνης (279 μg/g) σε φρέσκους καρπούς της ποικιλίας ‘Manzanillo’ ήταν όμοια με την συγκέντρωση (276,3 μg/g) σε καρπούς με επεξεργασία ξηρού άλατος της ποικιλίας ‘Mission’. Χαμηλή συγκέντρωση σε καρπούς με επεξεργασία ελληνικής μεθόδου έχει παρατηρηθεί και σε έρευνα η οποία μελέτησε την επιτραπέζια ποικιλία ελιάς ‘Bella di Cerignola’, όπου αναγνωρίστηκε η επιρροή του δείκτη ωριμότητας της ποικιλίας και της γεωγραφικής καταγωγής στην ποσότητα των φλαβονοειδών (D’Antuono et al., 2016; Brenes et al., 1993). Σε έρευνα σε φρέσκους καρπούς 18 ποικιλιών από την Πορτογαλία, ελεύθερη λουτεολίνη βρέθηκε σχεδόν σε όλα τα δείγματα (Vinha et al., 2004), όπου η συγκέντρωση της κυμάνθηκε από 3,3 έως 440 mg/kg. Οι ίδιοι ερευνητές υποστηρίζουν πως η υψηλή συγκέντρωση λουτεολίνης που βρέθηκε σε ένα δείγμα είναι χαρακτηριστικό της ποικιλίας και πως παρόλο που γενικά θεωρείται ότι τα ελεύθερα φλαβονοειδή εμφανίζονται στο τέλος της ωρίμανσης, ως αποτέλεσμα υδρολυτικής διεργασίας, δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του δείκτη ωριμότητας και των επιπέδων ελεύθερης λουτεολίνης. Οι Selli et al. (2018), υποστηρίζουν επίσης πως παρουσιάζονται υψηλές συγκεντρώσεις λουτεολίνης κατά την επεξεργασία των καρπών με ξηρό άλας, αλλά και πως η λουτεολίνη ήταν η φαινολική ένωση με την υψηλότερη συγκέντρωση (306 mg/kg), ανάμεσα σε όλες τις φαινολικές ενώσεις που προσδιορίστηκαν στην ποικιλία ‘Gemlik’. Γενικά αναφέρεται ότι η λουτεολίνη είναι πάντα παρούσα αλλά παρουσιάζεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις στους καρπούς ελιάς (D’Antuono et al., 2016; Blekas et al., 2002; Vinha et al., 2004).

1.4.2.4 Συγκέντρωση Ρουτίνης

Υποστηρίζεται πως η ρουτίνη είναι το κύριο φλαβονοειδές στον καρπό της ελιάς και είναι η ουσία η οποία είναι πάντα παρούσα, ακόμα και όταν άλλες ουσίες απουσιάζουν (Esti et al., 1998; Servili et al., 1999).

Στην παρούσα έρευνα βρέθηκε πως στον καρπό της ποικιλίας ‘Καλαμών’ η ρουτίνη βρίσκεται στα υψηλότερα επίπεδα της στους φρέσκους καρπούς, στους οποίους εμφανίστηκε με μέση συγκέντρωση 296,03 μg/g όταν χρησιμοποιήθηκε η αναλυτική μέθοδος LC-MS/MS και 653,8 μg/g όταν χρησιμοποιήθηκε η αναλυτική μέθοδος HPLC-(DAD). Παρουσιάστηκε στατιστικώς σημαντική μείωση της συγκέντρωσης ρουτίνης με την επεξεργασία των καρπών, ανεξάρτητα από τη μέθοδο

επεξεργασίας και την αναλυτική μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε. Η χαμηλότερη συγκέντρωση (3,40 µg/g – HPLC-(DAD) και 6,63 µg/g – LC-MS/MS) παρουσιάστηκε στους καρπούς με την ισπανική μέθοδο επεξεργασίας, και στις δύο αναλυτικές μεθόδους. Δεν παρουσιάστηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο μεθόδων επεξεργασίας καρπών, ανεξάρτητα από την αναλυτική μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε.

Αρκετές μελέτες έχουν παρατηρήσει μείωση της συγκέντρωσης της ρουτίνης κατά την επεξεργασία του καρπού ελιάς. Στις ποικιλίες ‘Ascolana tenera’ (**Brenes-Balbuena et al., 1992**) και ‘Intosso’ (**Marsilio et al., 2001**), πραγματοποιώντας επεξεργασία των καρπών με την ελληνική και ισπανική μέθοδο, η ρουτίνη ανιχνεύτηκε μόνο στα δείγματα φρέσκων καρπών, ενώ δεν αναγνωρίστηκε στους καρπούς που είχαν υποστεί επεξεργασία. Μείωση της συγκέντρωσης της φαινολικής παρατηρείται επίσης σε έρευνα, η οποία ανέλυσε φρέσκους και καρπούς με επεξεργασία ξηρού άλατος (**Melliou et al., 2015**).

Οι **Mitsopoulos et al., (2016)**, παρατήρησαν πως η ρουτίνη ήταν η φαινολική με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις στους φρέσκους καρπούς δέκα ελληνικών ποικιλιών ελιάς, με την συγκέντρωση να κυμαίνεται να κυμαίνεται από 0,11-0,998 mg/g στους μαύρους καρπούς και από 0,14 έως 1,51 mg/g στους πράσινους καρπούς. Ομοίως, έρευνα σε 18 πορτογαλικές ποικιλίες, αναφέρει πως η ρουτίνη ήταν το κύριο φλαβονοειδές που ανιχνεύτηκε στους φρέσκους καρπούς των ποικιλιών και γενικά ήταν σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις (175 έως 1139 mg/kg).

1.4.2.5 Συγκέντρωση Τυροσόλης

Η τυροσόλη είναι συνήθως παρούσα στους καρπούς, αλλά σε μικρότερες ποσότητες από την υδροξυτυροσόλη (**Romani et al., 1999**).

Η συγκέντρωση τυροσόλης κυμάνθηκε από 84,33 µg/g στους καρπούς με επεξεργασία ελληνικής μεθόδου έως 215,58 µg/g στους καρπούς χωρίς επεξεργασία όταν χρησιμοποιήθηκε η αναλυτική μέθοδος HPLC-(DAD) και από 18,26 µg/g έως 37,23 µg/g αντίστοιχα, όταν χρησιμοποιήθηκε η αναλυτική μέθοδος LC-MS/MS. Η συγκέντρωση της τυροσόλης μειώθηκε στατιστικώς σημαντικά με την επεξεργασία των καρπών όταν χρησιμοποιήθηκε η τεχνική ανάλυσης HPLC-(DAD), ενώ η μείωση της συγκέντρωσης ήταν στατιστικώς σημαντική μόνο στους καρπούς με επεξεργασία ελληνικής μεθόδου με τη χρήση τεχνικής LC-MS/MS. Μεταξύ των μεθόδων επεξεργασίας, δεν παρουσιάστηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές, ανεξάρτητα από την αναλυτική μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε, με την υψηλότερη συγκέντρωση να παρουσιάζεται στους καρπούς με επεξεργασία ισπανικής μεθόδου. Η μέση συγκέντρωση τυροσόλης με την ελληνική μέθοδο επεξεργασίας ήταν 18,2 µg/g όταν χρησιμοποιήθηκε η τεχνική LC-MS/MS και 84,3 µg/g, όταν χρησιμοποιήθηκε η HPLC-(DAD) τεχνική. Με την ισπανική μέθοδο επεξεργασίας, η

συγκέντρωση ήταν 27,9 µg/g με την τεχνική LC-MS/MS και 123,6 µg/g με την τεχνική HPLC-(DAD).

Σε ανάλυση καρπών την ποικιλίας ‘Ascolana tenera’, οι **Brenes-Babuena et al., (1992)**, παρατήρησαν μείωση της συγκέντρωσης τυροσόλης με την επεξεργασία των καρπών με την ελληνική και ισπανική μέθοδο επεξεργασίας. Αντιθέτως, σε ανάλυση καρπών της ποικιλίας ‘Nocellara del Belice’ με ισπανική μέθοδο επεξεργασίας παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης τυροσόλης στους καρπούς με την επεξεργασία, χωρίς όμως αυτή να είναι έντονη (**Ambra et al., 2017**). Σύμφωνα με τους ίδιους ερευνητές, η επεξεργασία των καρπών δεν μείωσε την ποσότητα Lingroside, παρά την αύξηση της τυροσόλης που παρατηρήθηκε, υποδεικνύοντας ότι και άλλοι, μη ανιχνεύσιμοι, πρόδρομοι της τυροσόλης υπάρχουν στους καρπούς. Μεγάλη αύξηση της τυροσόλης παρατηρήθηκε στην ανάλυση φρέσκων καρπών και καρπών με επεξεργασία σε άλμη και υδροξείδιο του νατρίου, με την υψηλότερη να παρουσιάζεται με την τελευταία μέθοδο επεξεργασίας (**Marsilio et al., 2001**).

Σε έρευνα που έγινε σε καρπούς διαφόρων ποικιλιών και μεθόδων επεξεργασίας, παρατηρήθηκε πως οι καρποί με επεξεργασία ισπανικής μεθόδου παρουσίασαν μεγαλύτερη συγκέντρωση τυροσόλης συγκριτικά με τους καρπούς με επεξεργασία ελληνικής μεθόδου (**Blekas et al., 2002**). Από την άλλη, οι **Johnson et al., (2018)**, σε ανάλυση καρπών της ποικιλίας ‘Manzanillo’ με ισπανική μέθοδο επεξεργασίας και καρπών της ποικιλίας ‘Καλαμών’ με ελληνική μέθοδο επεξεργασίας, παρατήρησαν σημαντική διαφορά της συγκέντρωσης ανάμεσα στις δύο μεθόδους, με την υψηλότερη να παρουσιάζεται στους καρπούς με την ελληνική μέθοδο επεξεργασίας.

Σε μελέτες σε καρπούς διαφορετικών ποικιλιών με επεξεργασία ελληνικής μεθόδου, η συγκέντρωση της τυροσόλης κυμάνθηκε από 356,6 µg/g (**D’Antuono et al., 2016**), έως 190 µg/kg (**Moreno-Gonzalez et al., 2019**). Σύμφωνα με τους τελευταίους η συγκέντρωση 190 µg/kg είναι ποσότητα σχεδόν διπλάσια από τις συγκεντρώσεις που παρατηρούνται σε άλλες έρευνες (**Zoidou et al., 2010**). Σε έρευνα που έγινε σε φρέσκους καρπούς 18 πορτογαλικών ποικιλιών, παρατηρήθηκε πως η τυροσόλη στο μεγαλύτερο αριθμό ποικιλιών βρέθηκε σε χαμηλές ποσότητες ή ήταν απύσφα (**Vinha et al., 2004**). Σε παρόμοια έρευνα που έγινε στην ανάλυση φρέσκων καρπών τριών ιταλικών ποικιλιών, η τυροσόλη εμφανίστηκε σε συγκεντρώσεις 0,4 έως 0,7 µg/g το μήνα Οκτώβριο, ενώ δεν ήταν παρούσα στους καρπούς των ίδιων ποικιλιών τον μήνα Νοέμβριο (**Sivakumar et al., 2005**). Φαίνεται πως η επίδραση του γονότυπου είναι σημαντικός παράγοντας στην συγκέντρωση της τυροσόλης.

1.4.2.6. Συγκέντρωση Ελευρωπαΐνης

Η ελευρωπαΐνη είναι μεταξύ των κύριων φαινολικών που απαντώνται στους καρπούς της ελιάς και προϊόν σεκοϊριδοειδών που βρίσκεται σε μεγαλύτερη αφθονία, η οποία εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το στάδιο ωρίμανσης του καρπού.

Στην παρούσα έρευνα, δεν ανιχνεύτηκε συγκέντρωση ελευρωπαΐνη, σε κανένα δείγμα καρπού όταν χρησιμοποιήθηκε η αναλυτική μέθοδος HPLC-(DAD). Χρησιμοποιώντας την αναλυτική μέθοδο LC-MS/MS, η ελευρωπαΐνη ανιχνεύτηκε σε χαμηλές συγκεντρώσεις σε όλα τα δείγματα. Η συγκέντρωση της μειώθηκε με την επεξεργασία των καρπών, αλλά η μείωση αυτή ήταν στατιστικώς σημαντική μόνο στα δείγματα καρπών με ισπανική μέθοδο επεξεργασίας. Δεν παρουσιάστηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των μεθόδων επεξεργασίας καρπού. Η συγκέντρωση κυμάνθηκε από 2,90 μg/g στους καρπούς με ισπανική μέθοδο επεξεργασίας έως 7,66 μg/g στους καρπούς χωρίς επεξεργασία.

Οι **Johnson et al., (2018)**, μελετώντας το φαινολικό περιεχόμενο της ελευρωπαΐνης, με LC-MS/MS, σε καρπούς της ποικιλίας 'Manzanillo' τύπου SP και καρπούς της 'Καλαμών' τύπου GR, συμπέραναν πως η συγκέντρωση της ελευρωπαΐνης στους καρπούς με επεξεργασία τύπου GR ήταν σημαντικά υψηλότερη από αυτή των καρπών τύπου SP. Κατά την GR μέθοδο δεν χρησιμοποιείται υδροξείδιο του νατρίου, συνεπώς η ελευρωπαΐνη διαλύεται με μειωμένη υδρόλυση. Το υδροξείδιο του νατρίου καταλύει την υδρόλυση της ελευρωπαΐνης στον καρπό και το διάλυμα. Σύμφωνα με άλλη έρευνα στους καρπούς της ποικιλίας 'Nocellara del Belice', με μέθοδο ανάλυσης HPLC-MS, κατά τη διάρκεια της ζύμωσης η ελευρωπαΐνη συνέχισε να μειώνεται σημαντικά σε όλες τις μεθόδους επεξεργασίας των καρπών, με την χαμηλότερη συγκέντρωση να εμφανίζεται στους καρπούς με επεξεργασία τύπου SP (**Ambra et al., 2017**). Σε αρκετές μελέτες αποδεικνύεται πως η συγκέντρωση της ελευρωπαΐνη με μέθοδο GR παραμένει σε υψηλότερα επίπεδα συγκριτικά με καρπούς με SP μέθοδο επεξεργασίας. Σε ανάλυση της ποικιλίας 'Ascolana tenera' (**Brenes-Babuena et al., 1992**), η ελευρωπαΐνη μειώθηκε σημαντικά κατά την επεξεργασία των καρπών, με την μέθοδο GR να συγκαταεί συγκέντρωση της φαινολικής ένωσης, ενώ στην μέθοδο SP ήταν αδύνατο να ανιχνευτεί. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε στην ποικιλία 'Intosso' (**Marsilio et al., 2001**). Ανεξάρτητα της μεθόδου επεξεργασίας, η ελευρωπαΐνη μειώνεται σημαντικά όταν οι καρποί υποστούν επεξεργασία. Οι **Melliou et al., (2015)**, αναλύοντας καρπούς με μέθοδο επεξεργασίας ξηρού άλατος, συμπέραναν πως η ελευρωπαΐνη μειώθηκε σημαντικά, συγκριτικά με τους φρέσκους καρπούς.

Οι **Tina Jerman Klen et al., (2015)**, αναφέρουν ότι η αναλυτική μέθοδος DAD δεν επέτρεψε σαφή αναγνώριση της ελευρωπαΐνης λόγω προβλημάτων συνέκλουσης, σε ανάλυση φαινολικού περιεχομένου που έγινε στην ποικιλία 'Istrska belica' από την Σλοβενία. Επίσης, σε άλλη έρευνα που έγινε σε φρέσκους καρπούς τριών ιταλικών ποικιλιών, στο στάδιο πλήρους ωρίμανσης, αναφέρεται ότι η ελευρωπαΐνη δεν ανιχνεύτηκε σε μία εκ των τριών ποικιλιών (**Sivakumar et al., 2005**).

Ο γονότυπος παίζει σημαντικό ρόλο στη συγκέντρωση της ελευρωπαΐνης στους καρπούς της ελιάς, καθώς σε έρευνα σε 18 ποικιλίες ελιάς από την Πορτογαλία, η συγκέντρωση της ελευρωπαΐνης στους φρέσκους καρπούς κυμάνθηκε από 388 mg/kg έως 21.681 mg/kg (Vinha et al., 2004). Στην ίδια έρευνα αναφέρεται πως σχεδόν το 50% των ποικιλιών παρουσίασε συγκέντρωση μεγαλύτερη των 3000 mg/kg, και παρατηρήθηκε πως οι ποικιλίες με υψηλή συγκέντρωση ελευρωπαΐνης ήταν αυτές με τη χαμηλότερη συγκέντρωση βερμπασκοζίτη. Οι Mitsopoulos et al., 2016, αναλύοντας φρέσκους καρπούς δέκα ελληνικών ποικιλιών με HPLC-(DAD), παρατήρησαν πως η συγκέντρωση της ελευρωπαΐνης κυμάνθηκε από 0,39 έως 12,23 mg/g στους πράσινους καρπούς και 1,41 έως 11,15 mg/g στους μαύρους καρπούς. Η συγκέντρωση της ελευρωπαΐνης επίσης εξαρτάται από την ωρίμανση του καρπού, καθώς η συγκέντρωση της ελευρωπαΐνης στους καρπούς ιταλικών ποικιλιών μειώθηκε από τον Οκτώβριο (4,2 έως 10,6 μg/g), προς τον μήνα Νοέμβριο (0,8 έως 2,1 μg/g), στις ίδιες ποικιλίες (Sivakumar et al., 2005)

1.4.3 Η σημασία της μεθόδου επεξεργασίας του καρπού στη φαινολικό προφίλ και την συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων στον ελαιόκαρπο

Στο παρόν πείραμα συγκρίνοντας τις δύο μεθόδους επεξεργασίας καρπών που χρησιμοποιήθηκαν, παρατηρήθηκε πως η συγκέντρωση του βερμπασκοζίτη και της υδροξυτυροσόλης ήταν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη στους καρπούς με την ελληνική μέθοδο επεξεργασίας όταν χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ανάλυσης LC-MS/MS, ενώ δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στην συγκέντρωση των υπόλοιπων φαινολικών ενώσεων μεταξύ των δύο μεθόδων επεξεργασίας των καρπών και με τις δύο αναλυτικές μεθόδους. Έρευνες που έχουν συγκρίνει τις δύο μεθόδους επεξεργασίας έχουν δείξει υψηλότερη συγκέντρωση φαινολικών ουσιών με την χρήση της ελληνικής μεθόδου επεξεργασίας συγκριτικά με την ισπανική μέθοδο επεξεργασίας (Blekas et al., 2002; Marsilio et al., 2005; D'Antuono et al., 2016; Johnson et al., 2018).

Κατά την ωρίμανση του καρπού, η υδρόλυση της ελευρωπαΐνης από το ένζυμο β-γλυκοσιδάση έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό ελευρωπαΐνης-αγλυκόνης. Επίσης, οι αγλυκόνες μπορούν να δεχθούν περαιτέρω υδρόλυση εστέρων και να παραχθούν υδροξυτυροσόλη και τυροσόλη. Η υδρόλυση μπορεί να συνεχιστεί και μετά τη συγκομιδή από την δραστηριότητα ενζύμων από βακτήρια γαλακτικού οξέος (Nychas et al., 2002). Με σκοπό τη δημιουργία εδώδιμων προϊόντων και για την μείωση της πικρής γεύσης των καρπών, οι καρποί της ελιάς υπόκεινται σε επεξεργασία. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την επεξεργασία των καρπών ελιάς έχουν επίδραση στη γεύση, αλλά ταυτόχρονα μπορεί να επηρεάσουν και τις ευεργετικές ιδιότητες του καρπού (Chaerprasert and Mitchell, 2012). Διαφορετικοί τρόποι επεξεργασίας του καρπού μπορεί να οδηγήσουν (Marsilio et al., 2005; Chaerprasert and Mitchell, 2012). Οι κύριες εμπορικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την επεξεργασία της επιτραπέζιας ελιάς είναι η ελληνική, η

ισπανική και η μέθοδος Καλιφόρνιας (**Karkoula et al., 2012**). Όλες οι παραπάνω μέθοδοι σχεδιάστηκαν με σκοπό τη μείωση της συγκέντρωσης της ελευρωπαϊνης, αλλά ταυτόχρονα μπορεί να επηρεάσουν και άλλες φαινολικές ενώσεις στο τελικό προϊόν, οδηγώντας σε ένα εντελώς διαφορετικό φαινολικό προφίλ, ανάλογα με τον τύπο επεξεργασίας που χρησιμοποιείται (**Doulgeraki et al., 2013; Panagou, 2006**). Σύμφωνα με την ισπανική μέθοδο, οι καρποί συντηρούνται σε διάλυμα υδροξειδίου νατρίου, ξεπλένονται, ζυμώνονται σε γαλακτικό οξύ και τελικώς παστεριώνονται (**Brenes et al., 1995; Ambra et al., 2017**).

1.4.4. Η σημασία της μεθόδου προσδιορισμού και ποσοτικοποίησης στην ανάλυση φαινολικών ενώσεων στα προϊόντα της ελιάς

Συγκρίνοντας τις δύο αναλυτικές μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν, παρατηρήθηκαν κάποιες διαφορές. Χρησιμοποιώντας την τεχνική HPLC-(DAD), η ελευρωπαϊνη δεν ανιχνεύτηκε στους καρπούς. Παρόλο τις διαφορές που παρουσιάστηκαν μεταξύ των αναλυτικών μεθόδων, παρατηρήθηκαν παρόμοιες τάσεις στις συγκεντρώσεις των καρπών ελιάς με ή χωρίς επεξεργασία.

Στο παρελθόν έχουν χρησιμοποιηθεί αρκετές μέθοδοι ανάλυσης και ποσοτικοποίησης για τον καθορισμό των φαινολικών ενώσεων στα προϊόντα της *Olea europaea* L. και κυρίως έχουν εστιάσει στο ελαιόλαδο (**Servili et al., 2004; Bendini et al., 2007; Bianco et al., 2003; Carrasco-Pancorbo et al., 2007; Caruso et al., 2000; Christophoridou et al., 2005; Gutierrez-Rosales et al., 2003; Fu et al., 2009**). Τεχνικές βασισμένες στην HPLC έχουν ευρέως χρησιμοποιηθεί για την αναγνώριση υδροφιλικών φαινολικών ουσιών στο ελαιόλαδο (**Gutiérrez-Rosales et al, 2003; Gutiérrez et al, 1989; Mateos et al, 2004; Siliani et al, 2006**), και τους καρπούς (**Romero et al, 2017; Obied et al, 2007; Kanakis et al, 2013**). UV μέθοδοι, καθώς και η εφαρμογή του DAD έχουν εκτενώς χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό και την ποσοτικοποίηση φαινολικών ενώσεων όπως η ελευρωπαϊνη, η υδροξυτυροσόλη και η τυροσόλη (**Amiot et al, 1986; Bonoli et al, 2004; Dierkes et al, 2012**), φαινολικών οξέων (**Bonoli et al, 2004; Morelló et al, 2004; Artajo et al, 2007**) και φλαβονοειδών (**Amiot et al, 1986; Morelló et al, 2004; Artajo et al, 2007**). Οι παραπάνω όμως μέθοδοι θεωρείται ότι μειονεκτούν λόγω του ότι υστερούν σε ευαισθησία που χρειάζεται για τη μέτρηση του συνολικού εύρους της υδρόλυσης των προϊόντων της ελευρωπαϊνης στις συγκεντρώσεις που παρουσιάζονται κατά την επεξεργασία των επιτραπέζιων ελιών (**Kumral et al., 2013**). Επίσης χαρακτηρίζονται για το μεγάλο χρόνο χρωματικού διαχωρισμού (20-100 min) και για υψηλά όρια ποσοτικοποίησης που δεν υποστηρίζουν τον προσδιορισμό συγκεκριμένων ειδών φαινολικών ενώσεων στα προϊόντα της ελιάς (**Segura-Carretero et al., 2010**), όπως για παράδειγμα στην υδροξυτυροσόλη όπου το LOQ είναι 1 mg/mL. Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι UV μέθοδοι αδυνατούν να αναγνωρίσουν επικαλυπτόμενες κορυφές (**Vinha et al., 2004**), έτσι η ταυτόχρονη ποσοτικοποίηση διαφόρων ουσιών γίνεται πολύπλοκη και δύσκολη διαδικασία. Σε έρευνα που έγινε σε καρπούς ελιάς,

η μέθοδος HPLC-DAD δεν επέτρεψε τη σαφή αναγνώριση των φαινολικών ενώσεων υδροξυτυροσόλη acetate, λουτεολίνη και ελευρωπαΐνη, λόγω προβλημάτων συνέκλωσης των ουσιών (Jerman Klen et al., 2015). Επίσης, τα δεδομένα απορρόφησης σε UV-Vis μεθόδους μερικές φορές διαφέρουν λόγω παρεμβολής του μητρικού υλικού, που μπορεί να οδηγήσει σε παρεμβολές (Jerman Klen et al., 2015). Γενικά, το όριο εντοπισμού (LOQ) των φαινολικών ενώσεων διαφέρει αρκετά μεταξύ των αναλυτικών μεθόδων που χρησιμοποιούνται και επηρεάζεται αρκετά από την προετοιμασία των δειγμάτων (Johnson et al., 2018). Για τους παραπάνω λόγους, διαφορετικές μεταβολομικές μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για την έρευνα χημικών ουσιών, όπως η MS. Γενικά, τα LOQ για της φαινολικές ενώσεις, ειδικά στα προϊόντα ελιάς, με MS μεθόδους είναι 10-100X πιο ευαίσθητα από τις UV μεθόδους (Melliou et al., 2015; Garcia-Villalba et al., 2010; Kanakis et al., 2013). Οι MS μέθοδοι είναι αρκετά πιο ευαίσθητες στην αξιολόγηση των προϊόντων υδρόλυσης της ελευρωπαΐνης σε συγκεντρώσεις που εμφανίζονται στις επιτραπέζιες ελιές, αλλά μέχρι τώρα έχουν κυρίως εστιάσει στο ελαιόλαδο (Dierkes et al., 2012; Gutierrez-Rosales et al., 2003; De La Torre-Carbot et al., 2005; Bendini et al., 2007). Οι MS μέθοδοι έχουν υιοθετηθεί για την ανάλυση πολύπλοκων μεταβλητών, λόγω της υψηλότερης ευαισθησίας και επιλεκτικότητας που παρουσιάζουν αλλά κυρίως για την υψηλότερη ακρίβεια μάζας (Jerman Klen et al., 2015). Η χρησιμότητα των LC-MS/MS μεθόδων αποδεικνύεται με την ταυτόχρονη ποσοτικοποίηση των φαινολικών ενώσεων (Melliou et al., 2015), αλλά και με την επίτευξη βελτιωμένης ευαισθησίας, επιλεκτικότητας και αποδοτικότητας (Segura-Carretero et al., 2010).

1.4.5 Η σημασία του γονότυπου στη σύνθεση των φαινολικών ενώσεων της ελιάς

Οι παράγοντες οι οποίοι έχουν τη δυνατότητα να επηρεάσουν το φαινολικό προφίλ των επιτραπέζιων ελιών είναι αρκετοί. Μερικοί από αυτούς είναι ο γονότυπος/ποικιλία, η γεωγραφική θέση, το στάδιο ωριμότητας και η μέθοδος που χρησιμοποιείται για την εκπίκραση και την επεξεργασία του καρπού (Laguerre et al., 2009). Ο γονότυπος, οι συνθήκες καλλιέργειας και ανάπτυξης και το στάδιο ωριμότητας του καρπού είναι οι κυριότεροι παράγοντες που επηρεάζουν την σύνθεση των φαινολικών ενώσεων στον καρπό της ελιάς (Bouaziz et al., 2010; Chaeroprasert and Mitchell, 2012; Lujan et al., 2009). Δείγματα ίδιας ποικιλίας, με διαφορετικό στάδιο ωριμότητας και γεωγραφική καταγωγή έχουν όμοιο φαινολικό προφίλ για τις κύριες φαινολικές ενώσεις, δείχνοντας την σημαντική επίδραση του γονότυπου στο φαινολικό προφίλ (Vinha et al., 2004). Σε πειράματα που έχουν γίνει για τη μέτρηση των φαινολικών ενώσεων στους καρπούς πορτογαλικών (Vinha et al., 2004) και ιταλικών ποικιλιών (Sivakumar et al., 2005), τα αποτελέσματα μεταξύ των ποικιλιών έδειξαν διαφορές ανάλογα με την ποικιλία, δείχνοντας τη σημαντικότητα του γονότυπου στη σύνθεση και στη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων. Επίσης,

όταν συγκρίνονται ίδιες μέθοδοι επεξεργασίας καρπών, οι διαφορές λόγω της επίδρασης του γονότυπου θα πρέπει να λαμβάνονται πάντα υπόψιν (Pereira et al., 2006; Blekas et al., 2002).

1.4.6. Συμπεράσματα

Στην παρούσα μελέτη προσδιορίστηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν οι αλλαγές στην συγκέντρωση των σημαντικότερων φαινολικών ενώσεων σε φρέσκους και επεξεργασμένους, με την ελληνική και ισπανική μέθοδο επεξεργασίας, καρπούς ελιάς ποικιλίας 'Καλαμών', χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικές αναλυτικές μεθόδους αναγνώρισης και ποσοτικοποίησης: HPLC-DAD και LC-MS/MS. Οι φαινολικές ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν ήταν η υδροξυτυροσόλη, η τυροσόλη, ο βερμπασκοζίτης, η ρουτίνη, η ελευρωπαΐνη και η λουτεολίνη.

Και στις δύο αναλυτικές μεθόδους, παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης του βερμπασκοζίτη και της υδροξυτυροσόλης, και στατιστικώς σημαντική μείωση στη συγκέντρωση της ρουτίνης, κατά την επεξεργασία των καρπών με την ελληνική και την ισπανική μέθοδο. Η συγκέντρωση της τυροσόλης μειώθηκε στατιστικώς σημαντικά στους επεξεργασμένους καρπούς ελιάς όταν χρησιμοποιήθηκε η τεχνική HPLC-(DAD), ενώ η μείωση της συγκέντρωσης ήταν στατιστικώς σημαντική μόνο στους καρπούς με επεξεργασία ελληνικής μεθόδου όταν χρησιμοποιήθηκε η αναλυτική τεχνική LC-MS/MS. Η συγκέντρωση της λουτεολίνης αυξήθηκε στατιστικώς σημαντικά σε όλους τους καρπούς που υπέστησαν επεξεργασία όταν χρησιμοποιήθηκε η αναλυτική τεχνική LC-MS/MS, ενώ δεν υπήρξε στατιστικώς σημαντική αλλαγή στη συγκέντρωσή της με την χρήση της τεχνικής HPLC-(DAD). Η ελευρωπαΐνη εντοπίστηκε, σε χαμηλές ποσότητες, μόνο όταν χρησιμοποιήθηκε η αναλυτική μέθοδος LC-MS/MS και παρατηρήθηκε μείωση με την επεξεργασία καρπών, η οποία ήταν στατιστικώς σημαντική στους καρπούς με επεξεργασία ισπανικού τύπου. Ο βερμπασκοζίτης ήταν η κυρίαρχη φαινολική ένωση σε όλους τους επεξεργασμένους καρπούς, ενώ η ρουτίνη ήταν η κυρίαρχη φαινολική ένωση στους φρέσκους καρπούς.

Η συγκέντρωση του βερμπασκοζίτη και της υδροξυτυροσόλης ήταν σημαντικά υψηλότερη στους καρπούς με επεξεργασία ελληνικής μεθόδου όταν χρησιμοποιήθηκε η αναλυτική τεχνική LC-MS/MS, ενώ δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στην συγκέντρωση των άλλων φαινολικών ενώσεων μεταξύ της ελληνικής και της ισπανικής μεθόδου επεξεργασίας, χρησιμοποιώντας και τις δύο αναλυτικές μεθόδους.

Αν και υπήρχαν διαφορές μεταξύ των ποσοτήτων των φαινολικών ενώσεων που ανιχνεύτηκαν χρησιμοποιώντας τις δύο αναλυτικές μεθόδους, παρατηρήθηκαν παρόμοιες τάσεις μεταξύ των καρπών με και χωρίς επεξεργασία. Συνολικά, οι δύο μέθοδοι επεξεργασίας που

χρησιμοποιήθηκαν άλλαξαν την συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων στους καρπούς της ελιάς ποικιλίας ‘Καλαμών’, σε σύγκριση με τους μη επεξεργασμένους καρπούς.

Οι φαινολικές ενώσεις είναι βασικοί παράγοντες που συμβάλουν στις αντιοξειδωτικές ιδιότητες του καρπού της ελιάς και αυτά τα αποτελέσματα μπορούν να είναι χρήσιμα για την παραγωγή εμπορικών προϊόντων με ευεργετικές ιδιότητες για την υγεία του καταναλωτή.

1.5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Achour, I., Arel-Dubeau, A. M., Renaud, J., Legrand, M., Attard, E., Germain, M., & Martinoli, M. G.** (2016). Oleuropein prevents neuronal death, mitigates mitochondrial superoxide production and modulates autophagy in a dopaminergic cellular model. *International journal of molecular sciences*, *17*(8), 1293.
- Afanas' ev, I. B., Dcrozsko, A. I., Brodskii, A. V., Kostyuk, V. A., & Potapovitch, A. I.** (1989). Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochemical pharmacology*, *38*(11), 1763-1769.
- Akdemir, Z., Kahraman, Ç., Tatlı, I. I., Akkol, E. K., Süntar, I., & Keles, H.** (2011). Bioassay-guided isolation of anti-inflammatory, antinociceptive and wound healer glycosides from the flowers of *Verbascum mucronatum* Lam. *Journal of ethnopharmacology*, *136*(3), 436-443.
- Alagna, F., Mariotti, R., Panara, F., Caporali, S., Urbani, S., Veneziani, G., ... & Perrotta, G.** (2012). Olive phenolic compounds: metabolic and transcriptional profiling during fruit development. *BMC plant biology*, *12*(1), 162.
- Al-Azzawie, H. F., & Alhamdani, M. S. S.** (2006). Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. *Life sciences*, *78*(12), 1371-1377.
- Al-Rejaie, S. S., Aleisa, A. M., Sayed-Ahmed, M. M., AL-Shabanah, O. A., Abuohashish, H. M., Ahmed, M. M., ... & Hafez, M. M.** (2013). Protective effect of rutin on the antioxidant genes expression in hypercholesterolemic male Westar rat. *BMC complementary and alternative medicine*, *13*(1), 1-9.
- Alirezai, M., Rezaei, M., Hajighahramani, S., Sookhtehzari, A., & Kiani, K.** (2017). Oleuropein attenuates cognitive dysfunction and oxidative stress induced by some anesthetic drugs in the hippocampal area of rats. *The Journal of Physiological Sciences*, *67*(1), 131-139.
- Alipieva, K. I., Orhan, I. E., Cankaya, I. I. T., Kostadinova, E. P., & Georgiev, M. I.** (2014). Treasure from garden: chemical profiling, pharmacology and biotechnology of mulleins. *Phytochemistry reviews*, *13*(2), 417-444.
- Ambra, R., Natella, F., Bello, C., Lucchetti, S., Forte, V., & Pastore, G.** (2017). Phenolics fate in table olives (*Olea europaea* L. cv. Nocellara del Belice) debittered using the Spanish and Castelvetro methods. *Food Research International*, *100*, 369-376.
- Amini, A., Liu, M., & Ahmad, Z.** (2017). Understanding the link between antimicrobial properties of dietary olive phenolics and bacterial ATP synthase. *International journal of biological macromolecules*, *101*, 153-164.
- Amiot, M. J., Fleuriet, A., & Macheix, J. J.** (1986). Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *34*(5), 823-826.
- Amiot, M.J., Fleuriet, A., Macheix, J.J.** (1989). Accumulation of oleuropein derivatives during olive maturation. *Phytochemistry*, *28*, 67-70.
- Andjelković, M., Van Camp, J., De Meulenaer, B., Depaemelaere, G., Socaciu, C., Verloo, M., & Verhe, R.** (2006). Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups. *Food chemistry*, *98*(1), 23-31.
- Andreadou, I., Iliodromitis, E. K., Mikros, E., Constantinou, M., Agalias, A., Magiatis, P., ... & Kremastinos, D. T.** (2006). The olive constituent oleuropein exhibits anti-ischemic, antioxidative, and hypolipidemic effects in anesthetized rabbits. *The journal of nutrition*, *136*(8), 2213-2219.

- Andreadou, I., Benaki, D., Efentakis, P., Bibli, S. I., Milioni, A. I., Papachristodoulou, A., ... & Iliodromitis, E. K.** (2015). The natural olive constituent oleuropein induces nutritional cardioprotection in normal and cholesterol-fed rabbits: comparison with preconditioning. *Planta Medica*, *81*(08), 655-663.
- Araruna, M. K., Brito, S. A., Morais-Braga, M. F., Santos, K. K., Souza, T. M., Leite, T. R., ... & Coutinho, H. D.** (2012). Evaluation of antibiotic & antibiotic modifying activity of pilocarpine & rutin. *The Indian journal of medical research*, *135*(2), 252.
- Ardrey, R. E.** (2003). *Liquid chromatography-mass spectrometry: an introduction* (Vol. 2). John Wiley & Sons.
- Artajo, L. S., Romero, M. P., Suárez, M., & Motilva, M. J.** (2007). Partition of phenolic compounds during the virgin olive oil industrial extraction process. *European Food Research and Technology*, *225*(5-6), 617-625.
- Aruoma, I.O.** (1998). Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American Oil Chemists Society*, *75*, 199–212.
- Appel, H. M.** (1993). Phenolics in ecological interactions: the importance of oxidation. *Journal of Chemical Ecology*, *19*(7), 1521-1552.
- Atochin, D. N., Chernysheva, G. A., Smolyakova, V. I., Osipenko, A. N., Logvinov, S. V., Zhdankina, A. A., ... & Plotnikov, M. B.** (2016). Neuroprotective effects of p-tyrosol after the global cerebral ischemia in rats. *Phytomedicine*, *23*(7), 784-792.
- Avola, R., Graziano, A. C. E., Pannuzzo, G., Bonina, F., & Cardile, V.** (2019). Hydroxytyrosol from olive fruits prevents blue-light-induced damage in human keratinocytes and fibroblasts. *Journal of cellular physiology*, *234*(6), 9065-9076.
- Bakir, M., Geyikoglu, F., Koc, K., & Cerig, S.** (2018). Therapeutic effects of oleuropein on cisplatin-induced pancreas injury in rats. *Journal of cancer research and therapeutics*, *14*(3), 671.
- Balentine, D. A., Wiseman, S. A., & Bouwens, L. C.** (1997). The chemistry of tea flavonoids. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, *37*(8), 693-704.
- Bayram, B., Ozcelik, B., Grimm, S., Roeder, T., Schrader, C., Ernst, I. M., ... & Rimbach, G.** (2012). A diet rich in olive oil phenolics reduces oxidative stress in the heart of SAMP8 mice by induction of Nrf2-dependent gene expression. *Rejuvenation Research*, *15*(1), 71-81
- Bedoya, L. M., Beltrán, M., Obregón-Calderón, P., García-Pérez, J., de la Torre, H. E., González, N., ... & Alcamí, J.** (2016). Hydroxytyrosol: a new class of microbicide displaying broad anti-HIV-1 activity. *AIDS (London, England)*, *30*(18), 2767.
- Belmonte-Reche, E., Martínez-García, M., Peñalver, P., Gómez-Pérez, V., Lucas, R., Gamarro, F., ... & Morales, J. C.** (2016). Tyrosol and hydroxytyrosol derivatives as antitrypanosomal and antileishmanial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *119*, 132-140.
- Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuno, A., Del Rio, J.A.** (2000). Antioxidant activity of phenolic extracted from *Olea europae* L. leaves. *Food Chemistry*, *68*, 457-462.
- Bendini, A., Cerretani, L., Carrasco-Pancorbo, A., Gómez-Caravaca, A. M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., & Lercker, G.** (2007). Phenolic molecules in virgin olive oils: a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade Alessandra. *Molecules*, *12*(8), 1679-1719.
- Bernini, R., Carastro, I., Palmi, G., Tanini, A., Zonefrati, R., Pinelli, P., ... & Romani, A.** (2017). Lipophilization of hydroxytyrosol-enriched fractions from *Olea europaea* L. byproducts and evaluation of the

in vitro effects on a model of colorectal cancer cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(31), 6506-6512.

Benincasa, C., Muccilli, S., Amenta, M., Perri, E., & Romeo, F. V. (2015). Phenolic trend and hygienic quality of green table olives fermented with *Lactobacillus plantarum* starter culture. *Food chemistry*, 186, 271-276.

Berrougui, H., Ikhlef, S., & Khalil, A. (2015). Extra virgin olive oil polyphenols promote cholesterol efflux and improve HDL functionality. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015.

Bharathy, H., & Fathima, N. N. (2017). Exploiting oleuropein for inhibiting collagen fibril formation. *International journal of biological macromolecules*, 101, 179-186.

Bianco, A., Buiarelli, F., Cartoni, G., Coccioli, F., Jasionowska, R., & Margherita, P. (2003). Analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry of biophenolic compounds in olives and vegetation waters, Part I. *Journal of Separation Science*, 26(5), 409-416.

Bigagli, E., Cinci, L., Paccosi, S., Parenti, A., D'Ambrosio, M., & Luceri, C. (2017). Nutritionally relevant concentrations of resveratrol and hydroxytyrosol mitigate oxidative burst of human granulocytes and monocytes and the production of pro-inflammatory mediators in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *International immunopharmacology*, 43, 147-155.

Bisignano, G., Tomaino, A., Cascio, R. L., Crisafi, G., Uccella, N., & Saija, A. (1999). On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 51(8), 971-974.

Bishnoi, M., Chopra, K., & Kulkarni, S. K. (2007). Protective effect of rutin, a polyphenolic flavonoid against haloperidol-induced orofacial dyskinesia and associated behavioural, biochemical and neurochemical changes. *Fundamental & clinical pharmacology*, 21(5), 521-529.

Blades, A. T., Ikonomidou, M. G., & Kebarle, P. (1991). Mechanism of electrospray mass spectrometry. Electrospray as an electrolysis cell. *Analytical chemistry*, 63(19), 2109-2114.

Blekas, G., Vassilakis, C., Harizanis, C., Tsimidou, M., & Boskou, D. G. (2002). Biophenols in table olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(13), 3688-3692.

Bonoli, M., Bendini, A., Cerretani, L., Lercker, G., & Gallina Toschi, T. (2004). Qualitative and semiquantitative analysis of phenolic compounds in extra virgin olive oils as a function of the ripening degree of olive fruits by different analytical techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(23), 7026-7032.

Bonura, A., Vlah, S., Longo, A., Bulati, M., Melis, M. R., Cibella, F., & Colombo, P. (2016). Hydroxytyrosol modulates Par j 1-induced IL-10 production by PBMCs in healthy subjects. *Immunobiology*, 221(12), 1374-1377.

Boskou, D., Blekas, G., & Tsimidou, M. (2005). Phenolic compounds in olive oil and olives. *Current Topics in Nutraceutical Research*, 3(2), 125-136.

Botia, J.M., Ortuño, A., Benavente-García, O., Baidez, A.G., Frias, J., Marcos, D., Del Río, J.A. (2001). Modulation of the biosynthesis of some phenolic compounds in *Olea europaea* L. fruits: Their influence on olive oil quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 355-358.

Bouaziz, M., Jemai, H., Khabou, W., & Sayadi, S. (2010). Oil content, phenolic profiling and antioxidant potential of Tunisian olive drupes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(10), 1750-1758.

Brala, C. J., Barbarić, M., Marković, A. K., & Uršić, S. (2017). Biomedical aspects and activities of olive oil phenolic compounds. *Handbook of olive oil. Phenolic compounds, production and health benefits*, 47-85.

- Bravo, L.** (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56, 317–33.
- Brenes, M., Rejano, L., Garcia, P., Sanchez, A. H., & Garrido, A.** (1995). Biochemical changes in phenolic compounds during Spanish-style green olive processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(10), 2702-2706.
- Brenes-Balbuena, M., Garcia-Garcia, P., & Garrido-Fernandez, A.** (1992). Phenolic compounds related to the black color formed during the processing of ripe olives. *Journal of agricultural and food chemistry*, 40(7), 1192-1196.
- Briante, R., Patumi, M., Terenziani, S., Bismuto, E., Febbraio, F., & Nucci, R.** (2002). Olea europaea L. leaf extract and derivatives: antioxidant properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(17), 4934-4940.
- Calabriso, N., Gnoni, A., Stanca, E., Cavallo, A., Damiano, F., Siculella, L., & Carluccio, M. A.** (2018). Hydroxytyrosol ameliorates endothelial function under inflammatory conditions by preventing mitochondrial dysfunction. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018.
- Campestre, C., Marsilio, V., Lanza, B., Iezzi, C., & Bianchi, G.** (2000, September). Phenolic compounds and organic acids change in black oxidized table olives. In *IV International Symposium on Olive Growing* 586 (pp. 575-578).
- Carito, V., Ceccanti, M., Cestari, V., Natella, F., Bello, C., Coccorello, R., ... & Fiore, M.** (2017). Olive polyphenol effects in a mouse model of chronic ethanol addiction. *Nutrition*, 33, 65-69.
- Carlos, S., La Fuente-Arrillaga, D., Bes-Rastrollo, M., Razquin, C., Rico-Campà, A., Martínez-González, M. A., & Ruiz-Canela, M.** (2018). Mediterranean diet and health outcomes in the SUN cohort. *Nutrients*, 10(4), 439.
- Carluccio, M. A., Siculella, L., Ancora, M. A., Massaro, M., Scoditti, E., Storelli, C., ... & De Caterina, R.** (2003). Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 23(4), 622-629.
- Carnevale, R., Silvestri, R., Loffredo, L., Novo, M., Cammisotto, V., Castellani, V., ... & Violi, F.** (2018). Oleuropein, a component of extra virgin olive oil, lowers postprandial glycaemia in healthy subjects. *British journal of clinical pharmacology*, 84(7), 1566-1574.
- Carrasco-Pancorbo, A., Neusüß, C., Pelzing, M., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A.** (2007). CE-and HPLC-TOF-MS for the characterization of phenolic compounds in olive oil. *Electrophoresis*, 28(5), 806-821.
- Caruso, D., Colombo, R., Patelli, R., Giavarini, F., & Galli, G.** (2000). Rapid evaluation of phenolic component profile and analysis of oleuropein aglycon in olive oil by atmospheric pressure chemical ionization– mass spectrometry (APCI– MS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(4), 1182-1185.
- Casado-Díaz, A., Anter, J., Müller, S., Winter, P., Quesada-Gómez, J. M., & Dorado, G.** (2017). Transcriptomic analyses of the anti-adipogenic effects of oleuropein in human mesenchymal stem cells. *Food & function*, 8(3), 1254-1270.
- Casamenti, F., Grossi, C., Rigacci, S., Pantano, D., Luccarini, I., & Stefani, M.** (2015). Oleuropein aglycone: a possible drug against degenerative conditions. In vivo evidence of its effectiveness against Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 45(3), 679-688.

- Castejón, M. L., Rosillo, M. Á., Montoya, T., González-Benjumea, A., Fernández-Bolaños, J. M., & Alarcón-de-la-Lastra, C.** (2017). Oleuropein down-regulated IL-1 β -induced inflammation and oxidative stress in human synovial fibroblast cell line SW982. *Food & function*, 8(5), 1890-1898.
- Catalán, Ú., Rubió, L., López de las Hazas, M. C., Herrero, P., Nadal, P., Canela, N., ... & Solà, R.** (2016). Hydroxytyrosol and its complex forms (secoiridoids) modulate aorta and heart proteome in healthy rats: Potential cardio-protective effects. *Molecular nutrition & food research*, 60(10), 2114-2129.
- Cech, T. R.** (2000). The ribosome is a ribozyme. *Science*, 289(5481), 878-879.
- Charoenprasert, S., & Mitchell, A.** (2012). Factors influencing phenolic compounds in table olives (*Olea europaea*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(29), 7081-7095.
- Chan, A. P. E., Hegde, A., & Chen, X.** (2009). Effect of rutin on warfarin anticoagulation and pharmacokinetics of warfarin enantiomers in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 61(4), 451-458.
- Chandramohan, R., & Pari, L.** (2016). Anti-inflammatory effects of tyrosol in streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. *Journal of Functional Foods*, 27, 17-28.
- Chang, C. Y., Huang, I. T., Shih, H. J., Chang, Y. Y., Kao, M. C., Shih, P. C., & Huang, C. J.** (2019). Cluster of differentiation 14 and toll-like receptor 4 are involved in the anti-inflammatory effects of tyrosol. *Journal of Functional Foods*, 53, 93-104.
- Chen, W. M., Jin, M., & Wu, W.** (2002). Experimental study on inhibitory effect of rutin against platelet activation induced by platelet activating factor in rabbits. *Zhongguo Zhong xi yi jie he za zhi Zhongguo Zhongxiyi jiehe zazhi= Chinese journal of integrated traditional and Western medicine*, 22(4), 283-285.
- Chen, H. Q., Jin, Z. Y., Wang, X. J., Xu, X. M., Deng, L., & Zhao, J. W.** (2008). Luteolin protects dopaminergic neurons from inflammation-induced injury through inhibition of microglial activation. *Neuroscience letters*, 448(2), 175-179.
- Cheng, A. C., Huang, T. C., Lai, C. S., & Pan, M. H.** (2005). Induction of apoptosis by luteolin through cleavage of Bcl-2 family in human leukemia HL-60 cells. *European journal of pharmacology*, 509(1), 1-10.
- Chiang, C. T., Way, T. D., & Lin, J. K.** (2007). Sensitizing HER2-overexpressing cancer cells to luteolin-induced apoptosis through suppressing p21WAF1/CIP1 expression with rapamycin. *Molecular cancer therapeutics*, 6(7), 2127-2138.
- Chiap, P., Boulanger, B., Fotsing, L., Hubert, P., & Crommen, J.** (2001). Liquid chromatographic analysis of local anesthetics in human plasma after sample preparation by on-line dialysis. Optimization by use of experimental design. *Chromatographia*, 53(11-12), 678-686.
- Chin, K. Y., & Ima-Nirwana, S.** (2016). Olives and bone: A green osteoporosis prevention option. *International journal of environmental research and public health*, 13(8), 755.
- Chiou, A., Salta, F. N., Kalogeropoulos, N., Mylona, A., Ntalla, I., & Andrikopoulos, N. K.** (2007). Retention and distribution of polyphenols after pan-frying of French fries in oils enriched with olive leaf extract. *Journal of food science*, 72(8), S574-S584.
- Choi, S. M., Kim, B. C., Cho, Y. H., Choi, K. H., Chang, J., Park, M. S., ... & Kim, J. K.** (2014). Effects of flavonoid compounds on β -amyloid-peptide-induced neuronal death in cultured mouse cortical neurons. *Chonnam medical journal*, 50(2), 45-51.
- Christophoridou, S., Dais, P., Tseng, L. H., & Spraul, M.** (2005). Separation and identification of phenolic compounds in olive oil by coupling high-performance liquid chromatography with postcolumn solid-phase extraction to nuclear magnetic resonance spectroscopy (LC-SPE-NMR). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(12), 4667-4679.

- Ciafardini G., Zullo B.A., Cioccia G.,** (2005). Effect of lipase-producing yeast on the oil fraction of microbiologically debittered table olives. *J. Lipid Sci.Technol.*, 107, 851-856.
- Cicerale, S., Lucas, L. J., & Keast, R. S. J.** (2012). Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory phenolic activities in extra virgin olive oil. *Current opinion in biotechnology*, 23(2), 129-135.
- Cirico, T. L., & Omaye, S. T.** (2006). Additive or synergetic effects of phenolic compounds on human low density lipoprotein oxidation. *Food and Chemical Toxicology*, 44(4), 510-516.
- Cole, R.B.,** (1997). *Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation and Applications*, Wiley, New York.
- Cole, R.B.,J,** (2000). *Mass. Spectrom.*, 35, 763–772.
- Coleta, M., Campos, M. G., Cotrim, M. D., de Lima, T. C. M., & da Cunha, A. P.** (2008). Assessment of luteolin (3', 4', 5, 7-tetrahydroxyflavone) neuropharmacological activity. *Behavioural brain research*, 189(1), 75-82.
- Colica, C., Di Renzo, L., Trombetta, D., Smeriglio, A., Bernardini, S., Cioccoloni, G., ... & De Lorenzo, A.** (2017). Antioxidant effects of a hydroxytyrosol-based pharmaceutical formulation on body composition, metabolic state, and gene expression: a randomized double-blinded, placebo-controlled crossover trial. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017.
- Cook, N.C. & Samman, S.** (1996). Flavonoids: Chemistry, metabolism cardioprotective effects, and dietary sources. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 7: 66-76.
- Corona, G., Tzounis, X., Assunta Dessi, M., Deiana, M., Debnam, E. S., Visioli, F., & Spencer, J. P.** (2006). The fate of olive oil polyphenols in the gastrointestinal tract: implications of gastric and colonic microflora-dependent biotransformation. *Free radical research*, 40(6), 647-658.
- Corona, G., Deiana, M., Incani, A., Vauzour, D., Dessi, M. A., & Spencer, J. P.** (2009). Hydroxytyrosol inhibits the proliferation of human colon adenocarcinoma cells through inhibition of ERK1/2 and cyclin D1. *Molecular nutrition & food research*, 53(7), 897-903.
- Crespo, M. C., Tomé-Carneiro, J., Burgos-Ramos, E., Kohen, V. L., Espinosa, M. I., Herranz, J., & Visioli, F.** (2015). One-week administration of hydroxytyrosol to humans does not activate Phase II enzymes. *Pharmacological Research*, 95, 132-137.
- Crespo, M. C., Tomé-Carneiro, J., Pintado, C., Dávalos, A., Visioli, F., & Burgos-Ramos, E.** (2017). Hydroxytyrosol restores proper insulin signaling in an astrocytic model of Alzheimer's disease. *Biofactors*, 43(4), 540-548.
- Crozier, A., Burns, J., Aziz, A. A., Stewart, A. J., Rabiasz, H. S., Jenkins, G. I., ... & Lean, M. E.** (2000). Antioxidant flavonols from fruits, vegetables and beverages: measurements and bioavailability. *Biological Research*, 33(2), 79-88.
- Dagla, I., Benaki, D., Baira, E., Lemonakis, N., Poudyal, H., Brown, L., ... & Gikas, E.** (2018). Alteration in the liver metabolome of rats with metabolic syndrome after treatment with Hydroxytyrosol. A Mass Spectrometry And Nuclear Magnetic Resonance-based metabolomics study. *Talanta*, 178, 246-257.
- Damak, N., Bouaziz, M., Ayadi, M., Sayadi, S., & Damak, M.** (2008). Effect of the maturation process on the phenolic fractions, fatty acids, and antioxidant activity of the Chétoui olive fruit cultivar. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(5), 1560-1566.

- Da Silva, R. R., De Oliveira, T. T., Nagem, T. J., Pinto, A. S., Albino, L. F., De Almeida, M. R., ... & Pinto, J. G.** (2001). Hypocholesterolemic effect of naringin and rutin flavonoids. *Archivos latinoamericanos de nutricion*, 51(3), 258.
- Davinelli, S., Maes, M., Corbi, G., Zarrelli, A., Willcox, D. C., & Scapagnini, G.** (2016). Dietary phytochemicals and neuro-inflammation: from mechanistic insights to translational challenges. *Immunity & Ageing*, 13(1), 16.
- D'Angelo, S., Manna, C., Migliardi, V., Mazzoni, O., Morrica, P., Capasso, G., ... & Zappia, V.** (2001). Pharmacokinetics and metabolism of hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil. *Drug Metabolism and Disposition*, 29(11), 1492-1498.
- D'Antuono, I., Garbetta, A., Ciasca, B., Linsalata, V., Minervini, F., Lattanzio, V. M., ... & Cardinali, A.** (2016). Biophenols from table olive cv Bella di Cerignola: Chemical characterization, bioaccessibility, and intestinal absorption. *Journal of agricultural and food chemistry*, 64(28), 5671-5678.
- D'Antuono, I., Bruno, A., Linsalata, V., Minervini, F., Garbetta, A., Tufariello, M., ... & Cardinali, A.** (2018). Fermented Apulian table olives: Effect of selected microbial starters on polyphenols composition, antioxidant activities and bioaccessibility. *Food chemistry*, 248, 137-145.
- Deepak M, Umashankar DC, Handa SS.,** (1999). Verbascoside—a promising phenylpropanoid. *Indian Drugs*;36:336–45.
- de Bock, M., Derraik, J. G., Brennan, C. M., Biggs, J. B., Morgan, P. E., Hodgkinson, S. C., ... & Cutfield, W. S.** (2013). Olive (*Olea europaea* L.) leaf polyphenols improve insulin sensitivity in middle-aged overweight men: a randomized, placebo-controlled, crossover trial. *PLoS one*, 8(3), e57622.
- de Queiroz Pimentel, R. B., da Costa, C. A., Albuquerque, P. M., & Junior, S. D.** (2013). Antimicrobial activity and rutin identification of honey produced by the stingless bee *Melipona compressipes manausensis* and commercial honey. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13(1), 151.
- De Sarmiento, F.M., Kimura, T.,** (1957). Treatment of whooping cough with vitamins C & K combined with rutin, intravenous administration. *Pediatr. Prat.* 28 (1), 51–62
- Dell'Agli, M., Fagnani, R., Mitro, N., Scuratì, S., Masciadri, M., Mussoni, L., ... & Tremoli, E.** (2006). Minor components of olive oil modulate proatherogenic adhesion molecules involved in endothelial activation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(9), 3259-3264.
- 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.
- de las Hazas, M. C. L., Piñol, C., Macià, A., Romero, M. P., Pedret, A., Solà, R., ... & Motilva, M. J.** (2016). Differential absorption and metabolism of hydroxytyrosol and its precursors oleuropein and secoiridoids. *Journal of Functional Foods*, 22, 52-63.
- de Las Hazas, M. C. L., Motilva, M. J., Piñol, C., & Macià, A.** (2016). Application of dried blood spot cards to determine olive oil phenols (hydroxytyrosol metabolites) in human blood. *Talanta*, 159, 189-193.
- de las Hazas, M. C. L., Godinho-Pereira, J., Macià, A., Almeida, A. F., Ventura, M. R., Motilva, M. J., & Santos, C. N.** (2018). Brain uptake of hydroxytyrosol and its main circulating metabolites: Protective potential in neuronal cells. *Journal of Functional Foods*, 46, 110-117.
- de la Puerta, R., Gutierrez, V. R., & Houtt, J. R. S.** (1999). Inhibition of leukocyte 5-lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil. *Biochemical pharmacology*, 57(4), 445-449.

- de la Puerta, R., Domínguez, M. E. M., Ruíz-Gutiérrez, V., Flavill, J. A., & Hoult, J. R. S.** (2001). Effects of virgin olive oil phenolics on scavenging of reactive nitrogen species and upon nitrenergic neurotransmission. *Life Sciences*, *69*(10), 1213-1222.
- De la Torre-Carbot, K., Jauregui, O., Gimeno, E., Castellote, A. I., Lamuela-Raventós, R. M., & López-Sabater, M. C.** (2005). Characterization and quantification of phenolic compounds in olive oils by solid-phase extraction, HPLC-DAD, and HPLC-MS/MS. *Journal of agricultural and food chemistry*, *53*(11), 4331-4340.
- Diallinas, G., Rafailidou, N., Kalpaktsi, I., Komianou, A. C., Tsouvali, V., Zantza, I., ... & Kostakis, I. K.** (2018). Hydroxytyrosol (HT) Analogs Act as Potent Antifungals by Direct Disruption of the Fungal Cell Membrane. *Frontiers in microbiology*, *9*, 2624.
- Di Benedetto, R., Vari, R., Scazzocchio, B., Filesi, C., Santangelo, C., Giovannini, C., ... & Masella, R.** (2007). Tyrosol, the major extra virgin olive oil compound, restored intracellular antioxidant defences in spite of its weak antioxidative effectiveness. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, *17*(7), 535-545.
- Dierkes, G., Krieger, S., Dück, R., Bongartz, A., Schmitz, O. J., & Hayen, H.** (2012). High-performance liquid chromatography–mass spectrometry profiling of phenolic compounds for evaluation of olive oil bitterness and pungency. *Journal of agricultural and food chemistry*, *60*(31), 7597-7606.
- Dirscherl, K., Karlstetter, M., Ebert, S., Kraus, D., Hlawatsch, J., Walczak, Y., ... & Langmann, T.** (2010). Luteolin triggers global changes in the microglial transcriptome leading to a unique anti-inflammatory and neuroprotective phenotype. *Journal of neuroinflammation*, *7*(1), 3.
- Dixon, R.A., Paiva, N.L.** (1995). Stress – induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell*, *7*, 1085–1097.
- Domínguez-Perles, R., Auñón, D., Ferreres, F., & Gil-Izquierdo, A.** (2017). Gender differences in plasma and urine metabolites from Sprague–Dawley rats after oral administration of normal and high doses of hydroxytyrosol, hydroxytyrosol acetate, and DOPAC. *European journal of nutrition*, *56*(1), 215-224.
- Dooley, K. C.** (2003). Tandem mass spectrometry in the clinical chemistry laboratory. *Clinical biochemistry*, *36*(6), 471-481.
- Dorsey, J. G., & Cooper, W. T.** (1994). Retention mechanisms of bonded-phase liquid chromatography. *Analytical chemistry*, *66*(17), 857A-867A.
- Doulgeraki, A. I., Pramateftaki, P., Argyri, A. A., Nychas, G. J. E., Tassou, C. C., & Panagou, E. Z.** (2013). Molecular characterization of lactic acid bacteria isolated from industrially fermented Greek table olives. *LWT-Food Science and Technology*, *50*(1), 353-356.
- Drira, R., Chen, S., & Sakamoto, K.** (2011). Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit adipocyte differentiation in 3 T3-L1 cells. *Life sciences*, *89*(19-20), 708-716.
- Dubey, S., Ganeshpurkar, A., Bansal, D., & Dubey, N.** (2013). Experimental studies on bioactive potential of rutin. *Chronicles of Young Scientists*, *4*(2), 153
- Dubey, S., Ganeshpurkar, A., Shrivastava, A., Bansal, D., & Dubey, N.** (2013). Rutin exerts antiulcer effect by inhibiting the gastric proton pump. *Indian journal of pharmacology*, *45*(4), 415.
- Echeverría, F., Ortiz, M., Valenzuela, R., & Videla, L. A.** (2017). Hydroxytyrosol and cytoprotection: A projection for clinical interventions. *International journal of molecular sciences*, *18*(5), 930.
- EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA).** (2010). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to vitamin E and protection of DNA, proteins and lipids from oxidative damage. *EFSA J.*, *8*, 1816.

- Eilami, O., Oliverio, M., Hosseinian, S., Motlagh, A. H., & Naghmachi, M.** (2017). Antimicrobial Effects of Hydroxytyrosol Extracted from Olive Leaves on *Propionibacterium Acnes*. *World Family Medicine Journal: Incorporating the Middle East Journal of Family Medicine*, 99(5588), 1-5.
- Esti, M., Cinquanta, L., La Notte, E.** (1998). Phenolic compounds in different olive varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 32–35.
- Estruch, R., Ros, E., Salas-Salvadó, J., Covas, M. I., Corella, D., Arós, F., ... & Lamuela-Raventos, R. M.** (2013). Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *New England Journal of Medicine*, 368(14), 1279-1290.
- Fabiani, R., Sepporta, M. V., Rosignoli, P., De Bartolomeo, A., Crescimanno, M., & Morozzi, G.** (2012). Anti-proliferative and pro-apoptotic activities of hydroxytyrosol on different tumour cells: the role of extracellular production of hydrogen peroxide. *European journal of nutrition*, 51(4), 455-464.
- Fabiani, R.** (2016). Anti-cancer properties of olive oil secoiridoid phenols: A systematic review of in vivo studies. *Food & function*, 7(10), 4145-4159.
- Fang, J., Zhou, Q., Shi, X. L., & Jiang, B. H.** (2007). Luteolin inhibits insulin-like growth factor 1 receptor signaling in prostate cancer cells. *Carcinogenesis*, 28(3), 713-723.
- Féart, C., Samieri, C., Alles, B., & Barberger-Gateau, P.** (2013). Potential benefits of adherence to the Mediterranean diet on cognitive health. *Proceedings of the Nutrition Society*, 72(1), 140-152.
- Feng, Z., Li, X., Lin, J., Zheng, W., Hu, Z., Xuan, J., ... & Pan, X.** (2017). Oleuropein inhibits the IL-1 β -induced expression of inflammatory mediators by suppressing the activation of NF- κ B and MAPKs in human osteoarthritis chondrocytes. *Food & function*, 8(10), 3737-3744.
- Fernandes, A. A. H., Novelli, E. L. B., Okoshi, K., Okoshi, M. P., Di Muzio, B. P., Guimarães, J. F. C., & Junior, A. F.** (2010). Influence of rutin treatment on biochemical alterations in experimental diabetes. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 64(3), 214-219.
- Fernández, A. G., Adams, M. R., & Fernandez-Diez, M. J.** (1997). *Table olives: production and processing*. Springer Science & Business Media.
- Fernandez-Pastor, I., Martínez-García, M., Medina-O'Donnell, M., Rivas, F., Martínez, A., Pérez-Victoria, J. M., & Parra, A.** (2018). Semisynthesis of ω -Hydroxyalkylcarbonate Derivatives of Hydroxytyrosol as Antitrypanosome Agents. *Journal of natural products*, 81(9), 2075-2082.
- Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., Pedro, L. G., & Scheffer, J. J.** (2008). Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance journal*, 23(4), 213-226.
- Field, T.S., Lee, D.W., Holbrook, N.M.** (2001). Why leaves turn red in autumn. The role of anthocyanins in senescing leaves of red – osier dogwood. *Plant Physiology*, 127, 566–574.
- Filho, A. G., Morel, A. F., Adolpho, L., Ilha, V., Giralt, E., Tarragó, T., & Dalcol, I. I.** (2012). Inhibitory effect of verbascoside isolated from *Buddleja brasiliensis* Jacq. ex Spreng on prolyl oligopeptidase activity. *Phytotherapy Research*, 26(10), 1472-1475.
- Franconi, F., Coinu, R., Carta, S., Urgeghe, P. P., Ieri, F., Mulinacci, N., & Romani, A.** (2006). Antioxidant effect of two virgin olive oils depends on the concentration and composition of minor polar compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(8), 3121-3125.
- Frisardi, V.; Panza, F.; Seripa, D.; et al.** (2010). Nutraceutical properties of Mediterranean diet and cognitive decline: possible underlying mechanisms. *J. Alzheimer's Dis.*, 22 (3), 715–740

- Fu, S., Segura-Carretero, A., Arraez-Roman, D., Menendez, J. A., De La Torre, A., & Fernandez-Gutierrez, A.** (2009). Tentative characterization of novel phenolic compounds in extra virgin olive oils by rapid-resolution liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry*, *57*(23), 11140-11147.
- Fuccelli, R., Fabiani, R., & Rosignoli, P.** (2018). Hydroxytyrosol exerts anti-inflammatory and anti-oxidant activities in a mouse model of systemic inflammation. *Molecules*, *23*(12), 3212.
- Funes, L., Fernández-Arroyo, S., Laporta, O., Pons, A., Roche, E., Segura-Carretero, A., ... & Micol, V.** (2009). Correlation between plasma antioxidant capacity and verbascoside levels in rats after oral administration of lemon verbena extract. *Food Chemistry*, *117*(4), 589-598.
- Furneri, P. M., Piperno, A., Sajia, A., & Bisignano, G.** (2004). Antimycoplasmal activity of hydroxytyrosol. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *48*(12), 4892-4894.
- Funakohi-Tago, M., Sakata, T., Fujiwara, S., Sakakura, A., Sugai, T., Tago, K., & Tamura, H.** (2018). Hydroxytyrosol butyrate inhibits 6-OHDA-induced apoptosis through activation of the Nrf2/HO-1 axis in SH-SY5Y cells. *European Journal of Pharmacology*, *834*, 246-256.
- García-Martínez, O., De Luna-Bertos, E., Ramos-Torrecillas, J., Ruiz, C., Milia, E., Lorenzo, M. L., ... & Rivas, A.** (2016). Phenolic compounds in extra virgin olive oil stimulate human osteoblastic cell proliferation. *PLoS One*, *11*(3), e0150045.
- García-Villalba, R., Carrasco-Pancorbo, A., Oliveras-Ferraros, C., Vázquez-Martín, A., Menéndez, J. A., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A.** (2010). Characterization and quantification of phenolic compounds of extra-virgin olive oils with anticancer properties by a rapid and resolute LC-ESI-TOF MS method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *51*(2), 416-429.
- Gaskell, S. J.** (1997). Electrospray: principles and practice. *Journal of mass spectrometry*, *32*(7), 677-688.
- Georgiev, M., Pastore, S., Lulli, D., Alipieva, K., Kostyuk, V., Potapovich, A., ... & Korkina, L.** (2012). Verbascum xanthophoeniceum-derived phenylethanoid glycosides are potent inhibitors of inflammatory chemokines in dormant and interferon-gamma-stimulated human keratinocytes. *Journal of ethnopharmacology*, *144*(3), 754-760.
- Gershenzon, J.** (1984). Changes in the levels of plant secondary metabolites under water and nutrient stress. In *Phytochemical adaptations to stress* (pp. 273-320). Springer, Boston, MA.
- Ghalandari, M., Naghmachi, M., Oliverio, M., Nardi, M., Shirazi, H. R. G., & Eilami, O.** (2018). Antimicrobial effect of Hydroxytyrosol, Hydroxytyrosol Acetate and Hydroxytyrosol Oleate on Staphylococcus Aureus and Staphylococcus Epidermidis. *Electronic Journal of General Medicine*, *15*(4).
- 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.
- Ghisalberti, E.L.** (1998). Biological and pharmacological activity of naturally occurring iridoids and secoiridoids. *Phytomedicine*, *5* (2), 147-163.
- Gikas, E., Papadopoulos, N., & Tsarbopoulos, A.** (2006). Kinetic study of the acidic hydrolysis of oleuropein, the major bioactive metabolite of olive oil. *Journal of liquid chromatography & related technologies*, *29*(4), 497-508.
- Giner, E., Andújar, I., Recio, M. C., Ríos, J. L., Cerdá-Nicolás, J. M., & Giner, R. M.** (2011). Oleuropein ameliorates acute colitis in mice. *Journal of agricultural and food chemistry*, *59*(24), 12882-12892.

- Goldstein, D. S., Jinsmaa, Y., Sullivan, P., Holmes, C., Kopin, I. J., & Sharabi, Y.** (2016). 3, 4-Dihydroxyphenylethanol (hydroxytyrosol) mitigates the increase in spontaneous oxidation of dopamine during monoamine oxidase inhibition in PC12 cells. *Neurochemical research*, 41(9), 2173-2178.
- Goldsmith, C. D., Bond, D. R., Jankowski, H., Weidenhofer, J., Stathopoulos, C. E., Roach, P. D., & Scarlett, C. J.** (2018). The olive biophenols oleuropein and hydroxytyrosol selectively reduce proliferation, influence the cell cycle, and induce apoptosis in pancreatic cancer cells. *International journal of molecular sciences*, 19(7), 1937.
- Gonzalez-Santiago, M., Martin-Bautista, E., Carrero, J. J., Fonolla, J., Baro, L., Bartolomé, M. V., ... & Lopez-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.
- González-Correa, J. A., Navas, M. D., Muñoz-Marín, J., Trujillo, M., Fernández-Bolaños, J., & de la Cruz, J. P.** (2008). Effects of hydroxytyrosol and hydroxytyrosol acetate administration to rats on platelet function compared to acetylsalicylic acid. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(17), 7872-7876.
- Gordon, M.H.** (1990). *The mechanism of antioxidant action in vitro*. (In) Food Antioxidant. Editor: B.J.F. Hudson. Elsevier Applied Science, New York.
- Gould, L.** (2004). The medical management of idiopathic chylothorax in a domestic long-haired cat. *The Canadian Veterinary Journal*, 45(1), 51.
- Gutteridge, J.M., Halliwell, B.** (1994). Antioxidants in nutrition, health and disease. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Gutierrez, F., Albi, M. A., Palma, R., Rios, J. J., & Olias, J. M.** (1989). Bitter taste of virgin olive oil: Correlation of sensory evaluation and instrumental HPLC analysis. *Journal of Food Science*, 54(1), 68-70.
- Gutiérrez-Rosales, F., Rios, J. J., & Gomez-Rey, M. L.** (2003). Main polyphenols in the bitter taste of virgin olive oil. Structural confirmation by on-line high-performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(20), 6021-6025.
- Hagerman, A.E., Riedl, K.M., Jones, G.A., Sovik, K.N., Ritchard, N.T., Hartzfeld, P.W., Riechel, T.L.** (1998). High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1887– 1892.
- Hagiwara, K., Goto, T., Araki, M., Miyazaki, H., & Hagiwara, H.** (2011). Olive polyphenol hydroxytyrosol prevents bone loss. *European journal of pharmacology*, 662(1-3), 78-84.
- Halliwell, B.** (2008). Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 476: 107-112.
- Hamilton, J. G., Zangerl, A. R., DeLucia, E. H., & Berenbaum, M. R.** (2001). The carbon–nutrient balance hypothesis: its rise and fall. *Ecology letters*, 4(1), 86-95.
- Harborne, J.B.** (1980). *Plant phenolics*. In: BELL EA, CHARLWOOD BV (eds) Encyclopedia of Plant Physiology, volume 8 Secondary Plant Products, Springer- Verlag, Berlin Heidelberg New York. pp:329-395
- Harborne, J.B.** (1993). Advances in chemical ecology. *Natural Product Reports*, 327– 348.
- Harnly, J. M., Bhagwat, S., & Lin, L. Z.** (2007). Profiling methods for the determination of phenolic compounds in foods and dietary supplements. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 389(1), 47-61.
- Han, J., Talorete, T. P., 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.

- Hassan, Z. K., Elamin, M. H., Daghestani, M. H., Omer, S. A., Al-Olayan, E. M., Elobeid, M. A., ... & Mohammed, O. B.** (2012). Oleuropein induces anti-metastatic effects in breast cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*, 13(9), 4555-4559.
- Hassen, I., Casabianca, H., & Hosni, K.** (2015). Biological activities of the natural antioxidant oleuropein: Exceeding the expectation—A mini-review. *Journal of Functional Foods*, 18, 926-940.
- Hausmann, M., Obermeier, F., Paper, D. H., Balan, K., Dunger, N., Menzel, K., ... & Rogler, G.** (2007). In vivo treatment with the herbal phenylethanoid acteoside ameliorates intestinal inflammation in dextran sulphate sodium-induced colitis. *Clinical & Experimental Immunology*, 148(2), 373-381.
- Heim, K.E., Tagliafero, A.R., Bobilya, D.J.** (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13: 572-584.
- Ho, T. S., Halvorsen, T. G., Pedersen-Bjergaard, S., & Rasmussen, K. E.** (2003). Liquid-phase microextraction of hydrophilic drugs by carrier-mediated transport. *Journal of Chromatography A*, 998(1-2), 61-72.
- Horcajada, M. N., Sanchez, C., Scalfo, F. M., Drion, P., Comblain, F., Taralla, S., ... & Henrotin, Y.** (2015). Oleuropein or rutin consumption decreases the spontaneous development of osteoarthritis in the Hartley guinea pig. *Osteoarthritis and cartilage*, 23(1), 94-102.
- Horiuchi, Y., Toda, M., Okubo, S., Hara, Y., Shimamura, T.** (1992). Protective activity of tea and catechins against *Bordetella Pertussis*. *Kansenshogaku Zasshi.*, 66, 599–605.
- Hornedo-Ortega, R., Cerezo, A. B., Troncoso, A. M., & Garcia-Parrilla, M. C.** (2018). Protective effects of hydroxytyrosol against α -synuclein toxicity on PC12 cells and fibril formation. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 120, 41-49.
- Hyun, H., Park, H., Jeong, J., Kim, J., Kim, H., Oh, H. I., ... & Kim, H. H.** (2014). Effects of watercress containing rutin and rutin alone on the proliferation and osteogenic differentiation of human osteoblast-like MG-63 cells. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, 18(4), 347-352.
- Hu, L. W., Yen, J. H., Shen, Y. T., Wu, K. Y., & Wu, M. J.** (2014). Luteolin modulates 6-hydroxydopamine-induced transcriptional changes of stress response pathways in PC12 cells. *PLoS One*, 9(5), e97880.
- Ibrahim, A. K., Youssef, A. I., Arafa, A. S., & Ahmed, S. A.** (2013). Anti-H5N1 virus flavonoids from *Capparis sinaica* Veill. *Natural product research*, 27(22), 2149-2153.
- Illesca, P., Valenzuela, R., Espinosa, A., Echeverría, F., Soto-Alarcon, S., Ortiz, M., & Videla, L. A.** (2019). Hydroxytyrosol supplementation ameliorates the metabolic disturbances in white adipose tissue from mice fed a high-fat diet through recovery of transcription factors Nrf2, SREBP-1c, PPAR- γ and NF- κ B. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 109, 2472-2481.
- Imran, M., Nadeem, M., Gilani, S. A., Khan, S., Sajid, M. W., & Amir, R. M.** (2018). Antitumor perspectives of oleuropein and its metabolite hydroxytyrosol: Recent updates. *Journal of food science*, 83(7), 1781-1791.
- Ishii, T.** (1997). Structure and functions of feruloylated polysaccharides. *Plant Science*, 12, 111-127.
- Jacob, R.A.** (1995). The integrated antioxidant system. *Nutrition Research*, 15: 755- 766.
- Jadhav, S.J., Nimbalkar, S.S., Kulkarni, A.D., Madhavi, D.L.** (1996). Lipid oxidation in 16 biological and food systems. (In) *Food Antioxidants: Technological, Toxicological and Health 17 Perspectives*. Marcel Dekker, Inc. New York.

- Janbaz, K. H., Saeed, S. A., & Gilani, A. H.** (2002). Protective effect of rutin on paracetamol-and CCl₄-induced hepatotoxicity in rodents. *Fitoterapia*, 73(7-8), 557-563.
- Javed, H., Khan, M. M., Ahmad, A., Vaibhav, K., Ahmad, M. E., Khan, A., ... & Safhi, M. M.** (2012). Rutin prevents cognitive impairments by ameliorating oxidative stress and neuroinflammation in rat model of sporadic dementia of Alzheimer type. *Neuroscience*, 210, 340-352.
- Jemai, H., Bouaziz, M., Fki, I., El Feki, A., & Sayadi, S.** (2008). Hypolipidemic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves. *Chemico-Biological Interactions*, 176(2-3), 88-98.
- Jemai, H., El Feki, A., & Sayadi, S.** (2009). Antidiabetic and antioxidant effects of hydroxytyrosol and oleuropein from olive leaves in alloxan-diabetic rats. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(19), 8798-8804.
- Jerman Klen, T., Golc Wondra, A., Vrhovšek, U., & Mozetič Vodopivec, B.** (2015). Phenolic profiling of olives and olive oil process-derived matrices using UPLC-DAD-ESI-QTOF-HRMS analysis. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(15), 3859-3872.
- Jessome, L.L., & Volmer, D.A.,** (2006). LCGC North America, 24, 498-510.
- Jetter, R., Schaffer, S. Riederer, M.** (2000). Leaf cuticular waxes are arranged in chemically and mechanically distinct layers: evidence from *Prunus laurocerasus* L. *Plant Cell and Environment*, 23, 619-628.
- Ji, S. T., Kim, Y. J., Jung, S. Y., Kang, S., Park, J. H., Jang, W. B., ... & Kwon, S. M.** (2018). Oleuropein attenuates hydrogen peroxide-induced autophagic cell death in human adipose-derived stem cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 499(3), 675-680.
- Jin, H. X., Zhang, Y. H., Guo, R. N., & Zhao, S. N.** (2018). Inhibition of MEK/ERK/STAT3 signaling in oleuropein treatment inhibits myocardial ischemia/reperfusion. *International journal of molecular medicine*, 42(2), 1034-1043.
- Johnstone, R. A., Johnstone, R. A. W., Johnstone, R. A., & Rose, M. E.** (1996). *Mass spectrometry for chemists and biochemists*. Cambridge university press.
- Johnson, R., Melliou, E., Zweigenbaum, J., & Mitchell, A. E.** (2018). Quantitation of oleuropein and related phenolics in cured Spanish-style green, California-style black ripe, and Greek-style natural fermentation olives. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(9), 2121-2128.
- Jung, C. H., Lee, J. Y., Cho, C. H., & Kim, C. J.** (2007). Anti-asthmatic action of quercetin and rutin in conscious guinea-pigs challenged with aerosolized ovalbumin. *Archives of pharmacal research*, 30(12), 1599.
- Kanadaswami, C., Lee, L. T., Lee, P. P. H., Hwang, J. J., Ke, F. C., Huang, Y. T., & Lee, M. T.** (2005). The antitumor activities of flavonoids. *In vivo*, 19(5), 895-909.
- Kanakis, P., Termentzi, A., Michel, T., Gikas, E., Halabalaki, M., & Skaltsounis, A. L.** (2013). From olive drupes to olive oil. An HPLC-orbitrap-based qualitative and quantitative exploration of olive key metabolites. *Planta medica*, 79(16), 1576-1587.
- Kanashiro, A., Andrade, D. C., Kabeya, L. M., Turato, W. M., Faccioli, L. H., Uyemura, S. A., & Lucisano-Valim, Y. M.** (2009). Modulatory effects of rutin on biochemical and hematological parameters in hypercholesterolemic Golden Syrian hamsters. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 81(1), 67-72.
- Kang, S. S., Lee, J. Y., Choi, Y. K., Kim, G. S., & Han, B. H.** (2004). Neuroprotective effects of flavones on hydrogen peroxide-induced apoptosis in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 14(9), 2261-2264.

- Kappel, V. D., Zanatta, L., Postal, B. G., & Silva, F. R. M. B.** (2013). Rutin potentiates calcium uptake via voltage-dependent calcium channel associated with stimulation of glucose uptake in skeletal muscle. *Archives of biochemistry and biophysics*, 532(2), 55-60.
- Karabourniotis, G., Kofidis, G., Fasseas, C., Liakoura, V., Drossopoulos, I.** (1998). Polyphenol deposition in leaf hairs of *Olea europaea* (Oleaceae) and *Quercus ilex* (Fagaceae). *American Journal of Botany*, 85, 1007–1012.
- Karakaya, S., Nehir, El. S.** (1999). Quercetin, luteolin, apigenin and kaempferol contents of some foods. *Food Chemistry*, 66, 289-292.
- Karkoula, E., Skantzari, A., Melliou, E., & Magiatis, P.** (2012). Direct measurement of oleocanthal and oleacein levels in olive oil by quantitative ¹H NMR. Establishment of a new index for the characterization of extra virgin olive oils. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(47), 11696-11703.
- Kataoka, H.** (2003). New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 22(4), 232-244.
- Kebarle, P., & Tang, L.** (1993). From ions in solution to ions in the gas phase-the mechanism of electrospray mass spectrometry. *Analytical chemistry*, 65(22), 972A-986A.
- Kempuraj, D., Madhappan, B., Christodoulou, S., Boucher, W., Cao, J., Papadopoulou, N., ... & Theoharides, T. C.** (2005). Flavonols inhibit proinflammatory mediator release, intracellular calcium ion levels and protein kinase C theta phosphorylation in human mast cells. *British journal of pharmacology*, 145(7), 934-944.
- Khan, R. A., Khan, M. R., & Sahreen, S.** (2012). Protective effects of rutin against potassium bromate induced nephrotoxicity in rats. *BMC complementary and alternative medicine*, 12(1), 204.
- Kim, J. S., Kwon, C. S., & Son, K. H.** (2000). Inhibition of alpha-glucosidase and amylase by luteolin, a flavonoid. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 64(11), 2458-2461.
- King, R., Bonfiglio, R., Fernandez-Metzler, C., Miller-Stein, C., & Olah, T.** (2000). Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 11(11), 942-950.
- Kingston, D. G.** (2011). Modern natural products drug discovery and its relevance to biodiversity conservation. *Journal of natural products*, 74(3), 496-511.
- Kolattukudy, P.E.** (1981). Structure, biosynthesis and biodegradation of cutin and suberin. *Annual Review of Plant Physiology*, 32, 539–567.
- Kopko, S.H.** (2005). The use of rutin in a cat with idiopathic chylothorax. *Can. Vet. J.* 46 (8), 729–731.
- Korkina, L. G.** (2007). Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: from plant defense to human health. *Cell Mol Biol*, 53(1), 15-25.
- Korkina, L., Kostyuk, V., De Luca, C., & Pastore, S.** (2011). Plant phenylpropanoids as emerging anti-inflammatory agents. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 11(10), 823-835.
- Korfmacher, W. A.** (2005). Foundation review: Principles and applications of LC-MS in new drug discovery. *Drug discovery today*, 10(20), 1357-1367.
- Kostyuk, V., Potapovich, A., Suhan, T., De Luca, C., Pressi, G., Dal Toso, R., & Korkina, L.** (2008). Plant polyphenols against UV-C-induced cellular death. *Planta Medica*, 74(5), 509.

- Kostyuk, V. A., Potapovich, A. I., Lulli, D., Stancato, A., De Luca, C., Pastore, S., & Korkina, L.** (2013). Modulation of human keratinocyte responses to solar UV by plant polyphenols as a basis for chemoprevention of non-melanoma skin cancers. *Current Medicinal Chemistry*, 20(7), 869-879.
- Krishna, K. M., Annapurna, A., Gopal, G. S., Chalam, C. R., Madan, K., Kumar, V. K., & Prakash, G. J.** (2005). Partial reversal by rutin and quercetin of impaired cardiac function in streptozotocin-induced diabetic rats. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 83(4), 343-355.
- Kyung, T. W., Lee, J. E., Shin, H. H., & Choi, H. S.** (2008). Rutin inhibits osteoclast formation by decreasing reactive oxygen species and TNF- α by inhibiting activation of NF- κ B. *Experimental & molecular medicine*, 40(1), 52-58.
- Kubasek, W. L., Ausubel, F. M., & Shirley, B. W.** (1998). A light-independent developmental mechanism potentiates flavonoid gene expression in Arabidopsis seedlings. *Plant molecular biology*, 37(2), 217-223.
- Kuem, N., Song, S. J., Yu, R., Yun, J. W., & Park, T.** (2014). Oleuropein attenuates visceral adiposity in high-fat diet-induced obese mice through the modulation of WNT10b-and galanin-mediated signalings. *Molecular nutrition & food research*, 58(11), 2166-2176.
- Kumral, A., Korukluoglu, M., Romero, C., de Castro, A., Ruiz-Barba, J. L., & Brenes, M.** (2013). Phenolic inhibitors involved in the natural fermentation of Gemlik cultivar black olives. *European Food Research and Technology*, 236(1), 101-107.
- Kurisu, M., Miyamae, Y., Murakami, K., Han, J., Isoda, H., Irie, K., & Shigemori, H.** (2013). Inhibition of amyloid β aggregation by acteoside, a phenylethanoid glycoside. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 130101.
- Kuوران, T., Kotiaho, T., Pedersen-Bjergaard, S., Einar Rasmussen, K., Leinonen, A., Westwood, S., & Kostiainen, R.** (2003). Feasibility of a liquid-phase microextraction sample clean-up and liquid chromatographic/mass spectrometric screening method for selected anabolic steroid glucuronides in biological samples. *Journal of mass spectrometry*, 38(1), 16-26.
- La Casa, C., Villegas, I., De La Lastra, C. A., Motilva, V., & Calero, M. M.** (2000). Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. *Journal of ethnopharmacology*, 71(1-2), 45-53.
- Laguerre, M., Giraldo, L. J. L., Piombo, G., Figueroa-Espinoza, M. C., Pina, M., Benaissa, M., ... & Villeneuve, P.** (2009). Characterization of olive-leaf phenolics by ESI-MS and evaluation of their antioxidant capacities by the CAT assay. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 86(12), 1215-1225.
- Larussa, T., Oliverio, M., Suraci, E., Greco, M., Placida, R., Gervasi, S., ... & Gulletta, E.** (2017). Oleuropein decreases cyclooxygenase-2 and interleukin-17 expression and attenuates inflammatory damage in colonic samples from ulcerative colitis patients. *Nutrients*, 9(4), 391.
- Lattanzio, V., Lattanzio, V. M., & Cardinali, A.** (2006). Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. *Phytochemistry: Advances in research*, 661(2), 23-67.
- Le Tutour, B., Guedon, D.** (1992). Antioxidative activities of *Olea Europaea* leaves and related phenolic compounds. *Phytochemistry*, 31(4), 1173-1178.
- Lee, H.S., Widmer, B.W.** (1996). Phenolic compounds, in *Handbook of Food Analysis*, Volume 1, L.M.L. Nollet (ed), Marcel Dekker, New York. 821-894.
- Lee, H. J., Wang, C. J., Kuo, H. C., Chou, F. P., Jean, L. F., & Tseng, T. H.** (2005). Induction apoptosis of luteolin in human hepatoma HepG2 cells involving mitochondria translocation of Bax/Bak and activation of JNK. *Toxicology and applied pharmacology*, 203(2), 124-131.

- Lee, J. Y., Woo, E. R., & Kang, K. W.** (2005). Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase expression by acteoside through blocking of AP-1 activation. *Journal of Ethnopharmacology*, *97*(3), 561-566.
- Lee, J. H., Lee, J. Y., Kang, H. S., Jeong, C. H., Moon, H., Whang, W. K., ... & Sim, S. S.** (2006). The effect of acteoside on histamine release and arachidonic acid release in RBL-2H3 mast cells. *Archives of pharmacological research*, *29*(6), 508.
- Lee, K. Y., Jeong, E. J., Lee, H. S., & Kim, Y. C.** (2006). Acteoside of *Callicarpa dichotoma* attenuates scopolamine-induced memory impairments. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, *29*(1), 71-74.
- Lee-Huang, S., Huang, P. L., Zhang, D., Lee, J. W., Bao, J., Sun, Y., ... & Huang, P. L.** (2007). Discovery of small-molecule HIV-1 fusion and integrase inhibitors oleuropein and hydroxytyrosol: Part I. Integrase inhibition. *Biochemical and biophysical research communications*, *354*(4), 872-878.
- Lee, O. H., & Lee, B. Y.** (2010). Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. *Bioresource technology*, *101*(10), 3751-3754.
- Lee, D. H., Kim, Y. J., Kim, M. J., Ahn, J., Ha, T. Y., Lee, S. H., ... & Jung, C. H.** (2016). Pharmacokinetics of tyrosol metabolites in rats. *Molecules*, *21*(1), 128.
- Lee, H., Im, S. W., Jung, C. H., Jang, Y. J., Ha, T. Y., & Ahn, J.** (2016). Tyrosol, an olive oil polyphenol, inhibits ER stress-induced apoptosis in pancreatic β -cell through JNK signaling. *Biochemical and biophysical research communications*, *469*(3), 748-752.
- Lee, B., Shim, I., Lee, H., & Hahm, D. H.** (2018). Oleuropein reduces anxiety-like responses by activating of serotonergic and neuropeptide Y (NPY)-ergic systems in a rat model of post-traumatic stress disorder. *Animal Cells and Systems*, *22*(2), 109-117.
- Lee, K. M., Hur, J., Lee, Y., Yoon, B. R., & Choi, S. Y.** (2018). Protective effects of tyrosol against oxidative damage in L6 muscle cells. *Food Science and Technology Research*, *24*(5), 943-947.
- Lee, B., Shim, I., Lee, H., & Hahm, D. H.** (2018). Effect of oleuropein on cognitive deficits and changes in hippocampal brain-derived neurotrophic factor and cytokine expression in a rat model of post-traumatic stress disorder. *Journal of natural medicines*, *72*(1), 44-56.
- Lemonakis, N., Poudyal, H., Halabalaki, M., Brown, L., Tsarbopoulos, A., Skaltsounis, A. L., & Gikas, E.** (2017). The LC-MS-based metabolomics of hydroxytyrosol administration in rats reveals amelioration of the metabolic syndrome. *Journal of Chromatography B*, *1041*, 45-59.
- Lenoir, L., Rossary, A., Joubert-Zakeyh, J., Vergnaud-Gauduchon, J., Farges, M. C., Fraisse, D., ... & Felgines, C.** (2011). Lemon verbena infusion consumption attenuates oxidative stress in dextran sulfate sodium-induced colitis in the rat. *Digestive diseases and sciences*, *56*(12), 3534-3545.
- Leri, M., Oropesa-Nuñez, R., Canale, C., Raimondi, S., Giorgetti, S., Bruzzone, E., ... & Bucciantini, M.** (2018). Oleuropein aglycone: A polyphenol with different targets against amyloid toxicity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, *1862*(6), 1432-1442.
- Levigne, S., Ralet, M.-C., Que'me'ner, B., Thibault, J.F.** (2004). Isolation of diferulic bridges ester-linked to arabinan in sugar beet cell walls. *Carbohydrate Research*, *339*, 2315-2319.
- Li, Y. M., Han, Z. H., Jiang, S. H., Jiang, Y., Yao, S. D., & Zhu, D. Y.** (2000). Fast repairing of oxidized OH radical adducts of dAMP and dGMP by phenylpropanoid glycosides from *Scrophularia ningpoensis* Hemsl. *Acta Pharmacologica Sinica*, *21*(12), 1125-1128.
- Li, S., Han, Z., Ma, Y., Song, R., Pei, T., Zheng, T., ... & Liu, L.** (2013). Hydroxytyrosol inhibits cholangiocarcinoma tumor growth: An in vivo and in vitro study. *Oncology reports*, *31*(1), 145-152.

- Lim, D. Y., Jeong, Y., Tyner, A. L., & Park, J. H.** (2007). Induction of cell cycle arrest and apoptosis in HT-29 human colon cancer cells by the dietary compound luteolin. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 292(1), G66-G75.
- Lin, Y., Shi, R., Wang, X., & Shen, H. M.** (2008). Luteolin, a flavonoid with potential for cancer prevention and therapy. *Current cancer drug targets*, 8(7), 634-646.
- Lin, J., Gao, L., Huo, S. X., Peng, X. M., Wu, P. P., Cai, L. M., & Yan, M.** (2012). Effect of acteoside on learning and memory impairment induced by scopolamine in mice. *Zhongguo Zhong yao za zhi= Zhongguo zhongyao zazhi= China journal of Chinese materia medica*, 37(19), 2956-2959.
- Liu, J., Yeo, H.C., Overvik-Douki, E., Hagen, T., Doniger, S.J., Chyu, D.W., Brooks, G.A., Ames, B.N.** (2000). Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. *Journal of Applied Physiology*, 89, 21-28.
- Liu, R., Gao, M., Qiang, G. F., Zhang, T. T., Lan, X., Ying, J., & Du, G. H.** (2009). The anti-amnesic effects of luteolin against amyloid β_{25-35} peptide-induced toxicity in mice involve the protection of neurovascular unit. *Neuroscience*, 162(4), 1232-1243.
- Liu, Y., Tian, X., Gou, L., Sun, L., Ling, X., & Yin, X.** (2013). Luteolin attenuates diabetes-associated cognitive decline in rats. *Brain Research Bulletin*, 94, 23-29.
- Liu, Y. N., Jung, J. H., Park, H., & Kim, H.** (2014). Olive leaf extract suppresses messenger RNA expression of proinflammatory cytokines and enhances insulin receptor substrate 1 expression in the rats with streptozotocin and high-fat diet-induced diabetes. *Nutrition research*, 34(5), 450-457.
- Liu, L., Ahn, K. S., Shanmugam, M. K., Wang, H., Shen, H., Arfuso, F., ... & Tang, F. R.** (2019). Oleuropein induces apoptosis via abrogating NF- κ B activation cascade in estrogen receptor-negative breast cancer cells. *Journal of cellular biochemistry*, 120(3), 4504-4513.
- Lockyer, S., Corona, G., Yaqoob, P., Spencer, J. P., & Rowland, I.** (2015). Secoiridoids delivered as olive leaf extract induce acute improvements in human vascular function and reduction of an inflammatory cytokine: a randomised, double-blind, placebo-controlled, cross-over trial. *British Journal of Nutrition*, 114(1), 75-83.
- Lockyer, S., Rowland, I., Spencer, J. P. E., Yaqoob, P., & Stonehouse, W.** (2017). Impact of phenolic-rich olive leaf extract on blood pressure, plasma lipids and inflammatory markers: A randomised controlled trial. *European journal of nutrition*, 56(4), 1421-1432.
- López de Las Hazas, M. C., Pinol, C., Macià, A., & Motilva, M. J.** (2017). Hydroxytyrosol and the colonic metabolites derived from virgin olive oil intake induce cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(31), 6467-6476.
- López-Villodres, J. A., Abdel-Karim, M., De La Cruz, J. P., Rodríguez-Pérez, M. D., Reyes, J. J., Guzmán-Moscoso, R., ... & González-Correa, J. A.** (2016). Effects of hydroxytyrosol on cardiovascular biomarkers in experimental diabetes mellitus. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 37, 94-100.
- Lopez-Huertas, E., & Fonolla, J.** (2017). Hydroxytyrosol supplementation increases vitamin C levels in vivo. A human volunteer trial. *Redox biology*, 11, 384-389.
- 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.
- Lucas, L., Russell, A., & Keast, R.** (2011). Molecular mechanisms of inflammation. Anti-inflammatory benefits of virgin olive oil and the phenolic compound oleocanthal. *Current pharmaceutical design*, 17(8), 754-768.

- Luján, R. J., Capote, F. P., & de Castro, M. D. L.** (2009). Temporal metabolomic analysis of o-glucoside phenolic compounds and their aglycone forms in olive tree and derived materials. *Phytochemical Analysis*, 20(3), 221-230.
- Maalej, A., Forte, M., Bouallagui, Z., Donato, S., Mita, L., Mita, D. G., ... & Sayadi, S.** (2017). Olive compounds attenuate oxidative damage induced in HEK-293 cells via MAPK signaling pathway. *Journal of Functional Foods*, 39, 18-27.
- Maillard, M. N., & Berset, C.** (1995). Evolution of antioxidant activity during kilning: role of insoluble bound phenolic acids of barley and malt. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(7), 1789-1793.
- Machado, D. G., Bettio, L. E., Cunha, M. P., Santos, A. R., Pizzolatti, M. G., Brighente, I. M., & Rodrigues, A. L. S.** (2008). Antidepressant-like effect of rutin isolated from the ethanolic extract from *Schinus molle* L. in mice: evidence for the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems. *European Journal of Pharmacology*, 587(1-3), 163-168.
- Macheix, J.J., Fleuriet, A., Billot, J.** (1990). Fruit phenolics. Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 1-126.
- Malheiro, R., Mendes, P., Fernandes, F., Rodrigues, N., Bento, A., & Pereira, J. A.** (2014). Bioactivity and phenolic composition from natural fermented table olives. *Food & function*, 5(12), 3132-3142.
- Malliou, F., Andreadou, I., Gonzalez, F. J., Lazou, A., Xepapadaki, E., Vallianou, I., ... & Konstandi, M.** (2018). The olive constituent oleuropein, as a PPAR α agonist, markedly reduces serum triglycerides. *The Journal of nutritional biochemistry*, 59, 17-28.
- Malik, N. S., & Bradford, J. M.** (2006). Changes in oleuropein levels during differentiation and development of floral buds in 'Arbequina' olives. *Scientia Horticulturae*, 110(3), 274-278.
- Mann, M., & Wilm, M.** (1995). Electrospray mass spectrometry for protein characterization. *Trends in biochemical sciences*, 20(6), 219-224.
- Manna, C., Migliardi, V., Golino, P., Scognmiglio, A., Galetti, P., Chiariello, M., Zappia, V.** (2004). Oleuropein prevents oxidative myocardial injury by ischemia and reperfusion. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 15, 461-468.
- Manna, C., Galletti, P., Maisto, G., Cucciolla, V., D'Angelo, S., & Zappia, V.** (2000). Transport mechanism and metabolism of olive oil hydroxytyrosol in Caco-2 cells. *FEBS letters*, 470(3), 341-344.
- Manna, C., Migliardi, V., Golino, P., Scognamiglio, A., Galletti, P., Chiariello, M., & Zappia, V.** (2004). Oleuropein prevents oxidative myocardial injury induced by ischemia and reperfusion. *The journal of nutritional biochemistry*, 15(8), 461-466.
- Markham, K.R., Ryan, K.G., Gould, K.S., Rickards, G.K.** (2000). Cell wall sited flavonoids in *Lisianthus* flower petals. *Phytochemistry*, 54, 681-687.
- Markham, K.R., Gould, K.S., Winefield, C.S., Mitchell, K.A., Bloor, S.J., Boase, M.R.** (2000). Anthocyanic vacuolar inclusions – their nature and significance in flower colouration. *Phytochemistry*, 55, 327-336.
- Margheri, F., Menicacci, B., Laurenzana, A., Del Rosso, M., Fibbi, G., Cipolleschi, M. G., ... & Giovannelli, L.** (2019). Oleuropein aglycone attenuates the pro-angiogenic phenotype of senescent fibroblasts: A functional study in endothelial cells. *Journal of Functional Foods*, 53, 219-226.
- Marquina, D., Peres, C., Caldas, F. V., Marques, J. F., Peinado, J. M., & Spencer-Martins, I.** (1992). Characterization of the yeast population in olive brines. *Letters in Applied Microbiology*, 14(6), 279-283.

- Marsilio, V., Campestre, C., & Lanza, B.** (2001). Phenolic compounds change during California-style ripe olive processing. *Food Chemistry*, 74(1), 55-60.
- Martinínez-Domínguez, E., De la Puerta, R., & Ruiz-Gutiérrez, V.** (2001). Protective effects upon experimental inflammation models of a polyphenol-supplemented virgin olive oil diet. *Inflammation research*, 50(2), 102-106.
- Masella, R., Di Benedetto, R., Van, R., Filesi, C., Giovannini, C.** (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione - related enzymes. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 16, 577-586.
- Marsilio, V., Seghetti, L., Iannucci, E., Russi, F., Lanza, B., & Felicioni, M.** (2005). Use of a lactic acid bacteria starter culture during green olive (*Olea europaea* L cv Ascolana tenera) processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(7), 1084-1090.
- Marquet, P. & Lachatre, G.,J.,** (1999). *Chromatogr.B*, 733, 93–118.
- Marzocco, S., Piccinelli, A. L., Rastrelli, L., Mazzon, E., Cuzzocrea, S., & Autore, G.** (2007). Inhibition of inducible nitric oxide synthase in vitro and in vivo by a water-soluble extract of *Wendita calysina* leaves. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 375(6), 349-358.
- Mateos, R., Cert, A., Pérez-Camino, M. C., & García, J. M.** (2004). Evaluation of virgin olive oil bitterness by quantification of secoiridoid derivatives. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 81(1), 71-75.
- Mazza, G. & Miniati, E.** (1993). *Anthocyanins in fruits, vegetables and grains* Boca Raton, FL: CRC Press, pp 64-67.
- McLucky, S.A., Wells, J.M.,** (2001). *Chem.Rev.*, 101, 571-606.
- McMaster, M. C., & HPLC, A.** (2007). *A practical user's guide*. Wiley, Hoboken, New Jersey.
- Medina, E., De Castro, A., Romero, C., & Brenes, M.** (2006). Comparison of the concentrations of phenolic compounds in olive oils and other plant oils: correlation with antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(14), 4954-4961.
- Mei, H., Hsieh, Y., Nardo, C., Xu, X., Wang, S., Ng, K., & Korfmacher, W. A.** (2003). Investigation of matrix effects in bioanalytical high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometric assays: application to drug discovery. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 17(1), 97-103.
- Mehraein, F., Sarbishegi, M., Aslani, A.** (2014). Therapeutic Effects of Oleuropein on Wounded Skin in Young Male Balb/c Mice. *Wounds*, 26, 7.
- Melliou, E., Zweigenbaum, J. A., & Mitchell, A. E.** (2015). Ultrahigh-pressure liquid chromatography triple-quadrupole tandem mass spectrometry quantitation of polyphenols and secoiridoids in California-style black ripe olives and dry salt-cured olives. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(9), 2400-2405.
- Mellou, F., Loutrari, H., Stamatis, H., Roussos, C., & Kolisis, F. N.** (2006). Enzymatic esterification of flavonoids with unsaturated fatty acids: effect of the novel esters on vascular endothelial growth factor release from K562 cells. *Process Biochemistry*, 41(9), 2029-2034.
- Mendes-Junior, L. D. G., Monteiro, M. M. D. O., Carvalho, A. D. S., Queiroz, T. M. D., & Braga, V. D. A.** (2013). Oral supplementation with the rutin improves cardiovascular baroreflex sensitivity and vascular reactivity in hypertensive rats. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 38(11), 1099-1106.
- Miles, E. A., Zoubouli, P., & Calder, P. C.** (2005). Differential anti-inflammatory effects of phenolic compounds from extra virgin olive oil identified in human whole blood cultures. *Nutrition*, 21(3), 389-394.

- Mira, L., Fernandez, M.T., Santos, M., Rocha, R., Florencio, M.H., Jennings, K.R.** (2002). Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free Radical Research*, 36: 1199-1208.
- Miró-Casas, E., Covas, M. I., Fito, M., Farre-Albadalejo, M., Marrugat, J., & De La Torre, R.** (2003). Tyrosol and hydroxytyrosol are absorbed from moderate and sustained doses of virgin olive oil in humans. *European journal of clinical nutrition*, 57(1), 186-190.
- Mitsopoulos, G., Papageorgiou, V., Komaitis, M., & Hagedimitriou, M.** (2016). Total Phenolic Content and Antioxidant Activity in Leaves and Drupes of Ten Olive Varieties. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 44(1), 155–161.
- Moldoveanu, S. C., & David, V.** (2002). *Sample preparation in chromatography*. Elsevier.
- Monasterio, A., Urdaci, M. C., Pinchuk, I. V., Lopez-Moratalla, N., & Martinez-Irujo, J. J.** (2004). Flavonoids induce apoptosis in human leukemia U937 cells through caspase- and caspase-calpain-dependent pathways. *Nutrition and cancer*, 50(1), 90-100.
- Mora, J. F. D. L., Van Berkel, G. J., Enke, C. G., Cole, R. B., Martinez-Sanchez, M., & Fenn, J. B.** (2000). Electrochemical processes in electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 35(8), 939-952.
- Morelló, J. R., Motilva, M. J., Tovar, M. J., & Romero, M. P.** (2004). Changes in commercial virgin olive oil (cv Arbequina) during storage, with special emphasis on the phenolic fraction. *Food Chemistry*, 85(3), 357-364.
- Moreno-González, R., Juan, M. E., & Planas, J. M.** (2020). Table olive polyphenols: A simultaneous determination by liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1609, 460434.
- Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Domínguez, J. M., Sineiro, J., Domínguez, H., ... & Parajó, J. C.** (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food chemistry*, 72(2), 145-171.
- Muñoz, E., Avila, J. G., Alarcón, J., Kubo, I., Werner, E., & Céspedes, C. L.** (2013). Tyrosinase inhibitors from *Calceolaria integrifolia* sl: *Calceolaria talcana* aerial parts. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(18), 4336-4343.
- Murotomi, K., Umeno, A., Yasunaga, M., Shichiri, M., Ishida, N., Koike, T., ... & Nakajima, Y.** (2015). Oleuropein-rich diet attenuates hyperglycemia and impaired glucose tolerance in type 2 diabetes model mouse. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(30), 6715-6722.
- Mylonaki, S., Kiassos, E., Makris, D. P., & Kefalas, P.** (2008). Optimisation of the extraction of olive (*Olea europaea*) leaf phenolics using water/ethanol-based solvent systems and response surface methodology. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392(5), 977.
- Nassiri-Asl, M., Mortazavi, S. R., Samiee-Rad, F., Zangivand, A. A., Safdari, F., Saroukhani, S., & Abbasi, E.** (2010). The effects of rutin on the development of pentylenetetrazole kindling and memory retrieval in rats. *Epilepsy & Behavior*, 18(1-2), 50-53.
- Natella, F., Nardini, M., di Felice, M., Scaccini, C.,** (1999). Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants: structure-activity relation. *Journal of Agriculture & Food Chemistry*, 47, 1453-1459.
- Neill, S., Gould, K.S.,** (1999). Optical properties of leaves in relation to anthocyanin concentration and distribution. *Canadian Journal of Botany*, 77, 1777–1782.
- Niaounakis, M., & Halvadakis, C. P.** (2006). *Olive processing waste management: literature review and patent survey*. Elsevier.

- Nieoczym, D., Socała, K., Raszewski, G., & Wlaź, P.** (2014). Effect of quercetin and rutin in some acute seizure models in mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *54*, 50-58.
- Nones, J., Costa, A. P., Leal, R. B., Gomes, F. C. A., & Trentin, A. G.** (2012). The flavonoids hesperidin and rutin promote neural crest cell survival. *Cell and tissue research*, *350*(2), 305-315.
- Nychas, G. J., Panagou, E. Z., Parker, M. L., Waldron, K. W., & Tassou, C. C.** (2002). Microbial colonization of naturally black olives during fermentation and associated biochemical activities in the cover brine. *Letters in Applied Microbiology*, *34*(3), 173-177.
- Obied, H. K., Bedgood Jr, D. R., Prenzler, P. D., & Robards, K.** (2007). Bioscreening of Australian olive mill waste extracts: biophenol content, antioxidant, antimicrobial and molluscicidal activities. *Food and Chemical Toxicology*, *45*(7), 1238-1248.
- Obied, H. K., Bedgood Jr, D. R., Prenzler, P. D., & Robards, K.** (2007). Chemical screening of olive biophenol extracts by hyphenated liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, *603*(2), 176-189.
- Obied, H. K., Bedgood Jr, D. R., Prenzler, P. D., & Robards, K.** (2007). Chemical screening of olive biophenol extracts by hyphenated liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, *603*(2), 176-189.
- Oi-Kano, Y., Iwasaki, Y., Nakamura, T., Watanabe, T., Goto, T., Kawada, T., ... & Iwai, K.** (2017). Oleuropein aglycone enhances UCP1 expression in brown adipose tissue in high-fat-diet-induced obese rats by activating β -adrenergic signaling. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *40*, 209-218.
- Ong, E. S.** (2004). Extraction methods and chemical standardization of botanicals and herbal preparations. *Journal of Chromatography B*, *812*(1-2), 23-33.
- Orsini, F., Ami, D., Lascialfari, A., & Natalello, A.** (2018). Inhibition of lysozyme fibrillogenesis by hydroxytyrosol and dopamine: An Atomic Force Microscopy study. *International journal of biological macromolecules*, *111*, 1100-1105.
- Owen, C. A., Bitá, E. C., Banilas, G., Hajjar, S. E., Sellianakis, V., Aksoy, U., ... & Hatzopoulos, P.** (2005). AFLP reveals structural details of genetic diversity within cultivated olive germplasm from the Eastern Mediterranean. *Theoretical and Applied Genetics*, *110*(7), 1169-1176.
- Paiva-Martins, F., Barbosa, S., Silva, M., Monteiro, D., Pinheiro, V., Mourão, J. L., ... & Santos-Silva, A.** (2014). The effect of olive leaf supplementation on the constituents of blood and oxidative stability of red blood cells. *Journal of functional foods*, *9*, 271-279.
- Palazzi, L., Bruzzone, E., Bisello, G., Leri, M., Stefani, M., Bucciantini, M., & de Laureto, P. P.** (2018). Oleuropein aglycone stabilizes the monomeric α -synuclein and favours the growth of non-toxic aggregates. *Scientific reports*, *8*(1), 1-17.
- Panagou, E. Z.** (2006). Greek dry-salted olives: Monitoring the dry-salting process and subsequent physico-chemical and microbiological profile during storage under different packing conditions at 4 and 20 C. *LWT-Food Science and Technology*, *39*(4), 323-330.
- Pandurangan, A. K., Ananda Sadagopan, S. K., Dharmalingam, P., & Ganapasam, S.** (2014). Luteolin, a bioflavonoid inhibits Azoxymethane-induced colorectal cancer through activation of Nrf2 signaling. *Toxicology mechanisms and methods*, *24*(1), 13-20.
- Papadopoulos, G., Boskou, D.,** (1999). Antioxidant effect of natural phenols on olive oil. *JAOCS*, *68*, 669-671.
- Papoutsis, Z., Kassi, E., Mitakou, S., Aligiannis, N., Tsiapara, A., Chrousos, G. P., & Moutsatsou, P.** (2006). Acteoside and martynoside exhibit estrogenic/antiestrogenic properties. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *98*(1), 63-71.

- Parkinson, L., & Cicerale, S.** (2016). The health benefiting mechanisms of virgin olive oil phenolic compounds. *Molecules*, *21*(12), 1734.
- Pastor, A., Rodríguez-Morató, J., Olesti, E., Pujadas, M., Pérez-Mañá, C., Khymenets, O., ... & Farré, M.** (2016). Analysis of free hydroxytyrosol in human plasma following the administration of olive oil. *Journal of Chromatography a*, *1437*, 183-190.
- Pastore, S., Potapovich, A., Kostyuk, V., Mariani, V., Lulli, D., De Luca, C., & Korkina, L.** (2009). Plant Polyphenols Effectively Protect HaCaT Cells from Ultraviolet C–Triggered Necrosis and Suppress Inflammatory Chemokine Expression. *Natural Compounds and Their Role in Apoptotic Cell Signaling Pathways*, Volume 1171, 29, 305.
- Pastore, S., Lulli, D., Fidanza, P., Potapovich, A. I., Kostyuk, V. A., De Luca, C., ... & Korkina, L. G.** (2012). Plant polyphenols regulate chemokine expression and tissue repair in human keratinocytes through interaction with cytoplasmic and nuclear components of epidermal growth factor receptor system. *Antioxidants & redox signaling*, *16*(4), 314-328.
- Patil, S. P., Jain, P. D., Sancheti, J. S., Ghumatkar, P. J., Tambe, R., & Sathaye, S.** (2014). Neuroprotective and neurotrophic effects of Apigenin and Luteolin in MPTP induced parkinsonism in mice. *Neuropharmacology*, *86*, 192-202.
- Percival, M.**, (1998). Antioxidants. *Clinical Nutrition Insight*, *31*, 1-4.
- Pereira, J. A., Pereira, A. P., Ferreira, I. C., Valentão, P., Andrade, P. B., Seabra, R., ... & Bento, A.** (2006). Table olives from Portugal: phenolic compounds, antioxidant potential, and antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(22), 8425-8431.
- Pereira, A. P., Ferreira, I. C., Marcelino, F., Valentão, P., Andrade, P. B., Seabra, R., ... & Pereira, J. A.** (2007). Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves. *Molecules*, *12*(5), 1153-1162.
- Perona, J. S., Cabello-Moruno, R., & Ruiz-Gutierrez, V.** (2006). The role of virgin olive oil components in the modulation of endothelial function. *The Journal of nutritional biochemistry*, *17*(7), 429-445.
- Peters, N. K., Frost, J. W., & Long, S. R.** (1986). A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Science*, *233*(4767), 977-980.
- Picerno, P., Autore, G., Marzocco, S., Meloni, M., Sanogo, R., & Aquino, R. P.** (2005). Anti-inflammatory activity of verminoside from *kigelia africana* and evaluation of cutaneous irritation in cell cultures and reconstituted human epidermis. *Journal of natural products*, *68*(11), 1610-1614.
- Piroddi, M., Albini, A., Fabiani, R., Giovannelli, L., Luceri, C., Natella, F., ... & Galli, F.** (2017). Nutrigenomics of extra-virgin olive oil: A review. *Biofactors*, *43*(1), 17-41.
- Pirozzi, C., Lama, A., Simeoli, R., Paciello, O., Pagano, T. B., Mollica, M. P., ... & Raso, G. M.** (2016). Hydroxytyrosol prevents metabolic impairment reducing hepatic inflammation and restoring duodenal integrity in a rat model of NAFLD. *The Journal of nutritional biochemistry*, *30*, 108-115.
- Plotnikov, M. B., Aliev, O. I., Sidekhmenova, A. V., Shamanaev, A. Y., Anishchenko, A. M., Fomina, T. I., ... & Arkhipov, A. M.** (2018). Effect of p-tyrosol on hemorheological parameters and cerebral capillary network in young spontaneously hypertensive rats. *Microvascular research*, *119*, 91-97.
- Prince, P. S. M., & Kamalakkannan, N.** (2006). Rutin improves glucose homeostasis in streptozotocin diabetic tissues by altering glycolytic and gluconeogenic enzymes. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, *20*(2), 96-102.

- Priore, P., Gnoni, A., Natali, F., Testini, M., Gnoni, G. V., Siculella, L., & Damiano, F.** (2017). Oleic acid and hydroxytyrosol inhibit cholesterol and fatty acid synthesis in C6 glioma cells. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017.
- Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M.** (2001). *Antioxidants in Food: Practical Applications*, Woodhead Publishing Limited.
- Porcu, C., Sideri, S., Martini, M., Cocomazzi, A., Galli, A., Tarantino, G., & Balsano, C.** (2018). Oleuropein induces AMPK-Dependent autophagy in NAFLD mice, regardless of the gender. *International journal of molecular sciences*, 19(12), 3948.
- Potapovich, A. I., Lulli, D., Fidanza, P., Kostyuk, V. A., De Luca, C., Pastore, S., & Korkina, L. G.** (2011). Plant polyphenols differentially modulate inflammatory responses of human keratinocytes by interfering with activation of transcription factors NF κ B and AhR and EGFR–ERK pathway. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 255(2), 138-149.
- Potapovich, A. I., Kostyuk, V. A., Kostyuk, T. V., de Luca, C., & Korkina, L. G.** (2013). Effects of pre- and post-treatment with plant polyphenols on human keratinocyte responses to solar UV. *Inflammation Research*, 62(8), 773-780.
- Potočnjak, I., Škoda, M., Pernjak-Pugel, E., Peršić, M. P., & Domitrović, R.** (2016). Oral administration of oleuropein attenuates cisplatin-induced acute renal injury in mice through inhibition of ERK signaling. *Molecular nutrition & food research*, 60(3), 530-541.
- Poudyal, H., Campbell, F., & Brown, L.** (2010). Olive leaf extract attenuates cardiac, hepatic, and metabolic changes in high carbohydrate–, high fat–fed rats. *The journal of nutrition*, 140(5), 946-953.
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K.** (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(10), 4290-4302.
- Pu, X., Song, Z., Li, Y., Tu, P., & Li, H.** (2003). Acteoside from Cistanche salsa inhibits apoptosis by 1-methyl-4-phenylpyridinium ion in cerebellar granule neurons. *Planta medica*, 69(01), 65-66.
- Pu, F., Mishima, K., Irie, K., Motohashi, K., Tanaka, Y., Orito, K., ... & Fujiwara, M.** (2007). Neuroprotective effects of quercetin and rutin on spatial memory impairment in an 8-arm radial maze task and neuronal death induced by repeated cerebral ischemia in rats. *Journal of pharmacological sciences*, 0707310004-0707310004.
- Puel, C., Mathey, J., Agalias, A., Kati-Coulibaly, S., Mardon, J., Obled, C., ... & Coxam, V.** (2006). Dose–response study of effect of oleuropein, an olive oil polyphenol, in an ovariectomy/inflammation experimental model of bone loss in the rat. *Clinical Nutrition*, 25(5), 859-868.
- Puel, C., Mardon, J., Agalias, A., Davicco, M. J., Lebecque, P., Mazur, A., ... & Coxam, V.** (2008). Major phenolic compounds in olive oil modulate bone loss in an ovariectomy/inflammation experimental model. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(20), 9417-9422.
- Qiao, H., Zhang, X., Zhu, C., Dong, L., Wang, L., Zhang, X., ... & Cao, X.** (2012). Luteolin downregulates TLR4, TLR5, NF- κ B and p-p38MAPK expression, upregulates the p-ERK expression, and protects rat brains against focal ischemia. *Brain research*, 1448, 71-81.
- Quirantes-Piné, R., Herranz-López, M., Funes, L., Borrás-Linares, I., Micol, V., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A.** (2013). Phenylpropanoids and their metabolites are the major compounds responsible for blood-cell protection against oxidative stress after administration of Lippia citriodora in rats. *Phytomedicine*, 20(12), 1112-1118.

- Rabiei, Z., Jahanbazi, S., Alibabaei, Z., & Rafieian-Kopaei, M.** (2018). Antidepressant effects of oleuropein in male mice by forced swim test and tail suspension test. *World Family Medicine Journal: Incorporating the Middle East Journal of Family Medicine*, 99(5804), 1-13.
- Ratty, A. K., & Das, N. P.** (1988). Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: structure-activity relationship. *Biochemical medicine and metabolic biology*, 39(1), 69-79.
- Reboredo-Rodríguez, P., Varela-López, A., Forbes-Hernández, T. Y., Gasparrini, M., Afrin, S., Cianciosi, D., ... & Battino, M.** (2018). Phenolic compounds isolated from olive oil as nutraceutical tools for the prevention and management of cancer and cardiovascular diseases. *International journal of molecular sciences*, 19(8), 2305.
- Reyes, J. J., Villanueva, B., López-Villodres, J. A., De La Cruz, J. P., Romero, L., Rodríguez-Pérez, M. D., ... & González-Correa, J. A.** (2017). Neuroprotective effect of hydroxytyrosol in experimental diabetes mellitus. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(22), 4378-4383.
- Rice-Evans, C., & Miller, N. J.** (1995). Antioxidants—the case for fruit and vegetables in the diet. *British food journal*.
- 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.
- Rice-Evans, CA, Miller, N.J., Pananga, G.** (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2: 152-159.
- Richetti, S. K., Blank, M., Capiotti, K. M., Piatto, A. L., Bogo, M. R., Vianna, M. R., & Bonan, C. D.** (2011). Quercetin and rutin prevent scopolamine-induced memory impairment in zebrafish. *Behavioural Brain Research*, 217(1), 10-15.
- Rietjens, S. J., Bast, A., & Haenen, G. R.** (2007). New insights into controversies on the antioxidant potential of the olive oil antioxidant hydroxytyrosol. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(18), 7609-7614.
- Rigacci, S., & Stefani, M.** (2016). Nutraceutical properties of olive oil polyphenols. An itinerary from cultured cells through animal models to humans. *International journal of molecular sciences*, 17(6), 843.
- Riley, R.G. & Kolattukudy, P.E.** (1975). Evidence for covalently attached p-coumaric acid and ferulic acid in cutins and suberins. *Plant Physiology*, 56, 650–654.
- Robbins, R.J.** (2003). Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 2866-2887.
- Roberfroid, M. & Calderon, P.** (1995). Free Radicals and Oxidation: Phenomena in Biological Systems. Marcel Dekker, New York.
- Robles-Almazan, M., Pulido-Moran, M., Moreno-Fernandez, J., Ramirez-Tortosa, C., Rodriguez-Garcia, C., Quiles, J. L., & Ramirez-Tortosa, M.** (2018). Hydroxytyrosol: Bioavailability, toxicity, and clinical applications. *Food Research International*, 105, 654-667.
- Rodríguez-Morató, J., Xicota, L., Fitó, M., Farre, M., Dierssen, M., & De la Torre, R.** (2015). Potential role of olive oil phenolic compounds in the prevention of neurodegenerative diseases. *Molecules*, 20(3), 4655-4680.
- Rodríguez-Morató, J., Boronat, A., Kotronoulas, A., Pujadas, M., Pastor, A., Olesti, E., ... & de la Torre, R.** (2016). Metabolic disposition and biological significance of simple phenols of dietary origin: hydroxytyrosol and tyrosol. *Drug metabolism reviews*, 48(2), 218-236.

- Romani, A., Mulinacci, N., Pinelli, P., Vincieri, F. F., Cimato, A.** (1999). Polyphenolic content in five Tuscany cultivars of *Olea europaea* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 964–967.
- Romero, C., Brenes, M., Garcia, P., Garrido, A.** (2002). Hydroxytyrosol 4- β -D- glucoside, an important phenolic compound in olive fruits and derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3835-3839.
- Romero, C., Medina, E., Mateo, M. A., & Brenes, M.** (2017). Quantification of bioactive compounds in Picual and Arbequina olive leaves and fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(6), 1725-1732.
- Rosignoli, P., Fuccelli, R., Sepporta, M. V., & Fabiani, R.** (2016). In vitro chemo-preventive activities of hydroxytyrosol: The main phenolic compound present in extra-virgin olive oil. *Food & function*, 7(1), 301-307.
- Ruiz-Barba, J. L., & Jimenez-Diaz, R.** (1995). Availability of essential B-group vitamins to *Lactobacillus plantarum* in green olive fermentation brines. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(4), 1294-1297.
- Ruzzolini, J., Peppicelli, S., Andreucci, E., Bianchini, F., Scardigli, A., Romani, A., ... & Calorini, L.** (2018). Oleuropein, the main polyphenol of *Olea europaea* leaf extract, has an anti-cancer effect on human BRAF melanoma cells and potentiates the cytotoxicity of current chemotherapies. *Nutrients*, 10(12), 1950.
- Ryan, D. & Robards, K.** (1998). Phenolic compounds in olives. *Analyst*, 123, 31–44.
- Ryan, D., Robards, K., Prenzler, P., Jardine, D., Herlt, T., & Antolovich, M.** (1999). Liquid chromatography with electrospray ionisation mass spectrometric detection of phenolic compounds from *Olea europaea*. *Journal of chromatography A*, 855(2), 529-537.
- Ryan, D., Robards, K., & Lavee, S.** (1999). Changes in phenolic content of olive during maturation. *International journal of food science & technology*, 34(3), 265-274.
- Ryan, D., Antolovich, M., Herlt, T., Prenzler, P.D., Lavee, S., Robards, K.** (2002). Identification of phenolic compounds in tissues of the novel olive cultivar Hardy's Mammoth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 6716–6724.
- Ryan, D., Prenzler, P. D., Lavee, S., Antolovich, M., & Robards, K.** (2003). Quantitative changes in phenolic content during physiological development of the olive (*Olea europaea*) cultivar Hardy's Mammoth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(9), 2532-2538.
- Saffari, Y., Sadrzadeh, S.M.** (2004). Green tea metabolite EGCG protects membranes against oxidative damage in vitro. *Life Sciences*, 74 (12), 1513-1518.
- Sahan, Y., Cansey, A., & Gulen, H.** (2013). Effect of processing techniques on antioxidative enzyme activities, antioxidant capacity, phenolic compounds, and fatty acids of table olives. *Food Science and Biotechnology*, 22(3), 613-620.
- Salta, F. N., Mylona, A., Chiou, A., Boskou, G., & Andrikopoulos, N. K.** (2007). Oxidative stability of edible vegetable oils enriched in polyphenols with olive leaf extract. *Food Science and Technology International*, 13(6), 413-421.
- Santiago-Mora, R., Casado-Díaz, A., De Castro, M. D., & Quesada-Gómez, J. M.** (2011). Oleuropein enhances osteoblastogenesis and inhibits adipogenesis: the effect on differentiation in stem cells derived from bone marrow. *Osteoporosis international*, 22(2), 675-684.
- Salucci, S., Burattini, S., Battistelli, M., Buontempo, F., Canonico, B., Martelli, A. M., ... & Falcieri, E.** (2015). Tyrosol prevents apoptosis in irradiated keratinocytes. *Journal of dermatological science*, 80(1), 61-68.

- Samuel, S. M., Thirunavukkarasu, M., Penumathsa, S. V., Paul, D., & Maulik, N.** (2008). Akt/FOXO3a/SIRT1-mediated cardioprotection by n-tyrosol against ischemic stress in rat in vivo model of myocardial infarction: switching gears toward survival and longevity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(20), 9692-9698.
- Sarna, L. K., Sid, V., Wang, P., Siow, Y. L., House, J. D., & Karmin, O.** (2016). Tyrosol attenuates high fat diet-induced hepatic oxidative stress: Potential involvement of cystathionine β -synthase and cystathionine γ -lyase. *Lipids*, 51(5), 583-590.
- Samy, R. P., Gopalakrishnakone, P., & Ignacimuthu, S.** (2006). Anti-tumor promoting potential of luteolin against 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene-induced mammary tumors in rats. *Chemico-biological interactions*, 164(1-2), 1-14.
- Scalbert, A. & Williamson, G.** (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of nutrition*, 130: 2073-2085.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L.** (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical reviews in food science and nutrition*, 45(4), 287-306.
- Schaffer, S., Müller, W. E., & Eckert, G. P.** (2010). Cytoprotective effects of olive mill wastewater extract and its main constituent hydroxytyrosol in PC12 cells. *Pharmacological research*, 62(4), 322-327.
- Schaffer, S., Asseburg, H., Kuntz, S., Muller, W. E., & Eckert, G. P.** (2012). Effects of polyphenols on brain ageing and Alzheimer's disease: focus on mitochondria. *Molecular neurobiology*, 46(1), 161-178.
- Schlauer, J., Budzianowski, J., Kukulczanka, K., & Ratajczak, L.** (2004). Acteoside and related phenylethanoid glycosides in *Byblis liniflora* Salisb. plants propagated in vitro and its systematic significance. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 73(1).
- Schuller, S., Le Garrères, A., Remy, I., & Peeters, D.** (2011). Idiopathic chylothorax and lymphedema in 2 whippet littermates. *The Canadian Veterinary Journal*, 52(11), 1243.
- Schwedhelm, E., Maas, R., Troost, R., & Böger, R. H.** (2003). Clinical pharmacokinetics of antioxidants and their impact on systemic oxidative stress. *Clinical pharmacokinetics*, 42(5), 437-459.
- Scoditti, E., Nestola, A., Massaro, M., Calabriso, N., Storelli, C., De Caterina, R., & Carluccio, M. A.** (2014). Hydroxytyrosol suppresses MMP-9 and COX-2 activity and expression in activated human monocytes via PKC α and PKC β 1 inhibition. *Atherosclerosis*, 232(1), 17-24.
- Scott, I.M., Dat, J.F., Lopez-Delgado, H., Foyer, C.H.** (1999). Salicylic acid and hydrogen peroxide in abiotic stress signalling in plants. *Plant Physiology*, 39, 13– 17.
- Segura-Carretero, A., Carrasco-Pancorbo, A., Bendini, A., Cerretani, L., & Fernández-Gutiérrez, A.** (2010). Analytical determination of polyphenols in olive oil. In *Olives and olive oil in health and disease prevention* (pp. 509-523). Academic Press.
- Seigler, D.S.** (1998). *Plant secondary metabolism*, Kluwer Academic Publishers: Norwell.
- Selli, S., Kelebek, H., Kesen, S., & Sonmezdag, A. S.** (2018). GC-MS olfactometric and LC-DAD-ESI-MS/MS characterization of key odorants and phenolic compounds in black dry-salted olives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(11), 4104-4111.
- Selvendiran, K., Koga, H., Ueno, T., Yoshida, T., Maeyama, M., Torimura, T., ... & Sata, M.** (2006). Luteolin promotes degradation in signal transducer and activator of transcription 3 in human hepatoma cells: an implication for the antitumor potential of flavonoids. *Cancer research*, 66(9), 4826-4834.

- Serra, A., Rubió, L., Borràs, X., Macià, A., Romero, M. P., & Motilva, M. J.** (2012). Distribution of olive oil phenolic compounds in rat tissues after administration of a phenolic extract from olive cake. *Molecular nutrition & food research*, 56(3), 486-496.
- Servili, M., Selvaggini, R., Esposito, S., Taticchi, A., Montedoro, G., & Morozzi, G.** (2004). Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *Journal of Chromatography A*, 1054(1-2), 113-127.
- Sepporta, M. V., Fuccelli, R., Rosignoli, P., Ricci, G., Servili, M., Morozzi, G., & Fabiani, R.** (2014). Oleuropein inhibits tumour growth and metastases dissemination in ovariectomised nude mice with MCF-7 human breast tumour xenografts. *Journal of functional foods*, 8, 269-273.
- Serrelli, G., & Deiana, M.** (2018). Biological relevance of extra virgin olive oil polyphenols metabolites. *Antioxidants*, 7(12), 170.
- Seo, E. S., Oh, B. K., Pak, J. H., Yim, S. H., Gurunathan, S., Kim, Y. P., & Lee, K. J.** (2013). Acteoside improves survival in cecal ligation and puncture-induced septic mice via blocking of high mobility group box 1 release. *Molecules and cells*, 35(4), 348-354.
- Sgarbossa, A., Dal Bosco, M., Pressi, G., Cuzzocrea, S., Dal Toso, R., & Menegazzi, M.** (2012). Phenylpropanoid glycosides from plant cell cultures induce heme oxygenase 1 gene expression in a human keratinocyte cell line by affecting the balance of NRF2 and BACH1 transcription factors. *Chemico-biological interactions*, 199(2), 87-95.
- Shahidi, F. & Wanasundara, J.** (1992). Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32, 67-103.
- Shahidi, F.**, (2000). Antioxidants in food and food antioxidants. *Die nahrung*, 44(3): 158-163.
- Shamshoum, H., Vlavcheski, F., & Tsiani, E.** (2017). Anticancer effects of oleuropein. *Biofactors*, 43(4), 517-528.
- Shaulian, E., Karin, M.**, (2001). AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene*, 20:2390–400.
- Sherif, I. O., & Al-Gayyar, M. M.** (2018). Oleuropein potentiates anti-tumor activity of cisplatin against HepG2 through affecting proNGF/NGF balance. *Life sciences*, 198, 87-93.
- Shi, C., Chen, X., Liu, Z., Meng, R., Zhao, X., Liu, Z., & Guo, N.** (2017). Oleuropein protects L-02 cells against H₂O₂-induced oxidative stress by increasing SOD1, GPx1 and CAT expression. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 85, 740-748.
- Shi, J., Wu, G., Zou, X., & Jiang, K.** (2017). Oleuropein protects intracerebral hemorrhage-induced disruption of blood-brain barrier through alleviation of oxidative stress. *Pharmacological Reports*, 69(6), 1206-1212.
- Siliani, S., Mattei, A., Innocenti, L. B., & Zanoni, B.** (2006). Bitter taste and phenolic compounds in extra virgin olive oil: an empirical relationship. *Journal of food quality*, 29(4), 431-441.
- Silva, S., Gomes, L., Leitao, F., Coelho, A. V., & Boas, L. V.** (2006). Phenolic compounds and antioxidant activity of *Olea europaea* L. fruits and leaves. *Food Science and Technology International*, 12(5), 385-395.
- Simić, A., Manojlović, D., Šegan, D., & Todorović, M.** (2007). Electrochemical behavior and antioxidant and prooxidant activity of natural phenolics. *Molecules*, 12(10), 2327-2340.
- Simsek, T., Erbas, M., Buyuk, B., Pala, C., Sahin, H., & Altinisik, B.** (2018). Prevention of rocuronium induced mast cell activation with prophylactic oleuropein rich diet in anesthetized rabbits. *Acta Cirurgica Brasileira*, 33(11), 954-963.

- Sivakumar, G., Bati, C. B., & Uccella, N.** (2005). HPLC-MS screening of the antioxidant profile of Italian olive cultivars. *Chemistry of Natural Compounds*, 41(5), 588-591.
- Siuzdak, G.**, (1996). *Mass Spectrometry for Biotechnology*, Academic Press, New York.
- Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R.** (2017). *Principles of instrumental analysis*. Cengage learning.
- Sofa, A., Dichio, B., Xiloyannis, C., & Masia, A.** (2005). Antioxidant defences in olive trees during drought stress: changes in activity of some antioxidant enzymes. *Functional Plant Biology*, 32(1), 45-53.
- Sogawa, K., Kobayashi, M., Suzuki, J., Sanda, A., Kodera, Y., & Fukuyama, M.** (2018). Inhibitory Activity of Hydroxytyrosol against Streptolysin O-Induced Hemolysis. *Biocontrol Science*, 23(2), 77-80.
- Soler-Rivas, C., Espin, J.C., Wichers, H.J.** (2000). Oleuropein and related compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 1013-1023.
- Son, Y. O., Lee, S. A., Kim, S. S., Jang, Y. S., Chun, J. C., & Lee, J. C.** (2011). Acteoside inhibits melanogenesis in B16F10 cells through ERK activation and tyrosinase down-regulation. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 63(10), 1309-1319.
- Song, H. S., Choi, M. Y., Ko, M. S., Jeong, J. M., Kim, Y. H., Jang, B. H., ... & Sim, S. S.** (2012). Competitive inhibition of cytosolic Ca²⁺-dependent phospholipase A 2 by acteoside in RBL-2H3 cells. *Archives of pharmacal research*, 35(5), 905-910.
- Soto-Alarcon, S. A., Valenzuela, R., Valenzuela, A., & Videla, L. A.** (2018). Liver protective effects of extra virgin olive oil: Interaction between its chemical composition and the cell-signaling pathways involved in protection. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders)*, 18(1), 75-84.
- Srinivasan, K., Kaul, C. L., & Ramarao, P.** (2005). Partial protective effect of rutin on multiple low dose streptozotocin-induced diabetes in mice. *Indian journal of pharmacology*, 37(5), 327.
- Stefanon, B., & Colitti, M.** (2016). Hydroxytyrosol, an ingredient of olive oil, reduces triglyceride accumulation and promotes lipolysis in human primary visceral adipocytes during differentiation. *Experimental Biology and Medicine*, 241(16), 1796-1802.
- Steyn, W.J., Wand, S.J.E., Holcroft, D.M., Jacobs, G.** (2002). Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection. *New Phytologist*, 155, 349–361.
- Strack, D.** (1997). *Phenolic metabolism*. In: *Plant Biochemistry*, Eds Dey, P.M., Harborne, J.B. Academic Press, London, pp. 387-416.
- St-Laurent-Thibault, C., Arseneault, M., Longpre, F., & Ramassamy, C.** (2011). Tyrosol and hydroxytyrosol two main components of olive oil, protect N2a cells against amyloid-β-induced toxicity. involvement of the NF-κB signaling. *Current Alzheimer Research*, 8(5), 543-551.
- Sudjana, A. N., D’Orazio, C., Ryan, V., Rasool, N., Ng, J., Islam, N., ... & Hammer, K. A.** (2009). Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. *International journal of antimicrobial agents*, 33(5), 461-463.
- Suribabu, R., Pindiprolu, S. S., Talluri, S. V., Chintamaneni, P., & Samidala, N.** (2017). Protective effects of hydroxytyrosol from diabetic peripheral neuropathy in rodents: implications of antioxidant and anti-inflammatory effects. *Lat. Amer. J. Pharm*, 36, 373-379.
- Sun, L., Luo, C., & Liu, J.** (2014). Hydroxytyrosol induces apoptosis in human colon cancer cells through ROS generation. *Food & function*, 5(8), 1909-1914.

- Sun, W., Wang, X., Hou, C., Yang, L., Li, H., Guo, J., ... & Kang, Y.** (2017). Oleuropein improves mitochondrial function to attenuate oxidative stress by activating the Nrf2 pathway in the hypothalamic paraventricular nucleus of spontaneously hypertensive rats. *Neuropharmacology*, *113*, 556-566.
- Susalit, E., Agus, N., Effendi, I., Tjandrawinata, R. R., Nofiarny, D., Perrinjaquet-Moccetti, T., & Verbruggen, M.** (2011). Olive (*Olea europaea*) leaf extract effective in patients with stage-1 hypertension: comparison with Captopril. *Phytomedicine*, *18*(4), 251-258.
- Svobodova, M., Andreadou, I., Skaltsounis, A. L., Kopecky, J., & Flachs, P.** (2014). Oleuropein as an inhibitor of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Genes & nutrition*, *9*(1), 1-8.
- Schwingshackl, L., & Hoffmann, G.** (2015). Adherence to Mediterranean diet and risk of cancer: an updated systematic review and meta-analysis of observational studies. *Cancer medicine*, *4*(12), 1933-1947.
- Taliou, A., Zintzaras, E., Lykouras, L., & Francis, K.** (2013). An open-label pilot study of a formulation containing the anti-inflammatory flavonoid luteolin and its effects on behavior in children with autism spectrum disorders. *Clinical therapeutics*, *35*(5), 592-602.
- Taskova, R. M., Gotfredsen, C. H., & Jensen, S. R.** (2005). Chemotaxonomic markers in Digitalideae (Plantaginaceae). *Phytochemistry*, *66*(12), 1440-1447.
- Terzuoli, E., Giachetti, A., Ziche, M., & Donnini, S.** (2016). Hydroxytyrosol, a product from olive oil, reduces colon cancer growth by enhancing epidermal growth factor receptor degradation. *Molecular nutrition & food research*, *60*(3), 519-529.
- Theoharides, T. C., Stewart, J. M., & Hatziagelaki, E.** (2015). Brain “fog,” inflammation and obesity: key aspects of neuropsychiatric disorders improved by luteolin. *Frontiers in neuroscience*, *9*, 225.
- Tome-Carneiro, J., & Visioli, F.** (2016). Polyphenol-based nutraceuticals for the prevention and treatment of cardiovascular disease: Review of human evidence. *Phytomedicine*, *23*(11), 1145-1174.
- Tomé-Carneiro, J., Crespo, M. C., Iglesias-Gutierrez, E., Martín, R., Gil-Zamorano, J., Tomas-Zapico, C., ... & Herrera, E.** (2016). Hydroxytyrosol supplementation modulates the expression of miRNAs in rodents and in humans. *The Journal of nutritional biochemistry*, *34*, 146-155.
- Tongjaroenbuangam, W., Ruksee, N., Chantiratikul, P., Pakdeenarong, N., Kongbuntad, W., & Govitrapong, P.** (2011). Neuroprotective effects of quercetin, rutin and okra (*Abelmoschus esculentus* Linn.) in dexamethasone-treated mice. *Neurochemistry international*, *59*(5), 677-685.
- Toteda, G., Lupinacci, S., Vizza, D., Bonofiglio, R., Perri, E., Bonofiglio, M., ... & Cifarelli, R. A.** (2017). High doses of hydroxytyrosol induce apoptosis in papillary and follicular thyroid cancer cells. *Journal of endocrinological investigation*, *40*(2), 153-162.
- Trumbeckaite, S., Bernatoniene, J., Majiene, D., Jakštas, V., Savickas, A., & Toleikis, A.** (2006). The effect of flavonoids on rat heart mitochondrial function. *Biomedicine & pharmacotherapy*, *60*(5), 245-248.
- Tuck, K. L., Hayball, P. J., & Stupans, I.** (2002). Structural characterization of the metabolites of hydroxytyrosol, the principal phenolic component in olive oil, in rats. *Journal of agricultural and food chemistry*, *50*(8), 2404-2409.
- Tutino, V., Caruso, M. G., Messa, C., Perri, E., & Notarnicola, M.** (2012). Antiproliferative, antioxidant and anti-inflammatory effects of hydroxytyrosol on human hepatoma HepG2 and Hep3B cell lines. *Anticancer research*, *32*(12), 5371-5377.
- Ugusman, A., Zakaria, Z., Chua, K. H., Megat Mohd Nordin, N. A., & Abdullah Mahdy, Z.** (2014). Role of rutin on nitric oxide synthesis in human umbilical vein endothelial cells. *The Scientific World Journal*, *2014*.

- Urquiaga, I. & Leighton, F. (2000).** Plant Polyphenol Antioxidants and Oxidative Stress. *Biological Research*, 33(2): 55-64.
- Valenzuela, R., Echeverria, F., Ortiz, M., Rincón-Cervera, M. Á., Espinosa, A., Hernandez-Rodas, M. C., ... & Videla, L. A. (2017).** Hydroxytyrosol prevents reduction in liver activity of Δ -5 and Δ -6 desaturases, oxidative stress, and depletion in long chain polyunsaturated fatty acid content in different tissues of high-fat diet fed mice. *Lipids in health and disease*, 16(1), 64.
- van der Stelt, I., Hoek-van den Hil, E. F., Swarts, H. J., Vervoort, J. J., Hoving, L., Skaltsounis, L., ... & Keijer, J. (2015).** Nutraceutical oleuropein supplementation prevents high fat diet-induced adiposity in mice. *Journal of Functional Foods*, 14, 702-715.
- Vaughn, R. H., Stevenson, K. E., Davé, B. A., & Park, H. C. (1972).** Fermenting yeasts associated with softening and gas-pocket formation in olives. *Applied Microbiology*, 23(2), 316-320.
- Vermerris, W. & Nicholson, R. (2008).** Phenolic compound biochemistry. *Springer Science & Business U.S.A.*
- Vinha, A. F., Ferreres, F., Silva, B. M., Valentao, P., Gonçalves, A., Pereira, J. A., ... & Andrade, P. B. (2005).** Phenolic profiles of Portuguese olive fruits (*Olea europaea* L.): Influences of cultivar and geographical origin. *Food chemistry*, 89(4), 561-568.
- Vinson, J.A. (1998).** Flavonoids in foods as in vitro and in vivo antioxidants. *Flavonoids in the Living System*. Plenum Press, New York, 151-164.
- Visioli, F., & Galli, C. (1994).** Oleuropein protects low density lipoprotein from oxidation. *Life Sciences*, 55(24), 1965-1971.
- Visioli, F., Galli, C., Bornet, F., Mattei, A., Patelli, R., Galli, G., & Caruso, D. (2000).** Olive oil phenolics are dose-dependently absorbed in humans. *FEBS letters*, 468(2-3), 159-160.
- Visioli, F., Poli, A., & Gall, C. (2002).** Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Medicinal research reviews*, 22(1), 65-75.
- Visioli, F., Galli, C., Grande, S., Colonnelli, K., Patelli, C., Galli, G., & Caruso, D. (2003).** Hydroxytyrosol excretion differs between rats and humans and depends on the vehicle of administration. *The Journal of nutrition*, 133(8), 2612-2615.
- Vissers, M. N., Zock, P. L., Roodenburg, A. J., Leenen, R., & Katan, M. B. (2002).** Olive oil phenols are absorbed in humans. *The Journal of nutrition*, 132(3), 409-417.
- Wainstein, J., Ganz, T., Boaz, M., Bar Dayan, Y., Dolev, E., Kerem, Z., & Madar, Z. (2012).** Olive leaf extract as a hypoglycemic agent in both human diabetic subjects and in rats. *Journal of medicinal food*, 15(7), 605-610.
- Wallace, G. & Fry, S.C. (1994).** Phenolic components of the plant cell wall. *International Review of Cytology*, 151, 229-267.
- Walter, W. M., Fleming, H. P., & Etchells, J. L. (1973).** Preparation of antimicrobial compounds by hydrolysis of oleuropein from green olives. *Applied microbiology*, 26(5), 773-776.
- Wang, S. Y., & Lin, H. S. (2000).** Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(2), 140-146.
- Wang, S. Y., & Stretch, A. W. (2001).** Antioxidant capacity in cranberry is influenced by cultivar and storage temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), 969-974.

- Wang, S., & Nagrath, D.** (2011). Liver tissue engineering. In *Biomaterials for Tissue Engineering Applications* (pp. 389-419). Springer, Vienna.
- Wang, H. Q., Xu, Y. X., & Zhu, C. Q.** (2012). Upregulation of heme oxygenase-1 by acteoside through ERK and PI3 K/Akt pathway confer neuroprotection against beta-amyloid-induced neurotoxicity. *Neurotoxicity research*, 21(4), 368-378.
- Wang, N., Liu, Y., Ma, Y., & Wen, D.** (2018). Hydroxytyrosol ameliorates insulin resistance by modulating endoplasmic reticulum stress and prevents hepatic steatosis in diet-induced obesity mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 57, 180-188.
- Warleta, F., Quesada, C. S., Campos, M., Allouche, Y., Beltrán, G., & Gaforio, J. J.** (2011). Hydroxytyrosol protects against oxidative DNA damage in human breast cells. *Nutrients*, 3(10), 839-857.
- Wartenberg, M., Budde, P., de Mareés, M., Grünheck, F., Tsang, S. Y., Huang, Y., ... & Sauer, H.** (2003). Inhibition of tumor-induced angiogenesis and matrix-metalloproteinase expression in confrontation cultures of embryoid bodies and tumor spheroids by plant ingredients used in traditional chinese medicine. *Laboratory investigation*, 83(1), 87-98.
- Watson, D.G.**, (2005,). *Pharmaceutical Analysis*, Elsevier Churchill Livingstone, London.
- Whetten, R., Sederoff, R.** (1995). Lignin biosynthesis. *The Plant Cell*, 7, 1001–1013.
- Whitehouse, C. M., Dreyer, R. N., Yamashita, M., & Fenn, J. B.** (1985). Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. *Analytical chemistry*, 57(3), 675-679.
- Wright, J.S., Johnson, E.R., DiLabio, G.A.** (2001). Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*, 123(6), 1173–1183.
- Wu, H., Zhang, J., Norem, K., & El-Shourbagy, T. A.** (2008). Simultaneous determination of a hydrophobic drug candidate and its metabolite in human plasma with salting-out assisted liquid/liquid extraction using a mass spectrometry friendly salt. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 48(4), 1243-1248.
- Wu, H., Jiang, K., Zhang, T., Zhao, G., & Deng, G.** (2017). Hydroxytyrosol exerts an anti-inflammatory effect by suppressing Toll-like receptor 2 and TLR 2 downstream pathways in *Staphylococcus aureus*-induced mastitis in mice. *Journal of Functional Foods*, 35, 595-604.
- Wu, L., Velander, P., Liu, D., & Xu, B.** (2017). Olive component oleuropein promotes β -cell insulin secretion and protects β -cells from amylin amyloid-induced cytotoxicity. *Biochemistry*, 56(38), 5035-5039.
- Wu, X., Li, C., Mariyam, Z., Jiang, P., Zhou, M., Zeb, F., ... & Feng, Q.** (2019). Acrolein-induced atherogenesis by stimulation of hepatic flavin containing monooxygenase 3 and a protection from hydroxytyrosol. *Journal of Cellular Physiology*, 234(1), 475-485.
- Xu, R. N., Fan, L., Rieser, M. J., & El-Shourbagy, T. A.** (2007). Recent advances in high-throughput quantitative bioanalysis by LC–MS/MS. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 44(2), 342-355.
- Yamada, K., Ogawa, H., Hara, A., Yoshida, Y., Yonezawa, Y., Karibe, K., ... & Nakamura, K.** (2009). Mechanism of the antiviral effect of hydroxytyrosol on influenza virus appears to involve morphological change of the virus. *Antiviral research*, 83(1), 35-44.
- Yang, Y. J., Yang, Z. L., Wang, D. C., Xiao, X. C., & Li, P.** (2006). Comparative study on effects of rutin and quercetin on metabolism in osteoblast cells. *Zhong yao cai= Zhongyaocai= Journal of Chinese medicinal materials*, 29(5), 467-470.

- Young, I.S. & Woodside, J.V.** (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, 54, 176-186.
- Yu, H., Liu, P., Tang, H., Jing, J., Lv, X., Chen, L., ... & Li, J.** (2016). Oleuropein, a natural extract from plants, offers neuroprotection in focal cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. *European Journal of Pharmacology*, 775, 113-119.
- Zenz, R., Eferl, R., Scheinecker, C., Redlich, K., Smolen, J., Schonhaler, H. B., ... & Wagner, E. F.** (2008). Activator protein 1 (Fos/Jun) functions in inflammatory bone and skin disease. *Arthritis research & therapy*, 10(1), 201.
- Zhang, F., Jia, Z., Deng, Z., Wei, Y., Zheng, R., & Yu, L.** (2002). In vitro modulation of telomerase activity, telomere length and cell cycle in MKN45 cells by verbascoside. *Planta medica*, 68(02), 115-118.
- Zhang, Y.C., Gan, F.F., Shelar, S.B., Ng, K.Y., Chew, E.H.,** (2013). Antioxidant and Nrf2 inducing activities of luteolin, a flavonoid constituent in *Ixeris sonchifolia* Hance, provide neuroprotective effects against ischemia-induced cellular injury. *Food Chem. Toxicol.* 59, 272–280.
- Zhang, J. Y., Yang, Z., Fang, K., Shi, Z. L., Ren, D. H., & Sun, J.** (2017). Oleuropein prevents the development of experimental autoimmune myocarditis in rats. *International Immunopharmacology*, 48, 187-195.
- Zhang, W., Liu, X., & Li, Q.** (2018). Protective effects of oleuropein against cerebral ischemia/reperfusion by inhibiting neuronal apoptosis. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, 24, 6587.
- Zhao, B., Ma, Y., Xu, Z., Wang, J., Wang, F., Wang, D., ... & Liu, L.** (2014). Hydroxytyrosol, a natural molecule from olive oil, suppresses the growth of human hepatocellular carcinoma cells via inactivating AKT and nuclear factor-kappa B pathways. *Cancer letters*, 347(1), 79-87.
- Zhao, Q., Bai, Y., Li, C., Yang, K., Wei, W., Li, Z., ... & Zhang, X.** (2017). Oleuropein protects cardiomyocyte against apoptosis via activating the reperfusion injury salvage kinase pathway in vitro. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017.
- Zheng, A., Li, H., Cao, K., Xu, J., Zou, X., Li, Y., ... & Feng, Z.** (2015). Maternal hydroxytyrosol administration improves neurogenesis and cognitive function in prenatally stressed offspring. *The Journal of nutritional biochemistry*, 26(2), 190-199.
- Zhou, F., Qu, L., Lv, K., Chen, H., Liu, J., Liu, X., ... & Sun, X.** (2011). Luteolin protects against reactive oxygen species-mediated cell death induced by zinc toxicity via the PI3K–Akt–NF-κB–ERK-dependent pathway. *Journal of neuroscience research*, 89(11), 1859-1868.
- Zhu, N., Wang, M., Wei, G.J., Lin, J.K., Yang, C.S., Ho, C.T.** (2001). Identification of reaction products of (-)-epigallocatechin, (-)-epigallocatechin gallate and pyrogallol with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Food Chemistry*, 73, 345- 349.
- Zoidou, E., Melliou, E., Gikas, E., Tsarbopoulos, A., Magiatis, P., & Skaltsounis, A. L.** (2010). Identification of Throuba Thassos, a traditional Greek table olive variety, as a nutritional rich source of oleuropein. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(1), 46-50.
- Zubair, H., Bhardwaj, A., Ahmad, A., Srivastava, S. K., Khan, M. A., Patel, G. K., ... & Singh, A. P.** (2017). Hydroxytyrosol induces apoptosis and cell cycle arrest and suppresses multiple oncogenic signaling pathways in prostate cancer cells. *Nutrition and cancer*, 69(6), 932-942.
- Αλγιζάκης Μ.,** (1982). Επεξεργασία και κονσερβοποίηση της επιτραπέζιας ελιάς, Αθήνα.
- Βαφοπούλου – Μαστρογιαννάκη, Α.** (2003). *Βιοχημεία τροφίμων*. Εκδόσεις ΖΗΤΗ. Θεσσαλονίκη.

Γαλάρης, Δ. & Δούλιας, Θ. (2001). Βιολογικά Αντιοξειδωτικά. *Χημικά Χρονικά*, 2, 49-50

Κυριτσάκης Α., Βαμβούκα Δ. και Κουτσαυτάκη Α., (1980). Προσδιορισμός της κατάλληλης περιόδου συγκομιδής για την παρασκευή βρώσιμων ελιών τύπου Ισπανίας. *Γεωργική Έρευνα*, 4, 219.

Μπόσκου, Δ., (1997). *Χημεία Τροφίμων*. Εκδόσεις Γαρταγάνη. Θεσσαλονίκη.

Παπαδογιάννης, Σαμανίδου, Β. Φ., (2000). *Ενόργανη Χημική Ανάλυση*, Εκδόσεις Πήγασος, Θεσσαλονίκη.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Πολυδιάστατη φυλογενετική ανάλυση γονιδιωματικών δεδομένων της *Olea europaea* L. και συσχέτιση φαινολικής ένωσης με νευροεκφυλιστικές ασθένειες

Περίληψη

Το δεύτερο κεφάλαιο αποτελείται από δύο πειράματα υπολογιστικής προσέγγισης που αφορούν γονιδιωματικά δεδομένα της *Olea europaea* L.

Στην εποχή των μεγάλων δεδομένων, η συμβατική πληροφορική φαίνεται πως αποτυγχάνει στην διαχείριση του πλήρους εύρους των διαθέσιμων γονιδιωματικών δεδομένων. Η παρούσα μελέτη εστιάζει στο δέντρο της ελιάς και στην συλλογή και ανάλυση των γενετικών και γονιδιωματικών δεδομένων, που βρίσκονται διάσπαρτα σε τράπεζες δεδομένων. Τα προϊόντα της ελιάς, όπως το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο και οι επιτραπέζιες ελιές θεωρούνται ευεργετικά για την υγεία του ανθρώπου τρόφιμα, λόγω των θρεπτικών φαρμακευτικών οφελών και των προστατευτικών ιδιοτήτων κατά του καρκίνου, των καρδιαγγειακών παθήσεων, των ασθενειών που σχετίζονται με την ηλικία, των νευροεκφυλιστικών διαταραχών και πολλών άλλων παθήσεων. Εκτεταμένες μελέτες αναφέρουν τα οφέλη των προϊόντων της ελιάς στην ανθρώπινη υγεία. Ωστόσο, τα διαθέσιμα δεδομένα σε επίπεδο νουκλεοτιδικής αλληλουχίας είναι σε μεγάλο βαθμό αδόμητα και αδιάρθρωτα. Με αυτό το σκοπό, στο πρώτο πείραμα περιγράφεται η υπολογιστική πολυδιάστατη προσέγγιση φυλογενετικής ανάλυσης γονιδιακών δεδομένων που αφορούν την ελιά. Η ανάλυση περιλαμβάνει διεργασίες εξόρυξης δεδομένων, διόδους μηχανικής εκμάθησης, κατηγοριοποίηση οντολογιών, σημασιολογική σύγκριση και σύγκριση των δεδομένων γονιδιακών ακολουθιών. Η συγχώνευση και ανάλυση όλων των διαθέσιμων γονιδιακών και γονιδιωματικών δεδομένων της ελιάς είναι ένα βήμα μεγάλης σημασίας για την ταξινόμηση και το χαρακτηρισμό των διαφόρων υποειδών και ποικιλιών της ελιάς, προς μία ολοκληρωμένη προσέγγιση στα πλαίσια της ασφάλειας των τροφίμων και της δημόσιας υγείας. Η παρούσα μελέτη αποτελεί ένα πρώτο βήμα για τον χειρισμό και την ανάλυση ακατέργαστων γονιδιωματικών δεδομένων στα φυτά. Επίσης, ο στόχος ήταν η κάλυψη κενών σε αναλύσεις μέσω φιλτραρίσματος, ομαδοποίησης και ταξινόμησης με τη χρήση όρων οντολογίας για την ανακάλυψη των σχετικών κόμβων των διαθέσιμων πληροφοριών.

Οι νευροεκφυλιστικές διαταραχές οδηγούν στο θάνατο των νευρικών κυττάρων στον εγκέφαλο ή στον νωτιαίο μυελό. Η ομάδα νευροεκφυλιστικών διαταραχών περιλαμβάνει ένα ευρύ φάσμα ασθενειών, με τις πιο συχνές να είναι οι διαταραχές της άνοιας, του AD και του PD.

Εκατομμύρια ηλικιωμένοι πάσχουν από τέτοιες παθολογίες. Η παγκόσμια αύξηση του προσδόκιμου ζωής οδηγεί αναπόφευκτα σε επακόλουθη αύξηση του αριθμού των ατόμων που θα επηρεαστούν σε κάποιο βαθμό από ασθένειες που σχετίζονται με νευροεκφυλισμό. Αυτή τη στιγμή, δεν υπάρχει αποτελεσματική θεραπεία που να αντιστρέφει ή να καθυστερεί την απώλεια νευρών, παρά μόνο αντιμετώπιση των συμπτωμάτων. Ένας αυξανόμενος αριθμός μελετών, επισημαίνει την αξία της κατανάλωσης ευεργετικών για την ανθρώπινη υγεία τροφίμων, και ιδιαίτερα των προϊόντων της ελιάς, ως μερικά από τα πιο σημαντικά συστατικά της Μεσογειακής διατροφής. Μία διατροφή με βάση τα προϊόντα της ελιάς φαίνεται να συμβάλει στη μείωση του κινδύνου των παθολογιών που σχετίζονται με την ηλικία λόγω της υψηλής συγκέντρωσης φαινόλης. Στο δεύτερο πείραμα, περιγράφεται η σύνδεση μίας φαινολικής ένωσης που βρίσκεται στον καρπό της ελιάς και το ελαιόλαδο, της τυροσόλης, με την πρωτεΐνη τυροσινάση, η οποία σχετίζεται με την PD. Σκοπός της μελέτης είναι η επισήμανση της χρήσης των φαινολικών ενώσεων της ελιάς στην αντιμετώπιση νευροεκφυλιστικών διαταραχών. Η τυροσόλη χρησιμοποιήθηκε ως παράδειγμα συσχέτισης μεταξύ φαινολικών ενώσεων και νευροεκφυλιστικών παθήσεων.

2.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

2.1.1. Πληθυσμιακή γενετική

Ο κλάδος ο οποίος ερευνά τη γενετική ποικιλομορφία που παρατηρείται, είτε στα άτομα ενός πληθυσμού, είτε μεταξύ διαφορετικών πληθυσμών, καλείται πληθυσμιακή γενετική. Ο κλάδος αυτός μελετά την παραλλακτικότητα γονότυπων και αλληλόμορφων και τα αίτια ή τους μηχανισμούς χάρις στους οποίους έχει μεταβληθεί η γενετική δομή των πληθυσμών. Η εξέλιξη μιας ομάδας πληθυσμού είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την πληθυσμιακή γενετική, καθώς αποτελεί το θεμέλιο για τη διατήρηση των ειδών και της βιοποικιλότητας, καθώς και της γενετικής βελτίωσης ενός είδους (Russell, 2009). Με την εφαρμογή της γενετικής σε ομάδες ατόμων, μελετάται η γενετική ποικιλομορφία εντός της ομάδας, δηλαδή η γενετική δομή, οι διαφοροποιήσεις τους και οι αλλαγές που πραγματοποιούνται μέσα σε αυτή στο χρόνο.

2.1.1.1. Γενετική Ποικιλομορφία

Η διαφοροποίηση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας είναι η βάση της πληθυσμιακής γενετικής ποικιλομορφίας. Οι νουκλεοτιδικές αλλαγές ή μεταλλάξεις είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την ύπαρξη γενετικής ποικιλομορφίας. Αλλαγές ή μεταλλάξεις είναι δυνατόν να πραγματοποιηθούν κατά την διαδικασία αντιγραφής του DNA και είναι δυνατόν να μεταβιβαστούν σε επόμενες γενιές. Με την εξέλιξη των μοριακών τεχνικών και των μεθόδων αλληλούχισης, τα τελευταία χρόνια, αυξήθηκαν σε μεγάλο βαθμό τα δεδομένα νουκλεοτιδικών αλληλουχιών. Γενετική ποικιλομορφία είναι δυνατόν να προκύψει από γενετικό ανασυνδυασμό, ο οποίος πραγματοποιείται από δύο διεργασίες στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Ο διαχρωμοσωματικός ανασυνδυασμός προκαλείται από ελεύθερο συνδυασμό χρωμοσωμάτων, όπου τα μειωτικά προϊόντα είναι το 50% του συνόλου των απογόνων και ο ενδοχρωμοσωματικός ανασυνδυασμός, ο οποίος συμβαίνει κατά τη μείωση μη αδελφών χρωματίδων και οδηγεί σε διαφορετικό συνδυασμό αλληλόμορφων, όπου τα μειωτικά προϊόντα είναι λιγότερα του 50% των απογόνων (Τριανταφυλλίδης, 2001).

Η γενετική ποικιλομορφία εντός μιας ομάδας πληθυσμού μπορεί να μεταβληθεί από διάφορους μηχανισμούς όπως η φυσική επιλογή, η γονιδιακή ροή και η γενετική παρέκκλιση. Η φυσική επιλογή περιλαμβάνει μια ομάδα εργασιών μέσω των οποίων οι οργανισμοί προσαρμόζονται καλύτερα στο περιβάλλον τους, αυξάνεται οι πιθανότητες διαβίωσης και αναπαραγωγής, διατηρούνται και μεταβιβάζονται σε επόμενες γενιές και διαμορφώνεται μεγάλο μέρος της φαινοτυπικής ποικιλομορφίας. Η γονιδιακή ροή αναφέρεται στην είσοδο γονιδίων από έναν ή περισσότερους πληθυσμούς στη γενετική δεξαμενή μιας ομάδας, συνήθως του ίδιου είδους, αλλά και διαφορετικού είδους σε μερικές περιπτώσεις, και μπορεί να πραγματοποιηθεί με μετακίνηση ατόμων

ή μεταφορά των ατόμων αυτών από άλλα άτομα. Η γενετική παρέκκλιση αναφέρεται στις μεταβολές του πληθυσμού από γενιά σε γενιά, λόγω τυχαίων γεγονότων, κατά την οποία μπορεί να ενσωματωθούν νέα αλληλόμορφα σε ένα πληθυσμό ή να υπάρξει απώλεια ορισμένων, με αποτέλεσμα την αλλοίωση της γενετικής παραλλακτικότητας.

2.1.1.2. Μελέτη εξελικτικών σχέσεων των οργανισμών

Φυλογένεση καλείται η μελέτη των εξελικτικών σχέσεων μεταξύ οργανισμών, πληθυσμών ή ειδών στο πέρασμα του χρόνου. Οι οργανισμοί μεταβάλλονται στο χρόνο, διασταυρώνονται ή εξαφανίζονται. Οι φυλογενετικές σχέσεις των οργανισμών συνδέονται άμεσα με την ταξινόμηση των οργανισμών. Αρχικά η περιγραφή των γενετικών σχέσεων μεταξύ των οργανισμών βασιζόταν κυρίως στα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του οργανισμού, εφόσον ο γονότυπος ενός οργανισμού αντικατοπτρίζεται στον φαινότυπο του, ο οποίος υφίσταται τις πιέσεις της φυσικής επιλογής και εξελίσσεται ορατά. Επίσης, με τη χρησιμοποίηση μορφολογικών χαρακτηριστικών είναι εφικτή η χρησιμοποίηση μεγάλου αριθμού δειγμάτων, με μείωση της πιθανότητας σφάλματος και την δυνατότητα επανάληψης της μελέτης με τα ίδια άτομα. Όμως οι αναλύσεις που βασίζονται στα μορφολογικά χαρακτηριστικά έχουν αρκετά μειονεκτήματα όπως η δύσκολη διάκριση διαφορετικών χαρακτηριστικών, η ασάφεια της κληρονομικότητας των χαρακτηριστικών κτλ.

Τα διάφορα προβλήματα που προκύπτουν στην ανάλυση με βάση το φαινότυπο, λύθηκαν με την ανάπτυξη μοριακών μεθόδων, οι οποίες μπορούν να εφαρμοστούν σε όλους τους οργανισμούς ή σε κάθε μόριο που φέρει πληροφορίες του οργανισμού. Συνεπώς, ως απαραίτητο εργαλείο για τις φυλογενετικές μελέτες καθιερώθηκε η μοριακή ανάλυση, όπου τα μοριακά δεδομένα, όπως η αλληλουχία του DNA, φέρουν όλες τις απαραίτητες αποδείξεις για την φυλογενετική ανάλυση ενός οργανισμού. Η μελέτη του DNA υπερίσχυσε της μελέτης των μορφολογικών χαρακτηριστικών καθώς επιτρέπει την ανάλυση γενετικού υλικού το οποίο έχει κληρονομηθεί από πρόγονο οργανισμό, αντανακλώντας τη γενεαλογία του οργανισμού. Επίσης, οι αναλύσεις με βάση το φαινότυπο δεν είναι δυνατό να αξιολογήσουν με ποιον τρόπο έχουν προκύψει ορισμένα χαρακτηριστικά, από κληρονομικότητα ή επιρροή του περιβάλλοντος, πράγμα που είναι απαραίτητο να είναι γνωστό για την εφαρμογή φυλογενετικής ανάλυση. Ακόμα, η μορφολογική ομοιότητα μεταξύ των οργανισμών καθιστούν εξαιρετικά δύσκολη την εύρεση σημαντικού αριθμού χαρακτηριστικών για την ανάλυση και την κατηγοριοποίηση των οργανισμών. Επιπλέον, άλλος ένας σημαντικός παράγοντας που λαμβάνεται υπόψιν είναι ο καθορισμός ενός μορφολογικού χαρακτηριστικού από περισσότερα από ένα γονίδια.

2.1.2. Ερευνητικό πεδίο

Τη βάση της σύγχρονης μοριακής βιολογίας και της ανάπτυξης της αποτέλεσε η ανακάλυψη του μοντέλου διπλής έλικας των **Watson και Crick** το **1953**. Τα συνεχόμενα ευρήματα ως προς τον τρόπο λειτουργίας τους DNA και άλλων μορίων, όπως το RNA ή οι πρωτεΐνες δημιούργησαν νέα δεδομένα και απαιτήσεις στο χώρο της βιολογίας, απαιτώντας την συνεργασία της συγκεκριμένης επιστήμης με ένα μεγάλο αριθμό επιστημών και αντικειμένων. Η παράλληλη ανάπτυξη της πληροφορικής οδήγησε σε μια επιτυχή συνεργασία των δύο αυτών αντικειμένων με αποτέλεσμα την επίλυση σημαντικών προβλημάτων, την εξειδίκευση στις λύσεις αυτών των προβλημάτων και την συστηματοποιημένη ενσωμάτωση του κλάδου της πληροφορικής στην επεξεργασία βιολογικών δεδομένων. Ένας από τους κύριους λόγους για την επιτυχία αυτής της συνεργασίας ήταν ο τρόπος κωδικοποίησης των πληροφοριών του DNA, ο οποίος είναι αρκετά όμοιος με τον τρόπο κωδικοποίησης των πληροφοριακών συστημάτων. Αντίστοιχα με την λειτουργία σε 0 και 1 (bits) των υπολογιστών, η πληροφορία του DNA εμφανίζεται με μορφή αλυσίδας (νουκλεοτίδια), με τέσσερις διαφορετικούς τύπους (αζωτούχες βάσεις). Με την συνεργασία των δύο αυτών κλάδων σημειώθηκε τεράστια ανάπτυξη στην έρευνα βιολογίας και βιοϊατρικής, αναπτύσσοντας αυτοματοποιημένες μεθόδους στοίχισης ακολουθιών, καθορισμού τρισδιάστατης δομής πρωτεϊνών, μέτρησης του mRNA και των πρωτεϊνών, συνθέτοντας έτσι πολύτιμες βιολογικές πληροφορίες και μεγάλο όγκο διαφορετικών δεδομένων. Η ανάγκη εξαγωγής και εκμετάλλευσης της πληροφορίας έγινε η βάση για τη δημιουργία του κλάδου της βιοπληροφορικής, ενός ιδιαίτερα σημαντικού κλάδου στις μέρες μας.

Η βιοπληροφορική επιστήμη είναι ικανή να απαντήσει σε ένα πλήθος ερωτημάτων όπως για παράδειγμα αν μία ακολουθία DNA κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη ή η συλλογή δεδομένων, η συστοίχιση τους και η μελέτη τους για την εξαγωγή πληροφοριών σχετικά με τις σχέσεις τους, κοινές λειτουργίες κτλ. Το πρώτο βήμα για μία φυλογενετική ανάλυση είναι η πολλαπλή συστοίχιση ακολουθιών (multiple sequence alignment), για την εκτίμηση των εξελικτικών σχέσεων ενός συνόλου βιολογικών δεδομένων. Για την εύρεση λειτουργίας ή δομής ενός στοιχείου ή την φυλογενετική ανάλυση δεδομένων η πολλαπλή στοίχιση ακολουθιών είναι απαραίτητη προϋπόθεση, και η ακρίβεια της μεθόδου είναι κρίσιμη και σημαντική για την εξαγωγή ορθών συμπερασμάτων.

2.1.2.1 Βιοπληροφορική

Το πεδίο όπου συνεργάζεται η βιολογία με τη στατιστική και τα μαθηματικά με στόχο την εξερεύνηση και την προσέγγιση βιολογικών προβλημάτων ονομάζεται βιοπληροφορική. Περιέχει ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών δομικής, μοριακής, πληθυσμιακής και περιβαλλοντολογικής βιολογίας και θεωρείται ο πλέον αναπτυσσόμενος κλάδος. Τα τελευταία χρόνια με την ταυτόχρονη εξέλιξη της

τεχνολογίας και την μελέτη πολύπλοκων βιολογικών συστημάτων πραγματοποιήθηκε ραγδαία αύξηση βιολογικών πληροφοριών που παράχθηκαν. Δημιουργήθηκε επομένως η ανάγκη για διαχείριση, έλεγχο και ανάλυση αυτών των δεδομένων για την εξαγωγή σημαντικών βιολογικών συμπερασμάτων. Η ανάπτυξη εξειδικευμένων υπολογιστικών εργαλείων για την διαχείριση, οπτικοποίηση και ανάλυση αυτών των δεδομένων ήταν η βάση για την ανάπτυξη του κλάδου της βιοπληροφορικής.

Ο σκοπός της επιστήμης της βιοπληροφορικής είναι η συγκέντρωση και επεξεργασία γονιδιακών δεδομένων ώστε να γίνει εφικτή η μελέτη της πρωτεϊνικής λειτουργίας, όπως για παράδειγμα η μελέτη δομών των πρωτεϊνών για την ευκολότερη παρασκευή φαρμάκων. Οι βασικότεροι στόχοι του κλάδου συνοψίζονται ως εξής: στην αναγνώριση της μορφής και λειτουργίας μιας πρωτεΐνης, στην αναγνώριση όλων των γονιδίων και πρωτεϊνών σε ένα δοσμένο γονιδίωμα, στον καθορισμό συγκεκριμένης θέσης στη δομή μιας πρωτεΐνης. Για την εκτέλεση των παραπάνω στόχων είναι απαραίτητη η εξερεύνηση των ομόλογων ακολουθιών. Με την ύπαρξη ομολογίας δύο ακολουθιών προτείνεται ότι οι ακολουθίες μοιράζονται κοινό πρόγονο. Η αναζήτηση ομοιότητας ακολουθιών είναι μία από τις σημαντικότερες διεργασίες της βιοπληροφορικής. Η αναζήτηση μπορεί να αποδώσει πολλές ακολουθίες με διαβαθμίσεις ως προς την ομοιότητα.

Οι ερευνητικοί τομείς με την μεγαλύτερη σημασία στην βιοπληροφορική είναι η οργάνωση δεδομένων με τον καλύτερο δυνατό τρόπο, η ανάπτυξη εργαλείων που επιτρέπουν την ερμηνεία βιολογικών αποτελεσμάτων και η ανάπτυξη εργαλείων που επιτρέπουν την ανάλυση, συστοίχισή και κατηγοριοποίηση ακολουθιών βιολογικών δεδομένων.

2.1.3 Οργάνωση δεδομένων

Η ανάγκη για την οργάνωση δεδομένων προέκυψε με τον ολοένα αυξανόμενο αριθμό βιολογικών δεδομένων που πρέπει να αποθηκεύονται με σκοπό τη διευκόλυνση ανάκτησης και επεξεργασίας τους. Η τεχνολογική εξέλιξη βοήθησε στην διεκπεραίωση τεράστιου όγκου πειραματικών εργασιών και ταυτόχρονα αύξησε τον όγκο των πληροφοριών σε απέραντα μεγέθη. Το σύνολο των βιολογικών δεδομένων συντηρείται σε βάσεις δεδομένων, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την ανανέωσή και συντήρησή τους. Η πρόσβαση στις βάσεις αυτές έχει καταστεί εύκολη διαδικασία, ενώ έχουν δημιουργηθεί σειρά από βάσεις που αποσκοπούν στην ταξινόμηση πληροφορίας σε επίπεδο ακολουθίας και δομής.

Σε όλο τον κόσμο πραγματοποιείται μεγάλη προσπάθεια για την συντήρηση και ενημέρωση των βάσεων δεδομένων νουκλεοτιδίων. Μερικές από τις κυριότερες βάσεις είναι η EMBL (European

Molecular Biology Laboratory) που διατηρείται στο EMBL-EBI (European Bioinformatics Institute, Hixton, UK), η GENBANK που διατηρείται στο NCBI (National centre for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland, USA και η DDBJ (DNA Data Bank of Japan) που διατηρείται στο NIG/CIB (Mishima, Japan).

Ομοίως, υπάρχουν βάσεις πρωτεϊνικών δεδομένων, με τις κυριότερες να είναι: η SWISS-PROT που διατηρείται στο University of Geneva/Swiss Institute of Bioinformatics (Geneva, Switzerland), η PIR (Protein Information Recourse) που διατηρείται στο NBRF (National Biomedical Foundation, Washington DC, USA) σε συνεργασία με το πανεπιστήμιο του Τόκιο / JIPID (Japanese International Protein Information Database, Tokyo, Japan) και το MIPS (Martinsried Institute for Protein Sequences, Martinsried, Germany), η PRF/SEQDB (Protein Resource Foundation) που διατηρείται στο PRF (Osaka, Japan), η PDB (Protein Data Bank) που διατηρείται στο University of New Jersey, στο San Diego Supercomputer Center, στο University of California και στο National Institute of Standards and Technology και είναι η μεγαλύτερη βάση δεδομένων με τρισδιάστατες δομές βιολογικών μακρομορίων. Υπάρχουν επίσης βάσεις όπου δημιουργούνται αυτόματα και περιέχουν τη μετάφραση κωδικοποιημένων ακολουθιών που προέρχονται από τις κυριότερες πρωτεϊνικές βάσεις όπως οι TrEMBL, SP-TrEMBL, REM-TrEMBL, GenPept. Ανάμεσα στις διάφορες βάσεις υπάρχουν διαφορές, όπως είναι λογικό, ως προς την ποιότητα της πληροφορίας ή τον αριθμό και όγκο των δεδομένων ή την ακρίβεια της πληροφορίας.

Για το λόγο του ότι καμία από τις βάσεις δεν είναι ολοκληρωμένη πραγματοποιείται προσπάθεια για την δημιουργία σύνθετων βάσεων δεδομένων, με σκοπό την αποφυγή πλεονασμού πληροφοριών και εξάλειψη διπλό-εγγραφών και όμοιων ακολουθιών. Έτσι, έχουν δημιουργηθεί αποτελεσματικότερες και μικρότερες βάσεις δεδομένων, όπως η βάση του NCBI που υποστηρίζει ημερησίως μια πλήρως ενημερωμένη συνδυαστική βάση δεδομένων νουκλεοτιδίων και πρωτεϊνών. Υπάρχουν επίσης εργαλεία, όπως το ENTREZ ή το SRS που δίνουν την δυνατότητα αναζήτησης δεδομένων από περισσότερες από 400 βάσεις δεδομένων.

Ένας άλλος τρόπος κατηγοριοποίησης των δεδομένων με σκοπό την αποθήκευση και διαχείρισή τους, είναι η κατηγοριοποίηση με βάση τον τύπο δεδομένων που περιέχουν, όπως η κατηγοριοποίηση σε πρωτοταγείς και δευτεροταγείς βάσεις. Οι πρώτες περιλαμβάνουν την πληροφορία που έχει προσδιοριστεί πειραματικά, όπως οι ακολουθίες νουκλεϊκών οξέων ή πρωτεϊνών. Οι δεύτερες περιλαμβάνουν βιολογικές πληροφορίες που προέκυψαν από ανάλυση των πρώτων. Εκτός των διαχωρισμένων βάσεων υπάρχουν και σύνθετες βάσεις που περιέχουν πληροφορίες και των δύο κατηγοριών, όπως οι OWL, NRDB. Επίσης έχουν δημιουργηθεί βάσεις οι οποίες εξειδικεύονται σε συγκεκριμένα δεδομένα, όπως οι HIV Database (DNA για τον ιό του HIV),

HPVSD (DNA για τον ιό του HPV), IMGT που περιέχει γονίδια ανοσοσφαιρίνης και T-κύτταρα, IMGT/HLA (δεδομένα ιστοσυμβατότητας θέσης A), NRL_3D (δεδομένα με γνωστές μορφές τρισδιάστατης μορφής πρωτεϊνών). Υπάρχουν ακόμα βάσεις οι οποίες περιλαμβάνουν πρωτεΐνες ομαδοποιημένες σε οικογένειες και περιλαμβάνουν συστοιχισμένες ακολουθίες με διαφορετικά μήκη ή αριθμό πρωτεϊνών, όπως οι Blocks, Block+, DOMO, PRINT, ProDom, HSSP, FSSP, Pfam.

2.1.3.1 Μεθοδολογία ερμηνείας βιολογικών αποτελεσμάτων

Η παραγωγή πληροφοριών εξαιτίας της αύξησης των βιολογικών δεδομένων έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη μεθόδων για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων αυτών. Αναπτύχθηκαν για αυτό το λόγο τομείς της βιοπληροφορικής όπως η φυλογενετική ανάλυση, ο καθορισμός τρισδιάστατων μορφών πρωτεϊνών από τις ακολουθίες μακρομορίων, η εξαγωγή συμπερασμάτων για τη ρύθμιση λειτουργίας ενός κυττάρου ή μιας πρωτεΐνης.

Για τη δημιουργία εξελικτικών δέντρων χρησιμοποιείται η φυλογενετική ανάλυση στο μεγαλύτερο ποσοστό των ερευνών. Η δημιουργία τέτοιων δέντρων είναι εφικτή μετά από σύγκριση βιολογικών ακολουθιών ενός οργανισμού ή διαφορετικών οργανισμών. Οι βιολογικές ακολουθίες πραγματοποιείται ανάλογα με το βαθμό ομοιότητας των ακολουθιών. Ο βαθμός ομοιότητας απεικονίζει το πως οι βιολογικές ακολουθίες μετασχηματίστηκαν κατά τη διάρκεια της εξελικτικής διαδικασίας. Τα φυλογενετικά δένδρα δημιουργούνται μετά από συστοίχιση ακολουθιών με τις μεθόδους μέγιστης φειδωλότητας (maximum parsimony), ιεραρχικής ομαδοποίησης (hierarchical clustering) και μέγιστης πιθανοφάνειας (maximum likelihood). Η μέθοδος που θα χρησιμοποιηθεί βασίζεται στον τρόπο δημιουργίας του δένδρου, το εξελικτικό μοντέλο ή στην απόσταση. Ο αλγόριθμος UPGMA (Unweighted Pair Group Method using arithmetic Averages) είναι από τις πιο γνωστές μορφές ιεραρχικής ομαδοποίησης.

Υπολογιστικά είναι πολύ δύσκολο να καθοριστεί η τρισδιάστατη μορφή μιας πρωτεΐνης από μια ακολουθία RNA για αυτό το λόγο απαιτούνται αλγόριθμοι πολυπλοκότητας τρίτου βαθμού, ενώ η το σχήμα που παίρνει η τρισδιάστατη μορφή μιας πρωτεΐνης από μια αμινοξική ακολουθία παραμένει άλυτο πρόβλημα. Σε αυτή την περίπτωση βρίσκουν εφαρμογή τα HMM (Hidden Markov Models) και η μέθοδος CFG (Context Free Grammar).

2.1.3.2 Ανάλυση – Κατηγοριοποίηση δεδομένων

Η περιγραφή κάθε βιολογικού μορίου ως ακολουθία συμβόλων ορισμένου αλφαβήτου ήταν βασική προϋπόθεση για την ανάπτυξη και εφαρμογή διαχειριστικών τεχνικών βιολογικών ακολουθιών. Πιο συγκεκριμένα, κάθε μόριο DNA θεωρείται ακολουθία συμβόλων τεσσάρων

χαρακτήρων, A, C, G, T, ενώ κάθε μόριο πρωτεΐνης θεωρείται ως ακολουθία συμβόλων από είκοσι χαρακτήρες, που συμβολίζουν τα είκοσι αμινοξέα.

Η ακριβής εύρεση προτύπου ή εύρεση προτύπου κατά προσέγγιση είναι τα αντικείμενα όπου επικεντρώνεται η ανάλυση ακολουθιών βιολογικών δεδομένων. Η εύρεση προτύπων στις ακολουθίες DNA έχουν τη δυνατότητα να προσδιορίσουν περιοχές όπου βρίσκονται γονίδια, περιοχές όπου τερματίζεται ή ξεκινά η αντιγραφή του DNA κ.ο.κ. Επίσης, οι εξελικτικές σχέσεις ή πρόβλεψη δευτεροταγών ή τριτοταγών δομών μπορούν να καθοριστούν σε πρωτεϊνικές ακολουθίες.

Η συστοίχιση ακολουθιών (sequence alignment) αποτελεί ένα από τα κυριότερα πεδία έρευνας της βιοπληροφορικής. Οι κληρονομούμενες μεταβολές πληροφορίας, ανεξαρτήτως αν η εξέλιξη είναι τμήμα του προβλήματος, αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της μεθόδου αυτής. Η συστοίχιση ακολουθιών DNA, RNA ή πρωτεϊνών, λειτουργικής, δομικής ή εξελικτικής συσχέτισης, είναι ο κυριότερος τρόπος αναγνώρισης περιοχών ομοιότητας στην βιοπληροφορική. Η αναπαράσταση των συστοιχισμένων ακολουθιών αμινοξέων ή νουκλεοτιδίων απεικονίζεται σαν γραμμές στο εσωτερικό ενός πίνακα. Εντός του πίνακα, εισάγονται κενά μεταξύ των περιοχών της ακολουθίας ώστε να επιτυγχάνεται η συστοιχία με επιτυχία στις στήλες των ακολουθιών. Η συστοίχιση ακολουθιών διακρίνεται σε τοπική (local), η οποία εφαρμόζεται σε κομμάτια της ακολουθίας ή σε ολική συστοίχιση (global alignment), η οποία εφαρμόζεται στο σύνολο του μήκους της ακολουθίας. Η πρώτη περίπτωση εφαρμόζεται όταν ερευνάται η ύπαρξη περιοχών συσχέτισης ή μοτίβα ακολουθιών σε ακολουθίες ανόμοιες μεταξύ τους. Η δεύτερη περίπτωση εφαρμόζεται σε όμοιες με περίπου όμοιο μήκος ακολουθίες. Οι πρώτοι αλγόριθμοι συστοίχισης δημιουργήθηκαν από τους **Smith** και **Waterman (1981)** για την τοπική συστοίχιση και από τους **Needleman** και **Wunsch (1970)** για την ολική συστοίχιση. Στους αλγόριθμους χρησιμοποιούνται προσεγγίσεις που επιταχύνουν την αναζήτηση ομόλογων ακολουθιών. Υπάρχει μια σειρά από μεθόδους και αλγόριθμους για την ανάλυση και σύγκριση των βιολογικών ακολουθιών, με το πρόγραμμα BLAST, το οποίο βασίζεται σε ευρετικούς αλγόριθμους να είναι το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο.

Άλλο ένα σημαντικό πεδίο έρευνας της βιοπληροφορικής, εκτός της ανάλυσης και σύγκρισης ακολουθιών, είναι η κατηγοριοποίηση. Ξεκινώντας από ένα σύνολο μεταβλητών, πραγματοποιείται οργάνωση σε ομάδες οι οποίες είναι άγνωστες αρχικά, από τεχνικές ανάλυσης ομαδοποίησης (Clustering). Οι ομαδοποιήσεις μπορούν να διαχωριστούν σε εξελικτικές μεθόδους (genetic algorithms), σε διαιρετικές μεθόδους (partitioning methods), σε ιεραρχικές μεθόδους (hierarchical methods), σε τεχνητά νευρωνικά δίκτυα (artificial neural networks), σε μηχανές υποστήριξης διανύσματος (support vector machines) και σε γραφοθεωρητικές μεθόδους (graph-based methods). Η επιτυχία και η απόδοση της κάθε μεθόδου εξαρτάται από τον σκοπό εφαρμογής της κάθε μίας, το

είδος των δεδομένων και των αντίστοιχων παραμέτρων. Τα κυριότερα προβλήματα αναγνώρισης προτύπων στο πεδίο της βιοπληροφορικής είναι ο καθορισμός συστατικών μιας ακολουθίας αμινοξέων της δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης που θα προκύψει και η αναγνώριση γονιδίων. Για την αναγνώριση προτύπων σε βιολογικά μακρομόρια υπάρχουν αρκετοί τρόποι επίλυσης, πολλοί από τους οποίους βασίζονται στη μηχανική εκμάθηση (machine learning), στα νευρωνικά δίκτυα και στα πιθανοθεωρητικά μοντέλα.

2.1.1. Συστοίχιση δεδομένων βιολογικών ακολουθιών

Σε έναν οργανισμό, το DNA είναι το γενετικό υλικό το οποίο δρα ως μέσο διαβίβασης της γενετικής πληροφορίας από τη μία γενιά στην άλλη (Graur and Li., 2002). Όλα τα έμβια όντα διαφοροποιούνται με την πάροδο του χρόνου από τον κοινό τους πρόγονο με εξέλιξη μέσω αλλαγών στο DNA τους (Carroll et al., 2001). Ως εκ τούτου, η ικανότητα αλληλούχισης του DNA ενός οργανισμού είναι μία από τις πιο σημαντικές και κύριες αξιώσεις στην βιολογική έρευνα. Πολλοί επιστήμονες έχουν επιδείξει ενδιαφέρον στην εφεύρεση εργαλείων που πραγματοποιούν αλληλούχιση του DNA. Παλιότερα συνηθιζόταν η αλληλούχιση μερικών δεκάδων ή εκατοντάδων νουκλεοτιδίων κάθε φορά, όμως, η αλληλούχιση DNA τώρα πραγματοποιείται μέσω μηχανών αλληλούχισης υψηλής απόδοσης με δισεκατομμύρια βάσεων να αλληλουχίζονται μέσα σε μία μέρα. Με την άφιξη των τεχνικών αλληλούχισης “Επόμενης Γενιάς” (NGS) (Liu et al., 2012), η απόδοση της παραγωγής αλληλουχιών αυξήθηκε σε μεγάλο βαθμό και ταυτόχρονα μειώθηκε το κόστος. Όλες οι βάσεις νουκλεοτιδίων είναι τώρα εξοπλισμένες με τεραστίου μεγέθους, πειραματικά ακατέργαστα, δεδομένα ακολουθιών. Σε αντίθεση με τις τεχνικές αλληλούχισης, οι πειραματικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό της δομής είναι χρονοβόρες, δαπανηρές, και επομένως, δεν θα μπορούν να είναι ικανές να συμβαδίσουν με τη ροή νέων χαρακτηριζόμενων ακολουθιών. Επομένως, η διαφορά μεταξύ των αποθηκευμένων ακολουθιών στις βάσεις δεδομένων και οι αντίστοιχες δομικές ή λειτουργικές πληροφορίες που περιέχουν, αυξάνεται ραγδαία. Η χρήση διαφόρων υπολογιστικών προσεγγίσεων, είναι η ταχύτερη εναλλακτική στην πρόβλεψη δομικών και λειτουργικών πληροφοριών για αυτές τις ακολουθίες νουκλεοτιδίων. Επί του παρόντος, η πληροφοριακή βιολογία και η βιοπληροφορική είναι εξαιρετικά ενδιαφέροντα πεδία της βιολογικής έρευνας. Η συστοίχισή ακολουθιών (Sequence Alignment-SA) είναι συνήθως το πρώτο βήμα που πραγματοποιείται στην βιοπληροφορική για την κατανόηση της μοριακής φυλογένειας μιας άγνωστης ακολουθίας. Αυτό πραγματοποιείται μέσω συστοίχισης μιας άγνωστης ακολουθίας με μία ή περισσότερες ακολουθίες από βάσεις δεδομένων για την πρόβλεψη κοινών στοιχείων, καθώς τα υπολείμματα που εκτελούν δομικό και λειτουργικό ρόλο τείνουν να διατηρούνται λόγω φυσικής επιλογής κατά τη διάρκεια της εξέλιξης (Thompson et al., 2011). Η βέλτιστη συστοίχισή διευθετεί δύο ή περισσότερες ακολουθίες κατά τρόπο ώστε ο μέγιστος

αριθμός πανομοιότυπων ή όμοιων κατάλοιπων να ταυτίζονται (**Mount, 2004**). Οι ακολουθίες μπορεί να είναι νουκλεοτιδικές ακολουθίες για DNA ή RNA ή ακολουθίες αμινοξέων για πρωτεΐνες. Η διαδικασία αναδιάταξης μπορεί να εισαγάγει ένα ή περισσότερα κενά στην συστοίχισή. Ένα κενό υποδηλώνει απώλεια ή αύξηση ενός κατάλοιπου, επομένως εξελικτική εισαγωγή ή διαγραφή, μετατοπίσεις και συμβάντα αναστροφής μπορούν να παρατηρηθούν στην συστοίχιση. Η συστοίχιση ή η χαρτογράφηση είναι επίσης σημαντικές τεχνικές μετα-αλληλούχισης. Η βαθιά αλληλούχιση στην NGS γενικά παράγει πολλές σύντομες ακολουθίες ανάγνωσης (200 βάσεις). Για την εύρεση του αντίστοιχου μέρους κάθε αλληλουχίας στην ακολουθία αναφοράς, χρειάζεται η συστοίχιση των ακολουθιών με την ακολουθία αναφοράς. Η συστοίχιση είναι επίσης απαραίτητη για επεξήγηση γονιδίων η οποία πραγματοποιείται μέσω της ανάλυσης σύντομων αναγνώσεων RNA ακολουθιών που προέρχονται από την χαρτογράφηση των γονιδίων σε γονιδίωμα αναφοράς. Η ανάγνωση της ακολουθίας πρέπει καλύπτει ομοιόμορφα κάθε αντίγραφο κατά μήκος των δύο άκρων του. Το πιο δύσκολο μέρος της ανάγνωσης ακολουθιών είναι το μικρό μέγεθος των ακολουθιών έναντι των βιολογικών αντιγράφων τους. Επομένως, οι σύντομες αναγνώσεις χρειάζεται να συστοιχιστούν για την εύρεση κοινού τέλους ακολουθιών μεταξύ των αναγνώσεων και ως εκ τούτου να συναρμολογηθούν για την κατασκευή ολόκληρης της μεταγραφής και της κάλυψης στο γονιδίωμα αναφοράς, μαζί με τους τόπους σύνδεσης.

Υπάρχουν δύο τύποι συστοίχισης ακολουθιών που εφαρμόζονται, η συστοίχιση ακολουθιών κατά ζεύγη (PSA) και η πολλαπλή συστοίχιση ακολουθιών (MSA). Η PSA εξετάζει δύο ακολουθίες τη φορά, ενώ η MSA συστοιχίζει πολλαπλές σχετιζόμενες ακολουθίες. Η MSA πλεονεκτεί έναντι της PSA καθώς εξετάζει πολλά μέλη μιας οικογένειας ακολουθιών και ως εκ τούτου παρέχει περισσότερη βιολογική πληροφορία. Η MSA είναι επίσης προαπαιτούμενο για την συγκριτικές γενομικές αναλύσεις για τον προσδιορισμό και ποσοτικοποίηση διατηρημένων περιοχών ή λειτουργικών μοτίβων σε μια ολόκληρη οικογένεια ακολουθιών, για την εκτίμηση της εξελικτικής απόκλισης μεταξύ αλληλουχιών και ακόμη για το προφίλ προγονικών ακολουθιών (**Kumar and Filipski, 2007**). Η συστοίχιση ακολουθιών σε επίπεδο αμινοξέων είναι περισσότερο κατάλληλο από ότι σε νουκλεοτιδικό επίπεδο καθώς οι πρωτεΐνες είναι σημαντικά λειτουργικά βιολογικά μόρια και ως εκ τούτου περιέχουν δομικές και λειτουργικές πληροφορίες (**Xiong, 2006**). Η συστοίχιση επομένως συνδέεται σημαντικά στην δομική βιολογία (**Morgenstern et al., 2006**). Επομένως, η συστοίχιση ακολουθιών, και ειδικά η πολλαπλή συστοίχιση ακολουθιών, είναι η αφετηρία κάθε βιολογικής μακρομοριακής έρευνας και δρα σαν σημείο προβολής εξελικτικών, λειτουργικών και δομικών προοπτικών των βιολογικών μακρομορίων συνοπτικά (**Chuong and Kazutaka, 2008**). Χρησιμοποιούνται διαφορετικοί μέθοδοι σκοραρίσματος στην συστοίχιση ακολουθιών για την αναγνώριση του επιπέδου ταυτοποίησης ή ομοιότητας. Το σκοράρισμα νουκλεοτιδίων είναι ένα απλό

σχέδιο αναγνώρισης, όπου ταυτόσημες βάσεις στις ακολουθίες εκχωρείται θετικό σκορ. Εν αντίθεση, για τις πρωτεΐνες, μετράται σκορ ομοιότητας δηλώνοντας τα αμινοξέα που έχουν όμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες.

Η μέθοδος συστοίχισης μπορεί να είναι δύο τύπων, γενική συστοίχιση (global alignment-GB) (Needleman and Wunsch, 1970) και τοπική συστοίχιση (local alignment-LA) (Smith, and Waterman, 1981). Η GB πραγματοποιείται όταν η ομοιότητα μετράται σε όλο το μήκος της ακολουθίας, και πραγματοποιείται σε αρκετές τεχνικές πολλαπλής συστοίχισης ακολουθιών (Thompson et al., 1994; Notredame et al., 2000), αλλά σημειώνονται δυσκολίες όταν οι ακολουθίες είναι μόνο ομόλογες σε τοπικές περιοχές όπου εμποδίζουν την μη συμπίεσμένη συστοίχιση που είναι κοινή σε όλες τις ακολουθίες ή όταν υπάρχει παρουσία ανακατεμένων τομών μεταξύ των σχετικών ακολουθιών (Heringa and Taylor, 1997). Σε τέτοιες περιπτώσεις, πραγματοποιείται τοπική συστοίχιση για την αναγνώριση τοπικών όμοιων περιοχών μεταξύ των ακολουθιών (Bailey and Elkan, 1994; Lawrence et al., 1993; Morgenstern, 1999). Όταν υπάρχει μεγάλη διαφορά στα μήκη των ακολουθιών που συγκρίνονται, γενικά εφαρμόζεται τοπική συστοίχιση (Lakshmi et al., 2016).

Για την συστοίχιση ακολουθιών κατά ζεύγη, ο δυναμικός προγραμματισμός (Dynamic Programming-DP) παρέχει πάντα το ιδανικό μονοπάτι συστοίχισης χρησιμοποιώντας μία διαδικασία ανίχνευσης (Shyu et al., 2004). Η αντικειμενική λειτουργία χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της ποιότητας της συστοίχισης ενός συνόλου εισηγμένων ακολουθιών. Η βελτιστοποιημένη λειτουργία συστοίχισης είναι σπανίως βιολογικά βέλτιστη όταν περισσότερες από τρεις ακολουθίες αξιολογούνται όπως στην πολλαπλή συστοίχιση ακολουθιών (Notredame, 2002). Επίσης, η υπολογιστικότητα είναι πολύπλοκη διαδικασία και απαιτεί υψηλούς υπολογιστικούς πόρους (Wang and Jiang, 1994). Επιπλέον, ο δυναμικός προγραμματισμός πάσχει από προβλήματα υψηλών διαστάσεων στην πολλαπλή συστοίχιση ακολουθιών, όπως ο αριθμός των ακολουθιών ισοδυναμεί με τον αριθμό των διαστάσεων. Εάν δύο ή περισσότερα ιδανικά μονοπάτια είναι διαθέσιμα και χρειάζεται να γίνει αντίστροφη ανίχνευση, η πολυπλοκότητα της αντίστροφης ανίχνευσης αυξάνεται εκθετικά. Οι περισσότερες μέθοδοι πολλαπλής συστοίχισης ακολουθιών είναι ευρετικές ή κατά προσέγγιση από τη φύση τους, γεγονός που παρέχει εφικτή λύση συστοίχισης μέσα σε σύντομο και περιορισμένο χρονικό πλαίσιο. Εφόσον οι διαθέσιμες ευρετικές δεν παρέχουν το βέλτιστο αποτέλεσμα και λόγω του ταχύτατα αυξανόμενου μεγέθους των βάσεων δεδομένων, η ανάπτυξη νέων μεθόδων πολλαπλής συστοίχισης ακολουθιών για την εύρεση καλής συστοίχισης ακολουθιών είναι ακόμα υπό έρευνα. Οι μέθοδοι πολλαπλής συστοίχισης ακολουθιών συχνά είναι δύσκολο να επιτύχουν εξαιτίας της πολύπλοκης σχέσης που υπάρχει μεταξύ των σχετιζόμενων ακολουθιών, και μερικές φορές υστερούν σε εξελικτικό ιστορικό (Lakshmi et al., 2016). Συχνά χρησιμοποιούνται τρεις κατηγορίες προσέγγισης στην πολλαπλή συστοίχιση ακολουθιών, οι οποίες είναι η ακριβής, ή

προοδευτική και η επαναληπτική μέθοδος προσέγγισης. Οι ακριβείς αλγόριθμοι συνήθως παραδίδουν υψηλής ποιότητας ακολουθίες, οι οποίες πλησιάζουν αρκετά το βέλτιστο αποτέλεσμα (**Lipman et al., 1989; Stoye et al., 1997**) και λόγω της προσπάθειας πολλαπλής συστοίχισης ακολουθιών υπάρχει μεγάλη εξάρτηση από τον Δυναμικό Προγραμματισμό. Λόγω του μειονεκτήματος αυτού της ακριβούς προσέγγισης οι περισσότερες πολλαπλές συστοιχίσεις ακολουθιών ακολουθούν τις άλλες δύο κατηγορίες (**Wang and Li, 2004**).

2.1.4.1. Προοδευτική συστοίχιση δεδομένων

Η προοδευτική συστοίχιση αποτυπώθηκε αρχικά από τους **Hogeweg and Hesper, (1984)**. Η προοδευτική συστοίχιση είναι μία ευρετική προσέγγιση όπου πολύπλοκα προβλήματα πολλαπλής συστοίχισης ακολουθιών διαχωρίζονται σε υπό-προβλήματα. Αυτή η διαδικασία λύνει άμεσα προβλήματα της πολλαπλής συστοίχισης ακολουθιών εμμέσως με την συστοίχιση ακολουθιών κατά ζεύγη. Κατά την προσέγγιση αυτή, όλες οι ακολουθίες συγκεντρώνονται προοδευτικά και η καλύτερη συστοίχιση κατά ζεύγη λαμβάνεται υπόψιν αρχικά. Η προοδευτική συστοίχιση χρησιμοποιεί δέντρο οδηγό (**Feng and Doolittle, 1987**) για την επίλυση των προβλημάτων της πολλαπλής συστοίχισης ακολουθιών, όπου κάθε φύλλο αντιπροσωπεύει μία ακολουθία που θα συστοιχηθεί. Κάθε επισκεπτόμενος εσωτερικός κόμβος σχετίζεται με μια πολλαπλή συστοίχιση των ακολουθιών μέσα στο αντίστοιχο υποδένδρο. Τελικώς, η πολλαπλή συστοίχιση ακολουθιών από όλες τις θεωρημένες ακολουθίες σχετίζεται με τον κόμβο της ρίζας. Η τεχνική προοδευτικής συστοίχισης χρησιμοποιείται σε αρκετά προγράμματα συστοίχισης όπως τα MULTAL (**Taylor, 1987; Taylor, 1988**), MULTIALIGN (**Corpet, 1988**), MAP (**Huang, 1994**), PCMA (**Pei et al, 2003**), CLUSTAL (**Higgins and Sharp, 1988; Thompson et al, 1994**), KAlign (**Lassmann and Sonnhammer, 2005**), T-Coffee (**Notredame et al, 2000**), κ.α. Η πιο διαδεδομένη μέθοδος είναι η ClustalW, η οποία πραγματοποιεί γενική συστοίχιση κατά ζεύγη (**Needleman and Wunsch, 1970**) των ακολουθιών και αναπτύσσει ένα πίνακα αποστάσεων και στη συνέχεια δημιουργεί ένα δένδρο οδηγό βασισμένο στις τιμές του πίνακα και εντέλει, αναπαράγει μία κοινή συστοίχιση, μέσω σταδιακής πρόσθεσης ακολουθιών ακολουθώντας το δένδρο οδηγό, όπου τα πιο κοντινά ζεύγη ακολουθιών συστοιχίζονται πρώτα, και σταδιακά προστίθενται οι επόμενες ακολουθίες. Όμως, η φύση αυτών των προσεγγίσεων δεν επιτρέπουν την τροποποίηση των κενών και ως εκ τούτου η συστοίχιση δεν μπορεί να μεταβληθεί σε επόμενο στάδιο. Επίσης, άλλο ένα μειονέκτημα είναι ότι κάθε προοδευτική πολλαπλή συστοίχιση ακολουθιών επηρεάζεται από την αρχική συστοίχιση. Έτσι, κάθε σφάλμα στο αρχικό στάδιο πολλαπλασιάζεται στα τελικά αποτελέσματα της πολλαπλής συστοίχισης ακολουθιών. Αντιθέτως, οι επαναληπτικές μέθοδοι συστοίχισης τροποποιούν επαναληπτικά την συστοίχιση, μέσω επανασυστοίχισης των ακολουθιών ή των ομάδων ακολουθιών και επομένως ξεπερνούν τα εμπόδια της προοδευτικής μεθόδου.

2.1.4.2. Δένδρο οδηγός

Τα δένδρα οδηγοί είναι η συγχώνευση των ακολουθιών βασισμένη στις αποστάσεις ζευγών, που έχουν υπολογιστεί για όλα τα πιθανά ζεύγη ακολουθιών που θα συστοιχθούν στην πολλαπλή συστοίχιση ακολουθιών. Για την κατασκευή δένδρων χρησιμοποιούνται οι μέθοδοι UPGMA (**Sokal and Michener, 1958**) ή neighbour-joining (**Saitou and Nei, 1987**). Παρόλα αυτά τα δένδρα οδηγοί μπορούν να προκαλέσουν σφάλμα στην προοδευτική συστοίχιση εάν ένα σφάλμα εισχωρηθεί κατά τη μέτρηση των αποστάσεων ή κατά την κατασκευή του δένδρου, το οποίο εντέλει θα εμφανιστεί στην τελική συστοίχιση. Το σφάλμα μπορεί να αντιμετωπιστεί με επαναληπτικές μεθόδους, μέσω επαναληπτικής τροποποίησης του δένδρου οδηγού και υπολογισμού της μέτρησης της απόστασης. Επομένως, οι επαναληπτικές μέθοδοι είναι βιολογικά πιο αβλαβείς προσεγγίσεις.

2.1.4.3. Επαναληπτική προσέγγιση

Η επαναληπτική μέθοδος γενικά εκτελεί μετα-επεξεργασία, μέσω πραγματοποίησης αλλαγών στην συστοίχιση που έχει δημιουργηθεί από προοδευτικές μεθόδους, και μεταβάλλει την κατασκευή του δένδρου οδηγού. Προγράμματα που χρησιμοποιούν επαναξιολόγηση δένδρων οδηγών είναι τα MUSCLE (**Edgar, 2004**), MAFFT (**Katoh et al., 2005; Katoh et al., 2002**), PRRP (**Gotoh, 1996**) και PRIME (**Yamada et al., 2006**). Τα προγράμματα αυτά υπολογίζουν νέους πίνακες αποστάσεων χρησιμοποιώντας μία πολλαπλή συστοίχιση ακολουθιών που έχει προκύψει από προοδευτική συστοίχιση. Έτσι, δημιουργείται ένα νέο δένδρο οδηγός που οδηγεί σε ένα δεύτερο γύρο προοδευτικής συστοίχισης. Μερικές επαναληπτικές μέθοδοι πραγματοποιούνται μέσω επαναλαμβανόμενου διαχωρισμού των συστοιχισμένων ακολουθιών σε δύο ομάδες και στη συνέχεια επανασυστοιχίζοντας αυτές τις ομάδες μέχρι η διαδικασία συστοίχισης να συγκλείσει (**Gotoh, 1996; Wang and Li, 2004**).

Κατά τη διάρκεια του σταδίου φιλτραρίσματος της προοδευτικής συστοίχισης, το πρόγραμμα MUSCLE διαχωρίζει την πολλαπλή συστοίχιση ακολουθιών σε δύο υπό-ομάδες, κάθε μία από τις οποίες περιέχει μερικές από τις ακολουθίες που εισήχθησαν. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται συστοίχιση προφίλ-προφίλ (profile-profile alignment). Σε ένα προφίλ, μια πολλαπλή ακολουθία αντιμετωπίζεται ως μία ακολουθία. Το πρόγραμμα PRIME επίσης πραγματοποιεί συστοίχιση ακολουθιών ομάδων στο στάδιο φιλτραρίσματος, όπου οι ομάδες συστοιχίζονται με μέθοδο σε ζεύγη.

2.1.4.4. Συστοίχιση βασισμένη σε κρυφά μοντέλα Markov

Στην συστοίχιση ακολουθιών, ένα από τα πιο δημοφιλή στατιστικά μοντέλα είναι το κρυφό μοντέλο MARKOV. Μία δημοφιλής μέθοδος είναι μέθοδος ProbCons (**Do et al., 2005**), η οποία χρησιμοποιεί μία λειτουργία σκοραρίσματος που βασίζεται στην πιθανοτική συνοχή. Είναι ακόμα

μία προοδευτική προσέγγιση, η οποία χρησιμοποιεί ένα συνδυασμό πιθανοτικής μοντελοποίησης και τεχνικές συστοίχισης που βασίζονται στη συνοχή. Έτσι, εφαρμόζοντας διατήρηση πληροφορίας πολλαπλής συστοίχισης ζευγών, τα προγράμματα είναι ικανά να παράξουν βελτιωμένα αποτελέσματα, συγκριτικά με άλλες σταθερές μεθόδους.

Μία άλλη πιθανοτική προοδευτική μέθοδος, η PROMALS φαίνεται πως είναι πολύ αποτελεσματική για μακρινές σχετιζόμενες πρωτεΐνες, όπου το επίπεδο ταυτοποίησης ακολουθιών είναι κάτω του 10%.

Το MSAProb (Liu et al., 2010) παράγει πολλαπλή συστοίχιση ακολουθιών σε πίνακα μεταγενέστερων πιθανοτήτων ζευγών. Ο πίνακας μεταγενέστερων πιθανοτήτων κατασκευάζεται χρησιμοποιώντας ζεύγος-HMM και λειτουργία διαίρεσης πίνακα μεταγενέστερων πιθανοτήτων. Ένα ζεύγος-HMM υπολογίζει τον πίνακα πιθανοτήτων ζευγών χρησιμοποιώντας αλγορίθμους Forward και Backward (Durbin et al., 1998). Η λειτουργία διαχωρισμού της συστοίχισης υπολογίζει έναν άλλο πίνακα πιθανοτήτων σε ζεύγη, μέσω της παραγωγής υποβέλτιστης συστοίχισης χρησιμοποιώντας δυναμικό προγραμματισμό.

2.1.4.5. Τεχνικές περικοπών

Για την μείωση του χώρου αναζήτησης στην πολλαπλή συστοίχιση ακολουθιών, κάποιες μέθοδοι χρησιμοποιούν τεχνικές περικοπών. Για την διαίρεση και τη σύνδεση της πολλαπλής συστοίχισης ακολουθιών εφαρμόζεται το πρόγραμμα αλγορίθμου Διαίρει και Κατάκτησε (Divide and Conquer Algorithm-DCA) (Stoye, 1998; Stoye et al., 1997). Με αυτή την προσέγγιση, αρχικά αναγνωρίζονται τα σημεία βέλτιστης κοπής χρησιμοποιώντας προβολές ακολουθιών κατά ζεύγη για τον διαχωρισμό μιας μεγάλης πολλαπλής ακολουθίας σε μικρότερα υπό-προβλήματα. Κάθε ένα από τα μικρά μέρη συστοιχίζεται ξεχωριστά και στη συνέχεια συμμετέχει για την παραγωγή της τελικής πολλαπλής συστοίχισης ακολουθιών.

2.1.4.6. Τεχνική σκοραρίσματος συστοίχισης

Οι τεχνικές συστοίχισης ακολουθιών μετρούν ποσοτικά την ποιότητα μιας συστοίχισης λαμβάνοντας υπόψιν ένα μοντέλο σκοραρίσματος. Το Σύνολο ζεύγων (SumOfPair - SOP) είναι το πιο κοινώς εφαρμοσμένο μοντέλο που χρησιμοποιείται από τις μεθόδους πολλαπλής συστοίχισης ακολουθιών (Thompson et al., 1999; Lassmann and Sonnhammer, 2002; Pollard et al., 2004).

Το σύνολο ζευγών είναι μία επέκταση μίας τυπικής τεχνικής σκοραρίσματος κατά ζεύγη σε μία προσέγγιση πολλαπλής συστοίχισης. Κατά την τεχνική αυτή, ένα κατάλοιπο ζευγών που έχουν συστοιχιστεί και είναι όμοια λαμβάνουν θετικό σκορ, η μη αντιστοίχιση λαμβάνει αρνητικό σκορ και

ένα διάστημα ή κενό λαμβάνει επίσης αρνητικό σκορ. Όμως, εμφανίζει μειονεκτήματα, καθώς ο υπολογιστικός χρόνος και η απαιτούμενη μνήμη αυξάνουν εκθετικά με τον αριθμό των ακολουθιών (**Wang and Jiang, 1994**), για την μεγιστοποίηση του σκορ. Επομένως, χρειάζεται μία ευρετική εναλλακτική, κυρίως προοδευτική μέθοδος για την εισαγωγή δεδομένων (**Feng and Doolittle, 1987**). Για την πολλαπλή συστοίχιση ακολουθιών, όλα τα πιθανά ζεύγη ακολουθιών σκοράρονται αρχικά βασιζόμενα στο σκοράρισμα ζευγών και στη συνέχεια όλα τα ζεύγη με σκορ προστίθενται για την εξαγωγή του τελικού σκορ συνόλου ζευγών. Ο συνολικός αριθμός των προβολών σε ζεύγη που θα πραγματοποιηθεί για n αριθμό ακολουθιών είναι $n \times (n-1)/2$ (**Murata et al., 1985**).

Στην φυσική εξέλιξη πραγματοποιείται μία σπάνια διαδικασία κατά την οποία αφαιρούνται ή προστίθενται βάσεις στο γονιδίωμα ενός οργανισμού και εμφανίζεται μεταξύ ομόλογων ακολουθιών, επομένως θα έπρεπε να “τιμωρείται” στο σκοράρισμα. Μερικά προγράμματα χρησιμοποιούν προτιμήσεις στις θέσεις κενών και προσπαθούν να τοποθετήσουν τα κενά όπου έχουν εμφανιστεί προηγούμενα κενά σε κάθε βήμα ένωσης ζευγών. Η αιτιολογία είναι ότι τα συμβάντα ανοίγματος κενών σε μια ομάδα ακολουθιών αντιπροσωπεύει ένα μοναδικό συμβάν εξέλιξης. Επιπλέον, τα κενά επιτρέπονται σε υδροφοβικές ομάδες αμινοξέων, τα οποία διπλώνονται σωστά για να εισέλθουν στον πρωτεϊνικό πυρήνα, όπου τα κενά είναι ανεκτά σε επιφανειακές ομάδες υδρόφιλων αμινοξέων μιας πρωτεΐνης. Σε μια εξελικτική διαδικασία, η πρόσθεση ή αφαίρεση βάσεων περιλαμβάνει μια ολόκληρη υπό-ακολουθία και συχνά προκύπτει από ένα συμβάν μετάλλαξης, παρά από πολλές μικρές προσθαφαιρέσεις βάσεων. Ως εκ τούτου, ένα κενό ανοίγματος τιμωρείται περισσότερο από τα κενά επέκτασης. Αυτό το σχέδιο σκοραρίσματος ονομάζεται συγγενική ποινή κενού.

Το μειονέκτημα του συνόλου ζευγών στην προοδευτική συστοίχιση είναι ότι το σύστημα βαθμολόγησης συνόλου ζευγών δεν μπορεί να υπερσχύσει της άπληστης φύσης της προοδευτικότητας. Μία εναλλακτική μεθοδολογία που βελτιώνει τη διαδικασία είναι ο σχηματισμός βαθμολόγησης με βάση τη συνέπεια (**Gotoh, 1990; Notredame et al., 1998; Vingron and Von Haeseler, 1997**). Ένα τέτοιο σχέδιο βαθμολόγησης έχει σαν αντικείμενο την βελτίωση των πρώιμων σταδίων συστοίχισης, μέσω ενσωμάτωσης πληροφοριών από ακολουθίες που βρίσκονται εκτός της ομάδας κατά τη διάρκεια κάθε συστοίχισης κατά ζεύγη. Οι πληροφορίες αυτές λειτουργούν σαν οδηγός για την κατασκευή της πολλαπλής συστοίχισης ακολουθιών. Οι συστοιχίσεις κατά ζεύγη αποτελούν τις γενικές καθώς και τις τοπικές συστοιχίσεις, επομένως, η πολλαπλή συστοίχιση ακολουθιών κατασκευάζεται με αύξηση στον ανώτατο βαθμό της συνέπειας στις συστοιχίσεις ζευγών. Αυτή η τεχνική βαθμολόγησης χρησιμοποιείται σε αρκετούς αλγόριθμους συστοίχισης, όμως δεν είναι απαλλαγμένο από διάφορους περιορισμούς. Το βασικό μειονέκτημα της μεθόδου είναι η υψηλότερη χρονική πολυπλοκότητα.

Εκτός των παραπάνω πιθανοτικών μεθόδων εφαρμόζονται και άλλα πιθανοτικά μοντέλα βαθμολόγησης, όπως η εφαρμογή μίας λειτουργίας η οποία ονομάζεται βαθμολογία προσδοκώμενης. Αυτή η τεχνική βαθμολόγησης βασίζεται στην πιθανότητα υποβάθρου ενός αμινοξέος και της συνδυαστικής πιθανότητας να συστοιχιστεί με ένα άλλο αμινοξύ.

2.1.4.7. Στοχαστικές προσεγγίσεις

Η χρήση αιτιοκρατικών προσεγγίσεων για την επίλυση πολλαπλής συστοίχισης ακολουθιών είναι μία πολύπλοκη διαδικασία βελτιστοποίησης. Σε αυτό το πεδίο έρευνας οι στοχαστικές μέθοδοι φαίνεται πως είναι μία πολύ υποσχόμενη εναλλακτική. Είναι χρήσιμες για πολύπλοκα και πτωχά καθορισμένα προβλήματα βελτιστοποίησης. Μία στοχαστική προσέγγιση που είναι επαναληπτική από τη φύση της είναι οι εξελικτικοί αλγόριθμοι (Evolutionary Algorithms - EA). Οι εξελικτικοί αλγόριθμοι είναι τεχνικές βελτιστοποίησης, οι οποίοι οδηγούνται από συγκεκριμένη γνώση ενός προβλήματος ή τομέα. Για προβλήματα συστοίχισης ακολουθιών, οι εξελικτικοί αλγόριθμοι παράγουν μία συστοίχιση και στη συνέχεια προσπαθούν να την βελτιώσουν με διαδοχικές επαναλήψεις. Οι εξελικτικοί αλγόριθμοι έχουν λάβει αρκετοί προσοχή από ερευνητές τα τελευταία χρόνια και μερικές από τις προσεγγίσεις που βασίζονται σε εξελικτικούς αλγόριθμους είναι οι Ant Colony Algorithm (Chen et al., 2007; Moss and Johnson, 2003), προσομοίωση ανόπτησης (Chen and Lin, 2007; Huo and Stojkovic, 2007; Kim et al., 1994), Bee Colony Optimization (Lei et al., 2010; Xu and Lei, 2010), Tabu search (Riaz et al., 2004; Riaz et al., 2005). Εκτός από τις παραπάνω μεθόδους, οι Γενετικοί Αλγόριθμοι (Genetic Algorithms - GA) είναι η πιο κοινή μέθοδος βελτιστοποίησης.

Οι γενετικοί αλγόριθμοι είναι μια στοχαστική μέθοδος, η οποία είναι εμπνευσμένη από τους φυσικούς γενετικούς μηχανισμούς και ακολουθεί το μηχανισμό “επιβίωση του ισχυρότερου” (Goldberg, 1989; Holland, 1975). Οι γενετικοί αλγόριθμοι λειτουργούν σε καλό επίπεδο στη βελτιστοποίηση πολύπλοκων, μεγάλων και πολυδιάστατων προβλημάτων και παρέχουν τη βέλτιστη ή σχεδόν βέλτιστη λύση. Αρχικώς, η αναζήτηση ξεκινά με ένα σύνολο πιθανών λύσεων ενός προβλήματος στο χώρο αναζήτησης. Οι λύσεις είναι κωδικοποιημένες με ένα σύνολο σειρών-συμβόλων, τα χρωμοσώματα. Η συλλογή τέτοιων χρωμοσωμάτων καλείται πληθυσμός. Κάθε σειρά πληθυσμού συνδέεται με μία αντικειμενική λειτουργία (Objective function - OF), η οποία αξιολογεί την καταλληλότητα της σειράς και αποφασίζει πόσο κατάλληλη είναι για να προχωρήσει στην επόμενη γενιά. Επομένως, η αντικειμενική λειτουργία μπορεί να ονομαστεί και λειτουργία καταλληλότητας. Οι καταλληλότερες σειρές επιλέγονται με βάση την καταλληλότητα τους. Οι γενετικοί διαχειριστές όπως οι διασταυρώσεις και οι μεταλλάξεις εφαρμόζονται στις επιλεγμένες σειρές ώστε να αποδοθούν στην επόμενη γενιά. Η λειτουργία επιλογής, διασταύρωσης και

μετάλλαξης συνεχίζονται επαναληπτικά μέχρι να επιτευχθεί ο μέγιστος αριθμός γενεών ή οποιασδήποτε άλλος όρος τερματισμού ικανοποιηθεί. Με αυτό τον τρόπο, οι γενετικοί αλγόριθμοι είναι ικανοί να βρουν την καλύτερη λύση (χρωμόσωμα) το οποίο είναι καθολική ή σχεδόν καθολική βέλτιστη λύση. Χαρακτηρίζονται από τέσσερις παραμέτρους, οι οποίες είναι το μέγεθος του πληθυσμού, ο βαθμός διασταύρωσης, ο βαθμός μετάλλαξης και η ελιτιστική επιλογή. Η λειτουργία καταλληλότητας καθορίζει το πρόβλημα. Το πλεονέκτημα του γενετικού αλγόριθμου είναι ότι η λειτουργία καταλληλότητας διαχωρίζεται από τα άλλα μέρη του αλγορίθμου, συνεπώς η μόνη τροποποίηση της λειτουργίας καταλληλότητας είναι αρκετή για την αλλαγή του γενετικού αλγόριθμου για ένα νέο πρόβλημα.

Αρκετοί ερευνητές έχουν εφαρμόσει τους γενετικούς αλγορίθμους σε περιπτώσεις εκτός των συμβατών προσεγγίσεων, για την επίλυση προβλημάτων συστοίχισης βιολογικών ακολουθιών, όπως το δημοφιλές λογισμικό SAGA (**Notredame and Higgins, 1996**), το οποίο όμως καταναλώνει μεγάλη χρονική διάρκεια στην εφαρμογή του. Επίσης, εφαρμόστηκε η ενσωμάτωση γενετικού αλγόριθμου για την συστοίχιση ακολουθιών με την έννοια τους σχήματος του γενετικού αλγόριθμου (**Zhang and Wong, 1997**), όπου ένα σχήμα περιγράφει ένα υποσύνολο σειρών που έχουν τα ίδια στοιχεία σε συγκεκριμένες θέσεις στη σειρά. Εφαρμόζεται μόνο σε ακολουθίες που έχουν πολύ υψηλή ομοιότητα μεταξύ τους και σε ακολουθίες με χαμηλή ομοιότητα η απόδοση του είναι κακή. Ακόμα, η GLOSCA (Global Criterion for Sequence Alignment) (**Arenas et al., 2009**), χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της ποιότητας της πολλαπλής συστοίχισης ακολουθιών των DNA ακολουθιών, η οποία είναι μία καθολική προσέγγιση που αξιολογεί την ακολουθία στο σύνολό της και όλες οι ακολουθίες θεωρούνται ταυτόχρονα. Επιπλέον, έχει προταθεί μία μέθοδος που βασίζεται σε γενετικούς αλγόριθμους, η VDGA (Vertical Decomposition with Genetic Algorithm) (**Naznin et al., 2011**) για την πολλαπλή συστοίχιση ακολουθιών, όπου οι ακολουθίες διαιρούνται σε δύο ή περισσότερες υπό-ακολουθίες και λύνονται ξεχωριστά η κάθε μία χρησιμοποιώντας δένδρο οδηγό. Οι ίδιοι ερευνητές ανέπτυξαν άλλη μία προοδευτική τεχνική συστοίχισης (GAPAM) χρησιμοποιώντας γενετικό αλγόριθμο, όπου ο αρχικός πληθυσμός αναπαράγεται από τυχαία δημιουργημένα δένδρα οδηγούς σε τρία στάδια (**Naznin et al., 2012**). Οι **Shyu and Foster (2003)**, ανέπτυξαν ένα σχήμα κωδικοποίησης χρωμοσωμάτων, εμπνευσμένοι από την έννοια της βιολογικής συναίνεσης ακολουθιών, όπου τα χρωμοσώματα σπάνε σε είκοσι κομμάτια για την εκπροσώπηση 20 αμινοξέων και σε τέσσερα κομμάτια για την εκπροσώπηση νουκλεοτιδίων. Μία άλλη μέθοδος που βασίζεται σε γενετικούς αλγόριθμους, όπου ο αρχικός πληθυσμός σπείρεται με τις προσυστοιχισμένες ακολουθίες χρησιμοποιώντας τα αποτελέσματα συστοίχισης του αλγορίθμου Needleman-Wunsch, είναι η μέθοδος MSA-GA (**Gondro and Kinghorn, 2007**). Μία νέα μέθοδος επίσης προτάθηκε από τους **Narimani et al. (2012)**, όπου η αρχικοποίηση πληθυσμού δεν βασίζεται

εντελώς σε άλλο ευρετικό αλγόριθμο. Η μέθοδος PWMAligner (**Botta and Negro, 2009**), αναπαράγει ένα πληθυσμό από θέσεις βάρους θέσης (PWMs) και κάθε μία από αυτές αντιπροσωπεύει ένα προφίλ πολλαπλής συστοίχισης των ακολουθιών που έχουν εισαχθεί. Επίσης, ένας νέος γενετικός αλγόριθμος παρουσιάστηκε από τους **Agarwal and Chauhan (2013)**, για την επίλυση πολλαπλής συστοίχισης ακολουθιών, όπου μόνο οι πιθανές θέσεις κενών σε μια ακολουθία χρησιμοποιούνται για την κατασκευή ενός χρωμοσώματος.

Οι παραπάνω μέθοδοι βασίζονται σε ακολουθητικούς γενετικούς αλγόριθμους. Εκτός από τους ακολουθητικούς γενετικούς αλγόριθμους, ο παραλληλισμός είναι ένα επιπλέον πλεονέκτημα των γενετικών αλγόριθμων. Δεν επιταχύνει μόνο την εκτέλεση, αλλά και βελτιώνει την αποτελεσματικότητα της σύγκλισης. Όμως, ο παραλληλισμός δεν βελτιώνει την ποιότητα της λύσης. Για την βελτίωση της ποιότητας της επίλυσης έχει προταθεί μία νήσος παράλληλων γενετικών αλγόριθμων (iPGA) (**Anbarasu et al., 2000; Luo et al., 2011**). Έχει εμπνευστεί από τη φυσική διαδικασία μετανάστευσης. Με αυτή την προσέγγιση, ο συνολικός πληθυσμός γενετικού αλγόριθμου υποδιαιρείται σε έναν αριθμό υποπληθυσμών και κάθε ένας από αυτούς ανατίθεται σε διαφορετικούς επεξεργαστές που συνδέονται μεταξύ τους. Εάν το μέγεθος του υποπληθυσμού είναι n και ο αριθμός των επεξεργαστών είναι P , τότε το σύνολο του μεγέθους των πληθυσμών είναι $n \times P$. Ο αρχικός υποπληθυσμός σε κάθε επεξεργαστή δημιουργείται τυχαία. Το καλύτερο μέρος αυτής της προσέγγισης είναι η μετανάστευση, όπου επιτρέπεται ένας συγκεκριμένος αριθμός μεταναστών ενός υποπληθυσμού να μεταπηδήσει σε άλλο υποπληθυσμό ενός άλλου επεξεργαστή, εφόσον έχει εκτελέσει συγκεκριμένο αριθμό γενεών. Η μετανάστευση συνεχίζεται ξεχωριστά για κάθε υποπληθυσμό για ένα συγκεκριμένο αριθμό γενεών. Μία τεχνική επικάλυψης γενεών χρησιμοποιείται όπου ο μισός πληθυσμός γονέων επιβιώνει στην επόμενη γενιά και ο πληθυσμός παιδιών αντικαθιστά το υπόλοιπο μισό των πιο αδύναμων ατόμων κατά τη διάρκεια κάθε γενιάς.

Σήμερα, η πολλαπλή συστοίχιση ακολουθιών δεν θεωρείται ερευνητικό πρόβλημα μιας μοναδικής αντικειμενικής βελτιστοποίησης, αλλά αντιμετωπίζεται σαν πρόβλημα βελτιστοποίησης πολλαπλών στόχων. Με αυτή την τεχνική, κάθε κριτήριο, που χρειάζεται βελτιστοποίηση αντιμετωπίζεται σαν ξεχωριστή αντικειμενική λειτουργία. Η βέλτιστη λύση μιας πολλαπλής συστοίχισης ακολουθιών δεν λαμβάνεται θεωρώντας μόνο ένα κριτήριο όπως η βαθμολογία συστοίχισης αλλά επιτυγχάνεται βελτιστοποιώντας πολλαπλά κριτήρια ταυτόχρονα, όμως η βελτίωση ενός αντικειμένου μπορεί να επηρεάσει ένα άλλο ή περισσότερα αντικείμενα. Για παράδειγμα, μία πολλαπλή συστοίχιση ακολουθιών με καλύτερη βαθμολογία συστοίχισης, μπορεί να περιλαμβάνει ένα μεγάλο αριθμό κενών, που είναι βιολογικά ασήμαντα, ή μπορεί να περιλαμβάνει χαμηλότερο αριθμό διατηρημένων στηλών σε μία συστοίχιση, γεγονός που είναι επίσης ανεπιθύμητο. Επομένως, η λήψη αποτελέσματος έχοντας όλα τα αντικείμενα ταυτόχρονα βελτιστοποιημένα είναι

σχεδόν αδύνατη. Αντιθέτως, θεωρείται ένα σύνολο λύσεων όπως έχει προσδιοριστεί σε βελτιστοποίηση πολλαπλών στόχων (**Zhou et al., 2011**). Το πιο σημαντικό χαρακτηριστικό αυτής της τεχνικής είναι η διαδικασία επιλογής που βασίζεται σε επιλογή μη επικρατέστερου αποτελέσματος. Αυτά τα μη επικρατέστερα σύνολα αποτελεσμάτων ονομάζονται βέλτιστα αποτελέσματα Pareto. Τα σύνολα αποτελεσμάτων Pareto αποτελούνται από όλα τα αποτελέσματα όπου δεν υπάρχουν άλλα αποτελέσματα που μπορούν να βελτιώσουν τις λειτουργίες αντικειμένων χωρίς να επηρεάσουν άλλα αντικείμενα (**Ehrgott, 2005**). Με άλλα λόγια, για τον καθορισμό της κυριαρχίας, ένα αποτέλεσμα x_1 κυριαρχεί έναντι σε ένα άλλο αποτέλεσμα x_2 εάν δύο από τις παρακάτω συνθήκες αληθεύουν: α) το αποτέλεσμα x_1 δεν είναι χειρότερο από το x_2 σε όλα τα αντικείμενα ή β) το αποτέλεσμα x_1 είναι αυστηρά καλύτερο από το x_2 σε τουλάχιστον ένα αντικείμενο. Επομένως, είναι πολύ δύσκολο να επιτευχθεί από υπολογιστικής απόψεως.

Πρόσφατα, λίγη εργασία έχει γίνει σε πολλαπλά αντικείμενα πολλαπλής συστοίχισης ακολουθιών (MMSA) όπου οι γενετικοί αλγόριθμοι χρησιμοποιούνται σαν βελτιστοποιητής διαφορετικών αντικειμένων. Το MO-SAStre (**Ortuño et al., 2013**) βασίζεται σε γενετικούς αλγόριθμους μη κυρίαρχης ταξινόμησης που θεωρούν τρεις αντικειμενικές λειτουργίες: τη βαθμολογία STRIKE, το ποσοστό μη κενών και το σύνολο συντηρημένων στηλών. Η βαθμολογία STRIKE (**Kemena et al., 2011**) βοηθά στην ακρίβεια της συστοίχισης χρησιμοποιώντας τουλάχιστον μία γνωστή δομή, που έχει ανακτηθεί από την PDB (**Berman et al., 2000**). Βρίσκει τις επαφές ανάμεσα στα αμινοξέα σε μία συστοίχιση θεωρώντας τη δομή. Αυτή η μέθοδος έχει αποδειχθεί αρκετά υποσχόμενη μέθοδος συστοίχισης αλλά το μειονέκτημα της είναι η περιορισμένη διαθεσιμότητα τρισδιάστατων δομών. Σε μία άλλη προσέγγιση πολλαπλών αντικειμένων, την MSAGMOGA (**Kaya et al., 2014**), ο μεγάλος αριθμός μη κυρίαρχων συστοίχισεων επιτυγχάνεται σε σχέση με τρεις στόχους: ελαχιστοποίηση ποινής συγγενούς κενού, μεγιστοποίηση ομοιότητας και μεγιστοποίηση υποστήριξης. Η ομοιότητα πραγματοποιείται δημιουργώντας PWMs για την παρατήρηση της αξίας κυριαρχίας κάθε καταλοίπου για την αντιπροσώπευση σε στήλη συστοίχισης. Με την μεγιστοποίηση υποστήριξης, καθορίζεται η συμπερίληψη ενός αριθμού ακολουθιών σε μία συστοίχιση, όπου αυξάνει την ποιότητα. Μεγαλύτερη αξία υποστήριξης σημαίνει ισχυρότερη κάλυψη συστοίχισης από τις συμπεριλαμβανόμενες ακολουθίες. Επίσης, έχει χρησιμοποιηθεί παράλληλος γενετικός αλγόριθμος για την πολλαπλή συστοίχιση ακολουθιών για την επίλυση με πολλαπλά αντικείμενα. Ο παράλληλος Niche Pareto Alinea γενετικός αλγόριθμος (**Da Silva et al., 2011**) είναι ένα παράδειγμα γενετικού αλγόριθμου πολλαπλών αντικειμένων που ερευνά για προσόψεις Pareto. Αυτή η προσέγγιση λαμβάνει υπόψιν το σύνολο ζευγών και την αναγνώριση των συστοίχισεων και βοηθά στην διανομή πληθυσμών αποτελεσμάτων και έτσι αυξάνει την ποικιλότητα του πληθυσμού. Έτσι, επιτρέπεται η παράλληλη σύγκλιση διαφορετικών καλών αποτελεσμάτων από

τη μείωση αποτελεσμάτων με υψηλή ομοιότητα. Όλες οι παραπάνω μέθοδοι που βασίζονται σε γενετικούς αλγόριθμους βασίζονται κυρίως στην λειτουργία μετάλλαξης, καθώς παίζει σημαντικό ρόλο στην επίλυση προβλημάτων πολλαπλής συστοίχισης ακολουθιών. Το αντικείμενο της λειτουργίας μετάλλαξης είναι η διατήρηση της ποικιλότητας εντός ενός πληθυσμού χρωμοσωμάτων και έτσι να μειώσει την πιθανότητα πρόωρης σύγκλισης σε ένα τοπικό βέλτιστο αποτέλεσμα. Η μετάλλαξη εκμεταλλεύεται το χώρο αναζήτησης προκαλώντας τυχαία μονοπάτια μέσα σε αυτό.

Σε μία συστοίχιση, οι βιολογικές ακολουθίες αποτελούνται από κατάλοιπα και ένα πιθανό αριθμό κενών. Επομένως, για την βελτιστοποίηση ενός αποτελέσματος πολλαπλής συστοίχισης ακολουθιών, είναι απαραίτητη η βελτιστοποίηση της διευθέτησης και του αριθμού κενών μέσα στην συστοίχιση. Η μετάλλαξη δεν λειτουργεί μέσω εισαγωγής, διαγραφής, αύξησης, μείωσης, συγχώνευσης, διαχωρισμού και ανάμιξης των κενών στις συστοιχισμένες ακολουθίες.

Στην διαδικασία εισαγωγής κενού, μία ακολουθία από σύνολο ακολουθιών σε μία συστοίχιση επιλέγεται τυχαία και μία δέσμη κενών διαφόρων μεγεθών εισάγεται σε τυχαία θέση σε αυτή την ακολουθία (Arenas et al., 2009; Da Silva et al., 2011; Gondro and Kinghorn, 2007; Narimani et al., 2012). Το μέγεθος της δέσμης κενών επίσης επιλέγεται τυχαία. Σε άλλο εναλλακτικό τρόπο, οι ακολουθίες στην συστοίχιση χωρίζονται οριζοντίως σε δύο ομάδες, όπου η πρώτη ομάδα περιέχει μερικούς αριθμούς ακολουθιών και η άλλη περιέχει τις ακολουθίες που απομένουν. Για κάθε μία από τις δύο ομάδες, ένα κενό με τυχαίο μήκος εισάγεται σε όλες τις ακολουθίες της ομάδας στην ίδια θέση που έχει επιλεγεί τυχαία. Για την διαγραφή κενού επιλέγεται μία ακολουθία τυχαία από τη συστοίχιση και μία δέσμη κενών. Στη συνέχεια διαγράφεται η δέσμη κενών από την ακολουθία (Arenas et al., 2009; Gondro and Kinghorn, 2007) και εάν δεν βρεθεί κανένα κενό τότε η ακολουθία παραμένει αμετάβλητη. Οι λειτουργίες αύξησης και μείωσης κενών είναι εντελώς αντίθετες μεταξύ τους. Αρχικά και στις δύο λειτουργίες επιλέγεται μία δέσμη κενών με διάφορα μήκη από τυχαία ακολουθία και στη συνέχεια ο διαχειριστής αύξησης αυξάνει το μέγεθος του κενού προσθέτοντας επιπλέον κενά στη δέσμη. Αντιθέτως, ο διαχειριστής μείωσης μειώνει το μέγεθος κενών αφαιρώντας ένα κενό (Arenas et al., 2009; Gondro and Kinghorn, 2007; Kaya et al., 2014; Narimani et al., 2012). Στην λειτουργία διαχωρισμού κενών επιλέγεται μία δέσμη κενών, διαχωρίζεται το μήκος των κενών καθέτως στα δύο, και μετακινείται το ένα μέρος στα δεξιά και το άλλο στα αριστερά. Ο διαχωρισμός μπορεί να γίνει και οριζοντίως χωρίζοντας την συστοίχιση στα δύο όπου το ένα μέρος περιέχει έναν αριθμό ακολουθιών και το άλλο μέρος τις υπόλοιπες ακολουθίες και στη συνέχεια μετακινείται μία δέσμη κενών της μίας ομάδας αριστερά ή δεξιά. Στην λειτουργία ανάμιξης κενών καθορίζεται η αλλαγή της θέσης των κενών τυχαία σε μία συστοίχιση. Σε μία τυχαία ακολουθία, ο διαχειριστής επιλέγει μία δέσμη κενών τυχαία και στη συνέχεια επιλέγεται τυχαία θέση σε αυτή την ακολουθία. Η δέσμη των κενών μετακινείται αργότερα στην επιλεγμένη θέση.

2.1.4.8. Συγκριτική αξιολόγηση

Για την αποτελεσματική αξιολόγηση διαφορετικών εργαλείων συστοίχισης, χρειάζεται να υπάρχουν ακολουθίες με συγκριτική αξιολόγηση και σταθερές συστοιχίσεις αναφοράς αυτών των ακολουθιών. Για την αξιολόγηση της απόδοσης διαφορετικών αυτοματοποιημένων εργαλείων συστοίχισης είναι απαραίτητη η εύρεση ποσοτικής ακρίβειας σχετικά με τις σταθερές συστοιχίσεις αναφοράς. Δημοφιλείς βάσεις δεδομένων συγκριτικής αξιολόγησης συστοιχίσεων αναφοράς είναι οι BAliBASE (Thompson et al., 1999) και HOMSTRAD (Mizuguchi et al., 1998). Ένας αριθμός σύγχρονων βάσεων δεδομένων συστοίχισης βασίζονται σε αυτοματοποιημένα πρωτόκολλα δομικής συστοίχισης και μερικές από αυτές είναι οι SABmark (Van et al., 2005), PREFAB (Edgar, 2004), OxBench (Raghava et al., 2003) και BAliBASE v.3 (Thompson et al., 2005). Μεταξύ των παραπάνω η πιο διαδεδομένη βάση δεδομένων είναι η BAliBASE.

2.1.5. Φυλογενετική ανάλυση

Η βιολογική έρευνα έχει μεταβληθεί ταχύτατα τις τελευταίες δεκαετίες, κυρίως ακολουθώντας την απογείωση της τεχνολογίας αλληλούχισης επόμενης γενιάς (next-generation sequencing - NGS) (Mardis, 2008). Αυτή η αλλαγή οφείλεται κυρίως στο ότι η NGS μειώνει δραματικά το κόστος αλληλούχισης, επιταχύνει την διαδικασία και αναπαράγει αποτελέσματα αλληλούχισης DNA υψηλής απόδοσης. Επιπλέον, η πρόοδος σε αρκετά πεδία “-ομικής” επιστήμης οδήγησε τη βιολογική έρευνα σε μία νέα εποχή βιοπληροφορικής, συστήματος βιολογίας και βιολογία δικτύωσης. Λόγω της εποχής των δεδομένων, η βιολογική έρευνα έχει μετατοπιστεί από τη γενιά των δεδομένων ακολουθιών στην αποτελεσματικότητα και ισχύ ανάλυσης. Η μοριακή φυλογενετική ανάλυση είναι η πειθαρχημένη μελέτη των εξελικτικών σχέσεων μεταξύ οργανισμών, χρησιμοποιώντας μοριακές ακολουθίες. Οι αναλυτικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στην μοριακή φυλογενετική αναπτύχθηκαν αρχικώς για να αποκαλύψουν εξελικτικά μονοπάτια, ενώ στις μέρες μας η φυλογενετική ανάλυση χρησιμοποιείται σε διάφορα ερευνητικά πεδία, όπως η συστηματική βιολογία και η βιοποικιλότητα (Senes-Guerrero and Schübler, 2016), η μοριακή επιδημιολογία (Baele et al., 2016; Bentley and Parkhill, 2015; Kenah et al., 2016), η αναγνώριση λειτουργιών των γονιδίων (Chang et al., 2004), και η αναγνώριση μικροβίων σε έρευνες μικροβιώματος (Carrillo-Araujo et al., 2015.; Martiny et al., 2015). Για αυτούς τους λόγους, η φυλογενετική ανάλυση είναι ένα θεμελιώδες πεδίο της έρευνας, από όπου οι περισσότεροι βιολόγοι αντλούν βασικές γνώσεις.

2.1.5.1 Φυλογενετικό δένδρο

Φυλογενετικό δέντρο ή φυλογένεια είναι ένα διάγραμμα σε σχήμα δέντρου που χρησιμοποιείται για την απεικόνιση εξελικτικών σχέσεων μεταξύ ενός συνόλου λειτουργικών ταξινομικών μονάδων (OTU). Οι ταξινομικές μονάδες γενικά αντιπροσωπεύουν ένα είδος, αλλά μπορεί να αντιπροσωπεύουν και μεμονωμένους οργανισμούς σε ένα πληθυσμό, μία γονιδιακή ή πρωτεϊνική ακολουθία ή μια κατηγορία ταξινόμησης σε μία ταξινομική τάξη, όπως οικογένεια, γένος, τάξη, φύλο κ.ο.κ. Το δέντρο αποτελείται από κόμβους και κλάδους. Οι κόμβοι στις άκρες του δέντρου ονομάζονται εξωτερικοί κόμβοι και χρησιμοποιούνται για την αντιπροσώπευση των ταξινομικών μονάδων. Άλλοι τύποι κόμβων, όπως οι εσωτερικοί κόμβοι αντιπροσωπεύουν ένα πρόσφατο κοινό πρόγονο. Οι μεταξύ τους γραμμές, που ονομάζονται κλάδοι, χρησιμοποιούνται για να ενώσουν νεότερους ή παλαιότερους κόμβους και δείχνουν τις εξελικτικές σχέσεις μεταξύ της ταξινομικής βαθμίδας. Ένα κλαδί που συνδέει δύο εσωτερικούς κόμβους είναι ένας εσωτερικός κλάδος που δείχνει μία αρχαία συγγένεια. Αντιστρόφως, το κλαδί που συνδέει ένα εσωτερικό κόμβο με έναν εξωτερικό και δείχνει μία νεότερη συγγένεια, ονομάζεται εξωτερικός κλάδος.

Το βαθύτερο κλαδί του δέντρου αντιπροσωπεύει τη ρίζα ή τον πιο κοινό πρόσφατο πρόγονο όλης της ταξινομικής βαθμίδας στο δέντρο. Γενικά, τα λογισμικά φυλογενετικής ανάλυσης μπορούν να ανασκευάσουν ένα δέντρο χωρίς ρίζα ή ένα δέντρο που δείχνει ποια μονάδα είναι στενά συνδεδεμένη με κάποια άλλη. Για το μεγαλύτερο νόημα σε ένα εξελικτικό πλαίσιο, το δέντρο με ρίζα ανασκευάζεται μέσω αναγνώρισης της καταγωγής όλης της ταξινομικής βαθμίδας. Ο καλύτερος τρόπος για την κατασκευή ρίζας σε ένα φυλογενετικό δέντρο είναι μέσω πρόσθεσης μίας εξωτερικής ομάδας στο σύνολο δεδομένων. Θεωρητικά, η ρίζα του δέντρου βρίσκεται μεταξύ της εξωτερικής ομάδας και της υπόλοιπης ταξινομικής βαθμίδας. Συνεπώς, η καλύτερη εξωτερική ομάδα είναι ένας οργανισμός ή μία ομάδα οργανισμών που έχουν προσφάτως απομακρυνθεί από τους εναπομείναντες οργανισμούς στο δέντρο. Εάν η εξωτερική ομάδα είναι άγνωστη ή η ιδανική εξωτερική ομάδα δεν είναι διαθέσιμη ή δεν υπάρχουν δεδομένα για συγγενικά είδη, το μεσαίο σημείο του μεγαλύτερου κλάδου σε μήκος στο δέντρο, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν ρίζα του δέντρου.

Το μοτίβο διακλάδωσης που χωρίζει δύο κόμβους ονομάζεται διακλάδωση ή διχοτόμηση. Αυτό ταιριάζει με την έννοια της εξελικτικής ανάπτυξης, όπου οι οργανισμοί χωρίζονται από ένα κοινό πρόγονο σε δύο νέα είδη. Το δέντρο που περιέχει μόνο κόμβους διακλάδωσης είναι ένα πλήρως επιλυμένο δέντρο. Εάν ένας πιο βαθύς κόμβος διακλαδώνεται σε περισσότερους από δύο νέους κόμβους (τρεις ή περισσότερους, αυτό το μοτίβο διακλάδωσης λέγεται πολύτομη.

Για την ορθή ανάγνωση ενός δέντρου, χρειάζεται να γίνει κατανοητό ότι όλοι οι κλάδοι ενός δέντρου μπορούν να περιστραφούν γύρω από ένα κόμβο ενώ διατηρείται το ίδιο νόημα για το

περιεχόμενο της εξελικτικής σχετικότητας. Μερικές φυλογένειες χωρίς ρίζα σχεδιάζονται σε σχήμα αστεριού, που ονομάζεται δέντρο αστέρας (star tree). Σε αυτή την περίπτωση όλα τα κλαδιά μπορούν επίσης να περιστραφούν και οι γωνίες όλων των κόμβων δεν έχουν κανένα νόημα. Ένα φυλογενετικό δέντρο ομαδοποιεί τις ταξινομικές βαθμίδες βασιζόμενο στις εξελικτικές σχέσεις τους. Οι ταξινομικές βαθμίδες που είναι στενά συνδεδεμένες ομαδοποιούνται μεταξύ τους και μοιράζονται ένα προσφάτως κοινό πρόγονο, ενώ οι πιο μακρινά σχετιζόμενες ταξινομικές μονάδες μοιράζονται ένα πιο παλιό κοινό πρόγονο. Όλες οι ταξινομικές βαθμίδες που κατάγονται από τον ίδιο πρόγονο συγκροτούν μία μονοφυλετική ομάδα ή κλάδο. Όμως, μία ομάδα οργανισμών που μοιράζονται ένα κοινό πρόγονο, αλλά δεν περιέχουν όλα τα μέλη που κατάγονται από αυτό τον πρόγονο ονομάζονται παραφυλετική ομάδα. Ένας άλλος τύπος φυλογενετικής ομάδας είναι οι πολυφυλετικές ομάδες. Αυτός ο όρος αναφέρεται σε ομάδες ταξινομικών βαθμίδων που είναι ομοιοπλαστικές. Αυτό σημαίνει ότι δεν προέκυψαν από κοινό πρόγονο και ο όρος χρησιμοποιείται συχνά για την περιγραφή συγκλίνουσας εξέλιξης.

Η μοριακή φυλογενετική ανάλυση πρέπει να ξεκινά με ένα σύνολο ομόλογων ακολουθιών. Η ομολογία στις μοριακές ακολουθίες βασίζεται στις ακολουθίες που έχουν προκύψει από τον ίδιο πρόγονο. Με βάση τα παραπάνω, η μοριακή ομολογία μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε τρεις διαφορετικούς τύπους που βασίζονται στους γενετικούς μηχανισμούς που διαχωρίζουν τις θυγατρικές ακολουθίες. Ο πρώτος τύπος είναι τα ορθολογικά γονίδια. Αυτό σημαίνει ότι η ακολουθία ήταν παρούσα στο γονιδίωμα ενός προγόνου και μεταφέρθηκε σε νέα είδη μέσω εξελικτικής ανάπτυξης. Αυτός ο τύπος γονιδίου είναι δυνητικά ενημερωτικός για τη μοριακή φυλογένεια. Αντιστρόφως, μερικά γονίδια είναι αντίγραφα άλλων γονιδίων στο ίδιο γονιδίωμα και ονομάζονται παράλογα γονίδια, τα οποία μπορούν να προκαλέσουν σύγχυση στην ανακατασκευή του δέντρου. Τελικά, ο τύπος των ομόλογων γονιδίων που πρέπει να αποφεύγονται στην μοριακή φυλογενετική ανακατασκευή είναι τα ξενολογικά γονίδια. Αυτά τα γονίδια προέρχονται από κατακόρυφη μεταφορά γονιδίων από ένα είδος στο άλλο. Αυτός ο τύπος γονιδίων μπορεί να είναι προβληματικός για την ανακατασκευή ενός δέντρου γονιδίων και συνήθως αποφεύγονται.

2.1.5.2. Μοριακές μέθοδοι για την κατασκευή φυλογενετικού δέντρου

Τις τελευταίες δεκαετίες, οι ακολουθίες DNA έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως σαν μοριακοί χαρακτήρες για την ανακατασκευή φυλογενετικών δέντρων, ξεπερνώντας τη χρήση μορφολογικών χαρακτήρων (Lumbsch and Leavitt, 2011), λόγω του ότι οι βάσεις της ακολουθίας του DNA, που μπορεί να είναι μόνο αδερίνη, θυμίνη, κυτοσίνη ή γουανίνη είναι πολύ πιο ξεκάθαρες από τις μορφολογικές βάσεις. Επίσης, οι μοριακές ακολουθίες παρέχουν ένα μεγάλο αριθμό χαρακτήρων για τη φυλογενετική ανάλυση. Για παράδειγμα, ο φαινότυπος ο οποίος ορίζεται από ένα μόνο γονίδιο ή

από μια ομάδα γονιδίων μπορεί να αναγνωριστεί ως ένας χαρακτήρας, αλλά σχεδόν όλες οι θέσεις σε μία ακολουθία γονιδίου DNA είναι χρήσιμες για την φυλογενετική ανάλυση. Επιπλέον, η φυλογένεια που βασίζεται στην ακολουθία επιτρέπει στους ερευνητές να συγκρίνουν οργανισμούς σε υψηλότερες ταξινομικές βαθμίδες, όπως η κλάση, το φύλο ή ακόμα και το βασίλειο, παρά την έλλειψη των μορφολογικών χαρακτηριστικών.

Οι ριβοσωμικές RNA (rRNA) ακολουθίες στην μικρότερη υποομάδα του ριβοσώματος είναι τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μοριακές περιοχές στις φυλογενετικές αναλύσεις (Case et al., 2007; Ettoumi et al., 2013; Yarza et al., 2014). Υπάρχουν πολλοί λόγοι για τους οποίους οι μικρές υποομάδες είναι πολύ ισχυροί δείκτες (Nadler, 1995; Poretsky et al., 2014). Αρχικά είναι ένα αρχαίο μόριο το οποίο εμφανίστηκε κατά τα πρώτα στάδια της ζωής και κωδικοποιεί λειτουργίες η οποίες είναι απαραίτητες για την επιβίωση όλων των κυτταρικών οργανισμών. Επομένως είναι παρόντα σε όλους τους μικροοργανισμούς. Αυτό επιτρέπει σε διαφορετικούς οργανισμούς χωρίς κοινή μορφολογία να συγκριθούν. Δεύτερον, αυτό το μόριο έχει μεταφερθεί οριζοντίως με μικρό βαθμό μετάλλαξης. Αυτό σημαίνει ότι οι μικρές υποομάδες έχουν διατηρηθεί στην ακολουθία, τη δομή και τη λειτουργία. Τρίτον, μία ακολουθία μικρών υποομάδων έχει πολλαπλές διαφορετικές περιοχές, οι οποίες είναι όλες συσσωρευμένες σε διατηρημένες δέσμες. Το γεγονός αυτό είναι πολύ βολικό για την εύρεση ολιγονουκλεοτιδικών primer για την ενίσχυση μέρους DNA μικρής υποομάδας για τον έλεγχο της ποικιλότητας των ακολουθιών. Επίσης, υπάρχουν αρκετοί άλλοι δείκτες ακολουθιών που είναι δυναμικά χρήσιμοι και έχουν χρησιμοποιηθεί για φυλογενετικές αναλύσεις. Γενικώς, ένας δυναμικά χρήσιμος δείκτης ακολουθίας θα έπρεπε να είναι ένα μοναδικό αντίγραφο και να εντοπίζεται είτε στο γονιδίωμα, είτε στο nucleus ή τα organelles (Zhang et al., 2012), όπως τα μιτοχονδριακά γονιδιώματα ή τα γονιδιώματα πλαστιδίου, τα οποία μπορεί να είναι κωδικοποιημένες ή μη κωδικοποιημένες ακολουθίες.

Το δέντρο το οποίο δημιουργείται από ένα γονίδιο, ονομάζεται δέντρο γονιδίου. Υπό φυσιολογικές συνθήκες ένα γονιδιακό δέντρο έχει τη δυνατότητα να απεικονίσει την εξελικτική ιστορία αυτού του γονιδίου, η οποία δεν είναι απαραίτητα όμοια με την εξελικτική ιστορία του είδους που ανήκει. Σε τέτοια περίπτωση, είναι πιθανό η τοπολογία του γονιδίου στο δέντρο να μην είναι ταυτόσημη με το δέντρο του είδους.

Η ανακατασκευή φυλογενετικού δέντρου που βασίζεται σε πολλαπλά γονίδια είναι ένας εναλλακτικός τρόπος για την βελτίωση της απεικόνισης του γενετικού δέντρου και την αποφυγή προκαταλήψεων που υπάρχουν σε δέντρα που έχουν αναπαραχθεί από ένα γονίδιο. τα φυλογενετικά σήματα από διαφορετικά γονίδια μπορούν να συνδυαστούν με τη συνένωση όλων των

συστοιχισμένων ακολουθιών. Αυτή η προσέγγιση έχει στόχο την ενσωμάτωση του σήματος από κάθε γονίδιο για να το κάνει πιο έντονο.

Ο όρος σπάνιες γενομικές μεταβολές (rare genomics changes-RGCs) (**Rokas and Holland, 2000**), ο οποίος αναφέρεται σε περιοχές του γονιδιώματος των οργανισμών σε συγκεκριμένο κλάδο που έχουν σπάνιες μεταλλαξιακές αλλαγές, οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν δείκτες στη μοριακή φυλογένεια και εξέλιξη. Μερικά παραδείγματα σπάνιων γενομικών μεταβολών περιλαμβάνουν εισαγωγές ή διαγραφές, υπογραφές ακολουθιών και αλλαγή στη σύνθεση των αμινοξέων, που δείχνει την δυναμική των σπάνιων γενομικών μεταβολών ως πληροφοριακοί δείκτες (**Ajawatanawong and Baldauf, 2013; Baldauf and Palmer, 1993; Chernikova et al., 2011; Janecka et al., 2007**). Έχουν γίνει προσπάθειες με τη χρήση σπάνιων γενομικών αλλαγών ως δεδομένα για την ανακατασκευή φυλογενετικών δέντρων αλλά είναι πολύ δύσκολο να μετρηθεί ο βαθμός εξέλιξης σε αυτούς τους δείκτες και δεν υπάρχει αποδεκτή μέθοδος ποσοτικοποίησης τους.

2.1.5.3. Ανακατασκευή φυλογένεσης

Οι μέθοδοι φυλογενετικής ανακατασκευής μπορούν να κατηγοριοποιηθούν με βάση τις δύο κύριες προσεγγίσεις τους, τις μεθόδους που βασίζονται στην απόσταση (distance-based methods) και τις μεθόδους που βασίζονται στους χαρακτήρες (character-based methods). Η ιδέα πίσω από τις μεθόδους που βασίζονται στην απόσταση, είναι ο μετασχηματισμός όλων των πληροφοριών των ακολουθιών μέσα σε ένα πίνακα αποστάσεων, τα οποία στη συνέχεια αναλύονται χρησιμοποιώντας έναν αλγόριθμο για την κατηγοριοποίηση των ταξινομικών βαθμίδων. Η κατασκευή ενός δέντρου με αυτό τον τρόπο είναι ταχύτερη διαδικασία, αλλά όλες οι πληροφορίες ακολουθιών χάνονται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας. Η μέθοδος που βασίζεται στους χαρακτήρες είναι χρονοβόρα διότι όλες οι πληροφορίες ακολουθιών χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση του καλύτερου φυλογενετικού δέντρου. Ο υπολογισμός των φυλογενετικών δέντρων χρησιμοποιώντας αυτή τη μέθοδο μπορεί να εκτελεστεί χρησιμοποιώντας διάφορες προσεγγίσεις, όπως οι maximum parsimony (MP) ή maximum likelihood (ML).

2.1.5.3.1. Μέθοδοι κατασκευής φυλογενετικών δέντρων που βασίζονται στην απόσταση

Η κεντρική ιδέα πίσω από τις μεθόδους πινάκων αποστάσεων είναι η μετατροπή μίας συστοίχισης ακολουθιών σε ζεύγη σε τιμές απομάκρυνσης. Λόγω του ότι μία πολλαπλή συστοίχιση ακολουθιών πρέπει να περιλαμβάνει τρεις ή περισσότερες ακολουθίες, οι τιμές αποστάσεων από όλες τις δυνατές ακολουθίες σε ζεύγη αναπαράγουν ένα πίνακα αποστάσεων. Με την ανάπτυξη του πίνακα, η συστοίχιση δεν χρησιμοποιείται πια για την φυλογενετική ανακατασκευή. Σε αυτό το σημείο, ο πίνακας χρησιμοποιείται σαν εισαγόμενα δεδομένα για την κατασκευή του δέντρου.

Διαφορετικές προσεγγίσεις κατασκευής δέντρου που έχουν χρησιμοποιηθεί περιλαμβάνουν την μέθοδο ομάδας ζεύγους χωρίς ζύγιση με αριθμητικό μέσο όρο (UPGMA), την μέθοδο ομάδων ζεύγους με ζύγιση με αριθμητικό μέσο όρο (WPGMA), την μέθοδο γειτονικής ένωσης (neighbor-joining), την μέθοδο ελάχιστων τετραγώνων (least square) και τις μεθόδους ελάχιστης εξέλιξης (minimum evolution).

Για την εξαγωγή συμπερασμάτων της εξέλιξης της ακολουθίας, υποδείγματα αντικατάστασης χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της τιμής απόστασης. Η πιο απλή μέθοδος, η οποία μπορεί να εξάγει συμπεράσματα για την απόσταση νουκλεοτιδικών και πρωτεϊνικών ακολουθιών, είναι η μέθοδος p-distance. Αυτή η μέθοδος βασίζεται στο επίπεδο ομοιότητας των ακολουθιών για κάθε ζεύγος στην συστοίχιση. Τα υποδείγματα Jukes-Cantor's one-parameter (JC69) υποθέτουν ότι όλες οι αλλαγές στα νουκλεοτίδια προκύπτουν με την ίδια αναλογία (**Jukes and Cantor, 1969**), ενώ τα υποδείγματα Kimura's two parameters (K80) αντιμετωπίζουν εμφάνιση μεταβάσεων και μετατροπών ως διαφορετικές αναλογίες (**Kimura, 1980**). Τα υποδείγματα των παραπάνω μεθόδων υποθέτουν και στις δύο μεθόδους ότι η υποκατάσταση νουκλεοτιδίων κινείται προς μία ισορροπία, που σημαίνει ότι η συχνότητα κάθε νουκλεοτιδίου είναι κοντά στο 0.25. Στην περίπτωση που δεν υφίσταται ισορροπία, χρειάζεται η πρόσληψη άλλου υποδείματος αντικατάστασης, το οποίο ταιριάζει στις μεταλλάξεις που παρατηρούνται. Χρησιμοποιώντας το κατάλληλο υπόδειγμα για την ανακατασκευή του φυλογενετικού δέντρου είναι σημαντική η αποφυγή σφαλμάτων στο στάδιο κατηγοριοποίησης. Υπάρχουν διάφορα πακέτα λογισμικού που έχουν χρησιμοποιηθεί για την δοκιμασία της δυνατότητας εφαρμογής του σχετικού υποδείματος έναντι της πολλαπλής συστοίχισης ακολουθιών, όπως το jModelTest (**Posada, 2008**).

Η εξαγωγή συμπερασμάτων με πρωτεϊνικά υποδείγματα είναι πιο πολύπλοκη διαδικασία. Αυτό συμβαίνει διότι οι μεταβολές στις ακολουθίες πρωτεϊνών είναι αποτέλεσμα αντικαταστάσεων στο DNA. Παρόλα αυτά, έχουν γίνει προσπάθειες για την παρατήρηση αντικατάστασης αμινοξέων σε πρωτεϊνικές ακολουθίες, χρησιμοποιώντας πίνακα αντικατάστασης πρωτεΐνης. Κυρίως, υπάρχουν δύο προσεγγίσεις με πίνακα που χρησιμοποιούνται σε λογισμικά ανάλυσης ακολουθιών, όπως τα λογισμικά φυλογενετικής ανάλυσης. Η μία προσέγγιση είναι ο πίνακας ποσοστών αποδεκτής μετάλλαξης (PAM) (**Dayhoff et al., 1978**) και η άλλη είναι ο πίνακας δεσμών αντικατάστασης (BLOSUM) (**Henikoff and Henikoff, 1992**).

Το κύριο πλεονέκτημα των μεθόδων που βασίζονται σε πίνακες αποστάσεων είναι η γρήγορη ταχύτητα υπολογισμού. Ο ταχύτερος υπολογισμός είναι εφικτός επειδή η μέθοδος μειώνει δραματικά το ποσό δεδομένων από μία μακριά συστοίχιση ακολουθιών σε έναν απλό πίνακα αποστάσεων. Επιπλέον, αυτή η μέθοδος ίσως δίνει αξιόπιστα αποτελέσματα εάν οι ομοπλαστικές αλλαγές είναι

σπάνιες και διανέμεται τυχαία σε όλο το δέντρο. Όμως, η μείωση των δεδομένων οδηγεί σε απώλεια πληροφορίας ακολουθιών και μερικές φορές αναπαράγει αρνητικά μήκη κλάδων, τα οποία υστερούν βιολογικού νοήματος. Επομένως, οι μέθοδοι που βασίζονται στην απόσταση προτείνονται για μεγάλα σύνολα δεδομένων (>1000 ακολουθίες) με υψηλότερη ομοιότητα ακολουθιών.

2.1.5.3.2. Μέθοδοι κατασκευής φυλογενετικών δένδρων που βασίζονται στους χαρακτήρες

Υπάρχουν αρκετές μέθοδοι που έχουν αναπτυχθεί από προσεγγίσεις που βασίζονται στους χαρακτήρες, όπως οι μέθοδοι μέγιστης οικονομίας (maximum parsimony - MP), μέγιστης πιθανότητας (maximum likelihood - ML) και μέθοδοι συμπεράσματος Bayesian. Αυτές οι μέθοδοι έχουν ως στόχο την ανακατασκευή φυλογένειας απευθείας από τα δεδομένα της ακολουθίας, χωρίς καμία μεταμόρφωση. Πραγματοποιούν πολύ αργούς υπολογισμούς αλλά το τελικό αποτέλεσμα είναι αρκετά ακριβές. Ο αλγόριθμος που χρησιμοποιείται σε αυτές τις μεθόδους ξεκινά με βαθμολόγηση όλων των πιθανών φυλογενειών που μπορούν να αναπαραχθούν από ένα αριθμό ταξινομικών βαθμίδων και στη συνέχεια το βέλτιστο δέντρο θεωρείται πως είναι το δέντρο με την καλύτερη βαθμολογία. Είναι όμως σχεδόν αδύνατο να βαθμολογηθούν όλα τα δέντρα ξεχωριστά όταν ο αριθμός των ταξινομικών βαθμίδων είναι μεγαλύτερος του είκοσι, χρησιμοποιώντας μία μέθοδο που ερευνά όλα τα πιθανά δέντρα. Μερικοί αλγόριθμοι υπολογιστικών αναζητήσεων επιτρέπουν στο χρήστη να βαθμολογήσει και να επιλέξει από όλα τα πιθανά δέντρα ταυτόχρονα, και μειώνουν τον αριθμό πιθανών δέντρων παρακάμπτοντας τις θεωρητικά αδύνατες τοπολογίες από τα πιθανά δέντρα, με αποτέλεσμα την αύξηση της ταχύτητας αναζήτησης. Δύο δημοφιλείς αλγόριθμοι αναζήτησης, οι οποίοι είναι ενσωματωμένοι στα περισσότερα φυλογενετικά λογισμικά, είναι η μέθοδος “διακλάδωση-και-δέσμευση” (branch-and-bound) και η ευρετική (heuristic) μέθοδος. Η διαδικασία στην μέθοδο b-and-b, ξεκινά με την αναπαραγωγή ενός δέντρου πυρήνα, μία φυλογένεια με τρεις ταξινομικές βαθμίδες και στη συνέχεια μία νέα τυχαία ταξινομική βαθμίδα από το σύνολο δεδομένων προστίθεται στο δέντρο πυρήνα, και μόνο στα νέα δέντρα με βελτιωμένη βαθμολογία προστίθεται μία πέμπτη ταξινομική βαθμίδα. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται μέχρι ο αλγόριθμος να φτάσει την τελευταία ταξινομική βαθμίδα. Η ευρετική μέθοδος μοιάζει με την προηγούμενη μέθοδο, αλλά αντί να προστίθεται μία ταξινομική βαθμίδα σε κάθε δέντρο με βελτιωμένη βαθμολογία, χρησιμοποιείται μόνο ένα δέντρο με την μεγαλύτερη βαθμολογία σε κάθε γύρο πρόσθεσης ταξινομικής βαθμίδας.

Η μέθοδος MP είναι η παλαιότερη φυλογενετική μέθοδος. Σε αυτή την μέθοδο δεν χρησιμοποιείται μοντέλο υποκατάστασης για την ανακατασκευή φυλογενετικού δέντρου. Χρησιμοποιείται κυρίως για την κατασκευή δέντρων από δεδομένα που βασίζονται στη μορφολογία, όπου είναι δύσκολο να μετρηθεί ο βαθμός της εξελικτικής αλλαγής. Όταν εφαρμόζεται σε μοριακές

ακολουθίες, κάθε στήλη στην πολλαπλή συστοίχιση ακολουθιών αντιμετωπίζεται σαν ξεχωριστός χαρακτήρας. Παρόλο που κάθε μοριακή ακολουθία περιέχει αρκετούς χαρακτήρες, δεν είναι κάθε θέση χρήσιμη στην ανάλυση με αυτή τη μέθοδο. Οι στήλες στην πολλαπλή συστοίχιση ακολουθιών που έχουν περισσότερους από δύο τύπους νουκλεοτιδίων ή αμινοξέων ονομάζονται parsimony informative sites και μόνο αυτές συμπεριλαμβάνονται στην ανάλυση. Η μέθοδος αναζητά για το πιο “οικονομικό” δέντρο το οποίο απαιτεί τον ελάχιστο αριθμό βημάτων για την κατασκευή του. Η ανακατασκευή δέντρου με αυτή τη μέθοδο μπορεί να δώσει αξιόπιστα αποτελέσματα εάν προκύψει ομοπλασία στα δεδομένα ακολουθίας, τυχαία ή σπανίως. Επιπλέον, αυτή η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί με ευκολία σε οποιοδήποτε νέο τύπο δεδομένων, όπως η εισαγωγή ή διαγραφή θέσεων. Όμως, οι περισσότερες ακολουθίες δεν εξελίσσονται απλά σε χαμηλό βαθμό, με αποτέλεσμα να είναι δύσκολη η συστοίχιση ακολουθιών, κάνοντας τη μέθοδο λιγότερο αποτελεσματική, ειδικά όταν τα μοτίβα συστοίχισης είναι πολύπλοκα. Επίσης, είναι μία χρονοβόρα μέθοδος και δεν προτείνεται όταν συνδέονται πολλαπλές γονιδιακές ακολουθίες ή οι ακολουθίες έχουν υψηλό επίπεδο παραλλακτικότητας (Stewart, 1993).

Η μέθοδος μέγιστης πιθανότητας είναι η δεύτερη πιο δημοφιλής μέθοδος ανακατασκευής φυλογενετικού δέντρου. Είναι μία στατιστική μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό παραμέτρων ενός υποδείγματος και αρχικώς εφαρμόστηκε σε φυλογενετικές αναλύσεις DNA και πρωτεϊνικών ακολουθιών (Felsenstein, 1981). Με βάση αυτή τη μέθοδο, υπολογίζεται το μήκος των κλάδων και η τοπολογία του δέντρου με βάση το υπόδειγμα αντικατάστασης και την συστοίχιση ακολουθίας. Το αριθμητικό αποτέλεσμα της μεθόδου είναι η πιθανότητα ότι η τοπολογία του δέντρου και το υπόδειγμα ταιριάζουν στις ακολουθίες. Ο υπολογισμός επαναλαμβάνεται για όλες τις πιθανές τοπολογίες που μπορούν να αναπαραχθούν από έναν αριθμό ταξινομικών βαθμίδων. Η τοπολογία του δέντρου με την υψηλότερη τιμή μέγιστης πιθανότητας αναφέρεται ως το δέντρο μέγιστης πιθανότητας. Η μέθοδος θεωρείται αρκετά ακριβείς για το λόγο ότι βασίζεται αρκετά στο εξελικτικό υπόδειγμα. Εξαιτίας αυτού, όλα τα υποδείγματα αντικατάστασης μπορούν να χρησιμοποιηθούν στις μεθόδους πίνακα αποστάσεων και για την επιλογή του δέντρου. Με αυτή τη μέθοδο, χρησιμοποιούνται όλες οι πληροφορίες της ακολουθίας για τον υπολογισμό της τιμής μέγιστης πιθανότητας, όμως τα αποτελέσματα πραγματοποιούνται με αργό χρόνο υπολογισμού. Επίσης, η μέθοδος δεν είναι ιδιαίτερα πρακτική για μεγάλα σύνολα δεδομένων, λόγω του ότι ο υπολογισμός απαιτεί σημαντικούς υπολογιστικούς πόρους.

Η μέθοδος Bayesian στατιστικών είναι η νεότερη μέθοδος, και εφαρμόστηκε για την κατασκευή φυλογενετικών δέντρων τις τελευταίες δύο δεκαετίες (Rannala and Yang, 1996). Ο στόχος της μεθόδου είναι η αναζήτηση του δέντρου που μεγιστοποιεί την πιθανότητα αναγνώρισης του υποδείγματος με βάση τα δεδομένα. Εν συντομία, αναζητά για το δέντρο που έχει την υψηλότερη

μεταγενέστερη πιθανότητα. Για την διαχείριση του τεράστιου αριθμού πιθανών δέντρων χρησιμοποιείται ένας αλγόριθμος (Markov chain Monte Carlo - MCMC) για την εύρεση του καλύτερου δέντρου. Αυτή η τεχνική είναι η περισσότερο εξελιγμένη μέθοδος που χρησιμοποιείται επειδή κάθε νέο δέντρο που ερευνάται μπορεί να παράξει χαμηλότερη βαθμολογία από το δέντρο στο προηγούμενο βήμα. Αυτό επιτρέπει στον αλγόριθμο να βρει τον καλύτερο αλγόριθμο αποτελεσματικά.

Εφόσον ένα δέντρο έχει ανακατασκευαστεί είναι απαραίτητη η οπτικοποίηση του. Γενικώς, δεν έχουν καθοριστεί κανόνες για την παρουσίαση ενός δέντρου, αλλά η εφαρμογή χρωμάτων και ή μετονομασία της ταξινομικής βαθμίδας σε κάτι πιο εύκολα κατανοητό είναι πάντα ωφέλιμη για τον αναγνώστη. Είναι προτιμότερο να αποφεύγεται η χρήση κώδικα ακολουθιών ή αριθμών καταχωρήσεων για τον χαρακτηρισμό των ακολουθιών. Ομοίως, είναι σημαντικό να αναγράφεται η σύνοψη της μεθόδου για την κατασκευή του δέντρου. Αυτό βοηθά το χρήστη να κατανοήσει το δέντρο ευκολότερα (**Baldauf, 2003**).

2.1.6. Εργαλείο βασικής τοπικής αναζήτησης συστοίχισης (Basic local alignment search tool - BLAST) και γρήγορης συστοίχισης (Fast alignment – FASTA).

Στις μέρες μας, η εφαρμογή υπολογιστικών προσεγγίσεων σε βιολογικά δεδομένα έχει γίνει ζωτικό μέρος της βιολογίας, ειδικά στην ανάλυση ακολουθιών DNA και πρωτεϊνών. Η αξιολόγηση ομοιότητας μεταξύ των βιολογικών ακολουθιών είναι ίσως το κύριο μέσο, με το οποίο η βιοπληροφορική συνεισφέρει στην κατανόηση της βιολογίας (**Pearson and Lipman, 1988; Bansal and Meyer, 2002**). Τα πιο κοινά εργαλεία βιοπληροφορικής για αυτό το σκοπό είναι τα βασικής τοπικής αναζήτησης συστοίχισης (BLAST) και γρήγορης συστοίχισης (FASTA), τα οποία πραγματοποιούν συγκρίσεις μεταξύ ζευγών ακολουθιών, βασιζόμενα σε περιοχές τοπικής ομοιότητας (**Altschul et al., 1990; Pearson and Lipman, 1988; Luscombe et al., 2001**). Επομένως, τα εργαλεία αυτά έχουν γίνει θεμελιώδη εργαλεία της βιολογίας και είναι απαραίτητη η γνώση λειτουργίας τους, των εργασιών που μπορούν να επιτύχουν και η γνώση ακριβούς ερμηνεύσης των αποτελεσμάτων τους.

2.1.6.1. Γονιδιακές και πρωτεϊνικές ακολουθίες

Το DNA έχει πρωτογενή δομή, η οποία εγείρεται από τον κατευθυντικό πολυμερισμό μεμονωμένες μονάδες νουκλεοτιδίων. Κάθε μονάδα νουκλεοτιδίου ενός μορίου DNA αποτελείται από σάκχαρο δεοξυριβόζης, αζωτούχα βάση (αδενίνη, γουανίνη, κυτοσίνη, θυμίνη) και μία φωσφορική ομάδα. Οι μονάδες νουκλεοτιδίων συνδέονται με φωσφοεστερικούς δεσμούς. Η αλληλουχία του DNA κληροδοτεί την ακριβή σειρά των νουκλεοτιδίων σε ένα μόριο DNA και

επομένως την πρωτογενή δομή. Η αλληλούχιση του DNA ξεκίνησε με βασικές μεθόδους αλληλούχισης που αναπτύχθηκαν από τους **Maxam and Gilbert (1977)** και **Sanger et al., (1977)**. Σήμερα, η αλληλούχιση του DNA έχει φτάσει σε υψηλά επίπεδα τεχνολογικής ανάπτυξης, με την τεχνολογία αλληλούχισης επόμενης γενιάς (Next generation Sequencing - NGS), η οποία είναι υψηλής απόδοσης (**Mardis, 2008**).

Η πρωτογενής δομή της πρωτεΐνης σχετίζεται με την ακολουθία αμινοξέων που συνδέονται μέσω πεπτιδικών δεσμών που σχηματίζουν τον ομοιοπολικό κορμό της πρωτεΐνης (**Orengo et al., 1999**). Υπάρχουν είκοσι γνωστά αμινοξέα και μια πολυπεπτιδική αλυσίδα που περιλαμβάνει έναν αριθμό συγκεκριμένων τύπων αμινοξέων διατεταγμένων σε μία καθορισμένη ακολουθία. Αυτό δείχνει ότι υπάρχει μεγάλη ποικιλία πιθανών αλληλουχιών πρωτεΐνης. Γενικώς, η πρωτογενής δομή μίας πρωτεΐνης περιλαμβάνει όλες τις απαραίτητες πληροφορίες που είναι απαραίτητες για την εκδήλωση υψηλότερης, τρισδιάστατου επιπέδου, δομής και λειτουργίας (**Orengo et al., 1999**). Παραδοσιακά, οι ακολουθίες αμινοξέων των πρωτεϊνών έχουν καθοριστεί από την αντίδραση υποβιβασμού Edman (**Niall, 1973**). Η μέθοδος με την οποία προσδιορίζονται οι ακολουθίες των πρωτεϊνών είναι η φασματομετρία μάζας (**Dhaunta et al., 2010**). Η ακολουθία αμινοξέων μιας πρωτεΐνης μπορεί να προσδιοριστεί έμμεσα από τις ακολουθίες DNA των προκαρυωτών, αλλά σε αυτή την περίπτωση η διαδικασία μπορεί να γίνει περίπλοκη (**Alberts, 2002; Lynch, 2002**). Πρακτικά, η πρωτογενής δομή μιας πρωτεΐνης, προσδιορίζεται ευκολότερα μέσω της ερμηνείας μίας γονιδιακής ακολουθίας νουκλεοτιδίων, παρά απ' ευθείας από μία πρωτεΐνη.

2.1.6.2. Συστοίχιση ακολουθιών και εργαλεία αναζήτησης βάσεων δεδομένων

Ο BLAST είναι ένας αλγόριθμος που χρησιμοποιείται για την σύγκριση ακολουθιών αμινοξέων διαφορετικών πρωτεϊνών ή νουκλεοτιδικών ακολουθιών νουκλεϊκού οξέος. Ο αλγόριθμος αυτός εφευρέθηκε το 1990 και από τότε έχει γίνει σταθερά στα εργαλεία αναζήτησης και συστοίχισης (**Altschul et al., 1990**). Μέσα από αναζήτηση με τον αλγόριθμο BLAST είναι δυνατή η σύγκριση ακολουθίας με μία βάση δεδομένων ακολουθιών και είναι εφικτή η αναγνώριση των ακολουθιών που μοιράζονται ομοιότητα με την ακολουθία υπό ερεύνηση, μετά από κάποιο ποσοστό σύγκρισης που έχει οριστεί. Βασισμένος σε μία τέτοια σύγκριση, ο αλγόριθμος BLAST μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επίτευξη διαφόρων στόχων, όπως η αναγνώριση ειδών, η εύρεση σημείων, η χαρτογράφηση του DNA και η annotation (**Altschul et al., 1990**). Υπάρχουν αρκετοί τύποι προγραμμάτων BLAST διαθέσιμοι, και η επιλογή του εκάστοτε προγράμματος εξαρτάται από τον στόχο της μελέτης και τον τύπο των ακολουθιών που ερευνώνται. Επιπλέον, έχουν αναπτυχθεί πιο σύγχρονα προγράμματα BLAST με βελτιωμένη ευαισθησία, όπως το BLAST PSI (position-specific iterative) (**Altschul et al., 1990**). Ο BLAST βασίζεται σε έναν ευρετικό αλγόριθμο (**Altschul et al., 1990**), ο οποίος παρέχει

σχεδόν τη σωστή απάντηση ή λύση σε κάποιες μεταβλητές του προβλήματος. Μέσα από μία ευρετική προσέγγιση, ο αλγόριθμος BLAST αναγνωρίζει ομόλογες ακολουθίες, μέσω ανίχνευσης μικρών ταυτοποιήσεων μεταξύ των ακολουθιών που συγκρίνονται. Αυτή η διαδικασία εύρεσης όμοιων ακολουθιών ονομάζεται *seeding* και μετά από αυτήν την αρχική αντιστοίχιση, ο αλγόριθμος BLAST ξεκινά να πραγματοποιεί τοπικές συστοιχίσεις. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, ο αλγόριθμος προσπαθεί να εντοπίσει όλες τις κοινές λέξεις τριών γραμμάτων στην ακολουθία ενδιαφέροντος και τις ακολουθίες από την βάση δεδομένων. Στο πλαίσιο αυτό, μία λέξη χαρακτηρίζεται από έναν αριθμό γραμμάτων. Αφού συντεθούν οι λέξεις για μία δεδομένη ακολουθία ενδιαφέροντος, συναρμολογούνται οι γειτονικές λέξεις. Εφόσον οργανωθούν οι λέξεις και οι γειτονικές λέξεις, συγκρίνονται με τις ακολουθίες από τις βάσεις δεδομένων, για να βρεθούν αντιστοιχίσεις. Η συστοίχιση επεκτείνεται προς οποιαδήποτε κατεύθυνση από τον BLAST αλγόριθμο. Κάθε επέκταση αυξάνει ή μειώνει την βαθμολογία της συστοίχισης και η βαθμολογία θα πρέπει να είναι υψηλότερη από το προκαθορισμένο όριο για να περιέχεται η συστοίχιση στα αποτελέσματα του αλγορίθμου. Όμως, αν η βαθμολογία πέσει χαμηλότερα του προκαθορισμένου ορίου, η συστοίχιση θα σταματήσει να επεκτείνεται, και ως εκ τούτου περιοχές αποκλεισμού της ανεπαρκούς ακολουθίας θα συμπεριληφθεί στα αποτελέσματα του αλγορίθμου. Αποτελέσματα αλγορίθμου BLAST μπορούν εύκολα να αναπαραχθούν υποβάλλοντας μία ακολουθία στον ιστότοπο NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Το αποτέλεσμα μίας αναζήτησης BLAST αποτελείται από τέσσερα μέρη. Το πρώτο είναι η επικεφαλίδα (HEADER), που αφορά τις περιγραφές του προγράμματος BLAST που χρησιμοποιείται, την ακολουθία και την βάση δεδομένων που στοχεύεται. Το δεύτερο μέρος του αποτελέσματος είναι μία λίστα ακολουθιών που δείχνει τις σημαντικές συστοιχίσεις, μαζί με τις κανονικοποιημένες βαθμολογίες και τις αναμενόμενες τιμές. Το τρίτο μέρος συνοψίζει τις συστοιχίσεις και τις σχετικές στατιστικές πληροφορίες, συμπεριλαμβανομένων των ακατέργαστων και αποσπασματικών βαθμολογιών, της αναμενόμενης τιμής και του επιπέδου αναγνώρισης, για κάθε συστοίχιση με υψηλή βαθμολογία. Το τέταρτο μέρος παρουσιάζει όλες τις παραμέτρους που χρησιμοποιήθηκαν για την αναζήτηση BLAST. Οι αναμενόμενες τιμές αντιπροσωπεύουν καλύτερους στατιστικούς δείκτες του πόσο σημαντική είναι μία αντιστοίχιση. Εξ' ορισμού, η αναμενόμενη τιμή είναι ισοδύναμη του αριθμού των ακολουθιών που προκύπτουν στην βάση δεδομένων, που αναμένεται να αντιστοιχηθούν σε μία δεδομένη ακολουθία, τουλάχιστον το ίδιο καλά με την αναφερόμενη ακολουθία, εάν η σχέση μεταξύ των ακολουθιών ήταν τυχαία.

Ο αλγόριθμος FASTA αναπτύχθηκε το 1995, με βάση μία βελτίωση στον αλγόριθμο FASTP, ένα εργαλείο συστοίχισης ακολουθιών που αναπτύχθηκε το 1985 (**Lipman and Pearson, 1985; Pearson, 1990**). Ο αρχικός αλγόριθμος χρησιμοποιήθηκε για εξερεύνηση της ομοιότητας πρωτεϊνών, όμως μετά την βελτίωση του είχε τη δυνατότητα να εκτελέσει αναζητήσεις DNA:DNA,

μεταφρασμένες αναζητήσεις πρωτεΐνης:DNA και επίσης παρείχε ένα πιο ισχυρό πρόγραμμα για την αξιολόγηση στατιστικής σημασίας (**Pearson and Lipman, 1988, Mount, 2001**). Υπάρχουν αρκετοί διαφορετικοί τύποι FASTA, όπως οι TFASTA και TFASTAY, οι οποίοι διαχειρίζονται πρωτεϊνικές εισαγωγές έναντι βιβλιοθηκών DNA και οι FASTAX και FASTAY, οι οποίοι διαχειρίζονται DNA έναντι πρωτεϊνικών βάσεων δεδομένων. Όπως και το BLAST, το πρόγραμμα FASTA βασίζεται σε έναν ευρετικό αλγόριθμο (**Pearson and Lipman, 1988**). Το FASTA ορίζει ένα συγκεκριμένο μέγεθος για ένα ταξινομημένο σύνολο τιμών k . Στη συνέχεια ψάχνει για διαγώνιες στον πίνακα σύγκρισης της ακολουθίας που έχει υποβληθεί και αναζητά ακολουθία και σε ποια k αντιστοιχεί. Στη συνέχεια, επαναξιολογεί τις περιοχές με την υψηλότερη βαθμολογία, με την βοήθεια ενός πίνακα αντικατάστασης (πίνακας που δείχνει το ρυθμό με τον οποίο ένας συγκεκριμένος χαρακτήρας στην ακολουθία αλλάζει σε άλλη κατάσταση χαρακτήρα στο πέρασμα του χρόνου. Μετά, προσπαθεί να ενωθεί με τις διαγώνιους με την υψηλότερη βαθμολογία, επιτρέποντας κενά. Εν τέλει, πραγματοποιεί την βέλτιστη τοπική συστοίχιση γύρω από τις περιοχές που έχει ανακαλύψει, βασισμένο στον αλγόριθμο Smith-Waterman. Αποτελέσματα του FASTA μπορούν εύκολα να αναπαραχθούν μέσω της υποβολής της ακολουθίας, σε Fasta μορφή, σε βάση δεδομένων όπως η UniProt (<http://www.uniprot.org/>). Το αποτέλεσμα χωρίζεται σε τέσσερα μέρη. Το πρώτο έχει πληροφορίες για τη βάση δεδομένων που έγινε η αναζήτηση και την ακολουθία που υποβλήθηκε. Το δεύτερο μέρος είναι ένα ιστόγραμμα, το οποίο αναφέρει γραφικά την κατανομή της βαθμολογίας. Το τρίτο μέρος είναι μία λίστα των αντιστοιχισμένων ακολουθιών και σχετικών στατιστικών πληροφοριών. Το τέταρτο μέρος απεικονίζει τις συστοιχίσεις.

Τα BLAST και FASTA, σαν προγράμματα βασίζονται και τα δύο στην κοινή υπόθεση ότι οι πραγματικές αντιστοιχίσεις πιθανόν έχουν μερικές σύντομες εκτάσεις ομοιότητας με υψηλή βαθμολογία. Όμως, ενώ το FASTA στοχεύει εντελώς ταυτόσημες λέξεις, το BLAST χρησιμοποιεί έναν πίνακα βαθμολογίας (**Pearson and Lipman, 1988; Altschul et al., 1990; Pertselmidis and Fondon, 2010**). Η σύγκριση των δύο προγραμμάτων βασίζεται στην ακρίβεια, την ορθότητα και την πολυπλοκότητα του χρόνου εκτέλεσης του αλγορίθμου, στα πλαίσια των εφαρμογών σε λογισμικά βιοπληροφορικής. Η πολυπλοκότητα χρόνου εκτέλεσης αλγορίθμου αναφέρεται στο πόσο γρήγορα το βιοπληροφορικό εργαλείο πραγματοποιεί και παράγει ένα αποτέλεσμα. Η ορθότητα είναι ο βαθμός εγγύτητας μίας μέτρησης με την πραγματική τιμή. Η ακρίβεια ενός συστήματος μέτρησης αναφέρεται στον βαθμό, τον οποίο επαναλαμβανόμενες μετρήσεις κάτω από αμετάβλητες συνθήκες αποδίδουν το ίδιο αποτέλεσμα. Σημειώνεται πως η ορθότητα ενός εργαλείου βιοπληροφορικής μπορεί να αξιολογηθεί από την ικανότητα να αναγνωρίσει ακολουθίες με μακρινή συγγένεια. Όσον αφορά την πολυπλοκότητα του χρόνου εκτέλεσης αλγορίθμου, το BLAST είναι ταχύτερο από το FASTA, λόγω της αναζήτησης μόνο των πιο σημαντικών μοτίβων στις ακολουθίες. Η ορθότητα των δύο προγραμμάτων τείνει να διαφέρει για ακολουθίες νουκλεϊκών οξέων και πρωτεϊνών. Για

συστοιχίσεις πρωτεϊνών, ο ευρετικός αλγόριθμος του BLAST είναι περισσότερο ευαίσθητος από τον αλγόριθμο του FASTA, παρόλο που το BLAST χρησιμοποιεί μέγεθος λέξης τριών χαρακτήρων για τις πρωτεΐνες, ενώ το FASTA χρησιμοποιεί μέγεθος λέξης δύο χαρακτήρων. Στην περίπτωση των ακολουθιών γονιδίων, το BLAST χρησιμοποιεί ένα μεγάλο μέγεθος λέξης, έντεκα χαρακτήρων. Όμως, ο ευρετικός αλγόριθμος που βελτιώνει την ευαισθησία για πρωτεϊνικές ακολουθίες δεν λειτουργεί το ίδιο καλά για τις ακολουθίες DNA (Li et al., 2004). Επίσης, το FASTA είναι πιο ευαίσθητο από το BLAST όσον αφορά ακολουθίες νουκλεϊκού οξέος. Τα δύο προγράμματα διαφέρουν και στην στατιστική αξιολόγηση του αποτελέσματος, το οποίο μπορεί κάλλιστα να επηρεάσει την σχετική ακρίβεια του. Το FASTA παράγει μία αναμενόμενη τιμή που δείχνει μία σχετικά ακριβής εκτίμηση για τις αντιστοιχίσεις που έχουν βρεθεί και την προσδοκία να βρεθούν κατά τύχη (Brenner et al., 1998). Από την άλλη πλευρά, το πρόγραμμα BLAST υπολογίζει την προσδοκία εύρεσης, μέσω της απομάκρυνσης των αποτελεσμάτων με βαθμολογία χαμηλότερη από την τιμή που έχει οριστεί ως όριο (Brenner et al., 1998; Sansom, 2000). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την εξάλειψη των στατιστικά μη σημαντικών συστοιχίσεων, αυξάνοντας έτσι την συνολική ορθότητα του BLAST, συγκριτικά με το FASTA (Sansom, 2000). Παρά τον υψηλό αριθμό των αναφορών για τα δύο προγράμματα, δεν υπάρχει σχεδόν καμία ποσοτική σύγκριση των δύο εργαλείων, όσον αφορά την ταχύτητα, την ακρίβεια και την συνολική ορθότητα. Μία συγκριτική ανάλυση της πολυπλοκότητας χρόνου εκτέλεσης του αλγορίθμου και της ακρίβειας των δύο εργαλείων, έδειξε ότι το BLAST ήταν πάνω από έξι φορές πιο γρήγορο στην αναζήτηση δομικής ταξινόμησης για πρωτεΐνες, συγκριτικά με το FASTA (Chattaraj et al., 1999). Όμως, η μέση ακρίβεια του FASTA ήταν περίπου 2% υψηλότερη από του BLAST (Chattaraj et al., 1999). Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι και τα δύο προγράμματα επιτρέπουν κενά σε κάποιο σημείο του μηχανισμού λειτουργίας τους, και για αυτό το λόγο και οι δύο μέθοδοι έχουν την δυνατότητα να χάσουν σημαντικές ομοιότητες που είναι παρούσες στη βάση δεδομένων. Ένα ακόμα μειονέκτημα και των δύο εργαλείων είναι ότι πολλές πρωτεΐνες είναι πολυλειτουργικές πρωτεΐνες πολλαπλών τομέων, και ως εκ τούτου μία υψηλή ευστοχία σε ένα τομέα δεν ορίζει απαραίτητα και τη λειτουργία της.

2.1.7 Σύγχρονη υπολογιστική βιολογία

Η υπολογιστική βιολογία καλείται να απαντήσει σε βιολογικά και βιοϊατρικά ερωτήματα χρησιμοποιώντας υπολογιστικά συστήματα, για την υποστήριξη των εργαστηριακών αναλύσεων, με σκοπό την απόκτηση περισσότερων και ακριβέστερων απαντήσεων με πολύ χαμηλότερο κόστος. Τις περασμένες δεκαετίες πραγματοποιήθηκε πρωτοφανής τεχνολογική ανάπτυξη, όσον αφορά την ανάπτυξη βιολογικών δεδομένων, την αλληλούχιση επόμενης γενιάς, τη φασματομετρία μάζας, τις μικροσυστοιχίες, την μικροσκοπία κρύο-ηλεκτρονίων, και άλλων προσεγγίσεων υψηλής απόδοσης,

που έχουν οδηγήσει σε έκρηξη δεδομένων. Από τη μία πλευρά, η κλίμακα και το εύρος των δεδομένων θα έπρεπε να επιτρέπει την απόκτηση νέων γνώσεων στην γενετική και τις ασθένειες, τον καρκίνο, την βασική βιολογία, κ.ο.κ. Όμως, από την άλλη πλευρά, οι ερευνητές αναπαραγάγουν σύνολα δεδομένων τόσο μεγάλου όγκου, που πλέον είναι δύσκολη η ανάλυση τους ώστε να ανακαλυφθούν μοτίβα που δίνουν ενδείξεις για τις υποκείμενες βιολογικές διαδικασίες. Οι υπολογιστές φυσικά, γίνονται ταχύτεροι και πιο οικονομικοί. Όταν αλληλουχήθηκε το πρώτο ανθρώπινο γονιδίωμα, η ανάπτυξη της υπολογιστικής ισχύος ήταν ακόμα αντίστοιχη του ρυθμού ανάπτυξης των γενομικών δεδομένων. Όμως, με την έλευση της αλληλούχισης επόμενης γενιάς, το κόστος αλληλούχισης γονιδιώματος έπεσε κατακόρυφα τα τελευταία χρόνια, μέχρι το σημείο όπου ένα ολόκληρο ανθρώπινο γονιδίωμα μπορεί να αλληλουχηθεί για λιγότερο από 1000 US\$, με αποτέλεσμα το μέγεθος των γενομικών δεδομένων που είναι διαθέσιμα, να αυξάνεται κατά δέκα φορές κάθε χρόνο. Αυτή η ανάπτυξη δεδομένων θέτει σημαντικές προκλήσεις στους ερευνητές (Marx and Werts, 2013). Σήμερα, πολλές εφαρμογές βιολογικών δεδομένων απαιτούν αποθήκευση, πρόσβαση και ανάλυση πολύ μεγάλων βιβλιοθηκών δεδομένων. Μία προσέγγιση που μπορεί να αντιμετωπίσει αυτές τις προκλήσεις, είναι η εκμετάλλευση υπολογιστικού νέφους (cloud computing). Παρόλη την ευκολία που παρέχουν στον ερευνητή, όμως, τα υπολογιστικά συστήματα που συγκροτούν αυτές τις βάσεις δεδομένων νέφους, δεσμεύονται από βελτιώσεις στην τεχνολογία και νόμο του Moore. Επομένως, δεν μπορούν πραγματικά να αντιμετωπίσουν το πρόβλημα που τίθεται από την εκθετική ανάπτυξη των δεδομένων. Οι ερευνητές που εφαρμόζουν υπολογιστική βιολογία εκμεταλλεύονται τακτικά τη δομή διαφόρων δεδομένων, προκειμένου να μειωθεί η πολυπλοκότητα του χώρου ή του χρόνου. Στην υπολογιστική βιολογία, αυτή η προσέγγιση έχει εξυπηρετήσει τους ερευνητές, όπως για παράδειγμα η ανάλυση βασικών συστατικών (PCA), η οποία μειώνει τη διάσταση των δεδομένων με σκοπό την απλοποίηση των αναλύσεων και την αποκάλυψη εμφανών χαρακτηριστικών (Berger et al., 2013).

2.1.7.1. Δεδομένα – Τύποι – Προκλήσεις

Στην μοριακή βιολογία, το DNA μεταγράφεται σε RNA, το οποίο μεταφράζεται από το ριβόσωμα σε πολυπεπτιδικές αλυσίδες, ακολουθίες αμινοξέων, οι οποίες μεμονωμένες ή σε σύμπλοκα, είναι γνωστές σαν πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες διπλώνονται σε δομές χαμηλής ενέργειας οι οποίες λειτουργούν σαν μοριακοί μηχανισμοί. Η ακολουθία του DNA καθορίζει την ακολουθία των αμινοξέων, που με τη σειρά της καθορίζει την δομή μίας πρωτεΐνης. Αυτή η δομή με τη σειρά της καθορίζει την λειτουργία της πρωτεΐνης μέσα στο κύτταρο. Έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι για τη συλλογή βιολογικών δεδομένων από κάθε επίπεδο της διαδικασίας, με αποτέλεσμα μία τεράστια εισροή δεδομένων από ακολουθίες, δομές, λειτουργίες και αλληλεπίδραση DNA, RNA και πρωτεϊνών. Πολλά από αυτά τα δεδομένα υπάγονται στις τυπικές μεθόδους αναλύσεις μεγάλων

δεδομένων. Τα δεδομένα ακολουθιών, είτε νουκλεοτιδίων, είτε πρωτεϊνών λαμβάνονται με διάφορους τρόπους. Και για τα δύο είδη δεδομένων, η φασματομετρία μάζας, η οποία μπορεί να καθορίσει τις ακολουθίες πρωτεΐνης και τις αλληλεπιδράσεις, επιτρέπει στους ερευνητές να συμπεράνουν επίσης την έκφραση του γονιδίου. Ωστόσο, με την έλευση των τεχνολογιών αλληλούχισης επόμενης γενιάς έγινε διαθέσιμος ο μεγαλύτερος όγκος δεδομένων ακολουθιών DNA. Ενώ, η δημιουργία δεδομένων γονιδιακής έκφρασης προσφέρεται για την ανάλυση μεγάλων ομάδων δεδομένων και πιθανολογικές προσεγγίσεις, η υψηλή διαστατικότητα και ο θόρυβος μέσα στα δεδομένα, δημιουργούν σημαντικές προκλήσεις. Η Ανάλυση κύριων συστατικών δείχνει αρκετά υποσχόμενη στην μείωση της διαστατικότητας των δεδομένων γονιδιακής έκφρασης. Λόγω του ότι η λειτουργία ακολουθεί την μορφή, έτσι μαζί με την ακολουθία και την έκφραση, και η δομή παίζει σημαντικό ρόλο στην επιστήμη βιολογικών δεδομένων. Ωστόσο, το ενδιαφέρον δεν επικεντρώνεται μόνο σε δομές RNA και πρωτεϊνών. Μικρές χημικές ουσίες αντιπροσωπεύουν μία επιπλέον πηγή σχετικών δεδομένων δομής, εφόσον συχνά αλληλοεπιδρούν με το DNA και τις πρωτεΐνες. Οι φυσικές δομές των μορίων μπορούν να καθοριστούν από κρυσταλλογραφία X-ray, NMR, μικροσκοπία ηλεκτρονίων, και άλλες τεχνικές. Εφόσον, καθοριστούν, υπάρχουν πολλοί τρόποι εκπροσώπησης αυτών των δομών, από γραφήματα μοριακών δεσμών σε σύνολα πρωτεϊνικών τομέων. Αυτές οι απεικονίσεις μπορούν να αποθηκευτούν σε βάσεις δεδομένων, όπως η Pub-Chem ή η Protein Data Bank, και στη συνέχεια να ανακτηθούν. Όταν ερευνώνται πιο πολύπλοκα φαινόμενα από τις απλές ουσίες ή πρωτεΐνες, συνήθως συντίθενται σύνολα σε ένα επίπεδο συστημάτων κατανόησης της βιολογίας. Για αυτό το λόγο, χρησιμοποιούνται δίκτυα που αντιπροσωπεύουν βιολογικά δεδομένα, όπως οι γενετικές και φυσικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών, όπως και οι μεταβολικές οδοί (**Berger et al., 2013**). Παρόλο που τυποποιημένα εργαλεία δικτύου χρησιμοποιούνται για τέτοιου είδους αναλύσεις, έχουν εφαρμοστεί διάφορες προσεγγίσεις, οι οποίες κάνουν χρήση διάχυσης ή τυχαίων περιπάτων για την εξερεύνηση της τοπολογίας των δικτύων (**Cao et al., 2013; Cho et al., 2015**), και συχνά συνδυάζονται με πιο συγκεκριμένα βιολογικά δεδομένα.

Με δεδομένα DNA ή RNA που έχουν προκύψει από τεχνολογίες αλληλούχισης επόμενης γενιάς, το πρώτο βήμα είναι η ανασυγκρότηση αυτών των κομματιών ακολουθιών σε συνεχόμενες ακολουθίες. Για την ανασυγκρότηση των συνεχόμενων ακολουθιών χρησιμοποιούνται διάφοροι τρόποι, όπως ανασυγκρότηση De novo. Όταν μία ακολουθία αναφοράς είναι διαθέσιμη, τα αποτελέσματα της αλληλούχισης μπορούν να χαρτογραφηθούν με βάση αυτή την ακολουθία. Η χαρτογράφηση επιτρέπει στις διαφορές μεταξύ της καινούριας ακολουθίας και της ακολουθίας αναφοράς να αναλυθούν. Αυτές οι διαφοροποιήσεις μπορεί να περιλαμβάνουν πολυμορφισμούς μεμονωμένου νουκλεοτιδίου, εισαγωγές ή διαγραφές γονιδίων στο γονιδίωμα, ή αλλαγές μεγαλύτερης κλίμακας στο γονιδίωμα. Η διαδικασία αυτή είναι πολύπλοκη υπολογιστικά, λόγω των

gigabyte ή terabyte αποτελεσμάτων που πρέπει να χαρτογραφηθούν σε ένα γονιδίωμα αναφοράς, το οποίο μπορεί να κυμαίνεται από εκατομμύρια βάσεις όταν πρόκειται για βακτήρια, έως δισεκατομμύρια βάσεις όταν πρόκειται για θηλαστικά. Κάθε δείγμα μπορεί να διαρκέσει ώρες να κατέβει από μία βάση δεδομένων. Επίσης, πολλοί ερευνητές δεν εμπιστεύονται τις χαρτογραφήσεις που έχουν πραγματοποιηθεί από άλλους ερευνητές και πραγματοποιούν επανάληψη της διαδικασίας. Ο χρόνος που πραγματοποιείται στην χαρτογράφηση είναι σχεδόν ίσος με το 50% του συνολικού χρόνου που αφιερώνεται στην μεθοδολογία ανάλυσης ακολουθιών. Σε ένα γονιδίωμα που έχει αλληλουχηθεί, το επόμενο ερώτημα που πρέπει να απαντηθεί είναι ποια γονίδια είναι παρόντα, ποια δομή έχει κάθε πρωτεΐνη και ποια βιολογική διεργασία πραγματοποιεί. Η αναγνώριση πιθανών γονιδίων είναι ένα πρόβλημα που έχει ερευνηθεί αρκετά (**Berger et al., 2013**). Όμως, ο καθορισμός των εξελικτικών σχέσεων, της δομής και λειτουργίας είναι αυτή τη στιγμή το επίκεντρο της έρευνας της υπολογιστικής βιολογίας. Εφόσον κάποιοι οργανισμοί έχουν ερευνηθεί καλύτερα από κάποιους άλλους, και η εξέλιξη τους διατηρεί σταθερή ακολουθία, η δομή και λειτουργία τους είναι η δυναμικότερη προσέγγιση για τον προσδιορισμό αυτών των ιδιοτήτων, είναι η αναζήτηση παρόμοιων ακολουθιών που είναι περισσότερο γνωστές. Αυτή η αναζήτηση ομολογίας συνεπάγεται αναζήτηση των καταλληλότερων αντιστοιχίσεων στις βάσεις δεδομένων που περιέχουν γνωστές γονιδιακές ή πρωτεϊνικές ακολουθίες. Το εργαλείο BLAST είναι η πιο τυποποιημένη μέθοδος για την πραγματοποίηση αναζήτησης ομολογίας σε βάσεις δεδομένων ακολουθιών. Το BLAST αναζητά για μικρές K-mer αντιστοιχίσεις που μπορεί να οδηγήσουν σε μεγαλύτερες αντιστοιχίσεις, και τις επεκτείνει, με αποτέλεσμα τη δημιουργία συστοίχισης ακολουθίας μεταξύ της ακολουθίας που ερευνάται και κάθε πιθανή ακολουθία στην βάση δεδομένων. Ωστόσο, ο χρόνος εκτέλεσης μίας τέτοιας εργασίας κλιμακώνεται γραμμικά ανάλογα με το μέγεθος του συνόλου των δεδομένων, γεγονός που εμφανίζει προβλήματα καθώς τα δεδομένα ακολουθιών αυξάνεται με μεγαλύτερο ρυθμό από το νόμο του Moore.

Σε ακόμη μεγαλύτερη κλίμακα είναι η ανάπτυξη των μεταγενομικών δεδομένων. Μεταγενομική είναι μελέτη πολλών γονιδιωμάτων, βακτηριών, μυκήτων, ακόμα και ιών, που συγκροτούν ένα συγκεκριμένο περιβάλλον. Τέτοια περιβάλλοντα μπορεί να είναι το έδαφος σε ορισμένη περιοχή ή το ανθρώπινο έντερο, του οποίου το μικροβίωμα έχει συνδεθεί με αρκετές παθήσεις. Η μεταγενομική ουσιαστικά ρωτά ποιοι οργανισμοί είναι παρόντες, και ποιες μεταβολικές διεργασίες πραγματοποιούν συνεργιστικά. Ένας τρόπος αντιμετώπισης αυτού του ερωτήματος είναι η προσπάθεια χαρτογράφησης αποτελεσμάτων αλληλούχισης επόμενης γενιάς από ένα μεταγενομικό δείγμα σε μία ομάδα γονιδιωμάτων αναφοράς που αναμένεται να είναι παρόντα. Όμως, με τόσα γονιδιώματα αναφοράς πρέπει να συντεθούν και οι αντίστοιχες υπολογιστικές απαιτήσεις. Ένας άλλος τρόπος για την πραγματοποίηση αναζήτησης ομολογίας είναι η αναζήτηση σε μία βάση

δεδομένων ακολουθιών. Η ακριβής ή σχεδόν ακριβής αντιστοίχιση υπονοεί την παρουσία ενός είδους, ενώ λιγότερο ακριβείς αντιστοιχίσεις μπορούν να δώσουν κάποια στοιχεία σχετικά με την λειτουργία τους. Η δυσκολία είναι ότι τα σύνολα δεδομένων που χρησιμοποιούνται για τέτοιου είδους διεργασίες, είναι γιγαντιαίου μεγέθους και πολύ πιο πολύπλοκα από τα τυποποιημένα γενομικά σύνολα δεδομένων. Αυτά τα τεράστια δεδομένα έχουν ως αποτέλεσμα βασικότερες προκλήσεις αναγνώρισης για συγκεκριμένα είδη και γένη (**Janda and Abbott, 2007**). Η υπολογιστική μελέτη φαρμάκων και των στόχων που βασίζεται στη χημική δομή και τη λειτουργία, είναι γνωστή ως χημική γονιδιωματική (**Bredel and Jacoby, 2004**). Στο πεδίο της εύρεσης και επαναπροσδιορισμού φαρμάκων, η πρόβλεψη των βιολογικών ενεργών ουσιών είναι μία σημαντική διαδικασία. Η υπολογιστική απεικόνιση υψηλής απόδοσης εξαλείφει αρκετές ουσίες από τις εργαστηριακές αναλύσεις και μπορεί να είναι ιδιαίτερα χρονοβόρα. Η χημική γονιδιωματική βασίζεται στην σύγκριση γραφημάτων δομών για την αναγνώριση όμοιων μορίων στα σημεία σύνδεσης. Επιπλέον, η σύγκριση χημικών γραφημάτων δομών περιλαμβάνει υπολογισμό του μέγιστου κοινού υπογράφου (Maximal common subgraph - MCS), το οποίο είναι πρόβλημα πολυωνυμικού χρόνου (NP). Η δυνατότητα της αποθήκευσης, αναζήτησης και ανάλυσης αυτών των αυξανόμενων συνόλων δεδομένων εξαρτάται από έξυπνους αλγορίθμους, που εκμεταλλεύονται την δομή και τον πλεονασμό που υπάρχει στα σύνολα δεδομένων. Η αύξηση του συνόλου των δεδομένων απειλεί να καταστήσει τα προβλήματα που προκύπτουν υπολογιστικά, ανέφικτα.

Ευτυχώς, τα βιολογικά δεδομένα έχουν μοναδική δομή, η οποία είναι εκμεταλλεύσιμη για την πραγματοποίηση αναζήτησης η οποία κλιμακώνεται γραμμικά στο μέγεθος της βάσης δεδομένων (**Yu et al., 2015**). Τα περισσότερα βιολογικά δεδομένα είναι περιττά σε μία βάση δεδομένων. Για παράδειγμα, εάν πραγματοποιηθεί υπολογισμός σε ένα ανθρώπινο γονιδίωμα και κάποιος ερευνητής πραγματοποιήσει τον ίδιο υπολογισμό σε άλλο γονιδίωμα, τότε η περισσότερη από τη δουλειά του έχει ήδη γίνει (**Singh et al., 2008**). Για την διαχείριση πλεοναζόντων δεδομένων, χρησιμοποιείται ομαδοποίηση (clustering), η οποία έχει μελετηθεί αρκετά (**Jardine and van Rijsbergen, 1971**). Επίσης, εκτός του πλεονασμού ακολουθιών, οι οποίες υπάρχουν σε σχεδόν αμέτρητο αριθμό, οι ακολουθίες που υπάρχουν είναι αρκετά όμοιες μεταξύ άλλων. Χάρης στην εξέλιξη, επιβιώνουν μόνο τα γονίδια που παρουσιάζουν χρήσιμη βιολογική λειτουργία και οι περισσότερες τυχαίες ακολουθίες αμινοξέων δεν αναμένεται να σχηματίσουν σταθερές δομές. Εφόσον δύο ανθρώπινα γονιδιώματα διαφέρουν κατά μέσο όρο μόνο 0,1%, μία συλλογή 1000 γονιδιωμάτων περιέχει λιγότερο από δύο φορές τις μοναδικές πληροφορίες ενός μόνο γονιδιώματος (**Loh et al., 2012**).

2.1.7.2. Αλγόριθμοι συμπίεσης

Η σύγχρονη εποχή υπολογισμού χαρακτηρίζεται από τους συμπίεστικούς αλγόριθμους, οι οποίοι χρησιμοποιούν ένα διαφορετικό παράδειγμα για τη δομή των βιολογικών δεδομένων. Για την εκμετάλλευση του έμφυτου πλεονασμού στα δεδομένα ακολουθιών, παρουσιάστηκαν οι συμπίεστικοί αλγόριθμοι, οι οποίοι ακολουθούν μια προσέγγιση που βασίζεται στην συμπίεση δεδομένων με τρόπο όπου ο επιθυμητός υπολογισμός πραγματοποιείται σε συμπίεσμένη αναπαράσταση (**Loh et al., 2012**). Η συμπίεστική γονιδιωματική βασίζεται στην ιδέα της συμπίεσμένης επιτάχυνσης, η οποία βασίζεται σε αναζήτηση δύο σταδίων, την χονδρική (coarse) και λεπτή (fine) αναζήτηση. Η πρώτη εκτελείται μόνο στις χονδρικές, ή αντιπροσωπευτικές, υποακολουθίες που αντιπροσωπεύουν μοναδικά δεδομένα. Κάθε αντιπροσωπευτική ακολουθία μέσα σε ένα όριο που έχει τεθεί στην αναζήτηση επεκτείνεται σε όλες τις όμοιες ακολουθίες που αντιπροσωπεύει. Η δεύτερη αναζήτηση πραγματοποιείται πάνω σε αυτό το υποσύνολο της αρχικής βάσης δεδομένων. Αυτή η προσέγγιση παρέχει βελτιώσεις χρόνου εκτέλεσης σε αναζητήσεις BLAST νουκλεοτιδίων ή πρωτεϊνών και οι βελτιώσεις αυξάνονται όσο η βάση δεδομένων μεγαλώνει. Εργαλεία όπως το BLAST και το caBLAST επιταχύνουν τα ήδη υπάρχοντα εργαλεία, επιτρέποντας τους να λειτουργούν σε συμπίεσμένο χώρο και βασίζονται στις φάσεις χονδρικής και λεπτής αναζήτησης. Στο πεδίο της μεταγονιδιωματικής αναζήτησης, το πρόγραμμα MICA (**Yu et al., 2015**) παρουσιάζει την προσέγγιση συμπίεστικής επιτάχυνσης του caBLAST (**Loh et al., 2012**) και του caBLASTP (**Daniels et al., 2013**), που είναι σε μεγάλο βαθμό ανεξάρτητα από μείωση-αλφαβήτου και ευρετηριακών προσεγγίσεων. Η συμπίεστική γονιδιωματική έχει προσαρμοστεί επίσης σε διαστήματα κενών χωρίς ακολουθία, επινοώντας τις συμπίεστικές -ομικές επιστήμες. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η χημική γονιδιωματική. Σε μερικές περιπτώσεις όμως, αυτή η προσέγγιση υστερεί σε ακρίβεια, οι οποίες όμως είναι καλά καθορισμένες. Η συμπίεστική -ομική δεν δίνει αποτελέσματα ψευδώς θετικά, επειδή η φάση λεπτής αναζήτησης εφαρμόζει την ίδια σύγκριση στους υποψήφιους με την αφελή προσέγγιση. Επιπλέον, όταν η λειτουργία απόστασης που χρησιμοποιείται για συγκρίσεις είναι μετρική, τα ψευδώς θετικά δεν θα εμφανιστούν ποτέ. Στην πράξη όμως, χρησιμοποιούνται μη μετρικές λειτουργίες, όπως η E-value στο BLAST, και έτσι ψευδώς θετικά μπορεί να προκύψουν. Ευτυχώς, το ποσοστό αυτών των σφαλμάτων είναι χαμηλό και παρατηρείται ανάκληση καλύτερη από 90% (**Daniels et al., 2013; Loh et al., 2012; Yu et al., 2015**).

2.1.7. Ανάλυση μεγάλων δεδομένων

Ο όρος μεγάλα δεδομένα αναφέρεται στην έκρηξη διαθέσιμων πληροφοριών σήμερα. Τεράστιος όγκος δεδομένων υψηλών διαστάσεων ή μη δομημένων, παράγεται συνεχώς και αποθηκεύεται, με πολύ χαμηλότερο κόστος από ποτέ. Για παράδειγμα, στον τομέα της γονιδιωματικής, η αλληλούχιση ολόκληρου γονιδιώματος έχει δει δραματική μείωση κόστους (**Stein,**

2010). Το ίδιο έχει συμβεί και σε διαφορετικούς τομείς, όπως η ανάλυση κοινωνικών δικτύων, η βιοϊατρική απεικόνιση, η οικονομία, οι πωλήσεις κ.ο.κ. Η υπάρχουσα κατάσταση μαζικής παραγωγής και χαμηλού κόστους δεδομένων, πιθανότατα θα επιταχυνθεί στο άμεσο μέλλον (**Donoho, 2010**), δημιουργώντας βαθύ αντίκτυπο στις επιστήμες, την μηχανική και τις επιχειρήσεις. Οι επιστημονική πρόοδος βασίζεται όλο και περισσότερο στην παραγωγή δεδομένων και οι τεράστιοι όγκοι δεδομένων δημιουργούν ευκαιρίες και νέες προκλήσεις στην ανάλυση δεδομένων.

Η ποσότητα της ψηφιοποιημένης πληροφορίας που παράγεται στην σύγχρονη κοινωνία συνεχώς αυξάνεται με εκθετικό ρυθμό και εκτιμάται ότι θα υπολογίζεται σε πέντε terabytes (Tb) για κάθε άνθρωπο έως το 2020 (**Egan, 2013**). Μεγάλης κλίμακας δεδομένα αναπαράγονται κάθε δευτερόλεπτο σε ένα τεράστιο εύρος περιοχών, όπως τα κοινωνικά δίκτυα, οι επιχειρήσεις και η οικονομία, οι βιοεπιστήμες, θέτοντας μεγάλη πρόκληση για την συλλογή, αποθήκευση, επεξεργασία και ανάλυση των δεδομένων. Στις βιολογικές επιστήμες, η επανάσταση μετά την αλληλούχιση επόμενης γενιάς (NGS) (**Bahassi and Stambrook, 2014; Hui, 2014; van Dijk et al., 2014**), το πρόγραμμα ανθρώπινου γονιδιώματος (**Collins et al., 2003; Green et al., 2015**), την πρόοδο στον προσδιορισμών δομών πρωτεϊνών (**Giege, 2013; Hekmat, 2015; Gavira, 2016**) και την ανάπτυξη της βιοϊατρικής πληροφορικής και της πληροφορικής απεικόνισης (**Andreu- Perez et al., 2015; Binder and Blettner, 2015**), έχει αναπόφευκτα οδηγήσει σε μία πρωτόγνωρη έκρηξη δεδομένων. Κατά συνέπεια, τα βιολογικά δεδομένα που έχουν αναπαραχθεί από τη γενομική, την πρωτεομική, την τρανσκριπτομική και τη μεταβολομική, χαρακτηρίζονται από μία υψηλότερη τάξη πολυπλοκότητας.

Η πρόοδος της βιοπληροφορικής τις τελευταίες δεκαετίες έχουν ενδυναμώσει δραματικά τους ερευνητές ως προς τη διαχείριση των -ομικών δεδομένων. Ένα εκτεταμένο σύνολο υπολογιστικών εργαλείων, αλγορίθμων και βάσεων δεδομένων, έχουν αναπτυχθεί με σκοπό την ανάλυση δεδομένων (**Berger et al., 2013**). Εντούτοις, με το ρυθμό που γίνεται η αναπαραγωγή δεδομένων και την ολοένα αυξανόμενη ανάγκη αποθήκευσης, επεξεργασίας και ανάλυσης, η βιοπληροφορική επιστήμη βρίσκεται στο επίκεντρο του ενδιαφέροντος. Ο νόμος του Moore προβλέπει πως η υπολογιστική ισχύς και η ικανότητα αποθήκευσης διπλασιάζεται κάθε δεκαπέντε χρόνια, όμως τα γενομικά δεδομένα δεκαπλασιάζονται κάθε χρόνο από το 2002 (**Moore, 1965; Kahn, 2011**). Η διαθεσιμότητα του αποθηκευτικού χώρου και η υπολογιστική ισχύς δεν μπορεί να ακολουθήσει αυτή την αύξηση και να ικανοποιήσει τις ανάγκες των ταχέως αναπτυσσόμενων τομών έρευνας που βασίζονται σε δεδομένα (**Papageorgiou et al., 2018**). Επίσης, τα ακατέργαστα δεδομένα δεν είναι πάντα χρήσιμα όπως εξάγονται από τις οδούς NGS και Illumina. Η εξαγωγή, ανάλυση και συλλογή των δεδομένων ή ο τρόπος που υπομνηματίζονται στις βάσεις δεδομένων, απέχουν πολύ ακόμα από τυποποιημένες

μεθόδους. Επιπλέον, τα σύνολα γενομικών δεδομένων είναι γεμάτα με πληροφορία θόρυβο και λανθασμένες πληροφορίες (**Fan et al., 2014**).

Η χρήση υπολογιστών υψηλών αποδόσεων, οι εξυπνότεροι και ταχύτεροι αλγόριθμοι και ο υπολογιστικός παραλληλισμός αποθήκευσης και επεξεργασίας, φαίνεται πως είναι η απάντηση στην διαχείριση δεδομένων. Για παράδειγμα, τα συστήματα βάσεων δεδομένων με προσανατολισμό στηλών υπερτερούν έναντι της αποθήκευσης δεδομένων ακατέργαστης αναπαράστασης, επιτρέποντας ταυτόχρονα υψηλότερη δυνατότητα συμπίεσης (**Abadi et al., 2009**). Επιπλέον, αλγόριθμοι συμπίεσης έχουν αναπτυχθεί, οι οποίοι επιτρέπουν άμεση επεξεργασία των συμπιεσμένων δεδομένων (**Loh et al., 2012; Berger et al., 2016**). Επίσης, οι υποδομές υπολογιστικών νεφών, αγωνίζονται ως προς τον μεγαλύτερο στόχο της ενοποιημένης και τυποποιημένης μεταγονιδιωματικής.

Οι κύριοι στόχοι της ανάλυσης δεδομένων υψηλών διαστάσεων είναι η ανάπτυξη αποτελεσματικών μεθόδων που μπορούν με ακρίβεια να προβλέψουν μελλοντικές παρατηρήσεις και ταυτόχρονα η απόκτηση εικόνας για την σχέση μεταξύ των χαρακτηριστικών και της απόκρισης για επιστημονικούς σκοπούς (**Bickel et al, 2008**). Επιπλέον, λόγω του μεγάλου όγκου δειγμάτων, τα μεγάλα δεδομένα έχουν ως σκοπό την κατανόηση της ανομοιογένειας και της ύπαρξης κοινών χαρακτηριστικών, σε διαφορετικούς πληθυσμούς. Η ανάλυση μεγάλων δεδομένων ερευνά τις κρυφές δομές κάθε υπό-πληθυσμού δεδομένων, που παραδοσιακά δεν είναι εφικτή και δεδομένα που ίσως θεωρούνται διαφορετικά όταν πρόκειται για μικρό μέγεθος δειγμάτων. Επίσης η ανάλυση μεγάλων δεδομένων εξάγει σημαντικά κοινά χαρακτηριστικά μεταξύ αρκετών υπό-πληθυσμών, ακόμα και όταν υπάρχουν μεγάλες μεμονωμένες αποκλίσεις.

Τα μεγάλα δεδομένα χαρακτηρίζονται από υψηλή διαστατικότητα και μεγάλο μέγεθος δείγματος. Αυτά τα χαρακτηριστικά των δεδομένων δημιουργούν μοναδικές προκλήσεις ως προς την ανάλυση τους. Η υψηλή διαστατικότητα των δεδομένων φέρει συσσώρευση θορύβου, λανθασμένες συσχετίσεις και τυχαία ομοιογένεια. Επιπλέον, τα δεδομένα υψηλών διαστάσεων σε συνδυασμό με μεγάλο μέγεθος δειγμάτων δημιουργεί προβλήματα όπως υψηλός κόστος υπολογιστικότητας και αλγοριθμικής αστάθειας. Ακόμα, τα δείγματα τεράστιου όγκου, συνήθως συγκεντρώνονται από διαφορετικές πηγές σε διαφορετικά χρονικά σημεία, χρησιμοποιώντας διαφορετικές τεχνολογίες. Το γεγονός αυτό δημιουργεί προβλήματα ανομοιογένειας, πειραματικές παραλλαγές και στατιστικές προκαταλήψεις. Για αυτό το λόγο απαιτείται η ανάπτυξη περισσότερο προσαρμοστικών και ισχυρών διαδικασιών για την ανάλυση δεδομένων.

Για τον χειρισμό μεγάλων δεδομένων, χρειάζεται νέες στατιστικές προσεγγίσεις και υπολογιστικές μέθοδοι. Πολλές παραδοσιακές μέθοδοι που λειτουργούν αρκετά καλά για δείγματα

μετρίου μεγέθους δεν μπορούν να ανταπεξέλθουν στην ανάλυση δεδομένων τεράστιου μεγέθους. Ομοίως, πολλές μέθοδοι στατιστικής ανάλυσης που αποδίδουν με επιτυχία σε δεδομένα χαμηλής διάστασης, αντιμετωπίζουν σημαντικές προκλήσεις στην ανάλυση πολυδιάστατων δεδομένων. Για τον σχεδιασμό αποτελεσματικών στατιστικών διαδικασιών για την εξερεύνηση και πρόβλεψη μεγάλων δεδομένων, είναι απαραίτητη η αντιμετώπιση προβλημάτων, όπως η ανομοιογένεια, η συσσώρευση θορύβου, οι λανθασμένες συσχετίσεις κ.ο.κ., με την ταυτόχρονη εξισορρόπηση της στατιστικής ακρίβειας και της υπολογιστικής αποτελεσματικότητας. Η στατιστική ακρίβεια, η μείωση διάστασης και η επιλογή μεταβλητής, έχουν καθοριστικό ρόλο στην ανάλυση μεγάλων πολυδιάστατων δεδομένων. Στην ταξινόμηση υψηλής διάστασης, αποδείχθηκε πως η συμβατικοί κανόνες κατηγοριοποίησης χρησιμοποιώντας όλα τα χαρακτηριστικά, δεν αποδίδουν καλύτερα από την τυχαία εικασία, λόγω της συσσώρευσης θορύβου στα δεδομένα (**Fan and Fan, 2008; Hall et al, 2008**). Το γεγονός αυτό ενέπνευσε νέες μεθόδους ρύθμισης (**Tibshirani, 1996; Chen and Donoho, 1998; Fan and Li, 2001; Candes and Tao, 2007**). Επιπλέον, η υψηλή διαστατικότητα εισάγει λανθασμένες συσχετίσεις μεταξύ αποκρίσεων και μη συσχετισμένων χαρακτηριστικών, γεγονός το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένα στατιστικά συμπεράσματα και επομένων σε εσφαλμένα επιστημονικά συμπεράσματα (**Fan et al, 2012**). Η υψηλή διαστατικότητα επίσης αυξάνει την τυχαία ενδογένεια, ένα φαινόμενο κατά το οποίο πολλά μη συσχετισμένα χαρακτηριστικά μπορούν κατά λάθος να συσχετιστούν με δεδομένα θορύβου. Η ενδογένεια δημιουργεί στατιστική προκατάληψη και προκαλεί ασυνέπεια επιλογής δειγμάτων, η οποία οδηγεί σε λανθασμένες επιστημονικές ανακαλύψεις (**Liao and Jiang, 2011; Fan and Liao, 2012**). Λόγω του ότι οι περισσότερες στατιστικές διαδικασίες βασίζονται σε μη ρεαλιστικές υποθέσεις που δεν μπορούν να επικυρωθούν από δεδομένα, είναι αναγκαία η ανάπτυξη στατιστικών διαδικασιών. Για τον λόγο της υπολογιστικής αποτελεσματικότητας, ο μεγάλος όγκος δεδομένων ώθησε την ανάπτυξη νέων υπολογιστικών υποδομών και μεθόδων αποθήκευσης δεδομένων. Η βελτιστοποίηση υπολογιστικών εργαλείων οδήγησε σε σημαντική εξέλιξη ανάπτυξης ταχύτατων αλγορίθμων που έχουν την ικανότητα να διαχειριστούν τεράστιο όγκο δεδομένων με υψηλή διαστατικότητα, μέσω της διασταύρωσης διαφορετικών πεδίων που περιλαμβάνουν στατιστική, βελτιστοποίηση και εφαρμοσμένα μαθηματικά. Εκτός την βελτιστοποίησης αλγορίθμων, ο μεγάλος όγκος δεδομένων ώθησε την ανάπτυξη αλγορίθμων πλειοψηφίας ή ελαχιστοποίησης (**Lange et al, 2000; Hunter and Li, 2005; Zou and Li, 2008**), πλαίσιο οπτικοποίησης μεγάλης κλίμακας και βελτιστοποίησης μικρής κλίμακας (**Fan et al, 2009**), μεθόδους παράλληλης υπολογιστικότητας (**Boyd et al, 2011; Bradley et al, 2011; Low et al, 2012**) και προσεγγιστικούς αλγορίθμους που προσαρμόζονται σε δείγματα μεγάλου μεγέθους.

2.1.8.1. Εφαρμογή δεδομένων μεγάλου όγκου

Τα σύγχρονα σύνολα δεδομένων χαρακτηρίζονται από δείγματα τεραστίου μεγέθους και υψηλή διαστατικότητα. Για παράδειγμα, στον τομέα της γονιδιωματικής, υπάρχουν πάνω από 500.000 μικροσυστοιχίες, που είναι διαθέσιμες δημόσια, με κάθε συστοιχία να περιλαμβάνει δεκάδες χιλιάδες τιμές έκφρασης μορίων. Στην βιοϊατρική μηχανική, υπάρχουν δεκάδες χιλιάδες terabytes από fMRI εικόνες, με κάθε εικόνα να περιλαμβάνει περισσότερες από 50.000 τιμές σε τρισδιάστατο χώρο. Παραδείγματα τεράστιου όγκου δεδομένων με υψηλή διαστατικότητα υπάρχουν σε αρκετούς τομείς όπως συλλογές μη δομημένων κειμένων, τα κοινωνικά δίκτυα, τα οικονομικά στοιχεία, τα δεδομένα ηλεκτρονικού εμπορίου κ.ο.κ.

Ιδιαίτερα στο πεδίο της γονιδιωματικής έχουν αναπτυχθεί νέες τεχνολογίες, οι οποίες καθιστούν ικανή την οικονομική και υψηλής απόδοσης μέτρηση ολόκληρων γονιδιωμάτων. Αυτές οι τεχνολογίες επιτρέπουν στους ερευνητές να αναπαράγουν εκατοντάδες χιλιάδες σύνολα δεδομένων και να ερευνήσουν όχι μόνο την βιολογική ακολουθία των δεδομένων αλλά και την βιολογική λειτουργία τους. Η διαθεσιμότητα τεράστιων συνόλων δεδομένων βοήθησε τις επιστημονικές ανακαλύψεις, όπως για παράδειγμα η ύπαρξη μεγάλου όγκου δεδομένων γονιδιωματικών ακολουθιών, οι οποίες έχουν δώσει τη δυνατότητα αποκάλυψης γενετικών δεικτών σπάνιων παθήσεων (Worthey et al., 2010; Chen et al., 2012) και η εύρεση συσχετίσεων μεταξύ ασθενειών και σπάνιων παραλλαγών ακολουθιών (Cohen et al., 2004; Han and Pan, 2010). Οι ανακαλύψεις στην τεχνολογία βιοϊατρικής απεικόνισης επέτρεψε στους ερευνητές να παρακολουθήσουν πολλές γονιδιακές και πρωτεϊνικές λειτουργίες, επιτρέποντας την μελέτη αλληλεπιδράσεων των ρυθμιστικών διαδικασιών και δραστηριότητας των νευρώνων. Ένα σημαντικό βήμα στην ανάλυση γονιδιωματικών δεδομένων είναι η αφαίρεση συστηματικών προκαταλήψεων. Τέτοιες συστηματικές προκαταλήψεις υπάρχουν λόγω πειραματικών παραλλαγών όπως οι περιβαλλοντικές, δημογραφικές και άλλως τεχνικών παραγόντων. Οι παράγοντες αυτοί τείνουν να αυξάνονται όταν συνδυάζονται διαφορετικές πηγές δεδομένων. Έχουν αποδειχθεί ότι έχουν σημαντική επίδραση στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων και η αποτυχία να ληφθούν υπόψιν μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένα επιστημονικά συμπεράσματα (Leek and Storey, 2007). Όταν τα δεδομένα προκύπτουν από πολλές πηγές, υπάρχει το πρόβλημα της επιλογής πρακτικής ομαλοποίησης. Ακόμα και με την αφαίρεση των συστηματικών προκαταλήψεων, η εφαρμογή δοκιμών μεγάλης κλίμακας για την επιλογή σημαντικών γονιδίων ή πρωτεϊνών, παραμένει ως πρόκληση. Στον έλεγχο σημαντικότητας χιλιάδων γονιδίων οι κλασικές μέθοδοι ελέγχου της πιθανότητας ψευδούς ανακάλυψης γονιδίου, δεν είναι πλέον κατάλληλες. Για αυτό το λόγο έχουν σχεδιαστεί εναλλακτικές μέθοδοι για τον έλεγχο του ποσοστού ψευδούς ανακάλυψης (Benjamini and Hochberg, 1995; Storey, 2003; Schwartzman et al., 2009; Efron, 2010) και την βελτίωση της

δυναμικότητας των ελέγχων (**Han et al., 2012**). Μία επιπλέον πρόκληση στην ανάλυση γονιδιακών δεδομένων είναι η μοντελοποίηση και εξερεύνηση της υποκείμενης ανομοιογένειας των συγκεντρωτικών συνόλων δεδομένων. Λόγω του περιορισμού της τεχνολογίας και των περιορισμένων πόρων, συνήθως τα πειράματα περιορίζονται σε μερικούς τύπου κυττάρων. Αυτό το γεγονός δημιουργεί βασικό εμπόδιο στον συνολικό χαρακτηρισμό της ρύθμισης του γονιδίου σε όλα τα βιολογικά πλαίσια, ο οποίος είναι θεμελιώδης στόχος στην λειτουργική γονιδιωματική. Όμως, αρκετές βάσεις δεδομένων έχουν συγκεντρώσει περισσότερα από μισό εκατομμύριο προφίλ γονιδιακής έκφρασης, από χιλιάδες βιολογικά πλαίσια. Συνολικά, αυτές οι βάσεις δεδομένων περιέχουν τεράστια μεγέθη πληροφορίας, οι οποίες παραμένουν μη εκμεταλλεύσιμες, μέχρι σήμερα. Αρκετά δεδομένα που είναι συγκεντρωμένα σε βάσει δεδομένων έχουν βοηθήσει την συστηματική μελέτη πολλών βιολογικών πλαισίων με υψηλής απόδοσης τρόπο. Η συστηματική εξερεύνηση της υποκείμενης ανομοιογένειας και η αποκάλυψη των κοινών στοιχείων μεταξύ διαφορετικών υπό-πληθυσμών παραμένει ένας από τους πιο ενεργούς ερευνητικούς τομείς.

Πολλές σημαντικές ασθένειες, όπως το AD, η σχιζοφρένεια, η κατάθλιψη κ.ο.κ. έχει αποδειχθεί ότι σχετίζονται με τα δίκτυα συνδεσιμότητας του εγκεφάλου. Η κατανόηση της πολυπλοκότητας, της οργάνωσης λειτουργικότητας του δικτύου του εγκεφάλου είναι το σημαντικό πρώτο βήμα για την εξερεύνηση των αλλαγών στο εγκέφαλο, λόγω της εκάστοτε ασθένειας. Η ταχύτερη πρόοδος στις τεχνικές απεικόνισης νευρώνων, όπως η λειτουργική εικόνα μαγνητικού σχεδιασμού (fMRI), όπως και ηλεκτροφυσιολογία, παρέχουν μεγάλη δυνατότητα μελέτης των λειτουργικών δικτύων του εγκεφάλου, όπως η συνοχή δραστηριοτήτων μεταξύ διαφορετικών περιοχών του εγκεφάλου (**Jonides et al., 2006**). Τα τελευταία χρόνια η τεχνική fMRI έχει γίνει η κυρίαρχη μέθοδος στα πεδία γνωστικής και φυσιολογικής νευροεπιστήμης, και ταυτόχρονα έχει δημιουργήσει τεράστια ποσότητα εικόνων εγκεφάλου σε υψηλή ανάλυση. Τα δεδομένα της τεχνικής αυτής είναι τεράστια σε αριθμό και πολύ υψηλής διαστατικότητας. Κάθε μέρα μηχανήματα fMRI αναλύουν διαφορετικά υποκείμενα και συνεχώς παράγουν νέα εικονικά δεδομένα. Ταυτόχρονα, όμως οι εικόνες fMRI είναι θορυβώδεις λόγω του τεχνολογικού περιορισμού και της περιορισμένης κίνησης των υποκειμένων. Η ανάλυση δεδομένων υψηλής διαστατικότητας και θορύβου αποτελούν μεγάλη πρόκληση για τους ερευνητές και τους στατιστικούς. Ομοίως, με το πεδίο της γονιδιωματικής, ένα σημαντικό πρόβλημα μεγάλου όγκου δεδομένων στις νευροεπιστήμες είναι η συλλογή συνόλων δεδομένων από πολλαπλές πηγές. Με παγκόσμια συλλογική προσπάθεια έχουν συλλεχθεί χιλιάδες σαρώσεις fMRI σε κατάσταση ηρεμίας με δομικές σαρώσεις. Μία από τις κύριες προκλήσεις, στον τομέα της γονιδιωματικής, είναι η αφαίρεση συστηματικών προκαταλήψεων που προκαλούνται από πειραματικές παραλλαγές και συγκέντρωση δεδομένων. Επιπλέον, η στατιστικώς ελεγχόμενη ενσωμάτωση ενός υποκειμένου σε μία συλλογική μελέτη, συχνά δεν διεξάγεται με τον

καλύτερο τρόπο (**Fritsch et al., 2012**) και τα στοιχεία που συνθέτουν τον πολυδιάστατο χώρο αδυνατούν να ευθυγραμμιστούν πλήρως σε διαφορετικά πειράματα που έχουν διεξαχθεί σε διαφορετικούς χώρους. Επομένως, τα δεδομένα που έχουν συλλεχθεί περιέχουν πολλές τιμές εκτός ορίων και τιμές που δεν συμπεριλαμβάνονται. Οι παραδοσιακές τεχνικές στατιστικής δεν ταιριάζουν καλά σε αυτές τις θορυβώδεις υψηλής διαστατικότητας ρυθμίσεις και καινούρια στατιστική προσέγγιση είναι απαραίτητη.

Τα τελευταία χρόνια, όλο και περισσότερες ιδιωτικές επιχειρήσεις και οργανισμοί υιοθετούν την προσέγγιση δεδομένων μεγάλου μεγέθους, με σκοπό την παροχή στοχευμένων υπηρεσιών, τη μείωση κινδύνων και την βελτίωση της απόδοσης. Σε αυτά τα πεδία εισάγονται εξειδικευμένα προγράμματα ανάλυσης δεδομένων για τη συλλογή, την αποθήκευση, την διαχείριση και την ανάλυση μεγάλων συνόλων δεδομένων από ένα εύρος πηγών. Για παράδειγμα, οι διαθέσιμες πηγές οικονομικών δεδομένων περιλαμβάνουν τιμές μετοχών, συναλλαγές νομισμάτων, αρχεία συναλλαγών, συναλλαγές υψηλής συχνότητας, μη δομημένα νέα και κείμενα, εμπιστοσύνη καταναλωτών και καταναλωτική ψυχολογία μέσα στα δίκτυα κοινωνικής δικτύωσης και τον παγκόσμιο ιστό. Η ανάλυση αυτών των τεράστιων συνόλων δεδομένων βοηθά στην μέτρηση των κινδύνων. Απαιτεί στατιστικές τεχνικές, οι οποίες πραγματοποιούνται από εξειδικευμένους χρήστες.

Τα δεδομένα μεγάλου όγκου έχουν πολυάριθμες εφαρμογές. Παίρνοντας για παράδειγμα την ανάλυση δεδομένων κοινωνικών δικτύων, τεράστιος όγκος δεδομένων κοινωνικής δικτύωσης παράγεται από εταιρείες όπως το Facebook, το Twitter, το LinkedIn, το YouTube, κ.ο.κ. Τα δεδομένα που συλλέγονται αποκαλύπτουν πολυάριθμα ατομικά χαρακτηριστικά και αξιοποιούνται σε διάφορα πεδία. Για παράδειγμα δεδομένα χρηστών κοινωνικής δικτύωσης έχουν χρησιμοποιηθεί, για την πρόβλεψη επιδημίας της γρίπης (**Aramaki et al., 2011**), ή για την πρόβλεψη εσόδων σε προβολές ταινιών, ή για την πρόβλεψη της τάσης τιμών του χρηματιστηρίου (**Asur and Huberman; 2010**). Επιπλέον, τα κοινωνικά δίκτυα και ο διαδικτυακός ιστός γενικότερα, περιέχουν τεράστιο όγκο πληροφορίας για τις προτιμήσεις των καταναλωτών, τους δείκτες οικονομίας, τις πολιτικές στάσεις και την οικονομική και κοινωνική κατάσταση μιας χώρας. Αναμένεται ότι τα δεδομένα κοινωνικών δικτύων θα συνεχίσουν να μεγαλώνουν με ραγδαίο ρυθμό και να αξιοποιούνται για νέες εφαρμογές. Επίσης, με τη συλλογή περισσότερων προσωπικών δεδομένων, οι εμπορικές επιχειρήσεις είναι ικανές να παρέχουν προσωπικές υπηρεσίες προσαρμοσμένες στις ατομικές προτιμήσεις. Επιπλέον, όσον αφορά την προστασία στον διαδικτυακό ιστό, όταν μια επίθεση λαμβάνει χώρα, δεδομένα κίνησης στο δίκτυο επιτρέπουν την αποτελεσματική αναγνώριση της πηγής και των στόχων των επιθέσεων. Η προσωποποιημένη ιατρική είναι επίσης ένας σημαντικός τομέας αξιοποίησης μεγάλου όγκου δεδομένων. Όλο και περισσότερες μεταβλητές που σχετίζονται με την υγεία, όπως τα μοριακά χαρακτηριστικά ενός ατόμου, οι δραστηριότητες του ατόμου, οι συνήθειες και διάφοροι

περιβαλλοντικοί παράγοντες, είναι πλέον διαθέσιμες. Χρησιμοποιώντας αυτά τα κομμάτια πληροφορίας, είναι δυνατή η διάγνωση ασθενειών ενός ατόμου και επιλογή ατομικής αντιμετώπισης της ασθένειας. Ακόμα, πολλά αρχεία έχουν ψηφιοποιηθεί. Για παράδειγμα, η Google έχει σαρώσει εκατομμύρια βιβλία και έχει ανιχνεύσει κάθε λέξη μέσα σε αυτά. Αυτή η δραστηριότητα παρήγαγε τεράστιο όγκο δεδομένων και κατέστη δυνατή η αναγνώριση σημαντικών στοιχείων για την ανθρωπότητα, όπως η οπτικοποίηση της οικονομικής σύνδεσης αρχαίων πολιτισμών, η χαρτογράφηση αρχαίων πόλεων, το πώς αναπτύχθηκε η γλώσσα στην πάροδο του χρόνου και η ανάλυση ιστορικών γεγονότων.

2.1.8.2. Δεδομένα μεγάλου όγκου μεγέθους δείγματος και υψηλής διαστατικότητας (Μεγάλα δεδομένα)

Τα μεγάλα δεδομένα δημιούργησαν μοναδικά χαρακτηριστικά πληροφοριών, τα οποία δεν χαρακτηρίζουν τα παραδοσιακά σύνολα δεδομένων, μέχρι σήμερα. Αυτά τα χαρακτηριστικά θέτουν σημαντικές προκλήσεις στην ανάλυση δεδομένων και ενισχύουν την ανάπτυξη νέων στατιστικών προσεγγίσεων. Αντίθετα με τα συμβατικά σύνολα δεδομένων μέχρι σήμερα, όπου το μέγεθος του δείγματος είναι συνήθως μεγαλύτερο της διάστασης τους, τα μεγάλα δεδομένα χαρακτηρίζονται από μεγάλο όγκο μέγεθος δείγματος και υψηλή διαστατικότητα. Το μεγάλο μέγεθος του δείγματος επιτρέπει την αποκάλυψη κρυμμένων μοτίβων που σχετίζονται με υπό-πληθυσμούς και χαμηλή ομοιότητα σε έναν σύνολο πληθυσμού. Όμως, η μοντελοποίηση της εγγενούς ετερογένειας των μεγάλων δεδομένων απαιτεί περισσότερο εξελιγμένες στατιστικές μεθόδους ανάλυσης. Ορισμένα χαρακτηριστικά των δεδομένων μεγάλου όγκου που σχετίζονται με την υψηλή διαστατικότητα, όπως η συσσώρευση θορύβου, οι λανθασμένες συσχετίσεις και η τυχαία ενδογένεια κάνουν τις παραδοσιακές μεθόδους ακατάλληλες για την ανάλυση των δεδομένων. Οι περισσότερες υψηλής διάστασης στατιστικές τεχνικές επικεντρώνονται μόνο στα προβλήματα συσσώρευσης θορύβου και λανθασμένων συσχετίσεων. Βασίζονται σε υποθέσεις εξωγένειας, που αδυνατούν να επαληθευτούν από τα δεδομένα που έχουν συλλεχθεί, λόγω της τυχαίας ενδογένειας.

Τα μεγάλα δεδομένα συχνά δημιουργούνται από την συγκέντρωση πολλών πηγών δεδομένων που αντιστοιχούν σε διαφορετικούς υπό-πληθυσμούς. Κάθε υπό-πληθυσμός ίσως κατέχει συγκεκριμένα χαρακτηριστικά, τα οποία δεν υπάρχουν σε άλλους υπό-πληθυσμούς. Σε δεδομένα όπου το μέγεθος δείγματος είναι μικρό, πολλά σημεία από μικρούς υπό-πληθυσμούς κατηγοριοποιούνται γενικά ως διαφορετικά και είναι δύσκολο να μοντελοποιηθούν συστηματικά, λόγω ανεπαρκών παρατηρήσεων. Όμως, το μεγαλύτερο μέγεθος δείγματος επιτρέπει την καλύτερη κατανόηση ανομοιογένειας, ενισχύοντας μελέτες όπως η εξερεύνηση συσχέτισης μεταξύ ορισμένων μεταβλητών όπως γονίδια, και σπάνιων συμπερασμάτων όπως σπάνιες παθήσεις ή παθήσεις σε μικρό πληθυσμό, και η κατανόηση γιατί κάποιες θεραπείες είναι ευεργετικές για κάποιους υπό-

πληθυσμούς, ενώ για κάποιους άλλους είναι ζημιογόνες. Χάρης στα μεγάλα μεγέθη δειγμάτων, επιτρέπεται η αποκάλυψη χαμηλής ομοιότητας σε έναν πληθυσμό. Για παράδειγμα, η αξιολόγηση του κινδύνου καρδιοπάθειας ορισμένων περιβαλλοντικών παραγόντων μπορούν να αξιολογηθούν μόνο όταν το μέγεθος δείγματος είναι αρκετά μεγάλο. Επίσης, η ανομοιογένεια των μεγάλων δεδομένων δημιουργεί σημαντικές προκλήσεις στα στατιστικά συμπεράσματα. Σε χαμηλή διαστατικότητα, οι συμβατικές τεχνικές, όπως ο αλγόριθμος μεγιστοποίησης προσδοκιών μπορεί να εφαρμοστεί για περιορισμένα μείγματα μοντέλων. Σε περιπτώσεις υψηλής διαστατικότητας όμως, χρειάζεται η προσεκτική ρύθμιση της διαδικασίας υπολογισμού για την αποφυγή υπερβολικής τοποθέτησης ή συσσώρευσης θορύβου και η επινόηση σωστών υπολογιστικών αλγορίθμων (**Khalili and Chen, 2007; Stadler et al., 2010**).

Η ανάλυση δεδομένων τεράστιου μεγέθους απαιτεί τον ταυτόχρονο υπολογισμό αρκετών παραμέτρων. Τα εκτιμώμενα σφάλματα συσσωρεύονται όταν ένας κανόνας πρόβλεψης εξαρτάται από ένα μεγάλο αριθμό τέτοιων παραμέτρων. Η συσσώρευση θορύβου είναι ιδιαίτερα δυνατή σε υψηλή διαστατικότητα και μπορεί να υπερισχύσει έναντι των πραγματικών σημάτων. Συνήθως αντιμετωπίζεται με την παραδοχή της αραιότητας (**Hastie et al., 2009; Bühlmann and van de Geer, 2011**). Σε μία κατηγοριοποίηση υψηλής διαστατικότητας τα αποτελέσματα μπορεί να είναι φτωχά όταν υπάρχουν πολλά αδύναμα χαρακτηριστικά που δεν συμβάλλουν στην μείωση του σφάλματος ταξινόμησης (**Fan and Fan, 2008**). Για την μείωση της επίδρασης της συσσώρευσης θορύβου, μπορούν να χρησιμοποιηθούν αραιά υποδείγματα και να γίνει επιλογή μεταβλητών. Αντί για τη χρήση όλων των χαρακτηριστικών, μπορεί να επιλεγεί ένα υποσύνολο χαρακτηριστικών, με το οποίο επιτυγχάνεται η καλύτερη αναλογία σήματος έναντι θορύβου. Αυτός ο τρόπος επιδεικνύει πιο βελτιωμένη απόδοση κατηγοριοποίησης (**Hastie et al., 2009; Bühlmann and van de Geer, 2011**). Επίσης, η επιλογή μεταβλητών παίζει σημαντικό ρόλο στην αποφυγή συσσώρευσης θορύβου στην ταξινόμηση και την πρόβλεψη παλινδρόμησης. Όμως, η επιλογή μεταβλητής σε υψηλή διαστατικότητα είναι αρκετά δύσκολη λόγω της ψευδούς συσχέτισης, της τυχαίας ενδογένειας, της ανομοιογένειας και των σφαλμάτων μέτρησης.

Ψευδής συσχέτιση προκύπτει εξαιτίας της υψηλής διαστατικότητας, όπου μη συσχετιζόμενες τυχαίες μεταβλητές μπορεί να έχουν υψηλή συσχέτιση δειγμάτων. Το γεγονός αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό, καθώς μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένες επιστημονικές ανακαλύψεις και λανθασμένα στατιστικά συμπεράσματα. Άλλο ένα ζήτημα που προκύπτει από την υψηλή διαστατικότητα είναι η τυχαία ενδογένεια. Σε μία ρύθμιση παλινδρόμησης, ο όρος ενδογένεια αναφέρεται στο ότι κάποιος παράγοντας πρόβλεψης σχετίζεται με υπολείμματα θορύβου. Η εξωγενής υπόθεση ότι τα υπολείμματα θορύβου δεν σχετίζονται με τους παράγοντες πρόβλεψης είναι σημαντική για την εγκυρότητα των υπάρχοντων στατιστικών διαδικασιών, συμπεριλαμβανομένης της συνέπειας

επιλογής μεταβλητής. Αυτή η υπόθεση είναι εύκολο να παραβιαστεί σε υψηλή διαστατικότητα αφού μερικές μεταβλητές σχετίζονται τυχαία με θόρυβο, κάνοντας τις περισσότερες διαδικασίες σε υψηλή διαστατικότητα στατιστικώς μη έγκυρες. Αντίθετα με την εσφαλμένη συσχέτιση, η τυχαία ενδογένεια αναφέρεται στην όχι σκοπίμως ύπαρξη συσχετισμών μεταξύ μεταβλητών, λόγω της υψηλής διαστατικότητας. Γενικότερα, η ενδογένεια συμβαίνει λόγω προκατειλημμένων επιλογών, σφαλμάτων μέτρησης και παράληψης μεταβλητών. Αυτά τα φαινόμενα εμφανίζονται στην ανάλυση μεγάλων δεδομένων κυρίως λόγω δύο λόγων. Με τα πλεονεκτήματα νέων τεχνικών μέτρησης υψηλής απόδοσης, οι ερευνητές είναι ικανοί να συλλέξουν όσο μεγαλύτερο αριθμό χαρακτηριστικών γίνεται. Έτσι αυξάνεται η πιθανότητα μερικά από αυτά τα χαρακτηριστικά να συσχετιστούν κατά λάθος με υπολείμματα θορύβου. Τα μεγάλα δεδομένα συγκεντρώνονται από πολλαπλές πηγές με δυναμικά διαφορετικά σχήματα παραγωγής δεδομένων. Αυτό αυξάνει την πιθανότητα της προκατειλημμένης επιλογής και σφαλμάτων μέτρησης, τα οποία μπορεί να προκαλέσουν τυχαία ενδογένεια.

2.1.8.3. Επίδραση μεγάλων δεδομένων στις υπολογιστικές δομές

Το τεράστιο μέγεθος δειγμάτων των μεγάλων δεδομένων θέτει υπό αμφισβήτηση τις παραδοσιακές υπολογιστικές υποδομές. Σε πολλές εφαρμογές χρειάζεται η ανάλυση δεδομένων που περιέχουν δισεκατομμύρια ή ακόμα και τρισεκατομμύρια σημεία πληροφορίας, γεγονός το οποίο καθιστά ακόμα και ένα γραμμικό πέρασμα του συνόλου δεδομένων μη προσιτό. Επιπροσθέτως, τέτοιου είδους δεδομένα μπορεί να είναι αδύνατο να αποθηκευτούν σε κεντρική βάση δεδομένων. Η θεμελιώδης προσέγγιση για την αποθήκευση και επεξεργασία τέτοιων δεδομένων είναι το διαίρει και βασίλευε. Η ιδέα είναι να διαχωριστεί ένα μεγάλο πρόβλημα σε εύκολα στο χειρισμό και ανεξάρτητα υπό-πρόβληματα. Κάθε υπό-πρόβλημα αντιμετωπίζεται παράλληλα από διαφορετικές μονάδες επεξεργασίας. Τα ενδιάμεσα αποτελέσματα από κάθε μεμονωμένη επεξεργασία συνδυάζονται στη συνέχεια για την παραγωγή του τελικού αποτελέσματος. Σε μικρή κλίμακα, αυτή η προσέγγιση μπορεί να ενσωματωθεί είτε σε υπολογιστές πολλαπλών πυρήνων, είτε σε υπολογιστές δικτύου. Όμως, σε πολύ μεγάλη κλίμακα, θέτονται σημαντικές προκλήσεις στις υπολογιστικές δομές. Για παράδειγμα, όταν συνδέεται μεγάλος αριθμός υπολογιστών για την εκτέλεση μεγάλων υπολογιστικών διεργασιών, είναι πολύ πιθανό κάποιοι από αυτούς να καταστραφούν ή να αντιμετωπίσουν προβλήματα κατά τη διάρκεια της διαδικασίας. Επιπλέον, σε μία μεγάλη υπολογιστική διαδικασία είναι απαραίτητη η ίση κατανομή στους διάφορους υπολογιστές για την ισορρόπηση της εργασίας. Ο σχεδιασμός μεγάλης κλίμακας, υψηλής προσαρμοστικότητας και ανεκτικότητας σε σφάλματα υπολογιστικά συστήματα είναι ιδιαίτερα δύσκολη διαδικασία και μπορεί να ωθήσει την δημιουργία νέων και αξιόπιστων υπολογιστικών δομών που υποστηρίζουν τεράστιου όγκου παράλληλη αποθήκευση και επεξεργασία δεδομένων. Ο υπολογισμός νέφους έχει

φέρει επανάσταση στα σύγχρονα υπολογιστικά συστήματα. Έχει τεράστιο εύρος εφαρμογής, από πόρους εξοπλισμού και υποδομές λογισμικού σε σύνολα δεδομένων, έως παράδοση σε ερευνητές σαν υπηρεσία όπου και όποτε χρειάζεται. Το σημαντικότερο χαρακτηριστικό του υπολογισμού νέφους είναι η ελαστικότητα του και η ικανότητα του να αυξηθεί ή να συρρικνωθεί, γεγονός το οποίο τον κάνει κατάλληλο για αποθήκευση και επεξεργασία μεγάλων δεδομένων.

Τα μεγάλα δεδομένα είναι υψηλής διαστατικότητας και τεράστιου μεγέθους, γεγονός το οποίο θέτει σημαντικές προκλήσεις στον υπολογισμό και την βελτιστοποίηση σε μεγάλη κλίμακα (**Boyd and Vandenberghe, 2004; Boyd et al., 2011**). Η απευθείας εφαρμογή σε δεδομένα υψηλής διαστατικότητας απαιτεί την επίλυση προβλημάτων βελτιστοποίησης μεγάλης κλίμακας. Η βελτιστοποίηση με μεγάλο όγκο μεταβλητών είναι ιδιαίτερα ακριβή και επίσης πάσχει από αργούς αριθμητικούς ρυθμούς σύγκλισης και αστάθειας. Επίσης, ο τεράστιος όγκος δειγμάτων των μεγάλων δεδομένων, που μπορεί να είναι της τάξης εκατομμυρίων ή δισεκατομμυρίων στα πεδία της γονιδιωματικής, των δικτύων κοινωνικής δικτύωσης κ.ο.κ, ευθύνονται για την αύξηση του εντατικού υπολογισμού διαχείρισης δεδομένων και αρκετών ερωτημάτων. Ο παράλληλος υπολογισμός, οι τυχαίοι αλγόριθμοι, οι αλγόριθμοι κατά προσέγγιση και η απλοποιημένη εφαρμογή είναι οι διαδικασίες που πρέπει να αναζητηθούν. Επομένως, η δυνατότητα επέκτασης των στατιστικών μεθόδων για υψηλή διαστατικότητα και μεγάλο μέγεθος δειγμάτων πρέπει να εξεταστεί σοβαρά στην ανάπτυξη στατιστικών διαδικασιών.

2.1.9. Μοριακό λειτουργικό περιβάλλον – Ποσοτικές σχέσεις δομής / λειτουργίας - Μοριακή σύνδεση

Η μελέτη των ποσοτικών σχέσεων δομής - λειτουργίας έχουν αποκτήσει σημαντική θέση στην σύγχρονη επιστήμη της χημείας (**Martinez et al., 2005; Tropsha and Wang, 2006; Rolland et al, 2005; González-Díaz et al, 2007**). Στις αναλύσεις δομής - λειτουργίας, ένας ή περισσότεροι παράγοντες προσδιορισμού σχετίζονται με την μοριακή δραστηριότητα, μέσω στατιστικής ανάλυσης. Ο κύριος στόχος της ανάλυσης είναι η δημιουργία στατιστικών μοντέλων μέσω των οποίων είναι εφικτή η πρόβλεψη της βιολογικής δραστηριότητας χημικών ενώσεων, που πολλές φορές δεν έχουν δοκιμαστεί. Επίσης, μέσω της ανάλυσης δομής - λειτουργίας, είναι εφικτή η μηχανική ερμηνεία της δραστηριότητας συγκεκριμένης ομάδας ουσιών και ως εκ τούτου η βελτιστοποίησή τους. Τα κύρια βήματα για την ανάπτυξη ενός τέτοιου μοντέλου ανάλυσης είναι η επιλογή συνόλου δεδομένων ουσιών με γνωστή βιολογική λειτουργία, ο υπολογισμός των μοριακών παραμέτρων περιγραφής, η ανάπτυξη στατιστικού μοντέλου που συσχετίζει την λειτουργία με τους υπολογισμένους παράγοντες και, στη συνέχεια, η αξιολόγηση του παραγόμενου υποδείγματος με ένα σύνολο δοκιμών.

Οι μοριακές παράμετροι περιγραφής αποτελούνται από μία σειρά αριθμητικών αξιών, που συνδέονται με τις δομικές, ηλεκτρονιακές, στερεοχημικές και φυσικό-χημικές ιδιότητες του μοριακού συστήματος σε μία μελέτη. Μέχρι σήμερα, ένας μεγάλος αριθμός μοριακών παραμέτρων περιγραφής έχουν επινοηθεί, μεταξύ των οποίων είναι φυσικό-χημικές παράμετροι (**Ivanciuc et al., 2007**), παράμετροι κβαντικών χημικών ουσιών (**Wan et al., 2004**), και παράμετροι τοπολογικών δεικτών (**Balaban et al., 2004**). Για τον υπολογισμό των τοπογραφικών και κβαντικο-χημικών παραμέτρων περιγραφής είναι απαραίτητο να καθοριστεί η πιο σταθερή τρισδιάστατη δομή των ουσιών, μέσω μοριακών μηχανισμών (**Kotev and Ivanov, 2008; van Gunsteren et al., 1994**), σε συνδυασμό με μεθόδους συμβατικών αναζητήσεων, όπως η μοριακή δυναμική (**van Gunsteren et al., 2006**). Ο υπολογισμός τοπολογικών παραμέτρων περιγραφής έχει βιώσει σημαντική ανάπτυξη τα τελευταία χρόνια, μέσω απλών διαδικασιών, που επιτρέπουν μία αποτελεσματική κωδικοποίηση της δομικής πληροφορίας ενός μορίου. Επιπλέον, υπάρχει ένα εύρος στατιστικών μεθοδολογιών που έχουν τη δυνατότητα να εφαρμοστούν σε αναλύσεις χημειομετρίας, όπως η πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση (MLR), η ανάλυση κύριων συστατικών (PCA), η μερική παλινδρόμηση τετραγώνων (PLS), και διαφορετικοί τύποι τεχνητών νευρωνικών δικτύων (ANN). Οι παραπάνω τεχνικές μπορούν να εφαρμοστούν επιτυχώς για την δημιουργία μοντέλου συσχέτισης μεταξύ της μοριακής δομής και των ιδιοτήτων τους (**Bharanidharan and Gautham, 2004; Vilar et al., 2006; González-Díaz et al., 2008; Nguyen and Rocke, 2002**).

Ένας άλλος τρόπος μελέτης της αλληλεπίδρασης μεταξύ ενός φαρμάκου και ενός συγκεκριμένου βιολογικού υποδοχέα περιλαμβάνει την μοντελοποίηση του μοριακού συμπλόκου που σχηματίζεται από δύο μόρια. Οι τρισδιάστατες δομές ενός αριθμού συμπλόκων φαρμάκων και πρωτεΐνης έχουν καθοριστεί μέσω φασματοσκοπίας και πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού. Αυτές οι πειραματικές δομές παρέχουν μία πολύ χρήσιμη απεικόνιση υψηλής ανάλυσης του ενεργού μέρους των πρωτεϊνών και των αλληλεπιδράσεων τους με σύμπλοκα. Με βάση τις δομικές πληροφορίες που λαμβάνονται είναι δυνατός ο σχεδιασμός νέων ενώσεων, οι οποίες σχετίζονται με τον στόχο που ερευνάται. Όμως, όταν η δομή της πρωτεΐνης δεν έχει καθοριστεί πειραματικά, ο σχεδιασμός με βάση τη δομή γίνεται εξαιρετικά πολύπλοκος, καθώς σε αυτή την περίπτωση ο σχεδιασμός βασίζεται σε πειραματικά μοντέλα ομολογίας. Σύμπλοκα μακρομορίων μπορούν να αναπαραχθούν μέσω πειραμάτων μοριακής σύνδεσης, που έχουν διεξαχθεί χρησιμοποιώντας πειραματικές δομές ή μοντέλα ομολογίας. Διαφορετικές μεθοδολογίες σύνδεσης και διαφορετικές λειτουργίες αξιολόγησης έχουν αναπτυχθεί για τον υπολογισμό και την ποσοτικοποίηση της αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης και συνδέτη συμπλόκων (**Kroemer, 2003; Friesner et al., 2004; Murphy et al., 2003**). Οι τεχνικές αυτές που βασίζονται στη δομή, αποδείχθηκαν πολύ χρήσιμες στην μελέτη μοριακής αναγνώρισης, από ποιοτικής και ποσοτικής απόψεως.

Ένα υπολογιστικό πρόγραμμα το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί για την αναπαραγωγή μοντέλων με βάση τον υπολογισμό μοριακών παραμέτρων περιγραφής και στατιστικής ανάλυσης και μοντέλων με βάση την μοριακή σύνδεση, είναι το MOE (molecular operating environment) (MOE). Με την εφαρμογή του λογισμικού είναι εφικτός ο υπολογισμός ενός μεγάλου αριθμού μοριακών παραμέτρων περιγραφής. Οι υπολογισμένες παράμετροι περιγραφής μπορούν να διαχωριστούν σε τρεις κατηγορίες: παράμετροι δύο διαστάσεων, οι οποίοι βασίζονται στα άτομα και την πληροφορία συνδεσιμότητας, εσωτερικοί παράμετροι περιγραφής τριών διαστάσεων, που βασίζονται στην τρισδιάστατη πληροφορία συντεταγμένων, αλλά δεν επηρεάζονται από τον προσανατολισμό, και εξωτερικοί παράμετροι περιγραφής τριών διαστάσεων, οι οποίοι βασίζονται σε τρισδιάστατες πληροφορίες συντεταγμένων και είναι ευαίσθητες στον απόλυτο προσανατολισμό. Μερικές παράμετροι δύο διαστάσεων είναι οι φυσικές ιδιότητες, οι υποδιαιρούμενες επιφάνειες, οι μετρήσεις ατόμων και ομολόγων, παράμετροι πινάκων απόστασης, οι παράμετροι περιγραφής χαρακτηριστικών φαρμακοφόρου, και οι μερικοί παράμετροι περιγραφής χρεώσεων. Ως τρισδιάστατοι παράμετροι περιγραφής κατηγοριοποιούνται οι δυνητικοί παράμετροι περιγραφής ενέργειας, οι επιφάνειες, οι παράμετροι περιγραφής όγκου και σχήματος, και οι παράμετροι περιγραφής που εξαρτώνται από τη διαμόρφωση. Εφόσον οι παράμετροι περιγραφής έχουν υπολογιστεί, είναι δυνατή η πραγματοποίηση διαφορετικών τύπων αναλύσεων, όπως η δυαδική ανάλυση παραμέτρων περιγραφής, πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση και ανάλυση κύριων συστατικών.

Η μοριακή σύνδεση μέσω του λογισμικού MOE αναζητά πλεονεκτικές δεσμευτικές παραμέτρους μεταξύ των μορίων-συνδετών και των μακρομοριακών στόχων. Η αναζήτηση πραγματοποιείται μέσα σε ένα κουτί σύνδεσης τριών διαστάσεων. Το μέγεθος και ο προσανατολισμός του κουτιού εξαρτάται από τα επιλεγμένα άτομα. Η αναζήτηση πραγματοποιείται μέσω μοριακών πεδίων δυναμικής μηχανικής (Halgren, 1996) και είναι εφικτή η χρήση δύο διαφορετικών πρωτοκόλλων που βελτιστοποιούν την χωροταξική επαφή και τις ηλεκτροστατικές επαφές μεταξύ των μορίων, μέσω της δημιουργίας τυχαίων αλλαγών στις συντεταγμένες των μορίων συνδετών. Αυτοί οι μέθοδοι χρησιμοποιούν αξιολόγηση αποδοχής ή απόρριψης για κάθε μοριακή κίνηση για την εύρεση της βέλτιστης λύσης. Τα δύο πρωτόκολλα που είναι διαθέσιμα είναι: προσομοίωση απόπτωσης, η οποία χρησιμοποιεί τις παραμέτρους κύκλους ανά εκτέλεση, όριο επανάληψης και αρχική θερμοκρασία, και αναζήτηση ταμπού, η οποία εκτελεί μία στοχαστική αναζήτηση διατηρώντας μία λίστα προηγούμενων διαμορφώσεων και απαγορεύονται σε μελλοντικές κινήσεις και χρησιμοποιεί τις παραμέτρους βήματα ανά εκτέλεση, κινήσεις ανά βήμα και μήκος λίστας. Αυτοί οι μέθοδοι εφαρμόζουν μία αξιολόγηση αποδοχής ή απόρριψης για κάθε μοριακή κίνηση για την εύρεση της βέλτιστης λύσης. Οι μοριακές κινήσεις που μειώνουν την ενέργεια του

συστήματος γίνονται αποδεκτές, ενώ κινήσεις που αυξάνουν την ενέργεια μπου να γίνουν αποδεκτές ή να απορριφθούν. Η εκτέλεση της σύνδεσης ξεκινά με μία τυχαία διάταξη του συνδέτη ή μία διάταξη που έχει επιλεγεί από το χρήστη. Μία κίνηση μπορεί να αποτελείται από τυχαίες διαταραχές μερικών ή όλων των περιστρεφόμενων δεσμών των μορίων συνδετών. Είναι επίσης εφικτός ο περιορισμός της αναζήτησης χρησιμοποιώντας παραμέτρους γωνίας, συστροφής και απόστασης. Οι ενέργειες μεταξύ των συνδετών και των στόχων υπολογίζονται από την ενσωματωμένη πιθανή λειτουργία ή από πιθανά πεδία που βασίζονται στο πλέγμα. Στην δεύτερη περίπτωση, η ενέργεια αλληλεπίδρασης υπολογίζεται χρησιμοποιώντας ηλεκτροστατικά πιθανά πεδία που έχουν δοκιμαστεί σε ένα πλέγμα που καλύπτει το κουτί σύνδεσης. Αυτή η μέθοδος υπολογίζει τα πιθανά πεδία ενέργειας μόνο στην αρχή του υπολογισμού σύνδεσης και είναι ταχύτερη από την μέθοδο που βασίζεται την ενσωματωμένη πιθανή ενεργειακή λειτουργία. Τελικώς, τα αποτελέσματα διαμορφώσεων και ενεργειών, όπως η συνολική ενέργεια, η ηλεκτροστατική ενέργεια, η ενέργεια μεταξύ της πρωτεΐνης και του συνδέτη, η ενέργεια του μορίου-συνδέτη, αποθηκεύονται σε μια βάση δεδομένων του λογισμικού. Το λογισμικό MOE έχει χρησιμοποιηθεί σε διάφορες μελέτες για την εφαρμογή μοριακή σύνδεσης διαφορετικών συνδετών με ένα μεγάλο αριθμό βιολογικών στόχων. Τα αποτελέσματα σε αυτούς τους τύπους ερευνών ποικίλουν με βάση την κρυσταλλογραφική πληροφορία που είναι διαθέσιμη για τις πρωτεΐνες και τα σύμπλοκα πρωτεϊνών-συνδετών. Όταν το πρωτόκολλο σύνδεσης προσαρμόζεται μέσω κρυσταλλοποιημένων δομών, τα αποτελέσματα είναι περισσότερο ακριβή και αξιόπιστα. Όταν οι μελέτες σύνδεσης βασίζονται σε μοντέλα ομολογιών, τα αποτελέσματα πρέπει να αντιμετωπίζονται με περισσότερη προσοχή, εξαιτίας της έλλειψης πειραματικού μοντέλου.

2.1.10. Σκοπός έρευνας

Στις μέρες μας, αποτελεί πρόκληση η συλλογή, διαχείριση και ανάλυση του μεγάλου όγκου των διαθέσιμων δεδομένων που υπάρχουν. Ειδικότερα, στις βιοεπιστήμες, με την πρόοδο της τεχνολογίας έχει σημειωθεί αύξηση πολυδιάστατων βιολογικών δεδομένων τα οποία βρίσκονται σε πρωτογενή μορφή και διάσπαρτα σε διάφορες βάσεις δεδομένων. Ταυτόχρονα, το δέντρο της ελιάς έχει υπάρξει ως αντικείμενο εκτενούς έρευνας, ωστόσο δεν είναι όλα γνωστά για τις φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των ειδών και των ποικιλιών. Συνεπώς, δημιουργείται η ανάγκη για ανάπτυξη αξιόπιστης μεθοδολογίας, με σκοπό την ανάλυση των γενετικών και γονιδιωματικών πληροφοριών, για την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τους μοριακούς μηχανισμούς δράσης της ελιάς. Στην παρούσα μελέτη παρουσιάζεται μία πρότυπη *in silico* προσέγγιση που συνδυάζει υπολογιστικά εργαλεία και μεθόδους, από την εξόρυξη γονιδιακών δεδομένων έως την ταξινόμηση οντολογιών και την γενετική συσχέτιση, με σκοπό την προσπάθεια ομαδοποίησης και ανακάλυψης σχεσιακών κόμβων εντός του γένους *Olea*. Συνοπτικά, ο στόχος της μελέτης είναι η κάλυψη των κενών σε αναλύσεις φυτικών γενετικών δεδομένων μέσω διαδικασιών εξόρυξης, φιλτραρίσματος,

ομαδοποίησης και ταξινόμησης γενετικών δεδομένων, με τη χρήση όρων οντολογίας και νουκλεοτιδικών ακολουθιών.

Μεγάλος αριθμός ερευνών υποστηρίζει την ευεργετική επίδραση των προϊόντων της ελιάς, όπως οι φαινολικές ενώσεις, ενάντια σε διάφορες παθολογίες, μέσω της αντιοξειδωτικής, αντιφλεγμονώδους, καρδιοπροστατευτικής και νευροπροστατευτικής τους δράσης. Ταυτόχρονα, όμως παρά τη μεγάλη προσπάθεια που γίνεται μέχρι σήμερα για την αντιμετώπιση των ασθενειών, όπως οι νευροεκφυλιστικές παθήσεις, δεν υπάρχει διαθέσιμη θεραπεία. Τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται για τέτοιου είδους ασθένειες, έχουν μόνο τη δυνατότητα καθυστέρησης της προόδου των συμπτωμάτων και μέχρι τώρα έχουν αποδειχθεί ανεπιτυχή. Επομένως, δημιουργείται η ανάγκη ανακάλυψης εκμεταλλεύσιμων ενώσεων με σκοπό τη μείωση του κινδύνου τέτοιου είδους διαταραχών ή την ανακάλυψη αποτελεσματικών θεραπειών. Η παρούσα έρευνα μελετά την αλληλεπίδραση της φαινολικής ένωσης τυροσόλης, με την πρωτεΐνη Τυροσινάση, η οποία σχετίζεται με τη νόσο Parkinson και χρησιμοποιείται για διάφορους σκοπούς από την φαρμακευτική βιομηχανία. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε μέσω υπολογιστικού μοριακού περιβάλλοντος, ως παράδειγμα κατανόησης του πιθανού ευεργετικού ρόλου των φαινολικών ενώσεων στην αντιμετώπιση νευροεκφυλιστικών διαταραχών.

2.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1. Συλλογή δεδομένων

Το σύνολο δεδομένων των γονιδιωματικών ακολουθιών δημιουργήθηκε συλλέγοντας δεδομένα από την Νουκλεοτιδική βάση δεδομένων του National Centre for Biotechnology Information (NCBI). Οι λέξεις κλειδιά που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάκτηση και εξαγωγή των δεδομένων ήταν: “*Olea europaea*”, “*europaea*”, “*protein*”, “*DNA*”, “*nucleotide*”, “*genome*”, “*clone*”, “*cultivar*”, “*wild species*”, “*propagating material*”, “*subspecies*”, “*Oleaceae*”, “*olive*”, “*gene*”, and “*Olea*”.

Η ανάλυση των ακολουθιών που συλλέχθηκαν, πραγματοποιήθηκε σε τρία βασικά επίπεδα, τα οποία αλληλοεπιδρούν μεταξύ τους. Τα επίπεδα αυτά ήταν: α) το μέγεθος της ακολουθίας, β) οι οντολογίες, και γ) η ομοιότητα των νουκλεοτιδικών ακολουθιών.

2.2.2. Πρώτο επίπεδο ανάλυσης – Φιλτράρισμα δεδομένων

Το φιλτράρισμα του συνόλου δεδομένων των νουκλεοτιδικών ακολουθιών που συλλέχθηκαν, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού και γλώσσας προγραμματισμού MATLAB. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αφαίρεση και μείωση του θορύβου, των ακολουθιών που αποτελούν μέρος της ακολουθίας και όχι ολόκληρη την ακολουθία του γονιδίου, και των ακολουθιών με τυχόν ακούσιες υποκαταστάσεις, παραλείψεις ή παρεμβολές αμινοξέων κατά τη διάρκεια της βιοσύνθεσης των πρωτεϊνών. Για την αφαίρεση των παραπάνω χρησιμοποιήθηκε ένα σύνολο χαρακτήρων για τον καθορισμό του μοτίβου αναζήτησης, κανονικών εκφράσεων (regular expressions).

Ενδεικτικά ένας από τους αλγόριθμους που χρησιμοποιήθηκε για την αφαίρεση και μείωση του θορύβου στο αρχικό σύνολο δεδομένων:

```
fasta = fastaread('clean_sequences.txt')
counter=1;
for i=1:length(fasta)

    if isempty(regexp(fasta(i).Header,'artial','match'))==1
        n_fasta(counter)=fasta(i);
        counter=counter+1;
    end
end
fasta=n_fasta;
clear n_fasta
```

Το νέο σύνολο δεδομένων που προέκυψε, περιλάμβανε μόνο ολοκληρωμένες ακολουθίες, οι οποίες με τη σειρά τους χωρίστηκαν σε τρία υπό-σύνολα δεδομένων ακολουθιών με βάση το μήκος της ακολουθίας ως εξής:

- Ομάδα A: ακολουθίες με μήκος μικρότερο ή ίσο με 1.000 βάσεις,
- Ομάδα B: ακολουθίες με μήκος μικρότερο ή ίσο με 10.000 βάσεις και μεγαλύτερο από 1.000 βάσεις,
- Ομάδα C: ακολουθίες με μήκος μεγαλύτερο ή ίσο με 10.000 βάσεις

Ενδεικτικά ένας από τους αλγορίθμους που χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό των συνόλων δεδομένων με βάση το μήκος:

```
% fasta=fastaread('fastadataset.txt')
counter=1;
counter2=1;
for i=1:501
    if length(fasta(i).Sequence)<1000
        n_fasta(counter)=fasta(i)

        counter=counter+1;
    else length(fasta(i).Sequence)>1000
        b_fasta(counter2)=fasta(i)
        counter2=counter+1;

    end
end
fastawrite('Newfile',b_fasta)
```

Ο διαχωρισμός του συνόλου δεδομένων με βάση το μήκος της ακολουθίας πραγματοποιήθηκε με σκοπό την απομόνωση και συγκέντρωση περιοχών, οι οποίες αντιστοιχούν σε ακολουθίες πρωτεϊνών. Ως εκ τούτου, οι ακολουθίες των Ομάδων A και B χρησιμοποιήθηκαν στο δεύτερο επίπεδο της ανάλυσης.

2.2.3. Δεύτερο επίπεδο ανάλυσης – Εξόρυξη δεδομένων και σημασιολογία

Με βάση την οντολογία, πραγματοποιήθηκε χαρακτηρισμός διαφορετικών ομάδων των συνόλων δεδομένων. Ο χαρακτηρισμός πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας αλγορίθμους ομαδοποίησης και ταξινόμησης. Σε αυτήν την κατεύθυνση, χρησιμοποιήθηκε κυρίως η εργαλειοθήκη Βιοπληροφορικής (**Bioinformatics Toolbox²**) για τον υπολογισμό, την ανάπτυξη, την εκμάθηση

και την μοντελοποίηση, ως γλώσσα υπολογισμού και προγραμματισμού υψηλής απόδοσης, σε φιλικό προς το χρήστη λειτουργικό περιβάλλον (Cai et al, 2005).

Ως αποτέλεσμα, με βάση το δεύτερο επίπεδο ανάλυσης, δημιουργήθηκε μια νέα βάση δεδομένων, η οποία περιέχει μεμονωμένα υπό-σύνολα δεδομένων. Τα υπό-σύνολα δεδομένων περιλάμβαναν, μεταξύ άλλων, δεδομένα: α) χλωροπλαστικών ακολουθιών (chloroplast), β) μιτοχονδριακών ακολουθιών (mitochondria), γ) ακολουθιών μικροδορυφόρων (microsatellite), δ) ακολουθίες καλλιεργήσιμων ποικιλιών (cultivars), ε) ακολουθίες πρωτεϊνών (protein), στ) ακολουθίες ελικάσης (helicase), ζ) ακολουθίες ATPase, η) ακολουθίες πλαστιδίου (plastid), θ) ακολουθίες γονιδίου trn, ι) ακολουθίες ενζύμων (enzyme), κ) ακολουθίες ειδών (species).

Εκτός των παραπάνω υπό-συνόλων δεδομένων που δημιουργήθηκαν, το σύνολο δεδομένων που αναφερόταν στις πρωτεΐνες (protein dataset) κατηγοριοποιήθηκε περαιτέρω σε μικρότερα μεμονωμένα υπό-σύνολα δεδομένων, ως εξής: α) ριβοσωμικές ακολουθίες (ribosomal), β) ακολουθίες φωσφατάσης (phosphatase), γ) ακολουθίες E3 λιγάσης ουβικουιτίνης (E3 ubiquitin ligase), δ) ακολουθίες πρωτεϊνών δέσμευσης λιπαρού οξέος και ρετινοειδών (fatty acid- and retinol-binding protein, FAR), ε) ακολουθίες πρωτεϊνών Fbox, στ) ακολουθίες κινάσης (kinase), ζ) ακολουθίες πρωτεϊνών συντονισμού ιόντων ψευδαργύρου (zinc-finger), η) ακολουθίες πεντατριπεπτιδίου (pentatricopeptide).

2.2.4. Τρίτο επίπεδο ανάλυσης – Ανάλυση γενετικής πληροφορίας

Το τρίτο επίπεδο ανάλυσης αποτελείτο από ομαδοποίηση των δεδομένων που συλλέχθηκαν από το δεύτερο επίπεδο ανάλυσης, μέσα από αυστηρό συσχετισμό των γονιδιακών πληροφοριών. Μία λειτουργία ταξινόμησης δημιουργήθηκε, σύμφωνα με τον αλγόριθμο BLASTClust, στο λειτουργικό σύστημα Bio Linux, για την ταυτοποίηση γενετικής ομοιογένειας ή ετερογένειας, μεταξύ κάθε γονιδιωματικής ακολουθίας.

Στον αλγόριθμο BLASTClust εισήχθησαν ως δεδομένα, νουκλεοτιδικές ακολουθίες με ένα αριθμό παραμέτρων, που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της αυστηρότητας της ομαδοποίησης των ακολουθιών. Οι παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν για την ταξινόμηση των ακολουθιών περιλάμβαναν όρια πυκνότητας βαθμολογίας, ποσοστό ταυτοποίησης, μήκος ακολουθίας, ως εξής:

- ταυτοποίηση νουκλεοτιδικών ακολουθιών,
- ομαδοποίηση ακολουθιών μόνο όταν μεγαλύτερο του 95% του μήκους της ακολουθίας είναι πανομοιότυπο,
- κάλυψη άνω του 90% του μήκους της ακολουθίας.

και

- ταυτοποίηση νουκλεοτιδικών ακολουθιών,

- κάλυψη του 100% του μήκους της ακολουθίας
- ομαδοποίηση ακολουθιών μόνο όταν μεγαλύτερο του 70% του μήκους της ακολουθίας είναι πανομοιότυπο.

Αλγόριθμος: BLASTCLUST blastclust -i infile -o outfile -p F -L .9 -b T -S 95

Infile: Οι ακολουθίες που εμπεριέχονται στο αρχείο θα αναλυθούν ως προς την γενετική τους ομοιότητα

outfile: Αποτελέσματα ομαδοποίησης γενετικής ομοιότητας

-p F: οι ακολουθίες εισόδου ταυτοποιούνται ως νουκλεοτίδια

-S 95: αντιστοίχιση ακολουθιών (πανομοιότυπες κατά 95%)

-L 0.9: Η περιοχή ανάλυσης καλύπτει το 90% του μήκους της ακολουθίας

Ο αλγόριθμος BLASTclust ομαδοποίησε τις ακολουθίες παρουσιάζοντας το ID κάθε ακολουθίας που ομαδοποιήθηκε.

Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε εκ νέου η γλώσσα προγραμματισμού MATLAB για την παρουσίαση των αποτελεσμάτων.

Ενδεικτικά, παρουσιάζεται παράδειγμα αλγορίθμου για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων ενός υπο-συνόλου δεδομένων.

```
fasta=fastaread('dataset.txt');
```

```
fileID = fopen('analysis.txt','a');
```

```
[n,m]=size(A);
```

```
for i=1:n
```

```
fprintf(fileID,'We are in cluster: %d\n',i);
```

```
for j=1:m
```

```
if isempty(A{i,j})==0
```

```
for jj=1:length(fasta)
```

```
if isempty(strfind(fasta(jj).Header,A{i,j}))==0
```

2.2.5. Μελέτη μοριακής σύνδεσης

Χρησιμοποιώντας προσέγγιση εικονικής αξιολόγησης, πραγματοποιήθηκε μελέτη μοριακής μοντελοποίησης για την διερεύνηση της μοριακής αλληλεπίδρασης, τον τρόπο σύνδεσης ή δέσμευσης της χημικής ουσίας τυροσόλης και της πρωτεΐνης Τυροσινάσης. Πιο συγκεκριμένα, ερευνήθηκε η συσχέτιση μεταξύ των χημικών δομών τους και τα αντίστοιχα αποτελέσματα δέσμευσης. Εφαρμόστηκε υπολογιστική μεθοδολογία στην μελέτη για την αποσαφήνιση της σχέσης δραστηριότητας - δομής μεταξύ της φαινολικής ένωσης και της πρωτεΐνης - βιολογικού στόχου. Το σύμπλοκο κρυσταλλικής δομής της πρωτεΐνης Τυροσινάσης ανακτήθηκε από τη βάση δεδομένων

Protein Data Bank (PDB ID: 4P6). Η σύνδεση της χημικής ουσίας πραγματοποιήθηκε χειροκίνητα και μέσω του αυτοματοποιημένου δομοστοιχείου λογισμικού Molecular Operating Environment (MOE), με τη χρήση της εντολής DOCK. Η φαινολική ένωση συνδέθηκε στην τρισδιάστατη δομή της πρωτεΐνης τυροσινάσης και για την εγκυροποίηση της δυνατότητας εφαρμογής του δομοστοιχείου λογισμικού MOE-DOCK, μεταφέρθηκε εκτός της εισόδου της ενεργούς τοποθεσίας της πρωτεΐνης, και στη συνέχεια μεταφέρθηκε ξανά εντός της ενεργούς τοποθεσίας.

Για την υλοποίηση της μελέτης ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα: α) Άνοιγμα PDB αρχείου της κρυσταλλικής δομής της πρωτεΐνης, β) SEQ (Καθαρισμός άλλων ουσιών), γ) Επιλογή MOE-RHS-QuickPrep: βαθμονόμηση της δομής, προσθήκη ατόμων H που λείπουν, προσθήκη πρόσδεσης στο ενεργό κέντρο, δ) Compute: Energy minimization, ε) Προσδιορισμός σύνδεσης: MOE-Compute-Site Finder- Apply, στ) Σύνδεση: MOE-Compute-Dock: Καθορισμός παραμέτρων: Receptor, Site, Pharmacophore, Ligand, Placement and Score, Refinement.

2.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.3.1. Συλλογή δεδομένων

Κατά το στάδιο συλλογής δεδομένων, ήταν δυνατή η συγκέντρωση πάνω από 420.000 νουκλεοτιδικών ακολουθιών από τη βάση δεδομένων National Center for Biotechnology Information (NCBI). Ως γονιδίωμα αναφοράς για την χαρτογράφηση των νουκλεοτιδικών ακολουθιών που συλλέχθηκαν, χρησιμοποιήθηκε το γονιδίωμα της “άγριας ελιάς” (*Olea europaea* var. *sylvestris*, “oleaster”), του οποίου η αλληλούχιση και κατανομή πραγματοποιήθηκε από τους **Unver et al.** (2017).

2.3.2. Πρώτο επίπεδο ανάλυσης

Από το αρχικό σύνολο δεδομένων των περίπου 422.000 νουκλεοτιδικών ακολουθιών, 374.069 νουκλεοτιδικές ακολουθίες, δηλαδή το 88,71% των ακολουθιών, ταξινομήθηκαν ως ολοκληρωμένες ακολουθίες και ως εκ τούτου θεωρήθηκαν άξιες για περαιτέρω έρευνα. Οι υπόλοιπες ακολουθίες του αρχικού συνόλου δεδομένων, οι οποίες αποτελούν το 11,26% του συνόλου, δηλαδή 48.549 νουκλεοτιδικές ακολουθίες, αποτελούνταν από μέρη ακολουθιών ή μη ολοκληρωμένες ακολουθίες.

Η σύνθεση του συνόλου δεδομένων ήταν εξαιρετικά ετερογενής. Αναγνωρίστηκαν γονιδιωματικές περιοχές από 15 διαφορετικά είδη του γένους *Olea* (Πίνακας 2.1). Επίσης, ανιχνεύτηκαν περιοχές γονιδιώματος 17 ειδών που ανήκουν στο φυτικό βασίλειο. Επιπλέον, αναγνωρίστηκαν περιοχές γονιδιώματος 21 ειδών μικροοργανισμών, εκ των οποίων οι περισσότεροι

επηρεάζουν έμμεσα ή άμεσα το φαινότυπο της ελιάς. Από το νέο σύνολο δεδομένων των ολοκληρωμένων ακολουθιών, το 86,74% των νουκλεοτιδικών ακολουθιών, αναφέρονται στο γένος *Olea*, και ιδιαίτερα στις οντολογίες *europaea* και *oleaster/sylvestris*. Πιο συγκεκριμένα, 324.732 νουκλεοτιδικές ακολουθίες αναφέρονταν στο είδος της *Olea europaea*. Μέσα στο υπό-σύνολο δεδομένων του είδους *Olea europaea*, αναγνωρίστηκαν ακολουθίες των υπό-ειδών του είδους, τα οποία είναι: *europaea*, *cuspidata* (ή *africana/indica/ferruginea*), *laperrinei*, *cerasiformis*, *guanchika* και *maroccana* (Πίνακας 2.1.). Από τα υπό-είδη του είδους *Olea europaea*, σχεδόν 74% των ακολουθιών δεν χαρακτηρίζονται και παρουσιάζονται ως ‘ορφανές’ ακολουθίες, εντός του υπό-συνόλου δεδομένων του *Olea europaea*. Από τις υπόλοιπες ακολουθίες του υπό-συνόλου δεδομένων της *Olea europaea*, 73.102 ακολουθίες αναφέρονται στο υπό-είδος *sylvestris* (άγρια ελιά), 11.363 ακολουθίες αναφέρονται στο υπό-είδος *europaea* (καλλιεργούμενη ελιά), και 90 ακολουθίες στα υπόλοιπα υπό-είδη που αναφέρθηκαν προηγουμένως.

Πίνακας 2.1. Είδη και υπό-είδη του γένους *Olea* που αναγνωρίστηκαν στο σύνολο δεδομένων ολοκληρωμένων ακολουθιών.

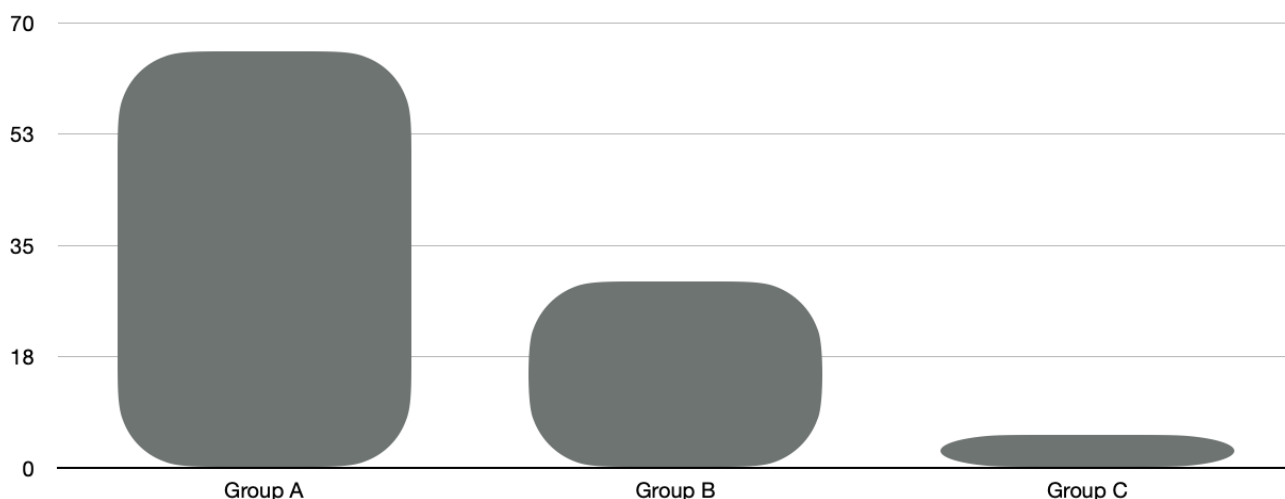
A/A	Species	Subspecies
1	<i>Olea europaea</i>	<i>europaea</i>
		<i>Sylvestris</i>
		<i>cuspidata/africana/ indica/ ferruginea</i>
		<i>laperrinei</i>
		<i>cerasiformis</i>
		<i>guanchika</i>
		<i>maroccana</i>
2	<i>Olea exasperata</i>	-
3	<i>Olea capensis</i>	<i>hochstetteri</i>
		<i>macrocarpa</i>
		<i>enervis</i>
		<i>capensis</i>
		<i>welwitschii</i>
4	<i>Olea lancea</i>	-
5	<i>Olea paniculata</i>	-
6	<i>Olea salicifolia</i>	-
7	<i>Olea rosea</i>	-
8	<i>Olea borneensis</i>	-
9	<i>Olea neriifolia</i>	-
10	<i>Olea brachiata</i>	-
11	<i>Olea javanica</i>	-
12	<i>Olea tsoongii</i>	-

13	<i>Olea schliebenii</i>	-
14	<i>Olea chimanimani</i>	-
15	<i>Olea woodiana</i>	<i>woodiana</i>

Στο υπόλοιπο σύνολο δεδομένων νουκλεοτιδικών ακολουθιών του γένους *Olea*, αναγνωρίστηκαν 14 ακόμα είδη του γένους, εκτός της *Olea europaea*, τα οποία ήταν: *Olea africana*, *Olea capensis*, *Olea lancea*, *Olea paniculata*, *Olea salicifolia*, *Olea rosea*, *Olea borneensis*, *Olea neriifolia*, *Olea brachiata*, *Olea javanica*, *Olea tsoongi*, *Olea schliebenii*, *Olea exasperata*, *Olea woodiana*. Επιπλέον, στο είδος *Capensis* αναγνωρίστηκαν τα εξής υπό-είδη: *hochstetteri*, *macrocarpa*, *enervis*, *capensis* and *welwitschi*, ενώ στο είδος *Woodiana* αναγνωρίστηκε το υπό-είδος *woodiana* (Πίνακας 2.1.).

Στο υπό-σύνολο δεδομένων του είδους *Olea europaea*, αναγνωρίστηκαν συνολικά νουκλεοτιδικές ακολουθίες 72 καλλιεργήσιμων ποικιλιών, οι οποίες ανήκουν στο υπό-είδος *europaea*. Ανιχνεύτηκαν επίσης, ακολουθίες ακόμα 20 καλλιεργήσιμων ποικιλιών επιπλέον, στο υπό-σύνολο δεδομένων θορύβου που περιείχε τις μέρη ακολουθιών και μη ολοκληρωμένες ακολουθίες.

Όσον αφορά τον διαχωρισμό του συνόλου δεδομένων των ακολουθιών με βάση το μήκος της ακολουθίας, το σύνολο δεδομένων χωρίστηκε σε τρεις ομάδες. Η πρώτη ομάδα (A), η οποία περιλάμβανε ακολουθίες με μήκος μικρότερο ή ίσο με 1.000 βάσεις, αποτέλεσε το 65,521% του συνόλου των ακολουθιών (Γράφημα 2.1.). Η δεύτερη ομάδα (B), η οποία περιλάμβανε ακολουθίες με μήκος μικρότερο ή ίσο με 10.000 βάσεις και μεγαλύτερο από 1.000 βάσεις, αποτέλεσε το 29,345% του συνόλου των ακολουθιών (Γράφημα 2.1.). Τέλος, η τρίτη ομάδα (C), η οποία περιλάμβανε ακολουθίες με μήκος μεγαλύτερο ή ίσο με 10.000 βάσεις, αποτέλεσε το 5,132% του συνόλου των ακολουθιών (Γράφημα 2.1.). Από τα υποσύνολα δεδομένων που δημιουργήθηκαν με βάση το μήκος της ακολουθίας, μόνο οι ομάδες δεδομένων A και B χρησιμοποιήθηκαν για το δεύτερο στάδιο ανάλυσης.



Γράφημα 2.1. Ποσοστό αριθμού ακολουθιών, επί του συνόλου δεδομένων του γένους *Olea*, των υπό-συνόλων ομάδων δεδομένων, που διαχωρίστηκαν με βάση το μήκος της ακολουθίας.

2.3.3. Δεύτερο επίπεδο ανάλυσης

Μετά τη συλλογή όλης της διαθέσιμης γενετικής και γονιδιωματικής πληροφορίας στο υπό-σύνολο δεδομένων *Olea europaea*, το επόμενο βήμα είναι η αναγνώριση των πιθανών σχέσεων των νουκλεοτιδικών ακολουθιών. Για την επιτυχή αναγνώριση της γενετικής σχέσης μεταξύ των ακολουθιών, ορίστηκαν καίριας σημασίας κόμβοι στο εσωτερικό των επιλεγμένων υπό-συνόλων δεδομένων. Με βάση τις οντολογίες, δημιουργήθηκαν μεμονωμένα υπό-σύνολα δεδομένων. Οι οντολογίες που επιλέχθηκαν για τη δημιουργία των συνόλων δεδομένων, φιλτραρίστηκαν έναντι χιλιάδων καταχωρήσεων εντός των συνόλων δεδομένων των ομάδων A και B. Τα νέα μεμονωμένα υποσύνολα δεδομένων που δημιουργήθηκαν περιλάμβαναν υποσύνολα δεδομένων νουκλεοτιδικών ακολουθιών ως εξής: χλωροπλαστικές ακολουθίες, μιτοχονδριακές ακολουθίες, ακολουθίες μικροδορυφόρου, ακολουθίες καλλιεργήσιμων ποικιλιών, ακολουθίες πρωτεϊνών, ακολουθίες ελικάσης, ακολουθίες ΑΤΡάσης, ακολουθίες πλαστιδίου, ακολουθίες trn γονιδίου, ενζυματικές ακολουθίες, κ.ο.κ.

Στο υποσύνολο δεδομένων, υπό την οντολογία ‘chloroplast’, που περιλάμβανε χλωροπλαστικές νουκλεοτιδικές ακολουθίες, κατηγοριοποιήθηκαν 1439 ακολουθίες (Πίνακας 2.2.). Το μέγεθος των ακολουθιών αυτής της ομάδας κυμάνθηκε από 75 έως 155.942 βάσεις, με μέσο μήκος ακολουθίας 3841,2 βάσεις (Πίνακας 2.2.). Οι 1401 νουκλεοτιδικές ακολουθίες της ομάδας, δηλαδή το 97,35% των ακολουθιών, αναφερόταν σε ακολουθίες του είδους *Olea europaea* (Γράφημα 2.2.). Εντός του συνόλου των ακολουθιών του είδους *Olea europaea*, το 97,216% των ακολουθιών αναφερόταν σε ακολουθίες του υποείδους *sylvestris* (άγρια ελιά) και οι υπόλοιπες χαρακτηρίστηκαν ως ορφανές ακολουθίες. Αναγνωρίστηκαν επίσης τέσσερις καλλιεργήσιμες ποικιλίες του είδους

Olea europaea subsp. europaea, οι οποίες ήταν: ‘Piqual’, ‘Frantoio’, ‘Bianchera’, ‘Manzanilla’. Στο υποσύνολο δεδομένων, αναγνωρίστηκαν επίσης 12 επιπλέον είδη του γένους *Olea*, τα οποία ήταν: *Olea africana*, *Olea capensis*, *Olea ferruginea/Olea indica*, *Olea lancea*, *Olea paniculata*, *Olea salicifolia*, *Olea rosea*, *Olea borneensis*, *Olea neriifolia*, *Olea exasperata*, *Olea woodiana*, *Olea tsoongii*. Εντός του συνόλου δεδομένων, αναγνωρίστηκε και το υποείδος *Hochstetteri*, του είδους *Olea capensis*. Αναγνωρίστηκαν ακόμα δύο φυτικά είδη εντός του υποσυνόλου δεδομένων χρωροπλαστικών ακολουθιών, τα οποία ήταν τα *Osmanthus* (*O. heterophyllus* και *O. fragrans*) και *Phillyrea latifolia*.

Υπό την οντολογία ‘mitochondrial’ δημιουργήθηκε υποσύνολο δεδομένων το οποίο περιείχε μιτοχονδριακές νουκλεοτιδικές ακολουθίες. Το υποσύνολο δεδομένων περιείχε 1439 ακολουθίες (Πίνακας 2.2.). Το μέγεθος των ακολουθιών κυμάνθηκε από 225 έως 11209 βάσεις, με μέσο μήκος βάσης 1241,9 βάσεις (Πίνακας 2.2.). 1039 (72,202%) ακολουθίες από το σύνολο δεδομένων αναφέρονταν στο είδος *Olea europaea* (Γράφημα 2.2.), με τις 927 (89,478%) από αυτές να προέρχονται από το υποείδος *sylvestris*. Από το γένος *Olea*, αναγνωρίστηκε και το είδος *Olea exasperata*, το οποίο αποτελούσε το 2,08% του συνόλου δεδομένων. Αναγνωρίστηκαν επίσης, δύο ακόμα είδη του φυτικού βασιλείου και δέκα καλλιεργήσιμες ποικιλίες του είδους *Olea europaea subsp. europaea*, οι οποίες ήταν οι εξής: ‘Galega’, ‘Frantoio’, ‘Hojiblanca’, ‘Picual’, ‘Mastoidis’, ‘Manzanilla’, ‘Koroneiki’, ‘Arbequina’, ‘Dolce Agogia’ και ‘Leccino’.

Πίνακας 2.2. Υπό-σύνολα δεδομένων, αριθμός ακολουθιών των υπό-συνόλων δεδομένων και μέσο μήκος ακολουθίας των υπό-συνόλων δεδομένων που δημιουργήθηκαν από τα αρχικά σύνολα δεδομένων.

A/A	Sub-Dataset	No of Sequences	Mean Length (b)
1	<i>Chloroplast</i>	1439	3831,2
2	<i>Mitochondria</i>	1439	1241,9
3	<i>Microsatellite</i>	343	270
4	<i>Helicase</i>	157	-
5	<i>ATPase</i>	242	-
6	<i>Plastid</i>	106	2332,1
7	<i>trn</i>	1123	687
8	<i>Enzyme</i>	241	-

Στο υποσύνολο δεδομένων, υπό την οντολογία ‘micro satellite’, το οποίο περιείχε νουκλεοτιδικές ακολουθίες μικροδορυφόρου, περιλαμβάνονταν 343 ακολουθίες (Πίνακας 2.2.). Από το σύνολο των ακολουθιών, 331 ακολουθίες (96,5%) αναφερόταν σε ακολουθίες του είδους *Olea europaea* (Γράφημα 2.2.), εκ των οποίων, 238 (71,9%) από αυτές αναφέρονταν στο υποείδος *europaea*. Αναγνωρίστηκε επίσης το υποείδος *cuspidata*, του είδους *Olea europaea*. Το μέγεθος των ακολουθιών κυμάνθηκε από 75 έως 761 βάσεις, ενώ το μέσο μήκος τους ήταν 270,07 βάσεις (Πίνακας 2.2.). Στο συγκεκριμένο υποσύνολο δεδομένων ανιχνεύτηκαν ακολουθίες 38 καλλιεργήσιμων ποικιλιών του είδους *Olea europaea subsp. europaea*. Οι ποικιλίες αυτές ήταν οι εξής: ‘Posola’, ‘Caprina di Casalanguida’, ‘Aurina’, ‘Castiglione’, ‘Olivastro di Montenero’, ‘Biancolilla’, ‘Cornicabra’, ‘Lechin de Sevilla’, ‘Konservolia’, ‘Manzanilla Cacerena’, ‘Frantoio’, ‘Chemlali’, ‘Carolea’, ‘Canino’, ‘Arbequina’, ‘Nocellara del Belice’, ‘Itrana’, ‘Leccione’, ‘Craputea’, ‘Castricianella Rapparina’, ‘Feglina’, ‘Mora’, ‘Cornacciola’, ‘Manna’, ‘Palma’, ‘Grignan’, ‘Cornia’, ‘Leccio del corno’, ‘Lavagnina’, ‘Sperone di Gallo’, ‘Cellina di Nardo’, ‘Coratina’, ‘Tonda di Strongoli’, ‘Bottone di Gallo’, ‘Santagostino’, ‘Cazzinicchio’.

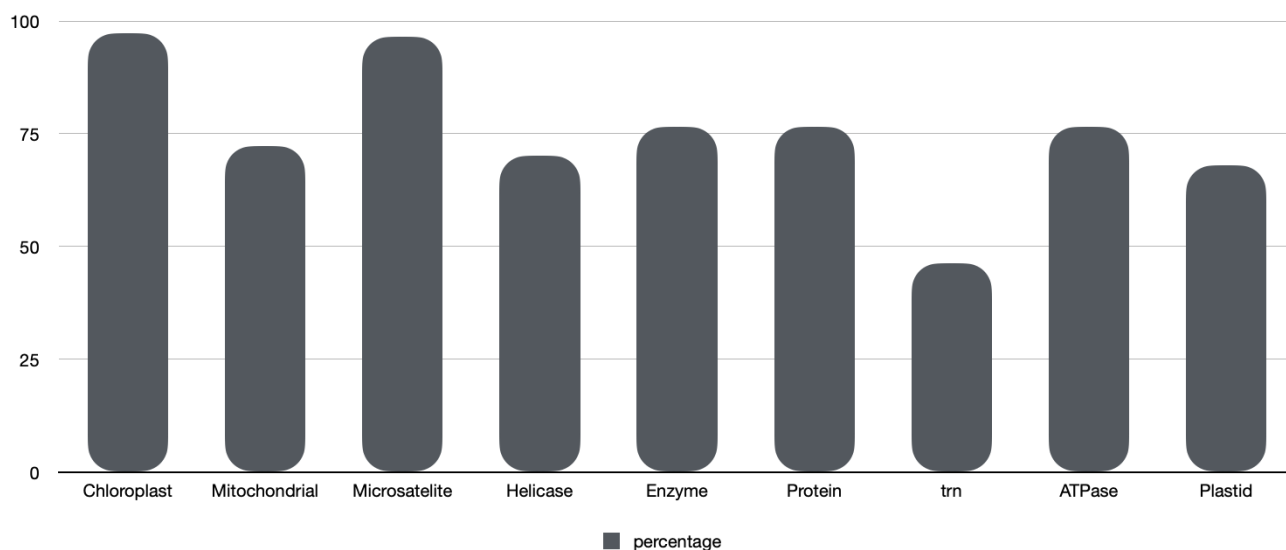
Στο υποσύνολο δεδομένων που δημιουργήθηκε υπό την οντολογία ‘helicase’, περιλαμβάνονταν νουκλεοτιδικές ακολουθίες που περιλάμβαναν ακολουθίες ελικάσης. Το υποσύνολο δεδομένων αποτελούνταν από 157 ακολουθίες (Πίνακας 2.2.), με τις 110 (70,06%) από αυτές να αναφέρονται στο είδος *Olea europaea subsp. sylvestris*. Το μήκος των ακολουθιών κυμάνθηκε από 366 έως 7627 βάσεις.

Υπό την οντολογία ‘ATPase’, δημιουργήθηκε το υποσύνολο δεδομένων που περιλάμβανε νουκλεοτιδικές ακολουθίες ATPάσης. Το συγκεκριμένο υποσύνολο δεδομένων αποτελούνταν από 242 ακολουθίες (Πίνακας 2.2.), με 185 (76,446%) να αναφέρονται στην *Olea europaea subsp. sylvestris* (άγρια ελιά). Το μήκος των ακολουθιών κυμάνθηκε από 225 έως 4678 βάσεις. Εντός του υποσυνόλου αναγνωρίστηκε επίσης το είδος *Olea exasperata*.

Το υποσύνολο δεδομένων που περιείχε νουκλεοτιδικές ακολουθίες πλαστιδίου, δημιουργήθηκε υπό την οντολογία ‘plastid’. Η ομάδα δεδομένων αποτελούνταν από 106 ακολουθίες (Πίνακας 2.2.). Το μήκος των ακολουθιών κυμάνθηκε από 321 έως 155875 βάσεις, με μέσο μήκος ακολουθίας τις 2332,1 βάσεις (Πίνακας 2.2.). Το 67,924% των ακολουθιών αναφερόταν στο είδος *Olea europaea* (Γράφημα 2.2.). Εντός του υποσυνόλου δεδομένων αναγνωρίστηκαν τα υποείδη του είδους *Olea europaea: sylvestris, maroccana, cerasiformis, cuspidata, laperrinei, europaea*. Επίσης, αναγνωρίστηκαν τα είδη που ανήκουν στο γένος *Olea: brachiata, javanica, tsoongi, paniculata, capensis, schiebenii, exasperata, chimanimani, lancea, woodiana*, και επιπλέον 11 φυτικά είδη που δεν ανήκουν στο γένος *Olea*.

Το υποσύνολο δεδομένων που δημιουργήθηκε υπό την οντολογία 'trn' περιλάμβανε 123 ακολουθίες (Πίνακας 2.2.). Το μήκος των ακολουθιών κυμάνθηκε από 359 έως 681 βάσεις. Το μέσο μήκος των ακολουθιών ήταν 681 βάσεις (Πίνακας 2.2.). 57 νουκλεοτιδικές ακολουθίες (46,341%) αναφέρονταν στο είδος *Olea europaea* (Γράφημα 2.2.) και στα υποείδη *maroccana*, *cuspidata/ferruginea/indica/africana*, *laperrinei*, *guanchika*, *ceraciformis*, *europaea*. Ανιχνεύτηκε επίσης, εντός του υποσυνόλου δεδομένων, το είδος *Olea capensis/welwitschii*, με τα υποείδη *hochstetteri*, *macrocarpa*, *enervis*, *capensis*. Έγινε αναγνώριση νουκλεοτιδικών ακολουθιών που ανήκουν στο γένος *Olea*, όπως τα *lancea*, *paniculata*, *salicifolia*, *rosea*, *borneesis*, *nerrifolia*, *branchiata*, *javanica*, *tsoongii*, *schiebenii*, *exasperata*, *chimanimani*, *woodiana*. Τέλος, ανιχνεύτηκαν ακολουθίες 9 φυτικών ειδών που δεν ανήκουν στο γένος *Olea*.

Υπό την οντολογία 'enzyme', δημιουργήθηκε υποσύνολο δεδομένων που περιείχε 241 νουκλεοτιδικές ακολουθίες (Πίνακας 2.2.). Το μήκος των ακολουθιών κυμάνθηκε από 346 έως 4471 βάσεις. Από το σύνολο των ακολουθιών, το 75,933% αναφερόταν στο είδος *Olea europaea* (Γράφημα 2.2.) και το 97,814% από αυτές στο υποείδος *sylvestris* (άγρια ελιά).



Γράφημα 2.2. Ποσοστό νουκλεοτιδικών ακολουθιών που αναφέρονται στο είδος *Olea europaea*, στα επιμέρους υπό-σύνολα δεδομένων που δημιουργήθηκαν.

Στο υποσύνολο δεδομένων που σχετίζεται με πρωτεϊνικές περιοχές, αναγνωρίστηκαν 49 λέξεις-κλειδιά με αξιοσημείωτη επαναληψιμότητα νουκλεοτιδικών ακολουθιών. Το 76,81% του συνόλου των νουκλεοτιδικών ακολουθιών, εντός του υποσυνόλου δεδομένων, αναφερόταν στο είδος *Olea europaea* subsp. *sylvestris* (Γράφημα 2.2.). Μεταξύ των 49 οντολογιών με υψηλή επαναληψιμότητα, 8 διακρίθηκαν και απομονώθηκαν από το υποσύνολο δεδομένων που αναφέρεται σε πρωτεϊνικές περιοχές. Με τις απομονωμένες ακολουθίες δημιουργήθηκαν μεμονωμένα

υποσύνολα δεδομένων για κάθε οντολογία που διακρίθηκε για την επαναληψιμότητα των ακολουθιών. Τα μεμονωμένα υποσύνολα δεδομένων που δημιουργήθηκαν ήταν τα εξής: 1) οντολογία ‘ribosomal’, το οποίο καταλάμβανε το 15,27% του συνόλου των ακολουθιών των πρωτεϊνικών περιοχών, 2) οντολογία ‘kinase’, το οποίο καταλάμβανε το 30,06% του υποσυνόλου δεδομένων των πρωτεϊνικών περιοχών, 3) οντολογία ‘E3’, το οποίο περιείχε το 9,85% των ακολουθιών που αναφέρονταν σε πρωτεϊνικές περιοχές, 4) οντολογία ‘phosphatase’, το οποίο περιείχε το 8,99% των ακολουθιών του υποσυνόλου δεδομένων των πρωτεϊνικών, 5) οντολογία ‘pentatricopeptide’, το οποίο περιείχε το 7,01% του συνόλου των ακολουθιών που σχετίζονται με πρωτεϊνικές περιοχές, 6) οντολογία ‘Fbox’, που αποτελούσε το 4,53% του συνόλου των ακολουθιών που αναφέρονταν σε πρωτεϊνικές περιοχές και 7) οντολογία ‘fatty acid-and retinol-binding protein (FAR)’, που αποτελούσαν το 2,87% του υποσυνόλου δεδομένων των πρωτεϊνικών περιοχών (Πίνακας 2.3.). Τέλος, με βάση τη γενετική πληροφορία, ήταν δυνατή η αναγνώριση νουκλεοτιδικών αλυσίδων, οι οποίες φέρουν μοτίβο δακτυλίου-ψευδαργύρου. Οι νουκλεοτιδικές αλυσίδες αποτελούσαν το 8,67% του συνόλου των ακολουθιών στο υποσύνολο δεδομένων των πρωτεϊνικών (Πίνακας 2.3.).

Πίνακας 2.3. Υπό-σύνολα δεδομένων που δημιουργήθηκαν από τις οντολογίες που εμφάνισαν υψηλή επαναληψιμότητα στο υπό-σύνολο δεδομένων πρωτεΐνης και το ποσοστό επαναληψιμότητας εντός του υπό-συνόλου δεδομένων πρωτεΐνης.

A/A	Protein Sub-dataset	Percentage of the protein dataSet (%)
1	<i>ribosomal</i>	15,27
2	<i>kinase</i>	30,06
3	<i>E3 ubiquitin</i>	9,85
4	<i>phosphatase</i>	8,99
5	<i>pentatricopeptide</i>	7,01
6	<i>F-box</i>	4,53
7	<i>FAR</i>	2,87
8	<i>zinc finger</i>	8,67

Στο υποσύνολο δεδομένων που αναφερόταν στις καλλιεργήσιμες ποικιλίες του είδους *Olea europaea* subsp. *europaea*, αναγνωρίστηκαν συνολικά 72 ποικιλίες ελιάς. Από τις 72 ποικιλίες, ξεχώρισε για την επαναληψιμότητα των νουκλεοτιδικών ακολουθιών, η ποικιλία ‘Gemlik’ (Πίνακας 2.4.). Μεγάλη επαναληψιμότητα ακολουθιών εμφάνισαν επίσης οι ποικιλίες ‘Hojiblancla’, ‘Frantoio’, ‘Picual’, ‘Arbequina’, ‘Manzanilla’ (Πίνακας 2.4.).

Πίνακας 2.4. Καλλιεργήσιμες ποικιλίες του είδους *Olea europaea subsp. europaea*, με τη μεγαλύτερη επαναληψιμότητα ακολουθίας, που εντοπίστηκαν στο σύνολο δεδομένων του γένους *Olea*.

A/A	Cultivars	No of Sequences
1	Gemlik	523
2	Hojiblanca	38
3	Frantoio	36
4	Picual	23
5	Arbequina	19
6	Manzanilla	11
7	Bella di Espagna	10
8	Loaime	
9	Verdial	
10	Picudo	
11	Koroneiki	8
12	Galega	7
13	Farga	
14	Acebuche	
15	Blanqueta	
16	Cornicabra	
17	Lechin de Sevilla	
18	Lucio	6
19	Empeltre	
20	Manzanilla de Sevilla	
21	Zard	
22	Rowghani	5
23	Ayvalik	
24	Leccino	
25	Villalonga	

Τέλος, από το αρχικό σύνολο δεδομένων των ακολουθιών, διαχωρίστηκαν ως μη ολοκληρωμένες ακολουθίες ή μέρη ακολουθίας, 48549 νουκλεοτιδικές ακολουθίες. Από αυτές, 2047 αναφέρονταν σε χλωροπλαστικές ακολουθίες, 1923 σε μιτοχονδριακές ακολουθίες, 239 σε ακολουθίες πλαστιδίου, 275 σε ακολουθίες καλλιεργήσιμων ποικιλιών και 18748 αναφέρονταν σε νουκλεοτιδικές ακολουθίες πρωτεϊνικών περιοχών.

Πίνακας 2.5. Σύνολο νουκλεοτιδικών ακολουθιών στο υπό-σύνολο δεδομένων θορύβου και κύρια υπό-σύνολα δεδομένων που αναγνωρίστηκαν μέσα σε αυτό.

A/A	Sub-dataset	No of Sequences	Total no of Sequences of the sub dataset P/V
1	<i>Chloroplast</i>	2047	48549
2	<i>Mitochondrial</i>	1923	
3	<i>Plastid</i>	239	
4	<i>Protein</i>	18748	
5	<i>Cultivar</i>	275	

2.3.4. Τρίτο επίπεδο ανάλυσης

Στο τρίτο επίπεδο ανάλυσης, ήταν δυνατή η συσχέτιση των νουκλεοτιδικών ακολουθιών των υποσυνόλων δεδομένων σε ομάδες με βάση τη γενετική τους ομοιότητα. Οι ομαδοποιήσεις πραγματοποιήθηκαν λαμβάνοντας υπόψιν ότι για την θεώρηση μίας ομάδας θα πρέπει τουλάχιστον πέντε νουκλεοτιδικές ακολουθίες, με γενετική ομοιότητα άνω των προκαθορισμένων ορίων, να συσχετίζονται σε μία ομάδα.

Μεταξύ των υποσυνόλων δεδομένων που δημιουργήθηκαν, το υποσύνολο υπό την οντολογία ‘trn’, σχημάτισε τον υψηλότερο αριθμό ομάδων ακολουθιών. Στο υποσύνολο δεδομένων ‘trn’ δημιουργήθηκαν 7 ομάδες συστοιχισμένων ακολουθιών με γενετική ομοιότητα. Η ομάδα με τη μεγαλύτερη γενετική ομοιότητα περιλάμβανε 80 καταχωρίσεις ακολουθιών του trnL gene (trnL-trnF intergenic spacer) και trnA-Phe gene. Περιλάμβανε καταχωρίσεις του είδους *Olea europaea* και των υποειδών *cuspidata*, *laperrinei*, *maroccana*, *cerasiformis*, *guanchika* και *europaea*. Επίσης περιλάμβανε τα είδη *Olea dioica*, *welwitscii*, *paniculata*, *tsoongi*, *javanica*, *neriifolia*, *borneensis*, *rosea*, *salicifolia*, *capensis* και *woodiana*. Η δεύτερη ομάδα κατά σειρά, παρουσίασε 79 καταχωρίσεις ακολουθιών του trnT-trnL intergenic spacer. Αυτή η ομάδα περιλάμβανε ακολουθίες χλωροπλάστη και πλαστιδίου των ειδών *Olea borneensis*, *rosea*, *salicifolia*, *dioica*, *africana*, *indica*, *exasperata*, *capensis*, *javanica*, *woodiana*, *lancea*, *chimanmani*, *brachiata* και *Olea europaea* και των υποειδών του *europaea*, *cuspidata*, *laperrinei*, *ceraciformis*, *guanchika*. Η τρίτη ομάδα γενετικής ομοιότητας παρουσίασε 32 καταχωρίσεις με βάση το trnT-trnD intergenic spacer. Η ομάδα αυτή περιλάμβανε νουκλεοτιδικές ακολουθίες χλωροπλάστη και πλαστιδίου του είδους *Olea europaea* και των υποειδών του *laperrinei*, *maroccana*, *ceraciformis*, *guanchika*, *cuspidata*. Ομαδοποιήθηκαν επίσης, οι ποικιλίες ‘Nociara’, ‘Coratina’, ‘Cassanese’, ‘Carolea’, ‘Ottobratica’, ‘Sinopolese’, ‘Bardhi’, ‘Leucocarpa’, ‘Nocellara del Belice’, ‘Palma’, ‘Gentile di Chieti’, ‘Leccino’, ‘Nocellara Etnea’, που ανήκουν στο είδος *Olea europaea subsp. europaea*. Η τέταρτη ομάδα σχηματίστηκε υπό τις

ακολουθίες του psbA-trnH intergenic spacer. Η ομάδα περιλάμβανε χλωροπλαστικές νουκλεοτιδικές ακολουθίες τως ειδών *Olea europaea* subsp. *cuspidata* και *Olea rosea*, *tsoongii*, *yuennanensis*. Η πέμπτη ομάδα, κατά σειρά γενετικής ομοιότητας, ομαδοποίησε γενετικά ακολουθίες χλωροπλάστη και πλαστιδίου των ειδών *Olea europaea* subsp. *cuspidata* και *Olea tsoongii*, *paniculata*, *capensis* και *brachiata*, με βάση το trnL gene (trnL-trnF). Στην έκτη ομάδα, ομαδοποιήθηκαν μόνο χλωροπλαστικές ακολουθίες του είδους *Olea europaea* με βάση το psbA gene (psbA-trnH intergenic spacer). Στην τελευταία ομάδα, οι όμοιες γενετικά ακολουθίες περιλάμβαναν το είδος *Olea europaea* και τα υποείδη του *cuspidata*, *maroccana*, *laperrinei*, *ceraciformis*, *guanchika*, *europaea*, υπό το γονίδιο trnK.

Πίνακας 2.6. Ομαδοποίηση νουκλεοτιδικών ακολουθιών με βάση τη γενετική ομοιότητα στο υπό-σύνολο δεδομένων ‘trn’, ο αριθμός ακολουθιών που περιλάμβανε κάθε ομάδα και τα είδη που συμπεριλαμβάνονταν σε κάθε ομάδα.

Cluster	Clustered Under	No of Sequences	Species	Subspecies
1	trnL gene (trnL-trnF intergenic spacer) / trnA-Phe	80	<i>Olea europaea</i>	<i>cuspidata</i> , <i>laperrinei</i> , <i>maroccana</i> , <i>ceraciformis</i> , <i>guanchika europaea</i>
			<i>Olea dioica</i> , <i>welwitscii</i> , <i>paniculata</i> , <i>tsoongi</i> , <i>javanica</i> , <i>neriifolia</i> , <i>borneensis</i> , <i>rosea</i> , <i>salicifolia</i> , <i>capensis</i> και <i>woodiana</i>	-
2	trnT-trnL	79	<i>Olea europaea</i>	<i>europaea</i> , <i>cuspidata</i> , <i>laperrinei</i> , <i>ceraciformis</i> , <i>guanchika</i>
			<i>Olea borneensis</i> , <i>rosea</i> , <i>salicifolia</i> , <i>dioica</i> , <i>africana</i> , <i>indica</i> , <i>exasperata</i> , <i>capensis</i> , <i>javanica</i> , <i>woodiana</i> , <i>lancea</i> , <i>chimanmani</i> , <i>brachiata</i>	-
3	trnT-trnD	32	<i>Olea europaea</i>	<i>laperrinei</i> , <i>maroccana</i> , <i>ceraciformis</i> , <i>guanchika</i> , <i>cuspidata</i>
4	psbA-trnH	15	<i>Olea europaea</i>	<i>cuspidata</i>
			<i>Olea rosea</i> , <i>tsoongii</i> , <i>yuennanensis</i>	-
5	trnL-trnF	10	<i>Olea europaea</i>	<i>cuspidata</i>
			<i>Olea tsoongii</i> , <i>paniculata</i> , <i>capensis</i> , <i>brachiata</i>	
6	psbA gene	10	<i>Olea europaea</i>	-
7	trnK	8	<i>Olea europaea</i>	<i>cuspidata</i> , <i>maroccana</i> , <i>laperrinei</i> , <i>ceraciformis</i> , <i>guanchika</i> , <i>europaea</i>

Ο αμέσως μεγαλύτερος αριθμός ομαδοποίησης ακολουθιών με γενετική ομοιότητα, παρουσιάστηκε στο υποσύνολο δεδομένων υπό την οντολογία ‘microsatellite’. Στο υποσύνολο δεδομένων δημιουργήθηκαν έξι ομαδοποιήσεις ακολουθιών με υψηλή γενετική ομοιότητα. Η πρώτη ομάδα δημιουργήθηκε υπό τον μικροδορυφόρο GAPU71B και περιλάμβανε ακολουθίες του είδους *Olea europaea subsp. europaea* και των ποικιλιών που ανήκουν στο ίδιο είδος, ‘Castiglione’, ‘Aurina’ και ‘Olivastro di Montenero’ (Πίνακας 2.7.). Η δεύτερη και τρίτη ομάδα περιλάμβαναν ακολουθίες μόνο του είδους *Olea europaea subsp. europaea*, υπό τους μικροδορυφόρους UDO43e176A και GAPU590e, αντίστοιχα (Πίνακας 2.7.). Στην τέταρτη ομάδα, κατά σειρά γενετικής ομοιότητας, ομαδοποιήθηκαν ακολουθίες του μικροδορυφόρου GAPU71B, του είδους *Olea europaea subsp. europaea* και των ποικιλιών του είδους, ‘Cellina di Nardo’, ‘Coratina’, ‘Tonda di strogoli’, ‘Bottone di Gallo’, ‘Cazzinichio’ και ‘Santagostino’ (Πίνακας 2.7.). Η πέμπτη και έκτη ομάδα με όμοιες γενετικά ακολουθίες, ομοίως, περιλάμβανε ακολουθίες του είδους *Olea europaea subsp. europaea*, με βάση τις αλληλουχικές πολυμορφικές επαναλήψεις βάσεων DCA13 και DCA16, αντίστοιχα (Πίνακας 2.7.).

Πίνακας 2.7. Ομαδοποίηση νουκλεοτιδικών ακολουθιών με βάση τη γενετική ομοιότητα στο υποσύνολο δεδομένων ‘microsatellite’, ο αριθμός ακολουθιών που περιλάμβανε κάθε ομάδα και τα είδη που συμπεριλαμβάνονταν σε κάθε ομάδα.

Cluster	Clustered Under	No of Sequences	Species	Cultivars
1	GAPU71B	12	<i>Olea europaea subsp. europaea</i>	Castiglione, Aurina, Olivastro di Montenero
2	UDO43e176A	10	<i>Olea europaea subsp. europaea</i>	-
3	GAPU590e	9	<i>Olea europaea subsp. europaea</i>	-
4	GAPU71B	8	<i>Olea europaea subsp. europaea</i>	Cellina di Nardo, Coratina, Tonda di strogoli, Bottone di Gallo, Cazzinichio, Santagostino
5	DCA13	6	<i>Olea europaea subsp. europaea</i>	-
6	DCA16	5	<i>Olea europaea subsp. europaea</i>	-

Στα υποσύνολα δεδομένων υπό τις οντολογίες ‘ATPase’, ‘enzyme’, ‘helicase’, ‘plastid’, δεν παρουσιάστηκε ομαδοποίηση ακολουθιών με γενετική ομοιότητα.

Στο σύνολο δεδομένων νουκλεοτιδικών ακολουθιών που περιλαμβάνει ακολουθίες που αναφέρονται σε πρωτεΐνες, δεν παρουσιάστηκε ομαδοποίηση ακολουθιών με γενετική ομοιότητα

άνω του 95%, για το 90% του μήκους της ακολουθίας. Αντίθετα, παρουσιάστηκαν δέκα ομάδες ακολουθιών όμοιων γενετικά, με ομοιότητα άνω του 70%, για το 100% του μήκους της ακολουθίας. Όλες οι ομάδες που δημιουργήθηκαν, αναφέρονται σε ακολουθίες του *Olea europaea* var. *sylvestris*. Οι νουκλεοτιδικές ακολουθίες που σχημάτισαν ομάδες αναφέρονταν στις εξής πρωτεΐνες, κατά σειρά ομοιότητας: pentatricopeptide repeat-containing protein At4g01580, B3 domain-containing protein At4g01580, calcineurin B-like protein 3, COP-1-interactive protein 1, kinetin-like protein KIN-13A, pentatricopeptide repeat-containing protein At4g01580, WPP domain-associated protein, G-type lectin S-receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g27290, SPX domain-containing membrane protein, squamose promoter-binding-like protein 12. Τα υποσύνολα δεδομένων που δημιουργήθηκαν και αναφέρονταν σε πρωτεΐνες, E3, FAR, Fbox, kinase, phosphatase, zinc-finger και ribosomal, δεν παρουσίασαν καμία ομαδοποίηση γενετικής ομοιότητας.

Το υποσύνολο χλωροπλαστικών ακολουθιών παρουσίασε συνολικά τέσσερις ομάδες, γενετικά όμοιων ακολουθιών. Η πρώτη ομάδα περιλάμβανε ολόκληρο χλωροπλαστικό γονιδίωμα του είδους *Olea europaea* και των υποειδών του *maroccana*, *guanchika*, *europaea*, *laperrinei*, *cuspidata* και των ποικιλιών 'Frantoio' και 'Bianchera' που ανήκουν στο *Olea europaea* subsp. *europaea* (Πίνακας 2.8.). Η δεύτερη ομάδα γενετικά όμοιων ακολουθιών περιλάμβανε ακολουθίες trnT-trnL intergenic spacer χλωροπλάστη, των ειδών *Olea europaea* subsp. *laperrinei*, *cuspidata*, *maroccana* και *Olea borneensis*, *rosea*, *salicifolia*, *africana*, *ferruginea*, *indica*, *capensis*, *lancea*, *ceraciformis* (Πίνακας 2.8.). Στην τρίτη ομάδα γενετικά όμοιων ακολουθιών παρουσιάστηκαν ακολουθίες των ειδών *Olea europaea*, *rosea* και *tsongii*, με βάση το psbA-trnH intergenic spacer. Στην τελευταίο σύνολο ομαδοποίησης παρουσιάστηκαν ακολουθίες των ειδών *Olea europaea* subsp. *cuspidata* και *Olea neriifolia*, *borneensis*, *rosea*, *salicifolia* και τριών φυτικών ειδών που δεν ανήκουν στο γένος *Olea*, υπό το trnL-trnF intergenic spacer (Πίνακας 2.8.).

Πίνακας 2.8. Ομαδοποίηση νουκλεοτιδικών ακολουθιών με βάση τη γενετική ομοιότητα στα υποσύνολα δεδομένων ‘*chloroplast*’, ‘*mitochondrial*’, ο αριθμός ακολουθιών που περιλάμβανε κάθε ομάδα και τα είδη που συμπεριλαμβάνονταν σε κάθε ομάδα.

Cluster	Clustered Under	No of Sequences	Species	Subspecies	Cultivars
1	Chloroplast genome	16	<i>Olea europaea</i>	maroccana, guanchika, europaea, laperrinei, cuspidata	Frantoio, Bianchera
2	chloroplastic tmT-trnL	17	<i>Olea europaea</i>	<i>laperrinei, cuspidata, maroccana</i>	-
			<i>Olea borneensis, rosea, salicifolia, africana, ferruginea, indica, capensis, lancea, ceraciformis</i>	-	-
3	chloroplastic psbA-trnH	10	<i>Olea europaea, rosea, tsongii</i>		-
4	chloroplastic tmL-trnF	8	<i>Olea europaea</i>	<i>cuspidata</i>	-
			<i>Olea nerifolia, borneensis, rosea, salicifolia</i>	-	-
5	mitochondrial orfB-Cox3	95	<i>Olea europaea</i>	europaea	Arbequina, Frantoio, Hojiblanca, Koroneiki, Manzanilla, Mastoidis, Picual

Στο υποσύνολο μιτοχονδιακών ακολουθιών παρουσιάστηκε μόνο μία ομάδα με όμοιες γενετικά ακολουθίες υπό το orfB-Cox3 intergenic spacer region (Πίνακας 2.8). Η ομάδα αυτή αποτελούνταν από ακολουθίες του είδους *Olea europaea* subsp. *europaea*, και των ποικιλιών του, ‘Arbequina’, ‘Frantoio’, ‘Hojiblanca’, ‘Koroneiki’, ‘Manzanilla’, ‘Mastoidis’, ‘Picual’ (Πίνακας 2.8).

Το υποσύνολο δεδομένων που περιλάμβανε ακολουθίες καλλιεργήσιμων ποικιλιών ελιάς του είδους *Olea europaea* subsp. *europaea*, παρουσιάστηκαν πέντε ομάδες γενετικά όμοιων ακολουθιών. Στην πρώτη ομάδα, με βάση ακολουθίες που αναφέρονται στο pollen profilin mRNA, βρέθηκαν όμοιες γενετικά οι ποικιλίες: ‘Lechin de Sevilla’, ‘Hojiblanca’, ‘Verdial’, ‘Picudo’, ‘Manzanilla de Sevilla’, ‘Arbequina’, ‘Cornicabra’, ‘Blanquita’, ‘Loaime’, ‘Empeltre Leccino’, ‘Sevillenca’, ‘Villalonga’, ‘Acebuche’, ‘Verdial’, ‘Lucio’, ‘Bella de Espagna’, ‘Farga’, ‘Frantoio’, ‘Galega’, ‘Lechin de Granada’, ‘Morrut’, ‘Sourani’, ‘Picual’, ‘Zard’, ‘Rowghani’. Η δεύτερη ομάδα γενετικά όμοιων ακολουθιών περιλάμβανε τις ποικιλίες ελιάς ‘Arbequina’, ‘Frantoio’, ‘Hojiblanca’, ‘Koroneiki’, ‘Manzanilla’, ‘Mastoidis’, ‘Picual’, με βάση περιοχή μιτοχονδριακού orfB-cox3 intergenic spacer. Με βάση ακολουθίες του pollen allergen Ole e 5 mRNA, δημιουργήθηκε η τρίτη ομάδα γενετικά όμοιων ακολουθιών που περιλάμβανε τις ποικιλίες ‘Rowghani’, ‘Zard’, ‘Loaime’, ‘Picudo’, ‘Acebuche’, ‘Hojiblanca’, ‘Picual’, ‘Arbequina’, ‘Bella de Espana’, ‘Lechin de Sevilla’,

‘Verdial de Velez’, ‘Cornicabra’, ‘Blanqueta’ και ‘Lucio’. Στην τέταρτη ομάδα εμφανίστηκαν ακολουθίες που προέρχονταν μόνο από την ποικιλία ‘Gemlik’. Στην τελευταία ομάδα που δημιουργήθηκε, παρουσιάστηκαν ακολουθίες όμοιες γενετικά των ποικιλιών ‘Cellina di Nardo’, ‘Coratina’, ‘Tonda di Strogoli’, ‘Bottone di Gallo’, ‘Cazzinichio’, ‘Santagostino’, με βάση τον μικροδορυφόρο Gapu71a.

Πίνακας 2.9. Ομαδοποίηση νουκλεοτιδικών ακολουθιών με βάση τη γενετική ομοιότητα στο υπό-σύνολο δεδομένων που αφορούσε καλλιεργήσιμες ποικιλίες της *Olea europaea subsp. europaea*, ο αριθμός ακολουθιών που περιλάμβανε κάθε ομάδα και τα είδη που συμπεριλαμβάνονταν σε κάθε ομάδα.

Cluster	Clustered Under	No of Sequences	Cultivars
1	pollen profilin mRNA	94	Lechin de Sevilla, Hojiblanca, Verdial, Picudo, Manzanilla de Sevilla, Arbequina, Cornicabra, Blanqueta, Loaime, Empeltre Leccino, Sevillena, Villalonga, Acebuche, Verdial, Lucio, Bella de Espagna, Farga, Frantoio, Galega, Lechin de Granada, Morrut, Sourani, Picual, Zard, Rowghani
2	orfB-cox3	75	Arbequina, Frantoio, Hojiblanca, Koroneiki, Manzanilla, Mastoidis, Picual
3	pollen allergen Ole e 5 mRNA	65	Rowghani, Zard, Loaime, Picudo, Acebuche, Hojiblanca, Picual, Arbequina, Bella de Espana, Lechin de Sevilla, Verdial de Velez, Cornicabra, Blanqueta και Lucio
4	Gapu71a	7	Cellina di Nardo, Coratina, Tonda di Strogoli, Bottone di Gallo, Cazzinichio, Santagostino

Στην πολλαπλή συστοίχιση των ακολουθιών του συνόλου δεδομένων των ακολουθιών με μήκος ακολουθίας μέχρι 1000 βάσεις, τα αποτελέσματα παρουσίασαν: α) 10 ομάδες γενετικά όμοιων ακολουθιών όταν οι ακολουθίες συστοιχίστηκαν με αναζήτηση ομοιότητας άνω του 95% για άνω του 90% του μήκους της ακολουθίας, και β) 26 ομάδες γενετικά όμοιων ακολουθιών, όταν οι ακολουθίες συστοιχίστηκαν με αναζήτηση ομοιότητας άνω του 70%, για το 100% του μήκους της ακολουθίας. Αναλύονται οι ομαδοποιήσεις της πρώτης περίπτωσης, καθώς οι ομαδοποιήσεις της δεύτερης συμπεριλαμβάνονται στην πρώτη. Η πρώτη ομάδα δημιουργήθηκε με βάση το trnT-trnL intergenic spacer χλωροπλάστη και πλαστιδίου, και περιείχε τα είδη που αναφέρθηκαν παραπάνω. Η δεύτερη ομάδα δημιουργήθηκε με βάση τις ακολουθίες που αναφέρονταν στο γονίδιο lupeol synthase (osw gene) και περιλάμβανε τις ποικιλίες ελιάς τους είδους *Olea europaea subsp. europaea*, ‘Mignola’, ‘Cassanese’, ‘Ottobratica’, ‘Caiazzana’, ‘Dolce’, ‘Kerkiras’, ‘Mastoidis’. Η τρίτη, τέταρτη, πέμπτη και έκτη ομάδα, παρουσίασαν ακολουθίες του είδους *Olea europaea* και των υποειδών του *europaea* και *laperrinei*, με βάση τα cul4 gene (for cullin protein), γονίδιο FAD6 (gene for plastidial delta-12 oleate desaturase, FAD6-L1), γονίδιο oco και γονίδιο MST2 (monosaccharide transporter-2), αντιστοίχως. 18 ομάδες που παρουσίασαν γενετικά όμοιες ακολουθίες αναφέρονταν

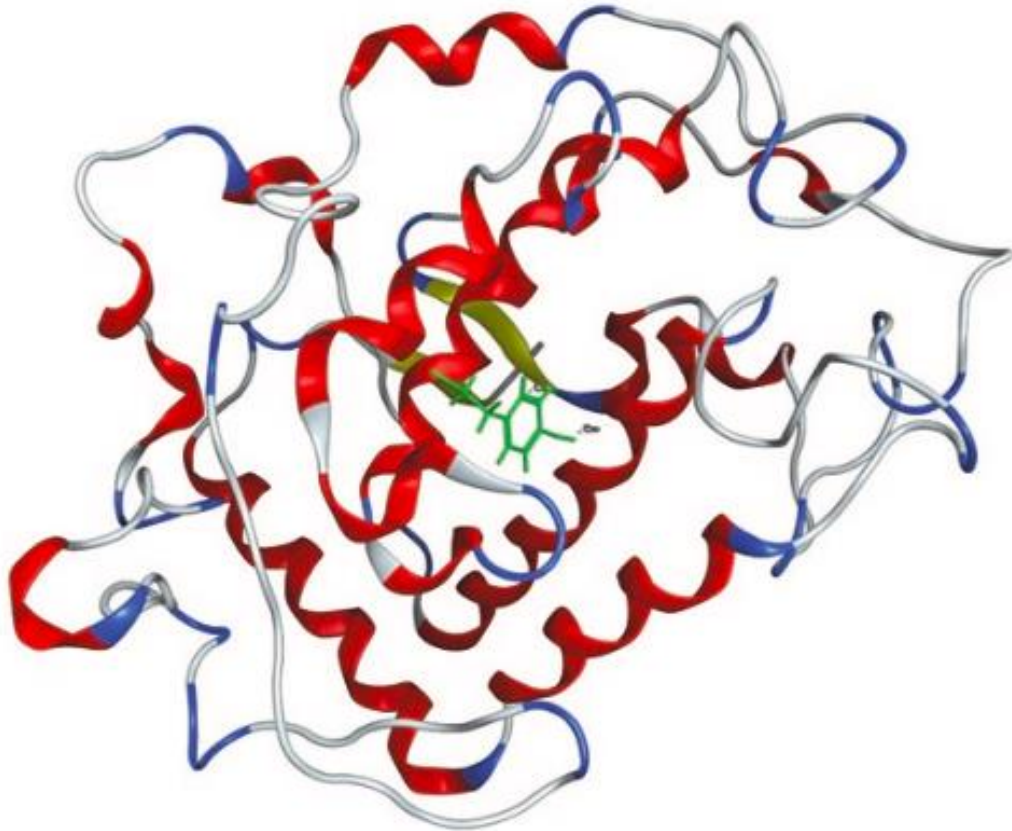
στο *Olea europaea* var. *sylvestris*, και 10 εξ' αυτών αναφέρονταν σε ακολουθίες γονιδίων που δεν έχουν χαρακτηριστεί.

Το σύνολο δεδομένων που περιλάμβανε ακολουθίες με μήκος ακολουθίας από 1000 έως 10000 βάσεις, παρουσίασε έντεκα ομαδοποιήσεις ακολουθιών, με γενετική ομοιότητα. Η πρώτη ομάδα παρουσίασε ακολουθίες πλαστιδίου του είδους *Olea europaea* και των υποειδών του *europaea*, *laperrinei*, *maroccana*, *cerasiformis*, *guanchika*, *cuspidata* και ακολουθίες χλωροπλάστη του είδους *Olea europaea* subsp. *europaea* και των ποικιλιών του είδους 'Nociara', 'Coratina', 'Cassanese', 'Cardea', 'Ottobratica', 'Sinopolese', 'Bardhi, Leucocarpa', 'Nocellara', 'Palma', 'Gentile di Chieti', 'Leccino', 'Nocellara Etna'. Οι παραπάνω ομαδοποιήσεις πραγματοποιήθηκαν με βάση το trnT-trnD intergenic spacer. Οι υπόλοιπες δέκα ομαδοποιήσεις που πραγματοποιήθηκαν αναφέρονταν στο *Olea europaea* var. *sylvestris*, και σε βασίζονταν σε ακολουθίες μη χαρακτηρισμένες και στα pentatricopeptide repeat-containing protein, valine t-RNA ligase, B3 domain-containing protein At4g01580, SPX domain-containing protein At4g22990, serine-rich adhesion for platelets like και high affinity nitrate transporter 2,5.

Τέλος, τα υποσύνολα δεδομένων που περιείχαν μέρη ακολουθιών ή μη ολοκληρωμένες ακολουθίες ή διαφέρουσες ακολουθίες, παρουσίασαν συνολικά 29 ομάδες ακολουθιών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το ποσοστό των γονιδιωματικών ακολουθιών που χαρακτηρίζονται ως άγνωστες ακολουθίες, ομαδοποιήθηκαν σε ποσοστό όμοιο με το ποσοστό εμφάνισης τους στο αρχικό σύνολο δεδομένων του γένους *Olea*.

2.3.5. Μελέτη μοριακής σύνδεσης φαινολικής ένωσης – πρωτεΐνης

Μία από τις πιο σημαντικές φαινολικές ενώσεις που είναι παρούσα στον καρπό της ελιάς (*Olea europaea* subsp. *europaea*), η τυροσόλη (TYR), βρέθηκε πως αλληλοεπιδρά με μία πρωτεΐνη, η οποία φαίνεται πως συνδέεται νευροεκφυλιστικές παθήσεις. Πιο συγκεκριμένα, η φαινολική ένωση τυροσόλη βρέθηκε πως συνδέεται με την ενεργή τοποθεσία της πρωτεΐνης τυροσινάσης, με βάση την κρυσταλλική δομή του συμπλέγματος (PDB ID: 4P6T). Περαιτέρω ανάλυση ως προς την εξέταση της αλληλεπίδρασης τους, είναι απαραίτητη για την εύρεση του αποτελέσματος της αλληλεπίδρασης τους.



Εικόνα 2.1. Αναπαράσταση της κρυσταλλικής δομής (PDB ID: 4P6T) της τυροσινάσης σε δέσμευση της τυροσόλης (σε πράσινο χρώμα), στην ενεργή της τοποθεσία.

2.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η πρόοδος στη βιοπληροφορική τις τελευταίες δεκαετίες έχουν ενδυναμώσει δραματικά τους ερευνητές στην διαχείριση των γονιδιωματικών πληροφοριών. Ένα εκτενές σύνολο υπολογιστικών εργαλείων, αλγορίθμων και βάσεων δεδομένων έχουν αναπτυχθεί για την ανάλυση δεδομένων (Berger *et al.*, 2013). Όμως, με το ρυθμό που αναπαράγονται τα δεδομένα και την αυξανόμενη ανάγκη για αποθήκευση αυτών, η επεξεργασία και η ουσιαστική ανάλυση, είναι το επίκεντρο ενδιαφέροντος στον τομέα της βιοπληροφορικής. Ο νόμος του Moore προβλέπει ότι η υπολογιστική ισχύς και η ικανότητα αποθήκευσης διπλασιάζεται κάθε δεκαπέντε χρόνια, αλλά τα γονιδιωματικά δεδομένα δεκαπλασιάζονται κάθε χρόνο από το 2002 (Moore, 1965; Kahn, 2011). Η δυνατότητα αποθήκευσης και η υπολογιστική ισχύς δεν συμβαδίζουν και δεν μπορούν να ικανοποιήσουν τις ανάγκες για ταχύτατη επέκταση ερευνητικών τομέων που βασίζονται στα δεδομένα (Papageorgiou *et al.*, 2018). Τα ακατέργαστα δεδομένα δεν είναι πάντα χρήσιμα, όπως εξάγονται από μέσα πληροφορίας NGS και Illumina. Η εξαγωγή, η ανάλυση και η συλλογή πληροφοριών, ή ο τρόπος που έχουν στοιχηθεί στις βάσεις δεδομένων, απέχουν πολύ από την τυποποίηση των μεθόδων τους.

Επιπλέον, τα γονιδιωματικά σύνολα δεδομένων είναι γεμάτα από θόρυβο ή λανθασμένες πληροφορίες (Fan et al., 2014).

Το δέντρο της ελιάς έχει αποτελέσει αντικείμενο εκτενούς έρευνας, ενώ λίγες πληροφορίες είναι γνωστές για τις φυλογενετικές του σχέσεις με άλλα είδη. Ένας εφευρετικός αγωγός για την ανάλυση της γενετικής και γονιδιωματικής πληροφορίας του δέντρου της ελιάς είναι απαραίτητος όσον αφορά την εξαγωγή αξιόπιστων συμπερασμάτων για τους μοριακούς μηχανισμούς δράσης και των ευεργετικών ιδιοτήτων του στην ανθρώπινη υγεία. Επιπλέον, η ανθρωπότητα θα πρέπει να αντιμετωπίσει τις επιπτώσεις της κλιματικής αλλαγής τα επόμενα χρόνια. Διάφορα είδη του φυτικού βασιλείου θα επηρεαστούν βαθιά, ειδικά η ελιά, και η κλιματική αλλαγή αποτελεί σημαντικό κίνδυνο για τις καλλιεργήσιμες ποικιλίες. Η πιθανότητα καλλιέργειας σε διαφορετικές κλιματικές συνθήκες, και η εξάπλωση σε μη παραδοσιακές τοποθεσίες, βασίζονται στο γενετικό προφίλ των ειδών.

2.4.1. Συλλογή δεδομένων

Το σύνολο των πάνω από 420.000 γονιδιωματικών ακολουθιών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα έρευνα, δημιουργήθηκε με τη συλλογή δεδομένων από τη Νουκλεοτιδική βάση δεδομένων του National Center for Biotechnology Information (NCBI). Το NCBI που βρίσκεται στο National Institutes of Health δημιουργήθηκε το 1988 για την ανάπτυξη πληροφοριακών συστημάτων βιολογίας. Εκτός της συντήρησης της GenBank (Benson et al., 2015), η NCBI παρέχει πολλά είδη βιολογικών δεδομένων, όπως συστήματα ανάκτησης και υπολογιστικούς πόρους για την ανάλυση των δεδομένων της GenBank και άλλων δεδομένων. Η βάση Νουκλεοτιδικών ακολουθιών είναι μία ολοκληρωμένη βάση δεδομένων που περιλαμβάνει δημοσίως διαθέσιμες νουκλεοτιδικές ακολουθίες για πάνω από 280000 είδη. Οι ακολουθίες λαμβάνονται κυρίως μέσω υποβολής από ανεξάρτητα εργαστήρια ή μαζικής υποβολής από μεγάλης κλίμακας μελέτες αλληλούχισης, συμπεριλαμβανομένων WGS, EST, GSS και μελέτες περιβαλλοντικών δειγματοληψιών υψηλής απόδοσης από κέντρα αλληλούχισης.

2.4.2. Πρώτο επίπεδο ανάλυσης

Το πρώτο επίπεδο ανάλυσης της μελέτης περιλάμβανε διαχωρισμό των νουκλεοτιδικών ακολουθιών από τα δεδομένα θορύβου και μη ολοκληρωμένες ή λανθασμένες ακολουθίες, χρησιμοποιώντας κανονικές εκφράσεις. Αφού αφαιρέθηκε ο θόρυβος από το αρχικό σύνολο δεδομένων, το 11,29% του συνόλου των ακολουθιών, οι ακολουθίες ταξινομήθηκαν με βάση το μήκος της ακολουθίας. Το μεγαλύτερο μέρος των ακολουθιών ανήκε στην ομάδα ακολουθιών με μήκος μικρότερο των 1000 βάσεων. Για την συνέχεια της ανάλυσης των νουκλεοτιδικών ακολουθιών, οι ακολουθίες με μήκος άνω των 10000 βάσεων, οι οποίες αποτελούσαν το 5,143% του

συνόλου των ακολουθιών, δεν χρησιμοποιήθηκαν για περαιτέρω ανάλυση, με σκοπό την προσέγγιση περιοχών που αναφέρονται σε πρωτεϊνικές ακολουθίες. Έχουν περάσει πάνω από 60 χρόνια από τότε που ο Francis Crick, οραματίστηκε έναν τρόπο μεταφοράς της πληροφορίας από τα γονίδια στις πρωτεΐνες, ο οποίος είναι γνωστός ως το κεντρικό δόγμα της μοριακής βιολογίας (Crick, 1970). Το δόγμα μοριακής βιολογίας διαφωτίζει την σχέση μεταξύ του γονοτύπου (ακολουθίες DNA) και του φαινότυπου (πρωτεΐνες). Έτσι, ο φαινότυπος διασφαλίζει την επιβίωση, την αναπαραγωγή και την εξέλιξη του γονότυπου με βάση την καταλληλότητα και εξελικτικότητα του τελευταίου (Tawfik, 2010; Tokuriki and Tawfik, 2009). Η συγκριτική ανάλυση γονιδιωματικών ακολουθιών, αποδεικνύεται ότι είναι ένα ισχυρό εργαλείο για την εύρεση γονιδίων, την πρόβλεψη δομών και λειτουργιών και της φυλογενετικής επιρροής (Gonczarenko et al., 2014). Συνήθως εξετάζονται ορθολογικές αλληλουχίες από τους συγκριθέντες οργανισμούς. Παρά την προφανή σημασία της συγκριτικής ανάλυσης, η ανίχνευση ορθολόγων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ποιότητα της συστοίχισης ακολουθιών, η οποία είναι δύσκολο να ελεγχθεί για μεγάλα σύνολα δεδομένων (Pe'er et al., 2004). Ο ρόλος της περιεκτικότητας σε νουκλεοτίδια στους μηχανισμούς προσαρμογής των νουκλεϊκών οξέων, καθώς και της πιθανής επίδρασης στην σύνθεση αμινοξέων (Friedman et al., 2014; Singer and Hickey, 2000) έχει συζητηθεί σε αρκετές έρευνες (Tekaiia and Yeramian, 2006; Tekaiia et al., 2002; Wu et al., 2012).

Η σύνθεση του συνόλου δεδομένων της παρούσας έρευνας ήταν εξαιρετικά ετερογενής. Αναγνωρίστηκαν διαδοχικές γονιδιωματικές περιοχές 15 ειδών του γένους *Olea*, γονιδιωματικές περιοχές 17 φυτικών ειδών και γονιδιωματικές περιοχές 21 μικροοργανισμών, εκ των οποίων οι περισσότεροι επηρεάζουν, άμεσα ή έμμεσα, τον φαινότυπο του δέντρου της ελιάς. Από το σύνολο των ολοκληρωμένων ακολουθιών, το μεγαλύτερο ποσοστό, το 86,74% αναφερόταν στο γένος της *Olea* και συγκεκριμένα στα είδη *europaea* και *oleaster*. Το είδος *Olea europaea* var. *Sylvestris* ή *oleaster*, είναι τύπος άγριου ελαιόδεντρου, και λόγω των αρκετών ομοιοτήτων με το είδος *Olea europaea* subsp. *europaea*, θεωρείται ο πρόγονος των καλλιεργούμενων ποικιλιών ελιάς (Kassa et al., 2019). Οι γενετικές διαφορές όμως των δύο ειδών δεν έχουν ακόμα μελετηθεί εκτενώς. Οι αναλυτικές τεχνικές που έχουν χρησιμοποιηθεί μέχρι στιγμής για τη γενετική ταυτοποίηση των ειδών περιλαμβάνουν τυχαία ενισχυμένο πολυμορφικό DNA (RAPD), ενισχυμένους πολυμορφισμούς μήκους θραύσματος (AFLPs) και απλές επαναλήψεις ακολουθίας (SSR/ISSR) (Salis et al., 2017; Linos et al., 2014; Pitsiouni et al., 2012; Despotaki et al., 2011), που βασίζονται κυρίως σε χλωροπλαστικό και μιτοχονδριακό DNA (Kassa et al., 2019; Besnard et al., 2002; Besnard and Bervillé, 2000, 2002; Van de Paer et al., 2018). Προσφάτως, όμως, το ολοκληρωμένο γονιδίωμα του *Olea europaea* var. *Sylvestris* δημοσιεύθηκε από τους Unver et al. (2017). Το υποείδος *sylvestris*, καλείται και άγρια ελιά ή *oleaster* (Green, 2002) και έχει μελετηθεί εκτενώς με μοριακούς δείκτες,

συγκριτικά με τα υπόλοιπα υποείδη της *Olea europaea*. Έχει αποδειχθεί ότι υπάρχουν δύο φυλογενετικές καταγωγές του υποείδους, στους τύπους της Δυτικής Μεσογειακής ζώνης, ενώ μόνο μία φυλογενετική καταγωγή στους τύπους της Ανατολικής Μεσογειακής ζώνης (**Besnard et al., 2013**).

Μέσα στο σύνολο δεδομένων της παρούσας έρευνας, αναγνωρίστηκαν ακολουθίες των υποειδών του είδους *Olea europaea*, τα οποία ήταν τα: *europaea*, *cuspidata*, *laperrinei*, *ceraciformis*, *guanchika* και *maroccana*. Το μεγαλύτερο μέρος (74%) των ακολουθιών όμως, ήταν ακολουθίες του είδους *Olea europaea* χωρίς χαρακτηρισμό, οι οποίες παρουσιάστηκαν ως “ορφανές” ακολουθίες του είδους. Το υποείδος *cuspidata* είναι διαδεδομένο σε ένα μεγάλο εύρος ζωνών όπου δεν υπάρχουν παραδοσιακά καλλιεργήσιμοι τύποι, όπως είναι η Αιθιοπία και η Κένυα, και εκτείνεται μέχρι τις περιοχές που έχουν προσφάτως υποδεχτεί την καλλιέργεια της ελιάς, όπως η Νότια Αφρική, η Ινδία και η Κίνα (**Green, 2002**). Το υποείδος *laperrinei* περιορίζεται στην Αφρικανική ήπειρο, όπου το γεωγραφικό σύνορο της ερήμου της Σαχάρας, μεταξύ των συνόρων των πληθυσμών της Νιγηρίας και της Αλγερίας, έχουν οδηγήσει σε ισχυρή γενετική παραλλακτικότητα εντός των τύπων του υποείδους, μεταξύ αυτών των περιοχών (**Besnard et al., 2007**). Τα υποείδη *guanchika*, *ceraciformis* και *maroccana* είναι ενδημικά είδη της περιοχής της Μακρονησίας. Το υποείδος *maroccana* είναι εξαπλωειδές είδος και η μελέτες με μοριακούς δείκτες που το αφορούν είναι σπάνιες. Σημειώνεται επίσης, ότι δεν υπάρχει διασταύρωση του υποείδους με συνυπάρχοντες πληθυσμούς *europaea*, λόγω φαινολογικών διαφορών και διαφορετικής πλοειδίας. Στο υπόλοιπο σύνολο δεδομένων της μελέτης, αναγνωρίστηκαν νουκλεοτιδικές ακολουθίες διαφόρων ειδών που ανήκουν στο γένος *Olea*, συμπεριλαμβανομένων των *Olea exasperata*, *Olea capensis* και των υποειδών του *hochstetteri*, *macrocarpa*, *enervis*, *capensis* και *welwitschii*. Συνολικά αναγνωρίστηκαν νουκλεοτιδικές ακολουθίες 72 καλλιεργήσιμων ποικιλιών ελιάς στο σύνολο δεδομένων υπό ανάλυση, και ακόμα 20 ποικιλίες στο υποσύνολο δεδομένων θορύβου, που αποτελείτο από μη ολοκληρωμένες ή λανθασμένες ακολουθίες. Οι ποικιλίες ελιάς που αναγνωρίστηκαν και είχαν υψηλή επαναληψιμότητα ακολουθιών ήταν, η τούρκικη ποικιλία ‘Gemlik’, και οι ισπανικές ποικιλίες ‘Hojiblanca’, ‘Frantoio’, ‘Picual’, ‘Arbequina’ και ‘Manzanilla’. Αναγνωρίστηκαν επίσης, με χαμηλή επαναληψιμότητα οι ελληνικές ποικιλίες, ‘Κορωνέικη’, ‘Μαστοειδής’, και ‘Κονσερβολιά’.

2.4.3. Δεύτερο επίπεδο ανάλυσης

Μετά την συλλογή όλης της διαθέσιμης γενετικής και γονιδιωματικής πληροφορίας για την *Olea europaea*, οι πιθανές γενετικές σχέσεις μεταξύ των νουκλεοτιδικών ακολουθιών έπρεπε να αναγνωριστούν. Με αυτό το σκοπό, προσδιορίστηκαν οι εσωτερικοί κόμβοι εντός του συνόλου των δεδομένων. Στο δεύτερο επίπεδο ανάλυσης δημιουργήθηκαν υποσύνολα δεδομένων, με βάση

οντολογίες που φιλτραρίστηκαν και ξεχώρισαν έναντι χιλιάδων καταχωρήσεων στις ομάδες δεδομένων A και B.

Το πρώτο υποσύνολο δεδομένων της μελέτης δημιουργήθηκε με ακολουθίες που αναφέρονταν σε νουκλεοτιδικές ακολουθίες χλωροπλάστη. Οι χλωροπλάστες έχουν το δικό τους γονιδίωμα και παρουσιάζουν ομοιότητα στη δομή του DNA, όπως ο αριθμός το περιεχόμενο και η διάταξη των γονιδίων. Ένα ολοκληρωμένο γονιδίωμα χλωροπλάστη αποτελείται από συντηρημένη τετραμερή δομή, δηλαδή ένα ζεύγος ανεστραμμένων επαναλήψεων (IRs) που διαχωρίζονται από μία περιοχή μοναδικού αντιγράφου (LSC) και μία μικρή περιοχή μονής αντιγραφής (SSC). Το μέγεθος των ακολουθιών του υποσυνόλου δεδομένων χλωροπλάστη της μελέτης κυμάνθηκε από 75 έως 155.942 βάσεις. Τα περισσότερα ολοκληρωμένα γονιδιώματα χλωροπλαστών αποτελούνται από ένα πλήρες κυκλικό μόριο, που κυμαίνεται από 120 έως 160 kb σε μέγεθος (Wicke et al., 2011). Τα συντηρημένα γονιδιώματα χλωροπλαστών περιέχουν συνήθως τέσσερα ριβοσωμικά RNA, περίπου τριάντα RNA μεταφοράς και ογδόντα μοναδικές πρωτεΐνες (Guisinger et al., 2011). Παρόλο που η δομή και το γονιδιακό περιεχόμενο του γονιδιώματος χλωροπλάστη, διατηρούνται σε μεγάλο βαθμό σε σχέση με τη βασική τους δομή, συγκριτικές μελέτες γονιδιωμάτων έχουν αποκαλύψει ότι ορισμένα είδη έχουν μία μοναδική δομή γονιδιώματος χλωροπλάστη (Asaf et al., 2017). Επίσης, ορισμένα είδη έχουν συμπαγές χλωροπλαστικό DNA για την ρύθμιση και προσαρμογή σε σκληρές και ανταγωνιστικές συνθήκες (Wicke et al., 2011). Λόγω της μητρικής κληρονομιάς και των συντηρημένων χαρακτηριστικών της δομής του (Burke et al., 2012; Civan et al., 2014; Ruh et al., 2014), τα χλωροπλαστικά γονιδιώματα μπορούν να παρέχουν άφθονες γενετικές πληροφορίες για τη μελέτη της απόκλισης των ειδών και τις γενετικές σχέσεις των φυτών (Moore et al., 2017; Walker et al., 2014; Oldenburg et al., 2015) και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ταυτοποίηση μέσω του κώδικα του DNA και μοριακών δεικτών που επιτρέπουν μορφολογικά όμοια είδη να διαχωριστούν (Kim et al., 2015; Park et al., 2017). Το 97,35% των ακολουθιών του υποσυνόλου δεδομένων της μελέτης, αναφερόταν σε ακολουθίες του είδους *Olea europaea*, με το 97,216% των ακολουθιών να αναφέρεται σε ακολουθίες του υποείδους *sylvestris* (άγρια ελιά).

Το δεύτερο υποσύνολο δεδομένων της παρούσας μελέτης δημιουργήθηκε από νουκλεοτιδικές ακολουθίες που αναφέρονταν σε μιτοχονδριακές νουκλεοτιδικές ακολουθίες. Σε αντίθεση με τα χλωροπλαστικά γονίδια, ο πολυμορφισμός στα μιτοχονδριακά γονιδιώματα δεν χρησιμοποιείται συχνά για την ανασυγκρότηση φυλογενειών ή για αποκωδικοποίηση του DNA σε ανώτερα φυτά (Donnelly, 2017; Govindarajulu et al., 2015; Mower et al., 2007). Τα μιτοχονδριακά γονίδια των φυτών συνήθως εξελίσσονται με πιο αργό ρυθμό από αυτά των πλαστιδίων, αλλά έρευνες έχουν αποδείξει ότι ο ρυθμός αντικατάστασης γονιδίων μπορεί να είναι αρκετά διαφορετικός μεταξύ

μιτοχονδριακών γονιδίων και μεταξύ των ειδών (Mower et al., 2007; Zhu et al., 2014). Οι πολυμορφισμοί μιτοχονδριακού και χλωροπλαστικού DNA, υποτίθεται ότι βρίσκονται σε ισχυρή ανισορροπία σύνδεσης και με αυτό τον τρόπο μπορούν να αποκαλύψουν όμοια φυλογενετικά πρότυπα (Desplanque et al., 2000; Olsen and McCauley, 2000), ωστόσο η διαφορετική κληρονομιά μιτοχονδρίων μπορεί να αποκαλύψει αποκλίνουσες εξελικτικές ιστορίες κυτταροπλασματικών γονιδιωμάτων. Όμως, η πλήρης αφομοίωση των μιτοχονδριακών γονιδίων των φυτών παραμένει δύσκολη λόγω της σύνθετης και μεταβλητής δομής τους (Smith and Keeling, 2015). Οι νουκλεοτιδικές ακολουθίες που ανήκαν σε αυτό το υποσύνολο της παρούσης μελέτης είχαν μέγεθος από 225 έως 11209 βάσεις. Τα γονιδιώματα μιτοχονδρίων έχουν μεγάλη μεταβλητότητα μεγέθους και δομικής οργάνωσης, που κυμαίνονται από 200kb έως 11Mb (Smith and Keeling, 2015). Αυτό οφείλεται σε μεγάλο ποσοστό μη κωδικοποιημένων και επαναλαμβανόμενων ακολουθιών (Smith and Keeling, 2015; Gualberto et al., 2014), όπου πολλές επαναλαμβανόμενες ακολουθίες προάγουν τον ανασυνδυασμό και δημιουργούν πολλαπλές πιθανές διαμορφώσεις μιτοχονδριακών γονιδίων (Lonsdale et al., 1988; Palmer and Herbon, 1988). Γενικά, οι μοριακοί δείκτες μιτοχονδρίων είναι αρκετά μεταβλητοί και μπορούν να επιλύσουν ταξινομικά μοτίβα γενετικά κοντινών ειδών ή πληθυσμών (Mucheka et al., 2015; Patwardan et al., 2014). Το μεγαλύτερο ποσοστό του υποσυνόλου δεδομένων μιτοχονδριακών νουκλεοτιδικών ακολουθιών αποτελούνταν από ακολουθίες που αναφέρονται στο είδος *Olea europaea* (71,9%).

Το επόμενο υποσύνολο δεδομένων που δημιουργήθηκε, αφορούσε ακολουθίες που αναφέρονταν σε ακολουθίες μικροδορυφόρου. Οι απλές επαναλήψεις αλληλουχίας (SSR) ή αλλιώς μικροδορυφόροι συνήθως απαντώνται σχηματίζοντας την περικεντρομερή και υποτελομερή ετεροχρωματίνη (Carmona et al., 2013; Cuadrado and Jouve, 2007; Cuadrado and Carmona, 2013). Θεωρητικά, το δορυφορικό DNA μπορεί να αναπαραχθεί από οποιαδήποτε τυχαία ακολουθία και οι διαδοχικές δορυφορικές οικογένειες που εντοπίζονται σε ένα γονιδίωμα μπορεί να σχετίζονται με την καταγωγή του είδους. Οι επαναλαμβανόμενες ακολουθίες DNA είναι παρούσες σε όλα τα ανώτερα φυτά και αντιπροσωπεύουν έως και το 90% του μεγέθους του γονιδιώματος σε ορισμένα είδη, δημιουργώντας σημαντικές διαφορές μεταξύ των γονιδιωμάτων, οι οποίες μπορεί να αντανakλούν τις εξελικτικές αποστάσεις μεταξύ των ειδών (Mehrota and Goyal, 2014). Μία συγκεκριμένη ακολουθία μπορεί να είναι παρούσα είτε σε ένα μεμονωμένο είδος είτε πολλά είδη που ανήκουν σε μια ταξινομική οικογένεια, υποδεικνύοντας ότι ορισμένες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες εξελίσσονται ταχύτατα, ενώ άλλες μπορεί να διατηρούνται (Ananthawat-Johnson and Heslop-Harisson, 1992). Οι επαναλαμβανόμενες ακολουθίες εμπλέκονται σε πολυάριθμες μοριακές λειτουργίες και θεωρούνται βασικά στοιχεία του μηχανισμού εξέλιξης και της καρυοτιπικής διαφοροποίησης (Silva et al., 2013; Mehrota et al., 2013). Επομένως, οι

επαναλαμβανόμενες ακολουθίες παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη των ειδών (**Britten, 2010**), και εικάζεται ότι μπορούν να μοντελοποιήσουν τα ρυθμιστικά πρότυπα των γονιδίων που οδηγούν σε φαινοτυπικές παραλλαγές (**Knight, 2004**). Το υποσύνολο δεδομένων της παρούσας μελέτης περιείχε 343 ακολουθίες με μέσο μήκος ακολουθίας περίπου 270 βάσεις. Οι περισσότερες ακολουθίες δορυφορικού DNA ζώων και φυτών έχουν συνήθως μονομερή μήκη μονάδας, περίπου 135 - 195 bp ή 315 - 375 bp (**Mehrotra and Goyal, 2014; Garrido-Ramos, 2015; Plohl et al., 2014**). Το μεγαλύτερο μέρος του υποσυνόλου δεδομένων (96,5%) που δημιουργήθηκε αποτελείται από ακολουθίες του είδους *Olea europaea*, εκ των οποίων, το 71,9% από αυτές αναφέρονταν στο υποείδος *europaea*.

Ένα ακόμα υποσύνολο δεδομένων, δημιουργήθηκε υπό την οντολογία 'trn', και αναφερόταν σε ακολουθίες γονιδίων ιντρονίων και διαγονιδιακών διαχωριστών. Ο γραμμικός κώδικας, είναι ένα βοήθημα για την ταξινομική ταυτοποίηση, που χρησιμοποιεί μία σύντομη τυποποιημένη γονιδιωματική περιοχή που υπάρχει καθολικά σε γενεαλογικές σειρές και έχει επαρκή παραλλαγή αλληλουχίας για διάκριση μεταξύ των ειδών (**Hebert et al., 2003; Savolainen et al., 2005; Hajibabaei et al., 2007**). Για τα φυτά χρησιμοποιούνται αρκετοί τύποι ως γραμμικοί κώδικες DNA, συμπεριλαμβανομένων κωδικοποιημένων γονιδίων και μη κωδικοποιημένων διαχωριστικών περιοχών στα γονιδιώματα χλωροπλάστη ή πλαστιδίου. Στα φυτά, η μη κωδικοποιημένη περιοχή trnH-psbA και η πολλαπλή αντιγραφή εσωτερικού μεταγραφόμενου διαχωριστή (ITS), είναι δύο από τους κορυφαίους γραμμικούς κώδικες που χρησιμοποιούνται (**Kress et al., 2005**). Επίσης, το trnL-F του χλωροπλαστικού γονιδιώματος των φυτών αποτελείται από γονίδια μεταφοράς RNA, διατεταγμένα παράλληλα και διαχωρισμένα από μη κωδικοποιημένες διαχωριστικές περιοχές, των οποίων η διατηρημένη φύση τους κατέστησε δυνατή τη σχεδίαση γενικών φυτικών εκκινητών (**Taberlet et al., 1991**), κάνοντας αυτή την περιοχή έναν από τους ευρύτερα χρησιμοποιούμενους δείκτες για φυλογενετικές αναλύσεις σε φυτά (**Borch et al., 2003; Hamilton et al., 2003**). Ακόμα, το ιντρόνιο χλωροπλάστη trnL αντιπροσωπεύει μία καλή περιοχή στόχο, καθώς οι αλληλουχίες του έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για την ανακατασκευή φυλογενειών μεταξύ συγγενικών ειδών (**McDade et al., 2005; Chen et al., 2005**), ή για τον εντοπισμό φυτικών ειδών (**Ronning et al., 2005; Ward et al., 2005**), και προτείνεται από αρκετούς ερευνητές ως πιθανός γραμμικός κώδικας φυτών (**Taberlet et al., 2006**). Η εξέλιξη του ιντρονίου trnL έχει αναλυθεί εκτενώς και έχει γίνει κατανοητό ότι έχει διατηρημένη δευτερεύουσα δομή (**Michel et al., 1982; Davies et al., 1982**), με εναλλαγή συντηρημένων και μεταβλητών περιοχών (**Quandt et al., 2004**). Στις μέρες μας, είναι ευρέως αποδεκτό ότι οποιοσδήποτε έγκυρος γραμμικός κώδικας φυτού θα πρέπει να είναι πολλαπλής τοποθεσίας, κατά προτίμηση υφιστάμενος μίας συντηρημένης κωδικοποιημένης περιοχής, όπως το rbcL, σε συνδυασμό με μία ταχύτερα εξελισσόμενη περιοχή, η οποία πιθανότατα δε είναι κωδικοποιημένη (**Kress et al., 2009**). Το μη κωδικοποιημένο ιντρόνιο trnL και ο διαγονιδιακός

διαχωριστής έχουν προταθεί επανειλημμένα για αυτό το σκοπό (**Hollingsworth et al., 2009; Taberlet et al., 2006; Taberlet et al., 1991**). Στην παρούσα μελέτη, εντός του υποσυνόλου δεδομένων, αναγνωρίστηκαν 29 είδη, μεταξύ των οποίων ήταν τα *Olea europaea* με έξι υποείδη και το *Olea capensis* με τέσσερα υποείδη.

Επιπλέον, δημιουργήθηκαν επιμέρους υποσύνολα δεδομένων, που αφορούσαν ακολουθίες ελικάσης, όπου το 70,06% των ακολουθιών απευθύνονταν στο είδος *Olea europaea*, και ενζύμων όπου το 74,27% των ακολουθιών αντιπροσώπευε επίσης το είδος *Olea europaea*.

Εκτός των παραπάνω υποσυνόλων δεδομένων, δημιουργήθηκε υποσύνολο δεδομένων που αφορούσε περιοχές που σχετίζονται με πρωτεΐνες. Ανάμεσα στις περιοχές του υποσυνόλου δεδομένων αναγνωρίστηκαν 49 λέξεις κλειδιά με αξιοσημείωτη επαναληπτικότητα, όπου το μεγαλύτερο μέρος των ακολουθιών (76,81%) αναφερόταν σε ακολουθίες του είδους *Olea europaea var. Sylvestris*. Ανάμεσα στις οντολογίες με μεγάλη επαναληψιμότητα, διαχωρίστηκαν 8 και απομονώθηκαν σε επιμέρους υποσύνολα δεδομένων. Το υποσύνολο δεδομένων πρωτεϊνών αποτελείτο κατά 30,06% από ακολουθίες που αναφέρονταν σε πρωτεΐνες κινάσης. Οι πρωτεΐνες κινάσες είναι μία μεγάλη οικογένεια ενζύμων, πολλά από τα οποία μεσολαβούν στην απόκριση των ευκαρυωτικών κυττάρων σε εξωτερικά ερεθίσματα (**Hunter and Cooper, 1986**). Για τις πρωτεϊνικές κινάσες, οι ακολουθίες αμινοξέων σε συνδυασμό με μεταλλαξογένεση κατευθυνόμενης περιοχής και ενζυματικής ανάλυσης, έχουν αποκαλύψει διατηρημένες ρυθμιστικές θέσεις φωσφορλίωσης (**Hanks et al., 1988; Songyang et al., 1996**). Οι ακολουθίες πρωτεϊνών που αναφέρονταν σε περιοχές ριβοσωμικών πρωτεϊνών καταλάμβανε το 15,27% του υποσυνόλου δεδομένων πρωτεϊνών. Οι ριβοσωμικές πρωτεΐνες είναι απαραίτητα συστατικά ενός ζώντος κυττάρου, αλλά οι δομές τους είναι εξαιρετικά διαφορετικές σε διαφορετικά είδη. Μέχρι σήμερα, έχουν βρεθεί στη φύση περισσότερες από 200 μη ομόλογες ριβοσωμικές πρωτεΐνες, αλλά μόνο 33 από αυτές υπάρχουν σε όλους τους τομείς της ζωής (**Lecompte et al., 2002; Agrawal et al., 2011**). Αυτές οι 33 πρωτεΐνες ποικίλουν σε μέγεθος και ακολουθία, που σε σύγκριση υψηλότερων ευκαρυωτών με βακτήρια, αυτές οι πρωτεΐνες διαφέρουν έως και πέντε φορές σε μήκος και μπορεί να έχουν μόλις 30% ομοιότητα (**Ben-Shem et al., 2011; Melnikov et al., 2012**). Άλλο ένα υποσύνολο δεδομένων δημιουργήθηκε υπό την οντολογία E3, που προερχόταν από το υποσύνολο δεδομένων πρωτεϊνών και αποτελούσε το 9,85% του συνόλου. Οι E3 λιγάσες ουβικιτίνης είναι οικογένεια ενζύμων οι οποίες διατηρούνται μεταξύ των ευκαρυωτών και στα φυτά είναι γνωστό ότι εκπληρώνουν μοναδικούς ρόλους ως κεντρικοί ρυθμιστές σηματοδότησης φυτοορμονών, συμπεριλαμβανομένης της ορμονικής αντίληψης και της ρύθμισης της βιοσύνθεσης των ορμονών (**Kelley, 2018**). Μόνο στο γονιδίωμα του *Arabidopsis*, υπάρχουν πάνω από 1500 πρωτεΐνες λιγάσης ουβικιτίνης E3 που κωδικοποιούνται, οι οποίες υποδιαιρούνται σε διαφορετικές οικογένειες (**Hua and Vierstra, 2011**). Το 8,99% του συνόλου των

πρωτεϊνικών ακολουθιών αποτελείτο από ακολουθίες φωσφατάσης. Οι φωσφατάσες διαδραματίζουν βασικούς ρυθμιστικούς ρόλους σε πολλές φυσιολογικές διεργασίες, όπως η απόκριση ανοσοποιητικού (Khalil et al., 2012), και η αλληλεπίδραση ξενιστή-μικροβίου (Bates et al., 2007). Η κατάσταση φωσφορυλίωσης μίας πρωτεΐνης καθορίζεται από την ισορροπία της δραστηριότητας μεταξύ κινασών και φωσφατασών, όπου οι δεύτερες είναι υπεύθυνες για την εξουδετέρωση της υδρολυτικής απομάκρυνσης των φωσφορικών τμημάτων. Οι φωσφατάσες αναλαμβάνουν κρίσιμους ρόλους στη ρύθμιση λειτουργίας πρωτεϊνών και των αποκρίσεων σηματοδότησης (Moura and Conde, 2019). Η επόμενη υποομάδα δεδομένων που δημιουργήθηκε από τις ακολουθίες πρωτεϊνών ήταν το υποσύνολο δεδομένων που αναφερόταν σε ακολουθίες πεντατρικοπεπτιδίων. Τα τρικοπεπίδια αποτελούν μερικές από τις πιο κοινές επαναλήψεις αμινοξέων σε πρωτεΐνες διαφορετικών οργανισμών, με τους πιο σημαντικούς εκπροσώπους να είναι οι επαναλήψεις τετρατρικοπεπτιδίων και επαναλήψεις πεντατρικοπεπτιδίων (PPR). Οι πρωτεΐνες PPR εμπλέκονται κυρίως σε διάφορα στάδια του RNA μεταβολισμού στα μιτοχόνδρια και χλωροπλάστες φυτών (Prikl et al., 2011; Saha et al., 2007; Rovira and Smith, 2019). Στις περισσότερες περιπτώσεις, κάθε μέλος της οικογένειας PPR πρωτεϊνών δεσμεύει ένα συγκεκριμένο οργανικό RNA και στρατολογεί παράγοντες για την επεξεργασία, ωρίμανση και μετάφρασή του, ρυθμίζοντας έτσι την έκφρασή του (Kotera et al., 2005; Lurin et al., 2004; Nakamura et al., 2004; Yamazaki et al., 2004). Δημιουργήθηκε ένα επιπλέον υποσύνολο δεδομένων, υπό την οντολογία 'Fbox', το οποίο αντιπροσώπευε το 4,53% του συνόλου δεδομένων των νουκλεοτιδικών ακολουθιών που αναφέρονταν σε πρωτεΐνες. Η πρωτεΐνες Fbox είναι μέρος ενός συμπλέγματος πολλαπλών πρωτεϊνών της οικογένειας SCF, η οποία ανήκει στις οικογένειες E3, και έχουν καθοριστικό ρόλο μέσα σε αυτό (Lechner et al., 2006). Το σύμπλεγμα SCF μεσολαβεί στον μεταγραφικό έλεγχο που εξαρτάται από την αυξίνη, μέσω στόχευσης πρωτεϊνών αυξινών AUX/IAA για την υποβάθμιση που εξαρτάται από την ουβικιτίνη (Gray et al., 2001). Αρκετές από τις Fbox πρωτεΐνες εμπλέκονται στο σχηματισμό και την ανάπτυξη των οργάνων, που περιλαμβάνουν ανώτατα όργανα λουλουδιών και ελέγχουν πτυχές ανάπτυξης των λουλουδιών (Samach et al., 1999; Stinberg et al., 2002). Τέλος, έχει βρεθεί ότι ομάδες Fbox πρωτεϊνών, ίσως ελέγχουν την ειδικότητα από πλευρά γύρης (Sijacic et al., 2004).

2.4.4. Τρίτο επίπεδο ανάλυσης

Στο τρίτο και τελευταίο στάδιο ανάλυσης της παρούσας μελέτης, ήταν εφικτή η συσχέτιση των νουκλεοτιδικών ακολουθιών των υποσυνόλων δεδομένων σε ομαδοποιήσεις με βάση τη γενετική τους ομοιότητα. Οι ομαδοποιήσεις πραγματοποιήθηκαν θεωρώντας ότι για την δημιουργία ομάδας, κάθε ομάδα πρέπει να έχει από πέντε και άνω ακολουθίες με γενετική ομοιότητα, σύμφωνα με τα κατώτατα όρια που τέθηκαν.

Μεταξύ των υποσυνόλων που δημιουργήθηκαν, ο υψηλότερος αριθμός ομαδοποίησης ακολουθιών παρουσιάστηκε στο υποσύνολο δεδομένων υπό την οντολογία 'trn'. Σε αυτό το υποσύνολο δημιουργήθηκαν 7 ομάδες ακολουθιών με γενετική ομοιότητα. Οι ομαδοποιήσεις πραγματοποιήθηκαν με βάση τα trnL-trnF και trnA-Phe, trnT-trnL, trnT-trnD, psbA-trnH, trnL-trnF, psbA και trnK. Σε έξι ομάδες με γενετική ομοιότητα ακολουθιών παρουσιάστηκε το είδος *Olea europaea* και τα υποείδη του και σε τέσσερις ομάδες παρουσιάστηκαν ακολουθίες ειδών του γένους *Olea*. Μέχρι σήμερα, οι μελέτες κατανόησης μοριακής παραλλακτικότητας σε ταξονομικό επίπεδο είναι περιορισμένες σε αριθμό. Παρά την ανάπτυξη των μοριακών τεχνικών, δεν υπάρχουν ακόμα αρκετά δεδομένα φυλογενετικών και φυλογεωγραφικών μελετών για τον καθορισμό της πλήρους φυλογένειας των ειδών της ελιάς (Kassa et al., 2019). Παρόλα αυτά, οι περισσότερες φυλογενετικές μελέτες επιβεβαιώνουν ότι το υποείδος *cuspidata*, του *Olea europaea*, είναι γενετικά το πιο απομακρυσμένο είδος (Kassa et al., 2019). Γενικά, έχει παρατηρηθεί σχετικά υψηλή μοριακή παραλλακτικότητα μεταξύ των *oleasters*, του υποείδους *laperrinei* και καλλιεργήσιμων πληθυσμών (Besnard et al., 2013). Μεγάλη παραλλακτικότητα φαίνεται και από μελέτη των πληθυσμών του *laperrinei* πληθυσμών της Αλγερίας (Besnard and Cherif, 2009). Ομοίως, έχει παρατηρηθεί υψηλή παραλλακτικότητα σε Μεσογειακά *oleasters* συγκριτικά με πληθυσμούς του *laperrinei* (Baali-Cherif and Besnard, 2005). Επιπλέον, έχει γίνει εμφανές ότι οι εξαπλοειδείς πληθυσμοί του υποείδους *maroccana* έχουν υψηλότερη παραλλακτικότητα, από τετραπολειδής πληθυσμούς του *ceraciformis* και του διπλοειδούς *guanchika* (Garcia-Verdugo et al., 2009). Σε μελέτη που έγινε στο *guanchika* βρέθηκε υψηλή γενετική παραλλακτικότητα μεταξύ νεότερων και παλαιότερων υποπληθυσμών του είδους (Garcia-Verdugo et al., 2010), ενώ σε άλλη μελέτη σε 13 υποείδη του ίδιου είδους, φάνηκε χαμηλό επίπεδο συνολικής γονιδιακής παραλλακτικότητας (Garcia-Verdugo et al., 2009). Θεωρητικά, είδη με υψηλότερη πλοειδία, αναμένεται να έχουν υψηλότερη γενετική παραλλακτικότητα (Frankham, 1997).

Ο αμέσως μεγαλύτερος αριθμός ομαδοποίησης ακολουθιών με γενετική ομοιότητα, παρουσιάστηκε στο υποσύνολο δεδομένων που περιλάμβανε ακολουθίες μικροδορυφόρων. Σε αυτή την κατηγορία δημιουργήθηκαν 6 ομαδοποιήσεις ακολουθιών, με βάση τους μικροδορυφόρους GAPI71B, UDO43e176A, GAPI590e, DCA13, DCA16. Όλες οι ομάδες που δημιουργήθηκαν περιείχαν ακολουθίες του είδους *Olea europaea* subsp. *europaea* και καλλιεργήσιμων ποικιλιών του είδους. Λόγω της μεγάλης ιστορίας της καλλιέργειας της ελιάς, ειδικά στην Μεσογειακή ζώνη, η καταγωγή των τοπικών ποικιλιών ελιάς και οι γενετικές τους σχέσεις με κοντινούς συγγενείς τύπους, είναι συχνά πολύπλοκη (Kassa et al., 2019). Αρκετές έρευνες, χρησιμοποιώντας διάφορους γενετικούς δείκτες, αναφέρουν γενετική διάβρωση στις καλλιεργήσιμες ποικιλίες (Besnard et al., 2013; Lumaret et al., 2004; Bronzini de Caraffa et al., 2002; Diez et al., 2011).

Στο υποσύνολο δεδομένων που αναφερόταν σε χλωροπλαστικές ακολουθίες σχηματίστηκαν τέσσερις ομαδοποιήσεις ακολουθιών, ενώ στο υποσύνολο δεδομένων μιτοχονδριακών ακολουθιών μόνο μία ομαδοποίηση. Στην ομάδα με τις περισσότερες ακολουθίες που ομαδοποιήθηκαν με βάση το χλωροπλαστικό γονιδίωμα, ομαδοποιήθηκαν όλα τα υποείδη του είδους *Olea europaea* και είδη του γένους *Olea*, και κάποιες καλλιεργήσιμες ποικιλίες. Οι δείκτες χλωροπλαστικού DNA έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στις μελέτες φυλογένεσης που αφορούν το δέντρο της ελιάς (**Kassa et al., 2019**). Σε έρευνα αναφέρεται ότι πληθυσμοί *cuspidata* από την Αίγυπτο και τύποι *lapperinei* από τη Σαχάρα, μοιράζονται την ίδια καταγωγή πλαστιδίου με άγριους τύπους και ποικιλίες ελιάς από τη Μεσόγειο (**Besnard et al., 2007**). Σε άλλη έρευνα έχει αποδειχθεί η διακριτική κοινή καταγωγή του *cuspidata* από τη Σαχάρα και της Μεσογειακής ελιάς, γεγονός που υποδεικνύει ότι εναλλαγή σπόρων μεταξύ αυτών των υποειδών μπορεί να έχει συμβεί πριν πολύ καιρό, πιθανότατα πριν την επέκταση της ερήμου της Σαχάρας (**Besnard et al., 2012;2013**). Λόγω της ροής γονιδίων μεταξύ άγριων τύπων και ποικιλιών, γίνονται εμφανή μοτίβα χωρίς καμία συνέπεια. Για παράδειγμα, πληθυσμοί του *guanchica* από τις ανατολικές Κανάριες Νήσους φαίνεται να είναι πιο κοινοί γενετικά με την Μεσογειακή ελιά, παρά με δυτικούς πληθυσμούς του ίδιου είδους (**Garcia-Verdugo et al., 2009**). Σε άλλη ομαδοποίηση του παρόντος υποσυνόλου δεδομένων, ομαδοποιήθηκαν ακολουθίες χλωροπλάστη του *Olea europaea subsp. cuspidata*, με άλλα είδη του γένους *Olea*. Σε μελέτη για την παραλλακτικότητα πλαστιδίου και ριβοσώματος, επιβεβαιώνεται η ύπαρξη μεγάλης παραλλακτικότητας του υποείδους *cuspidata* στην Ανατολική Αφρική, παρά σε άλλες περιοχές που υπάρχουν πληθυσμοί του (**Besnard et al., 2007**). Για πληθυσμούς του *cuspidata*, έχει προταθεί η μεταφορά πληθυσμών, ειδικά σε πολύ μεγάλες αποστάσεις, παρά τα φυσικά εμπόδια (**Besnard et al., 2007**), με τα πουλιά και τους ανθρώπους να θεωρούνται από τους κύριους φορείς μεταφοράς σε επίπεδο ηπείρων (**Nathan et al., 2008**).

Στο υποσύνολο δεδομένων που περιλάμβανε ακολουθίες καλλιεργήσιμων ποικιλιών ελιάς του είδους *Olea europaea subsp. europaea*, παρουσιάστηκαν πέντε ομάδες γενετικά όμοιων ακολουθιών. Στην ομάδα με τη μεγαλύτερη γενετική ομοιότητα ομαδοποιήθηκαν 24 ποικιλίες ελιάς. Σε μία ομάδα μόνο οι ακολουθίες αφορούσαν μόνο μία ποικιλία, ενώ στις υπόλοιπες ομάδες οι ομαδοποιήσεις ακολουθιών περιλάμβαναν από 6 έως 13 ποικιλίες ελιάς. Οι καλλιεργούμενες ποικιλίες ελιάς πολλαπλασιάζονται κυρίως αγενώς, με τη χρήση μοσχευμάτων, επομένως αναμένονται να έχουν μικρότερη παραλλακτικότητα, συγκριτικά με τους άγριους τύπους ελιάς. Από την άλλη πλευρά, ο γενετικός εμπλουτισμός των ποικιλιών λόγω διασταύρωσης με άλλους άγριους τύπους, κατά την εξάπλωση της καλλιέργειας στη Μεσογειακή ζώνη, είναι πολύ πιθανός. Τα μοριακά δεδομένα που υπάρχουν αυτή τη στιγμή, δεν έχουν ακόμα καταφέρει να ανακατασκευάσουν πλήρως τη διαδικασία εξημέρωσης των ειδών της ελιάς. Έχει επανειλημμένα αποδειχθεί πως οι καλλιεργήσιμες ποικιλίες ελιάς έχουν αρκετές ομοιότητες με μορφές του άγριου τύπου ελιάς (**Amane**

et al., 1999; Angiolillo et al., 1999; Besnard et al., 2007; 2013), και από μερικούς ερευνητές οι άγριοι τύποι θεωρούνται πρόγονοι των καλλιεργήσιμων ποικιλιών. Η επιλογή ποικιλιών για καλλιέργεια από τοπικούς άγριους πληθυσμούς ελιάς και η εντατική και μακροχρόνια καλλιέργεια τους, είναι ο κύριος λόγος υψηλής γενετικής ομοιότητας μεταξύ ποικιλιών ελιάς και τοπικών άγριων πληθυσμών, όπως επίσης και η ροή γονιδίων μεταξύ ποικιλιών και άγριων πληθυσμών (**Kassa et al., 2019**). Λόγω της μικρής απόστασης σε περιοχές εντατικής καλλιέργειας ελιάς, παρατηρείται ροή γονιδίων μεταξύ ποικιλιών και άγριων πληθυσμών (**Belaj et al., 2007; Garcia-Verdugo et al., 2009**). Σε πείραμα που έγινε στην Τυνησία, εντοπίστηκαν έξι γενετικές ομαδοποιήσεις άγριων τύπων και καλλιεργήσιμων ποικιλιών, πέντε εκ των οποίων παρουσίασαν γενετική ομαδοποίηση ποικιλιών και άγριων τύπων ελιάς (**Hannachi et al., 2010**). Όμως, σε ορισμένες περιοχές της Μεσογείου, οι καλλιεργήσιμες ποικιλίες είναι λιγότερο όμοιες γενετικά με τους ενδημικούς άγριους πληθυσμούς, πιθανότατα λόγω της μεγάλης απόστασης μεταφοράς των ποικιλιών (**Besnard et al., 2001; Besnard and Berville, 2000; Bronzini de Caraffa et al., 2002**).

Στην πολλαπλή συστοίχιση των ακολουθιών του συνόλου δεδομένων των ακολουθιών με μήκος ακολουθίας μέχρι 1000 βάσεις, παρουσιάστηκαν 10 ομάδες γενετικά όμοιων ακολουθιών όταν οι ακολουθίες συστοιχίστηκαν με αναζήτηση ομοιότητας άνω του 95% για άνω του 90% του μήκους της ακολουθίας, και 26 ομάδες γενετικά όμοιων ακολουθιών, όταν οι ακολουθίες συστοιχίστηκαν με αναζήτηση ομοιότητας άνω του 70%, για το 100% του μήκους της ακολουθίας. Στην πολλαπλή συστοίχιση των ακολουθιών του συνόλου δεδομένων με μήκος ακολουθίας από 1000 έως 10000 βάσεις, παρουσιάστηκαν 11 ομαδοποιήσεις ακολουθιών, με γενετική ομοιότητα. Από τις ομαδοποιήσεις της πρώτης ομάδας, 18 ομάδες αναφέρονταν σε ακολουθίες *Olea europaea* var. *sylvestris* και από τις ομαδοποιήσεις της δεύτερης κατηγορίας, 10 ομάδες ακολουθιών αναφέρονταν στο *Olea europaea* var. *sylvestris*. Έρευνες έχουν δείξει πως υπάρχει μεγάλη γενετική παραλλακτικότητα σε πυρηνικό και πλαστιδιακό DNA, μεταξύ πληθυσμών *sylvestris* της δυτικής και της ανατολικής Μεσογείου (**Besnard et al., 2013; Breton et al., 2006; Bronzini de Caraffa et al., 2002; Lumaret et al., 2004**). Διαφορετικοί παράγοντες, όπως το μέγεθος του πληθυσμού, ο κατακερματισμός του φυσικού περιβάλλοντος και η απόσταση από τις περιοχές καλλιέργειας, παίζουν καθοριστικό ρόλο για τη γενετική παραλλακτικότητα μεταξύ των πληθυσμών του υποείδους. Σε μελέτη που έγινε σε 11 άγριους πληθυσμούς, διασκορπισμένους στην Ισπανία και την Ιταλία, βρέθηκε υψηλή γονιδιακή παραλλακτικότητα εντός των πληθυσμών (**Belaj et al., 2007**). Σε άλλη έρευνα που έγινε σε 31 πληθυσμούς, ανά την Μεσόγειο, βρέθηκε επίσης σημαντική γενετική παραλλακτικότητα μεταξύ των πληθυσμών (**Lumaret et al., 2004**). Η ετερογένεια μίας περιοχής πιθανότατα οφείλεται στην μεταφορά γύρης και σπόρων. Για παράδειγμα, σε έρευνα που έγινε σε μία περιοχή 6 εκταρίων στην Ισπανία, βρέθηκε υψηλή ανταλλαγή γύρης μεταξύ των πληθυσμών άγριας ελιάς (**Beghe et al., 2017**). Όμως, λόγω της εντατικής καλλιέργειας ανά τους αιώνες, η ύπαρξη

πραγματικά άγριων πληθυσμών ελιάς στη Μεσόγειο, αμφισβητείται από πολλούς ερευνητές, και έχει αποδειχθεί ότι οι υποτιθέμενοι άγριοι τύποι ήταν το αποτέλεσμα διασταύρωσης μεταξύ των καλλιεργούμενων και άγριων μορφών ή της διάδοσης σπόρων από περιοχές καλλιέργειας (**Baldoni et al., 2006; Belaj et al., 2007; Bronzini de Caraffa et al., 2002; Lumaret et al., 2004**). Ο εντοπισμός καθαρών πληθυσμών άγριας ελιάς θα ήταν απαραίτητος για την επίλυση όλων των πληθυσμών και των εξελικτικών γενετικών πτυχών της εξημέρωσης της ελιάς (**Fuller and Allaby, 2009**). Γενικά, η παραλλακτικότητα απλοτύπων στους άγριους τύπους ελιάς είναι χαμηλή, συγκριτικά με τύπους άλλων δενδροκομικών ειδών, στη Μεσογειακή ζώνη. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην χαμηλή κινητικότητα πληθυσμών, σε συνδυασμό με τη μεγάλη διάρκεια ζωής της ελιάς (**Amane et al., 1999**).

Τέλος, υποσύνολα δεδομένων υπό τις οντολογίες ‘ATPase’, ‘enzyme’, ‘helicase’, ‘plastid’, δεν παρουσιάστηκε ομαδοποίηση ακολουθιών με γενετική ομοιότητα. Στο σύνολο δεδομένων νουκλεοτιδικών ακολουθιών που περιλαμβάνει ακολουθίες που αναφέρονται σε πρωτεΐνες, δεν παρουσιάστηκε ομαδοποίηση ακολουθιών με γενετική ομοιότητα άνω του 95%, για το 90% του μήκους της ακολουθίας. Αντίθετα, παρουσιάστηκαν δέκα ομάδες ακολουθιών όμοιων γενετικά, με ομοιότητα άνω του 70%, για το 100% του μήκους της ακολουθίας. Όλες οι ομάδες που δημιουργήθηκαν, αναφέρονται σε ακολουθίες του *Olea europaea* var. *sylvestris*.

2.4.5. Μοριακή σύνδεση φαινολικής ένωσης – πρωτεΐνης

Για την καλύτερη κατανόηση των ευεργετικών ιδιοτήτων των προϊόντων της ελιάς στην ανθρώπινη υγεία, έχουν αναπτυχθεί πολλές υπολογιστικές μέθοδοι ανάλυσης μακρομορίων σε μοριακό και δομικό επίπεδο (**Palaiomylitoy et al., 2008; Papageorgiou et al., 2016a; 2016b; Papageorgiou et al., 2017**). Πλήρεις δομικές μελέτες έχουν βοηθήσει στην αποσαφήνιση του ρόλου σημαντικών μεταβολικών ενζύμων (**Pavlopoulou et al., 2013; Vlachakis et al., 2014a; 2014b**). Σύμφωνα με τις μελέτες με υπολογιστικές μεθόδους ανάλυσης, όλη η πληροφορία που συλλέγεται είναι διαχειρίσιμη μέσω μεγάλων υπολογιστικών συστημάτων (**Theocharaki et al., 2018; Tsiliki et al., 2014; Vangelatos et al., 2009**). Η μοριακή μοντελοποίηση και η δομική βιοπληροφορική έχουν ανοίξει το δρόμο για μεγαλύτερη κατανόηση του ρόλου των συστατικών της ελιάς στη ανθρώπινη υγεία (**Schnerch et al., 2016; Sellis et al., 2012; Sertedaki et al., 2016; Steinhauf et al., 2014**).

Μία από τις πιο σημαντικές φαινολικές ενώσεις, που είναι παρούσα στα προϊόντα της ελιάς, η τυροσόλη, βρέθηκε ότι αλληλεπιδρά με μία πρωτεΐνη, η οποία φαίνεται να σχετίζεται με νευροεκφυλιστικές διαταραχές. Πιο συγκεκριμένα, η φαινολική ένωση τυροσόλη βρέθηκε πως αλληλοεπιδρά με την ενεργή περιοχή της τυροσινάσης, με βάση το σύμπλοκο κρυσταλλικής δομής (PDB ID: 4P6T) (**Goldfeder et al., 2014**). Η τυροσινάση, μία πρωτεΐνη που περιέχει χαλκό, είναι ένα

μόριο κλειδί στην βιοσύνθεση της μελανίνης και άλλων χημικών ουσιών (Cass and Hill, 1980). Η τυροσόλη καταλύει την υδροξυλίωση της τυροσίνης σε L-DOPA και την οξείδωση της L-DOPA σε ντοπακίνη (Korner and Pawelek, 1982; Sanchez-Ferrez et al., 1995). Είναι επίσης πιθανό, η οξείδωση της ντοπαμίνης για το σχηματισμό της μελανίνης να αναπαράγεται από την τυροσινάση (Miranda et al., 1984). Οι Goldfeder et al. (2014) εξήγαγαν τα παρακάτω συμπεράσματα: α) ο αλβινισμός στον άνθρωπο αναπαράγεται κυρίως από μία μεταλλαγμένη τυροσινάση, β) η φαρμακευτική βιομηχανία έχει στοχεύσει αισθητά την τυροσινάση και γ) πολλοί οργανισμοί οφείλουν την παραγωγή μελανίνης στην τυροσινάση. Επιπλέον, η προστασία από την UV ακτινοβολία, η αποτοξίνωση των φαινολών, και η επούλωση των πληγών σχετίζονται με τη δράση της τυροσινάσης (Fairhead and Thony-Meyer, 2012). Υποστηρίζεται επίσης, ότι το μελάνωμα μπορεί να σχετίζεται με την μετάλλαξη της τυροσινάσης (Olivares and Solano, 2009). Για τις επιπτώσεις τέτοιων μεταλλάξεων έχει γίνει εκτενής έρευνα (Dalkas et al., 2013; Filntisi et al., 2014; Inturi et al., 2014; Kandil et al., 2009; Kapasa et al., 2012; Maltezos et al., 2014; Marinou et al., 2018; Nicolaidis et al., 2015, 2016). Τα επίπεδα ντοπαμίνης στον εγκέφαλο συντηρούνται μέσω της υπερβολικής οξείδωσης της κυτοσολικής ντοπαμίνης και της L-DOPA από την τυροσινάση, η οποία αποτρέπει επίσης την κυτταρική διάσπαση από την αυτό-οξείδωση ντοπαμίνης (Asanuma et al., 2003). Σύμφωνα με την ίδια μελέτη, στην απουσία της υδροξυλάσης τυροσίνης, η ικανότητα της τυροσινάσης για διμερή σύνθεση και οξείδωση στο ντοπαμινεργικό σύστημα, ενδείκνυται για τη σύνθεση της ντοπαμίνης σε μακροχρόνιους ασθενείς με Parkinson. Ομοίως, η υπερέκφραση τυροσινάσης μεγέθυνε την ποσότητα ντοπαμίνης, η οποία συνοδεύτηκε από την ανάπτυξη χρωστικών μελανίνης που τελικά πυροδότησαν αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο (Hasegawa, 2010). Κλείνοντας, ο υποκινητής τυροσινάσης είναι ενεργητικός κατά την ανάπτυξη του εγκεφάλου ποντικών, και μπορεί να συνδέεται με την εξέλιξη νευρομελανίνης στις νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπως η ασθένεια του Parkinson (Tief et al., 1996).

2.4.6. Συμπεράσματα

Η παρούσα μελέτη οδήγησε στον σχεδιασμό μίας μεθόδου πολυδιάστατης ανάλυσης φυτικών γονιδιακών δεδομένων. Η μελέτη αποτελεί μία πρώτη προσπάθεια συσσώρευσης, ομαδοποίησης και αναγνώρισης των ειδών και ποικιλιών ελιάς, με βάση τη γενετική τους πληροφορία. Μέσω αυτής της μεθόδου κατέστη εφικτή η χαρτογράφηση όλων των κατακερματισμών νουκλεοτιδικών ακολουθιών του γένους *Olea* και η παραγωγή συνόλων γονιδίων που μπορούν να έχουν την δυνατότητα μεγάλου εύρους χρήσεων όπως η ταυτοποίηση ποικιλιών με υψηλή ακρίβεια ή χρήσεις φαρμακευτικού σκοπού. Επιπλέον, αυτή η υβριδική προσέγγιση έχει την δυνατότητα χρήσης ως εργαλείο πρόβλεψης, καθώς οι νουκλεοτιδικές ακολουθίες που αναγνωρίστηκαν ως άγνωστες ομαδοποιήθηκαν σε ποσοστό όμοιο με το ποσοστό εμφάνισης τους στο αρχικό σύνολο δεδομένων. Με βάση τα δεδομένα

που συλλέχθηκαν, έγινε εμφανές πως το μεγαλύτερο μέρος της έρευνας που έχει πραγματοποιηθεί και το μεγαλύτερο μέρος της διαθέσιμης πληροφορίας που βρίσκεται στις βάσεις δεδομένων, αφορά τα είδη ελιάς που βρίσκονται στη ζώνη της Μεσογείου, ενώ έχει δοθεί πολύ μικρή σημασία σε άλλα είδη ή υποείδη, που βρίσκονται διασκορπισμένα σε διαφορετικές εδαφοκλιματικές συνθήκες. Ακόμα, διαφορετικές ταξινομικές βαθμίδες έχουν επιβιώσει κάτω από διαφορετικές κλιματικές συνθήκες, γεγονός που συνεπάγεται τη συσσώρευση μοναδικών γονιδίων που είναι σημαντικά για την προσαρμοστικότητα και τις αγρονομικές βελτιώσεις του είδους. Γενετικές αποδείξεις δείχνουν ότι μοναδικοί γονότυποι από καλλιεργήσιμες ποικιλίες, μπορούν να εντοπιστούν σε άγριους πληθυσμούς, ακόμα και γεωγραφικά απομονωμένους. Η γενετική παραλλακτικότητα που συναντάται εντός και μεταξύ των ταξινομικών ομάδων της ελιάς είναι ένας εξαιρετικά χρήσιμος πόρος για την προσαρμοστικότητα και τις βελτιώσεις του είδους έναντι προκλήσεων όπως η αντιμετώπιση της κλιματικής αλλαγής. Το γενετικό αποτύπωμα της ελιάς είναι ιδιαίτερα υποσχόμενο για τον μελλοντικό προηγμένο έλεγχο παραγωγής νέων καλλιεργήσιμων ποικιλιών ελιάς και προϊόντων που καταναλώνονται από τους καταναλωτές, κάτω από το πρίσμα της ασφάλειας τροφίμων και της δημόσιας υγείας.

Μελετώντας την αλληλεπίδραση φαινολικών ενώσεων με πρωτεΐνη που σχετίζεται με νευροεκφυλιστική ασθένεια, παρατηρήθηκε πως η φαινολική ένωση τυροσόλη αλληλοεπιδρά με την ενεργή περιοχή της τυροσινάσης, μίας πρωτεΐνης που ευθύνεται για τον αλβινισμό στα θηλαστικά, και η οποία είναι ένας στόχος που έχει χρησιμοποιηθεί αρκετά από την φαρμακοβιομηχανία, και έχει συνδεθεί στενά με την ασθένεια του Parkinson. Η κατανάλωση προϊόντων ελιάς και φαινολικών ενώσεων, όπως οι τυροσόλη, φαίνεται να είναι δυνητικά ωφέλιμη στην αντιμετώπιση νευροεκφυλιστικών διαταραχών. Εν κατακλείδι, υπάρχει αυξανόμενη ανάγκη ανακάλυψης των πιθανών ευεργετικών επιδράσεων των ευεργετικών στην ανθρώπινη υγεία τροφών, όπως το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο και οι καρποί ελιάς, ενάντια στις νευροεκφυλιστικές διαταραχές και η αποκωδικοποίηση της δράσης τους σε μοριακό επίπεδο.

Η τρέχουσα έρευνα θέτει ένα πρώτο βήμα για μελλοντικές έρευνες και κλινικές δοκιμές, με σκοπό την αναγνώριση του πιθανού ρόλου των φαινολικών ενώσεων στην αντιμετώπιση ασθενειών.

2.5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abadi, D. J., Boncz, P. A., & Harizopoulos, S.** (2009). Column-oriented database systems. *Proceedings of the VLDB Endowment*, 2(2), 1664-1665.
- Agarwal, P., & Chauhan, R.** (2013). Alignment of multiple sequences using GA method.
- Agrawal, R. K., Sharma, M. R., Yassin, A., & Lahiri, I.** (2011). Structure and function of organellar ribosomes as revealed by cryo-EM. In *Ribosomes* (pp. 83-96). Springer, Vienna.
- Ajawatanawong, P., & Baldauf, S. L.** (2013). Evolution of protein indels in plants, animals and fungi. *BMC evolutionary biology*, 13(1), 140.
- Alberts, B.** (2018). *Molecular biology of the cell*. New York: Garland Science. p.760.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J.** (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403-410.
- Amane, M., Lumaret, R., Hany, V., Ouazzani, N., Debain, C., Vivier, G., & Deguilloux, M. F.** (1999). Chloroplast-DNA variation in cultivated and wild olive (*Olea europaea* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 99(1-2), 133-139.
- Anamthawat-Jónsson, K., & Heslop-Harrison, J. S.** (1992). Species specific DNA sequences in the Triticeae. *Hereditas*, 116(1-2), 49-54.
- Anbarasu, L. A., Narayanasamy, P., & Sundararajan, V.** (2000). Multiple molecular sequence alignment by island parallel genetic algorithm. *Current Science*, 858-863.
- Andreu-Perez, J., Poon, C. C., Merrifield, R. D., Wong, S. T., & Yang, G. Z.** (2015). Big data for health. *IEEE journal of biomedical and health informatics*, 19(4), 1193-1208.
- Angiolillo, A., Mencuccini, M., & Baldoni, L.** (1999). Olive genetic diversity assessed using amplified fragment length polymorphisms. *Theoretical and Applied Genetics*, 98(3-4), 411-421.
- Aramaki, E., Maskawa, S., & Morita, M.** (2011). Twitter catches the flu: detecting influenza epidemics using Twitter. In *Proceedings of the 2011 Conference on empirical methods in natural language processing* (pp. 1568-1576).
- Arenas-Díaz, E. D., Ochoterena, H., & Rodríguez-Vázquez, K.** (2009). Multiple sequence alignment using a genetic algorithm and GLOCSA. *Journal of Artificial Evolution and Applications*, 2009.
- Asaf, S., Khan, A. L., Aaqil Khan, M., Muhammad Imran, Q., Kang, S. M., Al-Hosni, K., ... & Lee, I. J.** (2017). Comparative analysis of complete plastid genomes from wild soybean (*Glycine soja*) and nine other *Glycine* species. *PLoS one*, 12(8), e0182281.
- Asanuma, M., Miyazaki, I., & Ogawa, N.** (2003). Dopamine-or L-DOPA-induced neurotoxicity: the role of dopamine quinone formation and tyrosinase in a model of Parkinson's disease. *Neurotoxicity research*, 5(3), 165-176.
- Asur, S., & Huberman, B. A.** (2010). Predicting the future with social media. In *2010 IEEE/WIC/ACM international conference on web intelligence and intelligent agent technology* (Vol. 1, pp. 492-499). IEEE.
- Baali-Cherif, D., & Besnard, G.** (2005). High genetic diversity and clonal growth in relict populations of *Olea europaea* subsp. *laperrinei* (Oleaceae) from Hoggar, Algeria. *Annals of Botany*, 96(5), 823-830.

- Baele, G., Suchard, M. A., Rambaut, A., & Lemey, P.** (2017). Emerging concepts of data integration in pathogen phylogenetics. *Systematic biology*, 66(1), e47-e65.
- Bahassi, E. M., & Stambrook, P. J.** (2014). Next-generation sequencing technologies: breaking the sound barrier of human genetics. *Mutagenesis*, 29(5), 303-310.
- Bailey, T. L., & Elkan, C.** (1994). Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in bipolymers.
- Balaban, A. T., Basak, S. C., Beteringhe, A., Mills, D., & Supuran, C. T.** (2004). QSAR study using topological indices for inhibition of carbonic anhydrase II by sulfanilamides and Schiff bases. *Molecular diversity*, 8(4), 401-412.
- Baldauf, S. L., & Palmer, J. D.** (1993). Animals and fungi are each other's closest relatives: congruent evidence from multiple proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(24), 11558-11562.
- Baldauf, S. L.** (2003). Phylogeny for the faint of heart: a tutorial. *TRENDS in Genetics*, 19(6), 345-351.
- Baldoni, L., Tosti, N., Ricciolini, C., Belaj, A., Arcioni, S., Pannelli, G., ... & Porceddu, A.** (2006). Genetic structure of wild and cultivated olives in the central Mediterranean basin. *Annals of Botany*, 98(5), 935-942.
- Bansal, A. K., & Meyer, T. E.** (2002). Evolutionary analysis by whole-genome comparisons. *Journal of Bacteriology*, 184(8), 2260-2272.
- Bates, J. M., Akerlund, J., Mittge, E., & Guillemin, K.** (2007). Intestinal alkaline phosphatase detoxifies lipopolysaccharide and prevents inflammation in zebrafish in response to the gut microbiota. *Cell host & microbe*, 2(6), 371-382.
- Beghe, D., Piotti, A., Satovic, Z., de la Rosa, R., & Belaj, A.** (2017). Pollen-mediated gene flow and fine-scale spatial genetic structure in *Olea europaea* subsp. *europaea* var. *sylvestris*. *Annals of botany*, 119(4), 671-679.
- Belaj, A., Muñoz-Diez, C., Baldoni, L., Porceddu, A., Barranco, D., & Satovic, Z.** (2007). Genetic diversity and population structure of wild olives from the north-western Mediterranean assessed by SSR markers. *Annals of Botany*, 100(3), 449-458.
- Benjamini, Y., & Hochberg, Y.** (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal statistical society: series B (Methodological)*, 57(1), 289-300.
- Benson, D. A., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Sayers, E. W.** (2015). 655 Genbank. *Nucleic Acids Res*, 43, D30-35.
- Ben-Shem, A., de Loubresse, N. G., Melnikov, S., Jenner, L., Yusupova, G., & Yusupov, M.** (2011). The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution. *Science*, 334(6062), 1524-1529.
- Bentley, S. D., & Parkhill, J.** (2015). Genomic perspectives on the evolution and spread of bacterial pathogens. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1821), 20150488.
- Berger, B., Peng, J., & Singh, M.** (2013). Computational solutions for omics data. *Nature reviews genetics*, 14(5), 333-346.
- Berger, B., Daniels, N. M., & Yu, Y. W.** (2016). Computational biology in the 21st century: Scaling with compressive algorithms. *Communications of the ACM*, 59(8), 72-80.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., ... & Bourne, P. E.** (2000). The protein data bank. *Nucleic acids research*, 28(1), 235-242.

- Besnard, G., & Bervillé, A.** (2000). Multiple origins for Mediterranean olive (*Olea europaea* L. ssp. *europaea*) based upon mitochondrial DNA polymorphisms. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series III-Sciences de la Vie*, 323(2), 173-181.
- Besnard, G., Baradat, P., Breton, C., Khadari, B., & Bervillé, A.** (2001). Olive domestication from structure of oleasters and cultivars using nuclear RAPDs and mitochondrial RFLPs. *Genetics Selection Evolution*, 33(1), S251-S268.
- Besnard, G., Khadari, B., Baradat, P., & Bervillé, A.** (2002). *Olea europaea* (Oleaceae) phylogeography based on chloroplast DNA polymorphism. *Theoretical and Applied Genetics*, 104(8), 1353-1361.
- Besnard, G., & Bervillé, A.** (2002). On chloroplast DNA variations in the olive (*Olea europaea* L.) complex: comparison of RFLP and PCR polymorphisms. *Theoretical and Applied Genetics*, 104(6-7), 1157-1163.
- Besnard, G., Christin, P. A., Baali-Cherif, D., Bouguedoura, N., & Anthelme, F.** (2007). Spatial genetic structure in the Laperrine's olive (*Olea europaea* subsp. *laperrinei*), a long-living tree from the central Saharan mountains. *Heredity*, 99(6), 649-657.
- Besnard, G., Rubio de Casas, R., & Vargas, P.** (2007). Plastid and nuclear DNA polymorphism reveals historical processes of isolation and reticulation in the olive tree complex (*Olea europaea*). *Journal of Biogeography*, 34(4), 736-752.
- Besnard, G., & Baali-Cherif, D.** (2009). Coexistence of diploids and triploids in a Saharan relict olive: Evidence from nuclear microsatellite and flow cytometry analyses. *Comptes Rendus Biologies*, 332(12), 1115-1120.
- Besnard, G., Anthelme, F., & Baali-Cherif, D.** (2012). The Laperrine's olive tree (Oleaceae): a wild genetic resource of the cultivated olive and a model-species for studying the biogeography of the Saharan Mountains. *Acta botanica gallica*, 159(3), 319-328.
- Besnard, G., Khadari, B., Navascués, M., Fernández-Mazuecos, M., El Bakkali, A., Arrigo, N., ... & Savolainen, V.** (2013). The complex history of the olive tree: from Late Quaternary diversification of Mediterranean lineages to primary domestication in the northern Levant. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 280(1756), 20122833.
- Besnard, G., El Bakkali, A., Haouane, H., Baali-Cherif, D., Moukhli, A., & Khadari, B.** (2013). Population genetics of Mediterranean and Saharan olives: geographic patterns of differentiation and evidence for early generations of admixture. *Annals of botany*, 112(7), 1293-1302.
- Bharanidharan, D., & Gautham, N.** (2006). Principal component analysis of DNA oligonucleotide structural data. *Biochemical and biophysical research communications*, 340(4), 1229-1237.
- Bickel, Peter. Fan; Roy, Lv. J.** (2008), Discussion on the paper "Sure independence screening for ultrahigh dimensional feature space". *Statist. Soc. Ser. B.* 70(5),883–88.
- Binder, H., & Blettner, M.** (2015). Big data in medical science—a biostatistical view: Part 21 of a series on evaluation of scientific publications. *Deutsches Ärzteblatt International*, 112(9), 137.
- Borsch, T., Hilu, K. W., Quandt, D., Wilde, V., Neinhuis, C., & Barthlott, W.** (2003). Noncoding plastid trnT-trnF sequences reveal a well resolved phylogeny of basal angiosperms. *Journal of evolutionary biology*, 16(4), 558-576.
- Botta, M., & Negro, G.** (2009). Multiple sequence alignment with genetic algorithms. In *International Meeting on Computational Intelligence Methods for Bioinformatics and Biostatistics* (pp. 206-214). Springer, Berlin, Heidelberg.

- Boyd, S., Boyd, S. P., & Vandenberghe, L.** (2004). *Convex optimization*. Cambridge university press.
- Boyd, S., Parikh, N., & Chu, E.** (2011). *Distributed optimization and statistical learning via the alternating direction method of multipliers*. Now Publishers Inc.
- Bradley, J. K., Kyrola, A., Bickson, D., & Guestrin, C.** (2011). Parallel coordinate descent for l_1 -regularized loss minimization. *arXiv preprint arXiv:1105.5379*.
- Bredel, M., & Jacoby, E.** (2004). Chemogenomics: an emerging strategy for rapid target and drug discovery. *Nature Reviews Genetics*, 5(4), 262-275.
- Brenner SE, Chothia C, Hubbard TJP** (1998). Assessing sequence comparison methods with reliable structurally identified distant evolutionary relationships. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 95:6073-6078.
- Breton, C., Tersac, M., & Bervillé, A.** (2006). Genetic diversity and gene flow between the wild olive (oleaster, *Olea europaea* L.) and the olive: several Plio-Pleistocene refuge zones in the Mediterranean basin suggested by simple sequence repeats analysis. *Journal of Biogeography*, 33(11), 1916-1928.
- Britten, R. J.** (2010). Transposable element insertions have strongly affected human evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(46), 19945-19948.
- Bühlmann, P., & Van De Geer, S.** (2011). *Statistics for high-dimensional data: methods, theory and applications*. Springer Science & Business Media.
- Burke, S. V., Grennan, C. P., & Duvall, M. R.** (2012). Plastome sequences of two New World bamboos—*Arundinaria gigantea* and *Cryptochloa strictiflora* (Poaceae)—extend phylogenomic understanding of Bambusoideae. *American journal of botany*, 99(12), 1951-1961.
- Cai, J. J., Smith, D. K., Xia, X., & Yuen, K. Y.** (2005). MBEToolbox: a MATLAB toolbox for sequence data analysis in molecular biology and evolution. *BMC bioinformatics*, 6(1), 64.
- Candes, E., & Tao, T.** (2007). The Dantzig selector: Statistical estimation when p is much larger than n . *The annals of Statistics*, 35(6), 2313-2351.
- Cao, M., Zhang, H., Park, J., Daniels, N. M., Crovella, M. E., Cowen, L. J., & Hescott, B.** (2013). Going the distance for protein function prediction: a new distance metric for protein interaction networks. *PLoS one*, 8(10), e76339.
- Carmona, A., Frierio, E., de Bustos, A., Jouve, N., & Cuadrado, A.** (2013). Cytogenetic diversity of SSR motifs within and between *Hordeum* species carrying the H genome: *H. vulgare* L. and *H. bulbosum* L. *Theoretical and applied genetics*, 126(4), 949-961.
- Carrillo-Araujo, M., Taş, N., Alcantara-Hernandez, R. J., Gaona, O., Schondube, J. E., Medellín, R. A., ... & Falcon, L. I.** (2015). Phyllostomid bat microbiome composition is associated to host phylogeny and feeding strategies. *Frontiers in microbiology*, 6, 447.
- Carroll, S. B., Grenier, J. K., & Weatherbee, S. D.** (2013). *From DNA to diversity: molecular genetics and the evolution of animal design*. John Wiley & Sons.
- Case, R. J., Boucher, Y., Dahllöf, I., Holmström, C., Doolittle, W. F., & Kjelleberg, S.** (2007). Use of 16S rRNA and *rpoB* genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Applied and environmental microbiology*, 73(1), 278-288.
- Cass, A. E. G., & Hill, H. A. O.** (1980, January). Copper proteins and copper enzymes. In *Ciba Found Symp* (Vol. 79, pp. 71-91).

- Chang, A. B., Lin, R., Studley, W. K., Tran, C. V., & Saier, Jr, M. H.** (2004). Phylogeny as a guide to structure and function of membrane transport proteins. *Molecular membrane biology*, 21(3), 171-181.
- Chattaraj A, Williams HE, Cannane A** (1999). Fast Homology Search using Categorization Profiles. RMIT University, Melbourne.
- Chen, S. S., Donoho, D. L., & Saunders, M. A.** (2001). Atomic decomposition by basis pursuit. *SIAM review*, 43(1), 129-159.
- Chen, S., Xia, T. A. O., Wang, Y., Liu, J., & Chen, S.** (2005). Molecular systematics and biogeography of *Crawfordia*, *Metagentiana* and *Tripterospermum* (Gentianaceae) based on nuclear ribosomal and plastid DNA sequences. *Annals of Botany*, 96(3), 413-424.
- Chen, L., Zou, L., & Chen, J.** (2007). An efficient ant colony algorithm for multiple sequences alignment. In *Third International Conference on Natural Computation (ICNC 2007)*(Vol. 4, pp. 208-212). IEEE.
- Chen, S., & Lin, C.** (2007). Multiple DNA sequence alignment based on genetic simulated annealing techniques. *International journal of information and management sciences*, 18(2), 97.
- Chen, R., Mias, G. I., Li-Pook-Than, J., Jiang, L., Lam, H. Y., Chen, R., ... & Cheng, Y.** (2012). Personal omics profiling reveals dynamic molecular and medical phenotypes. *Cell*, 148(6), 1293-1307.
- Chernikova, D., Motamedi, S., Csürös, M., Koonin, E. V., & Rogozin, I. B.** (2011). A late origin of the extant eukaryotic diversity: divergence time estimates using rare genomic changes. *Biology direct*, 6(1), 26.
- Cho, H., Berger, B., & Peng, J.** (2015). Diffusion component analysis: unraveling functional topology in biological networks. In *International Conference on Research in Computational Molecular Biology* (pp. 62-64). Springer, Cham.
- Chuong, B.D., Kazutaka, K.** (2008). Protein Multiple Sequence Alignment, *Methods Mol. Biol.* 484, 379–413.
- Civáň, P., Foster, P. G., Embley, M. T., Seneca, A., & Cox, C. J.** (2014). Analyses of charophyte chloroplast genomes help characterize the ancestral chloroplast genome of land plants. *Genome Biology and Evolution*, 6(4), 897-911.
- Cohen, J. C., Kiss, R. S., Pertsemlidis, A., Marcel, Y. L., McPherson, R., & Hobbs, H. H.** (2004). Multiple rare alleles contribute to low plasma levels of HDL cholesterol. *Science*, 305(5685), 869-872.
- Collins, F. S., Morgan, M., & Patrinos, A.** (2003). The Human Genome Project: lessons from large-scale biology. *Science*, 300(5617), 286-290.
- Corpet, F.** (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic acids research*, 16(22), 10881-10890.
- Crick, F.** (1970). Central dogma of molecular biology. *Nature*, 227, 561–563.
- Cuadrado, A., & Jouve, N.** (2007). The nonrandom distribution of long clusters of all possible classes of trinucleotide repeats in barley chromosomes. *Chromosome Research*, 15(6), 711-720.
- Cuadrado, A., Carmona, A., & Jouve, N.** (2013). Chromosomal characterization of the three subgenomes in the polyploids of *Hordeum murinum* L.: New insight into the evolution of this complex. *PLoS One*, 8(12), e81385.
- Dalkas, G. A., Vlachakis, D., Tsagkrasoulis, D., Kastania, A., & Kossida, S.** (2013). State-of-the-art technology in modern computer-aided drug design. *Briefings in bioinformatics*, 14(6), 745-752.

- Daniels, N. M., Gallant, A., Peng, J., Cowen, L. J., Baym, M., & Berger, B.** (2013). Compressive genomics for protein databases. *Bioinformatics*, 29(13), i283-i290.
- da Silva, F. J. M., Pérez, J. M. S., Pulido, J. A. G., & Rodriguez, M. A. V.** (2011). Parallel niche pareto AlineaGA—an evolutionary multiobjective approach on multiple sequence alignment. *Journal of integrative bioinformatics*, 8(3), 57-72.
- Davies, R. W., Waring, R. B., Ray, J. A., Brown, T. A., & Scazzocchio, C.** (1982). Making ends meet: a model for RNA splicing in fungal mitochondria. *Nature*, 300(5894), 719-724.
- Dayhoff, M., Schwartz, R., & Orcutt, B.** (1978). 22 a model of evolutionary change in proteins. *Atlas of protein sequence and structure*, 5, 345-352.
- de Caraffa, B. V., Maury, J., Gambotti, C., Breton, C., Bervillé, A., & Giannettini, J.** (2002). Mitochondrial DNA variation and RAPD mark oleasters, olive and feral olive from Western and Eastern Mediterranean. *Theoretical and Applied Genetics*, 104(6-7), 1209-1216.
- Desplanque, B., Viard, F., Bernard, J., Forcioli, D., Saumitou-Laprade, P., Cuguen, J., & Van Dijk, H.** (2000). The linkage disequilibrium between chloroplast DNA and mitochondrial DNA haplotypes in *Beta vulgaris* ssp. *maritima* (L.): the usefulness of both genomes for population genetic studies. *Molecular Ecology*, 9(2), 141-154.
- Despotaki, E., Linos, A. and Hagedimitriou, M.** (2011). Studying the genetic variation among clones of 'kalamon' and 'koroneiki' using molecular techniques. *Acta Hort.* 924, 335-339
- Dhaunta, N., Fatima, U., & Guptasarma, P.** (2011). N-Terminal sequencing by mass spectrometry through specific fluorescamine labeling of α -amino groups before tryptic digestion. *Analytical biochemistry*, 408(2), 263-268.
- Díez, C. M., Trujillo, I., Barrio, E., Belaj, A., Barranco, D., & Rallo, L.** (2011). Centennial olive trees as a reservoir of genetic diversity. *Annals of Botany*, 108(5), 797-807.
- Do, C. B., Mahabhashyam, M. S., Brudno, M., & Batzoglou, S.** (2005). ProbCons: Probabilistic consistency-based multiple sequence alignment. *Genome research*, 15(2), 330-340.
- Donnelly, K., Cottrell, J., Ennos, R. A., Vendramin, G. G., A'Hara, S., King, S., ... & Cavers, S.** (2017). Reconstructing the plant mitochondrial genome for marker discovery: a case study using *Pinus*. *Molecular ecology resources*, 17(5), 943-954.
- Donoho, D. L.** (2000). High-dimensional data analysis: The curses and blessings of dimensionality. *AMS math challenges lecture*, 1(2000), 32.
- Durbin, R., Eddy, S. R., Krogh, A., & Mitchison, G.** (1998). *Biological sequence analysis: probabilistic models of proteins and nucleic acids*. Cambridge university press.
- Eddy, S. R.** (2002). A memory-efficient dynamic programming algorithm for optimal alignment of a sequence to an RNA secondary structure. *BMC bioinformatics*, 3(1), 18.
- Edgar, R. C.** (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*, 32(5), 1792-1797.
- Efron, B.** (2010). Correlated z-values and the accuracy of large-scale statistical estimates. *Journal of the American Statistical Association*, 105(491), 1042-1055.
- Egan, B. M.** (2013). Prediction of incident hypertension. Health implications of data mining in the 'Big Data' era. *Journal of Hypertension*, 31(11), 2123-2124.

- Ehrgott, M.** (2005). *Multicriteria optimization* (Vol. 491). Springer Science & Business Media.
- Ettoumi, B., Guesmi, A., Brusetti, L., Borin, S., Najjari, A., Boudabous, A., & Cherif, A.** (2013). Microdiversity of deep-sea Bacillales isolated from Tyrrhenian sea sediments as revealed by ARISA, 16S rRNA gene sequencing and BOX-PCR fingerprinting. *Microbes and environments*, ME13013.
- Fairhead, M., & Thöny-Meyer, L.** (2012). Bacterial tyrosinases: old enzymes with new relevance to biotechnology. *New biotechnology*, 29(2), 183-191.
- Fan, J., & Li, R.** (2001). Variable selection via nonconcave penalized likelihood and its oracle properties. *Journal of the American statistical Association*, 96(456), 1348-1360.
- Fan, J., & Fan, Y.** (2008). High dimensional classification using features annealed independence rules. *Annals of statistics*, 36(6), 2605.
- Fan, J., Samworth, R., & Wu, Y.** (2009). Ultrahigh dimensional feature selection: beyond the linear model. *The Journal of Machine Learning Research*, 10, 2013-2038.
- Fan, J., & Liao, Y.** (2012). Endogeneity in ultrahigh dimension. *Available at SSRN 2045864*.
- Fan, J., Guo, S., & Hao, N.** (2012). Variance estimation using refitted cross-validation in ultrahigh dimensional regression. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Statistical Methodology)*, 74(1), 37-65.
- Fan, J., Han, F., & Liu, H.** (2014). Challenges of big data analysis. *National science review*, 1(2), 293-314.
- Felsenstein, J.** (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of molecular evolution*, 17(6), 368-376.
- Feng, D. F., & Doolittle, R. F.** (1987). Progressive sequence alignment as a prerequisite to correct phylogenetic trees. *Journal of molecular evolution*, 25(4), 351-360.
- Filntisi, A., Vlachakis, D., Matsopoulos, G. K., & Kossida, S.** (2014). Computational construction of antibody–drug conjugates using surface lysines as the antibody conjugation site and a non-cleavable linker. *Cancer informatics*, 13, CIN-S19222.
- Frankham, R.** (1997). Do island populations have less genetic variation than mainland populations?. *Heredity*, 78(3), 311-327.
- Friedman, R., Drake, J.W. and Hughes, A.L.** (2004). Genome-wide patterns of nucleotide substitution reveal stringent functional constraints on the protein sequences of thermophiles. *Genetics*, 167, 1507–1512.
- Friesner, R. A., Banks, J. L., Murphy, R. B., Halgren, T. A., Klicic, J. J., Mainz, D. T., ... & Shaw, D. E.** (2004). Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *Journal of medicinal chemistry*, 47(7), 1739-1749.
- Fritsch, V., Varoquaux, G., Thyreau, B., Poline, J. B., & Thirion, B.** (2012). Detecting outliers in high-dimensional neuroimaging datasets with robust covariance estimators. *Medical image analysis*, 16(7), 1359-1370.
- Fuller, D. Q., & Allaby, R.** (2009). Seed Dispersal and Crop Domestication: Shattering. *Germination and Seasonality in Evolution under Cultivation*.
- García-Verdugo, C., Fay, M. F., Granado-Yela, C., De Casas, R. R., Balaguer, L., Besnard, G., & Vargas, P.** (2009). Genetic diversity and differentiation processes in the ploidy series of *Olea europaea* L.: a multiscale approach from subspecies to insular populations. *Molecular Ecology*, 18(3), 454-467.

- García-Verdugo, C., Forrest, A. D., Fay, M. F., & Vargas, P.** (2010). The relevance of gene flow in metapopulation dynamics of an oceanic island endemic, *Olea europaea* subsp. *guanchica*. *Evolution: International Journal of Organic Evolution*, 64(12), 3525-3536.
- Garrido-Ramos, M. A.** (2015). Satellite DNA in plants: more than just rubbish. *Cytogenetic and Genome Research*, 146(2), 153-170.
- Gavira, J. A.** (2016). Current trends in protein crystallization. *Archives of biochemistry and biophysics*, 602, 3-11.
- Giegé, R.** (2013). A historical perspective on protein crystallization from 1840 to the present day. *The FEBS journal*, 280(24), 6456-6497.
- Graur, All D., Li, W.H.** (2002), *Fundamental of Molecular Evolution*, 2nd ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Gray, W. M., Kepinski, S., Rouse, D., Leyser, O., & Estelle, M.** (2001). Auxin regulates SCF TIR1-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature*, 414(6861), 271-276.
- Green, P. S.** (2002). A revision of *Olea* L.(Oleaceae). *Kew Bulletin*, 91-140.
- Group, C. P. W., Hollingsworth, P. M., Forrest, L. L., Spouge, J. L., Hajibabaei, M., Ratnasingham, S., ... & Fazekas, A. J.** (2009). A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(31), 12794-12797.
- Goldberg, D. E.** (1989). Genetic algorithms in search. *Optimization, and MachineLearning*.
- Goldfeder, M., Kanteev, M., Isaschar-Ovdat, S., Adir, N., & Fishman, A.** (2014). Determination of tyrosinase substrate-binding modes reveals mechanistic differences between type-3 copper proteins. *Nature communications*, 5(1), 1-5.
- Goncearenco, Alexander, Bin-Guang Ma, and Igor N. Berezovsky,** (2014). "Molecular mechanisms of adaptation emerging from the physics and evolution of nucleic acids and proteins." *Nucleic acids research* 42.5, 2879-2892.
- Gondro, C., & Kinghorn, B. P.** (2007). A simple genetic algorithm for multiple sequence alignment. *Genetics and Molecular Research*, 6(4), 964-982.
- Gonzalez-Diaz, H., Vilar, S., Santana, L., & Uriarte, E.** (2007). Medicinal chemistry and bioinformatics-current trends in drugs discovery with networks topological indices. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 7(10), 1015-1029.
- González-Díaz, H., González-Díaz, Y., Santana, L., Ubeira, F. M., & Uriarte, E.** (2008). Proteomics, networks and connectivity indices. *Proteomics*, 8(4), 750-778.
- Gotoh, O.** (1990). Consistency of optimal sequence alignments. *Bulletin of Mathematical Biology*, 52(4), 509-525.
- Gotoh, O.** (1996). Significant improvement in accuracy of multiple protein sequence alignments by iterative refinement as assessed by reference to structural alignments. *Journal of molecular biology*, 264(4), 823-838.
- Govindarajulu, R., Parks, M., Tennessen, J. A., Liston, A., & Ashman, T. L.** (2015). Comparison of nuclear, plastid, and mitochondrial phylogenies and the origin of wild octoploid strawberry species. *American Journal of Botany*, 102(4), 544-554.
- Green, E. D., Watson, J. D., & Collins, F. S.** (2015). Human Genome Project: Twenty-five years of big biology. *Nature*, 526(7571), 29-31.

- Gualberto, J. M., Milesina, D., Wallet, C., Niazi, A. K., Weber-Lotfi, F., & Dietrich, A.** (2014). The plant mitochondrial genome: dynamics and maintenance. *Biochimie*, *100*, 107-120.
- Guisinger, M. M., Kuehl, J. V., Boore, J. L., & Jansen, R. K.** (2011). Extreme reconfiguration of plastid genomes in the angiosperm family Geraniaceae: rearrangements, repeats, and codon usage. *Molecular biology and evolution*, *28*(1), 583-600.
- Halgren, T. A.** (1996). Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. *Journal of computational chemistry*, *17*(5-6), 490-519.
- Hall, P., Pittelkow, Y., & Ghosh, M.** (2008). Theoretical measures of relative performance of classifiers for high dimensional data with small sample sizes. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Statistical Methodology)*, *70*(1), 159-173.
- Hamilton, M. B., Braverman, J. M., & Soria-Hernanz, D. F.** (2003). Patterns and relative rates of nucleotide and insertion/deletion evolution at six chloroplast intergenic regions in New World species of the Lecythidaceae. *Molecular biology and evolution*, *20*(10), 1710-1721.
- Han, F., & Pan, W.** (2010). A data-adaptive sum test for disease association with multiple common or rare variants. *Human heredity*, *70*(1), 42-54.
- Han, X., Gu, W., & Fan, J.** (2010). Control of the false discovery rate under arbitrary covariance dependence. *arXiv preprint arXiv:1012.4397*.
- Hanks, S. K., Quinn, A. M., & Hunter, T.** (1988). The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science*, *241*(4861), 42-52.
- Hannachi, H., Breton, C., Msallem, M., El Hadj, S. B., El Gazzah, M., & Bervillé, A.** (2010). Genetic relationships between cultivated and wild olive trees (*Olea europaea* L. var. *europaea* and var. *sylvestris*) based on nuclear and chloroplast SSR markers. *Natural Resources*, *1*(02), 95.
- Hasegawa, T.** (2010). Tyrosinase-expressing neuronal cell line as in vitro model of Parkinson's disease. *International journal of molecular sciences*, *11*(3), 1082-1089.
- Hastie, T., Tibshirani, R., & Friedman, J.** (2009). *The elements of statistical learning: data mining, inference, and prediction*. Springer Science & Business Media.
- Hebert, P. D., Cywinska, A., Ball, S. L., & Dewaard, J. R.** (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, *270*(1512), 313-321.
- Hajibabaei, M., Singer, G. A., Hebert, P. D., & Hickey, D. A.** (2007). DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *TRENDS in Genetics*, *23*(4), 167-172.
- Hekmat, D.** (2015). Large-scale crystallization of proteins for purification and formulation. *Bioprocess and biosystems engineering*, *38*(7), 1209-1231.
- Henikoff, S., & Henikoff, J. G.** (1992). Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *89*(22), 10915-10919.
- Heringa, J., & Taylor, W. R.** (1997). Three-dimensional domain duplication, swapping and stealing. *Current opinion in structural biology*, *7*(3), 416-421.
- Higgins, D. G., & Sharp, P. M.** (1988). CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene*, *73*(1), 237-244.
- Hogeweg, P., & Hesper, B.** (1984). The alignment of sets of sequences and the construction of phyletic trees: an integrated method. *Journal of molecular evolution*, *20*(2), 175-186.

- Holland, J. H.** (1992). Adaptation in natural and artificial systems: an introductory analysis with applications to biology, control, and artificial intelligence. MIT press.
- Hua, Z., & Vierstra, R. D.** (2011). The cullin-RING ubiquitin-protein ligases. *Annual review of plant biology*, 62, 299-334.
- Huang, X.** (1994). On global sequence alignment. *Bioinformatics*, 10(3), 227-235.
- Hui, P.** (2012). Next generation sequencing: chemistry, technology and applications. In *Chemical Diagnostics* (pp. 1-18). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Hunter, T., & Cooper, J. A.** (1986). 6 Viral Oncogenes and Tyrosine Phosphorylation. In *The enzymes* (Vol. 17, pp. 191-246). Academic Press.
- Hunter, D. R., & Li, R.** (2005). Variable selection using MM algorithms. *Annals of statistics*, 33(4), 1617.
- Huo, H., & Stojkovic, V.** (2007, August). A simulated annealing algorithm for multiple sequence alignment with guaranteed accuracy. In *Third International Conference on Natural Computation (ICNC 2007)* (Vol. 2, pp. 270-274). IEEE.
- Inturi, R., Wäneskog, M., Vlachakis, D., Ali, Y., Ek, P., Punga, T., & Bjerling, P.** (2014). A splice variant of the human phosphohistidine phosphatase 1 (PHPT1) is degraded by the proteasome. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 57, 69-75.
- Ivanciuc, O., & Braun, W.** (2007). Robust quantitative modeling of peptide binding affinities for MHC molecules using physical-chemical descriptors. *Protein and peptide letters*, 14(9), 903-916.
- Janda, J. M., & Abbott, S. L.** (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of clinical microbiology*, 45(9), 2761-2764.
- Janečka, J. E., Miller, W., Pringle, T. H., Wiens, F., Zitzmann, A., Helgen, K. M., ... & Murphy, W. J.** (2007). Molecular and genomic data identify the closest living relative of primates. *Science*, 318(5851), 792-794.
- Jardine, N., & van Rijsbergen, C. J.** (1971). The use of hierarchic clustering in information retrieval. *Information storage and retrieval*, 7(5), 217-240.
- Jonides, J., Nee, D. E., & Berman, M. G.** (2006). What has functional neuroimaging told us about the mind? So many examples, so little space. *Cortex*, 42(3), 414-417.
- Jukes, T. H., & Cantor, C. R.** (1969). Evolution of protein molecules. *Mammalian protein metabolism*, 3, 21-132.
- Kahn, S. D.** (2011). On the future of genomic data. *science*, 331(6018), 728-729.
- Kandil, S., Biondaro, S., Vlachakis, D., Cummins, A. C., Coluccia, A., Berry, C., ... & Brancale, A.** (2009). Discovery of a novel HCV helicase inhibitor by a de novo drug design approach. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 19(11), 2935-2937.
- Kapasa, M., Vlachakis, D., Kostadima, M., Sotiropoulou, G., Kossida, S.** (2012). Towards the elucidation of the regulatory network guiding the insulin producing cells' differentiation. *Genomics* 100, 212-221
- Kassa, A., Konrad, H., & Geburek, T.** (2019). Molecular diversity and gene flow within and among different subspecies of the wild olive (*Olea europaea* L.): a review. *Flora*, 250, 18-26.

- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K. I., & Miyata, T.** (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic acids research*, 30(14), 3059-3066.
- Katoh, K., Kuma, K. I., Toh, H., & Miyata, T.** (2005). MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic acids research*, 33(2), 511-518.
- Kaya, M., Sarhan, A., & Alhaji, R.** (2014). Multiple sequence alignment with affine gap by using multi-objective genetic algorithm. *Computer methods and programs in biomedicine*, 114(1), 38-49.
- Kelley, D. R.** (2018). E3 ubiquitin ligases: key regulators of hormone signaling in plants. *Molecular & Cellular Proteomics*, 17(6), 1047-1054.
- Kemena, C., Taly, J. F., Kleinjung, J., & Notredame, C.** (2011). STRIKE: evaluation of protein MSAs using a single 3D structure. *Bioinformatics*, 27(24), 3385-3391.
- Kenah, E., Britton, T., Halloran, M. E., & Longini Jr, I. M.** (2016). Molecular infectious disease epidemiology: survival analysis and algorithms linking phylogenies to transmission trees. *PLoS computational biology*, 12(4), e1004869.
- Khalil, A. M., Cambier, J. C., & Shlomchik, M. J.** (2012). B cell receptor signal transduction in the GC is short-circuited by high phosphatase activity. *Science*, 336(6085), 1178-1181.
- Khalili, A., & Chen, J.** (2007). Variable selection in finite mixture of regression models. *Journal of the American Statistical Association*, 102(479), 1025-1038.
- Kim, J., Pramanik, S., & Chung, M. J.** (1994). Multiple sequence alignment using simulated annealing. *Bioinformatics*, 10(4), 419-426.
- Kim, K., Lee, S. C., Lee, J., Lee, H. O., Joh, H. J., Kim, N. H., ... & Yang, T. J.** (2015). Comprehensive survey of genetic diversity in chloroplast genomes and 45S rDNAs within *Panax ginseng* species. *PloS one*, 10(6), e0117159.
- Kimura, M.** (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution*, 16(2), 111-120.
- Knight, J. C.** (2004). Allele-specific gene expression uncovered. *Trends in Genetics*, 20(3), 113-116.
- Korner, A., Pawelek, J.** (1982). Mammalian tyrosinase catalyzes three reactions in the biosynthesis of melanin. *Science* 217:1163-1165
- Kotera, E., Tasaka, M., & Shikanai, T.** (2005). A pentatricopeptide repeat protein is essential for RNA editing in chloroplasts. *Nature*, 433(7023), 326-330.
- Kotev, M. I., & Ivanov, P. M.** (2008). Molecular mechanics (MM3 (π)) conformational analysis of molecules containing conjugated π -electron fragments: Leucomycin-V. *Chirality: The Pharmacological, Biological, and Chemical Consequences of Molecular Asymmetry*, 20(3-4), 400-410.
- Kress, W. J., Wurdack, K. J., Zimmer, E. A., Weigt, L. A., & Janzen, D. H.** (2005). Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(23), 8369-8374.
- Kress, W. J., Erickson, D. L., Jones, F. A., Swenson, N. G., Perez, R., Sanjurjo, O., & Bermingham, E.** (2009). Plant DNA barcodes and a community phylogeny of a tropical forest dynamics plot in Panama. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(44), 18621-18626.
- Kroemer, R. T.** (2003). Molecular modelling probes: docking and scoring.

- Kumar, S., & Filipinski, A.** (2007). Multiple sequence alignment: in pursuit of homologous DNA positions. *Genome research*, 17(2), 127-135.
- Lakshmi, N.J., Gavarraju, P., Jeevana, J.K., Karteeka, P.,** (2016). A literature survey on multiple sequence alignment algorithms, *Int. J. Adv. Res. Comput. Sci. Softw. Eng.* 6, 280–288.
- Lange, K., Hunter, D. R., & Yang, I.** (2000). Optimization transfer using surrogate objective functions. *Journal of computational and graphical statistics*, 9(1), 1-20.
- Lassmann, T., & Sonnhammer, E. L.** (2002). Quality assessment of multiple alignment programs. *FEBS letters*, 529(1), 126-130.
- Lassmann, T., & Sonnhammer, E. L.** (2005). Kalign—an accurate and fast multiple sequence alignment algorithm. *BMC bioinformatics*, 6(1), 1-9.
- Lawrence, C. E., Altschul, S. F., Boguski, M. S., Liu, J. S., Neuwald, A. F., & Wootton, J. C.** (1993). Detecting subtle sequence signals: a Gibbs sampling strategy for multiple alignment. *science*, 262(5131), 208-214.
- Lechner, E., Achard, P., Vansiri, A., Potuschak, T., & Genschik, P.** (2006). F-box proteins everywhere. *Current opinion in plant biology*, 9(6), 631-638.
- Leek, J. T., & Storey, J. D.** (2007). Capturing heterogeneity in gene expression studies by surrogate variable analysis. *PLoS Genet*, 3(9), e161.
- Lei, X., Sun, J., Xu, X., & Guo, L.** (2010). Artificial bee colony algorithm for solving multiple sequence alignment. In *2010 IEEE fifth international conference on bio-inspired computing: theories and applications (BIC-TA)* (pp. 337-342). IEEE.
- Lecompte, O., Ripp, R., Thierry, J. C., Moras, D., & Poch, O.** (2002). Comparative analysis of ribosomal proteins in complete genomes: an example of reductive evolution at the domain scale. *Nucleic acids research*, 30(24), 5382-5390.
- Li M, Ma B, Kisman D, Tromp J** (2004). PatternHunter II: Highly sensitive and fast homology search. *J. Bioinform. Comput. Biol.* 2(3):417-439.
- Liao, Y., & Jiang, W.** (2011). Posterior consistency of nonparametric conditional moment restricted models. *The Annals of Statistics*, 39(6), 3003-3031.
- Linos, A, Nikoloudakis, N, Katsiotis, A, Hagidimitriou, M.** (2014). Genetic structure of the Greek olive germplasm revealed by RAPD, ISSR and SSR markers, *Scientia Horticulturae*, Volume 175, Pages 33-43, ISSN 0304-4238
- Lipman, D. J., & Pearson, W. R.** (1985). Rapid and sensitive protein similarity searches. *Science*, 227(4693), 1435-1441.
- Lipman, D. J., Altschul, S. F., & Kececioglu, J. D.** (1989). A tool for multiple sequence alignment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(12), 4412-4415.
- Liu, W., Chen, L., & Chen, J.** (2007). An efficient algorithm for multiple sequence alignment based on ant colony optimisation and divide-and-conquer method. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 50(5), 617-626.
- Liu, Y., Schmidt, B., & Maskell, D. L.** (2010). MSAProbs: multiple sequence alignment based on pair hidden Markov models and partition function posterior probabilities. *Bioinformatics*, 26(16), 1958-1964.

- Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., ... & Law, M.** (2012). Comparison of next-generation sequencing systems. *BioMed research international*, 2012.
- Loh, P. R., Baym, M., & Berger, B.** (2012). Compressive genomics. *Nature biotechnology*, 30(7), 627-630.
- Lonsdale, D. M., Brears, T., Hodge, T. P., Melville, S. E., & Rottmann, W. H.** (1988). The plant mitochondrial genome: homologous recombination as a mechanism for generating heterogeneity. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 319(1193), 149-163.
- Low, Y., Gonzalez, J., Kyrola, A., Bickson, D., Guestrin, C., & Hellerstein, J. M.** (2012). Distributed graphlab: A framework for machine learning in the cloud. *arXiv preprint arXiv:1204.6078*.
- Lumaret, R., Ouazzani, N., Michaud, H., Vivier, G., Deguilloux, M. F., & Di Giusto, F.** (2004). Allozyme variation of oleaster populations (wild olive tree)(*Olea europaea* L.) in the Mediterranean Basin. *Heredity*, 92(4), 343-351.
- Lumbsch, H. T., & Leavitt, S. D.** (2011). Goodbye morphology? A paradigm shift in the delimitation of species in lichenized fungi. *Fungal Diversity*, 50(1), 59.
- Luo, J., Zhang, L., & Liang, C.** (2011). A multigroup parallel genetic algorithm for multiple sequence alignment. In *International Conference on Artificial Intelligence and Computational Intelligence* (pp. 308-316). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Lurin, C., Andrés, C., Aubourg, S., Bellaoui, M., Bitton, F., Bruyère, C., ... & Lechardy, A.** (2004). Genome-wide analysis of *Arabidopsis* pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *The Plant Cell*, 16(8), 2089-2103.
- Luscombe, N. M., Greenbaum, D., & Gerstein, M.** (2001). What is bioinformatics? A proposed definition and overview of the field. *Methods of information in medicine*, 40(04), 346-358.
- Lynch, M.** (2002). Intron evolution as a population-genetic process. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(9), 6118-6123.
- Maltezos, A., Platis, D., Vlachakis, D., Kossida, S., Marinou, M., & Labrou, N. E.** (2014). Design, synthesis and application of benzyl-sulfonate biomimetic affinity adsorbents for monoclonal antibody purification from transgenic corn. *Journal of Molecular Recognition*, 27(1), 19-31.
- Mardis, E. R.** (2008). The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends in genetics*, 24(3), 133-141.
- Marinou, M., Platis, D., Ataya, F. S., Chronopoulou, E., Vlachakis, D., & Labrou, N. E.** (2018). Structure-based design and application of a nucleotide coenzyme mimetic ligand: Application to the affinity purification of nucleotide dependent enzymes. *Journal of Chromatography A*, 1535, 88-100.
- Martinez, A., Alonso, M., Castro, A., Dorransoro, I., Gelpí, J. L., Luque, F. J., ... & Moreno, F. J.** (2005). SAR and 3D-QSAR studies on thiazolidinone derivatives: exploration of structural requirements for glycogen synthase kinase 3 inhibitors. *Journal of medicinal chemistry*, 48(23), 7103-7112.
- Martiny, J. B., Jones, S. E., Lennon, J. T., & Martiny, A. C.** (2015). Microbiomes in light of traits: a phylogenetic perspective. *Science*, 350(6261).
- Marx, V.** (2013). Biology: The big challenges of big data.
- Maxam, A. M., & Gilbert, W.** (1977). A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(2), 560-564.

- McDade, L. A., Daniel, T. F., Kiel, C. A., & Vollesen, K.** (2005). Phylogenetic relationships among Acantheae (Acanthaceae): major lineages present contrasting patterns of molecular evolution and morphological differentiation. *Systematic Botany*, 30(4), 834-862.
- Mehrotra, S., Goel, S., Sharma, S., Raina, S. N., & Rajpal, V. R.** (2013). Sequence analysis of KpnI repeat sequences to revisit the phylogeny of the Genus *Carthamus* L. *Applied biochemistry and biotechnology*, 169(4), 1109-1125.
- Mehrotra, S., & Goyal, V.** (2014). Repetitive sequences in plant nuclear DNA: types, distribution, evolution and function. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 12(4), 164-171.
- Melnikov, S., Ben-Shem, A., De Loubresse, N. G., Jenner, L., Yusupova, G., & Yusupov, M.** (2012). One core, two shells: bacterial and eukaryotic ribosomes. *Nature structural & molecular biology*, 19(6), 560.
- Michel, F., Jacquier, A., & Dujon, B.** (1982). Comparison of fungal mitochondrial introns reveals extensive homologies in RNA secondary structure. *Biochimie*, 64(10), 867-881.
- Miranda, M., Botti, D., Bonfigli, A., Ventura, T., & Arcadi, A.** (1984). Tyrosinase-like activity in normal human substantia nigra. *General pharmacology*, 15(6), 541-544.
- Mizuguchi, K., Deane, C. M., Blundell, T. L., & Overington, J. P.** (1998). HOMSTRAD: a database of protein structure alignments for homologous families. *Protein science*, 7(11), 2469-2471
- Moore, G.E.** (1965). Cramming more components onto integrated circuits. *Electronics*, 38
- Moore, M. J., Bell, C. D., Soltis, P. S., & Soltis, D. E.** (2007). Using plastid genome-scale data to resolve enigmatic relationships among basal angiosperms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(49), 19363-19368.
- MOE (The Molecular Operating Environment)**, software available from Chemical Computing Group Inc., 1010 Sherbrooke Street West, Suite 910, Montreal, Canada H3A 2R7. <http://www.chemcomp.com>
- Morgenstern, B.** (1999). DIALIGN 2: improvement of the segment-to-segment approach to multiple sequence alignment. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 15(3), 211-218.
- Morgenstern, B., Prohaska, S. J., Pöhler, D., & Stadler, P. F.** (2006). Multiple sequence alignment with user-defined anchor points. *Algorithms for Molecular Biology*, 1(1), 1-12.
- Moss, J., & Johnson, C. G.** (2003). An ant colony algorithm for multiple sequence alignment in bioinformatics. In *Artificial Neural Nets and Genetic Algorithms* (pp. 182-186). Springer, Vienna.
- Mount, D. W., & Mount, D. W.** (2001). *Bioinformatics: sequence and genome analysis* (Vol. 564). Cold Spring Harbor, NY: Cold spring harbor laboratory press.
- Moura, M., & Conde, C.** (2019). Phosphatases in mitosis: roles and regulation. *Biomolecules*, 9(2), 55.
- Mucheka, V. T., Lamb, J. M., Pfukenyi, D. M., & Mukaratirwa, S.** (2015). DNA sequence analyses reveal co-occurrence of novel haplotypes of *Fasciola gigantica* with *F. hepatica* in South Africa and Zimbabwe. *Veterinary parasitology*, 214(1-2), 144-151.
- Murata, M., Richardson, J. S., & Sussman, J. L.** (1985). Simultaneous comparison of three protein sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(10), 3073-3077.
- Murphy, J., Gatchell, D. W., Prasad, J. C., & Vajda, S.** (2003). Combination of scoring functions improves discrimination in protein-protein docking. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 53(4), 840-854.

- Mower, J. P., Touzet, P., Gummow, J. S., Delph, L. F., & Palmer, J. D.** (2007). Extensive variation in synonymous substitution rates in mitochondrial genes of seed plants. *BMC Evolutionary Biology*, 7(1), 135.
- Nadler, S. A.** (1995). Advantages and disadvantages of molecular phylogenetics: A case study of ascaridoid nematodes. *Journal of Nematology*, 27(4), 423.
- Nakamura, T., Schuster, G., Sugiura, M., & Sugita, M.** (2004). Chloroplast RNA-binding and pentatricopeptide repeat proteins.
- Nathan, R., Schurr, F. M., Spiegel, O., Steinitz, O., Trakhtenbrot, A., & Tsoar, A.** (2008). Mechanisms of long-distance seed dispersal. *Trends in ecology & evolution*, 23(11), 638-647.
- Narimani, Z., Beigy, H., & Abolhassani, H.** (2012). A new genetic algorithm for multiple sequence alignment. *International Journal of Computational Intelligence and Applications*, 11(04), 1250023.
- Naznin, F., Sarker, R., & Essam, D.** (2011). Vertical decomposition with genetic algorithm for multiple sequence alignment. *BMC bioinformatics*, 12(1), 353.
- Naznin, F., Sarker, R., & Essam, D.** (2012). Progressive alignment method using genetic algorithm for multiple sequence alignment. *IEEE Transactions on Evolutionary Computation*, 16(5), 615-631.
- Needleman, S. B., & Wunsch, C. D.** (1970). A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *Journal of molecular biology*, 48(3), 443-453.
- Nguyen, D. V., & Rocke, D. M.** (2002). Partial least squares proportional hazard regression for application to DNA microarray survival data. *Bioinformatics*, 18(12), 1625-1632.
- Niall, H. D.** (1973). [36] Automated edman degradation: The protein sequenator. In *Methods in enzymology* (Vol. 27, pp. 942-1010). Academic Press.
- Nicolaidis, N. C., Geer, E. B., Vlachakis, D., Roberts, M. L., Psarra, A. M. G., Moutsatsou, P., ... & Charmandari, E.** (2015). A novel mutation of the hGR gene causing Chrousos syndrome. *European journal of clinical investigation*, 45(8), 782-791.
- Nicolaidis, N. C., Skyrla, E., Vlachakis, D., Psarra, A. M. G., Moutsatsou, P., Sertedaki, A., ... & Charmandari, E.** (2016). Functional characterization of the hGR α T556I causing Chrousos syndrome. *European journal of clinical investigation*, 46(1), 42-49.
- Notredame, C., & Higgins, D. G.** (1996). SAGA: sequence alignment by genetic algorithm. *Nucleic acids research*, 24(8), 1515-1524.
- Notredame, C., Holm, L., & Higgins, D. G.** (1998). COFFEE: an objective function for multiple sequence alignments. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 14(5), 407-422.
- Notredame, C., Higgins, D. G., & Heringa, J.** (2000). T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *Journal of molecular biology*, 302(1), 205-217.
- Notredame, C.** (2002). Recent progress in multiple sequence alignment: a survey. *Pharmacogenomics*, 3(1), 131-144.
- Oldenburg, D. J., & Bendich, A. J.** (2016). The linear plastid chromosomes of maize: terminal sequences, structures, and implications for DNA replication. *Current genetics*, 62(2), 431-442.
- Olivares, C., & Solano, F.** (2009). New insights into the active site structure and catalytic mechanism of tyrosinase and its related proteins. *Pigment cell & melanoma research*, 22(6), 750-760.

- Olson, M. S., & McCauley, D. E.** (2000). Linkage disequilibrium and phylogenetic congruence between chloroplast and mitochondrial haplotypes in *Silene vulgaris*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 267(1454), 1801-1808.
- Orengo, C. A., Todd, A. E., & Thornton, J. M.** (1999). From protein structure to function. *Current opinion in structural biology*, 9(3), 374-382.
- Ortuño, F. M., Valenzuela, O., Rojas, F., Pomares, H., Florido, J. P., Urquiza, J. M., & Rojas, I.** (2013). Optimizing multiple sequence alignments using a genetic algorithm based on three objectives: structural information, non-gaps percentage and totally conserved columns. *Bioinformatics*, 29(17), 2112-2121.
- Palaiomylitou, M., Tartas, A., Vlachakis, D., Tzamarias, D., Vlassi, M.,** (2008). Investigating the structural stability of the Tup1-interaction domain of Ssn6: evidence for a conformational change on the complex. *Proteins Struct Funct Genet* 70, 72–82.
- Palmer, J. D., & Herbon, L. A.** (1988). Plant mitochondrial DNA evolved rapidly in structure, but slowly in sequence. *Journal of Molecular evolution*, 28(1-2), 87-97.
- Papageorgiou, L., Cuong, N. T., Vlachakis, D.,** (2016). Antibodies as stratagems against cancer. *Mol Biosyst* 12, 2047–2055
- Papageorgiou, L., Loukatou, S., Sofia, K., Maroulis, D., Vlachakis, D.** (2016) An updated evolutionary study of Flaviviridae NS3 helicase and NS5 RNA-dependent RNA polymerase reveals novel invariable motifs as potential pharmacological targets. *Mol Biosyst* 12, 2080–2093.
- Papageorgiou, L., Megalooikonomou, V., Vlachakis, D.** (2017). Genetic and structural study of DNA-directed RNA polymerase II of *Trypanosoma brucei*, towards the designing of novel antiparasitic agents. *PeerJ*.
- Papageorgiou, L., Eleni, P., Raftopoulou, S., Mantaïou, M., Megalooikonomou, V., & Vlachakis, D.** (2018). Genomic big data hitting the storage bottleneck. *EMBnet. journal*, 24.
- Park, I., Kim, W. J., Yang, S., Yeo, S. M., Li, H., & Moon, B. C.** (2017). The complete chloroplast genome sequence of *Aconitum coreanum* and *Aconitum carmichaelii* and comparative analysis with other *Aconitum* species. *PLoS one*, 12(9), e0184257.
- Patwardhan, A., Ray, S., & Roy, A.** (2014). Molecular markers in phylogenetic studies-a review. *Journal of Phylogenetics & Evolutionary Biology*, 2014.
- Pavlopoulou, A., Vlachakis, D., Balatsos, N., A.A., Kossida, S.** (2013). A comprehensive phylogenetic analysis of deadenylases. *Evol Bioinforma* 2013, 491–497
- Pe'er, I., Felder, C.E., Man, O., Silman, I., Sussman, J.L. and Beckmann, J.S.,** (2004). Proteomic signatures: amino acid and oligopeptide compositions differentiate among phyla. *Proteins*, 54, 20–40.
- Pei, J., Sadreyev, R., & Grishin, N. V.** (2003). PCMA: fast and accurate multiple sequence alignment based on profile consistency. *Bioinformatics*, 19(3), 427-428.
- Pearson, W. R., & Lipman, D. J.** (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(8), 2444-2448.
- Pearson, W. R.** (1990). Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. *Methods Enzymol.* 183:63-98.
- Pertsemlidis A, Fondon JW** (2001). Having a BLAST with bioinformatics (and avoiding BLASTphemy). *Genome Biol.* 2(10): REVIEWS2002.

- Plohl, M., Meštrović, N., & Mravinac, B.** (2014). Centromere identity from the DNA point of view. *Chromosoma*, 123(4), 313-325.
- Pitsiouni, M., Linos, A., Hagidimitriou, M. and Drogoudi, P.** (2012). Genetic diversity of greek wild and cultivated pomegranate (*punica granatum* l.) genotypes and cultivars using molecular markers . *Acta Hort.* 940, 193-200
- Pollard, D. A., Bergman, C. M., Stoye, J., Celniker, S. E., & Eisen, M. B.** (2004). Benchmarking tools for the alignment of functional noncoding DNA. *BMC bioinformatics*, 5(1), 6.
- Poretsky, R., Rodriguez-R, L. M., Luo, C., Tsementzi, D., & Konstantinidis, K. T.** (2014). Strengths and limitations of 16S rRNA gene amplicon sequencing in revealing temporal microbial community dynamics. *PloS one*, 9(4), e93827.
- Posada, D.** (2008). jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular biology and evolution*, 25(7), 1253-1256.
- Prikryl, J., Rojas, M., Schuster, G., & Barkan, A.** (2011). Mechanism of RNA stabilization and translational activation by a pentatricopeptide repeat protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(1), 415-420.
- Quandt, D., Müller, K., Stech, M., Frahm, J. P., Frey, W., Hilu, K. W., & Borsch, T.** (2004). Molecular evolution of the chloroplast trnL-F region in land plants. *Monogr Syst Bot Mo Bot Gard*, 98, 13-37.
- Raghava, G. P. S., Searle, S. M., Audley, P. C., Barber, J. D., & Barton, G. J.** (2003). OXBench: a benchmark for evaluation of protein multiple sequence alignment accuracy. *BMC bioinformatics*, 4(1), 47.
- Rannala, B., & Yang, Z.** (1996). Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. *Journal of molecular evolution*, 43(3), 304-311.
- Riaz, T., Wang, Y., & Li, K. B.** (2004). Multiple sequence alignment using tabu search. In *Proceedings of the second conference on Asia-Pacific bioinformatics-Volume 29* (pp. 223-232).
- Riaz, T., Yi, W., & Li, K. B.** (2005). A tabu search algorithm for post-processing multiple sequence alignment. *Journal of Bioinformatics and Computational Biology*, 3(01), 145-156.
- Rokas, A., & Holland, P. W.** (2000). Rare genomic changes as a tool for phylogenetics. *Trends in ecology & evolution*, 15(11), 454-459.
- Rolland, C., Gozalbes, R., Nicolai, E., Paugam, M. F., Coussy, L., Barbosa, F., ... & Revah, F.** (2005). G-protein-coupled receptor affinity prediction based on the use of a profiling dataset: QSAR design, synthesis, and experimental validation. *Journal of medicinal chemistry*, 48(21), 6563-6574.
- Rønning, S. B., Rudi, K., Berdal, K. G., & Holst-Jensen, A.** (2005). Differentiation of important and closely related cereal plant species (Poaceae) in food by hybridization to an oligonucleotide array. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(23), 8874-8880.
- Rovira, A. G., & Smith, A. G.** (2019). PPR proteins—orchestrators of organelle RNA metabolism. *Physiologia plantarum*, 166(1), 451-459.
- Russell, J.P.** (2009) iGenetics: Μια Μεντελική Προσέγγιση. 2ος Τόμος
- Saha, D., Prasad, A. M., & Srinivasan, R.** (2007). Pentatricopeptide repeat proteins and their emerging roles in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45(8), 521-534.

- Salis, C., Papadakis, I.E., Kintzios, S. and Hagidimitriou, M.** (2017). In vitro Propagation and Assessment of Genetic Relationships of Citrus Rootstocks Using ISSR Molecular Markers. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 45, 2 (Sep. 2017), 383–391.
- Saitou, N., & Nei, M.** (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4), 406-425.
- Samach, A., Klenz, J. E., Kohalmi, S. E., Risseuw, E., Haughn, G. W., & Crosby, W. L.** (1999). The UNUSUAL FLORAL ORGANS gene of *Arabidopsis thaliana* is an F-box protein required for normal patterning and growth in the floral meristem. *The Plant Journal*, 20(4), 433-445.
- Sánchez-Ferrer, Á., Rodríguez-López, J. N., García-Cánovas, F., & García-Carmona, F.** (1995). Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1247(1), 1-11.
- Sansom C** (2000). Database Searching with DNA and Protein Sequences: An Introduction. *Brief Bioinform*, pp.22-32.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences*, 74(12), 5463-5467.
- Savolainen, V., Cowan, R. S., Vogler, A. P., Roderick, G. K., & Lane, R.** (2005). Towards writing the encyclopaedia of life: an introduction to DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462), 1805-1811.
- Schnerch, J., Prasse, A., Vlachakis, D., Schuchardt, K. L., Pechkovsky, D. V., Goldmann, T., ... & Zissel, G.** (2016). Functional toll-like receptor 9 expression and CXCR3 ligand release in pulmonary sarcoidosis. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 55(5), 749-757.
- Schwartzman, A., Dougherty, R. F., Lee, J., Ghahremani, D., & Taylor, J. E.** (2009). Empirical null and false discovery rate analysis in neuroimaging. *Neuroimage*, 44(1), 71-82.
- Sellis, D., Drosou, V., Vlachakis, D., Voukkalis, N., Giannakouros, T., & Vlassi, M.** (2012). Phosphorylation of the arginine/serine repeats of lamin B receptor by SRPK1—Insights from molecular dynamics simulations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1820(1), 44-55.
- Senés-Guerrero, C., & Schüßler, A.** (2016). A conserved arbuscular mycorrhizal fungal core-species community colonizes potato roots in the Andes. *Fungal Diversity*, 77(1), 317-333.
- Sertedaki, A., Markou, A., Vlachakis, D., Kossida, S., Campanac, E., Hoffman, D. A., ... & Piaditis, G. P.** (2016). Functional characterization of two novel germline mutations of the KCNJ 5 gene in hypertensive patients without primary aldosteronism but with ACTH-dependent aldosterone hypersecretion. *Clinical endocrinology*, 85(6), 845-851.
- Shyu, C., & Foster, J. A.** (2003). Evolving consensus sequence for multiple sequence alignment with a genetic algorithm. In *Genetic and Evolutionary Computation Conference* (pp. 2313-2324). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Shyu, C., Sheneman, L., & Foster, J. A.** (2004). Multiple sequence alignment with evolutionary computation. *Genetic Programming and Evolvable Machines*, 5(2), 121-144.
- Sijacic, P., Wang, X., Skirpan, A. L., Wang, Y., Dowd, P. E., McCubbin, A. G., ... & Kao, T. H.** (2004). Identification of the pollen determinant of S-RNase-mediated self-incompatibility. *Nature*, 429(6989), 302-305.

- Silva, D. M., Pansonato-Alves, J. C., Utsunomia, R., Daniel, S. N., Hashimoto, D. T., Oliveira, C., ... & Foresti, F.** (2013). Chromosomal organization of repetitive DNA sequences in *Astyanax bockmanni* (Teleostei, Characiformes): dispersive location, association and co-localization in the genome. *Genetica*, *141*(7), 329-336.
- Singer, G. A., & Hickey, D. A.** (2000). Nucleotide bias causes a genomewide bias in the amino acid composition of proteins. *Molecular biology and evolution*, *17*(11), 1581-1588.
- Singh, R., Xu, J., & Berger, B.** (2008). Global alignment of multiple protein interaction networks with application to functional orthology detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(35), 12763-12768.
- Smith, T. F., & Waterman, M. S.** (1981). Identification of common molecular subsequences. *Journal of molecular biology*, *147*(1), 195-197.
- Smith, D. R., & Keeling, P. J.** (2015). Mitochondrial and plastid genome architecture: reoccurring themes, but significant differences at the extremes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(33), 10177-10184.
- Sokal, R.R., Michener, C.D.** (1958), A statistical method for evaluating systematic relationships, Univ. Kans. Sci. Bull. 28, 1409–1438.
- Songyang, Z., Lu, K. P., Kwon, Y. T., Tsai, L. H., Filhol, O., Cochet, C., ... & DeMaggio, A. J.** (1996). A structural basis for substrate specificities of protein Ser/Thr kinases: primary sequence preference of casein kinases I and II, NIMA, phosphorylase kinase, calmodulin-dependent kinase II, CDK5, and Erk1. *Molecular and cellular biology*, *16*(11), 6486-6493.
- Städler, N., Bühlmann, P., & Van De Geer, S.** (2010). ℓ_1 -penalization for mixture regression models. *Test*, *19*(2), 209-256.
- Stein, L. D.** (2010). The case for cloud computing in genome informatics. *Genome biology*, *11*(5), 207.
- Steinhauf, D., Rodriguez, A., Vlachakis, D., Virgo, G., Maksimov, V., Kristell, C., ... & Bjerling, P.** (2014). Silencing motifs in the Clr2 protein from fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *PLoS One*, *9*(1), e86948.
- Stewart, C. B.** (1993). The powers and pitfalls of parsimony. *Nature*, *361*(6413), 603-607.
- Storey, J. D.** (2003). The positive false discovery rate: a Bayesian interpretation and the q-value. *The Annals of Statistics*, *31*(6), 2013-2035.
- Stoye, J., Moulton, V., & Dress, A. W.** (1997). DCA: an efficient implementation of the divide-and-conquer approach to simultaneous multiple sequence alignment. *Bioinformatics*, *13*(6), 625-626.
- Stoye, J.** (1998). Multiple sequence alignment with the divide-and-conquer method. *Gene*, *211*(2), GC45-GC56.
- Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G., & Bouvet, J.** (1991). Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant molecular biology*, *17*(5), 1105-1109.
- Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Gielly, L., Miquel, C., Valentini, A., ... & Willerslev, E.** (2007). Power and limitations of the chloroplast trn L (UAA) intron for plant DNA barcoding. *Nucleic acids research*, *35*(3), e14-e14.
- Tawfik, D. S.** (2010). Messy biology and the origins of evolutionary innovations. *Nature chemical biology*, *6*(10), 692-696.

- Taylor, W. R.** (1987). Multiple sequence alignment by a pairwise algorithm. *Bioinformatics*, 3(2), 81-87.
- Taylor, W. R.** (1988). A flexible method to align large numbers of biological sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 28(1-2), 161-169.
- Tekaia, F., Yeramian, E. and Dujon, B.** (2002). Amino acid composition of genomes, lifestyles of organisms, and evolutionary trends: a global picture with correspondence analysis. *Gene*, 297, 51–60.
- Tekaia, F., & Yeramian, E.** (2006). Evolution of proteomes: fundamental signatures and global trends in amino acid compositions. *BMC genomics*, 7(1), 307.
- Theoharaki, C., Chronopoulou, E., Vlachakis, D., Ataya, F. S., Giannopoulos, P., Maurikou, S., ... & Labrou, N. E.** (2019). Delineation of the functional and structural properties of the glutathione transferase family from the plant pathogen *Erwinia carotovora*. *Functional & integrative genomics*, 19(1), 1-12.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J.** (1994). Improved sensitivity of profile searches through the use of sequence weights and gap excision. *Bioinformatics*, 10(1), 19-29.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J.** (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, 22(22), 4673-4680.
- Thompson, J. D., Plewniak, F., & Poch, O.** (1999). A comprehensive comparison of multiple sequence alignment programs. *Nucleic acids research*, 27(13), 2682-2690.
- Thompson, J. D., Plewniak, F., & Poch, O.** (1999). BALiBASE: a benchmark alignment database for the evaluation of multiple alignment programs. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 15(1), 87-88.
- Thompson, J. D., Koehl, P., Ripp, R., & Poch, O.** (2005). BALiBASE 3.0: latest developments of the multiple sequence alignment benchmark. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 61(1), 127-136.
- Thompson, J. D., Linard, B., Lecompte, O., & Poch, O.** (2011). A comprehensive benchmark study of multiple sequence alignment methods: current challenges and future perspectives. *PLoS one*, 6(3), e18093.
- Tibshirani, R.** (1996). Regression shrinkage and selection via the lasso. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, 58(1), 267-288.
- Tief, K., Hahne, M., Schmidt, A., & Beermann, F.** (1996). Tyrosinase, the key enzyme in melanin synthesis, is expressed in murine brain. *European journal of biochemistry*, 241(1), 12-16.
- Tokuriki, N., & Tawfik, D. S.** (2009). Stability effects of mutations and protein evolvability. *Current opinion in structural biology*, 19(5), 596-604.
- Tropsha, A., & Wang, S. X.** (2007). QSAR modeling of GPCR ligands: methodologies and examples of applications. In *GPCRs: From orphanization to lead structure identification* (pp. 49-74). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Tsiliki, G., Vlachakis, D., & Kossida, S.** (2014). On integrating multi-experiment microarray data. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 372(2016), 20130136.
- Unver, T., Wu, Z., Sterck, L., Turktas, M., Lohaus, R., Li, Z., ... & Llorens, C.** (2017). Genome of wild olive and the evolution of oil biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(44), E9413-E9422.
- Van de Paer, C., Bouchez, O., & Besnard, G.** (2018). Prospects on the evolutionary mitogenomics of plants: a case study on the olive family (Oleaceae). *Molecular ecology resources*, 18(3), 407-423.

- Van Dijk, E. L., Auger, H., Jaszczyszyn, Y., & Thermes, C.** (2014). Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends in genetics*, 30(9), 418-426.
- Van Gunsteren, W. F., Luque, F. J., Timms, D., & Torda, A. E.** (1994). Molecular mechanics in biology: from structure to function, taking account of solvation. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 23(1), 847-863.
- van Gunsteren, W. F., Bakowies, D., Baron, R., Chandrasekhar, I., Christen, M., Daura, X., ... & Kastenholtz, M. A.** (2006). Biomolecular modeling: goals, problems, perspectives. *Angewandte Chemie International Edition*, 45(25), 4064-4092.
- Van Walle, I., Lasters, I., & Wyns, L.** (2005). SABmark—a benchmark for sequence alignment that covers the entire known fold space. *Bioinformatics*, 21(7), 1267-1268.
- Vangelatos, I., Vlachakis, D., Sophianopoulou, V., & Diallinas, G.** (2009). Modelling and mutational evidence identify the substrate binding site and functional elements in APC amino acid transporters. *Molecular membrane biology*, 26(5-7), 356-370.
- Vilar, S., Santana, L., & Uriarte, E.** (2006). Probabilistic neural network model for the in silico evaluation of anti-HIV activity and mechanism of action. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(3), 1118-1124.
- Vingron, M., & von Haeseler, A.** (1997). Towards integration of multiple alignment and phylogenetic tree construction. *Journal of Computational Biology*, 4(1), 23-34.
- Vlachakis, D., Pavlopoulou, A., Tsiliki, G., Komiotis, D., Stathopoulos, C., Balatsos, N. A., & Kossida, S.** (2012). An integrated in silico approach to design specific inhibitors targeting human poly (a)-specific ribonuclease. *PloS one*, 7(12), e51113.
- Vlachakis, D., Armaos, A., Kasampalidis, I., Filntisi, A., Kossida, S.** (2014). ASSP; The antibody secondary structure profile search tool. In: *CEUR workshop proceedings*, pp 69–77
- Vlachakis, D., Bencurova, E., Papangelopoulos, N., Kossida, S.** (2014). Current state-of-the-art molecular dynamics methods and applications. 94.
- Vlachakis, D., Pavlopoulou, A., Roubelakis, M.G., Feidakis, C., Anagnou, N.P., Kossida, S.** (2014) 3D molecular modeling and evolutionary study of the trypanosoma brucei DNA topoisomerase IB, as a new emerging pharmacological target. *Genomics*, 103,107–113.
- Walker, J. F., Zanis, M. J., & Emery, N. C.** (2014). Comparative analysis of complete chloroplast genome sequence and inversion variation in *Lasthenia burkei* (Madieae, Asteraceae). *American Journal of Botany*, 101(4), 722-729.
- Wan, J., Zhang, L., Yang, G., & Zhan, C. G.** (2004). Quantitative structure– activity relationship for cyclic imide derivatives of protoporphyrinogen oxidase inhibitors: a study of quantum chemical descriptors from density functional theory. *Journal of chemical information and computer sciences*, 44(6), 2099-2105.
- Wang, L., & Jiang, T.** (1994). On the complexity of multiple sequence alignment. *Journal of computational biology*, 1(4), 337-348.
- Wang, Y., & Li, K. B.** (2004). An adaptive and iterative algorithm for refining multiple sequence alignment. *Computational Biology and Chemistry*, 28(2), 141-148.
- Ward, J., Peakall, R., Gilmore, S. R., & Robertson, J.** (2005). A molecular identification system for grasses: a novel technology for forensic botany. *Forensic Science International*, 152(2-3), 121-131.

- Watson, J., Crick, F.** (1953) Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* **171**, 737–738.
- Wicke, S., Schneeweiss, G. M., Depamphilis, C. W., Müller, K. F., & Quandt, D.** (2011). The evolution of the plastid chromosome in land plants: gene content, gene order, gene function. *Plant molecular biology*, *76*(3), 273-297.
- Worthey, E. A., Mayer, A. N., Syverson, G. D., Helbling, D., Bonacci, B. B., Decker, B., ... & Basehore, M. J.** (2011). Making a definitive diagnosis: successful clinical application of whole exome sequencing in a child with intractable inflammatory bowel disease. *Genetics in Medicine*, *13*(3), 255-262.
- Wu, H., Zhang, Z., Hu, S., & Yu, J.** (2012). On the molecular mechanism of GC content variation among eubacterial genomes. *Biology direct*, *7*(1), 2.
- Xiong, J.** (2006). *Essential bioinformatics*. Cambridge University Press.
- Xu, X., & Lei, X.** (2010, October). Multiple sequence alignment based on abc_sa. In *International Conference on Artificial Intelligence and Computational Intelligence* (pp. 98-105). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Yamada, S., Gotoh, O., & Yamana, H.** (2006). Improvement in accuracy of multiple sequence alignment using novel group-to-group sequence alignment algorithm with piecewise linear gap cost. *BMC bioinformatics*, *7*(1), 524.
- Yamazaki, H., Tasaka, M., & Shikanai, T.** (2004). PPR motifs of the nucleus-encoded factor, PGR3, function in the selective and distinct steps of chloroplast gene expression in Arabidopsis. *The Plant Journal*, *38*(1), 152-163.
- Yarza, P., Yilmaz, P., Pruesse, E., Glöckner, F. O., Ludwig, W., Schleifer, K. H., ... & Rosselló-Móra, R.** (2014). Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology*, *12*(9), 635-645.
- Yu, Y. W., Daniels, N. M., Danko, D. C., & Berger, B.** (2015). Entropy-scaling search of massive biological data. *Cell systems*, *1*(2), 130-140.
- Zhang, C., & Wong, A. K.** (1997). A genetic algorithm for multiple molecular sequence alignment. *Bioinformatics*, *13*(6), 565-581.
- Zhang, N., Zeng, L., Shan, H., & Ma, H.** (2012). Highly conserved low-copy nuclear genes as effective markers for phylogenetic analyses in angiosperms. *New Phytologist*, *195*(4), 923-937.
- Zhou, A., Qu, B. Y., Li, H., Zhao, S. Z., Suganthan, P. N., & Zhang, Q.** (2011). Multiobjective evolutionary algorithms: A survey of the state of the art. *Swarm and Evolutionary Computation*, *1*(1), 32-49.
- Zhu, A., Guo, W., Jain, K., & Mower, J. P.** (2014). Unprecedented heterogeneity in the synonymous substitution rate within a plant genome. *Molecular biology and evolution*, *31*(5), 1228-1236.
- Zou, H., & Li, R.** (2008). One-step sparse estimates in nonconcave penalized likelihood models. *Annals of statistics*, *36*(4), 1509.
- Τριανταφυλλίδης Κ.** (2001) Κλασική και Μοριακή Γενετική. Εκδοτικός οίκος Αδελφών Κυριακίδη Α.Ε.