

Professor **Mohamed BENLEMLIH**  
Dr. **Jamal GHANAM**

# POLYFENOLEN IN OLIJFOLIE, ONSCCHATBAAR VOOR UW GEZONDHEID!

Inleiding en bijlages door  
Professor **Henri JOYEUX**

POLYFENOLEN WERKEN ALS ANTIOXIDANT,  
ONTSTEKINGSREMMER,  
ANTI-VEROUDERINGSMIDDEL EN BESCHERMD  
TEGEN HART- EN VAATZIEKTEN

Vertaling van de tweede  
uitgebreide franse editie

**Medicatrix**

Professor BENLEMLIH Mohamed  
Dr. GHANAM Jamal

Inleiding en bijlages door Professor Henri JOYEUX


# POLYFENOLEN IN OLIJFOLIE, ONSCHATBAAR VOOR UW GEZONDHEID!

---

Polyfenolen werken als antioxidant,  
ontstekingsremmer, anti-verouderingsmiddel  
en beschermd tegen hart- en vaatziekten

**MedicatriX**

3<sup>de</sup> aangevulde editie

	<p>We herinneren onze lezers aan de wet omtrent het eigendomsrecht van 1 juli 1992 dat het ongeautoriseerde fotokopiëren met collectief gebruik uitdrukkelijk verbiedt. Deze praktijk wordt algemeen doorgevoerd bij de instellingen voor hoger onderwijs, met gevolg een sterke daling van de aankoop van boeken en tijdschriften, waardoor de mogelijkheid voor auteurs om nieuwe oeuvres te publiceren kleiner wordt.</p> <p>Daarom vragen we de lezer om in acht te nemen dat elke vorm van reproductie, deels of in zijn geheel, van de huidige publicatie verboden is zonder de toestemming van de rechthebbenden, in Frankrijk, door de exploitatie-maatschappij van het recht op kopieën (CFC, 20 rue des Grands-Augustins, 75006 Parijs) en in België door Repobel (87 Koninklijke-Prinsstraat, B-1050 Brussel).</p>
---	---



Elke vorm van reproductie, aanpassingen, parodieën of representaties (zelfs gedeeltelijke vormen hiervan) van het huidige werk, in de vorm van een gedrukte tekst, een microfilm, fotografieën, fotokopieën of in elke andere chemische, technische, elektronische of mechanische vorm mag niet gerealiseerd worden zonder de schriftelijke toestemming van de uitgever.

Alle rechten voorbehouden, ook aan de landen die deel uitmaken van de voormalige Sovjetunie en China.

Gedrukt in Frankrijk (Nouvelle Imprimerie Laballery)

© marco pietteur, uitgever  
 ISBN 978-2-87211-159-6  
 Wettelijk depot 2016/5053/X1

39, avenue du Centenaire — B-4053 Embourg (België)  
 Tél.: + 32 (0) 4 365 27 29 – Fax: + 32 (0) 4 341 29 21  
 E-mailadres : infos@mpeditions.be



# Sommaire

Voorwoord	7
Inleiding van Pr Henri Joyeux	9
Invoering van Pr Henri Joyeux	13
<b>DEEL 1</b>	41
<b>Algemeenheden over de olijfboom en olijfolie</b>	41
<b>Hoofdstuk 1 - De olijf, een vrucht vol gezonde voedingsstoffen</b>	43
1. De oorsprong	43
2. De geschiedenis	43
3. Eigenschappen van de olijfboom en zijn vrucht, de olijf	44
3.1 Rijpingsstadia	46
<b>Hoofdstuk 2 - De olijf van de vrucht tot de olie</b>	51
1. Het principe van extractie	51
1.1 Het reinigen van de vrucht	52
1.2 Het fijnmaken	52
1.3 Het kneden	52
1.4 De scheiding van de vloeistof en de vaste stof	54
<b>Hoofdstuk 3 - De bewaaromstandigheden van de olijfolie</b>	59
<b>DEEL 2</b>	61
<b>De chemische samenstellingen en eigenschappen van olijfolie</b>	61
<b>Hoofdstuk 1 - Olijfolie, een bron van antioxidanten en goede vetzuren</b>	63
1. Vetzuur, triacylglycerol en gedeeltelijke glyceriden	67
2. De polyfenolen in olijfolie, machtige antioxidanten	68
2.1 De fenolische monomeren	69
3. Het tocoferolgehalte	74
4. Koolwaterstoffen	74
5. Pigmenten	75

Hoofdstuk 2 - De analyse en kwantificering van polyfenolen in olijfolie	77
<b>DEEL 3</b>	79
<b>De effecten van olijfolie op de gezondheid</b>	79
Hoofdstuk 1 - De voordelen van olijfolie zijn voornamelijk te danken aan zijn polyfenolen	81
Hoofdstuk 2 - De polyfenolen in olijfolie zijn erg biologisch beschikbaar en bioactief	85
1. De absorptie van fenolische verbindingen	85
2. Het metabolisme	89
3. Uitscheiding	91
Hoofdstuk 3 - De kracht van antioxidanten in polyfenolen van olijfolie	93
1. Enzymatische antioxidantensystemen	96
2. Niet-enzymatische antioxidantensystemen	96
3. De polyfenolen in olijfolie, verbindingen van krachtige antioxidanten	98
Hoofdstuk 4 - De polyfenolen in olijfolie en hun effect tegen ouderdom	103
1. Het positieve effect van hydroxytyrosol op de mitochondriale biogenese	104
2. Het anti-ouderdomseffect van polyfenolen in olijfolie sur les cellules cardiaques	106
Hoofdstuk 5 - Hydroxytyrosol en oleuropein tegenover AIDS	107
Hoofdstuk 6 - Hydroxytyrosol en polyfenolen in olijfolie, kanker bestrijdende krachten	109
1. Algemeenheden	109
2. Hydroxytyrosol/Oleuropein, polyfenolen met een hoog kanker bestrijdend effect	110

3. Het doeltreffende effect van Hydroxytyrosol/ Oleuropein bij de behandeling en de preventie van borstkanker	111
<b>Hoofdstuk 7 - <i>In vitro</i> studie</b>	115
1. Samenvatting	116
2. Introductie	117
3. Resultaten	118
4. Discussie	126
<b>Hoofdstuk 8 - Het beschermende effect van de polyfenolen in olijfolie op het hart- en vaatsysteem</b>	133
1. Algemeenheden	133
2. Fenolische verbindingen en de preventie van arteriosclerose	136
3. Het effect van de polyfenolen in olijfolie tegen trombocytenaggregatie	140
4. Het ontstekingsremmende effect van polyfenolen in olijfolie	142
5. Hydroxytyrosol in olijfolie verhoogt de stikstofmonoxide, vaatverwijdend peptide gas	144
<b>Hoofdstuk 9 - De bescherming van polyfenolen tegen de schade van proteïnen</b>	147
<b>Hoofdstuk 10 - Het antimicrobenefect van polyfenolen in olijfolie</b>	149
<b>Hoofdstuk 11 - De preventie van polyfenolen tegen diabetes</b>	151
<b>Hoofdstuk 12 - De preventie van polyfenolen tegen de ziekte van Alzheimer</b>	153
<b>Hoofdstuk 13 - Getuigenissen</b>	155
1. Ik voel me over het algemeen beter	155
2. Een normaal cholesterolgehalte	159
3. Gewrichten	160
4. Regulering van de tensie	160
5. Huid, haar en gezondheid	160

<b>Hoofdstuk 14 - Klinische studie</b>	
<b>«Olivie Riche 4000»</b>	163
1. Samenvatting	163
2. Inleiding	165
3. Materiaal en methodes	168
4. Resultaten	174
5. Discussie en conclusie	181
<b>Literatuurlijst en wetenschappelijke werken</b>	193

# VOORWOORD

## Olijfolie boordevol polyfenolen

---

De natuurlijke polyfenolen in olijfolie zijn moleculen die heel biologisch beschikbaar en erg bioactief zijn, wat hun vele voordelen verschaft voor de gezondheid. De verbindingen van de polyfenolen maken deel van de familie van de antioxidanten. Door deze eigenschap kunnen de polyfenolen het gevecht aangaan met funeste vrije radicalen zoals agressieve cellen, verandering in het DNA en de vorming van giftige stoffen door oxidatie van lipiden.

Recente studies hebben aangetoond dat Hydroxytyrosol uit olijfolie de mitochondriale functie verbeterd, deze beschermd tegen het verouderen van het lichaam. De studies leiden ons ertoe te bevestigen dat de verbindingen nuttig zijn voor het voorkomen van ziektes die gepaard gaan met ouderdom.

De polyfenolen in olijfolie dragen ook bij aan de bescherming tegen en de behandeling van kanker. In dit kader is bewezen dat de polyfenolen Hydroxytyrosol en Oleuropein een kanker bestrijdend effect hebben tegen darmkanker, bloedkanker, borstkanker,... Deze bekende verbindingen reageren op kanker door middel van meerdere antiproliferatieve en proapoptotische mechanismen.

De voordelen van de fenolische verbindingen van olijfolie op het hart – en vaatsysteem zijn gedefinieerd door meerdere auteurs. De polyfenolen in olijfolie bevorderen de vermindering van celadhesiemoleculen, verhogen de beschikbaarheid van stikstofmonoxide, onderdrukken de trombocytenuitstrooming, verdedigen de LDL-cholesterol tegen oxidatie om aderverkalking te vertragen en ontstekingsreacties te verminderen.



Momenteel zijn er meer voordelen van de polyfenolen in olijfolie bekend, waaronder het antibacteriële effect en zijn bijdrage bij de behandeling en de preventie van diabetes en de ziekte van Alzheimer.

*«De olijfboom, een rustieke  
en eeuwenoude boom, is het symbool  
van wijsheid, kracht, vrede en gezondheid».*

Prof. Henri Joyeux

# INLEIDING VAN P<sup>R</sup> HENRI JOYEUX

Bij deze het boek dat ontbrak om op een wetenschappelijke en begrijpelijke manier het belang van olijfolie aan te tonen en niet eender welk belang, maar het belang voor onze GEZONDHEID.

Er moet inzicht komen over de vervaardiging en het uitkiezen van de beste olijfolie. De olijfolie moet geregeld gebruikt worden nu men de troeven ervan kent voor ons lichaam.

Het tegengaan van de beangstigende ziekte van Alzheimer, voorbarige kenmerken van ouderdom bestrijden in onze weefsels en organen, kankers voorkomen en hartaandoeningen, overmaat van cholesterol binnen de perken houden, cerebrovasculaire accidenten aanvechten,... kortom een goede gezondheid behouden is onze grootste wens.

De olijfolie komt uit een hard en rotsachtig deel van het Atlasgebergte in Marokko en is echt onschatbaar voor de gezondheid. In vergelijking met andere oliën van de mediterrane omtrek en daarboven heeft olijfolie een hoge concentratie van relatief onbekende polyfenolen: Tyrosol en Hydroxytyrosol. De polyfenolen komen in een hogere mate voor dan ooit eerder gemeten in levensmiddelen. 30 keer meer (240 mg/kg) dan in andere populaire oliën (gemiddeld 8 mg/kg). Zijn polyfenolengehalte is het hoogst als de olijf rijp is. Als de olijf zijn groene, rode of paarsrode kleur krijgt onder de Atlaszon.

Waarom is deze extra Virgin olijfolie "OLIVIE Plus" zo waardevol? Omdat de moeilijke ecologische situatie van de olijfboom hem de kracht geeft om zichzelf te beschermen en dus ons ook, door zijn antioxidanten, veroude-

ringsbestrijders, anti-arteriële en ontstekingsremmende stoffen.

Daar komt bovenop dat er een goed gehalte oliezuur aanwezig is, wat een uitstekende vervoerder is van calcium in ons lichaam, zoals ook in noten, peterselie en alle seizoensfruit- en groenten.

Ook vitamine C mag men niet vergeten, deze staat in voor de vruchtbaarheid, voor de jeugdigheid die een belangrijke rol speelt bij het "smeren van de neuronen" en de spermatozoïden en eicellen verliefd laat worden op elkaar.

Dit boek heeft een grote wetenschappelijke waarde. Ik wil mijn collega's aan de Universiteit van Fès hartelijk feliciteren, die met hun ervaring en vele wetenschappelijke proeven de beste literatuur van de wereld verrijken.

«Olijfolie heeft een kanker bestrijdend effect, in het bijzonder bij vrouwelijke borstkankerpatiënten<sup>1</sup> die de recidieven van de kanker willen vermijden en zeer waarschijnlijk (hoewel dit nog niet wetenschappelijk is vastgesteld) bij mannelijke prostaat­kankerpatiënten of zij die deze kanker willen vermijden. Een *in vitro* studie naar de stamcellijnen van borstkanker heeft in januari van het jaar 2005 aangetoond dat het oliezuur, het grootste enkelvoudig onverzadigd vetzuur van olijfolie, de overexpressie van een kankergen normaliseert. Het gen heet Her-2/neu en ontwikkelt erge vormen van kanker (het geval bij 1 op 5 borstkankerpatiënten). Onderzoekers in Chicago (*Javier Menendez & collega's, Annals of Oncology, januari 2005*) hebben een moleculenmechanisme ontdekt die

---

1 *Comment enrayer l'Épidémie des cancers du sein et des récives* - P<sup>r</sup> Henri Joyeux et D<sup>r</sup> Bérengère Arnal - Ed. FX de Guibert, 2010.

de beschermende effecten in olijfolie tegen borstkanker beschrijven bij de vrouwelijke consument. Het oliezuur stimuleert vooral de activiteit van Herceptin, de beste keuze in de strijd tegen borstkanker want het stelt het kankergen Her-2/neu als doelwit. Het oliezuur vermindert het kankergen met 46 % en de Herceptin met 48 %. Bij de combinatie van het oliezuur en de Herceptin kunnen we een synergie met een vermindering van 70 % waarnemen. De Herceptin in de oliezuren en de polyfenolen in de olijf zijn dus effectieve strijders tegen kanker».

Deze fundamentele wetenschappelijke gegevens bevestigen de resultaten van de epidemiologische studies die hebben aangetoond dat de mediterrane eetgewoontes belangrijke effecten hebben tegen kanker, hart- en vaatziekten en zelfs enkele verouderingskenmerken voorkomen.

### **Prof. Henri JOYEUX- Oncoloog**

Internationaal deskundige van de preventie  
van ziekten door de voeding van de beschaving  
Medische Faculteit te Montpellier

●●● POLYFENOLEN IN OLIJFOLIE, ONSCHATBAAR VOOR UW GEZONDHEID!

# INVOERING VAN P<sup>R</sup> HENRI JOYEUX

## 1. De krachtigste olie voor uw gezondheid

---

Beste vrienden van de gezondheid,

Toen ik klein was ging ik soms op dinsdag met mijn broers en zussen met mijn vader mee, hij is afkomstig van de Cevennen, dicht bij Uzès dans le Gard in Frankrijk, om olijfolie te bemachtigen die van de familie was. De olie had een mooie groene kleur en wanneer hij in de salade of over de asperges werd besprenkeld konden we de rijke smaak proeven tot de laatste vloeibare gouden druppel. De gezonde voordelen van olijfolie waren toen echter nog niet bekend.

**Ik zal mij beperken tot de waardevolle polyfenolen**, ontdekt door de vooruitgang in analysetechnieken bij de dosering van verschillende onderdelen van de olijfolie. Door middel van deze techniek kan de wetenschapper de onderdelen herkennen en de beste eigenschappen selecteren in functie van het extractieproces, de teelt en hun geografische ligging. We leven immers niet meer in de Middeleeuwen!

Olijfolie is in het algemeen de belangrijkste bron van de dagelijkse vetinname uit de Mediterrane voeding<sup>1</sup>, samen met geiten en/of schapenkaas. Hieronder volgen de beelden bestemd voor specialisten zowel als iedereen die meer wil weten wat er gezond en nuttig is aan olijfolie.

---

1 Ik vermijd hier graag het woord "dieet", dat te streng is voor deze context.

Ik ben zelf olijfgaarden gaan bezoeken in een rotsachtige en harde zone van het Atlasgebergte van Marokko.

De olijfboom moet lijden om het beste van zichzelf te kunnen geven. In de extreme hitte en droogte (52°C), belet de steenharde zon de planten het groeien. Deze situatie is de wrede maar perfecte omstandigheid voor de olijfboom. Bij het zakken van de zon, na een vurige dag te weerstaan is de olijf op z'n best en krijgt hij een groene of paarsrode kleur. Op dat moment van de avond zit hij vol polyfenolen en ook belangrijke antioxidanten voor ons lichaam.

In deze toestand wordt de olijfolie "*Olivie plus 30x*" geproduceerd, een van de beste olijfolies voor de gezondheid. Gezien zijn kwaliteiten (en zijn prijs) zie ik de olie eerder als een elixir. Hij onderscheid zich van olijfolie uit de supermarkt waarmee we ons eten volop bespreken. Dat komt omdat hij in zeer moeilijke omstandigheden wordt geproduceerd waardoor de opbrengst ook zwak is maar de kwaliteit uitzonderlijk. Dit laatste verklaard de prijs – *Olivie plus 30x* is helaas niet voor elke portemonnee weggelegd.

Ik bewonder het werk van de producent. Hij heeft overigens harde capsules gecreëerd in geconcentreerde vorm: *Olivie Forte* en *Olivie Riche*. Ik citeer graag de drie producten in deze invoering, ze zijn het onderwerp geweest van al zoveel studies. Maar ik wil ook benadrukken dat ik geen enkele commissie krijg en ik ook geen contract heb met de producent. Jullie laten ontdekken wat het beste is voor de gezondheid is mijn prioriteit. En volgens mij is "*Olivie plus 30x*" de meest gezonde olijfolie.

Het gaat om een olijfolie met een rijke smaak, met een hoog gehalte aan polyfenolen waarvan het gehalte is ver-

geleken met andere oliën van alle uithoeken van het Mediterrane<sup>2</sup> gebied zoals Italië, Spanje, Frankrijk en Tunesië.

### Wat zijn de beste olijfolies?

Ongeacht zijn herkomst is de olijfolie de koningin van de plantaardige oliën. We gebruiken de olie nog niet genoeg. De Grieken doordrenken tot op de dag van vandaag hun eten met olijfolie. Deze goede gewoonte wordt aangemoedigd door studies die het Kretenzische dieet hoog in vaandel houden.

We zouden alle industriële mengelingen moeten laten varen. De manier waarop ze geproduceerd zijn brengt geen voordelen voor de gezondheid met zich mee, zoals wel het geval is bij traditionele oliën.

De olies moeten niet geraffineerd noch opgewarmd en nog minder gekookt worden. De olijfolie is erg bestendig tegen de hitte en heeft zijn kookpunt pas na 210°C. Dit sluit het frituren uit alsook het afbakken in de oven.

### De algemene samenstelling van de beste plantaardige oliën en hun blaadjes

Olijfolie bevat 56 tot 84 % **oliezuur** en 3 tot 21 % **linolzuur**, een uiterst belangrijk omega-6 vetzuur. De verhouding van het linolzuur/oliezuur vermindert naarmate de olijf rijper wordt.

### Optimaal voor de gezondheid is het betrekken van de omega-6 zuren in olijfolie met omega-3's.

Omega-3 vindt men terug in **vis** of **vlees met het bio-label (bleu blanc cœur)**, als de dieren perfect gevoed zijn geweest en lijnzaad hebben gekregen met omega-3.

---

2 Ik vermijd hier graag het woord "dieet", dat te streng is voor deze context.



**De kleinere verbindingen in olijfolie onderscheiden zich van elkaar** door hun verleende smaak, kleur, hun stabiliteit en bij het voorkomen van hun bederf.

Olijfolie bezit **squaleen** en **bètacaroteen** een voorloper van Vitamine A. Deze twee stoffen geven de olijf zijn groene en gele tinten.

De olijf is ook rijk aan **vitamine E**. Vitamine E geeft de olie bladgroene pigmenten. *Olivie Plus 30x* bezit 5 keer zoveel vitamine E dan een standaardolie, ongeveer 120 mg/kg. Het alfa-tocoferol, de vitamine E in de olijfolie, is een antioxidant dat tegen te hoog cholesterol beschermt (LDL). Kortom de olijfolie is boordevol **polyfenolen**.

### **Wat zijn polyfenolen en waar vind ik ze ?**

Polyfenolen worden ook wel **biofenolen** genoemd. Zij zijn de voornaamste oorzaak voor de vastheid van de olijfolie. Ze maken deel uit van fenolische verbindingen, hieronder de verbindingen die we onderscheiden :

- Polymeren (tannine en anthocyanen die lijken op de tannine en anthocyanen aanwezig in rode wijn);
- Fenolische monomeren boordevol *Oleuropein* (de voornaamste fenolische verbinding van olijfblaadjes);
- De fenolische alcoholen *Hydroxytyrosol* en Tyrosol. Hrnčirik et Fritsche (2004)<sup>3</sup> onderzochten 23 staaltjes extra Virgin olijfolie uit verschillende landen (Italië, Spanje, Griekenland en Tunesië). De resultaten toonden een grote variatie van geconcentreerde polyfenolen in de olies in totaal.

---

3 Comparability and Reliability of Different Techniques for the Determination of Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil. Hrnčirik, K., & Fritsche, S.(2004). European Journal of Lipid Science and Technology, 106, 540-549.

De samenstelling en de concentratie van de fenolische verbindingen in olijfolie worden sterk beïnvloed door meerdere agronomische en technologische factoren, zoals: de cultivar, de geografische ligging en het klimaat, het seizoen van de oogst en de rijping van de olijf, het productieproces en de irrigatie.

Het is dus moeilijk om een gedetailleerd verslag van de ingrediënten in olijfolie op het label te verwachten. Het is wel goed om te weten welke schatten de olie herbergt.

- **Oleuropein** (de voornaamste fenolische verbinding in olijfblaadjes) en alle derivaten ervan waren de meest voorkomende fenolische verbindingen in alle olijfolies.

- **Tyrosol** en **Hydroxytyrosol** komen in vrije vorm voor of verbonden met *elenolisch zuur*, *oleocanthal* en *oleopentandial* vormend, ook wel *oleoceine* genoemd.

Laatstgenoemde product is Hydroxytyrosol verbonden met elenolisch zuur, het is even krachtig als oleocanthal.

Zoals eerder gezegd ben ik de olijfgaarden gaan bezoeken in het zuiden van Marokko. Daar zijn de olijfbomen geplant in een rotsachtige grond, zonder vervuiling of industriële activiteiten en waar er bijna geen regen valt. Ze ondergaan dus hittestress van een temperatuur boven de 50°C, wat de hoge concentraties aan polyfenolen verklaart in de olie.

De wortels hebben geen ruimte om te groeien door de gigantische stenen (kalksteen en silex) in de grond. De olijfboom stelt een overlevingsmechanisme in werking, waar wij uiteindelijk een graantje van kunnen meepikken voor onze gezondheid.

De olijfbom gaat enorme hoeveelheden antioxidanten aanmaken om zichzelf te redden. De boom blijft in een perfect natuurlijke staat in de woestenij.

## De resultaten van internationale analyse van geconcentreerde olie

De analyses zijn uitgevoerd in gekwalificeerde internationale laboratoria, waarvan de data in de tabel onderaan staat.

De gehaltes *Hydroxytyrosol*, *Tyrosol* en *Oleopentandial* zijn met elkaar vergeleken door middel van 22 staaltjes van traditionele olie uit Italië, Spanje, Griekenland en Tunesië. De resultaten tonen aan dat *Olivie plus 30x* 30 keer meer polyfenolen bevat (*Hydroxytyrosol*, *Oleopentandial*) of een 30 keer hogere concentratie dan in welke ander olie dan ook ter wereld (1 360 mg/kg).

**We kunnen dus spreken van een echt voedings-supplement om specifieke gezondheidssituaties te verbeteren.**

Verbinding	Olivie plus 30x	Standaard-olie
Totaal aantal polyfenolen	2840	236
Hydroxytyrosol	233	13
Oleopentandial (derivaat van Oleuropein, verbonden met Hydroxytyrosol)	1360	51
Tyrosol	78	13

**Tabel:** de concentratie van de voornaamste fenolische verbindingen in *Olivie Plus 30x* en in een standaardolie in mg/kg.

*Olivie Force* en *Olivie Riche* is geconcentreerde olie in de vorm van capsules, gemaakt door middel van fysische technieken en zonder chemische toevoegingen of conserveringsmiddelen. De dosis polyfenolen is dus 2000 keer sterker dan een standaardolie. *Olivie Force* en *Olivie Riche* bevat ook vitamines (A, B1, PP, C, D, E en K) en mineralen.

- **Oleuropein en zijn dyaldehyde** derivaten maken deel uit van de familie van de flavonoïden. Oleuropein wordt vooral uit het blad van de olijfbom gehaald.

- **Hydroxytyrosol** is aanwezig in standaardolijfolie met een gehalte van 7 mg/kg; 1000 mg per liter in de marges (dat 50 % uit water bestaat van de platgedrukte olijf) en in de olijfboombladeren met een gehalte van 219 mg/kg. *Olivie Plus 30x* bevat 233 mg/kg aan Hydroxytyrosol en *Olivie Force* of *Olivie Riche* 17200 mg/kg of 17,2 g/kg.

- **Tyrosol** is de natuurlijke fenolische antioxidant in de olijfolie en in de olijfboombladeren. Ook witte wijn bevat Tyrosol.

- **Oleopentandial** (ook wel **Oleoceïne** genoemd) is zeer biologisch beschikbaar samengesteld. Het kan gemakkelijk worden geabsorbeerd op het niveau van de darm in de bloedbaan. Eigenlijk is de sterke lipofiele aard (van vet houden) van *Oleopentandial*, ten opzichte van zijn moleculenmoeder *Oleuropein*, een teken dat *Oleopentandial* een hogere biologische beschikbaarheid heeft voor intestinale absorptie<sup>4</sup>. Bovendien bleef *Ole-*

---

4 Activity and location of olive oil phenolic antioxidants in liposomes. Paiva-Martins, F., Gordon, M. H., & Gameiro, P. (2003). *Chemistry and Physics of Lipids*, 124, 26–34

*opentandial* stabiel tijdens de zuurachtige omstandigheid van de maagzuursimulatie tijdens de *in vitro* testen.<sup>5</sup> Het bereikte opmerkelijke bloedconcentraties voor een mens (gaande van 1 tot 18 µM).

De antioxidantenactiviteit in *Oleopentandial* reageert op de actieve vormen van zuurstof en stikstof, zoals bewezen in de *in vitro* proeven, waar men gebruik maakte van verschillende experimentele modellen.<sup>6</sup>

De stof is aanwezig in *Olivie plus 30x* met een gehalte van 1360 mg/kg.

- Oleocanthal is een fenolische verbinding met een zeer goede werking als antioxidant, het staat zeer dicht bij Tyrosol. Het geeft de olijfolie de extra Virgin, vers geperst en met een pittige smaak. (een tinteling in de keel)

## **De toekomst van de polyfenolen in het organisme en hun kracht als antioxidant**

Na de digestieve inname verschijnen de *Hydroxytyrosol* en de *Tyrosol* in hun geheel in een mum van tijd in het bloed. Ze verspreiden zich naar alle weefsels van het organisme, inclusief de hersenen, omdat het in staat is de bloed-hersenbarrière over te steken, die de hersencellen beschermt. Ze zijn totaal verdwenen na het derde uur.

Het verdwenen percentage, 30 % in de urine, afhankelijk van hoeveel men consumeert.

---

5 *In vitro* activity of olive oil polyphenols against *Helicobacter pylori*. Romero, C., Medina, E., Vargas, J., Brenes, M., & De Castro, A. (2007). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 680–686.

6 A comparison of antioxidant activities of Oleuropein and its dialdehydic derivative from olive oil, oleacin - Czerwin´ska, M., Kiss, A. K., & Naruszewicz, M. (2012). *Food Chemistry*, 131, 940–947.

## De antioxidantenkracht van polyfenolen

Als de polyfenolen een rol als antioxidant hebben kunnen ze tegen de ouderdom beschermen en zelfs eigenschappen ervan vermijden. Ze zouden de oxidatie stoppen.

De kracht van antioxidanten wordt op wetenschappelijk wijze gemeten door het ORAC dat staat voor "*Oxygen Radical Absorbance Capacity*" of de capaciteit van de absorptie van vrije zuurstofradicalen. Men spreekt van vrije radicalen.

De meest bekende antioxidantenstoffen zijn :

- De polyfenolen in wijn en olijfolie ;
- De vitamines C en E ;
- De glutathion, de koning der antioxidanten.

Bij het meten van de kracht van de antioxidanten van de polyfenolen in *Olivie Plus 30x* drukken de specialisten de hoeveelheid uit in micromol TE/g (*micromol troloxequivalent*) (TE) oraal (100gr). De resultaten voor de moleculen die aanwezig zijn in de plantaardige mediterrane voeding :

- Hydroxytyrosol = 40.000
- Resveratrol = 20.000
- Noten = 13.000
- Oleuropein = 11.000
- Epicatechine in groene thee = 8.000
- Extract van trosje druiven = 6.000
- Verse pruim = 6.000
- Rode wijn van Cabernet Sauvignon = 4.500
- Verse granaatappel = 4.500

- Verse aardbei = 4.300
- Granny appel ongeschild = 3.800
- Vitamine C = 2.000
- Groene thee – met de blaadjes intact = 1.200

Alle experimentele studies gebruiken rode bloedcellen, gekweekte intestinale cellen die blootgesteld worden aan een oxidatief risico, dus aan premature ouderdom. Deze cellen zijn beschermd door de polyfenolen in de olijfolie, des te beter als er sprake is van een hogere concentratie van polyfenolen.

### **De combinatie omega 3/omega 6 in essentiële vetzuren**

Om het evenwicht te stellen tussen de essentiële vetzuren, Omega 3 en Omega 6, is het ideaal om een klein beetje olie toe te voegen die rijk is aan Omega 3 aan uw eten.

**De olies met eerste koude pressing : Soja, met 8 % Omega 3, koolzaad met 9 % Omega 3, noten met 10 % Omega 3, olie van zwarte komijn met 23 % Omega 3, papaverzaad met 45 % Omega 3 en Perilla met 65 % Omega 3.**

**Allemaal steeds vergezeld van een goede scheut olijfolie weliswaar.**



## 2. Polyfenolen in olijfolie, onschatbaar voor uw gezondheid

---

De olijfolie is werkelijk goed voor de gezondheid. Het verhelpt een heleboel aandoeningen.

### **Polyfenolen tegen ouderdom, de ziekte van Alzheimer, hart- en vaatziekten en hypercholesterolemie**

Mitochondriën worden vergeleken met longcellen. Ze produceren energie terwijl ze voedingsstoffen omzetten die worden vervoerd door het MAT (moleculair adenosine trifosfaat) wat de werking en het onderhoud van de cel verzekert. Het afdalen van de functie van de mitochondriën is cellulaire ouderdom.

Aan mijn collega prof. Benlemlih :

« Ouderdom wordt geassocieerd met een gereduceerde mitochondriale biogenese en met een accumulatie van een mitochondriale schade ».

Gelukkig verhoogt *Hydroxytyrosol*, een antioxidant in olijfolie, de formatie van de mitochondriën. Het verbetert de mitochondriale functie door de ademhalingsketen in werking te zetten in de cel. Zo speelt de antioxidant een grote rol in de preventie van ouderdom en ziektes die met ouderdom gepaard gaan.

Bij de proefratten die de antioxidant toegediend kregen zagen we proteïnen verbonden aan de duurzaamheid van hartcellen. [1] [2]

Een ander antioxidant in olijfolie is Oleocanthal. Het heeft een zeer ontstekingsremmend effect, het beschermt



tegen hart- en vaatziekten en zelfs tegen de ziekte van Alzheimer. Volgens onderzoekers aan de universiteit van Louisiana vermindert het ook de bèta-amyloïde in de hersenen.

In 2011 stelden Daccache en zijn collega's [3] dat « *Oleuropein en zijn derivaten Hydroxytyrosol, Oleopentandial in staat waren de eiwitaggregatie te remmen in vitro* ». Deze aggregatie van Tau-proteïnes omvat de belangrijkste fase bij het ontwikkelen van de ziekte van Alzheimer en andere neurodegeneratieve ziektes.

Dezelfde auteurs hebben aangetoond dat de verbindingen kunnen worden geassocieerd met een vermindering van het risico op de ziekte van Alzheimer of dementie. De mediterrane voeding, gekenmerkt door het vele gebruik van olijfolie, kan een chemische basis vormen voor de ontwikkeling van remmers van Tau-eiwitaggregatie.

Op vasculair niveau verminderen de polyfenolen de aanwezigheid van celadhesiemoleculen van atherogene lipoproteïnes (LDL en kleine VLDL'en [4]). Deze verlagen de aggregatie van bloedplaatjes met een bloedstolling [5] aan de oorsprong en verminderen ontstekingsreacties (voornamelijk een vermindering van het reactieve proteïne C).

Professor Benlemlih benadrukt terecht sterk in zijn boek het werk van Singh *et al.*, 2007 [6]: het extract van olijfboombladeren bezitten 4,5 mg/ml van het actieve molecule Oleuropein. Het zou kunnen dat deze moleculen in staat zijn de geïsoleerde bloedplaatjes van gezonde personen te remmen. De auteurs suggereren dat de polyfenolen in olijfolie in synergie handelen om de activiteit van bloedplaatjes te verminderen, wat nuttig kan zijn voor de preventie en de behandeling van trombocytose (een

teveel aan plaatjes) en andere hart – en vaatziekten om trombose te vermijden.

Bovendien is het olijfboombladextract genaamd *Olea europaea* in staat om de hypertensie in de bloeddruk van ratten te verminderen die met hypertensie kampen. We konden het effect verifiëren aan de hand van kruidenthee van gedroogde olijfboombladeren (een soeplepel per glas).

## **Wees niet bang om met uw statines te stoppen: vraag uw huisarts om uitleg!**

Tegenover een buitensporige hoeveelheid is er geen behoefte voor klassieke cholesterol cholesterolverlagende geneesmiddelen (statines). Ze veroorzaken veel bijwerkingen [7] (tenzij u familiale hypercholesterolemie heeft).

Het enzym dat het cholesterolgehalte in het bloed regelt heet HMG-CoA reductaseremmer. De polyfenolen in olijfolie remmen dit enzym af en spelen ook een belangrijke rol om ziektes die gepaard gaan met een overmaat aan cholesterol te verhinderen. Onderzoekers hebben nog niet de juiste dosis van polyfenolen bepaald. [8]

De fenolische verbindingen in mediterrane voeding (rijk aan olijfolie) belemmeren biochemische gebeurtenissen die in het geding worden gebracht door atherogene ziektes, vooral de oxidatie van LDL [9]. Vandaar het verband met mediterrane voeding en de preventie van coronaire hartziekten.

Natuurlijk heeft het stopzetten van statines enkel nut als u rekening houdt met uw dagelijkse voedingsgewoonten, vraag begeleiding als het moet van een specialist.

## Polyfenolen als bescherming tegen infecties – inclusief voor zij die seropositief zijn en dus zeer gevoelig voor kleinere infecties

**Tegenover opportunistische infecties** bij patiënten die wel of niet seropositief zijn toont *Hydroxytyrosol* (aanwezig in olijfolie) een antibacteriële werking aan bij darm en luchtweginfecties.

*Oleuropein* en zijn derivaten in de olijfolie verhinderen of vertragen de groei van een breed scala van bacteriën en schimmels, waaronder ook de pathogene bacteriën en schimmels.

In dit kader bewezen Medina *et al.* (2006) [10] de bacteriedodende kracht van olijfolie tegenover bacteriën met een schadelijk effect op de darmflora (*Clostridium perfringens* en *Escherichia coli*). Olijfolie is in dit kader ook veel effectiever dan andere plantaardige oliën (uit zonnebloem, koolzaad, soja, maïs).

Deze auteurs stelden dat pathogene bacteriën afkomstig uit voedsel (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, *Yersinia sp.*, *Shigella sonnei*) de incubatietijd van meer dan een uur niet overleven in olijfolie.

*Oleocanthal* en *Oleopentandial*, *Hydroxytyrosol* en *Tyrosol* zijn de fenolische verbindingen die aan de olijfolie het bacteriedodende effect geven. [11] In een gelijksoortige studie zijn de antibacteriële activiteiten in *Oleuropein* en zijn derivaten *Hydroxytyrosol* en *Tyrosol* vergeleken met twee ontsmettingsmiddelen (voor de kenners: *glutaaraldehyde* en *ortho-ptalaldehyde*)

Uit de resultaten bleek dat de antibacteriële fenolische verbindingen in olijfolie superieur waren aan vele fenoli-

sche verbindingen uit voeding (Techine, Epicatechine, Eugenol, Thymol, Carvacrol...).

De natuurlijke bacteriedodende stoffen zijn verbazingwekkend genoeg even actief als synthetische biociden als controle gebruikt tegen *Pseudomonas fluorescens* (bacterie die de kaas contamineert), *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* (bacterie in ziekenhuizen, met een hoge natuurlijke weerstand tegen antibiotica) en *Escherichia coli*.

## **Polyfenolen om de immuniteit te stimuleren: Aids en kanker**

### **Tegen het aidsvirus**

*Oleuropein* en *Hydroxytyrosol* remmen in vitro de overdracht van VIH-1 van een cel naar de andere wat de virusvermenigvuldiging zwaar vertraagt.

Het kan handig zijn bij de vele medicamenten van de HAART-behandeling (*zeer actieve antiretrovirale behandeling*) om een status van betere immuniteit te behouden. Ongetwijfeld dat men olijfolie, boordevol polyfenolen, kan voorschrijven aan mensen die drager zijn of waarschijnlijk drager zijn van het aidsvirus.

De hoogste dosis wordt toegepast in de vorm van zes harde capsules *Olivie Forte/Olivie Riche*, twee in de ochtend, twee in de middag en twee in de avond.

### **Tegen kankers**

Grote epidemiologische studies toonden aan dat mensen met mediterrane voedingsgewoonten minder vaak kanker hebben (van de dikke darm, de baarmoeder, prostaat kanker, borstkanker,...). Mensen die zich houden aan het dieet voorgeschreven door reclames op tv zullen eer-

der de portemonnee stimuleren van de producent dan hun eigen gezondheid.

Het voordeel ligt hem in het eten van plantaardige producten (fruit, groenten, peulvruchten, ook vis en zeevruchten en rode wijn maar het meeste in olijfolie). De effecten van deze voeding zijn aanzienlijk beter dan deze gebaseerd op dierlijke producten (rood vlees, fijne vleeswaren, zuivelproducten....).

Natuurlijk hebben de onderzoekers geprobeerd het specifieke effect van de voeding van mediterrane bodem te bepalen. Na de rode wijn, die de Franse paradox aan toont, namen ze olijfolie onder de loep, met name het effect van olijfolie tegen kankers.

Het onderzoek was eerst getest op kleine dieren zoals de witte rat en door humane celkweken te gebruiken met een vorm van kanker, dikke darmkanker, leukemie of borstkanker (MCF-7).

*Hydroxytyrosol* in olijven heeft onlangs aandacht gekregen i het bijzonder door de activiteiten van zijn antioxidanten en de antiproliferatieve, proapoptotische (wat kankercellen doodt) en ontstekingsremmende activiteiten. Deze activiteiten kunnen in het bijzonder alle aspecten van kanker aanvechten. [12]

Specialisten suggereren aan de hand van de resultaten van experimenten dat buiten de ontstekingsremmende en antioxidanteneffecten *Hydroxytyrosol* en andere polyfenolen in olijven ook kanker bestrijdende effecten uitoefenen door de activatie van moleculaire signalisatie wat tot het doden of stoppen van de groei van meerdere *in vitro* tumorcellijnen leidt. [13]

Een dieet dat 15 % olijfolie bevat ten opzichte van de normale dagelijkse voedselinname verlaagt aanzienlijk de voorstadia van borstkanker en dikke darmkanker bij ratten. [14] [15] Dezelfde hoeveelheid sojaolie, maisolie en palmolie hebben niet hetzelfde beschermende effect. Ook saffloerolie [16] bracht niet hetzelfde resultaat op in vergelijkbare experimenten.

*In vitro* kunnen we waarnemen dat *Hydroxytyrosol* en *Oleuropein* een antiproliferatief effect hebben door apoptose (de dood van kankercellen) in een vroeger stadium en een vermindering van de oxidatiestoffen voortbrengt, de oxidatie is gedeeltelijk toe te schrijven aan carcinogeniteit.

Een Griekse epidemiologische studie merkte ook een zware vermindering van het risico op borstkanker bij het bestuderen van 14807 vrouwen. [17] Ze moesten zich dan wel aan een streng mediterraan dieet houden.

De auteurs benadrukken echter een belangrijk punt, Griekenland heeft de minste consumptie van hormonen (pillen en substitutiebehandelingen van de menopauze) in het land.

## **Polyfenolen tegenover auto-immune ziektes: diabetes, obesitas de ziekte van Alzheimer en huidziekten.**

*Oleuropein* bleek een efficiënt antioxidant voorzien van ontstekingsremmende eigenschappen.

In het geval van **diabetes** werden er tests uitgevoerd op ratten met diabetes die een sterke dosis polyfenolen (20mg/kg/per dag) toegediend kregen voor twee maanden. Resultaten toonden een bloedsuikerspiegel die met 55 % verlaagd was. [18]

20343 mensen van EPIC (The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition) vulden een enquête in waaruit bleek dat eten volgens de mediterrane gewoontes omgekeerd evenredig staat met de invloed van een **hoge bloeddruk** en de gevolgen daarvan. [19]

Ter vergelijking kijken we naar het moderne dieet, waar vetzuren worden gehaald uit rood vlees, boter, drie a vier zuivelproducten per dag en brood boordevol slechte glutens, wat allemaal de welvaartsziekten in de hand speelt.

We staan op een keerpunt op vlak van gezondheid en van de economie. We zullen moeten kiezen: minder maar beter eten of onze portefeuille weggooien. Vergeet immers niet dat de goedkoopste industriële gerechten, waar de kortingen op prijken en bovendien slecht voor de gezondheid nog altijd duurder zijn dan groenten en fruit voor een hele familie.

Cardiovasculaire aandoeningen komen ons duur te staan in termen van gezondheid – **hartaanvallen en artritis**, er komen steeds meer reumatologische ziekten van lange duur (reumatoïde artritis, spondylitis ankylopoetica...).

90 patiënten waarvan er 27 **reumatoïde artritis** hadden werden ad random gekozen om te onderzoeken. Sommigen onder hen ondergingen de behandeling van 6 mg Hydroxytyrosol per dag voor 8 weken oftewel twee grote lepels *Olivie plus 30x* of na elke hoofdmaaltijd vier capsules van 500 mg *OlivieForce* of *OlivieRiche* per dag.

De resultaten van dit onderzoek zijn statistisch interessant zowel op het niveau van klinische symptomen als op dat van tekenen van ontstekingen. [20]

Een speciale aankondiging door Jean-Marc Dupuis van "*Santé Nature Innovation*":

## De kunst om zich te laten verzorgen door planten

Japanse steranijs en het karwijblad werken zeer goed tegen maagpijn; de essentiële olie in bergthee (uit Canada) vervangt op succesvolle wijze een niet-steroïdale ontstekingsremmer; look en bladeren van de olijfboom moduleren een hoge bloeddruk... U kan alle raad hier terugvinden om zich op doeltreffende en natuurlijke wijze door planten te laten verzorgen.

In het geval van **hypermetabolische syndromen** gaven we *Hydroxytyrosol* aan 38 patiënten gedurende zes maanden in de vorm van twee eetlepels *Olivie plus 30x* of 3 capsules *OlivieForce* per dag.

Huidziektes zoals lupus, sclerodermie, psoriasis, zijn verbonden met immunologische tekortkomingen wat leidt tot een chronische ontsteking. We kunnen dus het gebruik van bio-extracten van olijfolie en zijn krachtige polyfenolen (*Hydroxytyrosol* en *Oleopentandial*) overwegen om de symptomen van de ziektes te verlichten.

## De mediterrane paradox: wijn, olijfolie en tarwe

Bovenop alle voordelen voor de gezondheid die hierboven opgesomd zijn kan olijfolie ook op de huid gesmeerd worden op plekken met psoriasis, (op de helft van het lichaam zodat men kan vergelijken met de andere helft) of nog beter men kan olijfolie opeten, een soeplepel in de ochtend en in de salade doen 's avonds.

Als u de olijfolie niet lust, neem dan drie capsules olijfolie 's ochtends, s' middags en 's avonds voor een paar maanden. Mijn voorkeur gaat naar *Olivie force* en *Olivie riche*. [21]



Dans les autres maladies auto-immunes qui sont les trop  
Het mediterrane dieet werkt goed tegen andere auto-immune ziektes, waaronder de meest frequente neurodegeneratieve ziektes (Alzheimer, Parkinson, multiple sclerose en amyotrofische lateraalsclerose...)

De conventionele behandelingen tegen auto-immune ziektes zijn niet doeltreffend, zwaar, duur en hebben ook een heleboel bijwerkingen. Het mediterrane dieet daar-entegen is niet riskant, het kost bijna niets en u kan er meteen mee beginnen.

In mediterrane landen koppelen we olijfolie meteen aan elke maaltijd. De combinatie van de dagelijkse antioxidanten in olijfolie en in wijn (French paradox) maakt de "Mediterranean paradox". [22] De mediterrane paradox bestaat uit een schijnbaar ongezonde maaltijd (vet en alcohol) wat uw gezondheid dan wel op peil kan houden. Het huwelijk tussen wijn (met mate te consumeren) en olijfolie kan als cultureel erfgoed van de mens en zijn gezondheid worden beschouwd.

We gooien daar nog een schepje bovenop met brood dat wordt gemaakt van zaaizaad van eeuwenoude tarwe, wat het beste is voor de gezondheid, en ook het onderwerp uitmaakt van het boek "Le Pain et le chirurgien" wat ik binnenkort publiceer met de bakker van Cucugnan.

Steeds in dienst van uw gezondheid,

**Prof Henri JOYEUX – oncoloog**

Internationaal deskundige van de preventie van ziekten door de voeding van de beschaving  
Medische Faculteit te Montpellier



## Sources :

- [1] *Expression of the longevity proteins by both red and white wines and their cardioprotective components, resveratrol, tyrosol, hydroxytyrosol* – Mukherjee S. et al – *Free radical Biology and Medicine* 2009, 46: 573-578
- [2] *Use of hydroxytyrosol as anti-aging agent.* Raederstorff D, Wangschmidt Y, Wertz K (2010). Pub. No. : US 2010/0130621 A1.
- [3] *Oleuropein and derivatives from olives as Tau aggregation inhibitors.* Daccache A, Lion C, Sibille N, Gerard M, Slomianny C, Lippens G, Cotelle P. *Neurochemistry International*. 2011, 58(6): 700-7.
- [4] *De vrije radicalen zijn verantwoordelijk voor de oxidatie van plasma LDL-cholesterol in oxLDL die ontstekingsreacties activeren en chemische reacties die de afzetting van arteriële plakken in de wanden van bloedvaten bevorderen.*
- [5] *Hetzelfde effect als een aspirine*
- [6] *The effects of polyphenols in olive leaves on platelet function.* Singh I, Mok M, Christensen AM, Turner AH, Hawley JA. *Nutrition Metabolism and Cardiovascular Disease*. 2008, 18(2):127-32.
- [7] *Spierpijn en spierzwakte, leverproblemen met en verhoogde Gamma-GT of, minder bekend, cataracten. Onlangs merkten we officieel een verhoogd risico op diabetes en cognitieve stoornissen (verwardheid, geheugenverlies).*
- [8] *Effects of feeding virgin olive oil or their polyphenols on lipid of rat liver.* Benkhalti F, Prost J, Paz E, Perez-Jimenez F, El Modafar C, El Boustani E. *Nutrition Research*. 2002, 22 : 1067–1075.
- [9] *Structure antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids.* Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. *Free Radical Biology and Medicine*. 1996, 20 : 933–956.
- [10] *Comparison of the concentrations of phenolic compounds in olive oils and other plant oils : correlation with antimicrobial activity.* Medina E, De Castro A, Romero C, Brenes M. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006, 54, 4954–4961.
- [11] *Bactericidal activity of glutaraldehyde-like compounds from olive products.* Medina E, Brenes M, Garcia A, et al. *Journal of Food Protection*. 2009, 72, 2611–2614.
- [12] *Potential of olive oil phenols as chemopreventive and therapeutic agents against cancer: A review of in vitro studies.* Casaburil, PuociF, Chimento A, Sirianni R, Ruggiero C, AvenaP, Pezzi, V. *Mol. Nutr. Food Res*. 2013, 57, 71–83.

[13] *Hydroxytyrosol rich extract from olive leaves modulates cell cycle progression in MCF-7 human breast cancer cells.* Bouallagui Z, Han J, Isoda H, Sayadi S. *Food Chem. Toxicol.* 2011, 49, 179–184.

[14] *Dietary fat, olive oil intake and breast cancer risk.* Martin-Moreno JM, Willett WC, Gorgojo L et al. *Int J Cancer.* 1994, 58:774–780.

[15] *Inhibition of p38/CREB phosphorylation and COX-2 expression by olive oil polyphenols underlies their anti-proliferative effects.* Corona G, Deiana M, Incani A et al. *BiochemBiophysRes Commun.* 2007, 362: 606–611.

[16] *The antioxydant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil.* Owen R. et al. : *European Journal of Cancer* 2000, 36, 12351247

[17] *Conformity to traditional Mediterranean diet and breast cancer risk in the Greek EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition) cohort – 2010 American Society for Nutrition – Antonia Trichopoulou, Christina Bamia, PagonaLagiou, and DimitriosTrichopoulos*

[18] *Hamden K, Allouche N, Damak M, Elfeki A. Hypoglycemic and antioxidant effects of phenolic extracts and purified hydroxytyrosol from olive mill waste in vitro and in rats. Chemico-Biological Interactions 180 (2009) 421–432.*

[19] *Mediterranean Diet and Incidence of and Mortality From Coronary Heart Disease and Stroke in Women – Teresa T. Fung, Kathryn M. Rexrode, Christos S. Mantzoros, JoAnn E. Manson, Walter C. Willett, Frank B. Hu – Circulation. 2009; 119: 1093-1100*

*27 Olive extract supplement decreases pain and improves daily activities in adults with osteoarthritis and decreases plasma homocysteine in those with rheumatoid arthritis – Catherine M. Bitler and al. Nutrition Research 27 (2007) 470–477*

[20] *Het effect van het extract van de olijfboom, rijk aan polyfenolen, OLIVIE RICHE/ OLIVIE FORCE, over de ontsteking en de pijn van patiënten die leiden aan reumatoïde artritis: een klinische studie ad random in dubbelblinde tegen placebo met een duur van acht maanden-Benlemlih M/ Ghanam Jamal- Dhar El Mahraz , P.O. Box 1796, Fès, Université Sidi Mohammed Ben Abdellah, Fès, Maroc. Laboratoire de Biotechnologie de la Faculté des Sciences*

[21] *U vindt het terug in Europa, Frankrijk bij NATURAMedicatrix en in Marokko bij Atlas Olive Oil*

[22] *28 « L’Olivier et le chirurgien » en préparation et parution 2015 – Pr H. Joyeux et Pr M. Benlemlih.*

## ANALYSE EN CERTIFICATEN

### Olijfolie, een natuurlijke bron van polyfenolen.

---

De analyse van extra virgin olijfolie "OLIVIE Plus" geproduceerd door het bedrijf ATLAS OLIVE OILS toonde aan dat het gaat om een olie die een natuurlijke bron vormt van polyfenolen en meer specifiek van Hydroxytyrosol in een concentratie van 233 mg/kg, en Tyrosol in een concentratie van 161 mg/kg (fig.1) Dit is ongeveer 30 keer meer Hydroxytyrosol en Tyrosol dan in enige andere extra virgin olijfolie.

Tabel 1 toont de gehalten van Hydroxytyrosol en Tyrosol van 22 staaltjes conventionele olijfolie uit vier mediterrane landen die producent zijn van olijfolie *Hrneirik* et *Frische* (2004).

Het bijgevoegde certificaat van de analyse van de olie komt van een Italiaans laboratorium met een zeer goede reputatie. De resultaten in figuur 1 tonen duidelijk dat *Olivie Plus* de meest gezonde extra virgin olijfolie is van de wereld. Hij zit buitengewoon vol polyfenolen (*Hydroxytyrosol* en *Tyrosol*), bovendien bezit hij veel actieve antioxidanten.

Deze unieke eigenschappen van de olijfolie van *Olivie plus* komen van olijfbomen die geplant zijn in een rotsachtige woestijn. (fig. 2, fig. 3) Zoals bij wijnstokken zijn olijfbomen bekend door hun leed om lijden het beste van zichzelf te kunnen geven. Omdat de omgeving zeer warm is (tot 50° in de zomer) kunnen de wortels in de rotsachtige grond niet goed groeien. Ze krijgen onvoldoende water, de olijfbomen komen in een staat van stress. Dit

proces zet een paniekfenomeen in gang in de olijven (een overlevingsinstinct) dat zich vertaalt naar een verhoogde productie van polyfenolen, Hydroxytyrosol en Tyrosol (auto defensie).

Beste lezer, om u te overtuigen van de kwaliteit van onze olie kan u de onderstaande, interessante certificaten bekijken.



**chemiservice**  
ricerca ed analisi chimiche e microbiologiche

www.chemiservice.it  
info@chemiservice.it




Accredited according to the Italian UNI EN ISO/IEC 17025, Italian National Accreditation Body (IAC-MRA) for the analysis of olive oils and olive pomace oils. Accredited according to the Italian UNI EN ISO/IEC 17025, Italian National Accreditation Body (ACCREDIA) for the analysis of olive oils and olive pomace oils. Accredited according to the Italian UNI EN ISO/IEC 17025, Italian National Accreditation Body (ACCREDIA) for the analysis of olive oils and olive pomace oils.

---

**Test Report No. 27267/11**

---

**Customer Details:** ATLAS  
110 Boulevard Vaucaub II Mansour 20379 CASABLANCA - Marocco (...)

**Date issued:** Monopoli 27/12/2011

---

**Sample Code:** 27.267      **Date sample received:** 15/12/2011      **Date analysis commenced:** 16/12/11      **Date analysis finished:** 20/12/11

**Product Category:** Olive oils and Olive Pomace Oils

**Product Declared:** 1. EXTRA VIRGIN OLIVE OIL

**Label:** Extra Virgin Olive Oil - Rich Naturally in Polyphenols "Olivie Plus"

**Seal:** Hermetically sealed tin

**Sample Description:**

**Quantity:** 2 per 100 ml      **Return of Sample:** No

**Packaging:** None

**Sampling Procedure:** By the customer

---

Test Name and Analytical Method	Results	U	LOQ	R%	Limit value	Remarks
<b>FREE FATTY ACIDS</b> (expressed as oleic acid, in %) EEC Reg No 2568/1991 of 11 July 1991 (3) L248 05/05/1991 Ann II EEC Reg No 762/2007 of 21 June 2007 (4) L144 22/04/2007	0,33	± 0,005			Max 0,8 (3)	
<b>PEROXIDE VALUE</b> , in mg O2/Kg oil EEC Reg No 2568/1991 of 11 July 1991 (3) L248 05/05/1991 Ann II	9,5	± 0,5			Max 20 (3)	
<b>BIOPHENOLS</b> , in mg/Kg NGD C89 - 2007						
<b>Total Polyphenols</b> , in mg/Kg	1250		30			
<b>POLYPHENOLS COMPOSITION</b> , in mg/kg*						
Hydroxy-tyrosol*	233,0		3			
Tyrosol*	161,0		3			
Diastereic form of dicarboxymerol chlorogenic aglycon*	13,0		3			
Diastereic form of dicarboxymerol ligustride aglycon*	7,0		3			
Lignans*	36,0		3			
Hydroxytyrosol aglycon*	10,0		3			
Ligustride aglycon*	6,0		3			
<b>TOTAL POLYPHENOLS</b> , in mg caffeic acid/Kg*	1066,0					

Internal Laboratory Method (Foliva Cuvellone) - Colorimetric Method - LR1 - 0,3 mg caffeic acid/Kg

---

**CHEMISERVICE S.r.l.**  
I.L. Strada Piovato Via Vialla (Spigno) - 00043 Spigno - Roma (ITALY)  
Tel. +39 0665 742177 FAX +39 0665 509910000  
F. RAC.F. e Inv. Reg. Impres. di Roma 06/0500756 - REA 02344 BA 01143  
CAPITALE SOCIALE € 80.000.000.000.000






ATLAS Oils, s.r.l. (1991) è firmataria con il proprio sigillo della marca DOP per l'olio extravergine di oliva. L'azienda è specializzata nella produzione e nella commercializzazione di oli extravergine di oliva.

**Figuur 1.** Analyse van het laboratorium, de olijfolie *Olivie plus*, natuurlijke bron van polyfenolen.

**Opmerking:** Zoals u kan zien heeft de Hydroxytyrosol een waarde van 233, dat is 33 keer meer geconcentreerd dan in klassieke olijfolies.



**Figuur 2.** Europees bio-certificaat van olijfolie Olive plus, de natuurlijke bron van polyfenolen.

**Opmerking:** Sinds 2015 heeft Atlas Olive Oils, de eerste bio gecertificeerde producent van olijven door Marokkaanse instellingen, ook zijn bio verklaring gevalideerd door Europese certificaten.

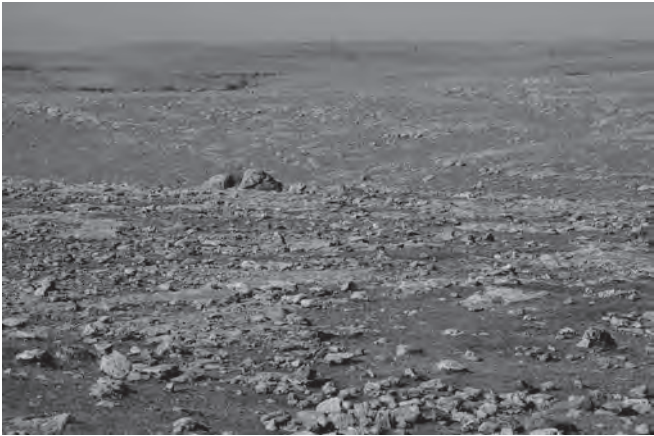
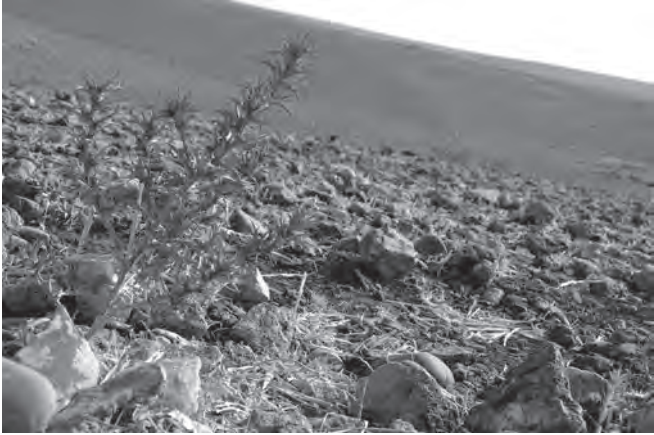
Marokko	OPA	233	161
Tunesië	Moy	13,0	13,1
	22	10,9	6,3
	21	7,6	7,8
Griekenland	20	11,2	15
	19	20,5	19,5
	18	18,9	11,9
	17	15,5	13,0
	16	6,6	10,5
	15	11,9	22,8
	14	1,4	10,8
	13	12,9	10,2
	12	14,7	9,1
	11	5,5	7,5
	10	9,2	7,8
	9	19,4	16,4
Spanje	8	14,6	6,3
	7	7,2	12,7
	6	18,9	6,1
	5	10,1	7,5
	4	8,7	17,1
	3	16,3	15,8
	2	10,0	9,0
Italië	1	7,4	8,2
		HT	T

**Tabel 1.** Vergelijking van het gehalte aan Hydroxytyrosol (HT) en Tyrosol (T) tussen 22 staaltjes olijfolie uit vier mediterrane landen en onze olie "OLIVIE Plus".

## AFBEELDINGEN

### De olijfboom plantaties

---



---

**Figuur 3.** Rotsachtige woestijn in Marokko.





**Figuur 4.** Olijfgaard in het midden van de rotsachtige woestijn in Marokko.



●●● DEEL 1 |

# Algemeenheden over de olijfboom en olijfolie



# HOOFDSTUK 1

## De olijf, een vrucht vol gezonde voedingsstoffen

---

### 1. De oorsprong

De olijfboom is afkomstig van het Middellandse-Zeegebied en staat al jaar en dag als symbool voor de wijsheid, vrede, rijkdom en glorie. De boom is perfect aangepast aan een gematigd klimaat, aan een rotsachtige en kalkstenen grond, een bodem die geen meststoffen vereist. De oorsprong van de olijfboom ligt in Syrië, Klein-Azië, Ethiopië, Egypte en Indië. Kreta, de Peloponnesos, de kustgebieden van Griekenland, de oostelijke eilanden van de Egeïsche zee zoals Lesbos, Samos en Thassos en de Ionische eilanden, allen bezitten ze tal van olijfgaarden. De olijfboom komt ook wijd verspreid voor in Cyprus, de Turkse kust, Syrië, Libanon, Palestina, het zuiden van Spanje, Frankrijk en Italië. In Noord-Afrika bestond de olijventeelt al van voor de komst van de Romeinen.

Tegenwoordig behoort de olijventeelt evenzeer toe aan landen aan het Middellandse-Zeegebied, Zuid-Algerije, Australië, Japan, bepaalde gebieden in China (*Ryan et Roberts, 1998*) en Argentinië (*COI, 2010*).

### 2. De geschiedenis

De olijventeelt maar ook het produceren en het gebruik van olijfolie zijn praktijken die zeer bekend en gevestigd zijn in het Middellandse-Zeegebied al meer dan 7000 jaar (*Tsagaraki et al., 2004*).

De geschiedenis vertelt ons niets over het gebruik van olijfproducten bij de inwoners aan de Egeïsche zee. Niettemin, lijkt het mogelijk dat vanaf de neolithische periode, ongeveer rond 8000 v.C., de wilde olijven van de *Olea Sylvestris*, soms werden geplukt samen met ander wild en eetbaar fruit om de dagelijkse voeding te verrijken. De palynologie is een vrij nieuwe tak van de wetenschap die het zaad van de pollen bestudeert. Hierdoor werd vastgesteld dat er tegen het einde van de neolithische periode, rond 3200-3100 v.C., er pollen aanwezig waren bij de wilde olijfboom *Olea Sylvestris* aan het Copais-meer, in Thessalië en Kreta.

Het begin van de olijventeelt is waarschijnlijk pas later ontdekt en geformuleerd, tijdens het derde millennium voor Christus, tijdens het begin van de Bronzen tijd. De Kretenzers hadden contact met oostelijke Mediterrane beschaving en Noord-Afrika waar de olijfboom al gedomesticeerd was. Dit contact heeft geleid tot de verspreiding en het begrip van de olijventeelt in Kreta.

Archeologen suggereren dat de eerste vorm van olijventeelt al werd beheerst tijdens de Bronzen tijd. Tijdens deze periode werd het beheer van de olijventeelt, het nauwkeurig en selectief snoeien waarschijnlijk door de mens uitgevoerd om de olijfboom jong te houden, met andere woorden om de productie van de bloemen en het fruit te bevorderen.

### 3. Eigenschappen van de olijfboom en zijn vrucht, de olijf

De olijfboom is een typische mediterrane boom, 6 tot 8 meter hoog, met een kronkelige boomstam en met een grijsachtige en gescheurde schors. De blaadjes zijn wit en zilverachtig aan de onderzijde en grijsachtig groen aan de bovenzijde, tegenstrijdig, taai, doorzettend, en lansvor-

mig. De bloemen, klein en wit, met vier blaadjes, komen in trossen samen.

De olijfboom is de overkoepelende naam voor 35 boomsoorten en struiken van het *Olea* type. De naam wordt veelal gebruikt voor de soort: *Olea europaea*. De botanische oorsprong van de boom en het begin van de teelt zijn een controversieel onderwerp (Anon, 1983; Loukas et Krimbas, 1983; Blazquez, 1996).

Van de 35 boomsoorten van het type *Olea* wordt de *Olea Chrysophylla*, gevonden in Azië en Afrika, beschouwd als de voorouder van de olijfboom. Een andere theorie stelt echter dat wilde Mediterrane olijfboom, de *Olea Sylvestris* (Loukas et Krimbas, 1983) de voorouder der olijfbomen is. Anderen beschouwen de *Olea Sylvestris* als een tussenfase in de ontwikkeling van de wilde olijfboom *Olea Chrysophylla* tot de *Olea europaea* (Blazquez, 1996; Lavee, 1996).

Rijk	<i>Plantae</i>
Aftakking	<i>Magnoliophyta</i>
Onder-aftakking	<i>Magnoliophytina</i>
Klasse	<i>Magnoliopsida</i>
Onder-klasse	<i>Dialypetales</i>
Orde	<i>Lamiales</i>
Familie	<i>Oleaceae</i>
Type	<i>Olea</i>
Soort	<i>Olea europaea L</i>
Onder-soort	<i>O.europaea subsp.europaea var sylvestris</i>
	<i>O.europaea subsp.europaea var. europaea</i>

**Tabel 2.** botanische situatie van de soort *Olea europaea L.*

De olijf is een ovaalvormige steenvrucht en bestaat uit een vruchtwand en een endocarpium. Het weegt normaal gezien van 2 g tot 12 g, sommige soorten kunnen wel tot 20g wegen. De vruchtwand omvat twee delen: het epicarpium (de peul) en de mesocarp (de pulp) wat ongeveer 65-83 % van het totale gewicht inneemt. Het endocarpium (de kern) omvat 13 % tot 30 % van het totale gewicht. Het epicarpium is omringd door was en heeft een kleur die van felgroen naar zwart gaat wanneer het rot.

De gemiddelde chemische samenstelling van de olijf wordt getoond in tabel 4. Het bestaat uit: water, 50 %, oliën, 22 %, polyfenolen, 1.5 %, suikers, 18 %, cellulose, 5,5 %, mineralen (as), 1,5 %. Andere belangrijke bestanddelen zijn pectinen, organische zuren, pigmenten fenolglycosiden.



**Figuur 5.** Chemische samenstelling van olijven.

### 3.1 Rijpingsstadia

De toename van het gewicht van het fruit in de verschillende fases van oktober tot het midden van november is opmerkelijk. Daarna begint het gewicht van het fruit af te nemen, dat komt door het verlies van vocht. Hierdoor

komt er wel een verhoging van het oliegehalte, normaal gezien is dit zichtbaar vanaf de maand oktober tot december. De accumulatie van olie begint eind juli tot het begin van augustus. Tijdens de herfst en de winter wordt het fruit zwart en bereikt het oliegehalte zijn maximum. De olie is vooral hoog geconcentreerd in de vruchtwand (96-98 %).

De eerste fase van het rijpingsproces (fig. 5), eind mei/juni, augustus, staat bekend om het “groene” stadium waar de omvang van het fruit erg toeneemt. De kleur van het fruit verandert naar rood-paars en daarna naar zwart. Het kleuringstadium vindt plaats in midden oktober. Het polyfenolgehalte van de olijf is op zijn hoogst aan het begin van de kleuringfase, wanneer de olijf een groenachtige, rode kleur heeft.

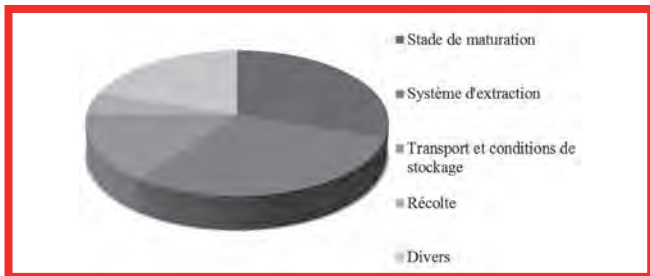


**Figuur 6.** Rijpingsstadia van de olijf.

De rijping van de olijf is een traag en lang proces wat meerdere maanden duurt en afhangt van de breedtegraad, de soort, de beschikbaarheid van water, de temperatuur en de teeltpraktijken. Het rijpen van de olijven is een belangrijke factor. Vanuit een wetenschappelijk standpunt is het moeilijk om in wiskundige termen de bijdrage aan de globale kwaliteit van de olijfolie extraheren van elke factor te meten en uit te drukken. Volgens



Monteredo en zijn collega's (1986) dragen de rijpingsstadia bij aan 30 % van de kwaliteit van de olijfolie. De andere factoren dragen bij aan de volgende percentages: het afzuigsysteem (30 %), maatregelen en vervoer van de opslag (15 %), oogst (5 %), anderen (20 %).



**Figuur 7.** Verschillende factoren die de kwaliteit van de olijfolie beïnvloeden.

Er zijn een aantal methodes voorgesteld om de rijpingsstadia van de olijven te bepalen. Waaronder de netto-absorptiewaarden van de olijvenpasta in spectrofotometrie in een gebied dat zichtbaar twee verschillende golflengten heeft (665 nm et 525 nm). De internationale Olijfolieraad (1984) stelde een simpele techniek voor gebaseerd op de evaluatie van de kleur van 100 olijfextracten, willekeurig gekozen, vanaf 1kg aan staaltjes. Om de rijpingsgraad te berekenen wordt de volgende formule gebruikt:

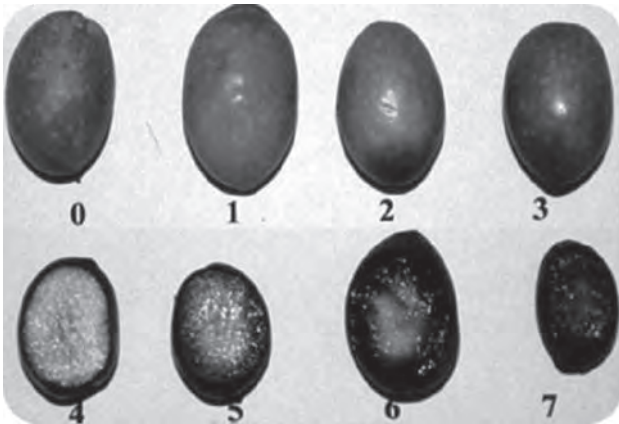
$$\text{Rijping} = \frac{(0 \times n_0) + (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + \dots (7 \times n_7)}{100}$$

Of  $n_0, n_1, n_2, \dots, n_7$ , zijn de cijfers die acht categorieën van de olijven representeren:

0 = Olijven waarvan de schil een diepgroene kleur heeft.

1 = Olijven waarvan de schil geel of geelgroen is.

- 2 = Olijven met een geelachtige schil en geelachtige vlekken.
- 3 = Olijven waarvan de schil een roodachtige of violette kleur heeft.
- 4 = Olijven waarvan de schil zwart is en het vruchtvlees nog helemaal groen.
- 5 = Olijven waarvan de schil zwart is en het vruchtvlees groen-paars.
- 6 = Olijven waarvan de schil zwart is en het vruchtvlees paars is over bijna de hele kern.
- 7 = Olijven met een zwarte schil en een compleet zwarte kern.



**Figuur 8.** De aanduidingen van de rijping van de olijven.

Volgens deze benadering komt de beste periode om de olijf te oogsten overeen met de rijpingswaarden van 5. Deze aanwijzingen hebben een relatieve waarde en het gebruik ervan kan niet zomaar veralgemeend worden. De waarde kan immers beïnvloed worden door meerdere

factoren dan de olijfsoorten, het gebied van de olijfboom en de klimaataspecten. Zo kan het rijpingsgehalte berekend worden in verschillende productielanden en kan de rijpingswaarde van olijven uit bepaalde gebieden gelinkt worden aan de olie die geproduceerd wordt en aan het gehalte van de polyfenolverbindingen. Over het algemeen wordt het maximale gehalte van polyfenolen in olijven bereikt in het begin van de verkleuring. Daarom hangt de beslissing om olijven en hun olie een zachte of eerder een pikante smaak te geven sterk af van de oogstperiode wat de belangrijkste factor is voor de samenstelling en de smaakwaliteit.



## HOOFDSTUK 2

### De olijf van de vrucht tot de olie

---

*Olijfolie, het pure sap van de olijf is gezond en aanbevolen door voedingsdeskundigen. Verbeter uw keuze door te informeren naar zijn productie !*

Men verkrijgt olijfolie door de pericarp van de vrucht te vermalen, niet van hun zaden, in een speciale oliemolen. Het oliegehalte hangt af van de streek, de variëteit (cultivar), de rijpingsstaat bij de oogst en plaatselijke landbouwkundige praktijken.

De afgelopen jaren kent het proces van het vermalen van de pericarp een technologische vooruitgang. Deze vooruitgang brengt een mechanisering van het volledige proces met zich mee, een verhoging van de werkcapaciteit en een specialisatie van het extractieproces wat belangrijk is om de kosten te verlagen maar het verhoogt ook de kwaliteit van de olie (*Ben Sassi et al., 2006*).

#### 1. Het principe van extractie

Alle extractiemethoden hebben als doel de grootst mogelijke kwantiteit van olie te produceren zonder de oorspronkelijke kwaliteit te wijzigen. Als de kwaliteit echter niet moet worden verbeterd is het noodzakelijk om enkel mechanische of fysieke methodes te gebruiken bij de extractie van de olie. Zo voorkomt men chemische en enzymatische reacties die de natuurlijke samenstelling kan veranderen. Het schema van de extractie, recentelijk opgesteld, bestaat uit vier principiële handelingen :

1. Het kuisen van het fruit (van bladeren ontdoen, de olijven wassen);
2. Bereiding van het deeg (fijnmaken, kneden);
3. Scheiding van de vaste stof (de perskoeken) van de vloeistof (de olie en het vruchtwater);
4. Scheiding van de vloeistoffen (scheiding van de olie van het vruchtwater).

## 1.1 Het reinigen van de vrucht

Het reinigen bestaat uit twee acties: het ontdoen van de bladeren en het wassen van de vrucht. De machines om bladeren te ontdoen zuigen de bladeren, takjes en het vuil weg door een krachtige luchtstroom langs een ventilator. Daarna worden de olijven gewassen onder stromend water.

## 1.2 Het fijnmaken

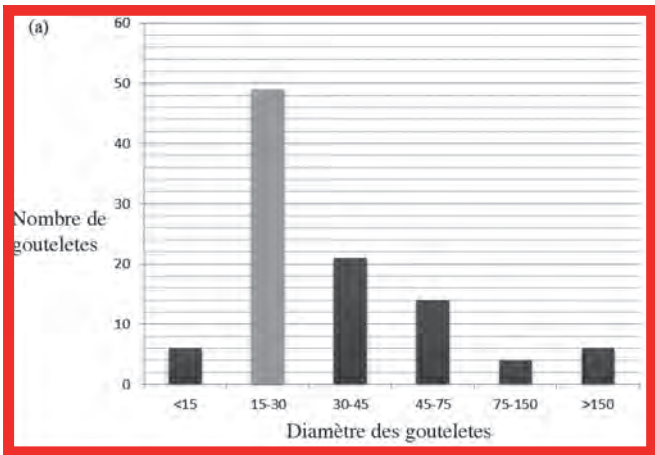
Deze actie dient om de cellen van de olijven te pletten en oliedruppels te verkrijgen. Vanuit een praktisch oogpunt is het onmogelijk om alle cellen fijn te maken en dus om alle olie uit de olijf te halen. De oliedruppels zijn ook omgeven door een amfoteer pseudomembraam die de olie in een staat van emulsie houdt. De stabiliteit hangt dus af van de grootte van de druppels, hoe kleiner ze zijn, hoe stabielere ze zijn. Bovendien blijft een kleine mate van de olie gevangen in het colloïdale systeem, gevormd door de pectine in het deeg.

## 1.3 Het kneden

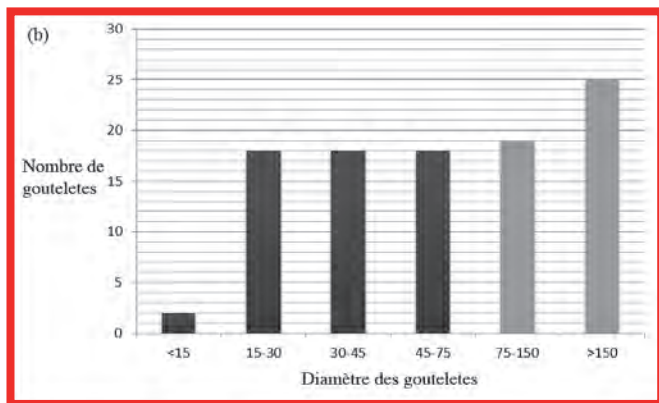
De olie moet uit de vrucht worden gehaald door mechanische methodes en vanuit de weefsels zodanig dat de oliedruppels worden samengevoegd bij de grotere druppels tot ze 'zakjes' vormen.

Het kneden is fundamenteel om de extractie te verbeteren. Het proces is bedacht om het drukeffect te versterken en het deeg beter te uniformiseren. Zijn voornaamste doel is om de emulsie van het water en/of de olie te breken zodat de oliedruppeltjes grotere druppels kunnen vormen.

*Di-Giovacchino (1989, 1996)* bestudeerde het percentage van de omvang van de oliedruppels in het geplette deeg. Na het pletten hadden maar 45 % van de druppels een omvang van meer dan 30 microns, wat de minimum omvang is bij de scheiding van de olie. Bij het kneden van het deeg stijgt dit percentage naar 80 % een verhoging die evenredig loopt met het aantal grotere druppels (fig. 9a et 9b).



**Figuur 9a.** Percentages van de omvang van de oliedruppels in het deeg na het fijnmaken (a). (*Di Giovacchino et al., 2002*).



**Figuur 9b.** Percentage van de omvang van de olie-druppels in het deeg na het kneden (b). (*Di Giovacchino et al., 2002*).

## 1.4 De scheiding van de vloeistof en de vaste stof

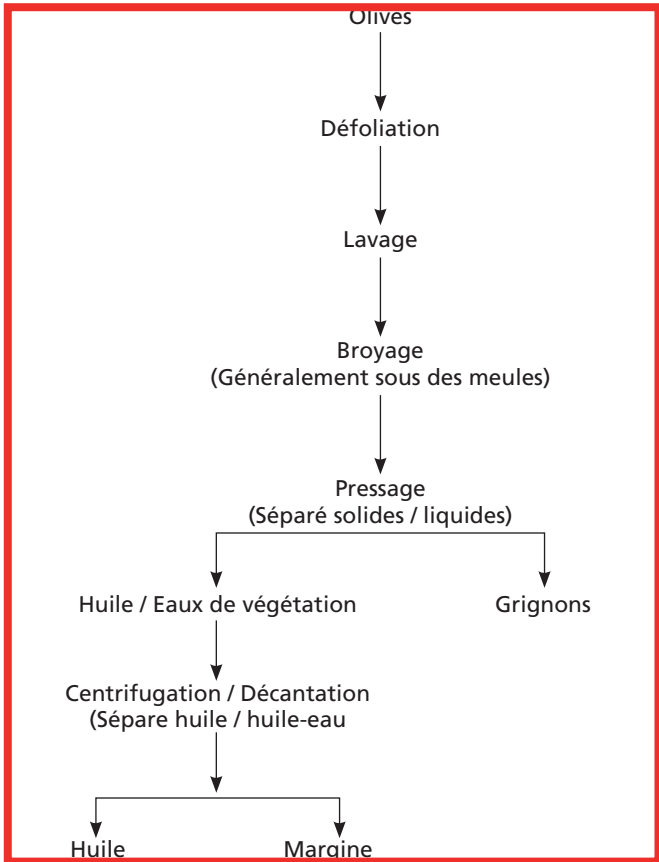
Het fijnmaken en het kneden resulteren in een deeg dat uit een vaste stof en vloeistof bestaat. De vaste stof wordt ook wel **perskoek** genoemd en bestaat uit delen van de pit, de schil, de celwand, enzovoort. De vloeistof bestaat uit olie en vruchtwater.

De scheiding van de perskoek en de olie en het vruchtwater gebeurt door druksystemen centrifuge en filtratieprocessen (*Caputo et al., 2003*). In de loop van deze processen werken verschillende toestellen volgens een bepaalde gevraagde fysieke kracht.

### Een drukproces

Klassieke druksystemen helpen de breekmachines. Het vermalen van de olijven met daarna het kneden wordt onder slijpstenen gedaan. Na ongeveer een halfuur ver-

krijgt men een deeg. Het deeg bestaat uit de perskoek en een beslag van olie en vruchtwater. De scheiding van de twee gebeurt door een simpel drukproces waardoor de olie wordt gescheiden van het vruchtwater door een natuurlijke bezinking.



**Figuur 10.** Extractie van de olijfolie door een traditioneel druksysteem



Vandaag wordt extractie door druk (fig. 9) uitgevoerd door hydraulische super-persers met een druk die tot 400 at m gaat. Het superdruk systeem werkt op een simpele wijze met een progressieve verhoging van de druk tot de maximale waarde na 45-60 minuten en die wordt behouden gedurende 10-20 minuten. Na de druk wordt een klein deel van het water gebruikt om het materiaal te spoelen en de olie over te zetten naar de bassins. De opbrengst van het behandelde product stijgt gemiddeld tot 86-90 % en de vochtigheid van de perskoek tot ongeveer 28 %.

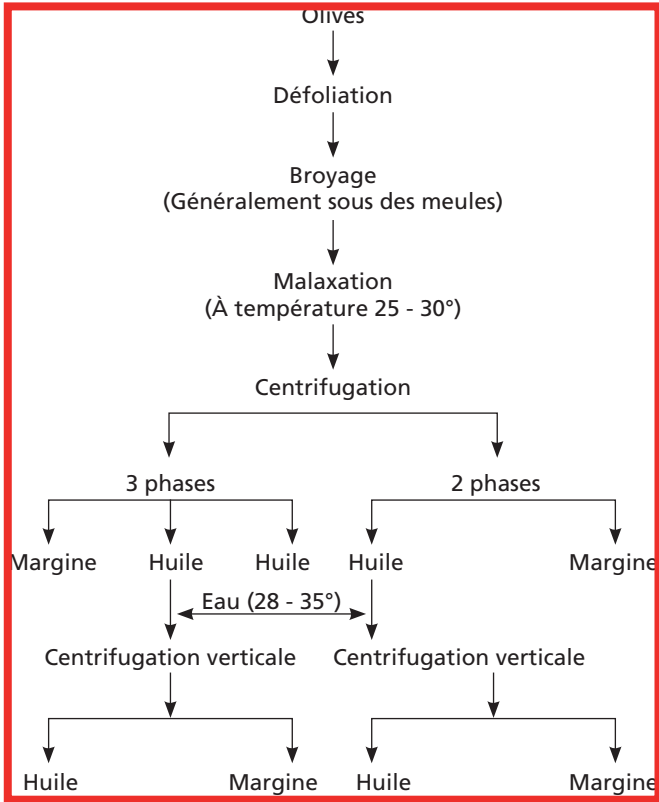
## **Centrifuge**

Deze methode is gebaseerd op de scheiding van de verschillende bestanddelen van een mengsel op basis van de dichtheid.

Als enkel de zwaartekracht wordt toegepast kan de snelheid van de scheiding extreem traag gaan. Toch kan de snelheid van de scheiding verhogen als het mengsel wordt onderworpen aan een artificiële zwaartekracht. Dit wordt verwezenlijkt met roterende machines waarvan de snelheid en de doeltreffendheid meteen afhangen van de draaisnelheid van de draaiingshoek. Zo komt er een verschil in de dichtheid van de vloeistoffen die worden gescheiden.

De machines die worden gebruikt zijn horizontale centrifuges die een draaisnelheid hebben die 3000 keer hoger is dan de natuurlijke versnelling van de zwaartekracht.

De constante centrifugering (fig. 10) omvat de volgende stappen: ontdoen van bladeren en wassen, fijnmalen van olijven, kneden van het olijvendeg, centrifuge met of zonder toevoeging van water voor het tweeledige en drieledige systeem, achtereenvolgens.



**Figuur 11.** Extractie van olijfolie door centrifugering.





## HOOFDSTUK 3

### De bewaaromstandigheden van de olijfolie

---

Olijfolie kan meerdere maanden worden bewaard. Tijdens de opslag kan de olijfolie organoleptische veranderingen ondergaan door de verhoging van de zuurgraad (door de lipasen) en de ontwikkeling van reacties van ranzigheid. Daarvoor moet een reeks voorzorgmaatregelen in acht worden genomen om olijfolie te bewaren:

- Tanks of trommels moeten worden gemaakt van ondoordringbaar en inert materiaal voor de olie,
- De olie moet worden afgeschermd van lucht, licht en temperatuurschommelingen,
- De olie moet in een stockruimte worden opgeslagen. Als de olie buiten wordt bewaard moeten de tanks worden voorzien van een bekleding om extreme temperatuurswisselingen te voorkomen,
- De olie moet op een temperatuur van 12-18° worden bewaard, zonder vorst of hitte. Zo niet wordt de olie gebroken wit, vrijwel vast met een opstapeling veroorzaakt door gedeeltelijke kristallisatie van tryglyceriden en verzadigde vetzuren tijdens de winter (bij een temperatuur onder de 10°).

Temperaturen boven de 22-25° moeten evengoed worden vermeden want dit versnelt biochemische modificaties en oxidatiefenomenen die tot de ranzigheid van de olie kunnen leiden. (*Sacchi, 2007*).





●●● DEEL 2

De chemische  
samenstellingen en  
eigenschappen van olijfolie

●●● POLYFENOLEN IN OLIJFOLIE, ONSCHATBAAR VOOR UW GEZONDHEID!

# HOOFDSTUK 1

## Olijfolie, een bron van antioxidanten en goede vetzuren

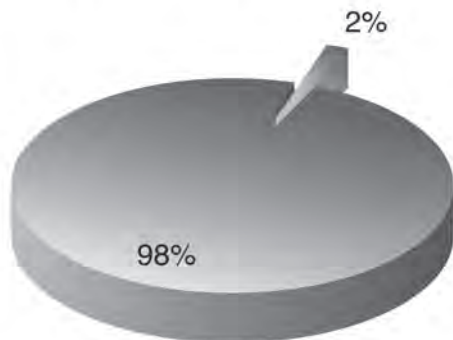
---

De chemische samenstelling van olijfolie bestaat uit hoofd- en secundaire bestanddelen (fig. 12). Olijfolie bezit een evenwichtige voedingswaarde met vetzuren en triglyceriden (98 % van het totale gewicht). De overvloed aan oliezuur, een enkelvoudig vetzuur, is de eigenschap die olijfolie onderscheidt van andere plantaardige oliën. Het oliezuur (C18:1 n-9) neemt 56-84 % in beslag van de vetzuren in olijfolie (Rossell, 2001), terwijl linolzuur (C18:2 n-6), een meervoudig onverzadigd vetzuur essentieel voor de menselijke voeding, 3 tot 21 % in beslag neemt (Tiscornia et al., 1982; Visioli et al., 1998). De secundaire bestanddelen beslaan ongeveer 2 % van het totale gewicht van de olie, met name, meer dan 230 chemische verbindingen, zoals alifatische en triterpeen alcoholen, plantensterolen, koolwaterstoffen, vluchtige verbindingen en polyfenolen (Servili et al., 2002).

Niettemin onderscheidt olijfolie zich van andere oliën door de aanwezigheid van fenolische verbindingen en andere bepaalde antioxidanten die de olijfolie een hoge weerstand verlenen tegen oxidatie met een unieke kleur en smaak. De voornaamste antioxidanten in olijfolie zijn caroteen en fenolische verbindingen, waaronder lipofiele en hydrofiele fenolen (Boskou, 1996). Het tocoferolgehalte (lipofiele fenolen) vindt men terug in oliën van andere groenten, terwijl sommige hydrofiele fenolen zoals Hydroxytyrosol in olijfolie meestal niet aanwezig zijn in andere oliën en vetten (Boskou, 1996; Shahidi, 1997).



■ Triglycérides & Acides gras libres    ■ Composés mineurs



**Figuur 12.** De chemische verbinding van olijfolie.

Bestanddelen	Extra virgin olijfolie*	Virgin olijfolie**	Geraffineerde olijfolie***
<b>Fraction glycérique</b>			
Fractie glycerine/ vetzuren (g/100g)			
<b>16:0 acide palmitique</b>	6.6	8.6	9.1
16:1n-7 palmitoleïnezuur	0.4	1.1	0.6
18:0 stearinezuur	2.8	1.9	3.4
18:1n-9 oliezuur	83.1	78.7	78.6
18:2n-6 linolzuur	5.1	8.3	6.2

**Tabel 3.** Principaux constituants de l'huile d'olive (Huang *et al.*, 2008).

Bestanddelen	Extra virgin olijfolie **	Virgin olijfolie **	Geraffineerde olijfolie ***
18:3n-3 $\alpha$ -linolzuur	0.6	—	0.4
18:3n $\alpha$ -linolzuur	0.4	—	0.5
Fractie non-glycerinezuur (mg/kg)			
alifatische alcoholen			
C <sub>18</sub> - C <sub>30</sub> alcoholen	≤200	≤200	≤200
Triterpeenalcoholen	500 -3,000	500 -3,000	500 -3,000
Totaal sterolen	1,260.8	687.4	1,366.6
Cholesterol	1.9	2.8	2.0
$\Delta^3$ -Avenasterol	91.5	35.1	82.7
B-Sitosterol	1,124.4	640.9	1,268.8
Sitosterol	7.3	2.3	1.1
Stigmasterol	8.2	6.4	12.0
Proteïnes (µg/kg)	1.76	1.76	1.76
Non-glyceride esters	100 250	100 250	100 250
Was	≤250	≤250	≤350
<b>Koolwaterstoffen</b>			
Squaleen	4,277	ND	2,598
$\beta$ -caroteen	0.33– 4.0	ND	ND
<b>Polyfenolen</b>	236	164	11

**Tabel 3.** Principaux constituants de l'huile d'olive (Huang *et al.*, 2008).

Bestanddelen	Extra virgin olijfolie *	Virgin olijfolie **	Geraffineerde olijfolie ***
• Lipofielen			
α-tocoferolgehalte	300	ND	200
Tocotriënen	ND	ND	None
• Hydrofiele stoffen	40-1,000	40-1,000	None
Hydroxytyrosol Tyrosol	Voornaamste fenolische verbindingen in olijfolie met een gemiddelde concentratie van 8mg/kg		

**Tabel 3.** Principaux constituants de l'huile d'olive (Huang *et al.*, 2008).

**\*Extra Virgin olijfolie** komt van de vrucht van de olijfboom. Het wordt enkel verkregen door mechanische processen of andere fysieke procedures onder thermische omstandigheden die niet leiden tot de wijziging van de olie en die geen andere procedures zijn ondergaan dan het wassen, decanteren, de centrifuge en het filteren. Het gehalte aan vrije vetzuren, uitgedrukt in oliezuren heeft een maximum gehalte van 1 gram per 100 gram.

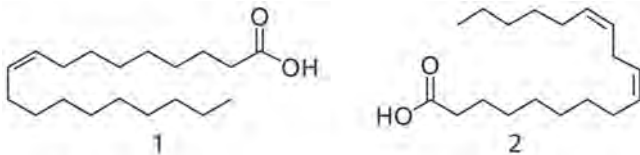
**\*\*Virgin olijfolie** wordt op dezelfde manier van de vrucht van de olijfboom verkregen als extra Virgin olijfolie, maar de vrije vetzuren, uitgedrukt in oliezuren hebben een maximum van 2 gram per 100 gram.

**\*\*\*Geraffineerde olijfolie** is de olie die wordt verkregen uit Virgin olijfolie door raffinagetechnieken die geen wijzigingen brengen in de oorspronkelijke glycerinestructuur.



# 1. Vetzuur, triacylglycerol en gedeeltelijke glyceriden

De vetzuren die aanwezig zijn in olijfolie zijn de volgende: palmitinezuur (C16:0), palmitoleïnezuur (C16:1), stearinezuur (C18:0), oliezuur (C18:1), linolzuur (C18:2), linoleenzuur (C18:3), myristinezuur (C14:0). Heptadecaanzuur en arachidinezuur komen in kleine mate voor. *Scano et al.*, (1999), vonden sporen van vacceenzuur en arachidinezuur bij het bestuderen van een staaltje olijfolie in NMR (kernspinresonantie).



**Figuur 13.** Structuur van de hoofdzuren in olijfolie (1) oliezuur, (2) linolzuur (*Amanda et al.*, 2010).

Het vetzuurgehalte in olijfolie hangt af van de productiezone, de breedtegraad, het klimaat, de soort en de rijpingsfase van de vrucht. *Baccouri et al.* (2008) hebben bewezen dat de verhouding oliezuuren/linolzuur de tendens heeft te verlagen naarmate de olijven rijper worden. Bovendien zijn de Italiaanse, Spaanse en Griekse oliën arm aan palmitinezuur en linolzuur. Ze tonen wel een verhoogd percentage oliezuurgehalte. De Marokkaanse en Tunesische oliën zijn rijk aan linol en palmitinezuur en armer aan oliezuur.

Aan de hand van de analyse van staaltjes uit verschillende landen kan olijfolie in twee types worden verdeeld:

- Oliën arm aan palmitine en linolzuur en rijk aan oliezuur.
- Oliën rijk aan linol en palmitinezuur en arm aan oliezuur.

Het vetzuurgehalte hangt af van de rijpheid van de olijf. *Ninni (1999)* toonde aan dat oliezuur zich eerst in de vrucht vormt en dat er een sterk antagonistisch verband bestaat tussen oliezuren, palmitinezuren, palmitoleïnezuren en linolzuren.

## 2. De polyfenolen in olijfolie, machtige antioxidanten

De term “polyfenolen” is ontstaan door de polaire fenolfractie in olijfolie (een verouderde term als men naar recente publicaties kijkt). Deze term wordt in de literatuur gebruikt om substanties te definiëren met een benzeenkern met een of meerdere hydroxylgroepen, met hun functionele derivaten inbegrepen (*Harborne, 1989*). De fenolische verbindingen die aanwezig zijn in olijfolie zijn extraheerbaar in het mengsel water/methanol en worden gewoonlijk aangeduid als biofenolen (*Uccella, 2001*).

In de laatste tien jaar is het onderzoek naar deze verbindingen aanzienlijk gestegen om verschillende redenen: de fenolische verbindingen zijn verbonden met de stabiliteit of weerstand van de olie, door hun biologische eigenschappen. Vooral fenolische verbindingen in olijfolie zoals **Hydroxytyrosol** en zijn derivaten zijn het onderwerp van vele studies met als doel het bepalen van het verband tussen voedingsopname en het risico op verschillende hart- en vaatziekten.

De fenolische fractie van olijfolie bestaat uit een heterogeen mengsel van bestanddelen. Elk van deze bestandde-

len beïnvloedt de chemische eigenschappen en heeft een bepaalde invloed op de kwaliteit van de olie (*Psomadiou et al., 2003*). De aanwezigheid van hydrofiele fenolen in de olie is al sinds 40 jaar aangetoond door *Cantarelli et Montedoro (1961; 1969)*.

## 2.1 De fenolische monomeren

De fenolische monomeren in olijfolie, die de zuren en de fenolische alcoholen hergroeperen zijn de volgende (in alfabetische volgorde): 4-acetoxy-ethyl-1, 2-dihydroxybenzeen, 1-acetoxypinoresinol, apigenin, koffiezuur, kaneelzuur (geen fenol), De zuren o- en p-coumaric, ferulazuur, galluszuur, HVA, 4-hydroxybenzoëzuur, Hydroxytyrosol, luteoline, Oleuropein, pinoresinol, protocatechuic acid, sinapic acid, "l'acide syringique", Tyrosol, vanillinezuur en vanilline. De aanwezigheid van elenol zuur 'l'acide élénolique' (geen fenol) in dezelfde fractie is verschillende keren aangetoond. (*Brenes et al., 2000, Morales et Tsimidou, 2000; Owen et al., 2000; García et al., 2001; Mateos et al., 2001; Boskou, 2002*).

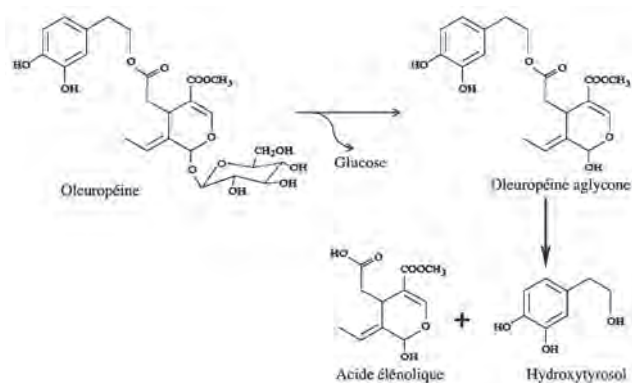
Tyrosol, Hydroxytyrosol en hun derivaten zijn de voornaamste vertegenwoordigers van de monomerenfractie.

Het meest polaire deel van het methanol/water extract bevat vrije fenolen en fenolzuren. Het minst polaire deel bevat aglycon Oleuropein (Hydroxytyrosol veresterd met elenolzuur) en ligstroside (Tyrosol veresterd met elenolzuur), luteoline en apigenin (flavones) alsook kaneelzuur en elenolzuur.

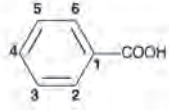
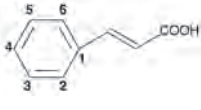
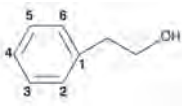
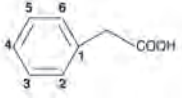
Bianco en zijn medewerkers (2001) ontdekten een nieuwe klasse fenolen: hydroxyl-iso-chromanen. De identificatie van twee delen van deze klasse: 1-phenyl-6, 7-dihydroxy-isochromane en 1 - (3-methoxy-4-hydroxy) phenyl-6, 7-dihydroxy-isochromane werden bevestigd

door de spectra van de fenolen te vergelijken. Ze werden van de olie gescheiden door extractie in de vaste fase, met de spectra LC-MS van de afgeleide bestanddelen van een reactie tussen Hydroxytyrosol aromatische aldehyde (benzaldehyde en vanilline). Eenzelfde reactie komt ook in de natuur voor. In dit geval speelt oliezuur als katalysator.

Hydroxytyrosol, aanwezig in de olijf, komt voor in een geglycosyleerde vorm maar wordt voornamelijk verbonden met zijn geësterde vorm in het aglycondeel van de Oleuropeïne. Tijdens de kneedprocedure is de Hydroxytyrosol bevrijd door de glucosidases en esterasen (Fig. 14). Dit hydrolytisch proces, die de kwantiteit van de carbonylverbindingen verbetert, bevordert de formatie van isochrome afleidingen.

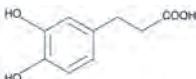
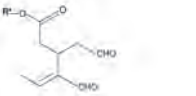
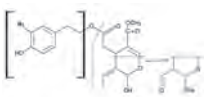
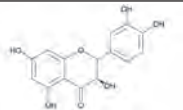
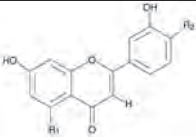
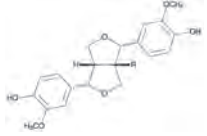


**Figuur 14.** De oorsprong van hydroxytyrosol l'hydroxytyrosol (Granados-Principal et al., 2010).

Samenstelling	Substitutiegroepen (PM)	Structuur
Benzoëzuur en zijn derivaten		
3-hydroxy-benzoëzuur p-hydroxy-benzoëzuur 3,4-dihydroxy-benzoëzuur Gentisinezuur Vanillinezuur Galluszuur Acide syringique	3-OH (138) 4-OH (138) 3,4-OH (154) 2,5-OH (154) 3-OCH <sub>3</sub> , 4-OH (168) 3,4,5-OH (170) 3,5-OCH <sub>3</sub> , 4-OH (198)	
Kaneelzuur en zijn derivaten		
<i>o</i> -coumaric zuur <i>p</i> -coumaric zuur Koffiezuur Ferulazuur Sinapic zuur	2-OH (164) 4-OH (164) 3,4-OH (180) 3-OCH <sub>3</sub> , 4-OH (194) 3,5-OCH <sub>3</sub> , 4-OH (224)	
Fenolalcoholen		
Tyrosol (( <i>p</i> -hydroxyphenyl) ethanol) of p-HPEA Hydroxytyrosol [(3,4-dihydroxyphenyl) ethanol] of 3,4-DHPEA	4-OH (138) 3,4-OH (154)	
Andere fenolzuren en hun derivaten		
<i>p</i> -Hydroxyphényllecétique zuur	4-OH (152)	
3,4-Dihydroxyphényllecétique zuur	3,4-OH (168)	
4-Hydroxy-3- méthoxyphényllecétique zuur	3-OCH <sub>3</sub> , 4-OH (182)	

**Tabel 4.** De fenolische verbindingen in Virgin olijfolie: naam van de verbinding, algemene chemische structuur en moleculaire gewicht (PM: g.mol<sup>-1</sup>), (Bendini et al., 2007).



Bestanddelen	Substitutiegroepen (PM)	Structuur
3-(3,4-Dihydroxy- phényle) propénoïque <b>Dealdehydevormen van secoiridoïdes</b> Décarboxyméthylvormen van anglycon en Oleuropein (3,4-DHPEA-EDA)	(182) $R_1-OH$ (304)	
Décarboxyméthylvormen van anglycon van ligstroside ( <i>p</i> -HPEA-EDA)	$R_1-H$ (320)	
<b>Aglycon secoiridoïdes</b>		
Anglycon Oleuropein of 3,4-DHPEA-EA	$R_1-OH$ (378)	
Anglycon ligstroside of <i>p</i> -HPEA-EA F	$R_1-H$ (362)	
Aldehydevormen van Oleuropein Anglycon	$R_1-OH$ (378)	
Aldehydevormen van Anglycon van ligstroside	$R_1-H$ (362)	
<b>Flavonolen</b>		
(+)-Taxifoline	(304)	
<b>Flavones</b>		
Apigenin	$R_1-OH, R_2-H$ (270)	
Luteoline	$R_1-OH, R_2-OH$ (286)	
<b>Lignanén</b>		
(+)-Pinoresinol	$R-H$ (358)	
(+)-1-Acetoxypinoresinol	$R-OCOCH_3$ (416)	
(+)-1-Hydroxypinoresinol	$R-OH$ (374)	

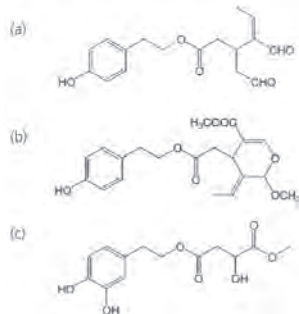
**Tabel 4.** De fenolische verbindingen in Virgin olijfolie : naam van de verbinding, algemene chemische structuur en moleculaire gewicht (PM: g.mol<sup>-1</sup>), (Bendini et al., 2007).

Bestanddelen	Substituegroepen (PM)	Structuur
Hydroxyisochromanes		
1-Phényl-6,7-dihydroxy-isochromane R 1-(3'-Methoxy-4'-hydroxy)phényle 6,7-dihydroxy-isochromane )	R <sub>1</sub> , R <sub>2</sub> -OH, R-H (242) R <sub>1</sub> -OH, R <sub>2</sub> -OCH <sub>3</sub> (288)	

**Tabel 4.** De fenolische verbindingen in Virgin olijfolie: naam van de verbinding, algemene chemische structuur en moleculaire gewicht (PM: g.mol<sup>-1</sup>), (*Bendini et al., 2007*).

De identificatie van Oleocanthal en andere fenolische verbindingen vonden recentelijk plaats (Fig. 15) (*Bianco et al., 2005; Beauchamp et al., 2005*). Nu moet er nog worden bepaald of deze verbindingen aanwezig zijn in specifieke oliën (op basis van specifieke cultivars) of ze toebehoren aan olijfolies van goede kwaliteit. Beauchamp en zijn medewerkers (2005), concluderen dat Oleocanthal, een verbinding met dezelfde farmaceutische capaciteit als ibuprofen<sup>®</sup>, een ontstekingsremmend geneesmiddel, enkel kan gevonden worden in vers geperst extra Virgin olijfolie en dat de aanwezigheid ervan verbonden is aan een tinteling in de keel.

**Figuur 15.** Onlangs geïdentificeerde fenolische verbindingen in olijfolie: (a) Oleocanthal, (b) methylacetaat van aglycon van ligstroside en (c)  $\beta$ -ester van methylhydroxytyrosolmalaat.



### 3. Het tocoferolgehalte

Het onderzoek naar de aanwezigheid en het gehalte van tocoferol in Virgin olijfolie toont aan dat buiten de acht bekende "E-vitameren", de  $\alpha$ -homoloog 90 % van het totale tocoferolgehalte beslaat. De  $\alpha$ -tocoferol komt in vrije vorm voor. De geregistreerde gehalten blijken een breed scala van  $\alpha$ -tocoferol per kg olie te bevatten. Dit hangt af van de cultivars en de gebruikte technologische procedures. De invoering van goede fabricatieprocessen en procedures voor de controle van de kwaliteit voor alle eetbare olijfolies heeft een positieve impact op het tocoferolgehalte. De gehalten die momenteel vastgesteld zijn, zijn veel hoger dan de gemiddelde waarde van 100 mg/kg vastgesteld in vroegere olijfolies (*Gunstone et al., 1994; Belitz et al., 2004*).

Het niveau van  $\alpha$ -tocoferol kan worden verbonden met de verhoogde kwantiteit chlorofylpigmenten en zijn gelijktijdige werking tegen zuurstofradicalen (*Grammes et Eskins, 1972*). De tocoferolconcentratie blijkt kleiner in rijpe vruchten. De data van hun invloed op het extractiesysteem varieert (*Psomiadou et Tsimidou, 1998; Beltran et al., 2005*). Het raffineren of hydrogeneren veroorzaken een verlies in het tocoferolgehalte (*Andrikopoulos et al., 1989; Rabascall et Riera, 1987*).

### 4. Koolwaterstoffen

Er zijn twee koolwaterstoffen in belangrijke mate aanwezig in olijfolie, squalen en  $\beta$ -caroteen. Squalen (2,6,10,15,19,23 hexaméthyl-2-,6,10,14,18,22 tétracosahexane) is de metaboliet die voorafgaat aan de formatie van de sterolenkern. Zijn aanwezigheid wordt deels aangenomen als verantwoordelijk voor de positieve effecten voor de gezondheid in olijfolie en voor zijn chemopreventieve acties tegenover bepaalde kankers (*Rao et al.,*

1998, *Smith et al., 1998*). Het is het hoofdbestanddeel van de onverzeepbare bestanddelen in olijfolie en beslaat meer dan 90 % van de koolwaterstoffen (*Perrin, 1992; Lanzón et al., 1994*). Zijn concentratie varieert van 200 tot 7500 mg per kg olie (*Perrin, 1992*). Zelfs de hogere concentraties tot 12 000 mg/kg zijn teruggevonden (*Lanzón et al., 1994*). Deze kwantiteit hangt af van de cultivar (*De Leonardis et al., 1998; Manzi et al., 1998*), van het extractiesysteem van de olie (*Nergiz et Ünal, 1990*) en bovendien vermindert het aanzienlijk tijdens het raffinageproces (*Mariani et al., 1992; Lanzón et al., 1994*). De variatie in de concentratie kan liggen aan twee verschillende geanalyseerde methodes (*Nenadis et Tsimidou, 2002*). De fractie van koolwaterstoffen in Virgin olijfolie bevat ook diterpenen en triterpenen, isoprenoïdale polyolefinen en n-paraffine (*Lanzon et al., 1994*).

## 5. Pigmenten

De olijfolie verkrijgt zijn groene en gele kleur door de chlorofyl en caroténoïden. Dit wordt ook beïnvloedt door de cultivar van de olijf, het rijpingsproces, het productiegebied, het extractiesysteem en de bewaarvoorwaarden. De kleur kan daarom worden beschouwd als een aanwijzing van de kwaliteit maar jammer genoeg bestaan er nog geen standaardmethoden om dit te meten.

De chlorofyl nemen hun magnesium ionen en veranderen deze in koperfeofytinen, wat groene en geelachtige pigmenten zijn. Onder deze laatstgenoemden is de  $\alpha$ -feofytine ( $\alpha$ -feo) de meest dominante (*Mínguez-Mosquera et al., 1990; Mínguez-Mosquera et al., 1991; Rahmani et Csallany, 1991; Gandul-Rojas et Mínguez-Mosquera, 1996; Psomiadou et Tsimidou, 2001*).





## HOOFDSTUK 2

# De analyse en kwantificering van polyfenolen in olijfolie

---

Het polyfenolgehalte is duidelijk verbonden aan de kwaliteit van de Virgin olijfolie en zijn bijdrage aan de stabiliteit van de antioxidanten van de olie is grotendeels geaccepteerd. De landbouwkundige en technologische voorwaarden van de productie van olijfolie beïnvloeden sterk de kwaliteit en de kwantiteit van de hydrofiële fenolische verbindingen. Om deze redenen is de identificatie en de kwantificatie van de bestanddelen van groot belang. Er zijn veel verschillende analyseprocedures voorgesteld om het volledige profiel van de fenolen te bepalen.

De colorimetrische methode die universeel wordt toegepast om de fenolische waarden te bepalen in de water-methanol extractie is gebaseerd op het reactieve gebruik van het Folinfenol. De resultaten worden over het algemeen uitgedrukt in het equivalent van koffiezuur (mg koffiezuur/ kg olie), andere fenolen die als standaard kunnen worden gesteld zijn galluszuur en looizuur (*Tsimidou, 1999*). De resultaten kunnen variëren, dit hangt af van de gebruikte norm en de relatieve concentratie van de verschillende bestanddelen (*Singleton et al., 1999; Hrnčirik et Fritsche, 2004*). Desondanks wordt de klassieke colorimetrische methode algemeen toegepast bij de kwantificatie van polaire fenolen, omdat deze een goede indicatie geeft van de stabiliteit van de olie (*Gutfinger, 1981; Aparicio et al., 1999; Blekas et al., 2002; Psomiadou et al., 2003*).

In het algemeen bestaat de analyseprocedure om de verschillende fenolische verbindingen in olijfolie te bepalen

uit drie fundamentele fasen: de extractie van de olie, de analyse van de scheiding en de kwantificatie. Het geheel van de technieken op basis van vloeistof-vloeistofextractie of van vaste fase-extractie (SPE-kolom) wordt gebruikt om de polaire fenolische fractie te isoleren van de olijfolie. De analytische technieken zijn gebaseerd op spectrofotometrische methodes, zoals de gaschromatografie (GC), de hogeprestatievloeistofchromatografie (HPLC) en de capillaire elektroforese (CE). De CE werd onlangs toegepast bij de analyse van fenolische verbindingen in olijfolie en was baanbrekend voornamelijk door zijn hoge resolutie. De techniek werd geoptimaliseerd door de volumevermindering in de steekproef en door een vermindering van de analyseduur (*Carrasco-Pancorbo et al., 2005*).



# De effecten van olijfolie op de gezondheid





## HOOFDSTUK 1

# De voordelen van olijfolie zijn voornamelijk te danken aan zijn polyfenolen

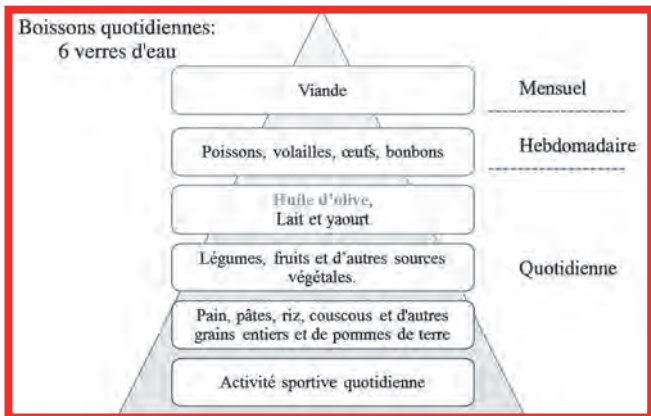
---

*Olijfolie zit boordevol antioxidanten, zoals polyfenolen en in het bijzonder Hydroxytyrosol en Tyrosol. Het helpt bij het behandelen en voorkomen van hart- en vaatziekten, kankers, diabetes, neurodegeneratieve ziektes, ontsteking en ouderdom. Het zijn antimicroben en spelen ook een belangrijke rol bij de versterking van het immuunsysteem en de bescherming van bepaalde weefsels en organen tegen de schade van oxidatie aan de hersenen, de lever, bloedcellen, spieren en slagaders.*

De interesse voor een mediterraan dieet is groter geworden over heel de wereld in de afgelopen tien jaar, zelfs bij voedingsdeskundigen buiten het Middellandse zee gebied. Dit komt grotendeels doordat het dieet wordt geassocieerd met een langere levensduur, een betere levenskwaliteit en aan het voorkomen van hart- en vaatziekten, kanker en cognitieve achteruitgang door ouderdom (*Trichopoulou et al., 2003; Trichopoulou et al., 2005*). Het mediterraan dieet is rijk aan gezonde vetten, het tegenovergestelde van aanbevolen diëten de afgelopen tientallen jaren werden aangeraden door menig voedingsdeskundige in andere geografische zones.

Nochtans is het hoofdbestanddeel van de vette stof in het mediterraan dieet (Fig. 16) afgeleid van een enkele voe-

dingsstof, olijfolie, wat betekent dat de voeding arm is aan verzadigde vetten maar rijk aan vetzuren, enkelvoudig en meervoudig onverzadigd en in het bijzonder, oliezuur.



**Figuur 16.** De voornaamste bestanddelen van mediterrane voeding.

In de afgelopen jaren zijn andere oliën met een gelijkwaardige vetsamenstelling beschikbaar gesteld voor de menselijke voeding, door de technologische vooruitgang. Het gaat om bepaalde olies verkregen uit verschillende soorten zaaizaad, waarvan sommige rijk zijn aan oliezuur zoals zonnebloem, soja en koolzaadolie. Deze situatie leidde tot een nieuw concept in het mediterraan dieet, waar het oliezuur niet meer noodzakelijkerwijs van olijfolie moet komen maar ook uit andere oliën kan worden gehaald.

Het mediterraan dieet werd gekoppeld aan een lage consumptie van vlees, een bron van verzadigde vetten en ook aan rijke plantaardige enkelvoudig onverzadigde vetten. Onderzoek heeft het belang benadrukt van plantaardige voeding (en ook van koolhydraten en onverteerbare vezels) en het regelmatige gebruik van olijfolie.

Met betrekking tot het hart- en vaatsysteem zijn de beschermende eigenschappen van olijfolie, tot recente data, enkel te danken aan zijn hoge gehalte van enkelvoudig onverzadigde vetzuren (EOV), voornamelijk oliezuur. De toevoeging van EOV brengt een hogere resistentie van LDL tegen oxidatie (*Bonanome et al., 1992*), wat de basis vormt voor een risicofactor voor coronaire hartziekten (*Witztum et Steinberg, 2001*). Bij wijze van een voorbeeld, heeft de FDA (Food and Drug Administration, USA) een gezondheidsclaim geautoriseerd voor de EOV in olijfolie en voor een lager risico op coronaire hartziekten (*FDA, P04-100, 2004*).

Meerdere observaties pleiten tegen de hypothese van oliezuren als de enige factor verantwoordelijk voor de basis van hart- en vaatziekten in mediterraan gebied. Het effect van EOV bijvoorbeeld op lipiden en circulerende lipoproteïnen is nog niet geheel duidelijk, hoewel de principiële effecten van EOV op het serumcholesterol over het algemeen beschouwd worden als indirect (*Belkner et al., 1993; Hegsted et al., 1993; Gardner et Kraemer, 1995*). Bepaalde studies (*Mensink et al., 2003*) hebben het directe cholesterolverlagende effect bewezen, weliswaar in bescheiden mate, van de EOV enkel wanneer ze de koolhydraten als energiebron vervangen. Daarbij verhogen de EOV het lipoproteïnegehalte met hoge dichtheid (HDL) meer dan de meervoudig onverzadigde vetzuren wanneer de twee vetzuurklassen de koolhydraten vervangen in de voeding (*Mensink et al., 2003*).

De positieve effecten van de consumptie van olijfolie gaan verder dan een verlaging van de cholesterol en de lipoproteïnes met een lage dichtheid. De belangrijkste klinische en biologische effecten van de rijke voeding van EOV (met name oliezuren) tegenover het metabolisme van lipoproteïnes, de schade van oxidatie, ontstekingen,

erectiestoornissen, bloeddruk, trombose en het metabolisme van koolhydraten, zijn door vele auteurs bestudeerd (Covas, 2009; Huang et al., 2008).

Oliezuur is een van de meest dominante vetzuren in de meest geconsumeerde levensmiddelen van dierlijke oorsprong, zoals gevogelte en varken. In tegenstelling tot de algemene overtuiging is het percentage van oliezuur in mediterrane voeding maar lichtelijk hoger dan die in andere westerse voeding, van bijvoorbeeld Noord Amerika (Dougherty et al., 1987; Katan, 1995). Het is daarom weinig geloofwaardig dat oliezuur alleen zorgt voor de positieve effecten van olijfolie op de gezondheid. Het is even interessant om vast te stellen dat meerdere soorten zaadolie, door genetische selectie verkregen en verkrijgbaar op de markt zoals zonnebloem, soja en koolzaadolie vandaag de dag rijk zijn aan enkelvoudig onverzadigde vetzuren maar zonder fenolische verbindingen. Deze oliën hebben niet hetzelfde effect als olijfolie op de verlaging van de cholesterol en lipoproteïnes met een lage dichtheid (Owen et al., 2000; Gunstone, 2004).

*Als oliezuur belangrijke beschermende effecten heeft op het hart, een lage hart- en vaatziekten incidentie en een langere levensduur met zich meebrengt, zou dit ook buiten het Middellandse zeegebied moeten zichtbaar zijn waar de consumptie van olijfolie niet zo hoog ligt.*

Het volgende hoofdstuk bespreekt het bewijsmateriaal dat aantoont hoe de fenolische verbindingen in olijfolie een rol spelen in de bescherming en behandeling van hart- en vaatziekten, kanker en andere aandoeningen in het mediterrane gebied.

## HOOFDSTUK 2

# De polyfenolen in olijfolie zijn erg biologisch beschikbaar en bioactief

---

Onder de **biologische beschikbaarheid** van een substantie verstaan we de proportie van deze substantie in de grote bloedsomloop na orale toediening en ook diens metabolisme, verspreiding en afbraak. Het is belangrijk om niet alleen te weten wat de dagelijkse kwantiteit ingenomen polyfenolen moet zijn maar ook hun biologische beschikbaarheid aangezien hun voedingskwaliteit en effecten op het systeem afhangen van hun absorptie in het maagdarmkanaal.

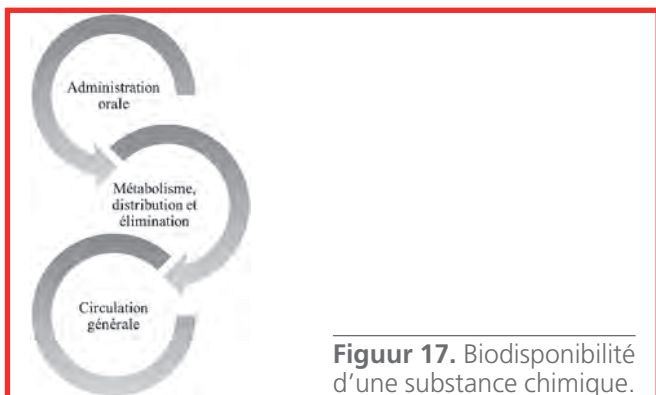
### 1. De absorptie van fenolische verbindingen

*De fenolische verbindingen in olijfolie zijn niet toxisch en hun absorptie hangt af van de toegediende dosis. Deze verbindingen zijn zeer biologisch beschikbaar als natuurlijke bestanddelen van olijfolie.*

Bai *et al.* (1998) hebben ontdekt dat de orale toediening van Hydroxytyrosol bij ratten leidde tot een snelle verschijning in het bloed, met maximale concentraties al verkregen in de volgende **5-10 minuten**. De Hydroxytyrosol is volledig afgebroken en/of gemetaboliseerd na 180 minuten na de inname.

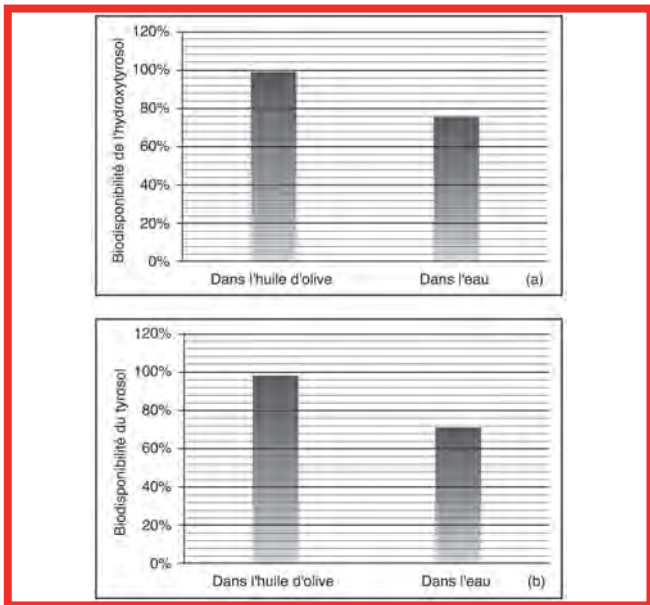
Visioli en zijn medewerkers hebben de absorptie van fenolische verbindingen van olijfolie in de mens bestudeerd. Zes vrijwillige mannen (tussen de 27 en 33 jaar)

kregen 50ml uit vier steekproeven van olijfolie boordevol Hydroxytyrosol (*Olivie Plus*). Na 24 uur werd er een urine-test afgelegd. De resultaten toonden dat de verhouding Tyrosol/Hydroxytyrosol in de urine gelijk is aan deze in de olijfolie (~1.7). Na de resultaten van deze auteurs kan men vaststellen dat het gehalte van de uitscheiding van Tyrosol/Hydroxytyrosol in de urine afhangt van de toegediende dosis. De gegevens laten uitschijnen dat fenolische verbindingen, ook Tyrosol en Hydroxytyrosol geabsorbeerd worden na toediening en worden uitgescheiden in de vorm van glucuronideconjugaat. In een andere studie heeft urineanalyse de aanwezigheid van twee andere metabolieten van Hydroxytyrosol aangetoond, homovanillinezuur (4-hydroxy-3-methoxy fenylazijnzuur) en homovanillyl (*Caruso et al., 2001*).



In een andere studie over biologische beschikbaarheid hebben Tuck *et al.* (2001) de absorptie en afbraak van radioactief gelabelde Hydroxytyrosol en Tyrosol bestudeerd bij mannelijke Sprague-Dawley ratten. Na de intraveneuze injectie (in een zoutoplossing) en orale toediening (in olijfolie en een waterige oplossing) van de beide verbindingen leidden de intraveneuze en orale toediening tot

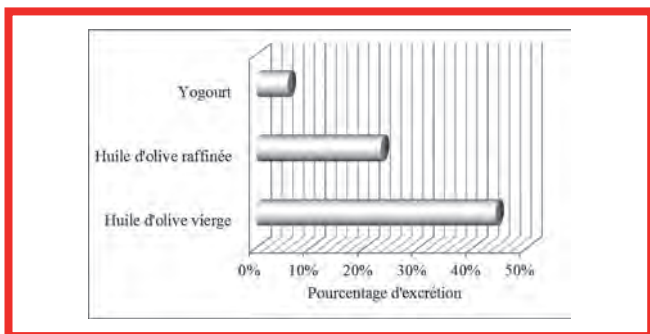
een significante afbraak in de urine na 24u, wanneer de verbindingen oraal werden toegediend langs een waterige oplossing. Bij Hydroxytyrosol en Tyrosol was er geen significant verschil te merken aan de afgebroken kwantiteit in de urine tussen intraveneuze injectie en orale toediening in een olieachtige oplossing. De analyse van de urinestaaltjes toonden de aanwezigheid aan van Hydroxytyrosol en vijf andere metabolieten. De schatting van de orale biologische beschikbaarheid van Hydroxytyrosol, wanneer hij in een olieachtige oplossing wordt toegediend en daarna in een waterige oplossing, bedraagt 99 % en 75 %. (Fig. 18a), terwijl de schatting van de biologische beschikbaarheid van Tyrosol 98 % en 71 % was, respectievelijk (Fig. 18b).



**Figuur 18.** De biologische beschikbaarheid van (a) Hydroxytyrosol en (b) Tyrosol naar het type van transportstof.



In 2003 hebben diezelfde Visioli et al. hun resultaten bevestigd voor de mens. Ze hebben de uitscheiding van Hydroxytyrosol in de mens vergeleken, wanneer deze als een natuurlijke verbinding van extra Virgin olijfolie werd geconsumeerd en toegevoegd aan geraffineerde olijfolie en yoghurt. De uitscheiding van Hydroxytyrosol was veel hoger na zijn toediening als een natuurlijke verbinding van olijfolie (44,2 % van Hydroxytyrosol) dan bij zijn toediening van geraffineerde olijfolie (23 % Hydroxytyrosol) of in yoghurt (5,8 % Hydroxytyrosol) (Fig. 19). Het verhoogde gehalte van de uitscheiding getuigt van een verhoogde absorptie van Hydroxytyrosol.



**Figuur 19.** Urinaire uitscheiding van hydroxytyrosol naar het type van transport.

In een andere studie slikten acht gezonde vrijwilligers 100 g extra Virgin olijfolie. Staaltjes van hun bloed werden op verschillende momenten na de toediening genomen. De onderzoekers concludeerden dat de fenolische verbindingen in olijfolie geabsorbeerd waren in de darmen. Dit echter langs een weg die onafhankelijk is van de formatie van chylomicronen (lipoproteïnes die zich bij de spijsvertering vormen, die verantwoordelijk zijn voor het transport van lipiden in de dunne darm naar de perifere vetweefsels, waar ze worden aangepast). De verbindingen kun-

nen een belangrijk effect als antioxidant uitoefenen in vivo, waarschijnlijk in de postprandiale fase (*Bonanome et al., 2000*).

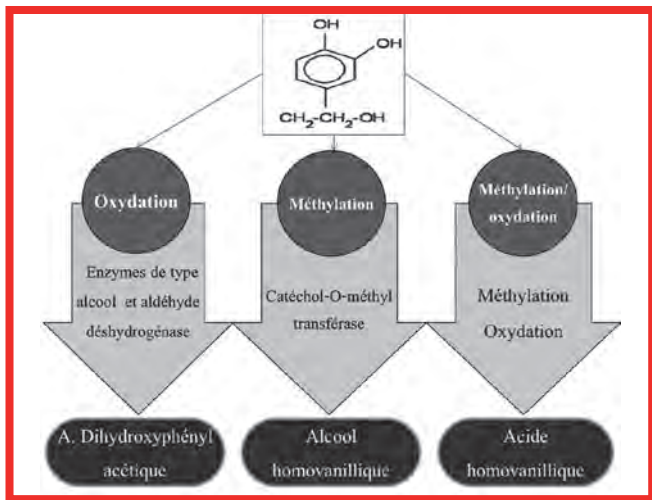
Nog een andere studie bestudeert de supplementaire absorptie van polyfenolen in Virgin olijfolie bij proefpersonen met ileostoma. Vissers et al. (2001) ontdekten dat de fenolische verbindingen vooral worden geabsorbeerd in de dunne darm. De absorptie wordt bewezen door de uitscheiding van tyrosol en hydroxytyrosol in de urine. Er werd geschat dat de zichtbare absorptie van de fenolische verbindingen ongeveer 55-66 % stegen boven de ingenomen dosis. In een kwantitatieve studie ontdekten Ruiz-Gutierrez et al., (2000) dat het gehalte hydroxytyrosol in het bloed ongeveer 5 % is na 5 minuten na de inname.

Manna et al. (2000) bestudeerden de moleculaire mechanismen van het transport in het darmkanaal van hydroxytyrosol. Ze gebruikten ondertussen de cellen Caco-2 met een monolaag, gedifferentieerd als model voor het menselijke darmepitheel. De kinetische gegevens suggereren dat het transport van [<sup>14</sup>C]-hydroxytyrosol door een passief en tweerichtingsmechanisme van verspreiding werkt. De waarde van de coëfficiënt van de berekende zichtbare doorlaatbaarheid suggereert dat de hydroxytyrosol voor 100 % in het darmkanaal wordt geabsorbeerd. Deze gegevens versterken de stelling dat hydroxytyrosol een hoge biologische beschikbaarheid heeft.

## 2. Het metabolisme

Na de intraveneuze toediening van [<sup>14</sup>C]-hydroxytyrosol bij ratten, is minder dan 8 % van de geregistreeerde radioactiviteit aanwezigheid in het bloed 5 minuten na de injectie (6 % verbonden aan plasma en 2 % aan celfracties). Slechts 0,1 % van de toegediende dosis die cor-

respondeert met de detecteerbare hydroxytyrosol in het bloed vijf uur na de toediening. Ongeveer 90 % van de toegediende radioactiviteit werd gevonden in de urine in de volgende vijf uur, terwijl ongeveer 5 % in de feces en de inhoud van het maagdarmstelsel werd teruggevonden. De [<sup>14</sup>C]-hydroxytyrosol is enzymatisch omgezet in vier derivaten van oxides en/of gemethyleerd. Een significant deel van de totale radioactiviteit werd geassocieerd met vormen van zwavelzuurconjugaten, wat evenwel de hoofdproducten van de uitscheiding in urine vertegenwoordigt. Op basis van deze resultaten hebben meerdere onderzoekers (Fig. 20) een metabolische weg voorgesteld van de exogene toediening van hydroxytyrosol waaronder catechol-O-methyltransferase, alcoholdehydrogenase, aldehydedehydrogenase en fenolsulfotransferase (D'Angelo et al., 2001).



**Figuur 20.** De belangrijkste metaboliseroutes van hydroxytyrosol in de mens zoals voorgesteld door D'Angelo et al., (2001).

Drie groepen van mannelijke Sprague-Dawley ratten kregen 1,5 of 10 mg/kg vruchtwaterextracten, 41,4; 207 en 414 µg/kg hydroxytyrosol verschaffend, respectievelijk. De hydroxytyrosol werd geabsorbeerd en uitgescheiden in de urine, voornamelijk in de vorm van glucuronideconjugaat. Ongeveer 25 % van de totale toegediende dosis hydroxytyrosol werd teruggevonden in de urine (in vrije vorm en in de vorm van glucuronideconjugaat).

Caruso *et al.* (2001) bestudeerden de metabolisatieroute van hydroxytyrosol na de inname van Virgin olijfolie (50 ml, 7 tot 23 mg hydroxytyrosol bevattend in het totaal) bij zes gezonde mannelijke vrijwilligers. De resultaten suggereren dat het metabolisme van hydroxytyrosol het enzym catechol-O-methyltransferase nodig heeft.

Ter samenvatting, meerdere onderzoekers toonden de grote biologische beschikbaarheid aan van hydroxytyrosol in de mens na de orale toediening van olijfolie. Deze studies bewezen de aanwezigheid van hydroxytyrosol in de urine en in het bloed. Het is ook goed om weten dat Oleuropein, evenzeer aanwezig in olijfolie, kan worden geabsorbeerd en gehydrolyseerd in hydroxytyrosol.

### 3. Uitscheiding

Visioli *et al.* (2003) bestudeerden de uitscheiding van vrije hydroxytyrosol in urine en geconjugeerd bij ratten en mensen na de toediening van olijfolie. De resultaten van deze studie tonen aan dat na 24 u de mens 31 % van de hydroxytyrosol uitscheidt en de ratten maar 5 %.

In een opeenvolgende studie bewezen Miro-Casas *et al.* (2003b) een verhoogde concentratie hydroxytyrosol na de inname van eenzelfde dosis (50 ml) en in de consumptie op korte termijn (25 ml per dag voor een week) Virgin olijfolie bij zeven gezonde personen. Miro-Casas *et al.*

(2003a) toonden ook een verhoging aan van de concentratie van hydroxytyrosol en 3-O-methyl-hydroxytyrosol in het plasma na de inname van Virgin olijfolie (25 ml) bij de mens, ze bereikten maximale concentraties na 32 en 52 minuten, respectievelijk. De schatting van de halfwaardetijd van de afbraak van hydroxytyrosol was 2,43 uur, terwijl de maximale concentratie 26 µg/l was. Op basis van deze resultaten blijkt 98 % van de hydroxytyrosol aanwezig in het plasma en in urine in conjugaatvorm, voornamelijk glucuronideconjugaat, wat kan betekenen dat een eerste metaboliseroute lang de darmen/lever gaat van de ingenomen hydroxytyrosol.

In een vervolgonderzoek van de absorptiestudie bij de urinestaaltjes identificeerden Tuck *et al.* (2002) drie metabolieten van de hydroxytyrosol door middel van massaspectroscopie (MS/MS in tandem): het monosulfaatconjugaat, het 3-O glucuronideconjugaat en 4-hydroxy-3-methoxyfenolzuur (homovanillinezuur). Tuck en Hayball (2002) toonden aan dat de hydroxytyrosol werden uitgescheiden in de nieren in vrije vorm en geconjugeerd in de volgende samenstellingen: glucuronide, sulfaat, homovanillinezuur, homovanillylalcohol, 3,4-dihydroxyfenolzuur en 3,4-dihydroxyfenolzuuraldehyde.



## HOOFDSTUK 3

### De kracht van antioxidanten in polyfenolen van olijfolie

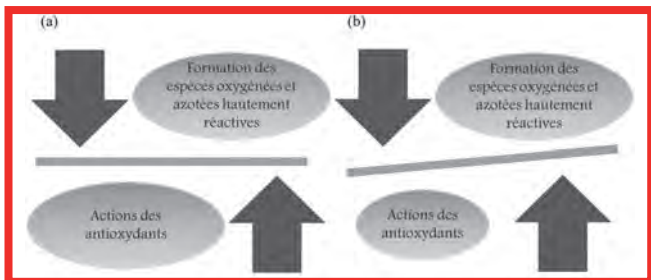
---

De homeostase op celniveau en op het niveau van het lichaam, komt overeen met het evenwicht tussen de formatie van zuurstofsoorten en hoog reactieve stikstof en de actie van antioxidanten wanneer ze acceptabele gehalten van hun substanties behouden en hun niet specifieke reacties tegenover biomoleculen (nucleïnezuren, proteïnes, vetzuren, etc.) minimaliseren (Fig. 21) wat kan leiden tot degeneratieve ziektes (atherosclerose, kanker, diabetes, reumatoïde artritis en ontstekingsziektes) (*Pérez-Jiménez, 2006*).

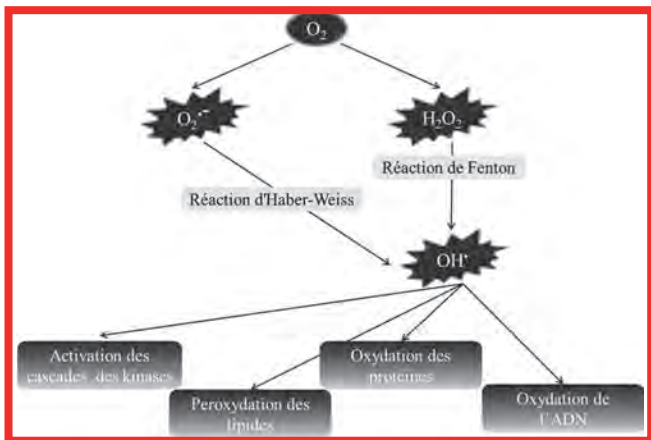
Een vrije radicaal is een chemisch gegeven, een atoom of een molecule, met niet gepaarde elektronen. Deze verbinding is zeer instabiel en kan reageren met de meest stabiele moleculen om het elektron te koppelen. Het kan ofwel het elektron afbreken (zoals bij oxidatie) ofwel het overdragen (zoals bij een reductiemiddel). Deze eerste actie leidt meestal tot een kettingformatie van nieuwe radicalen, wat verklaart dat de productie van een eerste vrije radicaal belangrijke schade aan de cel kan berokkenen. Zuurstof is een bi-radicaal, door twee atomen gevormd met in zijn buitenste banen twee niet gepaarde elektronen. De stof is daarom vatbaar om een dan wel twee elektronen te vangen om gedeeltelijk  $O_2^{\cdot-}$  en dan  $H_2O_2$  te verminderen. Het ligt ook aan de basis van de formatie van reactieve zuurstofsoorten (Reactive Oxygen Species: ROS), radical hydroxyle (OH.).

De benaming ROS omsluit ook de vrije radicalen van zuurstof (Fig. 21 : anion superoxide  $O_2^{\cdot-}$ ) maar ook bepaal-

de derivaten van niet radicalen van zuurstofsoorten, waar de toxiciteit even belangrijk is als de waterstofperoxide ( $H_2O_2$ ).



**Figuur 21.** Het evenwicht tussen de formatie en eliminatie van zuurstofsoorten en hoog reactieve azoten, normale geval en (b) geval van oxidatieve stress



**Figuur 22.** Schema van de verschillende vormen van ROS (Gutteridge et Halliwell, 1992).

De anion superoxide is een negatief geladen radicaal afkomstig van de monovalente vermindering van moleculaire zuurstof in een elektron. De disproportioneeringsreactie van deze  $O_2^{\cdot -}$  leidt tot de formatie van fundamentele

zuurstof en waterstofperoxide.  $H_2O_2$  is geen vrije radicaal in letterlijke zin maar hij is extreem reactief en heeft krachtige antioxidanten. Bovendien kan de stof zich bevinden op een grote afstand van zijn plaats van productie door zijn eigenschap om zich te verplaatsen door de biologische membranen.

Volgens de Fenton reactie breekt  $H_2O_2$  zichzelf af bij ferro-ionen ( $Fe^{2+}$ ), in een  $OH^\bullet$  ion en een hydroxylradicaal:



Deze reactie onderbreekt zichzelf snel bij de uitputting van ferro-ijzer, behalve in het bijzijn van anion superoxide dat  $Fe^{3+}$  in  $Fe^{2+}$  herstelt volgens de reactie van Haber-Weiss:



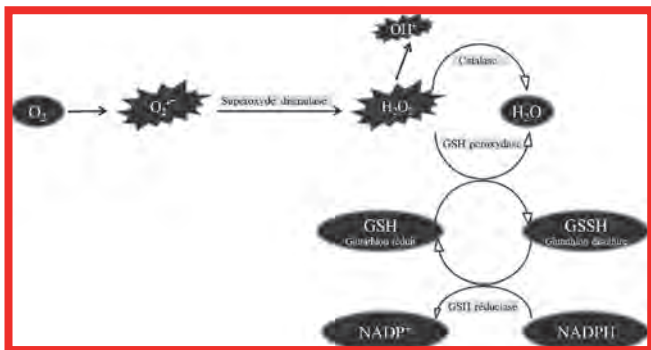
De gelijktijdige aanwezigheid van waterstofperoxide, anion superoxide en ijzer staat de productie van hydroxylradicalen toe. De  $OH^\bullet$ , met een halfwaardetijd van een nanoseconde, is de meeste instabiele en meest reactieve van alle derivaten van de zuurstofstoorten. De beperkte verspreiding van dit radicaal staat toe met veel verschillende andere moleculen te reageren in zijn nabijheid (proteïnes, lipiden, ADN,...) wat leidt tot schade aan de cellen. De  $OH^\bullet$  lijkt een grote rol te spelen cytotoxiciteit van de ROS net zoals radicalensoorten (*Gutte-ridge et Halliwell, 1993*).

*Een antioxidant kan gedefiniëerd worden als alle substanties die, als ze in zwakke concentraties voorkomen tegenover een oxideerbaar substraat, de oxidatie aanzienlijk vertragen of verhinderen in dat substraat. Halliwell et al., 1999).*



# 1. Enzymatische antioxidantensystemen

De enzymatische antioxidanten (Fig. 23) (superoxide dismutase, het katalase-enzym, glutathionperoxidase en glutathionreductase) worden beschouwd als de eerste verdedigingslinie van ons lichaam tegen ROS.



**Figuur 23.** Schema van de bescherming van enzymatische antioxidantensystemen.

# 2. Niet-enzymatische antioxidantensystemen

**Biologische metaalbinders:** verhinderen de deelname van metaalionen in overgang in de formatie van het hydroxylradicaal en andere hoog reactieve stoffen.

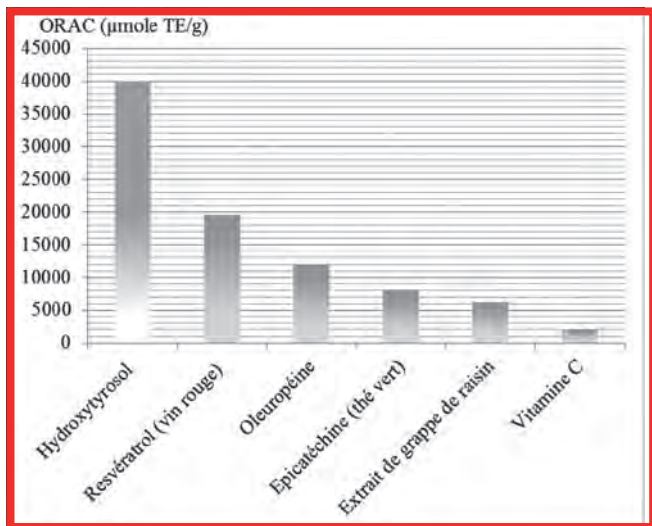
**Moleculen die de verspreiding van oxidatie tegen gaan:** deze moleculenklasse handelt wanneer een oxide-rende reactie wordt gestart ondanks de aanwezigheid van de biologische antioxidantensystemen. Het is een grote molecuulencategorie die een cruciale rol speelt in het strijd-proces tegen hoog reactieve stoffen. Deze klasse omvat verschillende hydrofiele en hydrofobe soorten met een laag of een hoog moleculair gewicht:

- Polyfenolen (in olijfolie);
- Tocoferolen, vitamine E (in olijfolie);
- Carotenoïden (in olijfolie);
- Ascorbinezuur (vitamine C);
- Glutathion;
- Bepaalde aminozuren (zoals cysteïne, methionine of tyrosine);
- Urinezuur.

De voornaamste actie van deze antioxidanteklasse is het reageren met vrije radicalen om minder reactieve radicalen te vormen die niet in staat zijn om met biomoleculen te reageren, of om op chemische wijze een beschadigd doelwit te herstellen.

*Olijfolie bevat veel meer beschermende substanties met een groot antioxidanteneffect dan rode wijn, groene thee en vitamine C. De vrije radicalen zijn op een efficiënte manier gevangen door de polyfenolen in olijfolie, wat de grote kracht van de antioxidanten verklaart.*

De exogene antioxidanten hebben een dubbele functie: ze verhinderen de oxidatie in voedsel, in het bijzonder in lipiden en ze verhogen tegelijkertijd het gehalte van endogene antioxidanten wat een bescherming tegen degeneratieve ziektes met zich meebrengt. De belangrijkste antioxidanten in voeding zijn bepaalde vitamines (ascorbinezuur, tocoferolen, carotenen) en fenolische verbindingen die in verschillende plantaardige voeding, kenmerkend voor de mediterrane voeding, zijn terug te vinden, zoals olijfolie (Edwin et al., 2011).



**Figuur 24.** De kracht van antioxidanten zoals hydroxytyrosol (de belangrijkste fenolische verbinding in olijfolie) tegenover andere antioxidanten. (de capaciteit om zuurstofradicalen te absorberen).

### 3. De polyfenolen in olijfolie, verbindingen van krachtige antioxidanten

Fenolische verbindingen kunnen op verschillende manieren handelen als antioxidanten. In de systemen die metaaloxiden gebruiken in overgang zoals koper en ijzer kunnen ze deze metaalionen binden, die de Fenton reactie in werking stellen en kunnen hoge concentraties van hydroxylradicalen genereren (Fig. 21) (*Halliwell & Gutterige, 1990; Halliwell et al., 1995*). De belangrijkste activiteit van antioxidanten is verbonden aan de anti-radicalen capaciteit, de reactieketting brekend die losgelaten is door de vrije radicalen. De antioxidanteneigen-

schap van de polyfenolen is verbonden aan hun capaciteit om intramoleculaire waterstofbruggen te maken tussen hydroxiele groepen en fenoxyl-radicalen (*Visioli & Galli, 1998b*). Gelijkaardige studies naar de flavonoïden hebben al aangetoond dat de graad van de activiteit van antioxidanten gerelateerd is aan het aantal hydroxiele groepen (*Rice-Evans et al., 1996; Cao et al., 1997*). Het aantal hydroxiele groepen en hun positie in de aromatische ring zijn bepalend voor de activiteit van de flavonoïden en de polyfenolen. De studie naar de resonantiestructuren die gevormd zijn tijdens oxidatieprocessen heeft het mogelijk gemaakt om aan te tonen dat de vervangen ortho en para verbindingen stabiel zijn dan de meta substituties (*Finotti et Di Majo, 2003*). In het bijzonder bevordert de substitutie orthodifenol (orthodiphénolique) een hoge antioxidantencapaciteit, terwijl een enkele hydroxyl substitutie, zoals bij tyrosol, geen hoge activiteit verleent, zolang de tyrosol de lipoproteïnes met een lage dichtheid (LDL) niet beschermt tegen de schade die op chemische wijze wordt veroorzaakt door oxidatie.

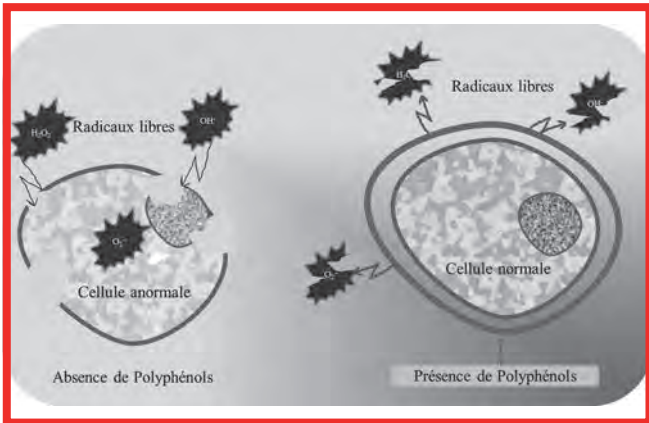
Olijfolie bevat een relatief zwakke concentratie van  $\alpha$ -tocoferol, de stof die bekend staat om zeer resistent te zijn tegen de afbraak van oxidatie. Dit komt, toch deels, door het relatief lage gehalte van meervoudig onverzadigde vetzuren, maar bovenal aan **het hoge gehalte van fenolische verbindingen**. De activiteit van antioxidanten van fenolische verbindingen in olijfolie en in het bijzonder van hydroxytyrosol en oleuropein is bestudeerd in verschillende experimentele modellen die gebruik maken van metalen in overgang; de oxidatie van LDL op chemische manier veroorzaakt; de formatie van ROS, bijvoorbeeld het radicaal superoxide, het radicaal trichloromethylperoxide en hypochloorzuur (*Aeschbach et al., 1994; Salami et al., 1995; Visioli et al., 1995a, 1998; Aruoma et al., 1998*). Door te kijken naar de activiteit van de antioxidanten van

fenolische verbindingen en hun capaciteit om peroxides af te remmen, is bewezen dat koffiezuur hydroxytyrosol en protocatechuiczuur een grotere anti-radicalenactiviteit hebben (*Papadopoulos & Boskou, 1991*). De antioxidan-tenactiviteit in oleuropein en hydroxytyrosol is evenzeer aangetoond op celmodellen en in vivo bij dieren (*Manna et al., 1997; Speroni et al., 1998*).

Keceli et Gordon (2001) hebben de activiteit van antioxidanten van  $\alpha$ -tocoferol vergeleken met extracten van fenolische verbindingen van olijven en olijfolie over een bepaalde duur. Het is bewezen dat in de eerste 15 minuten de activiteit van  $\alpha$ -tocoferol hoger was maar ze stopt ook heel snel. Het extract van olijven en olijfolie blijft langzaam de concentratie van radicalen verminderen; na de reactie van 60 minuten, zijn de extracten van olijven en olijfolie veel actiever dan de  $\alpha$ -tocoferol. Deze activiteit kan men nog zes uur waarnemen.

Het effect van de antioxidanten van de polyfenolen in olijfolie op de integriteit en de functie van de cellen zijn bestudeerd bij erythrocyten en darmcellen (Caco-2). Polyfenolen hebben de eigenschap om schade in de cellen te voorkomen. Dit werd geverifieerd door blootstelling aan oxidatieve stress in het bijzijn van  $H_2O_2$ . De mense-lijke erythrocyten werden gekozen omdat ze de cellen zijn die het meest worden blootgesteld aan oxidatieve risico's, omdat ze de specifieke rol hebben zuurstof te transporteren. Het hoofddoel van  $H_2O_2$  is hemoglobine, wat ge-oxideerd is in methaemoglobine. de spontane oxidatie van hemoglobine produceert anion superoxide radicalen, wat een disproportioneeringsreactie veroorzaakt bij  $H_2O_2$  (Fig. 21). In het bijzijn van verminderde metaalionen, in het bijzonder ijzer, vormen deze verbindingen een hoog reactief hydroxylradicaal dat het celmembraan kan scha-

den, wat ook de hemolysis van de cellen kan veroorzaken (Sadrzadeh *et al.*, 1984; Van Dyke & Saltman, 1996). In normale fysiologische omstandigheden zijn de ROS snel door twee enzymatische en niet-enzymatische systemen afgebroken. Als de productie van ROS buitensporig wordt of als de bescherming van de antioxidanten afzwakt, kan grote schade door oxidatie voorkomen, zowel aan het plasmamembraan als aan de cytosol, wat uiteindelijk naar hemolyse leidt.



**Figuur 25.** Schema van het beschermende effect van de polyfenolen in olijfolie tegen vrije radicalen.

De erythrocyten die door de fenolische verbindingen uit extra Virgin olijfolie behandeld zijn bieden weerstand tegen de oxidatie van de lipiden en de hemolyse na oxidatieve stress veroorzaakt door  $H_2O_2$ . Hydroxytyrosol verhindert de wijziging van het transport van aminozuren door  $H_2O_2$  in de intacte erythrocyten (Manna *et al.*, 1999). Ook in cellen bij darmtumoren (Caco-2) die door  $H_2O_2$  worden behandeld, heeft de preventieve behandeling van polyfenolen in olijfolie een krachtige antioxidantenwerking. De voorverwarming van (Caco-2) cellen met hydroxytyro-

sol verhinderen in het geheel de wijzigingen veroorzaakt door  $H_2O_2$  (Manna et al., 1999).



## HOOFDSTUK 4

# De polyfenolen in olijfolie en hun effect tegen ouderdom

---

*Hydroxytyrosol is een krachtige fenolische verbinding van olijfolie en verhoogt de productie van mitochondrieën. Het verhoogde aantal mitochondrieën in de cel is een aanwijzing van jeugdigheid van het lichaam en een goede gezondheid.*

Ouderdom is een fysiologisch complex proces waar de functies van meerdere organen in het systeem verslechteren (Sung et al., 2005). Verschillende auteurs toonden aan dat de veranderingen en schade gerelateerd aan ouderdom meteen verbonden zijn met oxidatieve stress en met geactiveerde ontstekingsreacties van vrije radicalen, hoog reactieve chemische soorten (Sung et al., 2005).

Deze schade is duidelijker op het niveau van de mitochondrieën, alom tegenwoordige organieten in de cellen, een overweldigende hoeveelheid reacties van redoxreacties die energie produceren door voedingsstoffen te converteren naar trifosfaat adenosine (ATP), moleculen die gebruikt worden bij de normale functies en de integriteit van de cellen. De mitochondrieën worden gelijkwaardig betrokken bij de regulatie van de celoverleving. Onlangs werd er gesuggereerd dat het verlies van de mitochondriale functie niet enkel ziektes veroorzaakt maar ook een belangrijke rol speelt in het ouderdomsproces (Raedersdorff et al., 2010).



Een vermindering in het aantal mitochondriën in bepaalde organen en een aanpassing van de mitochondriale ademhalingsketen worden vaak geassocieerd met het ouderdomsproces en worden beschouwd als een belangrijke factor van veroudering (*Hao et al., 2010*). Gezonde oude personen tussen 65 en 75 toonden tekenen van modificatie van mitochondriale eigenschappen getekend door een verlies van enzymatische oxidatieve mitochondriale activiteit en de inhoud van weefsels (*Raederstorff et al., 2010*). Bovendien tonen weefsels van oude dieren een verandering in de mitochondriale structuur verbonden met een zwakke productie van energie. Ouderdom wordt ook geassocieerd met een verminderde mitochondriale biogenese en een accumulatie van mitochondriale schade.

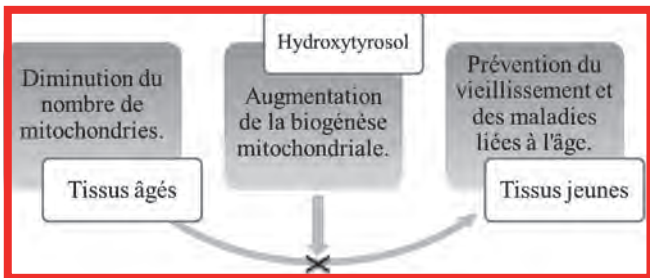
## 1. Het positieve effect van hydroxytyrosol op de mitochondriale biogenese

De mitochondriale biogenese heeft betrekking op het groeiproces, de amplificatie en het gezonde onderhoud van de mitochondrie. Het is een complex proces dat nucleaire en mitochondriale acties betreft. Het mitochondriale DNA code voor een klein aantal proteïnes worden vertaald in de ribosomen van de mitochondriën. Het merendeel van de proteïnen zijn hydrofobe subgroepen van de ademhalingsketen in het mitochondriale interne membraan. Het merendeel van de mitochondriale proteïnes zijn gecodeerd door een nucleair DNA en vertaald in de cytosolische ribosomen en daarna getransporteerd naar de mitochondriën. De proteïnes bevatten de structuurproteïnes, de enzymen of de enzymatische subgroepen, de bestanddelen van vermenigvuldiging, van de transcriptie, de vertaling en de begeleidde proteïnes.

De PGC-1 $\alpha$  (peroxisome proliferator activator receptor  $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$ ) is een co-transcriptionele regulatiefactor van het energetische celmetabolisme die de mitochondriale biogenese aangaat en dus, de controle over de mitochondriale functie. De vermindering van PGC-1 $\alpha$  in oude weefsels is een belangrijke factor in de mitochondriale stoornis die kan worden voorzien door een verhoging van PGC-1 $\alpha$  door een verhoogde mitochondriale biogenese.

Raederstorff en zijn medewerkers hebben bewezen dat hydroxytyrosol de mitochondriale functie verbeterd door de activatie van complexiteiten op de mitochondriale ademhalingsketen en de verhoging van de mitochondriale biogenese die de expressie van PGC-1 $\alpha$  teweegbrengt. In die zin hebben Hao en zijn collega's (2010) aangetoond dat de concentratie de 0.1 tot 10  $\mu\text{mol/l}$  hydroxytyrosol de expressie van de PGC-1 $\alpha$  factor stimuleert en zijn afgeleide doelgroepen, wat leidt tot een verhoging van het mitochondriale DNA (ADNmt) en het aantal mitochondriën in adipocyten 3T3-L1.

Een verbetering van de mitochondriale functie kan de ouderdom van cellen voorkomen en bijgevolg de ouderdom van het lichaam (Fig. 26). Ter conclusie, hydroxytyrosol kan beschouwd worden als een nuttige actie tegen ouderdom en ziektes die hiermee gepaard gaan.



**Figuur 26.** Het anti-ouderdomseffect van hydroxytyrosol.

## 2. Het anti-ouderdomseffect van polyfenolen in olijfolie sur les cellules cardiaques

Mukherjee en zijn medewerkers (2009), bestudeerden de capaciteit van hydroxytyrosol en tyrosol, ook andere bronnen van polyfenolen hebben de expressie van proteïnes veroorzaakt verbonden aan de levensvatbaarheid van hartcellen. De hartcellen van ratten die behandeld werden met **2,5 mg/kg/j** tyrosol en hydroxytyrosol gedurende 14 dagen, werden geïsoleerd met als doel het proteïnegehalte te bestuderen.

De resultaten bewezen de capaciteit van tyrosol en hydroxytyrosol om meerdere proteïnes te betrekken bij de levensvatbaarheid (anti-veroudering) van hartcellen, waaronder PBEF, SirTs, en FoxOs.



## HOOFDSTUK 5

# Hydroxytyrosol en oleuropein tegenover AIDS

---

*Oleuropein en hydroxytyrosol zijn nuttige acties om de fusie en de integratie van HIV in menselijke cellen te vertragen.*

Op dit moment worden 29 geneesmiddelen geautoriseerd in de Verenigde Staten door de FDA (Food and Drug Administration) om HIV-1 te behandelen (*Hammer, 2005*). Deze acties kunnen onderverdeeld worden volgens hun acties: (i) remmers van de omgekeerde transcriptase (IRT), (ii) remmers van protease (IP), (iii) remmers van fusie. De combinatie van (IRT) en (IP), samen bekend onder de naam HAART (*Hammer, 2005; Cohen, 2002*), heeft aanzienlijk de morbiditeit en mortaliteit vermindert veroorzaakt door HIV-1, tegelijkertijd HIV/AIDS veranderend in een simpele chronische ziekte. De HAART-behandeling kan de progressie van de ziekte vertragen maar niet de HIV infectie genezen. De antivirale behandeling moet men voor lange tijd aanhouden, dit leidt tot de verschijning van zware Dit leidt tot onderzoek naar nieuwe medicamenten tegen toxiciteit.

In dit kader heeft *Lee-Huang et al. (2003)* aangetoond dat het extract van olijfboombladeren goed werkt tegen HIV-1. Het is bewezen dat de doeltreffendheid van het extract van olijfbladeren komt door de aanwezigheid van oleuropein en hydroxytyrosol. Deze twee samenstellingen, **in overvloed in olijfolie** (*Olivie Plus*) zijn rijk aan polyfenolen, actief op het niveau van meerdere stappen in de levenscyclus van HIV-1 van een cel naar de andere en vertraagt aanzienlijk de virale verspreiding.

De in vitro studies tonen aan dat oleuropein en hydroxytyrosol reageren met de hydrofobe groep die bewaard wordt aan de oppervlakte van de centrale trimerische structuurmotief in het proteïne van de complexe fusie van gp41 in HIV, de groep van zes spiraalvormige structuurmotieven (6HB) en het katalytische domein van de actieve site van integrase. Bijgevolg hebben deze twee verbindingen een dosisafhankelijk remmend effect op de formatie van complexe fusie van HIV-1 met de gastheercel en met een  $EC_{50}$  (noodzakelijke concentratie om 50 % van het effect te bekomen) van de volgorde 58-66 nM, zonder zichtbare toxiciteit (*Lee-Huang et al., 2007*).



## HOOFDSTUK 6

# Hydroxytyrosol en polyfenolen in olijfolie, kanker bestrijdende krachten

---

*Hydroxytyrosol en polyfenolen in olijfolie zijn krachtige beschermers tegen kanker. De natuurlijke verbindingen zijn ook uitstekend bij de behandeling en de voorkoming van kanker.*

### 1. Algemeenheden

De opmars van kanker is in Mediterrane landen minder hoog dan in Europese landen en de Verenigde Staten (Keys et al., 1981). Epidemiologische studies toonden een zwak gehalte van dikkedarmkanker, borstkanker, endometrium en prostaatkanker aan in het Middellandse-zeegebied. De hoofdreden hiervoor, genetische factoren buiten beschouwing gelaten, is de voeding. De traditionele mediterrane voeding is gekenmerkt door veel plantaardige voeding, relatief weinig rood vlees en veel olijfolie en olijfolieproducten. Een aantal studies behandelen de positieve effecten van olijfolie voor de gezondheid. Deze studies stelden dat lipiden in olijfolie kanker voorkomen in vergelijking met andere toegevoegde lipiden, door het hoge gehalte van enkelvoudig onverzadigde vetzuren (Owen et al., 2000a, b; Visioli et Galli, 2001). Een voeding met 15 % olijfolie kan al sterk de schade van de beginnende fase van borstkanker en dikkedarmkanker verminderen bij ratten (Martin-Moreno et al., 1994; Corona et al., 2007; Paula et al., 2007). Dezelfde hoeveelheid soja-

olie heeft echter niet hetzelfde beschermende effect (*La Vecchia et al., 1998*). Daarbij is borstkanker 70 % minder hoog bij ratten die olijfolie werden toegediend tegenover een andere groep die saffloerolie kregen onder dezelfde experimentele omstandigheden (*Owen et al., 2000a, b*). Deze data suggereren dat het voorkomende effect van olijfolie tegen kanker niet enkel komt door het gehalte van « goede » vetten.

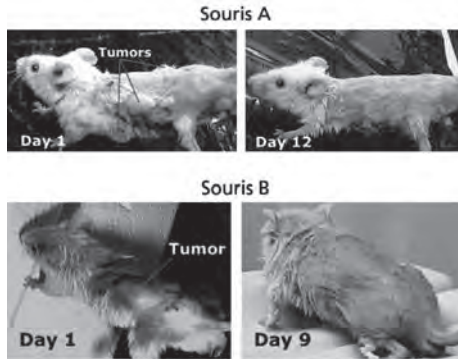
## 2. Hydroxytyrosol/Oleuropein, polyfenolen met een hoog kanker bestrijdend effect

De kleinere verbindingen in olijfolie kunnen bijdragen tot de bescherming tegen kanker, zoals het geval is voor de polyfenolische verbindingen in olijfolie. Hieromtrent is bewezen dat hydroxytyrosol een kanker bestrijdend effect heeft op een adenocarcinoom van de menselijke dikke darm (cellen HT-29) en op promyelocytair leukemie (cellen HL-60) (*Fabiani et al., 2002, 2006*), oleuropein remt dus de celgroei van (*Hamdi et Hamdi et 2005*):

- LN-18 weinig verschillend van glioblastoom (de meest voorkomende en agressieve primitieve hersentumor);
- TF-1a, erythroleukemia;
- 786-O, nieradenocarcinoom
- RPMI-7951 huidkanker met uitzaaiing in de lymfeklier van de huid;
- LoVo colorectaal adenocarcinoom.

Kanker bestrijdende eigenschappen van oleuropein en hydroxytyrosol zijn bevestigd door verschillende auteurs, door in vitro studies op cellijnen. Bovendien stellen ver-

schillende epidemiologische studies de mogelijke correlatie tussen de consumptie van olijfolie en een effect op borstkanker.

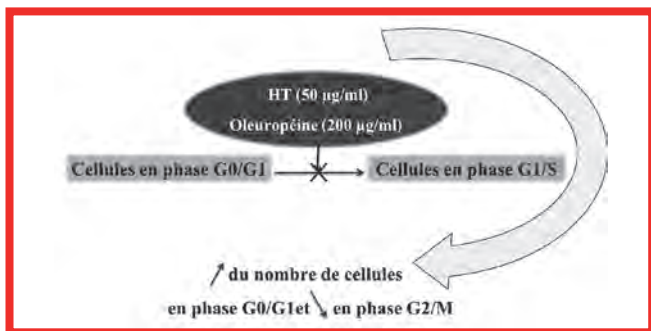


**Figuur 27.** geglycosyleerde hydroxytyrosol leidt tot een terugloop van *in vivo* tumoren. Muizen die drager zijn van een tumor kregen 1 % oleuropein in drinkbaar water toegediend. Sommige muizen hadden meerdere tumoren (zoals te zien is bij muis A) anderen hadden een unieke tumorlast (zoals bij muis B). Na 9 tot 12 dagen behandeling waren de tumoren allemaal gedaald. (Hamdi et Castellon, et 2005).

### 3. Het doeltreffende effect van Hydroxytyrosol/Oleuropein bij de behandeling en de preventie van borstkanker

Han *et al.*, 2009 bestudeerden het antiproliferatieve en apoptotische effect bij *in vitro* van oleuropein en hydroxytyrosol (respectievelijk 200 µg/ml et 50 µg/ml gedurende 12u) op de MCF-7 cellen van borstkanker. De resultaten (Fig. 28) bewezen dat deze twee stoffen :



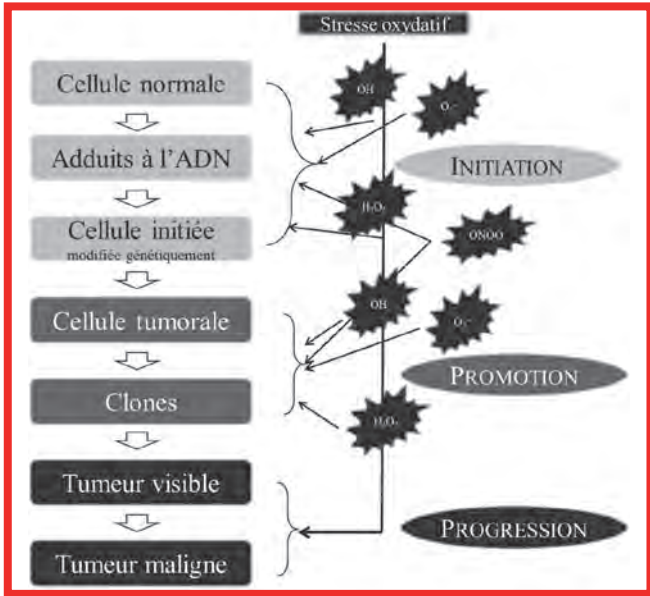


**Figuur 28.** Het antiproliferatieve effect van hydroxytyrosol op MCF-7cellen van borstkanker.

Verschillende plantaardige voeding bevat substanties met kanker bestrijdende eigenschappen (*Huang et al., 1994; Johnson et al., 1994; Pezzuto, 1997*), het merendeel van deze substanties zijn actieve antioxidanten (*Aruoma, 1994*). Vanaf de ontdekking van de rol van ROS in de tumorgenese is de studie van de antitumorale activiteiten van fenolische verbindingen in olijfolie uiterst belangrijk.

De peroxy-nitriet ( $\text{ONOO}^-$ ) zijn zeer reactieve verbindingen die in staat zijn om lipideperoxidatie te veroorzaken, de oxidatie van methionine en de schade van het DNA door deamidering en nitrering (*Yermilov et al., 1995*). De peroxy-nitrieten worden gevormd door de reactie tussen stikstofmonoxide (NO) en waterstofperoxide. De deamidering van guanine en adenine breekt de DNA-keten, wat leidt tot de verschijning van mutaties (*de Rojas-Walker et al., 1995*). De oxidatie van het DNA is evenzeer mogelijk mutageen (Fig. 29) (*Newcomb & Loeb, 1998*).

*In vitro* vermindert de aanwezigheid van hydroxytyrosol de biochemische effecten van peroxy-nitriet, zoals de deamidering van adenine en guanine in bepaalde cellijnen (*Deiana et al., 1999*).

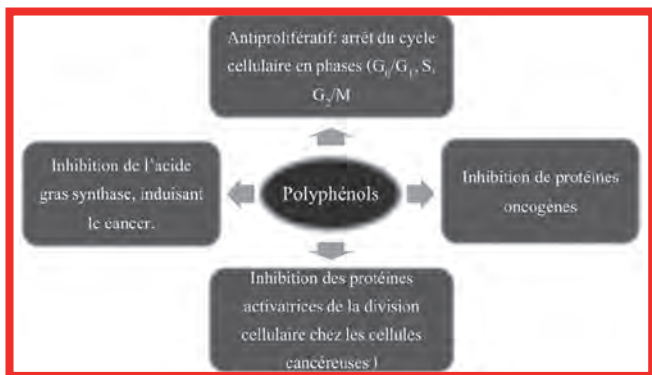


**Figuur 29.** Het effect van oxidatieve stress op de drie fasen van carcinogenese.

Buiten deze actie tonen de extracten van Virgin olijfolie een remmende werking aan op de activiteit van xanthineoxydase met een consequente vermindering van de formatie van superoxide (Owen *et al.*, 2000a). Een sterke bijdrage van olijfolie heeft dus een dubbele werking: het brengt bescherming tegen zuurstofradicalen en vermindert de activiteit van xanthineoxydase, een enzym dat mogelijk deel uitmaakt van de cancerogenese (Tanaka *et al.*, 19).

Bernini en zijn collega's hebben een nieuw ester van hydroxytyrosol en  $\alpha$ -lipoïque gemaakt met een goed rendement door simpele en originele procedures. De antiproliferatieve activiteit van het product op basis van

hydroxytyrosol is getest geweest op de menselijke colorectale adenocarcinoom, met de cellijnen HT-29. De verbinding toonde een veel sterkere remmende activiteit op de celgroei dan de natuurlijke corresponderende ouderlijke verbindingen. Zeer waarschijnlijk komt dit door de inductie van het stoppen van de celcyclus in de G<sub>2</sub>/M fase. Deze data stelt dat het nieuwe ester een sterkere antitumorale werking kan uitoefenen dan hydroxytyrosol en  $\alpha$ -lipoïdezuur.



**Figuur 30.** Andere kanker bestrijdende effecten van polyfenolen.



## HOOFDSTUK 7

*In vitro* studie

## Oleocanthal veroorzaakt snel en selectief de dood van kankercellen door het water opnemende vermogen van het lysosomale membraan (LMP)

Door Onica LeGendre<sup>ab</sup>, P.A.S. Breslin<sup>cd</sup> et David A. Foster<sup>a</sup>. O LeGendre<sup>ab</sup>, P A S Breslin<sup>cd</sup> & D A Foster<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Biological Sciences, Hunter College of the City University of New York.

<sup>b</sup> Department of Natural Sciences, LaGuardia Community College of the City University of New York, Long Island City, New York

<sup>c</sup> Rutgers University Department of Nutritional Sciences, New Brunswick New Jersey

<sup>d</sup> Monell Chemical Senses Center, Philadelphia Pennsylvania

Gepubliceerd door Molecular & Cellular Oncology - Editeur: Taylor & Francis le 23 janvier 2015.

Kort geleden publiceerden Amerikaanse wetenschappers van de Rutgers University en The Hunter College van de City University in New York hun onderzoek naar het **anti-kankereffect** van een bepaald onderdeel van olijfolie: **oleocanthal** (in februari 2015, in het tijdschrift Mo-

lecular & Cellular Oncology). In deze studie concludeerden ze dat oleocanthal de binnenkant van kankercellen penetreert en er lysosomen vernietigd, die veel groter en fragieler zijn in kankercellen dan in gezonde cellen. Zo sterft de 'zieke' cel waar de gezonde cellen intact blijven.

Een andere interessante verrassing was de snelheid waarmee het molecuule de kankercellen doodt, in slechts 30 minuten! Waar normaal gezien meerdere uren nodig zijn!

U vindt hieronder de volledige studie.

## 1. Samenvatting

Oleocanthal (OC) is een fenolische verbinding van extra Virgin olijfolie. Het wordt betrokken bij de voordelen voor de gezondheid bij diëten die rijk zijn aan extra Virgin olijfolie. Wij hebben het effect van OC bestudeerd bij menselijke kankercellijnen bij overenting. Tot grote verbazing doodde de OC alle bestudeerde kankercellen- 30 minuten na de behandeling en zonder serum. De behandeling van OC op niet getransformeerde cellen heeft de verspreiding gestopt maar veroorzaakte niet de dood van de kankercellen. De OC veroorzaakte de dood van enteritis en primaire apoptosecellen in het LMP (het water opnemend vermogen van het lysosomale membraan). Wij hebben het bewijs dat de OC de LMP bevordert door de activiteit van ASM (sphingomyelinasezuur) te remmen, wat de interactie tussen de noodzakelijke proteïnes destabiliseert tot de stabiliteit van het lysosomale membraan. De data hier toont aan dat de kankercellen, waarvan het lysosomale membraan fragiel is tegenover cellen die geen kankercellen zijn, gevoelig zijn voor de dood van cellen door een lysosomotropische factor. Daarom toont de stabiliteit van het lysosomale mebraan aan dat er een nieuwe manier is om kankercellen te doden.

## 2. Introductie

De extra Virgin olijfolie (EVOO), een hoofdbestanddeel van de mediterrane voeding, bevat veel fenolische antioxidanten, krachtige remmers van reactieve zuurstofsoorten en de voeding uit het Middellandse zeegebied wordt geassocieerd met een vermindering op het risico van verschillende menselijke kankers<sup>1</sup>. We hebben aangetoond dat de fenolische secoridoïdes van de EVOO de levensvatbaarheid van borstkankercellen afneemt met een overexpressie van HER2 dat de apoptotische dood van de cel<sup>2</sup> veroorzaakt. (-)-Oleocanthal (OC), een dialdehydevorm van ligostride aglycone, vanaf de EVOO geïsoleerd, bezit een grote reeks van biologische effecten. Het is een sterke antioxidant, met een ontstekingsremmend effect zonder steroïden die COX-1 en COX-2 afremt; een neurobeschermmer die de structuur en de functie van neurotoxines,  $\beta$ -amyloïde en Tau verandert, wat geassocieerd wordt met het afzwakkende effect op de ziekte van Alzheimer; een afremmer van de verspreiding, de migratie en de invasie van borst en prostaat kankercellen bij mensen door het remmen van c-Met; een afremmer van AMPK in darmkankercellen; en een afremmer van de proteïne -1a macrofage ontsteking in verschillende myelomen<sup>3-8</sup>.

Om de kanker bestrijdende effecten te bestuderen van OC hebben we zijn invloed op de levensvatbaarheid van kankercellen en cellen zonder kanker bestudeerd. Het is interessant genoeg om te melden dat de OC snel het verlies van de levensvatbaarheid van kankercellen (binnen de 30 minuten) naargelang de dosis provoceert. Als we het serum verwijderen bevordert de OC de dood van primaire enteritiskankercellen, wat correleert met verhoogde niveaus van ERK1/2 fosfaatsteen en met de afwezigheid van de expressie van gesplitste caspase-3. Met het serum inbegrepen hebben we een combinatie vastgesteld van

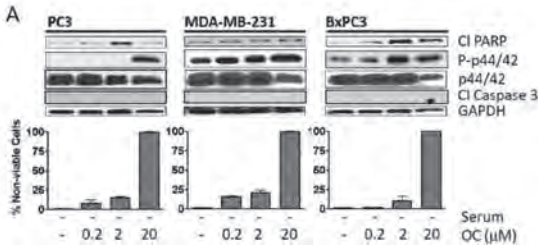
apoptose en secundaire necrose. Het is interessant om te weten dat OC een omkeerbare stop veroorzaakt van de celcyclus van cellen zonder kanker die hun levensvatbaarheid behouden. Onze bevindingen tonen aan dat de destabilisatie van het lysosomale membraan dat leidt tot de inductie van LMP de dood van kankercellen bevordert door de bemiddeling van de OC. De LMP die geïnduceerd is door de OC wordt verkregen door het afremmen van de activiteit van de ASM, wat wordt geobserveerd door de verhoogde regulatie van Hsp70 of de duale behandeling met anioogene lipiden. Deze gegevens verschaffen het bewijs dat de bron van de anti-kanker activiteit in EVOO gedeeltelijk te danken is aan de capaciteit van de OC die de lysosomale membranen breekt in kankercellen, wat de dood van cellen veroorzaakt door necrose en/of apoptose. Belangrijk: de cellen zonder kanker blijven in leven dankzij de integriteit van hun lysosomale membranen.

### 3. Resultaten

**Oleocanthal veroorzaakt het verlies van de levensvatbaarheid van kankercellen, maar ook het omkeerbare stoppen van de celcyclus in cellen zonder kanker.**

We hebben eerder bewezen dat OC de verspreiding, de migratie en de celinvasie remt van borst en prostaat kankercellen door de verhindering van c-Met<sub>5</sub> fosforylering. We hebben ook aangetoond dat de OC de celverspreiding belemmert in meerdere myeloomcellen door de inductie van apoptose en de remming van de expressie van de proteïne 1- $\alpha$  macrofage ontsteking<sub>7</sub>. Om het mechanisme beter te kunnen bestuderen wat de OC de dood van cellen veroorzaakt in kankercellen hebben we het effect van de OC bekeken op de levensvatbaarheid van de cel binnen PC3 kankercellen (prostaat), MDA-MB-231 (borst) en BxPC3 (pancreas). Bij de terugtrekking van het

serum veroorzaakt 20 $\mu$ M OC snel een verlies van celadhesie binnen de 30minuten na behandeling alsook 100 % van niet-levensvatbare cellen in alle kankercellijnen na een behandeling van 24u. **(Fig. A)**

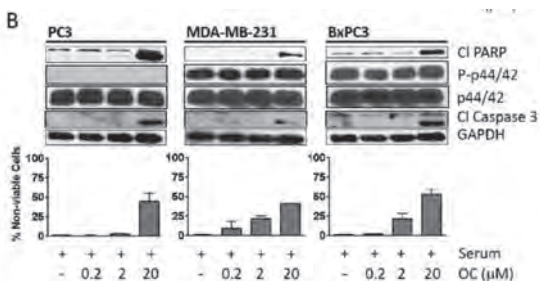


Het is interessant om weten dat de OC de niveaus van p44/42 fosforylase verhoogt maar niet echt de niveaus van gesplitste polymerase ADP-ribose (PARP) - een indicator van apoptotische dood - bij de afwezigheid van het serum. We hebben eerder aangetoond dat de activatie van ERK een belangrijke bemiddelaar is van mitochondriale storing en de dood van de epitheliale necrose cellen van de nier na een behandeling met antioxidanten<sup>9</sup>. Het is belangrijk om te melden dat de OC geen expressie van de gesplitste caspase-3 veroorzaakt bij de afwezigheid van het serum. De caspase-3, een noodzakelijke handelaar met morfologische en biochemische kenmerken die geassocieerd wordt met apoptose, is gesplitst tijdens de signaaltransductieroutes bij de apoptotische dood van de cellen die tegelijkertijd intrinsiek en extrinsiek zijn<sup>10,11</sup>. De afwezigheid van de expressie van gesplitste caspase-3 tijdens de behandeling van de OC bij de afwezigheid van het serum toont aan dat de kankercellen overgemaakt worden door de apoptotische machines die de dood van cellen veroorzaken. De behandeling van de OC heeft ook het totale verlies als resultaat van de mitochondriale activiteit van de micro-molaire concentraties in afwezigheid van het serum zoals gemeten werd in de MTT test



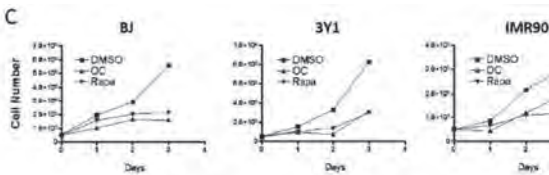
(geen gegevens beschikbaar). Alles samen genomen laat het snelle verlies van de levensvatbaarheid door de OC geprovoceerd en de afwezigheid van PARP en de splitsing van caspase-3 blijken dat de OC de dood van primaire necrosecellen veroorzaakt in de afwezigheid van een serum voor alle kankercellen.

Maar in het bijzijn van het serum verhoogt de behandeling van de OC het gesplitste PARP niveau en splitst het de caspase-3 wat correleert met een groter aantal niet-levensvatbare cellen in alle onderzochte kankercellen (**Fig. 1B**). De OC heeft geen significant effect op het P-p44/42 niveau in aanwezigheid van het serum of op de eerste P-p44/42 niveaus die heel hoog blijven (**Fig. 1B**) en remt maar gedeeltelijk de mitochondriale activiteit (gegevens niet beschikbaar) wat correleert met het verlies van levensvatbaarheid van de geobserveerde cellen (**Fig. 1B**). In de aanwezigheid van het serum veroorzaakt de OC de dood van cellen door de activatie van apoptotische mechanismen. Over het algemeen duiden deze gegevens dat de OC snel de dood van sterke kankercellen veroorzaakt via verschillende mechanismen in functie van de aanwezigheid of de afwezigheid van een serum.



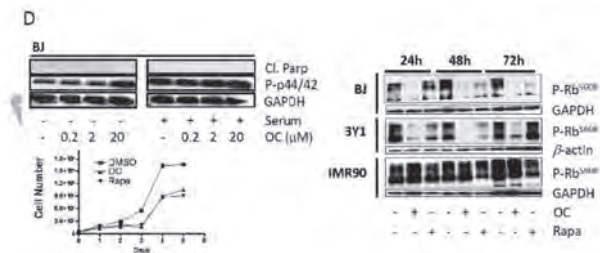
We hebben een extreem gerichte behandeling tegen kanker nodig die toxisch is voor tumoren en niet toxisch voor de weefsels zonder kanker. Gezien de gegevens uit

**Fig. 1A** en **Fig. 1B** bewijzen dat de OC duidelijk de dood van kankercellen veroorzaakt hebben we het effect van OC bestudeerd op menselijke BJ fibroblasten zonder kanker, de fibroblasten 3Y1 bij ratten en de fibroblasten IMR90 van menselijke longen, zoals **Fig. 1C** toont. OC veroorzaakt celverspreiding in drie onderzochte cellen zonder kanker, zoals bepaald door het aantal cellen na een behandeling van 72u. We gebruikten rapamycine als positieve controle voor zijn capaciteit om de celcyclus in G1 te stoppen. Het is belangrijk te weten dat OC geen gesplitste PARP veroorzaakt in het bijzijn of de afwezigheid van een serum en dat de celverspreiding hersteld was na 72 u van de OC behandeling in de BJ cellen (**Fig. 1D** linkse inferieure en superieure bord).



De fosforylering van Rb is een cruciale stap om van de G1 fase naar de S fase van de celcyclus<sup>13</sup>. Een onderfosforylering van Rb maakt E2F activiteit aan door het vasthouden en het remmen van de celprogressie<sup>14, 15</sup>. We stellen dat de fosforylering van Rb van Ser608 noodzakelijk is om de bindingsaffiniteit te verminderen van E2F en Rb<sup>16</sup>. Daarom hebben we het effect van OC bestudeerd op niveaus van fosfo-Rb van Ser608 van cellen zonder kanker. Zoals **Fig. 1D** aantoont (rechtse bord) heeft de behandeling van OC in cellen zonder kanker, BJ en 3Y1 (embryonale fibroblast bij ratten), een verminderend resultaat op fosfo-Rb niveaus van Ser608 na 24 uur, wat voor 72 uur doorgaat in het bijzijn van een serum. De cellen IMR90 toonden geen grote vermindering van Rb fosforylering van Ser608 aan - waarschijnlijk is het stoppen van

de celcyclus aan de buitenkant van G1<sup>17</sup> zichtbaar. Deze gegevens laten blijken dat de behandeling van OC geen celdood veroorzaakt in cellen zonder kanker maar vooral wel het omkeerbare stoppen van de celcyclus door de verwijdering van Rb fosforylering, wat dient om gezonde cellen te beschermen tegen negatieve effecten van de OC behandeling.



### De oleocanthal veroorzaakt op een verschillende manier celdood in functie van de afwezigheid en aanwezigheid van een serum in de kankercellen.

De biochemische en morfologische modificaties die verbonden zijn aan apoptotische celdood vinden plaats tussen de zes en de twaalf uur na de traumatische gebeurtenis door de formatie van het apoptotische lichaam tussen de 24-28 uur.<sup>18</sup> De snelheid waarmee de OC het arrondissement van de cel veroorzaakt en grip op de substantie verliest in de afwezigheid van een serum (binnen de 30 minuten na de behandeling waargenomen) doet denken aan een niet apoptotische vorm van celdood. Zoals we zagen in **Fig. 1A** veroorzaakt 20µM OC een fosforylering met een verhoging van ERK1/2 – dat geassocieerd wordt met necrotische celdood<sup>9</sup> – bij een afwezigheid van gesplitste PARP en de expressie van gesplitste caspase-3. Daarom hebben we de methode bestudeerd waarop de OC celdood veroorzaakt bij afwezigheid van een serum

door een specifieke proefkit te gebruiken van celdood die het onderscheid maakt tussen apoptose en necrose. Een kleinere dosis OC ( $10\mu\text{M}$ ) werd gebruikt om het gehalte van het arrondissement van de cel te verminderen om de specifieke methode voor celdood te kunnen bepalen. Zoals getoond in **Fig. 2A** veroorzaakt de behandeling met OC een aanzienlijk aantal necrotische cellen na 24 u. Het verhoogde aantal necrotische cellen verklaart het grote verlies van de levensvatbaarheid van de cellen bij een afwezigheid van gesplitste caspase-3 en de gelimiteerde toeneming van gesplitste PARP zoals gezien in **Fig. 1A**, wat nog meer de celdood bevestigt via primaire necrotische signalen. We observeren geen gesplitste PARP in de afwezigheid van een serum door de activatie van de signalen van primaire necrotische celdood. Door deze activatie zagen we een toename van gesplitste PARP en niveaus van caspase-3 tijdens een behandeling van OC met een serum (**Fig. 1B**). Dit gaf meer necrotische dan apoptotische cellen (**Fig. 2B**). De necrotische signaalwegen die de celdood reguleren, nemen tegelijkertijd deel aan de necrose en de apoptose; het is dus mogelijk een apoptotische celdood te hebben en een secundaire necrotische celdood te hebben in dezelfde celpopulatie.<sup>19, 20</sup> **Fig. 1 en 2** suggereren collectief dat de OC celdood veroorzaakt in kankercellen langs mechanismen die tegelijkertijd apoptotisch en necrotisch zijn, afhankelijk van de aanwezigheid of afwezigheid van een serum.

**De oleocanthal reguleert een neerwaartse activiteit van sfingomyelinasezuur om het lysosomale membraan en de celdood in kankercellen te veroorzaken wat wordt geannuleerd door anionogene lipiden.**

Als het geprovoceerd wordt door een ernstige blessure, ofwel extracellulair of intracellulair, kan de primaire ne-

crose geïdentificeerd worden door het snelle water opnemende vermogen van het plasmamembraan<sup>19</sup>. Niet lang geleden hebben we de lysosomen betrokken bij de celdood door de vrijlating van lysosomale hydrolytische enzymen in de cytosol wat de apoptotische celdood met zich meebrengt (door het water opnemend vermogen van het exterieure mitochondriale membraan (MOMP) en de activatie van caspase) of de necrotische celdood (door de verzuring van de cytosol)<sup>21</sup>. Om te bepalen of de LMP als bemiddelaar werkt bij de celdood door OC, hebben we de integriteit van het lysosomale membraan bestudeerd na een behandeling met OC door oranje acridine te gebruiken. Oranje acridine is een metachromatische lysosomale fluorochroom dat een rode fluorescentie afgeeft als het zeer geconcentreerd is in de intacte lysosomen<sup>22</sup>. De OC vermindert aanzienlijk de rode fluorescentie zowel bij aanwezigheid als afwezigheid van een serum. Dit toont aan dat de celdood door OC wordt verbeterd door de inductie van de LMP in alle kankercellijnen (**Fig. 3A**). De OC vermindert echter niet de rode fluorescentie in aanwezigheid of afwezigheid van een serum in BJ cellen, wat aantoont dat de OC geen LMP veroorzaakt in cellen die geen kanker hebben (**Fig. 3A** onderste bord).

De integriteit van het lysosomale membraan wordt gereguleerd door de activiteit van de ASM, een lysosomaal lipase dat hydrolyse veroorzaakt en sfingomyeline (SM) in ceramide<sup>23</sup>. Petersen et. al bewezen dat siramesine, een kationisch en amfifilisch geneesmiddel, LMP veroorzaakt door de activiteit van ASM te remmen<sup>24</sup>. Daarom bestudeerden we het effect van OC op de activiteit van ASM. Zoals werd aangetoond in **Fig. 3B** (linkse afbeelding), bij de terugname van een serum, remt de activiteit van ASM tot 40 % na een behandeling van 10 $\mu$ M OC van vier uur. In aanwezigheid van een serum veroorzaakt 10 $\mu$ M maximaal een afremming van 10 % ASM activiteit (**Fig. 3B**

rechtse bord). Het niveau van de remming van de activiteit van ASM komt overeen met de specifieke signaalweg van celdood, geactiveerd in functie van de behandeling met OC en het gehalte van LMP. De massale of complete LMP laat al snel proteasen vrij van lysosomen en we hebben aangetoond dat dit de necrotische celdood veroorzaakt. Een gedeeltelijke of selectieve LMP laat proteasen van lysosomen vrij op een manier die geprogrammeerde apoptotische celdood activeert.<sup>25, 26</sup> Deze vondsten ontluiken een correlatie tussen necrotische en apoptotische celdood door OC en het niveau van ASM activiteit.

De activiteit van ASM wordt gereguleerd door zijn capaciteit om zich met bis te binden (monoacylglycerol) fosfaat (BMP), een anionogene lipide die noodzakelijk is als cofactor van het metabolisme van het lysosomale sfingomyeline<sup>27</sup>. We toonden aan dat Hsp70 zich bindt met een grote affiniteit en specificiteit van BMP, wat ook de stabiliteit versterkt van het complexe BMPASM, wat op zijn beurt de LMP afremt en het overleven van de cel verbetert<sup>23</sup>. Daarom vroegen wij ons af of Hsp70 de LMP door OC remt. We bewezen dat cerulenine, remmer van de synthese van vetzuren, de expressie van Hsp70 reguleert dankzij de capaciteit van Hsp70 om meteen te interageren met vetzuren<sup>28</sup>. Bij de terugname van een serum wordt de overexpressie van Hsp70 geremd door de cerulenine, deels de LMP door de OC in PC3 kankercellen (**Fig. 3C**). We toonden aan dat kationische lipiden of kationische amfifilische medicamenten het lysosomale membraan destabiliseren door de hydrolyse te remmen van de SM door een verminderde regulatie van de ASM activiteit<sup>24, 29</sup>. Maar we toonden aan dat vetzuren of amfipatische anionogene lipiden de activiteit van ASM verbeteren<sup>30-32</sup>. Daarom hebben we het effect bestudeerd van een mengeling van anionogene lipiden op de LMP veroorzaakt door de OC. Zoals getoond in **Fig. 3D** (linkse bord) remt de behande-

ling van anionogene lipiden de LMP veroorzaakt door OC in afwezigheid van een serum in PC3 cellen. De remming van de LMP veroorzaakt door OC komt ook overeen met een verhoging van de levensvatbaarheid van de verbonden cellen (**Fig. 3D** rechtse bord). Een dubbele behandeling van lipiden en OC heeft geen celdood veroorzaakt, zoals geobserveerd werd door het gebrek van drijvende cellen na 24 tot 72 uur behandeling van OC alleen – De afname van het aantal cellen komt door de vermindering van cel proliferatie. Deze gegevens tonen dat de voortzetting of de stimulatie van de ASM activiteit – langs de toevoeging van anionogene lipiden- de stabiliteit van het lysosomale membraan verhoogt wat ook celdood vermijdt door de LMP in kankercellen. De gegevens van **Figuren 1 tot 3** tonen dat de OC in kankercellen de ASM activiteit afremt wat een gedeeltelijke of hele LMP veroorzaakt, wat als resultaat de necrotische of apoptotische celdood heeft in aanwezigheid of afwezigheid van een serum.

## 4. Discussie

De verzamelde gegevens tonen hier dat de OC een celdood veroorzaakt in kankercellen door de regulatie van een lagere ASM activiteit dat de LMP veroorzaakt. Het stopt dus kankercellen op een omkeerbare manier. In cellen zonder kanker zorgt OC voor een stopzetting van de G1 celcyclus door de afremming van Rb fosforylering in ser608 waardoor de celcyclus naar fase S doorgaat<sup>33, 34</sup>. Het is belangrijk om weten dat de cellen zonder kanker die gestopt zijn door de OC terug beginnen te vermenigvuldigen na een behandeling van OC van 72 uur.

In tegenstelling tot de stopzetting van de celcyclus zoals geobserveerd bij cellen zonder kanker, ondergingen de kankercellen snel ofwel de primaire necrotische celdood die correleert met een verhoging van fosforylering

van ERK1/2 in de afwezigheid van gesplitste caspase-3 en PARP met een terugneming van een serum of de apoptotische celdood die afhangt van caspase-3 in de aanwezigheid van een serum door de inductie van LMP. Tijdens de ontwikkeling van kankercellen ondergaan de lysosomen morfologische veranderingen van hun grootte en een grotere cathepsine activiteit dan in normale cellen<sup>35</sup>. De verhoging van de grootte van lysosomen zorgt ervoor dat de cellen gevoeliger worden voor de behandeling tegen kanker<sup>36</sup>. De LMP provoceert een vrijlating van cathepsine (lysosomale proteasen) in de cytosol wat de degradatie van cel proteïnes<sup>21</sup> veroorzaakt. Hierdoor werken het aantal en de proportie van de vrijgelaten lysosomale enzymen in de cytosol als bemiddelaar bij de activatie van necrotische en apoptotische signaalwegen. We hebben hier aangetoond dat de mate van de afschaffing van de activiteit van ASM door de OC overeenkomt met de activiteit van de signaalwegen van specifieke celdood.

De breekbaarheid van het lysosomale membraan verhoogt de vatbaarheid van een kankercel voor LMP, toch kunnen de kankercellen deze breekbaarheid overwinnen door een overexpressie van Hsp70, een regelaar van complexe multi-proteïnen en van het transport van proteïnen door celmembranen<sup>37</sup>. De Hsp70 bevindt zich in het lysosomale membraan en beschermt zich tegen LMP door de activiteit van ASM te versterken en de interactie tussen ASM en BMP te stabiliseren. Daarom verbeteren de kankercellen die een overexpressie hebben van Hsp70 het overleven van de cel en verhogen ze de lysosomale integriteit om LMP te voorkomen<sup>35, 37</sup>. Deze studie bevestigt dat er een groeiende expressie van Hsp70 is die ceruleïne gebruikt, een remmer van de vetzuren synthese. Dit geheel onderdrukt de LMP door OC in PC3 cellen door de toegenomen stabiliteit van het lysosomale membraan<sup>28</sup>. Hoewel de kationische lipiden het lysosomale membraan



destabiliseren door de interactie te reguleren tussen ASM en het lysosomale membraan, hebben we aangetoond dat de anionogene lipiden zoals de BMP en de phosphatidylinositol (PI) de ASM activiteit activeren zoals is gemeten door de verhoging van de hydrolyse van de SM<sup>29, 31, 32</sup>. We hebben ook het bewijs gevonden dat vrije anionogene vetzuren in staat zijn het lysosomale membraan te stabiliseren en LMP te voorkomen. Onze bevindingen laten blijken dat de dood van kankercellen door de OC door hun capaciteit komt om te reageren als lysosoom en ze vergemakkelijken de complete LMP in afwezigheid van een serum en gedeeltelijke LMP bij de aanwezigheid van een serum – Dit heeft een verband met het remgehalte van de activiteit van ASM.

Onlangs vonden we dat de OC de groei van de tumor verhindert in een orthotopisch borstkankermodel bij naaktmuizen<sup>38</sup>. Deze studie vertoonde de onderdrukking van c-Met als het kritieke gevolg van de OC behandeling. In deze studie weten we niet of het de LMP of de geobserveerde gesplitste PARP is die betrokken is bij de celdood. Deze studie toont echter wel dat OC dezelfde effecten heeft als in de studie met een diemodel waaruit de geringe gevolgen blijken van de OC op normale cellen wat het therapeutische potentieel van de OC versterkt bij borstkanker en andere kankers.

Onze studie gebruikt een soort mechanisme waarbij de OC selectief en snel celdood in kankercellen veroorzaakt zonder cytotoxisch te zijn bij cellen zonder kanker. De verbindingen die de destabilisatie veroorzaken bij het lysosomale membraan, zoals OC, gebruiken een levensvatbare methode om toch iets positiefs te halen uit de kwetsbaarheid van vergrootte lysosomen van kankercellen. Deze studie laat blijken dat de chemo-preventieve activiteit van de EVOO te danken is aan de capaciteit van

de fenolische en biologisch actieve verbindingen, voornamelijk van de OC, waarbij de verbindingen celdood veroorzaken door de lysosoom te penetreren en door de activiteit van ASM te remmen, wat LMP teweegbrengt. Hierdoor representeert de capaciteit van OC, om LMP te veroorzaken in kankercellen en niet in normale cellen, een nieuwe therapeutische strategie om verschillende kankers waar de lysosomen groter zijn en blijkbaar gevoeliger voor lysosomotropische acties te behandelen.

## Referenties voor deze studie :

- [1] Giacosa A, Barale R, Bavaresco L, Gatenby P, Gerbi V, Janssens J, Johnston B, Kas K, La Vecchia C, Mainguet P, et al. Cancer prevention in Europe: the Mediterranean diet as a protective choice. *Eur J Cancer Prev* 2013; 22:90-5.
- [2] Menendez JA, Vazquez-Martin A, Colomer R, Brunet J, CarrascoPan-corbo A, Garcia-Villalba R, Fernandez-Gutierrez A, Segura-Carretero A. Olive oil's bitter principle reverses acquired autoresistance to trastuzumab (Herceptin) in HER2- overexpressing breast cancer cells. *BMC Cancer* 2007; 7:80.
- [3] Beauchamp GK, Keast RS, Morel D, Lin J, Pika J, Han Q, Lee CH, Smith AB, Breslin PA. Phytochemistry: ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. *Nature* 2005; 437:45-6.
- [4] Busnena BA, Foudah AI, Melancon T, El Sayed KA. Olive secoiridoids and semisynthetic bioisostere analogues for the control of metastatic breast cancer. *Bioorg Med Chem* 2013; 21:2117-27.
- [5] Elnagar AY, Sylvester PW, El Sayed KA. (-)-Oleocanthal as a c-Met inhibitor for the control of metastatic breast and prostate cancers. *Planta Med* 2011; 77:1013-9
- [6] Monti MC, Margarucci L, Riccio R, Casapullo A. Modulation of tau protein fibrillization by oleocanthal. *J Nat Prod* 2012; 75:1584-8.
- [7] Scotece M, Gomez R, Conde J, Lopez V, Gomez-Reino JJ, Lago F, Smith AB, 3rd, Gualillo O. Oleocanthal inhibits proliferation and MIP-1a expression in human multiple myeloma cells. *Curr Med Chem* 2013; 20:2467-75.
- [8] Pitt J, Roth W, Lacor P, Smith AB, 3rd, Blankenship M, Velasco P, De Felice F, Breslin P, Klein WL. Alzheimer's-associated Ab oligomers show

*altered structure, immunoreactivity and synaptotoxicity with low doses of oleocanthal. Toxicol Appl Pharmacol 2009; 240:189-97.*

[9] Zhuang S, Kinsey GR, Yan Y, Han J, Schnellmann RG. Extracellular signal-regulated kinase activation mediates mitochondrial dysfunction and necrosis induced by hydrogen peroxide in renal proximal tubular cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; 325:732-40.

[10] Salvesen GS. Caspases: opening the boxes and interpreting the arrows. *Cell Death Differ* 2002; 9:3-5.

[11] Ghavami S, Hashemi M, Ande SR, Yeganeh B, Xiao W, Eshraghi M, Bus CJ, Kadkhoda K, Wiechec E, Halayko AJ, et al. Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. *J Med Genet* 2009; 46:497-510.

[12] Law BK, Chytil A, Dumont N, Hamilton EG, Waltner-Law ME, Aakre ME, Covington C, Moses HL. Rapamycin potentiates transforming growth factor binduced growth arrest in nontransformed, oncogene-transformed, and human cancer cells. *Mol Cell Biol* 2002; 22:8184-98.

[13] Ho A, Dowdy SF. Regulation of G(1) cell-cycle progression by oncogenes and tumor suppressor genes. *Curr Opin Genet Dev* 2002; 12:47-52.

[14] Goodrich DW, Wang NP, Qian YW, Lee EY, Lee WH. The retinoblastoma gene product regulates progression through the G1 phase of the cell cycle. *Cell* 1991; 67:293-302.

[15] Helin K, Harlow E, Fattaey A. Inhibition of E2F-1 transactivation by direct binding of the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol* 1993; 13:6501-8.

[16] Schmitz NM, Hirt A, Aebi M, Leibundgut K. Limited redundancy in phosphorylation of retinoblastoma tumor suppressor protein by cyclin-dependent kinases in acute lymphoblastic leukemia. *Am J Pathol* 2006; 169:1074-9.

[17] Kalan S, Matveyenko A, Loayza D. LIM protein ajuba participates in the repression of the ATR-mediated DNA damage response. *Front Genet* 2013; 4:95.

[18] Furuya Y, Lundmo P, Short AD, Gill DL, Isaacs JT. The role of calcium, pH, and cell proliferation in the programmed (apoptotic) death of androgen-independent prostatic cancer cells induced by thapsigargin. *Cancer Res* 1994; 54:6167-75.

[19] Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG, Gabai VL. Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp Cell Res* 2003; 283:1-16.

- [20] Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun* 2005; 73:190716.
- [21] Boya P, Kroemer G. Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene* 2008; 27:6434-51.
- [22] Antunes F, Cadenas E, Brunk UT. Apoptosis induced by exposure to a low steady-state concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is a consequence of lysosomal rupture. *Biochem J* 2001; 356:549-55.
- [23] Kirkegaard T, Roth AG, Petersen NH, Mahalka AK, Olsen OD, Moilanen I, Zyllicz A, Knudsen J, Sandhoff K, Arenz C, et al. Hsp70 stabilizes lysosomes and reverts Niemann-Pick disease-associated lysosomal pathology. *Nature* 2010; 463:549-53.
- [24] Petersen NH, Olsen OD, Groth-Pedersen L, Ellegaard AM, Bilgin M, Redmer S, Ostenfeld MS, Ulanet D, Dovmark TH, Lonborg A, et al. Transformation-associated changes in sphingolipid metabolism sensitize cells to lysosomal cell death induced by inhibitors of acid sphingomyelinase. *Cancer Cell* 2013; 24:379-93.
- [25] Kroemer G, Jaattela M. Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat Rev Cancer* 2005; 5:886-97.
- [26] Guicciardi ME, Leist M, Gores GJ. Lysosomes in cell death. *Oncogene* 2004; 23:2881-90.
- [27] Kolter T, Sandhoff K. Lysosomal degradation of membrane lipids. *FEBS Lett* 2010; 584:1700-12.
- [28] Dridi S, Decuypere E, Buyse J. Cerulenin upregulates heat shock protein-70 gene expression in chicken muscle. *Poult Sci* 2013; 92:2745-53.
- [29] Wattiaux R, Jadot M, Warnier-Pirotte MT, Wattiaux-De Coninck S. Cationic lipids destabilize lysosomal membrane in vitro. *FEBS Lett* 1997; 417:199-202.
- [30] Jenkins RW, Canals D, Hannun YA. Roles and regulation of secretory and lysosomal acid sphingomyelinase. *Cell Signal* 2009; 21:836-46.
- [31] Oninla VO, Breiden B, Babalola JO, Sandhoff K. Acid sphingomyelinase activity is regulated by membrane lipids and facilitates cholesterol transfer by NPC2. *J Lipid Res* 2014; 55:2606-19.
- [32] Linke T, Wilkening G, Lansmann S, Moczall H, Bartelsen O, Weisgerber J, Sandhoff K. Stimulation of acid sphingomyelinase activity by lysosomal lipids and sphingolipid activator proteins. *Biol Chem* 2001; 382:283-90.

- [33] Burke JR, Deshong AJ, Pelton JG, Rubin SM. Phosphorylation-induced conformational changes in the retinoblastoma protein inhibit E2F transactivation domain binding. *J Biol Chem* 2010; 285:16286-93.
- [34] Flemington EK, Speck SH, Kaelin WG, Jr. E2F-1-mediated transactivation is inhibited by complex formation with the retinoblastoma susceptibility gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90:6914-8.
- [35] Nylandsted J, Gyrd-Hansen M, Danielewicz A, Fehrenbacher N, Lademann U, Hoyer-Hansen M, Weber E, Multhoff G, Rohde M, Jaattela M. Heat shock protein
- [36] 70 promotes cell survival by inhibiting lysosomal membrane permeabilization. *J Exp Med* 2004; 200:425-35.
- [37] Mohamed MM, Sloane BF. Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6:764-75.
- [38] Garrido C, Brunet M, Didelot C, Zermati Y, Schmitt E, Kroemer G. Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. *Cell Cycle* 2006; 5:2592-601.
- [39] Akl MR, Ayoub NM, Mohyeldin MM, Busnena BA, Foudah AI, Liu YY, Sayed KA. Olive phenolics as c-Met inhibitors: (-)-oleocanthal attenuates cell proliferation, invasiveness, and tumor growth in breast cancer models. *PLoS One* 2014; 9:e97622.
- [40] Le Gendre O, Sookdeo A, Duliepre SA, Utter M, Frias M, Foster DA. Suppression of AKT phosphorylation restores rapamycin-based synthetic lethality in SMAD4-defective pancreatic cancer cells. *Mol Cancer Res* 2013; 11:474-81.
- [41] LeGendre O, Sookdeo A, Foster DA. BxPC3 pancreatic cancer cells express a truncated Smad4 protein upon PI3K and mTOR inhibition. *Oncology Lett* 2014; 7:1165-8.



## HOOFDSTUK 8

# Het beschermende effect van de polyfenolen in olijfolie op het hart- en vaatsysteem

---

*Olijfolie boordevol polyfenolen staat de preventie en behandeling toe van hart- en vaatziektes. De polyfenolen in olijfolie verbeteren de vermindering van cel-adhesiemoleculen en verhogen de beschikbaarheid van stikstofmonoxide, onderdrukken de trombocytenuitstrooming en stimuleren de endogene antioxidanten van LDL om arteriële sclerose te vertragen en ontstekingsreacties te verminderen.*

## 1. Algemeenheden

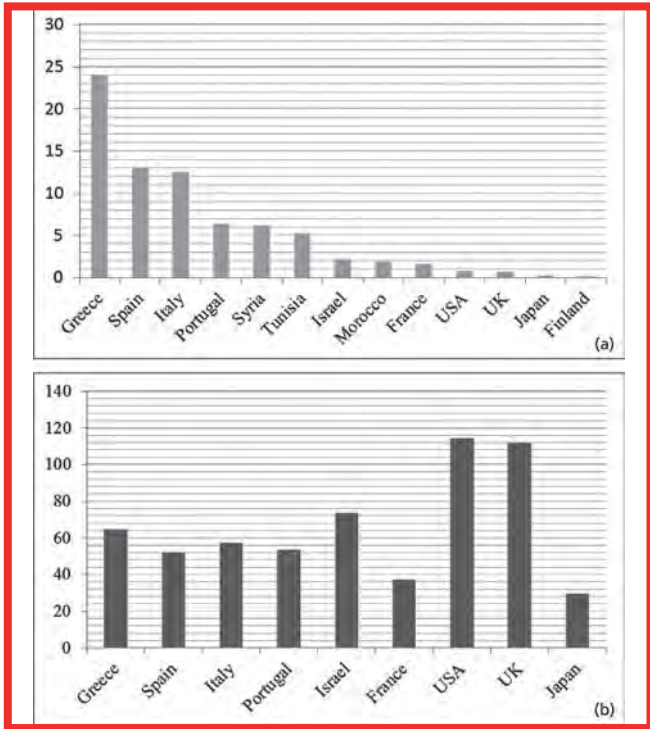
Niet-overdraagbare ziektes zullen de oorzaak zijn van drie kwart van alle overlijdens in 2030 (Ortega, 2006). Hart-en vaatziektes zijn de grootste oorzaak van morbiditeit en mortaliteit in de wereld, met een overlijdensaantal dat boven de 17,1 miljoen ging in 2004 en boven de 23,4 miljoen zal gaan in 2030 (Ortega 2006). Ischemische hartziekte was geïdentificeerd als de grootste doodsoorzaak ter wereld in 2004 en, jammer genoeg, in 2030 in de geïndustrialiseerde landen (Ortega, 2006). De gevolgen van mortaliteit door ischemische hartziekte heeft een even snelle groei in minder ontwikkelde landen. Het acuut myocardinfarct vormt een vreselijke manifestatie van ischemische hartziekten en atherosclerotische hartziekten.

Onacceptabele hoge getalen van mortaliteit door de acute myocardinfarct komen nog voor in veel ontwikkelde landen.

Er werd, vreemd genoeg, een kleine incidentie van deze ziektes geobserveerd in zuidelijke Europese landen zoals Frankrijk, Spanje, Griekenland, Italië en Portugal, tegenover noordelijke landen of de Verenigde Staten (Fig. 30b). Dit contrast verklaart gedeeltelijk de stijging van de levensverwachting in mediterrane gebieden. Mediterrane voeding is aangewezen als de belangrijkste factor van dit voordeel (*Menotti et al., 1997; Perez-Jimenez et al., 1999*). Een van de belangrijkste eigenschappen ervan is de grote hoeveelheid olijfolie als voornaamste culinair vet in deze landen (Fig. 30a).

Een aantal verschillende factoren beïnvloeden de mortaliteitsgehalten door hart- en vaatziekten, waaronder verschillende regionale voeding, de kwaliteit van de gezondheidszorg en de socio-economische status. Het is algemeen vastgesteld dat het Finlands dieet, gebaseerd op vetzuren uit rood vlees, boter en brood, hart- en vaatziekten in de hand werken tegenover het mediterrane dieet. De andere factoren, zoals genetische eigenschappen, beheerseenheden van stress, dagelijkse activiteiten en de omgeving kunnen bijdragen aan deze verschillen op gezondheidsvlak.

*Mediterrane landen zijn producenten en consumenten van olijfolie en worden aanzienlijk minder getroffen door hart- en vaatziekten dan landen die geen olijfolie consumeren, op voorwaarde van Japan. Japanners hebben een voeding die rijk is aan polyfenolen.*



**Figuur 31.** (a) De consumptie per inwoner van olijfolie in enkele landen (Conseil Oléicole International). (b) Het mortaliteitsgehalte van hart- en vaatziekten volgens de Wereldgezondheidsorganisatie (infobase voor hart- en vaatziekten) (Huang et al., 2008).

De polyfenolen verzetten zich tegen de gestarte en ondersteunde kettingreacties van vrije radicalen. Dit verhindert de schade op het DNA, de formatie van hydroperoxide en de peroxidatie van lipiden (Visioli et Galli, 1998; Katiyar en Mukhtar, 1996). Bovendien verhogen de exogene antioxidanten de concentratie van antioxidanten in het lichaam en beschermen ze tegen degeneratieve ziek-



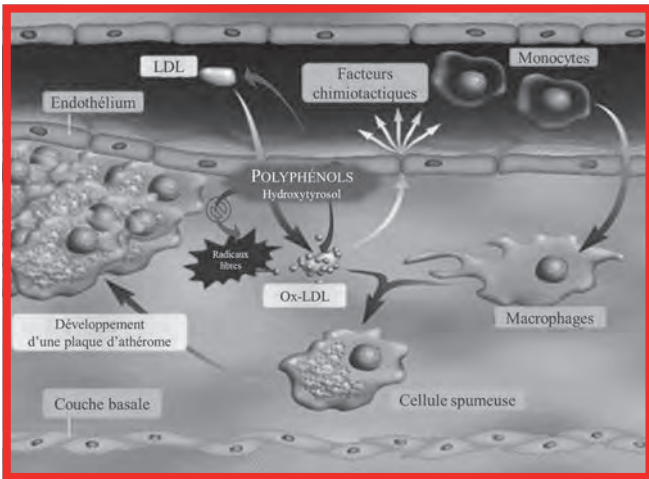
ten (*Visioli et al., 1995*). De flavonoïden zorgen voor een besparing van een basis  $\alpha$ -caroteen gehalte, uraat (zout urinezuur) en de vitamines C en E (*Sumpio et al., 2006*). De fenolische verbindingen verbeteren de vermindering van celadhesiemoleculen, dit verhoogt de beschikbaarheid van stikstofmonoxide (NO), onderdrukt de bloedplaatjesaggregatie, stimuleert de fenolische verbindingen van LDL om arteriosclerose te vertragen en vermindert de ontstekingsreacties (*Perez-Jimenez, 2005*).

## 2. Fenolische verbindingen en de preventie van arteriosclerose

Arteriosclerose is een pathologische ontsteking van de slagaderwand wat resulteert in een agressie van het vasculair endotheel door verschillende acties waarvan de voornaamste de atherogenese lipoproteïnen (LDL, kleine-VLDL) en het roken van tabak. Volgens de indeling van « American Heart Association » kunnen de arteriële plakken vijf opeenvolgende evolutiefasen doorgaan, overeenkomstig met een histopathologisch oogpunt voor zes plaksoorten. De twee eerste corresponderen met de absorptie van geoxideerde LDL (Ox-LDL) door de sub-endotheliale macrofagen en de vorming van schuimcellen (type I), waarvan de accumulatie de lipidengroeven omvat (type II). De dood van schuimcellen (opgeblazen macrofagen van vetdruppeltjes, LDL) zowel door apoptose als door necrose, provoceert een cholesterol depot in de arteriële intima, eerst van diffuse aard (type III), daarna in collectieve vorm om het lipidenlichaam te vormen (type IV). De ontsteking door Ox-LDL en de activatie van de macrofagen van endotheliale cellen en gladde spiercellen laten cytokines vrij en/of groeifactoren en staan het de gladde spiercellen toe om te migreren naar de intima, zich te vermenigvuldigen en om een laag vezelachtig eiwit te repliceren die het lipidenlichaam bedekt. Deze plak verhoogt

daarom erg de omvang. Zodra deze laatste zijn genezingscapaciteit overschrijdt van de slagaderwand, steekt het plak uit de slagaderwand en naar het vaat lumen, waar het een stenose (type V) aanmaakt (Duriez, 2004).

De vrije radicalen zijn verantwoordelijk voor de oxidatie van LDL plasma in atherogene ox-LDL, die een heleboel ontstekingen en biochemische reacties veroorzaken wat resulteert in een opeenhoping van arteriële plakken in de slagaderwand (Fig. 31) (Sumpio et al., 2006). De plasma LDL is pas atherogeen na oxidatie (Brown et Goldstein, 1983; Parthasarathy, 1991; Edwin, 2011). Bepaalde studies toonden dat oxidatieve stress arteriosclerose provoceert en de peroxidatie van lipiden induceert. (Halliwell, 1997). Vanuit dit oogpunt bekeken, kunnen de antioxidanten die de peroxidatie in lipiden verhinderen een belangrijke rol spelen in de preventie van oxidatie en de modificatie van LDL.



**Figure 32.** De fenolische verbindingen verhinderen de oxidatie van LDL wat resulteert in het aanmaken van arteriële plakken.

De menselijke plasma LDL bevat een reeks antioxidanten die in staat zijn hun peroxidatie te onderdrukken, zoals  $\alpha$ -tocoferol, ubiquinon-10,  $\beta$ -caroteen, lycopreen en andere hydroxy-carotenoïden.  $\alpha$ -tocoferol is de meest voorkomende antioxidant in LDL (Princen et al., 1992; Abbey et al., 1993; Reaven et al., 1993; Jialal et al., 1995; Hung et al., 2008). Het is echter aangetoond dat andere exogene antioxidanten in staat zijn om LDL te beschermen tegen oxidatie (Cominacini et al., 1991; Esterbauer et al., 1992). Op basis van eerder epidemiologische studies die de directe correlatie benadrukken tussen mediterrane voeding en een zwakkere incidentie van hart -en vaatziekten (Hertog et al., 1993; Ruiz-Canela, 2011), hebben verschillende studies in vitro en in vivo bewezen dat de fenolische verbindingen van extra virgin olijfolie een belangrijke rol spelen in de preventie van oxidatie van LDL wat leidt tot arteriosclerose (Visioli et al., 1995a; Rice-Evans et al., 1996; Cao et al., 1997; Masella et al., 1999). In een staaltje van LDL wordt de oxidatie van vitamine E door  $\text{CUSO}_4$  verhinderd door de toevoeging van hydroxytyrosol of de secundaire verbindingen van oleuropein. Dit effect werd lineair in verband gebracht met de concentratie van hydroxytyrosol. De toevoeging van fenolische verbindingen aan LDL veroorzaakt een significante vermindering van de vorming van peroxide lipiden. Bij LDL die niet behandeld werd met fenolische verbindingen werden deze peroxiden van lipide op hetzelfde moment gevormd als de vermindering van het vitamine E gehalte. Deze verarming van vitamine E door de LDL gebeurt voor de massale peroxidatie van lipiden. De fenolische verbindingen vertragen dus het begin van het oxidatieproces en bewaren de endogene antioxidanten (Visioli et al., 1995a, 2000a).

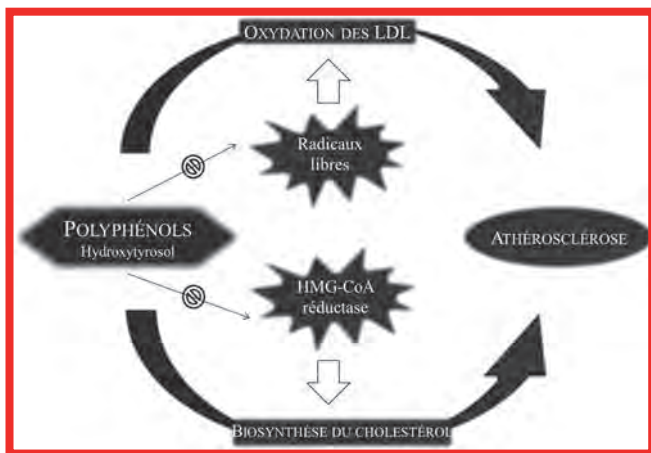
Bepaalde studies over het effect van antioxidanten van fenolische verbindingen op LDL plasma hadden als doel om op de best mogelijke manier een *in vivo* situatie te

simuleren. De plasma werd geïncubeerd in het bijzijn van verschillende fenolische verbindingen van extracten olijfolie; de LDL werd vervolgens geïsoleerd en onderworpen aan de actie van vrije radicalen, zodat ze hun relatieve resistentie kunnen testen tegen oxidatie.

De resultaten toonden aan dat hydroxytyrosol en oleuropein effectiever zijn tegen peroxidatie van LDL dan mono-hydroxyfenolen (tyrosol en ligstroside aglycone). Deze data bevestigen ook de eerdere resultaten van Rice-Evans (1996) en Cao (1997) en hun medewerkers. De concentratie van antioxidanten toegevoegd aan het plasma om de oxidatie in LDL te onderdrukken is aanzienlijk hoger dan in de voorgaande studies, waar de antioxidanten meteen toegevoegd werden aan de geïsoleerde LDL (*Leenen et al., 2002*). Deze gegevens bevestigen de andere in vivo studies op dieren die gevoed werden met olijfolie vol polyfenolen. Bij deze dieren waren de lipoproteïnen veel resistenter tegen oxidatie dan bij dieren die dezelfde hoeveelheid oliezuur kregen toegediend (*Scaccini et al., 1992*), waarbij de niveaus vitamine E zorgvuldig werden behouden (*Wiseman et al., 1996*).

Een verhoogde concentratie cholesterol in bloed is een andere risicofactor voor arteriosclerose. De regulering van plasma cholesterol is verbonden met de activiteit van hydroxy-methyl-glutaryl-co-enzym-A-reductase (HMG-CoA-reductase), het belangrijkste enzym bij de biosynthese van cholesterol. Het gebruik van substanties die HMG-CoA-reductase is zeer effectief tegen de vermindering van cholesterol in het bloed. Bepaalde studies hebben de aandacht gevestigd op het effect van fenolische verbindingen in virgin olijfolie op het metabolisme van cholesterol. Het is onlangs bewezen dat de activiteit van HMG-CoA-reductase aanzienlijk is verminderd in de levermicrosomen bij ratten die fenolische verbindingen te eten kregen. De

inname van olijfolie heeft een positief effect door de fenolische verbindingen die HMG-CoA-reductase onderdrukken en de verbindingen spelen een belangrijke rol bij het voorkomen van hart- en vaatziekten. Er is echter verder onderzoek nodig naar de concentratie van fenolische verbindingen die in staat zijn om een dergelijk therapeutisch effect te veroorzaken (*Benkhalti et al., 2002*).

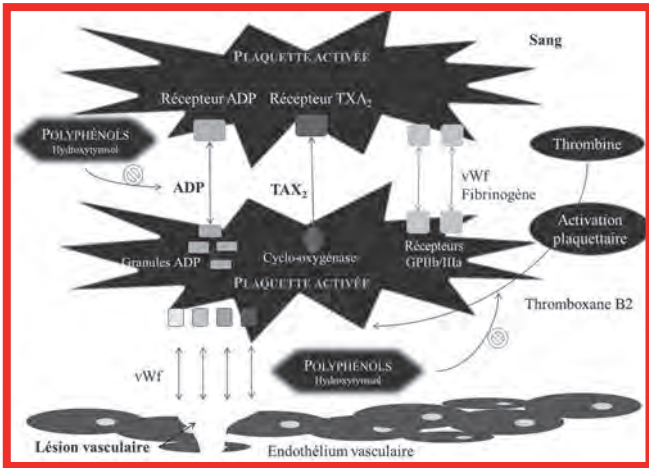


**Figuur 33.** Het anti-arteriosclerose effect van polyfenolen in olijfolie

### 3. Het effect van de polyfenolen in olijfolie tegen trombocytenuitstroom

Een *in vitro* studie analyseerde het effect van hydroxytyrosol en oleuropein op trombocytenuitstroom. Hydroxytyrosol vertraagt ADP (2  $\mu$ M) en collageen (2  $\mu$ g/ml) volledig, deze verbindingen veroorzaken trombocytenuitstroom in het plasma dat rijk is aan bloedplaatjes (Fig. 33) (*Petroni et al., 1995*). Het trombocytenuitstroomremmende effect

van hydroxytyrosol werd beschouwd als een equivalent van aspirine. In dezelfde studie bleek dat hydroxytyrosol een remmer is van trombine dat voor de productie zorgt van B2 tromboxaan (Fig. 33) (betrokken bij de activatie en trombocytenuitstrooming in het geval van een blessure). Bij vrijwilligers werd er evenwel gezien dat het extract van olijfboombladeren 5,40 mg/ml polyfenolen bevat en in staat was de activatie van trombocytenuitstrooming te vertragen bij een *in vitro* behandeling op gezonde mannen die niet roken. (Singh et al., 2007).



**Figuur 34.** Het anti-trombocytenuitstroomende effect van de polyfenolen in olijfolie.

Dell'Agli en zijn collega's (2007) hadden als doel het testen of de AMPc en GMPc fosfodiësterase het biologische doelwit is van de remming van trombocytenuitstrooming. Ze bestudeerden de effecten van extracten van olijfolie met een hoog en een laag gehalte van polyfenolen en eenvoudige fenolische verbindingen op trombocytenuitstrooming. De extracten van olijfolie en van eenvoudige

fenolen toonden een remmend effect afhankelijk van de toegediende concentratie op de aggregatie en op de AMPc fosfodiëstase.

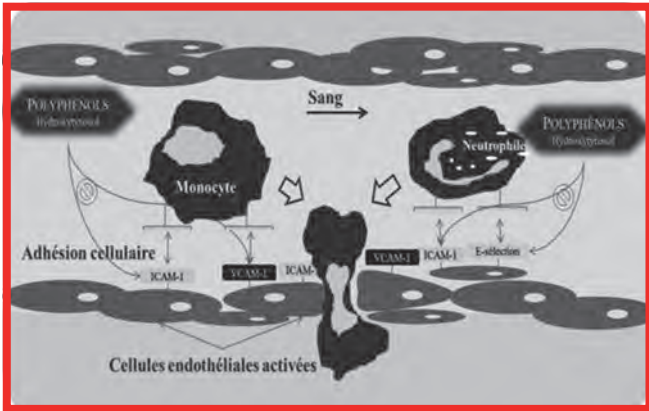
In een gecontroleerde ad random proef in Napels, Italië, werden 180 mensen met een metabolismeprobleem uitgenodigd om een mediterrane voeding te volgen, met veel olijfolie. Na 2 jaar was er een duidelijke verbetering van de endotheliale functie, met een opmerkelijke statistieke vermindering van de bloeddruk, van cholesterol, van insuline en glucosegehalten en trombocytenaggregatie. Er waren aanzienlijke verminderingen van de kenmerken van systemische vasculaire ontstekingen, waaronder reactieve proteïne C en interleukinen. Meer dan 66 % van de proefpersonen toonden een vermindering van risicofactoren, zodat ze niet meer onderverdeeld werden als lijdend aan metabolismeproblemen (*Esposito et al., 2004*).

We weten langs deze weg nog niet exact hoe de polyfenolen de trombocytenaggregatie vertragen. Er wordt verondersteld dat het de inductor is van de vermindering van de productie van eicosanoides of de afbraak van de AMPc (*Dell'Agli et al., 2007*).

## 4. Het ontstekingsremmende effect van polyfenolen in olijfolie

De ontstekingsreactie tijdens atherogenese bevat de toetreding van leukocyten, monocyten en lymfocyten tot het endotheel. De toevoeging van deze cellen wordt bevorderd door de intercellulaire adhesiemoleculen 1 (ICAM-1), de vasculaire celadhesiemoleculen (VCAM-1) en de E-selectie factor (*Dell'Agli et al., 2006*). Carluccio et al (2003) hebben bewezen dat de fysiologisch relevante dosissen van de fenolische verbindingen in extra virgin olijfolie-extracten de expressie van ICAM-1 verminderen

en VCAM-1 op de oppervlakte van de cellen (Fig. 34). Een mengeling van polyfenolen in olijfolie, waaronder oleuropein, hydroxytyrosol en tyrosol staan ook een vermindering toe van ARNm gehaltes in VCAM-1, van de E-selectie factor en de activiteit van het gen ICAM-1 (*Carluccio et al., 2003*). De PREDIMED studie op mensen stelde vast dat mediterrane voeding met veel olijfolie een aanzienlijke statistieke vooruitgang veroorzaakte bij de vermindering van ontstekingskenmerken waarvan de C-reactive proteïnes (door de lever aangemaakt), interleukine-6, ICAM1 en VCAM-1 ten opzichte van een voeding die arm is aan vetten (*Estruch et al., 2003*).



**Figuur 35.** Het effect van polyfenolen op de endotheliale adhesiemoleculen.

Weinig onderzoek heeft het effect van de mediterrane voeding op de vaatwand getest. De PREDIMED studie onderzocht het effect van olijfolie op de morfologische veranderingen van de vaatwand. De diktematen van de intima-media van de slagader (EIM) werden gebruikt als marker van de vervanging om de graviteit van de ziekte arteriosclerose te meten. Een verhoging van 0,2 mm in de



EIM werd betrokken bij een verhoging van 28 % en 31 % van het risico op een myocardinfarct en een beroerte, respectievelijk (*de Groot et al., 2004*). De verzamelde gegevens van 190 deelnemers toonden aan dat zij die minder olijfolie consumeerden het meest blootgesteld waren aan de verhoging van EIM. Een andere studie bewees een aanzienlijk statistiek verschil tussen de inductor van EIM bij zij die 6 tot 34 gram olijfolie consumeerden per dag (*Buil-Cosiales, 2008*).

## 5. Hydroxytyrosol in olijfolie verhoogt de stikstofmonoxide, vaatverwijdend peptide gas

In het geval van hypercholesterolemie verhoogde de productie van superoxide anionen en andere soorten vrije radicalen in endotheliale cellen, gladde spiercellen en de monocytten tegenover de cellen die de normocholesterolemie controleren (*Keaney et Vita, 1995*). Deze soorten reageren met stikstofmonoxide (NO) en ze breken het vasculaire endotheel af waardoor het niet genoeg NO kan produceren en dit kan leiden tot en trombocyttenaggregatie wat resulteert in trombose. De vermindering van de biologische activiteit van de NO kan een constrictie uitlokken van de kransslagaders tijdens fysieke inspanningen en vasculaire ontstekingen wat leidt tot de vorming van schuimcellen (*Cannon, 1998*).

De studies hebben aan de andere kant ook aangetoond dat de oxLDL de transcriptie van de NO synthase en de synthese van de NO in de slagadercellen bij runderen stimuleert (*Hirata et al., 1995*). De studies hebben ook een toegenomen expressie getoond in NO synthase in slagaderweefsel bij konijnen met arteriosclerose en in arteriële plakken bij mensen. Deze overproductie brengt een

inactivatie van oxidatie met zich mee of een snelle overgang van NO en ONOO, giftig vanwege de accumulatie van superoxide anionen en andere vrije radicalen (*Canon, 1998*).

De studies veronderstellen dat de vasculaire stoornis limiterend kan zijn door het verstrekken van acties die in staat zijn de vrije radicalen te omsluiten (*Perona et al., 2006*). De consumptie van een maaltijd die rijk is aan fenolische verbindingen, zoals bij olijfolie, verbeterde de endotheel-afhankelijke microvasculaire vasodilatatie tijdens de 4 eerste postprandiale uren bij vrijwilligers met hypercholesterolemie. Bij de personen die een maaltijd kregen vol polyfenolen was er een sterke concentratie aanwezig van NO en lagere gehalten lipoperoxide (peroxide lipiden) tegenover de personen die een maaltijd kregen die arm was aan polyfenolen. Deze verbetering is te danken aan een vermindering van oxidatieve stress en een verhoging van eindproducten van NO (*Ruano et al., 2005*). Bovendien stimuleert oleuropein een productie van NO in macrofagen van de muis en activeert het de geïnduceerde vorm van NO synthase (*Visioli et al., 1998*).

Een enquête met 20 343 deelnemers in het kader van de Griekse cohort van de EPIC (European Prospective Investigation into Cancer) stelde vast dat de toevoeging van een mediterrane dieet omgekeerd evenredig is met de incidentie van systolische en diastolische bloeddruk. Olijfolie, groenten en fruit zijn de voornaamste factoren van het globale effect van een mediterrane voeding op de bloeddruk. Granen worden over het algemeen beschouwd als gezond voor de mens maar dit voedsel staat in verbinding met een hogere bloeddruk (*Psaltopoulou et al., 2004*).





## HOOFDSTUK 9

### De bescherming van polyfenolen tegen de schade van proteïnen

---

Meerdere studies toonden aan dat lange golven ultraviolette straling (UVA) zware schade berokkenen aan de huid door het aanmaken van ROS en door de uitputting van endogene antioxidantensystemen. D'Angelo en zijn medewerkers (2001) bemerkten een spectaculaire en abnormale verhoging van producten van lipidenperoxidatie en van het residu van L-isoaspartyl (oxidatie van proteïnen) op de menselijke melanomencellen bestraald door UVA. In deze studie wordt het effect bestudeerd van hydroxytyrosol op de celschade door UVA door gebruik te maken van cellijnen van menselijke melanomen (M14 cellen) als systeemmodel. Voor de M14 cellen die bestraald zijn door UVA oefent de hydroxytyrosol een beschermend effect uit, wat zich vertaalt naar de vertraging van de typische kenmerken van oxidatieve stress, zoals de TBARS (oxidatieve kenmerken van lipiden). Bovendien verhindert de hydroxytyrosol de verhoging van residus van L-isoaspartaat gemodificeerd en gevormd na de UVA-straling van de proteïnes.

Deze resultaten komen overeen met de hypothese dat oxidatieve stres een grote rol speelt in de bemiddeling van schade door proteïnen veroorzaakt door UVA. De resultaten laten blijken dat hydroxytyrosol verschillende effecten uitoefent op melanomencellen in functie van de gebruikte dosis. Hier moet steeds rekening mee worden gehouden tijdens de consumptie van olijfolie en zijn derivaatproducten, waaronder cosmetische producten en functionele levensmiddelen.





## HOOFDSTUK 10

### Het antimicrobeneffect van polyfenolen in olijfolie

---

Veel studies toonden de capaciteit aan van hydroxytyrosol om de groei te vertragen of te verhinderen van een gamma van bacteriën en schimmels waaronder ziekteverwekkende bacteriën van de mens (menselijke pathogene acties). Het is bewezen dat plantenwater uit olijfolie giftig is voor deze phytopathogenische bacteriën *Pseudomonas syringae* (Gram-negatief) en *Corynebacterium michiganense* (Gram-positief). Capasso en zijn collega's (1995) merkten op dat onder deze voorname polyfenolen van het plantenwater, methylcatechol een sterke bacteriële activiteit toonde tegen *P. syringae*, anderzijds maar licht actief was tegen *C. michiganense*. Andere polyfenolen zoals catechol en hydroxytyrosol zijn minder actief op de stammen van de *P. syringae* en inactief op *C. michiganense*.

Bisignano *et al.*, (1999) bestudeerden de *in vitro* gevoeligheid van meerdere ziekteverwekkende acties van luchtwegen of darmwegen bij de mens voor hydroxytyrosol en oleuropein. De bestudeerde pathogene acties waren vijf standaard bacteriële stammen (*Haemophilus influenzae* ATCC 9006; *Moraxella catarrhalis* ATCC 8176; *Salmonella typhi* ATCC 6539; *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802 en *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) en 44 verse isolaten (geïsoleerd bij gehospitaliseerde personen) (*Haemophilus influenzae*, acht stammen; *Moraxella catarrhalis*, six souches; *Salmonella typhi* espèces, 15 stammen; *Vibrio cholerae*, een stam; *Vibrio alginolyticus*, twee stammen; *Vibrio parahaemolyticus*, een stam; *Staphylococcus aureus*; vijf gevoelig voor penicilline en zes resistente stammen voor penicilline).

De minimum concentratie om te remmen (CMI) die gevonden is in de studie heeft een grote antibacteriële activiteit bewezen van hydroxytyrosol tegen bacteriële stammen (CMI tussen 0,24 en 7,85 mg/ml voor standaard stammen en tussen de 0,97 en 31,25 mg/ml voor de klinisch geïsoleerde stammen). Deze resultaten laten blijken dat hydroxytyrosol nuttig kan zijn bij de antibacteriële behandeling van infecties in de darmkanalen en in de luchtwegen van de mens.



## HOOFDSTUK 11

# De preventie van polyfenolen tegen diabetes

---

*De polyfenolen in olijfolie zijn doeltreffend tegen hyperglykemie en kunnen een rol spelen bij de preventie van diabetische complicaties die te wijten zijn aan oxidatieve stress.*

Type 1 diabetes is een metabolische ziekte die wordt veroorzaakt door een complete of relatieve tekortkoming van de uitscheiding van insuline (Henquin et al., 1992). Het is een van de voornaamste redenen voor de vele complicaties verbonden aan vele ziekten. De chronische toename van glycemie leidt tot weefselschade, wat kan worden geobserveerd in de vele organen en systemen (Henquin et al., 1992; Hamden et al., 2008). Hyperglycemie veroorzaakt complicaties van lange duur die worden onderverdeeld aan de hand van de voornaamste oorzaken van morbiditeit en mortaliteit in de wereld (Palsamy et al., 2009). De toename van de productie van vrije radicalen alsook oxidatieve stress spelen een belangrijke rol bij de pathogenese van diabetes en zijn latere complicaties (Palsamy et al., 2009).

Hamden en zijn collega's (2009) namen de effecten van polyfenolen in olijfolie onder de loep (met een dosis van 20 mg/kg/j) en andere fenolische verbindingen bij de oxidatieve stress en de hyperglycemie bij ratten met diabetes (behandeld door alloxaan). Na twee maanden van de behandeling vermindert het glucosegehalte in de plasma van de behandelde ratten met 55 % tegenover de ratten met diabetes die niet behandeld zijn.



Deze studie toonde voor de eerste keer aan dat polyfenolen in olijfolie, rijk aan hydroxytyrosol, doeltreffend zijn tegen de vertraging van oxidatieve stress en hyperglycemie. Deze studie laat ook blijken dat de toediening van polyfenolen in olijfolie nuttig kan zijn bij de preventie van complicaties van diabetes geassocieerd met oxidatieve stress.



## HOOFDSTUK 12

### De preventie van polyfenolen tegen de ziekte van Alzheimer

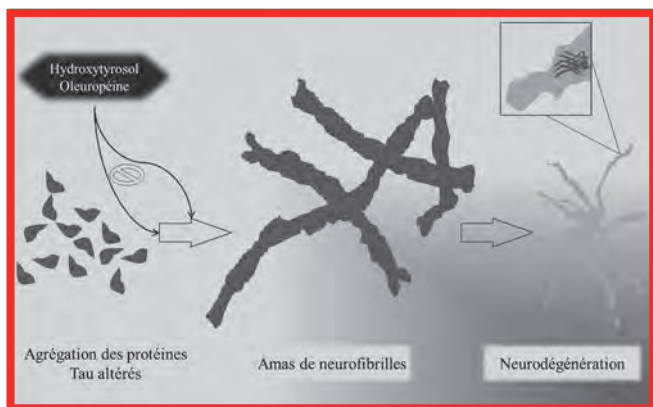
---

Epidemiologische studies tonen dat de consumptie van olijfolie de cognitieve aftakeling kan vertragen (*Solfrizzi et al., 1999, 2003, 2005, 2006; Panza et al., 2004*).

De Tau proteïnes (Tau isovormen) maken deel uit van de proteïnefamilie die geassocieerd wordt met microtubuli die vooral geuit worden door neuronen van het centrale zenuwstelsel. Ze bevorderen de verzameling van tubuline in monomeren microtubuli en staan toe hun stabiliteit te moduleren, terwijl ze een belangrijke structurele rol spelen bij het distale deel van axonen. Als de Tau proteïne bij de ziekte van Alzheimer en andere neurodegeneratieve ziekten gehyperfosforyleerd is maakt het zich los van de microtubuli. Het gaat zich in pathologische spiraalvormige filamentenparen vormen die samenklonteren in clusters van neurofibrillaire formaties wat progressieve fibrillaire neurodegeneratie teweegbrengt. De noodzakelijke substanties in de functies van neuronen kunnen niet meer overgebracht worden naar het cellenlichaam, de neuronen sterven af. Daccache en zijn collega's (2011) bestudeerden de capaciteit van drie natuurlijke fenolische verbindingen verkregen uit olijfolie; hydroxytyrosol, oleuropein en aglycon oleuropein om de aggregatie van Tau proteïnen tegen te gaan in *in vitro* fibrillaire strengens.

De voornaamste fenolische bestanddelen van fruit, olijven of olijfolie, oleuropein, aglycon oleuropein en hydroxytyrosol vertragen de aggregatie van Tau proteïnen op hetzelfde niveau als blauwe methyleen (actieve principe van referentie). Hydroxytyrosol, een van de belang-

rijkste metabolieten van oleuropein bereikt de hersenen na de consumptie van olijfolie. De resultaten tonen dat deze metaboliet handelt als een polyfenol die de aggregatie van Tau proteïnen vertraagt op een vergelijkbare manier met andere fenolische verbindingen (Fig. 35). De aanwezigheid van aldehyde fragmenten in de tautomere vormen van aglycon oleuropein verhoogt de vertragingcapaciteit van laatstgenoemde, door een mechanisme dat anders kan zijn dan dat van oleocanthal, een andere geïsoleerde dialdehyde verbinding in olijfolie.



**Figuur 36.** Het effect van polyfenolen in olijfolie op de ziekte van Alzheimer.

De resultaten bewijzen de capaciteit van aglycon oleuropein, oleuropein en hydroxytyrosol om de aggregatie van Tau te vertragen. Deze verbindingen kunnen ook worden gelinkt aan de vermindering van het risico op de ziekte van Alzheimer of neurodegeneratieve dementies geassocieerd met een mediterrane voeding en de consumptie van olijfolie en het verstrekken van een chemische basis voor de ontwikkeling van aggregatieremmers van Tau proteïnes.

## HOOFDSTUK 13

### Getuigenissen

---

De volgende mensen probeerden *Olivie Plus 30x Bio* of *Olivie Riche* en merkten een vermindering van het cholesterolgehalte en een daling van de bloeddruk in het geval van hypertensie, een vermindering van gewrichtspijn en een verbetering van de kwaliteit van de huid. Wij selecteerden enkele getuigenissen:

#### 1. Ik voel me over het algemeen beter

**Marco P.** – *Als we weten dat voltaren, nurofen en al deze chemische ontstekingsremmende medicamenten meestal bijwerkingen hebben op onze maag en dat de patiënt de pil niet meer dan 5 dagen op rij mag nemen, zijn we heel blij een natuurlijk alternatief te kunnen aanbieden, OLIVIE Riche, dat de patiënt ELKE DAG mag nemen en nog veel andere voordelen heeft voor de gezondheid: zoals voor de cholesterol, tegen hypertensie, psoriasis en veroudering... Ik ben ervan overtuigd dat het natuurlijke en bovendien bioproduct "een product vanop de boerderij" steeds meer zijn opmars maakt.*

**Catherine S.** – *OLIVIE Force / Riche is een uitstekend product met veel gezonde voordelen.*

**Chantal C.** – *Voortreffelijk product, je voelt meteen het effect.*

**Aurelien H.** – *Bijna magisch. Het is misschien toeval maar na drie capsules op een dag, zelfs in de avond, had ik een stoelgang die terug normaal was. Dat was niet het geval voor een hele week, en wat vrijwel nooit het geval is voor mij (van kleins af aan heb ik een prikkelbaar darm-syndroom). Het moet een week zijn geweest dat ik 2 tot*

*4 capsules innam per dag en ik heb sindsdien geen last meer van mijn darmen. Het valt nog af te wachten wat de effecten zijn op lange termijn maar ik ben momenteel erg tevreden.*

**Claude** – *Een nieuwe smaak, ik gebruik Olivie als een essentieel onderdeel van mijn gezonde voeding door zijn hoge gehalte aan hydroxytyrosol. Deze olie met een zeer speciale smaak (voor mij was het even wennen) wordt ten sterkste aangeraden door professor Joyeux en anderen.*

**Alain D.** – *De beste olijfolie die er bestaat. De voordelen van bio olijfolie zijn wetenschappelijk bewezen door verschillende studies. Ik kocht OLIVIE Plus 30x en ik was werkelijk onder de indruk over deze olie, eerst door het parfum dat het afgeeft, je ruikt meteen dat je met een buitengewoon product te maken hebt, daarna door de smaak die me doet denken aan olie die men vijftig jaar geleden kon vinden. Vanaf dat je het gebruikt voel je je meteen veel beter, het is een super natuurlijk geneesmiddel. Het is moeilijk om uit te leggen dus ik raad aan om het zelf te proberen!*

**Eric B.** – *Lekker en gezond!*

**Patricia B.** – *Hoewel de smaak wat wennen is, moet ik wel toegeven dat het erg gezond is... Ik ben zelf kanker aan het bestrijden en ik weiger alle behandelingen na de operatie, ik hou het dus enkel bij alternatieve behandelingen, en deze olie is echt een zegen. Mijn humeur is gestegen en ik kwam weer wat bij, mijn haar is dikker geworden en ik heb geen pijn meer aan mijn gewrichten, mijn huid is mooier en ik voel me ook beter aan mijn lever. Heel erg bedankt!!! Ik raad deze olie aan!!!*

**Christiane C.** – *Heel fruitig. Het past goed bij vis, vlees en groenten naar keuze en is heel lekker in slaatjes. Ik geniet er echt van.*

**Fabienne L.** – *Het voldoet aan de verwachtingen. Lekkerere smaak, een beetje verrassend maar ik kan er niet meer van af blijven. Er is geen enkele reden om dit te missen.*

**Annick K.** – *Ik kan niet meer zonder, deze olie is echt goed voor mijn lichaam en de smaak van de olijven is onovertreffelijk.. Het maakt deel uit van mijn vaste dagelijkse voeding, wie het uitprobeert houdt het voor goed.*

**Marie A.** – *OLIVIE Plus 30x is een goed product en het werkt heel erg snel. Het verliep vlot.*

**Guillaume D.** – *Eerst vond ik de smaak heel lekker, daarna merkte ik dat ik honger kreeg de daaropvolgende uren, ik had het tegen 13u genomen en nam daarna een tussendoortje om 17u. De olie is erg verteerbaar, niet zwaar, ik had de indruk dat het gezond was voor mijn maag, ook in mijn keel en mijn slokdarm voelde de olie aangenaam. Ik heb in lange tijd geen bloedanalyse meer laten nemen dus ik kan u hierover niet informeren maar ik voel me over het algemeen beter en steeds beter als ik OLIVIE Plus 30x neem elke dag. Ik heb ook minder trek in vlees en vis maar meer in verse groenten en fruit. Ik heb een betere weerstand en drink ook minder alcohol.*

**Gilberte L.** – *Zodra het flesje leeg is vraag ik een nieuwe!*

**Christian M.** – *Heel goed product, ik gebruik het regelmatig.*

**Astrid H.** – *Verrassend van smaak en toch proeft het ook naar traditionele olijfolie.*

**Gisele R.** – *VERUKKELIJK! Het is echt een plezier om deze olie te proeven op een kleine salade, vinaigrette is niet meer nodig.*

**Srinath S.** – *Heel goede olie!*

**Francoise S.** – *Perfect, snel, efficiënt, bedankt.*

**Viviane C.** – *De eerste keren was ik een beetje terughoudend over de smaak, die is heel erg straf. Wij zijn het beetje bij beetje gewoon geworden en nu houden we ervan. Het is heel anders dan de olijfolie die we normaal gebruikten.*

**Annie L.** – *10/10! OLIVIE Plus 30x is heel lekker, fijne smaak van olijfolie.*

**Janine T.** – *Ik ken dit product dankzij de conventies van professor Joyeux die ik op het internet zag. Ik vind de producten van uitstekende kwaliteit. Ik bedank zowel professor Joyeux als OLIVIE.*

**Nathalie P.** – *Product van hoge kwaliteit.*

**Fabienne L.** – *Olie van goede kwaliteit en lekker, proficiat!*

**Martin G.** – *De olijfolie van mijn keuze.*

**Francine L.** – *Buitengewoon lekker.*

**Marie M.** – *Perfect product, hoewel de smaak me veraste in het begin, ik probeer het met honing of siroop op een sneetje brood.. Heel lekker en gezond.*

**Alain S.** – *Heel goed product, we voelden meteen de voordelen voor de gezondheid, heel goede olie!*

**Alain D.** – *OLIVIE Plus is een erg goed product. Ik heb nog nooit iets gelijkaardig op de markt gevonden, heel erg gezond en zeldzaam. Naturamédicatrix is een site op het internet met veel informatie en wetenschappelijke bronnen, het raadplegen ervan gaat gemakkelijk.*

**Ginetta B.** – *Ik neem OLIVIE plus 30x regelmatig en ik ben zeer tevreden van dit product!*

**Nicolas F.** – *Je proeft de antioxidanten (een beetje bitter) maar de kwaliteit is er zeker, bedankt.*

**Ismail B.** – *Mijn kinderen kochten OLIVIE 30x voor me en sinds ik het gebruik is mijn suikerspiegel gedaald van 13,9 mmol/mol naar 8mmol/mol, ik reken op dit product om mijn gezondheidsproblemen te verbeteren, ik wil het ook aan de rest van mijn familie tonen.*

**Hizanuiddin Z.** – *Ik heb diabetes en een hoge cholesterol. Sinds 2014 neem ik elke avond een lepeltje OLIVIE 30 en sindsdien is het suikergehalte in mijn bloed gedaald van 12-16mmol/mol tot 4-5 mmol/mol!!*

**Eliane G.** – *Super product.*

## 2. Een normaal cholesterolgehalte

**Francine M.** – *Eindelijk het natuurlijke product dat mijn cholesterol en mijn kleine darmprobleempjes aanpakt. Momenteel ga ik nog een paar maanden door met deze behandeling. Daarna wil ik nog graag proberen wat jullie te bieden hebben. Bedankt voor jullie goede raad.*

**JOPAR** – *Mijn cholesterol is gedaald! Na een kuur van 3 maanden, 2 soeplepels per dag is mijn cholesterol van 3,30 naar 3,00 gedaald. Ik had nog meer gewild maar ik vind het al zeker niet slecht.*

**René D.** – *Zeer tevreden. Het is een top product! Mijn cholesterol is gedaald met 25 % na 2 maanden OLIVIE 30x.*

**Michel** – *Ik ben heel blij met deze olie, mijn cholesterol zit bijna op 50 % en ik voel me gewoon veel beter.*

**Dahri B.** – *Na regelmatig gebruik van OLIVIE Plus 30x (ongeveer een maand), stelde ik vast dat mijn cholesterol was verlaagd, de tryglyceriden waren een beetje verminderd. Ik ga verder met dit gezonde product.*



### 3. Gewrichten

**Eliane S.** – *Alleen al bij het proeven merk je dat het niet een gewone olie is, ik ken twee mensen die het testten buiten mezelf en momenteel gaat alles goed..Zelfs beter voor een vriendin die vrij serieuze problemen aan haar gewrichten had!*

**Antoine R.** – *Een verbetering voor de darmen, en huidproblemen in het algemeen. Een goede ontstekingsremmer.*

**Mme Debbagh K.** – *In het begin was mijn enige zorg de pijn van mijn artrose te verlichten aan mijn knieën want ik kon niet meer normaal stappen, of rechtstaan. Mijn man vertelde me over ontstekingsremmende olijfolie en ik besloot OLIVIE Plus 30x te testen. Na een maand voelde ik me niet alleen, tot mijn grote verrassing, veel soepeler en kon ik mijn knieën bewegen zonder pijn maar mijn Psoriasis begon te verdwijnen! Mijn rode vlekken veranderden van kleur tot ze bleek werden en verdwenen na ongeveer twee maanden.*

### 4. Regulering van de tensie

**Mme Martine H.** – *OLIVIE Plus 30x is een fantastische olie, buiten de sterke smaak misschien, en verminderde mijn hypertensie en de pijn in mijn gewrichten, ik raad het aan!*

**Martine K.** – *Heel goed product. Helpt om de bloeddruk te verlagen.*

### 5. Huid, haar en gezondheid

**Marie-Madeleine P.** – *Mijn stoelgangproblemen zijn genezen sinds ik de olie gebruik, mijn huid wordt jonger met een duidelijkere tint. De smaak is een beetje bitter,*

*waarschijnlijk omdat de olie nog zo jong is. De levering gaat ook snel, ik ben zeer tevreden.*

**Solveig K.** – *Ik kan enkel maar zeggen dat ik een SUPER ZACHTE huid heb nu.*

**Shariffah Z.** – *Ik leed voor lange tijd aan sinusitis. Ik stopte niet met niezen en ik had steeds de griep. Na een maand het product te gebruiken waren mijn huidallergieën veel minder erg en ik niesde bijna niet meer. Ze hebben bij mij een cyste in de eierstokken gevonden in 2010 waarvan de grootte steeds schommelde, toenam en afnam. Maar een recente diagnose toonde dat mijn cyste weg was! Ik neem dit product nog zo lang als ik hoop op een goede gezondheid.*

**Muhammad F.** – *Sinds 3 jaar dat ik OLIVIE olijfolie gebruik, ik smeer het op mijn gezicht en neem ook de capsules, is mijn huid veel minder gezwollen, het rood is bijna helemaal weg en ik heb geen problemen meer met constipatie.*

**Abdul K.** – *Ik neem een soeplepel OLIVIE Plus 30x per dag en smeer het ook op mijn hoofd op de kale plekken. Mijn haren begonnen weer te groeien!*



●●● POLYFENOLEN IN OLIJFOLIE, ONSCHATBAAR VOOR UW GEZONDHEID!

## HOOFDSTUK 14

## Klinische studie « Olivie Riche 4000 »

---

Betreffende het effect van het extract van olijfolie boordevol polyfenolen, Olivie Riche 4000 op de ontsteking en de pijn van patiënten met artritis: een klinische studie ad random en dubbelblind tegenover placebo gedurende 8 weken.

Door Ghanam Jamal<sup>a</sup>, Cresteil Thierry<sup>b</sup>, Benlemlih M.<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Biotechnology Laboratory, Faculty of Science Dhar El Mahraz, P.O. Box 1796, Atlas-Fez, University Sidi Mohammed Ben Abdellah, Fez, Morocco.

Gepubliceerd door het Amerikaanse tijdschrift van biologisch en farmaceutisch onderzoek op 2 februari 2015.



### 1. Samenvatting

**Doelstellingen:** De polyfenolen in olijven staan bekend om hun natuurlijke ontstekingsremmende acties. Het doel van de klinische proef is om het therapeutische effect van het olijvenextract, vol polyfenolen, te bepalen op het ontstekingsproces en de pijn bij patiënten met artritis (AR)

**Werkwijzes:** Het gaat over een klinische proef ad random en dubbelblind tegenover een placebo. 90 patiënten met AR werden willekeurigerwijs in twee groepen ver-

deeld; in de behandelde groep kregen de patiënten een dosis van 3 g Olivie Riche (6 capsules, 500 mg per capsule) voor 8 weken, terwijl de placebogroep capsules met maltodextrine kregen. De analyses in het laboratorium zowel als de reacties op de vragenlijsten, de intensiteit van de pijn en de biomarkers van ontstekingen zijn in het begin van de studie vastgesteld en ook op het einde. Dokters evalueerden de potentiële negatieve effecten van het olijvenextract tijdens de volledige studie.

**Resultaten:** Een duidelijke vermindering van de ziektescore aan het einde van de studie bij de behandelde groep ( $P < 0,0001$ ). Tegenover de placebogroep waren de biomarkers van de ontstekingen op een duidelijke manier afgenomen bij de behandelde groep ( $P < 0,0001$ ). De verbeteringen van de behandelde groep tegenover het begin van de studie waren:  $-1,37$  mg/L (IC  $-2,71$  à  $-1,57$  mg/L),  $-2,14$  pg/mL (IC  $-2,71$  à  $-1,57$ ),  $-1,046$  pg/mL (IC  $-1,50$  à  $-0,59$ ) et  $-1795$  pg/mL (IC  $-2283$  à  $-1308$ ) voor hs-CRP, IL-6, TNF- $\alpha$  en PGE2 respectievelijk.

**De verlichting van pijn was op een aanzienlijke manier gestegen na acht maanden van de behandeling met het extract van Olivie Riche olijfolie.**

**Conclusie:** De verkregen resultaten na 2 maanden van de klinische studie toonden voor de eerste keer het potentiële therapeutische effect van Olivie Riche olijfolie, met een hoog gehalte polyfenolen (OLF) tegen ontstekingen en de pijn van artritis (AR).

Het is interessant om te weten dat de vegetale capsules van Olivie Riche / Olivie Force geproduceerd zijn uit olijfbomen die geplant zijn in een woestijn en rotsachtige omgeving in Marokko, zonder vervuiling of gevolgen van industriële activiteit, een zeer hard milieu met temperatu-

ren boven de 50° C, waar het bijna nooit regent en waar de wortels geen plek hebben om te groeien.

Dit komt door de grote rotsen (kalk en silex) en door de brandende zon. Daarom verkeren de olijfbomen in een staat van stress en nemen ze aan dat ze zullen sterven. Ze gebruiken een mechanisme om te overleven waar ze abnormaal hoge kwantiteiten antioxidanten aanmaken (polyfenolen) om zich te beschermen. De antioxidanten zijn dus op een 100 % natuurlijke manier verkregen door de blaadjes en de olijven van de bomen in de woestijn (zie [www.olivie.ma](http://www.olivie.ma)).

## 2. Inleiding

Reumatoïde artritis (AR) is een autoimmune chronische ontstekingsziekte die verantwoordelijk is voor de vernieling van gewrichten wat bijdraagt tot een functionele afname in het lichaam. De AR blijft de meest courante gewrichtenziekte, met een patiëntenpercentage van meer dan 0,5-1 % in de hele wereld. (*Helmick et al., 2008; Erikson et al. 2013*). Meerdere factoren maken mee deel uit van het algemene verval dat de ziekte veroorzaakt: tabak (*Ruiz-Esqvide et Sanmarti, 2012; Glossop et al. 2006; Matthey et al., 2002*), de microbiota (*Wu et al., 2010*), hormonale factoren (*Berglin et al., 2010*), de genetische voorgeschiedenis en invloed van de omgeving (*Packard et al., 2011; LandreBeauvais, 1800*). Schematisch gezien kunnen we de pathofysiologie van AR onderverdelen in 3 fasen: (1) de beginfase, (2) de ontsteking van het slijmvlies in de gewrichten en (3) de vernieling van de gewrichten door de verspreiding van pseudotumorale cellen in het slijmvlies van de gewrichten onder invloed van cytokines.

Eigenlijk is de chronische ontsteking van het slijmvlies de eigenschap van AR dat de complexe interactie aan-

duidt tussen lymfocyten T en B, macrofagen en synoviocyten vergelijkbaar met fibroblasten, waaronder een netwerk van cytokines, chemokines en andere moleculen (*Smolen et Redlich, 2014; Boissier et al., 2012; Firestein, 2003*). In AR is er een onevenwichtigheid tussen cytokines die pro en anti ontstekingsvormend zijn. Bijvoorbeeld de nucleaire factor kappa  $\beta$  (NF- $\kappa\beta$ ) is in ontstekingscellen actief van het synovium en veroorzaakt de expressie van cytokines, waaronder de alfa factor van tumorale necrose (TNF- $\alpha$ ), interleukine-1 (IL-1 $\beta$ ), IL-6, IL-15, IL-18, maar ook de metalloprotease (MMP-1) en de kleine moleculen die het kraakbeen kapotmaken zoals prostaglandine E2 (PGE2) en stikstofmonoxide (*Killeen et al., 2014; Tak et al., 2001*). Deze ontstekingsvormende biomarkers zijn in grote concentraties aanwezig in de vloeibare synovial en het serum van de patiënten met AR, wat zich klinisch uitdrukt in zwellingen, pijn en het vernielen van weefsels. De laatste jaren speelt de blokkering van het netwerk van cytokines een belangrijke rol in het klinische beheer van AR, vooral bij de vertraging van TNF- $\alpha$ , IL-6 en IL-1 producten (*Smolen, 2014; Smolen et al., 2012*). De moleculen die nuttig zijn bij deze blokkering van de cytokines zijn voor het grootste deel monoklonale antilichamen of recombinante eiwitten (zoals infliximab, Etanercept) (*Smolen et al., 2012; Strand et al., 2007*). Ondanks hun eenvoudige klinische gebruik hebben deze substanties enkele onverwachte kenmerken (waaronder een grote werkzaamheid, toxiciteit en zelfs farmacodynamiek). Een voorbeeld hiervan zijn de catastrofale effecten op mensen na de eerste toediening van TGN1412 (*Strand et al., 2007*).

Buiten het bestaande therapeutische arsenaal over AR, vertegenwoordigen natuurlijke producten een innovatieve bron van behandelingen die revolutionair kunnen zijn bij het behandelen van ontstekingsziektes. Salminen *et al.* (2002) bewezen dat 33 tot 75 % van de patiënten met

AR in complementaire alternatieve therapie geloofden, zoals een bepaald dieet volgen die de symptomen kunnen vertragen (*Cernadas et al., 2014*). In deze zin hebben verschillende klinische studies duidelijk gemaakt dat polyfenolen in olijfolie zeer doeltreffend zijn, de basisonderdelen van de mediterrane voeding, tegen chronische ontstekingsziektes zoals AR (*McKellar et al., 2007; Sköldstam et al., 2003*) en de coronaire hartziekte (of angina pectoris) (*Estruch, 2010; Fito et al., 2007; Estruch et al., 2006*).

Het aannemen van een mediterraan dieet verkleint de activiteit van ontstekingen, verhoogt de fysieke functies van het lichaam en verbetert de vitaliteit van de patiënten met AR. Hydroxytyrosol (3,4-DHPEA) is een van de meest bestudeerde polyfenolen in olijfolie door zijn ontstekingsremmende eigenschappen en veel verschillende farmaceutische activiteiten die overtuigen dat hydroxytyrosol mogelijks gebruikt kan worden bij de ontwikkeling van een functionele voeding (*Hu et al., 2014*). In werkelijkheid hebben hydroxytyrosol, tyrosol (p-HPEA) en oleuropein (3,4-DHPEA-EA) *in vitro* remmende effecten op PGE2, LTB4, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 en zeer gevoelige reactieve proteïnen (hs-CRP) (*Camargo et al., 2014; Richard et al., 2011; Zhang et al., 2009*). *Beauchamp et al.* (2005) toonden aan dat de ontstekingsremmende effecten van oleocanthal vergelijkbaar waren met ibuprofen (niet-steroiden ontstekingsremmende middelen NSAID's).

Hoewel de *in vitro* resultaten wel eens het eerste onderdeel kunnen zijn in de ketting van modificaties van het natuurlijke product naar een farmaceutisch product gebaseerd op een synthetische molecule, hebben we meer resultaten nodig van klinische proeven. We stellen dus hier de resultaten tentoon van een klinische studie ad random over de effecten van de toevoegingen van een extract olijfolie op de ontstekingsbiomarkers, de intensiteit van



de pijn en de activiteit van de ziekte bij marokkaanse patiënten met AR.

## 3. Materiaal en methodes

### De personen

De patiënten zijn toegekend aan de ESSEHA Cassablanca kliniek van reumatologie in Marokko. Zowel mannen als vrouwen werden gekozen tussen oktober 2012 en april 2013. Om deel te nemen aan de studie moesten de patiënten met artritis gediagnostiseerd zijn van ten minste een jaar volgens de criteria van het Amerikaanse College van Reumatologie (ACR) en de Europese Liga tegen Reuma (ELULAR) (*Aletaha et al., 2010*). De studie werd naar behoren uitgelegd aan de vrijwillige deelnemers. Om geselecteerd te worden moest men aan de volgende voorwaarden voldoen: tussen de 20 en de 80 jaar oud zijn, niet zwanger zijn, geen borstvoeding geven, geen contra-ceptiemiddelen nemen, niet roken, niet gediagnostiseerd zijn met een metabolisch syndroom zoals wordt uitgelegd in tabel III over de behandeling van volwassenen, geen ontstekingsproblemen hebben, geen niet-steroïde anti-inflammatoire middelen (NSAID's) krijgen en/of remmers van cytokines, geen gehalte van leukocyten hebben  $\leq 3.5 \times 10^9/L$  en van creatinine  $\geq 2.1$  mg/dl en geen aspartaataminotransferase (AST) gehaltes 2,5 keer hoger dan het normale limiet. De uitsluitingscriteria bevatten ook de consumptie van de antioxidanten uit olijven of andere complementaire voeding met antioxodanten minder dan drie weken voor de testen, alsook een voorgeschiedenis van allergie of intolerantie van olijfproducten. Om aan de studie te kunnen meedoen moesten de vrijwillige deelnemers hun geschreven toelating geven om blijk te geven van hun kennis van de zaak.

## Beschrijving van de studie en de behandeling

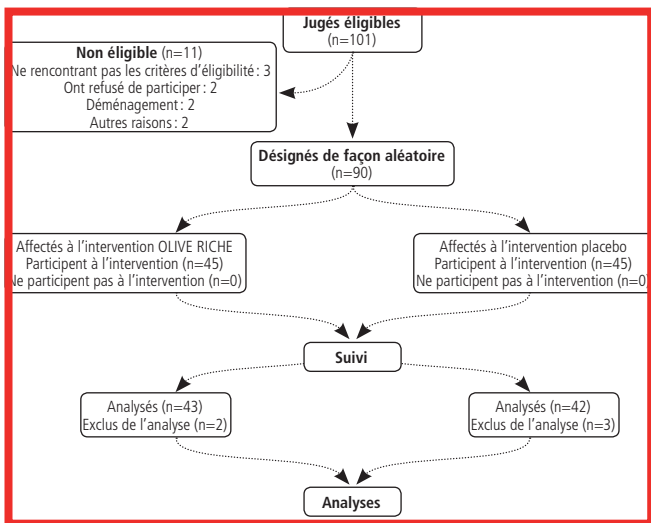
De studie is ontworpen met de volgende eigenschappen: dubbelblind, in willekeurige modus en gecontroleerd placebo. De gekozen deelnemers werden in twee groepen verdeeld, dit gebeurde willekeurig: een groep kreeg OLIVIE RICHE (OLF), en de andere groep kreeg het placebo. De onderzoekers, de deelnemers en het klinische personeel kregen geen toegang tot de behandelingscodes van de beide groepen. De kandidaten werden uitgenodigd om naar de kliniek te komen na een nacht vasten van ongeveer twaalf uur om een medisch onderzoek te doen naar de gezwollen en pijnlijke gewrichten.

Het onderzoek bevatte hun deelname aan het mediterrane dieet volgens de aangepaste vragenstelling van Estruch *et al.* (2006) (appendix Tabel 1), de evaluatie van fysieke oefeningen volgens de internationale vragenstelling van fysieke activiteit (de fysieke oefening werd onderverdeeld in: zwaar, gemiddeld of licht). Er werd gevraagd aan de deelnemers om hun gewoonlijke dieet bij te houden tijdens de periode van de studie en om consumptie van olijfproducten te vermijden (ook olijfolie en olijven zelf) en voedsel met een hoog gehalte meervoudige onverzadigde vetzuren  $\Omega$ -3 (PUFA) aanwezig in bijvoorbeeld vis, en ook om aromaten en producten te vermijden die bekend staan om hun eigenschap de ontstekingsstaat te veranderen en met een immuunfunctie (antioxidanten en probiotische producten). De veranderingen in de voeding werden geregistreerd tijdens de eerste drie dagen van het dieet, daarna tot 4 en 8 weken na de behandeling met OLF of met het placebo. De deelnemers kregen de nodige uitleg over hoe ze hun voedinginname konden schatten en hoe ze deze metingen konden registreren. Bij elke deelnemer werden er antropometrische maatregelen getroffen, de bloeddruk werd opgenomen en er werden

monsters genomen van 8 ml. De studies en metingen werden herhaald na 8 weken (zie Figuur 1).

Tijdens de studie kregen de deelnemers en de onderzoekers een vrije en aanhoudende toegang tot een kliniek voor raad en consultaties. De deelnemers die aan de criteria voldeden kregen capsules van 500 mg (identiek voor het complement en het placebo).

De deelnemers kregen ook instructies over het nemen en het bewaren van de capsules. We vroegen aan de patiënten om **6 capsules per dag te nemen** voor de studie aanvang en we hebben ze elke week gecontacteerd om dit te controleren.



**Figuur 1.** Diagram van de flux (organigram) van de studie;

Het waterige extract van de olijf (OLF: Olive Riche/Oliverie Force) en de maltodextrine hulpstof werden in zachte capsules gesloten van oplosbare gelatine. De capsules met

placebo bevatten dezelfde maltodextrine. De OLF van de olijfbom (de vrucht en de bladeren) werd verkregen door een procedure van pure fysieke ontginning. Het is belangrijk om te weten dat de plantaardige capsules van Olivie Riche/Olivie Force geproduceerd zijn door olijfbomen in een rotsachtige woestijn in Marokko, zonder vervuiling of industriële activiteiten. Voor meer informatie hierover is het mogelijk de site te raadplegen: **[www.olivie.ma](http://www.olivie.ma)** of **[www.naturamedicatrix.fr](http://www.naturamedicatrix.fr)**. Tabel 1 illustreert de voornaamste onderdelen van het extract van de olijf (OLF).

Parameters	Gemiddelde waarde (g/100g)
Totaalgehalte vaste stof	97.96 +/- 7.83
Totaalgehalte vluchtige stoffen (mineralen)	12.9 +/- 0.7
Totaal aantal lipiden	<1
Totaal aantal polyfenolen	15.98 +/- 1.9
Hydroxytyrosol	2.09 +/- 0.14

**Tabel 1.** Voornaamste onderdelen van het extract van de olijf (OLF) uitgedrukt in percentage (g/100g). Gemiddelde standaarddeviatie +/-.

## Laboratoriumgegevens

We gebruikten antropometrische metingen met behulp van een stadiometer aan de muur met een precisie van 0,1 cm. We meetten de systolische en diastolische bloeddruk met een semi-automatische oscilloscoop (Boso Medicus smart Semi automatic Blood Pressure Monitor, Duitsland).

We verzamelden bloedstaaltjes in EDTA en SST tubes. De staaltjes van de erythrocyten, het plasma, het serum en de urine werden in microtubes geplaatst van 1ml en bewaard in een temperatuur van 80° tijdens het wachten op de analyse. De analyse van de energie, van de opname

van voedingsstoffen en het dieet van de deelnemers werd gerealiseerd door het computerprogramma logiciel Nutritionist 4.3 (First Databank, Hearst Corp. San Bruno, CA). We gebruikten ELISA tests met hoge gevoeligheid (DIA, België) om de PGE<sub>2</sub>, de leukotriën B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) TNF- $\alpha$  en IL-6 in het serum te kwantificeren volgens de instructies van de fabrikant. Het niveau hs-CRP van het serum werd bepaald door turbidimetrie en biologisch-moleculaire methodes met een golflengte van 500 nm. We meetten de klinische aanwijzingen van de activiteit van de ziekte en de laboratoriumparameters bij de deelnemers in het begin en aan het einde van de studie volgens de interne methodes van de klinische laboratoria van ESSEHA.

De urinaire hydroxytyrosol is gekwantificeerd door chromatografie met een hoog vermogen in de vloeibare fase (HPLC) met OLF als innamemerk. De hydroxytyrosol werd gehaald uit aangezuurde urine (zoutzuur, 0,6 N van de uiteindelijke concentratie) zoals eerder beschreven (*Visioli et al., 2000*) en geanalyseerd in een gelijksoortige chromatografie door Shimadzu met een C18 reversed-phase kolom (250 mm L. X 4,6 mm I.D., 5  $\mu$ m).

De intensiteit van de pijn werd bij afloop gemeten, na 4 tot 8 weken (aan het einde van de studie) gebruik makend van een visueel analoge schaal (VAS) volgens het bepaalde protocol door DeLoach *et al.* (1998). We vroegen aan de deelnemers om de pijnintensiteit aan te duiden door een lijn van 100 mm aan te kruisen, een 0 betekent geen pijn en 100 mm is ernstige pijn. De verlichting van de pijn werd gemeten door een verbale schaalverdeling van vijf punten (VRS) waar 0 geen verlichting betekent, 1 een kleine verlichting, 2 een duidelijke verlichting, 3 een grote verlichting en 4 een volledige verlichting. De disease activity score (DAS28) werd bepaald volgens de EULAR (Wells *et al.*, 2009), gebaseerd op het aantal breekbare en

opgezwollen gewrichten, de (TJC en SJC), het serum, de concentratie aan hs-CRP en de resultaten van de algehele gezondheid geëvalueerd door de patiënt op een VAS van 10cm. De DAS28 werd als volgt berekend:

$$\text{DAS28(CRP)} = \{0,56\sqrt{\text{TJC}}\} + \{0,28\sqrt{\text{SJC}}\} + \{0,36\text{Ln}(\text{CRP}+1)\} + \{0.014(\text{GH})\}$$

De dokters hebben de potentiële secundaire effecten gemeten van de toediening van OLF tijdens de studie, waaronder de symptomen in de mond, de verteringsproblemen, de verzadigdheid en de allergische reactie van de huid en andere symptomen verbonden aan de studie. Om te eindigen werd de evaluatie gemaakt van de totale voldoening als reactie op de behandeling (GAST) (waaronder nervositeit) gebruik makend van een categorische schaal met 5 punten (0 = slecht, 1 = middelmatig, 2 = goed, 3 = heel goed, 4 = uitstekend). De eigenlijke studie werd gemaakt volgens de goedgekeurde aanwijzingen van de Verklaring van Helsinki.

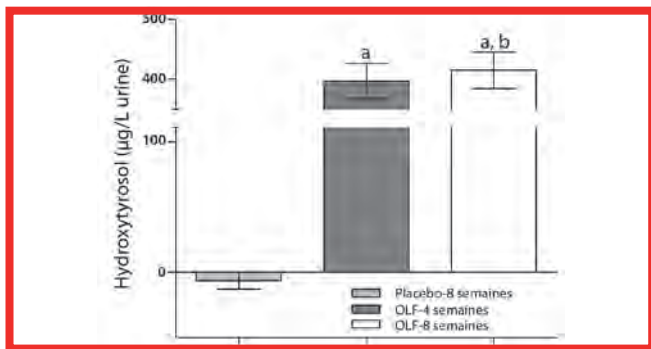
### Statistische analyse

De data werd statistisch geanalyseerd met GrafPad Prism version 5.00 (GraphPadInc, San Diego, Californie). De constante variabelen bij de gegevens op het einde worden uitgedrukt in gemiddeld absolute verschil +/- standaard (SD) en categorische variabelen zoals frequenties (percent). Voor de ontstekings biomarkers werden de pijnintensiteit en pijnverlichting, de gemiddelde waarden uitgedrukt met betrouwbaarheidsintervallen van 95 % (CIs). De normale verdeling van de Kolmogorov-Smirnov test. Het verschil tussen de eigenschap van de eindgroepen werd gerealiseerd door de onafhankelijke t test, de U Mann-Whitney test, en de  $\chi^2$  test respectievelijk voor de gewoonlijk continue data, de gegevens die normaal ge-

zien niet continu zijn en de categorische gegevens. De onafhankelijke t test werd ook gebruikt om de gemiddelde veranderingen te vergelijken van het begin tot het einde van de studie (8 weken) tussen de OLF en placebo groepen. De resultaten met bilaterale P waarden van  $<0,05$  worden beschouwd als statistisch significantief.

## 4. Resultaten

101 patiënten kwamen in aanmerking en deden mee, 11 werden uitgesloten van de studie om meerdere redenen (figuur 1). Vijf deelnemers werden van de analyse gehaald (2 van de OLF-groep en 3 van de placebogroep) omdat ze de protocol van de studie niet konden volgen. Er werd een grote overeenkomst geobserveerd tussen de OLF-groep (95,55 %) en de placebogroep (93,33 %) zonder een ongunstige factor voor de studie. De bepaalde urinaire hydroxytyrosol als biomarker van de overeenstemming werd gekwantificeerd door HPLC. De gerichte resultaten in de grafiek van Figuur 2 illustreren de



**Figuur 2.** De veranderingen vanaf het begin in de uitscheiding van urinaire hydroxytyrosol. Gemiddeld met 95 % CI. a)  $P < 0,0001$ , tussen de OLF groep van 4 en 8 weken; b)  $P = 0,003$  tussen de OLF groep van 4 en 8 weken.

veranderingen op basis van de periodes van tussenkomst voor de placebo en OLF-groepen (na 4 weken en aan het einde van de studie). De bepaalde concentratie hydroxytyrosol in de urine van de deelnemers van de OLF groep was heel verschillend ( $P < 0,0001$ ) van de cellen van de placebogroep. Het is echter belangrijk om te weten dat de gegevens van de literatuur over de absorptie van fenolen van olijven, het metabolisme en de uitscheiding niet overeenkomen (Covas *et al.*, 2006; Visioli *et al.*, 2003).

Tabel 2 (verder in de tekst) toont de beginwaarden van 90 deelnemers die willekeurig gemeten zijn in de OLF en placebogroepen. De statistische analyse vertoont geen enkel verschil tussen de twee groepen bij wat de beginwaarden aangaan, de adhesiegraad van het mediterrane dieet inbegrepen ( $p = 0,296$ ).

De resultaten van de vragenlijsten over de voeding in Tabel 3 tonen dat er geen significant verschil in de voeding inbreng is van het begin en na 8 weken van OLF en placebo toediening. De resultaten van Tabel 3 tonen ook dat de inname van PUFA constant is gebleven ( $P$  waarde van 0,611 tot 0,741 voor de OLF en placebogroepen), omdat de aanwezigheid van een hoeveelheid PUFA nuttig kan zijn bij de behandeling van ontstekingen in AR (Park *et al.*, 2013).

We hebben ook de gewichtsveranderingen aangetoond in Tabel 3 van de deelnemers en we zagen geen enkel significant verschil tijdens de studie bij de OLF-groepen ( $P = 0,976$ ) en placebogroepen ( $P = 0,759$ ). Dit is anders aan deze studie omdat het vetweefsel een endocrien orgaan is dat ontstekingscytokines afscheidt (Lu *et al.*, 2014). In het algemeen hebben we een constant niveau van de inbreng van macronutriënten aangehouden tijdens de studie zodat de ontstekingsreactie en de biomarkers op ontstekingsniveau niet kon veranderen in het serum van



de patiënt. We merkten echter de laatste week van de studie bij 2 deelnemers van de placebogroep een aanzienlijk verschil in de inbreng van de MUFA (oliezuur), dit komt door een overmatig gebruik van olijfolie (hoog gehalte van oliezuur (MUFA)) waarvan we dachten dat het de resultaten van de studie niet beïnvloedden. Alle deelnemers respecteerden het dagelijkse dieet dat was aangeraden door de onderzoekers voor de studie en vermeden olijfproducten en een paar andere producten bekend voor hun ontstekingsremmende werkingen.

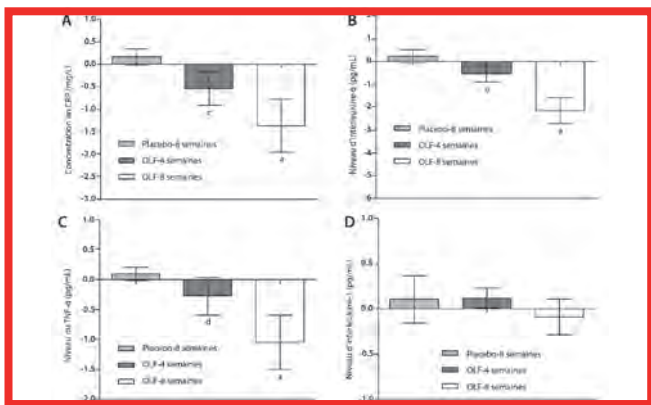
Parameters	Groep OFL (n=45)	Groep placebo (n=45)	P waarde
Leeftijd	53.27 +/- 1.61	55.73 +/- 1.97	0.346
Vrouwelijk, n (%)	42 (93.33)	41 (91.11)	0.915
Gewicht (kg)	67.15 +/- 3.86	67.65 +/- 3.99	0.944
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	28.17 +/- 1.662	27.83 +/- 1.815	0.851
Duur van de ziekte (jaren)	6.67 +/- 0.421	7.50 +/- 0.563	0.366
Medische verleden, n (%)	19 (40.00)	15 (33.33)	0.106
Genetische voorouders, n (%)	9 (20.00)	10 (22.22)	0.698
Gewoonte van lichamelijke beweging, n (%)	14 (31.11)	13 (28.88)	0.788
Gewoonte alcohol consumptie, n (%)	4 (8.88)	2 (4.44)	0.293
- Score van het mediterranea dieet	2.05 +/- 0.15	2.40 +/- 0.20	0.296
- DAS28	3.374 +/- 0.6625	3.392 +/- 0.7132	0.940
- VAS brood (0-100mm)	75.51 +/- 9.814	76.65 +/- 10.12	0.741

**Tabel 2.** De basiseigenschappen van de deelnemers. De uitgedrukte waarde als gemiddelde standaardafwijking +/- of in percentage. Met een P waarde (<0,05) van onafhankelijke t-testen of van Mann-Whitney tests.

Parameters	Groep (OLF) (n=45)	Groep Placebo (n=45)
<b>Energie (cal)</b>		
Begin	1695.00 +/- 219,80	1729.00 +/- 100.7
8 weken	1702.00 +/- 225,30	1685.00 +/- 318.6
Waarde Pa	0.576	0.745
<b>Vet (g)</b>		
Begin	65.90 +/- 11.04	68.23 +/- 14.37
8 Weken	69.07 +/- 12.35	70.40 +/- 14.35
Waarde Pa	0.547	0.780
<b>PUFA (g)</b>		
Begin	13.23 +/- 1.41	12.90 +/- 1.33
8 Weken	13.73 +/- 2.89	13.07 +/- 1.91
Waarde Pa	0.611	0,741
<b>MUFA (g)</b>		
Begin	20.57 +/- 1.85	20.07 +/- 1.77
8 Weken	21.57 +/-2.09	21.57 +/- 1.62
Waarde Pa	0.110	0.045
<b>SFA</b>		
Begin	13.73 +/- 1.49	13.73 +/- 2.07
8 Weken	14.23 +/- 1.63	13.57 +/- 2.09
Waarde Pa	0.415	0.849
<b>Poids (kg)</b>		
Begin	67.15 +/- 3.86	67.65 +/- 3.99
8 Weken	67.31 +/- 3.87	69.31 +/- 3.46
Waarde Pa	0.976	0.759

**Tabel 3.** Veranderingen van de inbreng van energie en macronutriënten aan het begin en het einde van de studie voor de 2 groepen. De gegevens zijn uitgedrukt in gemiddelde absolute verschil +/- standaard. PUFA, meervoudig onverzadigde vetzuren; MUFA, enkelvoudig onverzadigde vetzuren; SFA, verzadigde vetzuren. a test t van Student ( $p < 0,05$ ).

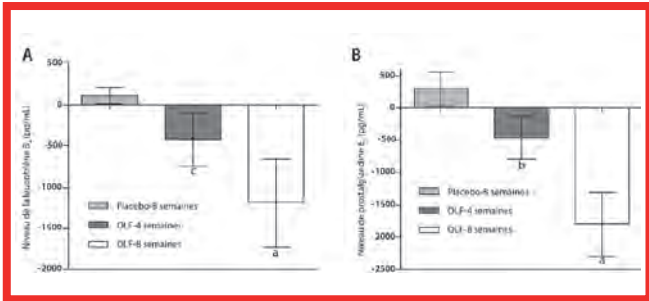
De reumatoïde artritis (AR) is een chronische auto-immune ontstekingsziekte door de opzwellen van gewrichten, de breekbaarheid van de gewrichten en de vernietiging van de synoviale gewrichten. De klinische gevolgen: pijn, een warm gevoel en een functieverlies. We denken dat de ontsteking van het synoviale membraan de grootste oorzaak is voor de gevolgen van AR. Een hoge concentratie van ontstekingsmarkers, zoals cytokines (IL-6, IL-1, TNF- $\alpha$ ) en hs-CRP correleren met de neiging tot de destructie van de gewrichten met AR. De grafieken in figuur 2 tonen de veranderingen op basis van beginwaarden in de ontstekings biomarkers IL-6, IL-1, TNF- $\alpha$ , en hs-CRP bij de twee groepen. De concentratie CRP vermindert op significatieve wijze bij de deelnemers die OLF kregen na 4 (P = 0,014) en 8 weken (P<0,0001) bij de deelnemers van de placebogroep. De gemiddelde verandering van het niveau van hsCPR was -0,55 (CI, -0,92 à -0,18) en -1,37 mg/L (CI, -2,71 à 1,57 mg/L) na respectievelijk 4 en 8 weken.



**Figuur 3.** Veranderingen van het niveau bij afloop van ontstekings biomarkers in de studiegroepen (a) hs-CRP, (b) IL6, (c) TNF- $\alpha$ , en (d) IL-1. De foutstaven zijn 95 % CIs. a(P<0,0001), b(P=0,014), c(P=0,009), en d(P=0,0247).

We hebben ook een aanzienlijke vermindering gezien in de plasmaniveaus IL-6 en TNF- $\alpha$  ( $P < 0,0001$ ). De aangepaste veranderingen tussen de groepen waren  $-2,14$  pg/mL (CI,  $-2,71$  à  $-1,57$ ) en  $-1,046$  pg/ml (CI,  $-1,50$  à  $-0,59$ ) voor IL-6 en de TNF- $\alpha$  respectievelijk op het einde van de studie. Niettemin hebben we geen enkel significant verschil gezien in het begin ( $P$  waarde van  $0,929$  en  $0,206$  bij 4 en 8 weken) voor concentraties van IL-1. Het aanzienlijke verschil van IL-6 plasma kan een stabilisatie veroorzaken van circulerende IL-1La wat de resultaten in figuur 3d verklaren. Aan de andere kant komt AR vaak samen met sterke chronische pijn.

De grafieken in Figuur 4 vatten de veranderingen van intensiteit en verlichting van pijn samen van de OLF en de placebogroepen.

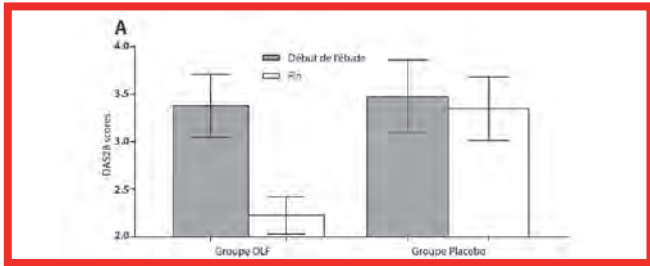


**Figuur 4.** Veranderingen vanaf het begin in de intensiteitscore van de pijn (a) en de verlichting van de pijn (b). Gemiddeld met 95 % CIs. De sterretjes tonen het verschil aan tussen de placebo en OLF-groepen,  $a(p < 0,0001)$ .

Een duidelijk verschil in de intensiteitscore van de pijn ( $P < 0,0001$ ) werd geregistreerd in de OLF-groep en vergeleken met de placebogroep. De evaluatie van de intensiteit van de pijn na tussenkomst toont een vermindering

van -12,94 +/- 4,970 (CI, -15,50 tot -10,139) na 4 weken en -26,71 +/- 9,29 (CI, -31,49 tot -21,93) tot het einde van de studie. De pijnintensiteit (pijnschaal 100-mm) vermindert dus van 75,51 +/- 9,81 naar 48,80 +/- 4,16 na 8 weken van inname van OLF. Een gelijkaardige tendens als reactie op de pijnintensiteit werd gezien bij de score van de pijnverlichting. De deelnemers van de OLF-groep hadden duidelijke verhoogde verlichting van pijn tegenover de placebogroep ( $P < 0,0001$ ), zelfs na slechts 4 weken van tussenkomst. De verlichtingsscore is verhoogt met 2,61 +/- 0,48 (CI, 2,37 à 2,37), dit komt overeen met een gemiddelde waarde van 3,26 +/- 0,66 (CI, 2,92 à 3,60) in de VRS met 5 punten na een toediening van OLF na 8 weken. We moeten benadrukken dat slechts 30 % van de deelnemers van groep OLF een grote verlichting van pijn hebben verklaard (pijn verlichtingsscore  $\geq 3$ ), de andere mensen van de OLF-groep hebben een merkbare pijnverlichting gevoeld (een pijnverlichtingsscore van  $\geq 2$ ) aan het einde van de studie.

Op dezelfde manier hebben we significante verschillen opgemerkt tussen de OLF en placebogroepen ( $p < 0,0001$ ) voor de DAS28 scores. De patiënten van groep OLF met een actieve AR aan het einde (score DAS28  $\geq 3,2$ ) toonden een goede therapeutische reactie (vermindering van DAS28 van 1,23). De geregistreerde DAS-score op het einde van de studie voor groep OLF was 2,23 +/- 0,40, wat een genezing van AR aanduidt ( $\leq 2,6$ ). Figuur 5 vat ook de globale evaluatie samen van de voldoening van de patiënten tijdens de behandeling, waaronder de nervositeit van de patiënt. De deelnemers die in de OLF-groep geplaatst waren hadden een voldoeningsscore van 3,206 +/- 0,53 (wat overeenkomt met « heel goed » in de 5-punten schaal), vergeleken met de placebogroep. Een dergelijke voldoeninggraad correleert met een aanzienlijke vermindering van het niveau van ontstekings biomarkers.



**Figuur 5.** Effect van het toegevoegde olijvenextract op de DAS28 scores (A) en GART (B). Een gemiddelde van 95 % CIs.  $p < 0,0001$  vs van de placebogroepen en OLF groepen.

## 5. Discussie en conclusie

Patiënten met chronische AR (volgens ACR/ELUAR) kregen een behandeling met een waterig olijvenextract gedurende 8 weken, ze kregen een dagelijkse dosis van 3 g olijvenextract (6 capsules van 500 mg). We zagen geen schommelende slechte tekens, noch laboratorische parameters tijdens de studie en 3 weken na tussenkomst (gegevens zijn niet gepubliceerd).

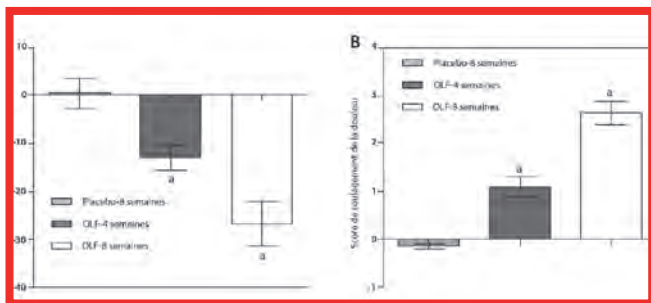
De verkregen resultaten na 2 maanden van de klinische studie tonen voor de eerste keer de therapeutische doeltreffendheid van het olijvenextract dat rijk is aan polyfenolen (OLF) tegen de ontsteking van AR.

De 8 weken van toediening van OLF hebben dus het niveau van pro-ontstekingscytokines vermindert (TNF- $\alpha$ , IL-6, maar niet aanzienlijk bij IL-1), de concentratie van hs-CRP en de intensiteit van pijn. Tijdens de progressie van AR merkten we een toestroming van ontstekingscellen in het synoviale membraan (getransformeerd in autonoom weefsel, pannus) waar de chronische ontsteking

plaatsvindt en schade aan het kraakbeen berokkent en de vernietiging van bot (door osteoclasten).

Alles bij elkaar zijn het ontstekingsproces en de differentiatie van osteoclasten het gevolg van de activatie van cytokines, vooral van  $TNF-\alpha$ , IL-6, IL-1 en andere bemiddelaars van ontstekingen zoals eicosanoiden (vooral PGE2 en LTB4) (Smolen et Redluch, 2014; Boissier et al., 2012).

De remming van de bijproductie van ontstekingscytokines is dus het voornaamste doel van de anti-ontstekingsacties, waaronder de glucocorticoiden en de NSAID's. Smolen en Redlich (2014) hebben aangetoond dat de remming van de productie van  $TNF-\alpha$  en IL-6 belangrijker lijken bij het voorkomen van ontstekingen, terwijl de remming van IL-1 eerder secundair lijkt.



**Figuur 6.** De veranderingen vanaf het vertrekpunt van de leucotriene B4 gehaltes (A) en de prostaglandine E2 (B). Gemiddelde van 95 % CIs. a)  $P < 0,0001$  vs groep placebo; b)  $P = 0,0004$  vs groep placebo; c)  $P = 0,0017$  vs groep placebo.

De verkregen resultaten tonen dat de toevoeging van het extract dat rijk was aan polyfenolen (15 % van de totale polyfenolen en 2 % hydroxytyrosol) bijdragen aan een vermindering van  $TNF-\alpha$ , van l'IL-6, van hs-CRP, PGE2,

en van LTB4 (Figure 6) bij patiënten met AR. Het kan zijn dat dit resultaat een direct gevolg is van de polyfenolen in OLF (vooral hydroxytyrosol) die meteen handelen op het DNA om de expressie te verminderen van ontstekingsbemiddelars of de wegen van biosynthese vertragen door een mechanisme dat lijkt op glucocorticoiden en/of NSAID's.

In deze zin vertraagt hydroxytyrosol de expressie van de veroorzaakte cyclo-oxygenase (COX-2) (belangrijk enzym dat de biosynthese van PGE2 katalyseert van arachidnozuur tijdens het ontstekingsproces) en bijgevolg het gehalte van PGE2 in geïsoleerde humane monocytten (*Rosignoli et al., 2013; Zhang et al., 2009a; Lu et al., 2005*) en in deze murine macrofagen (*Richard et al., 2011*). We observeerden een gelijksoortig effect bij COX2 en PGE2 *in vivo* wanneer de muizen met colitis behandeld werden met olijfolie met hoge gehalten hydroxytyrosol (*Sanchez-Fidalgo et al., 2011*) of oleuropein (*Giner et al., 2011*). Bovendien, oefent deze pure hydroxytyrosol of hydroxytyrosol in zijn natuurlijke matrix (producten van olijven zoals waterige extracten en olijfolie) een remmend effect uit op LTB4; ETNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 en hsCRP (*Camargo et al., 2014; Richard et al., 2011; Zhang et al., 2009a; Bitler et al., 2005; Maiuri et al., 2005*). Het effect van de polyfenolen in olijven op de ontstekingsmarkers zijn duidelijker bij de patiënten met een stabiele coronaire ziekte die de olijfolie kregen in verschillende concentraties (*Fito et al., 2007; Estruch et al., 2006*). De resultaten van de huidige studie bevestigen de resultaten van de *in vitro* en *in vivo* onderzoeken (zie de literatuurlijst hieronder) wat de doeltreffendheid laat blijken van de therapeutische werking van hydroxytyrosol en andere polyfenolen OLF tegen de ontstekingen in AR. Daarbij kan de vermindering van PGE2, LTB4, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 en de concentratie hs-CRP het directe gevolg zijn van de vertraging van COX-2. De onderdrukking van



het gen COX-2 veroorzaakt echter de vermindering van de productie van IL-6 en we zagen een relatie tussen de verhoging van de macrofagen PGE2 afhankelijk van het niveau van IL-6 *in vitro* (Inoue et al., 2002; Hinson et al., 1996). Op zijn beurt is een van de bekende biologische rollen van IL-6 de activatie van geproduceerde ontstekingsproteïnes, dit kan de vermindering van het niveau van hs-CRP verklaren. Een gelijkaardig mechanisme is al beschreven voor NSAID's medicamenten.

Niettemin, hebben de niet-steroïdale anti-inflammatoire geneesmiddelen (celecoxib®, rofecoxib®, diclofenac® de productie van TNF- $\alpha$  verhoogt in de reumatoïde synoviale membraanculturen (Rosignoli et al., 2013; Page et al., 2010). Zo komt het dat onze resultaten een aanzienlijke vermindering aantonen van plasma TNF- $\alpha$ . Dit kan liggen aan een andere signaalweg veroorzaakt door hydroxytyrosol en/of andere polyfenolen in OLF. Het potentiële effect van hydroxytyrosol (en andere polyfenolen van olijfolie) op de NF- $\kappa$ B is eerder uitgelegd door meerdere auteurs. De NF- $\kappa$ B bezet een opwaartse centrale positie in het ontstekingsproces omdat het de expressie van meer dan 150 genen activeert (Makarov, 2001). Tussen deze genen, bevinden zich de genen die de cytokines coderen, de TNF- $\alpha$ , de IL-1 en IL-6. De hydroxytyrosol van het waterige olijvenextract vertraagt de expressie van NF- $\kappa$ B-P65 en de auteurs laten blijken dat de remmende effecten de oorzaak kan zijn van de vermindering van cytokines in murine macrofagen (Richard et al., 2011). Bovendien onderdrukt hydroxytyrosol de expressie van NF- $\kappa$ B in de menselijke monocyste (TPH-1) en wijzigt het de translocatie in de kern (Zhang et al., 2009b). Daarbij vermindert hydroxytyrosol de activiteit van NF- $\kappa$ B in endotheliale cellen (Scoditti et al., 2012) en neurale cellen (St-Laurent- Thibault et al., 2011). Het is dus aannemelijk dat het waterige olijvenextract (OLF) zijn anti-ontstekings effect uitoefent bij pati-

enten met AR terwijl ze de expressie van NF- $\kappa$ B en/of het COX-2 enzym verminderen.

Aan de andere kant komt een excessieve angiogenese voort uit het ontstekingsproces in het synoviale membraan en veroorzaakt het een verspreiding van cellen van pannusweefsels en een complicatie van symptomen van AR. De neovascularisatie (angiogenese) draagt veel bij aan de ontwikkeling en het behouden van de ontsteking van AR (*Semerano et al., 2011; Lee et al., 2001*), en we zagen een correlatie tussen de progressie van AR en het VEGF niveau (Vascular Endothelial Growth Factor, de meest belangrijke pro-angiogenese factor) bij patiënten met AR (*Lee et al., 2001; Sone et al., 2001*). De activatie van VEGF en angiopoietine-1 (Ang-1), een andere pro-angiogenese factor, is een gedeeld mechanisme met meerdere doelwitten, inclusief NF- $\kappa$ B afhankelijk van de cytokines (IL-1 $\beta$  en TNF- $\alpha$ ) en de expressie van COX-2 (*Scoditti et al., 2012; Pettit et al., 2001*).

Onze nog ongepubliceerde gegevens leggen uit dat hydroxytyrosol van olijven (de vrucht) in vitro de angiogene reactie vertragen van endotheliale cellen en tegelijkertijd de VEGF (isovormen A, B en C), de expressie van Ang-1 en Ang-2 genen onderdrukken.

Dit correspondeert met de resultaten van de vorige studies (*Scoditti et al., 2012; Fortes et al., 2012*). De pijnintensiteit is lange tijd bekend als de voornaamste klinische manifestatie van het ontstekingsproces van AR. De pijnintensiteit van AR werd geassocieerd met een verhoging van het PGE2 niveau (*Prochazkova et al., 2009; Scher et al., 2007; Kamei et al., 2004*), dit verklaart de doeltreffendheid van NSAID's zoals pijnstillers. Beauchamp et al. (2005) hebben de resultaten opgeschreven in verband met oleocanthal (fenolische verbindingen in olijfolie).

Het is mogelijk dat de vermindering van de circulerende ontstekingsmarkers vooral op het niveau van PGE<sub>2</sub>, de voornaamste reden is voor de intensiteit van de pijn, zoals gezien in de OLF-groep.

Tot slot lijken de resultaten van de klinische studie de doeltreffendheid aan te tonen van het olijvenextract met een hoog gehalte aan polyfenolen als anti-ontstekingsmiddel bij patiënten met AR. De resolutie van het ontstekingsproces in AR wordt uitgeoefend door plausibele mechanismen, waaronder de remming van NF- $\kappa$ B afhankelijk van cytokines (IL-6 et TNF- $\alpha$ ), de onderdrukking van COX-2, van VEGF en Ang-1. De nettoresultaten zijn een vermindering van pijn, de activiteitsscore van de ziekte en de bescherming van gewrichten. Dit versterkt de effecten van pleiotropen van hydroxytyrosol bij de ontsteking, zeker als het getransporteerd is in zijn natuurlijke matrix. Ondanks verschillende tests is meer informatie nodig over de anti-angiogene activiteit van hydroxytyrosol in het synoviale membraan wat een toekomstig doelwit kan worden voor nieuwe anti-ontstekingsmiddelen gebaseerd op de hydroxytyrosolstructuur. Het potentiële effect van polyfenolen in olijven op de co-stimulatie van T cellen en de vermindering van B cellen moet worden verduidelijkt. De recente ontdekkingen komen overeen met de verkregen gegevens uit in vitro en in vivo testen in meerdere klinische studies over anti-ontstekingseffecten van polyfenolen in olijven, wat de potentiële rol van de natuurlijke verbindingen aantoont voor de opzet van functionele voeding.



## Referentielijst van de studie:

Aletaha D, Neogi T., Silman A., Funovits J., Felson D., Bingham III, CO, *et al.* The 2010 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism Classification Criteria for Rheumatoid Arthritis. *Ann. Rheum.* 2010; 69: 1580-1588.

Beauchamp G.K., Russell S.J.K., Diane M., Jianming L., Jana P., Qiang H., *et al.* Phytochemistry: Ibuprofenlike activity in extra-virgin olive oil. *Nature* 2005; 437: 45-46.

Berglin E., Kokkonen H., Einarsdottir E., Agren A., Rantapää Dahlqvist S., Influence of female hormonal factors, in relation to autoantibodies and genetic markers, on the development of rheumatoid arthritis in northern Sweden: a case-control study. *Scand. J. Rheumatol.* 2010; 39:454-60.

Boissier M.C., Semerano L., Challal S., Saidenberg- Kermanac'h N., Falgarone G., Rheumatoid arthritis: from autoimmunity to synovitis and joint destruction: a review. *J. Autoimmun* 2012; 39: 222- 8.

Camargo A., Rangel-Zuñiga O., Haro C., Meza- Miranda E., Peñã-Orihuela P., Meneses M., *et al.* Olive oil phenolic compounds decrease the postprandial inflammatory response by reducing postprandial plasma lipopolysaccharide levels. *Food Chem.* 2014; 162: 161-171.

Bitler C.M., Viale T.M., Damaj B., Crea R., Hydrolyzed Olive Vegetation Water in Mice Has Anti-Inflammatory Activity. *J. Nutr.* 2005; 135: 1475-1479.

Cernadas L., Rodríguez-Romero B., Carballo-Costa L., Importance of nutritional treatment in the inflammatory process of rheumatoid arthritis patients; a review. *Nutr. Hosp.* 2014; 29: 237-45.

Covas M.I., de la Torre K., Farre-Albaladejo M., Kaikkonen J., Fitò M., Lopez-Sabater C., *et al.* Postprandial LDL phenolic content and LDL oxidation are modulated by olive oil phenolic compounds in human. *Free Radic. Biol. Med.* 2006; 40: 608-16.

DeLoach L.J., Higgins M.S., Caplan A.B., Stiff J.L., The visual analog scale in the immediate postoperative period: intra subject variability and correlation with a numeric scale. *Anesth. Analg.* 1998; 86: 102-106.

Eriksson J.K., Neovius M., Ernestam S., Lindblad S., Simard J.F., Askling J., 2013. Incidence of rheumatoid arthritis in Sweden: a nationwide population-based assessment of incidence, its determinants, and treatment penetration. *Arthritis Care Res.* 2013; 65: 870-878.

Estruch R. Anti-inflammatory effects of the Mediterranean diet: the experience of the PREDIMED study. *Proc. Nutr. Soc.* 2010; 69: 333-40.

Estruch, R., Martínez-González, M.A., Corella, D., Salas-Salvadó J, RuizGutiérrez V, Covas MI, *et al.* Effects of a Mediterranean-Style Diet on Cardiovascular Risk Factors: A Randomized Trial. *Ann. Intern. Med.* 2006; 145: 1-11.

Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001; 285: 2486-2497.

Firestein, G. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 423, 356-361 (2003). Fitó M, Cladellas M, Torre R, Martí J, Muñoz D, Schröder H, *et al.*, Anti-inflammatory effect of virgin olive oil in stable coronary disease patients: a randomized, crossover, controlled trial. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2007; 62: 570-574.

Fortes C, García-Vilas J, Quesada A, Medina M. Evaluation of the anti-angiogenic potential of hydroxytyrosol and tyrosol, two bio-active phenolic compounds of extra virgin olive oil, in endothelial cell cultures. *Food Chem.* 2012; 134: 134-140.

Giner E, Andújar I, Recio M, Ríos J, Cerdá-Nicolás J, Giner R. Oleuropein ameliorates acute colitis in mice. *J. Agric. Food Chem.* 2011; 59: 12882-92.

Glossop JR, Dawes PT, Matthey DL. Association between cigarette smoking and release of tumor necrosis factor alpha and its soluble receptors by peripheral blood mononuclear cells in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2006; 45: 1223-1229.

Helmick CG, Felson DT, Lawrence RC, Gabriel S, Hirsch R, Kwoh CK, *et al.* Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part I. *Arthritis Rheum.* 2008; 58: 15-25.

Hinson R, Williams J, Shacter E. Elevated interleukin 6 is induced by prostaglandin E2 in a murine model of inflammation: possible role of cyclooxygenase-2. *Proc. Natl. Sci. Acad.* 1996; 93: 4885–4890.

Hu T, He XWW, Jiang JGG, Xu XLL. Hydroxytyrosol and its potential therapeutic effects: a review. *J. Agric. Food Chem.* 2014; 62: 1449–55.

Inoue H, Takamori M, Shimoyama Y, Ishibashi H, Yamamoto S, Koshihara Y. Regulation by PGE2 of the production of interleukin-6, macrophage colony stimulating factor, and vascular endothelial growth factor in human synovial fibroblasts. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2002; 136: 287-295.

Smolen JS, and Redlich K. Rheumatoid arthritis. In Rose N & Mackay I (Eds): *The Autoimmune Diseases* (Fifth Edition); 2014. p. 511-523.

Kamei D, Yamakawa K, Takegoshi Y, Mikami- Nakanishi M, Nakatani Y, Oh-Ishi S, *et al.* Reduced pain hypersensitivity and inflammation in mice lacking microsomal prostaglandin E synthase-1. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 33684-95.

Killeen M, Linder M, Pontoniere P, Crea R. NF- $\kappa$ B signaling and chronic inflammatory diseases: exploring the potential of natural products to drive new therapeutic opportunities. *Drug Discov. Today* 2014; 19: 373-378.

Landre-Beauvais AJ. Doit-on admettre une nouvelle espèce de Goutte sous la denomination de Goutte, Asthenique Primitive? *An. VIII*, Paris, Brisson 1800.

Lu Y, Wahl LM. Oxidative stress augments the production of matrix metalloproteinase-1, cyclooxygenase-2, and prostaglandin E2 through enhancement of NF-kappa  $\beta$  activity in lipopolysaccharide-activated human primary monocytes. *J. Immunol.* 2005; 175: 5423–9.

Lu B, Hiraki L, Sparks JA, Malspeis S, Chen CY, Awosogba JA, *et al.* Being overweight or obese and risk of developing rheumatoid arthritis among women: a prospective cohort study. *Ann. Rheum. Dis.* 2014; 73: 205-459.

Maiuri M, Stefano D, Meglio P, Irace C, Savarese M, Sacchi R, *et al.* Hydroxytyrosol, a phenolic compound from virgin olive oil,

prevents macrophage activation. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 2005; 371: 457-465.

Makarov S. NF-kappa  $\beta$  in rheumatoid arthritis: a pivotal regulator of inflammation, hyperplasia, and tissue destruction. *Arthritis Res.* 2001; 3: 200-206.

Mattey DL, Dawes PT, Clarke S, Fisher J, Brownfield A, Thomson W, *et al.* Relationship among the HLADRB1 shared epitope smoking and rheumatoid factor production in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2002; 47: 403-407.

Packard CJ, Bezlyak V, McLean JS, Batty GD, Ford I, Burns H, *et al.* Early life socioeconomic adversity is associated in adult life with chronic inflammation, carotid atherosclerosis, poorer lung function and decreased cognitive performance: a cross-sectional, population-based study. *BMC Public Health* 2011; 11, 42.

Page TH, Turner JJ, Brown AC, Timms EM, Inglis JJ, Brennan FM, *et al.* Nonsteroidal antiinflammatory drugs increase TNF production in rheumatoid synovial membrane cultures and whole blood. *J. Immunol.* 2010; 185: 3694-3701.

Park Y, Lee A, Shim S-C, Lee J, Choe J-Y, Ahn H, *et al.* Effect of n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation in patients with rheumatoid arthritis: a 16-week randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-design multicenter study in Korea. *J. Nutr. Biochem.* 2013; 24: 1367-72.

Pettit AR, Ji H, von Stechow D, Müller R, Goldring SR, Choi Y, *et al.* TRANCE/RANKL knockout mice are protected from bone erosion in a serum transfer model of arthritis. *Am. J. Pathol.* 2001; 159: 1689-1699.

Procházková M, Zanvit P, Doležal T, Prokešová L, Kršiak M. Increased gene expression and production of spinal cyclooxygenase 1 and 2 during experimental osteoarthritis pain. *Physiol. Res.* 2009; 58: 419-25.

Richard N, Arnold S, Hoeller U, Kilpert C, Wertz K, Schwager J. Hydroxytyrosol Is the Major Anti-Inflammatory Compound in Aqueous Olive Extracts and Impairs Cytokine and Chemokine Production in Macrophages. *Planta Medica* 2011; 77: 1890-1897.

Rosignoli P, Fuccelli R, Fabiani R, Servili M, Morozzi G. Effect of olive oil phenols on the production of inflammatory mediators in freshly isolated human monocytes. *J. Nutr. Biochem.* 2013; 24: 1513- 1519.

Salminen E, Heikkilä S, Poussa T, Lagstrom H, Saario R, Salminen S, *et al.* Female patients tend to alter their diet following the diagnosis of rheumatoid arthritis and breast cancer. *Prev. Med.* 2002; 34: 529-35.

Sánchez-Fidalgo S, Sánchez de Ibarguen L, Cárdeno A, Alarcón de la Lastra C. Influence of extra virgin olive oil diet enriched with hydroxytyrosol in a chronic DSS colitis model. *Eur. J. Nutr.* 2011; 51: 497–506.

Scher J, Pillinger M, Abramson S. Nitric oxide synthases and osteoarthritis. *Curr. Rheumatol. Rep.* 2007; 9: 9-15.

Scoditti E, Calabriso N, Massaro M, Pellegrino M, Storelli C, Martines G, *et al.* Mediterranean diet polyphenols reduce inflammatory angiogenesis through MMP-9 and COX-2 inhibition in human vascular endothelial cells: a potentially protective mechanism in atherosclerotic vascular disease and cancer. *Arch. Biochem. Biophys.* 2012; 527: 81–89.

Semerano L, Clavel G, Assier E, Denys A, Boissier MC. Blood vessels, a potential therapeutic target in rheumatoid arthritis? *Jt Bone Spine* 2011; 78: 118-123.

Smolen J, Aletaha D, Redlich K. The pathogenesis of rheumatoid arthritis: new insights from old clinical data? *Nat. Rev. Rheumatol.* 2012; 8: 235–43.

St-Laurent-Thibault C, Arseneault M, Longpré F, Ramassamy C. Tyrosol and hydroxytyrosol, two main components of olive oil, protect N2a cells against amyloid- $\beta$ -induced toxicity. Involvement of the NF- $\kappa$ B signaling. *Curr. Alzheimer Res.* 2011; 8: 543–551.

Strand V, Kimberly R, Isaacs J. Biologic therapies in rheumatology: lessons learned, future directions. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2007; 6: 75–92.

Ruiz-Esquide V, Sanmartí R. Tobacco and Other Environmental Risk Factors in Rheumatoid Arthritis. *Reumatol Clin.* 2012; 8: 342–350.



Visioli F, Galli C, Bornet F, Mattei A, Patelli R, Galli G, *et al.* Olive oil phenolics are dose- dependently absorbed in humans. *FEBS Lett.* 2000; 468:159–160.

Visioli F, Galli C, Grande S, Colonnelli K, Patelli C, Galli G, *et al.* Hydroxytyrosol excretion differs between rats and humans and depends on the vehicle of administration. *J. Nutr.* 2003; 133: 2612–2615.

Wells G, Becker JC, Teng J, Dougados M, Schiff M, Smolen J, *et al.* Validation of the 28-joint Disease Activity Score (DAS28) and European League Against Rheumatism response criteria based on C-reactive protein against disease progression in patients with rheumatoid arthritis, and comparison with the DAS28 based on erythrocyte sedimentation rate. *Ann. Rheum. Dis.* 2009; 68: 954–60.

Wu HJ, Ivanov II, Darce J, Hattori K, Shima T, Umesaki Y, *et al.* Gutresiding segmented filamentous bacteria drive autoimmune arthritis via T helper 17 cells. *Immunity* 2010; 32: 815-827.

Zhang X, Cao J, Jiang L, Zhong L. Suppressive effects of hydroxytyrosol on oxidative stress and nuclear Factor-kappa  $\beta$  activation in THP-1 cells. *Biol. Pharm. Bull.* 2009a; 32: 578–582.

Zhang X, Cao J, Zhong L. Hydroxytyrosol inhibits pro-inflammatory cytokines, iNOS, and COX- 2 expression in human monocytic cells.

Naunyn Schmiedebergs *Arch. Pharmacol.* 2009b; 379: 581–6.



# Literatuurlijst en wetenschappelijke werken

---

**Abbey M, Nestel PJ & Baghurst PA (1993).** Antioxidant vitamins and low density lipoprotein oxidation. *American Journal of Clinical Nutrition*. 58, 52.

**Aeschbach R, Loliger J, Scott BC, Murcia A, Butler J, Halliwell B, Aurome OI (1994).** Antioxidant actions of tymol, carvacrol, 6-gingerolo, zingerone and hydroxytyrosol. *Food and Chemical Toxicology*. 32: 31–36.

**Amanda L, Clark, Kathryn Mansfield Matera (2010).** Effect of unsaturation in fatty acids on the binding and oxidation by myeloperoxidase: Ramifications for the initiation of atherosclerosis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 20: 5643–5648.

**Andrikopoulos N, Hassapidou M, Manoukas A (1989).** The Tocopherol Content of Greek Olive Oils. *J. Sci. Food Agric*. 46: 503-509.

**Anon (1983).** Presencia Historica del Aceite de Oliva, in (Cabrera,F.B,ed), Las Raices del Aceite de Oliva, Ministerio de Agricultura, Servicio de Publicaciones Agrarias, Madrid.

**Aparicio R., Luna G (2002).** Characterization of Monovarietal Virgin Olive Oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*. 104: 614-627.

**Aruoma OI (1994).** Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*. 32: 671–683.

**Aruoma OI, Deiana M, Jenner A, Halliwell B, Harparkash K, Banni S, Corongiu FF, Dessi MA, Aeschbach R (1998).** Effect of hydroxytyrosol found in extravirgin olive oil on DNA damage and on lowdensity lipoprotein oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46: 5181–5187.

**Baccouri O, Guerfel M, Baccouri B, Cerretani L, Bendini A, Lercerker G, Zarrouk M, Daoud Ben Miled D (2008).** Chemical composition and oxidative stability of Tunisian monovarietalvirgin olive oils with regard to fruit ripening. *Food Chemistry*. 109: 743–754.

**Bai C, Yan X, Takenakay M, Sekiya S, Nagata T. (1998).** Determination of synthetic hydroxytyrosol in rat plasma by GC– MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46: 3998–4001.

**Beauchamp G, Keast R, Morel D (2005).** Ibuprofen-like Activity in Extra Virgin Olive Oil. *Nature*. 437: 45-46.

**Belitz HD, Grosch W, Schieberle P (2004).** Food Chemistry (3rd edition). Berlin: Springer Verlag.

**Belkner J, Wiesner R, Rathman J, (1993).** Oxygenation of Lipoproteins by Mammalian Lipooxygenases. *Eur. J. Biochem.* 213 : 251-261.

**Beltran G, Aguilera A, del Rio C, (2005).** Influence of Fruit Ripening Process on the Natural Antioxidant Content of Hojiblanca Virgin Olive Oils. *Food Chem.* 89 : 207-215.

**Ben Sassi A, Boularbah A, Jaouad A, Walker G, Boussaid A (2006).** A comparison of Olive oil Mill Wastewaters (OMW) from three different processes in Morocco. *Process Biochemistry.* 41 (1) : 74-78.

**Bendini A, Cerretani L, Carrasco-Pancorbo A, Maria Gómez-Caravaca A, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A and G Lercker (2007).** Phenolic Molecules in Virgin Olive Oils: a Survey of Their Sensory Properties, Health Effects, Antioxidant Activity and Analytical Methods. An Overview of the Last Decade. *Molecules.* 12 : 1679-1719.

**Benkhalti F, Prost J, Paz E, Perez-Jimenez F, El Modafar C, El Boustani E (2002).** Effects of feeding virgin olive oil or their polyphenols on lipid of rat liver. *Nutrition Research.* 22 : 1067-1075.

**Bianco A, Chiacchio M, Grassi D (2006).** Phenolic Components of *Olea europaea*: Isolation of New Tyrosol and Hydroxytyrosol Derivatives. *Food Chem.* 95 : 562-565.

**Bianco A, Coccioli F, Guiso M (2001).** Presence in Olive Oil of a New Class of Phenolic Compounds: Hydroxyl-isochromans. *Food Chem.* 77 : 405-411.

**Bisignano G, Tomaino A, Lo Cascio R, Crisafi G, Uccella N, Saija A (1999).** On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 51 : 971-974.

**Blazquez-Martinez JM (1996).** History of Olive Tree, The World Olive Encyclopaedia, IOOC. Madrid, pp19-54.

**Blekas G, Psomiadou E, Tsimidou M (2002).** On the Importance of Total Polar Phenols to Monitor the Stability of Greek Virgin Olive Oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 104 : 340-346.

**Bonanome A, Pagnan A, Biffanti S (1992).** Effect of Dietary Monounsaturated and Polyunsaturated Fatty Acids on the Susceptibility of Plasma Low Density Lipoproteins to Oxidative Modification. *Arterioscler. Thromb.* 12 : 529-533.

**Bonanome A, Pagnan A, Caruso D, Toia A, Xamin A, Fedeli E, Berra B, Zamburlini A, Ursini F, Galli G, (2000).** Evidence of postprandial absorption of olive oil phenols in humans. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases.* 10 : 111-120.

**Boskou D (1996).** Olive oil: Chemistry and Technology. *AOCS Press, Champaign.* IL : 52- 83.

**Boskou D, In. Gunstone F (ed) (2002).** Vegetable Oils in Food Technology. Oxford: CRC Press. 244-277.

**Brenes M., Hidalgo F, Garcia A, (2000).** Pinoresinol and 1-acetoxypinoresinol, Two New Phenolic Compounds Identified in Olive Oil. *JA-OCS*. 77:715-720.

**Brown MS, Goldstein JL (1983).** Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annual Review of Biochemistry*. 52: 223.

**Buil-Cosiales P, Irimia P, Berrade N, (2008).** Carotid intima-media thickness is inversely associated with olive oil consumption. *Atherosclerosis*. 196:742-748.

**Cannon R (1998).** Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. *Clin Chem*. 44:1809-1819.

**Cantarelli C (1961).** Sui polifenoli presenti nella drupa e nell'olio di oliva. *Riv. Ital. Sost. Grasse*. 38: 69-72.

**Cao G, Sofic E, Prior RL (1997).** Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine*. 22: 749-760.

**Cao G, Sofic E, Prior RL (1997).** Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine*. 22: 749-760.

**Capasso R, Evidente A, Schivo L, Orru G, Marcialis MA, Cristinzio G (1995).** Antibacterial polyphenols from olive oil mill waste waters. *Journal of Applied Bacteriology*. 79: 393-398.

**Carluccio M, Siculella L, Ancora M, (2003).** Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol*. 23:622-629.

**Carrasco-Pancorbo A, Cerretani L, Bendini A, Segura-Carretero A, Gallina-Toschi T, Fernandez-Gutierrez A (2005).** Analytical determination of polyphenols in olive oils. *J. Sep. Sci*. 28: 837 - 858.

**Caruso D, Visioli F, Patelli R., Galli C, Galli G (2001).** Urinary excretion of olive oil phenols and their metabolites in humans. *Metabolism*. 50: 1426-1428.

**Cohen J (2002).** Therapies. Confronting the limits of success. *Science*; 296:2320-2324.

**Cominacini L, Garbin U, Cenci B, Davoli A (1991).** Predisposition to LDL oxidation during copper-catalyzed oxidative modification and its relation to a-tocopherol content in humans. *Clinica Chimica Acta*. 204: 57-68.

**Covas MI, Konstantinidou V, Fito M (2009).** Olive oil and cardiovascular health. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 54: 477–82.

**D'Angelo S, Manna C, Migliardi V, Mazzoni O, Morrica P, Capasso G, Pontoni G, Galletti P, Zappia V (2001).** Pharmacokinetics and metabolism of hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil. *Drug Metabolism and Disposition.* 29: 1492–1498.

**Daccache A, Lion C, Sibille N, Gerard M, Slomianny C, Lippens G, Cotelle P (2011).** Oleuropein and derivatives from olives as Tau aggregation inhibitors. *Neurochemistry International.*

**de Groot E, Hovingh G, Wiegman A, (2004).** Measurement of arterial wall thickness as a surrogate marker for atherosclerosis. *Circulation.* 109: III33–III38.

**De Leonardis A, Macciola V, De Felice M (1998).** Rapid Determination of Squalene in Virgin Olive Oils Using Gas-liquid Chromatography. *It. J. Food Sci.* 1: 75-80.

**de Rojas-Walker T, Tamir S, Ji H, Wishnock J, Tennenbaum SR (1995).** Nitric oxide induces oxidative damage in addition to deamination in macrophages DNA. *Chemical Research in Toxicology.* 8: 473–477.

**Deiana M, Aruoma OI, Bianchi MDLP, Spencer JPE, Kaur H, Halliwell B, Aeschbach R, Banni S, Dessi MA, Corongiu FP (1999).** Inhibition of peroxynitrite dependent DNA base modification and tyrosine nitration by the extra virgin olive oil-derived antioxidant hydroxytyrosol. *Free Radical Biology and Medicine.* 26: 762–769.

**Dell'Agli M, Fagnani R, Mitro N (2006).** Minor components of olive oil modulate proatherogenic adhesion molecules involved in endothelial activation. *J. Agric. Food Chem.* 54: 3259–3264.

**Dell'Agli M, Maschi O, Galli G (2007).** Inhibition of platelet aggregation by olive oil phenols via cAMP phosphodiesterase. *Br. J. Nutr.* 11:1–7.

**Di Giovacchino L (1989).** Olive Processing Systems. Separation of the Oil from the Must. *Olivae.* 26: 21-29.

**Di Giovacchino L (1996).** Influence of Extraction Systems on Olive Oil Quality, in (Boskou D., ed), Olive Oil, Chemistry and Technology. AOCs Press, Champaign, Illinois. 12-51.

**Di Giovacchino L, Sestili S, Di Vincenzo D (2002).** Influence of olive processing on virgin olive oil quality. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 104: 587–601.

**Dougherty RM, Galli C, Ferro-Luzzi A (1987).** Lipid and Phospholipid Fatty Acid Composition of Plasma, Red Blood Cells, and Platelets and How They are Affected by Dietary Lipids: a Study of Normal Subjects From Italy, Finland, and the USA. *Am. J. Clin. Nutr.* 45: 443-455.

**DT Angelo S, Ingrosso D, Perfetto B, Baroni A, Zappia M, Lo bianco Lubrano L, Tufano MA, Galletti P (2001).** UVA irradiation induces l-isoaspartyl formation in melanoma cell proteins. *Free Radic. Biol. Med.* 31:1–9.

**Duriez P (2004).** Mécanismes de formation de la plaque d'athérome. *La revue de médecine interne* 25: S3–S6.

**Edwin N. Frankel (2011).** Nutritional and biological properties of extra virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.*

**Espósito K, Marfella R, Ciotola M, (2004).** Effect of a Mediterranean style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome: a randomized trial. *JAMA.* 292:1440–1446.

**Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G (1992).** The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radical Biology and Medicine.* 13: 341.

**Estruch R, Martínez-González M, Corella D (2006).** Effects of a Mediterranean-style diet on cardiovascular risk factors. *Ann. Int. Med.* 145:1–11.

**Evagelia T, Harris N. Lazarides and Konstantinos B (2004).** Olive Mill Wastewater Treatment. Petrotos Aristotle University of Thessaloniki, Department of Food Science and Technology, 54006, Thessaloniki, Greece.

**Finotti E, Di Majo D (2003).** Influence of solvents on the antioxidant property of flavonoids. *Nahrung/Food.* 47: 186–187.

**Gandul-Rojas B, Mínguez-Mosquera M (1996).** Chlorophyll and Carotenoid Composition in Virgin Olive Oils From Various Spanish Olive Varieties. *J. Sci. Food Agric.* 72: 31-39.

**Gardner CD, Kraemer HC (1995).** Monounsaturated Versus Polyunsaturated Dietary Fat and Serum Lipids. A Meta-analysis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15: 1917-1927.

**Grams G, Eskins K (1972).** Dye-sensitized Photooxidation of Tocopherols: Correlation Between Singlet Oxygen Reactivity and Vitamin E Activity. *Biochemistry.* 11: 606-608.

**Granados-Principal SP, Quiles LJ, Ramirez-Tortosa CL, Sanchez-Rovira P, and Ramirez-Tortosa MC (2010).** Hydroxytyrosol: from laboratory investigations to future clinical trials. *Nutrition Reviews.* 68(4):191–206.

**Gunstone F, Harwood J, Padley F (eds) (1994).** The Lipid Handbook (2nd Edition). London: Chapman and Hall.

**Gunstone FD (2004).** The Chemistry of Oils and Fats Sources, Composition, Properties and Uses. Oxford, UK: Blackwell Publishing.

Gutfinger T (1981). Polyphenols in Olive Oils. *JAOCS*. 58: 966-968.

**Gutteridge JM, Halliwell B (1992)**. Comments on review of Free Radicals in Biology and Medicine, second edition, by Barry Halliwell and John M. C. Gutteridge. *Free Radic. Biol. Med.* 12: 93-95.

**Halliwell B, Gutteridge JMC (1999)**. "Free Radicals in Biology and Medicine." Oxford University Press, Oxford.

**Halliwell B (1997)**. Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutrition Reviews*. 55, 44-52.

**Halliwell B, Aeschbach R, Loliger J, Aruoma OI (1995)**. The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*. 33: 601-617.

**Halliwell B, Gutteridge MC (1990)**. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in Enzymology*. 186: 1-85.

**Hamden K, Carreau S, Lajmi S, Aloulou D, kchaou D, Elfeki A (2008)**. Protective effect of 1,7-estradiol on hyperglycemia, stress oxidant, liver dysfunction and histological changes induced by alloxan in male rat pancreas and liver. *Steroids*. 94: 495-501.

**Hamdi K. Hamdi, Castellon R (2005)**. Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an anti-tumor agent and cytoskeleton disruptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 334: 769-778.

**Hammer SM (2005)**. Clinical practice. Management of newly diagnosed HIV infection. *N. Engl. J. Med.*; 353: 1702-1710.

**Han J, Talorete TP, Yamada P, Isoda H (2009)**. Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells. *Cytotechnology*. 59:45-53.

**Hao J, Shen W, Yu G, Jia H, Li X, Feng Z, Wang Y, Weber P, Wertz K, Sharman E, Liu J (2010)**. Hydroxytyrosol promotes mitochondrial biogenesis and mitochondrial function in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 21: 634-644.

**Harborne JB, Dey PM.. Methods in Plant Biochemistry. Harborne JB (Ed.) (1989)**. Academic Press, London (UK).

**Hegsted DM., Ausman LM, Johnson JA (1993)**. Dietary Fat and Serum Lipids: an Evaluation of the Experimental Data. *Am. J. Clin. Nutr.* 57: 875-883.

**Henquin C, Debuyser A, Drews G (1992)**. Plant, Regulation of K<sup>+</sup> permeability and membrane potential in insulin-secreting cells, in: P.R. Flatt (Ed.), Nutrient Regulation of Insulin Secretion, Portland, London. pp. 173-192.

**Hertog MLG, Feskens EJM, Katan MB, Kromhout D (1993).** Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*. 342: 1007.

**Hrcirik K, Fritsche S (2004).** Comparability and Reliability of Different Techniques for the Determination of Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 106: 540-549.

**Huang CL, Sumpio BE (2008).** Olive oil, the Mediterranean diet, and cardiovascular health. *J. Am. Coll. Surg.* 207:407–16.

**Huang MT, Osawa T, Ho CT, Rosen RT (1994).** Food phytochemicals for cancer prevention. In *Fruits and Vegetables*. ACS Symposium Series no. 46. Washington, DC: American Chemical Society.

**Jialal I, Fuller CJ, Huet BA (1995).** The effect of  $\alpha$ -tocopherol supplementation on LDL oxidation. A dose-response study. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 15: 190–198.

**Johnson IT, Williamson G, Musk SRR (1994).** Anticarcinogenic factors in plant foods. A new class of nutrients. *Nutrition Research Reviews*. 7: 1–30.

**Katan MB (1995).** Fish and Heart Disease. *N. Engl. J. Med.* 332: 1024-1025.

**Katiyar S, Mukhtar H (1996).** Tea in the chemoprevention of cancer: epidemiologic and experimental studies. *Int. J. Oncol.* 8: 221–238.

**Keceli T, Gordon MH (2001).** The antioxidant activity and stability of the phenolic fraction of green olives and extra virgin olive oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 81: 1391–1396.

**Lanzón A, Albi T, Cert A (1994).** The Hydrocarbon Fraction of Virgin Olive Oil and Changes Resulting From Refining. *JAOCS*. 71: 285-291.

**Lavee S (1996).** Olive Tree Biology and Physiology, World Olive Encyclopedia, IOOC, Madrid, pp 5910.

**Lee-Huang S, Lin Huang P, Zhang D, Wook Lee J, Bao J, Sun Y, Chang YT, Zhang J, Lee-Huang P (2007).** Discovery of Small-Molecule HIV-1 Fusion and Integrase Inhibitors Oleuropein and Hydroxytyrosol: I. Fusion Inhibition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 23; 354(4) : 872–878.

**Lee-Huang S, Zhang L, Huang PL, Chang YT (2003).** Anti-HIV activity of olive leaf extract (OLE) and modulation of host cell gene expression by HIV-1 infection and OLE treatment. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 307:1029–1037.

**Leenen R, Roodenburg AJ, Vissers MN, Schuurbiens JA, van Putte KP, Wiseman SA, van de Put FH (2002).** Supplementation of plasma with olive oil phenols and extracts: influence on LDL oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 1290–1297.



**Loukas M, Krimbas CB (1983).** History of Olive Cultivars Based on the Generic Distances, *J. Hort. Science*. 58: 121-127.

**Manna C, Galletti P, Cucciolla V, Moltedo O, Leone A, Zappia V (1997).** The protective effect of the olive oil polyphenol (3,4-dihydroxyphenyl) ethanol counteracts reactive oxygen metabolite-induced cytotoxicity in Caco-2 cells. *Journal of Nutrition*. 127: 286-292.

**Manna C, Galletti P, Cucciolla V, Montedoro GF, Zappia V (1999).** Olive oil hydroxytyrosol protects human erythrocytes against oxidative damages. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 10: 159-165.

**Manna C, Galletti P, Maisto G, Cucciolla V, Dangelo S, Zappia V (2000).** Transport mechanism and metabolism of olive oil hydroxytyrosol in Caco-2 cells. *FEBS Letters*. 470: 341-344.

**Manzi P, Panfili G, Esti M, (1998).** Natural Antioxidants in the Unsaponifiable Fraction of Virgin Olive Oils From Different Cultivars. *J. Sci. Food Agric*. 77: 115-120.

**Martin S, Andriantsitohaina R (2002).** Cellular mechanism of vasculo-protection induced by polyphenols on the endothelium. *Annales de cardiologie et d'angéologie*. 51: 304-315.

**Masella R, Cantafora A, Modesti D, Cardilli A, Gennaro L, Bocca A, Coni E (1999).** Antioxidant activity of 3, 4-DHPEA-EA and protocatechuic acid: a comparative assessment with other olive oil biophenols. *Redox Report*. 4: 113-121.

**Mateos R, Espartero J, Trujillo M (2001).** Determination of Phenols, Flavones and Lignans in Virgin Olive Oil by Solid Phase Extraction and HPLC With Diode Array Ultraviolet Detection. *J. Agric. Food Chem*. 49: 2185-2192.

**Menotti A, Blackburn H, Kromhout D, Nissinen A, Fidanza F, Giampaoli S, Buzina R, Mohacek I, Nedeljkovic S, Aravanis C, et Toshima H (1997).** Changes in population cholesterol levels and coronary heart disease deaths in seven countries. *Eur. Heart J*. 18: 566-571.

**Mensink RP, Zock PL, Kester AD (2003).** Effects of Dietary Fatty Acids and Carbohydrates on the Ratio of Serum Total to HDL Cholesterol and on Serum Lipids and Apolipoproteins: a Meta-analysis of 60 Controlled Trials. *Am. J. Clin. Nutr*. 77: 1146-1155.

**Mínguez-Mosquera M, Rejano-Navarro L, Gandul-Rojas B (1991).** Color-pigment Correlation in Virgin Olive Oil. *JAOCS*. 68: 332-336.

**Mínguez-Mosquera M., Gandul-Rojas B, Garrido-Fernández (1990).** J Pigments Present in Virgin Olive Oil. *JAOCS*. 67: 192-196.

**Mario-Casas E, Covas MI, Farre M, Fito M, Ortuno J, Weinbrenner T, Roset P, de la Torre R, (2003a).** Hydroxytyrosol disposition in humans. *Clinical Chemistry*. 49: 945–952.

**Mario-Casas E, Covas MI, Fito M, Farre-Albadalejo M, Marrugat J, de la Torre R (2003b).** Tyrosol and hydroxytyrosol are absorbed from moderate and sustained doses of virgin olive oil in humans. *European Journal of Clinical Nutrition*. 57: 186–190.

**Mario-Casas E, Farre Albadalejo M, Covas MI, Rodriguez JO, Menoyo Colomer E, Lamuela Raventos RM, de la Torre R (2001).** Capillary gas chromatography-mass spectrometry quantitative determination of hydroxytyrosol and tyrosol in human urine after olive oil intake. *Analytical Biochemistry*. 294: 63–72.

**Montedoro GF, Cantarelli C (1969).** Indagine sulle sostanze fenoliche presenti nell'olio di oliva. *Riv. Ital. Sost. Grasse*. 46: 115–124.

**Montedoro GF, Garofolo L, Bertuccioli M (1986).** Factors Shaping the Quality Characteristics of an Olive Oil. *Industria Alimentari*. 25: 549555.

**Morales M, Tsimidou M, In Harwood J, Aparicio R (eds) (2002).** Handbook of Olive Oil. Gaithersburg: Aspen Publishers. pp: 393-438.

**Mukherjee S, Lekli I, Gurusamy N, Bertelli AAA, Das DK (2009).** Expression of the longevity proteins by both red and white wines and their cardioprotective components, resveratrol, tyrosol, and hydroxytyrosol. *Free Radical Biology & Medicine*. 46: 573–578.

**Nenadis N, Tsimidou M (2002).** Determination of Squalene in Olive Oil Using Fractional Crystallization for Sample Preparation. *JAOCS*. 79: 257-259.

**Newcomb TG & Loeb LA (1998).** Mechanism of mutagenicity of oxidatively-modified bases. In *Molecular Biology of Free Radicals in Human Diseases*, pp. 137–166 [OI Aruoma and B Halliwell, editors]. Saint Lucia: OICA International.

**Ninni V (1999).** A Statistical Approach to the Biosynthetic Route of the Fatty Acids in Olive Oil: Crosssectional and Time Series Analyses. *J. Sci.Food Agric*. 79: 2113-2121.

**Ortega RM (2006).** Importance of functional foods in the Mediterranean diet. *Publ. Health Nutr*. 9: 1136–1140.

**Owen R, Mier W, Giacosa A (2000).** Identification of Lignans as Major Components in the Phenolic Fraction of Olive Oil. *Clinic. Chem*. 46: 976-988.

**Owen RW, Giacosa A, Hull WE, Haubner R, Spiegelhalder B, Bartsch H (2000a).** The antioxidant/anticancer potential of phenolic

compounds isolated from olive oil. *European Journal of Cancer*. 36: 1235–1247.

**Owen RW, Mier W, Giacosa A (2000).** Identification of Lignans as Major Components in the Phenolic Fraction of Olive Oil. *Clin. Chem*. 46: 976–988.

**Palsamy P, Subramanian S (2009).** Modulatory effects of resveratrol on attenuating the key enzymes activities of carbohydrate metabolism in streptozotocinnicotinamide induced diabetic. *Chem. Biol. Interact*. 179: 356–362.

**Panza F, Solfrizzi V, Colacicco AM, D'introno A, Capurso C, Torres F, Del Parigi A, Capurso, S, Capurso A (2004).** Mediterranean diet and cognitive decline. *Public Health Nutr*. 7: 959–963.

**Papadopoulos G & Boskou D (1991).** Antioxidant effect of natural phenols on olive oil. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 68: 669–671.

**Parthasarathy S (1991).** Novel atherogenic oxidation modification of low density lipoprotein. *Diabetes/Metabolism Reviews*. 7: 163.

**Perez-Jimenez F (2005).** International conference on the healthy effect of virgin olive oil. *Eur. J. Clin. Invest*. 35: 421–424.

**Perez-Jimenez F, Castro P, Lopez-Miranda J (1999).** Circulating levels of endothelial function are modulated by dietary monounsaturated fat. *Atherosclerosis*. 145: 351–358.

**Pérez-Jiménez F, Delgado Lista J, Pérez-Martínez P, López-Se-gura F, Fuentes F, Cortés B, Lozano A, López-Miranda J (2006).** Olive oil and haemostasis: a review on its healthy effects. *Public Health Nutrition*. 9(8A): 1083–1088.

**Perrin J (1992).** Minor Components and Natural Antioxidants of Olives and Olive Oils. *Rev. Franç*.

**Pezzuto JM (1997).** Plant-derived anticancer agents. *Biochemical Pharmacology*. 53: 121–133.

**Princen HMG, van Poppel G, Vogelzang C, Buytenhek R, Kok FJ (1992).** Supplementation with vitamin E but not b-carotene in vivo protects low density lipoprotein from lipid peroxidation in vitro Effect of Cigarette Smoking. *Arteriosclerosis and Thrombosis*. 12: 554–562.

**Psaltopoulou T, Naska A, Ofranos P (2004).** Olive oil, the Mediterranean diet, and arterial blood pressure: the Greek European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Am. J. Clin. Nutr*. 80: 1012–1018.

**Psomiadis E, Karakostas K, Blekas G (2003).** Proposed Parameters for Monitoring Quality of Virgin Olive Oil (Koroneiki cv). *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 105: 403-408.

**Psomiadis E, Tsimidou M (1998).** Simultaneous HPLC Determination of Tocopherols, Carotenoids and Chlorophylls for Monitoring Their Effect on Virgin Olive Oil Oxidation. *J. Agric. Food Chem.* 46: 5132-5138.

**Psomiadis E, Tsimidou M (2001).** Pigments in Greek Virgin Olive Oils: Occurrence and Levels. *J. Sci. Food Agric.* 41: 640-647.

**Rabascall NH, Riera JB (1987).** Variations of the Tocopherols and Tocotrienols Content in the Obtention, Refining and Hydrogenation Processes of Edible Oils. *Gracas Aceites.* 38: 145-148.

**Raederstorff D, Wang-schmidt Y, Wertz K (2010).** Use of hydroxytyrosol as anti-aging agent. *Pub. No. : US 2010/0130621 A1.*

**Rahmanism M, Csallany A (1991).** Chlorophyll and  $\beta$ -carotene Pigments in Moroccan Virgin Olive Oils Measured by High Performance Liquid Chromatography, *JAOCS.* 68: 672-674.

**Rao C, Newmark H, Reddy B (1998).** Chemopreventive Effect of Squalene on Colon Cancer. *Carcinogenesis.* 19: 287-290.

**Raven PD, Parthasarathy S, Grasse BJ, Miller E, Almazan F, Mattson FH, Khoo JC, Steinberg D, Witztum JL (1991).** Feasibility of using an oleate-rich diet to reduce the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidative modification in humans. *American Journal of Clinical Nutrition.* 54: 701-706.

**Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1996).** Structure-Antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine.* 20: 933-956.

**Rohn TT, Hinds TR, Vincenzi OF (1993).** Ion transport ATPases as targets for free radical damage. Protection by an aminosteroid of the Ca<sup>2+</sup> pump ATPase and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump ATPase of human red blood cell membranes. *Biochemical Pharmacology.* 46: 525-534.

**Rossell JB (2001).** *Frying: Improving quality.* Woodhead Publishing Limited, CRC Press, Boca Raton. Boston. New York Washington, DC.

**Ruiz-Canela M, Martínez-González MA (2011).** Olive oil in the primary prevention of cardiovascular disease. *Maturitas.* 68: 245-250.

**Ruiz-Gutierrez V, Juan ME, Cert A, Planas JM (2000).** Determination of hydroxytyrosol in plasma by HPLC. *Analytical Chemistry.* 72: 4458-4461.

**Ryan D, Robardo K (1998).** Critical review: phenolic compounds in olives. *Analyst.* 123: 31R-44R.

**Sacchi R (2007).** Extraction technology In L'Extravergine, a guide to the best certified quality olive oil in the world. *Oreggia, M. Ed. Cucina Vini*. 82-103.

Sadrzadeh SMH, Graf E, Panther SS, Hallaway PE, Eaton JW (1984). Hemoglobin. A biologic Fenton reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 259: 14354–14356.

**Salami M, Galli C, De Angelis L, Visioli F (1995).** Formation of F2-isoprostanes in oxidized low density lipoprotein. Inhibitory effects of hydroxytyrosol. *Pharmacological Research*. 31: 275–279.

**Scaccini C, Nardini M, D'Aquino M, Gentili V, Di Felice M, Tomassi G (1992).** Effect of dietary oils on lipid peroxidation and on antioxidant parameters of rat plasma and lipoprotein fractions. *Journal of Lipid Research*. 33: 627–633.

**Scania P, Casu M, Lai A (1999).** Recognition and Quantitation of Cis-vaccenic and Eicosenoic Fatty Acids in Olive Oils by C-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Lipids*. 34: 757759.

**Servilism M, Piacquadio P, De Stefano G (2002).** Influence of a New Crushing Technique on the Composition of the Volatile Compounds and Related Sensory Quality of Virgin Olive Oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*. 104: 483-489.

**Shahidi F (1997).** Natural antioxidants: Chemistry, health effects and applications. *AOCS Press, Champaign, IL (USA)*, 97–149.

**Singleton V, Orthofer R, Lamuela-Raventos R, In. Packer L (ed) (1999).** Methods in Enzymology (Vol. 299). San Diego: Academic Press, 152-178.

**Smith T, Yang G, Serial D (1998).** Inhibition of 4-(methylnitrosamino)1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced Lung Tumorigenesis by Dietary Olive Oil and Squalene. *Carcinogenesis*. 19: 703-706.

**Solfrizzi V, Colacicco AM, D'Introno A, Capurso C, Torres F, Rizzo C, Capurso A, Panza F, (2006).** Dietary intake of unsaturated fatty acids and age-related cognitive decline: a 8.5-year follow up of the Italian longitudinal study on aging. *Neurobiol. Aging*. 27: 1694–1704.

**Solfrizzi V, Colacicco AM, D'Introno A, Capurso C, Torres F, Rizzo C, Capurso A, Panza F, (2006).** Dietary intake of unsaturated fatty acids and age-related cognitive decline: a 8.5-year follow up of the Italian longitudinal study on aging. *Neurobiol. Aging*. 27: 1694–1704.

**Solfrizzi V, Panza F, Capurso A (2003).** The role of diet in cognitive decline. *J. Neural. Transm*. 110: 95–110.

**Solfrizzi V, Panza F, Torres F, Mastroianni F, Del Parigi A, Venezia A, Capurso A, (1999).** High monounsaturated fatty acids intake protects against age-related cognitive decline. *Neurology*. 52: 1563– 1569.

**Speroni E, Guerra MC, Minghetti A, Crespi-Perello N, Pasini P, Piazza F, Roda A (1998).** Oleuropein evaluated in vitro and in vivo as an antioxidant. *Phytotherapy Research*. 12 : 98–100.

**Sumpio B, Cordova A, Berke-Schlessel D (2006).** Green tea, the “Asian paradox,” and cardiovascular disease. *J. Am. Coll. Surg.* 202:813–825.

**Sung B, Jin Jeong KI, Seok Song YE, Jin Son M, Pal Yu B, Young Chung H (2005).** cDNA representational difference analysis used in the identification of genes related to the aging process in rat kidney. *Mechanisms of Ageing and Development*. 126 : 882–891.

**Tanaka T, Makita H, Kawamori T, Kawabata K, Mori H, Murakami A, Satoh K, Hara A, Ohigashi H, Koshimizu K (1997).** A xanthine oxidase inhibitor 10-acetoxycavicol acetate inhibits azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats. *Carcinogenesis*. 18 : 1113–1118.

**Tiscornia E, Fiorina N, Evangelisti F (1982).** Chemical Composition of Olive Oil and Variations Induced by Refining. *Riv. Ital. Sost. Grasse*. 59 : 519–555.

**Trichopoulou A, Costacou T, Bamia C (2003).** Adherence to a Mediterranean Diet and Survival in a Greek Population. *N. Engl. J. Med.* 348 : 2599–2608.

**Trichopoulou A, Orfanos P, Norat T (2005).** Modified Mediterranean Diet and Survival: EPIC-elderly Prospective Cohort Study. *Bmj*. 330 : 991.

**Tuck KL, Freeman MP, Hayball PJ, Stretch GL, Stupans I (2001).** The in vivo fate of hydroxytyrosol and tyrosol, antioxidant phenolic constituents of olive oil, after intravenous and oral dosing of labeled compounds to rats. *Journal of Nutrition*. 131 : 1993–1996.

**Tuck KL, Hayball PJ (2002).** Major phenolic compounds in olive oil: Metabolism and health effects. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 13 : 644.

**Tuck KL, Hayball PJ, 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 : 2404–2409.

**Uccella N (2001).** The olive biophenols: hedonic-sensory descriptors of evoo and wotos in the Mediterranean aliment culture. In *Food Flavours and Chemistry: Advances of the New Millennium*. A. H. Spanier, F. Shahidi, T.H. Parment, C. J. Mussinan, C. T. Ho, E. TratrasContis Eds. *The Royal Society of Chemistry Publishers*, Cambridge, UK. 253–265.

**Van Dyke DR, Saltman P (1996).** Hemoglobin: a mechanism for the generation of hydroxyl radicals. *Free Radical Biology and Medicine*. 20: 985–989.

**Visioli F, Bellomo G, Montedoro G, Galli C (1995).** Low density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents. *Atherosclerosis*. 117:25–32.

**Visioli F, Bellomo G, Montedoro GF, Gallic (1995a).** Low density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents. *Atherosclerosis*. 117: 25–32.

**Visioli F, Bellomo G, Montedoro GF, Gallic (1995a).** Low density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents. *Atherosclerosis*. 117: 25–32.

**Visioli F, Caruso D, Plasmati E, Patelli R, Mulinacci N, Romani A, Galli G, Galli C (2001).** Hydroxytyrosol, as a component of olive mill waste water, is dose-dependently absorbed and increases the antioxidant capacity of rat plasma. *Free Radical Research*. 34: 301–305.

**Visioli F, Galli C (1998).** The effect of minor constituents of olive oil on cardiovascular disease: new findings. *Nutr. Rev*. 56: 142–147.

**Visioli F, Galli C (1998b).** The effect of minor constituents of olive oil on cardiovascular disease: new findings. *Nutrition Reviews*. 56: 142–147.

**Visioli F, Galli C (2001).** Antiatherogenic components of olive/olive oil. *Current Atherosclerosis Reports*. 3: 64–67.

**Visioli F, Galli C (2003).** Olives and their production waste products as sources of bioactive compounds. *Current Topics in Nutraceutical Research*. 1: 85–88.

**Visioli F, Galli C (2003).** Olives and their production waste products as sources of bioactive compounds. *Current Topics in Nutraceutical Research*. 1: 85–88.

**Visioli F, Galli C, Bonnet F, Mattei A, Patelli R, Galli G, Caruso D (2000).** Olive oil phenolics are dose-dependently absorbed in humans. *FEBS Letters*. 468: 159–160.

**Vissers MN, Zock PL, Roodenburg AJC, Leenen R, Katan MB (2001).** Olive oil phenols are absorbed in humans. *American Society for Nutritional Sciences*. 409–417.

**Wiseman SA, Mathot JNJ, De Fouw NJ, Tijburg LBM (1996).** Dietary non-tocopherol antioxidants present in extra virgin olive oil increase the resistance of low density lipoproteins to oxidation in rabbits. *Atherosclerosis*. 120: 15–23.

**Witztum JL, Steinberg D (2001).** The Oxidative Modification Hypothesis of Atherosclerosis: Does it Hold for Humans? *Trends Cardiovasc Med.* 11: 93-102.

**Yermilov V, Rubio J, Ohshima H (1995).** Formation of 8-nitroguanine in DNA treated with peroxynitrite in vitro and its rapid removal from DNA by depurination. *FEBS Letters.* 376: 207–210.

**Zhu LI, Liu Z, Feng ZHao J, Shen WEI, Li X, Sun L, Sharman E, Wang Y, Wertz K, Weber P, Shi X, Liu J (2010).** Hydroxytyrosol protects against oxidative damage by simultaneous activation of mitochondrial biogenesis and phase II detoxifying enzyme systems in retinal pigment epithelial cells.







# POLYFENOLEN IN OLIJFOLIE, ONSCHATBAAR VOOR UW GEZONDHEID!

Pr **M. BENLEMLIH** & Dr **J. GHANAM**



De natuurlijke polyfenolen in olijfolie uit de Marokkaanse woestijn aan de voet van het Atlasgebergte zijn zeer biologisch beschikbare en actieve moleculen, wat hen verschillende gezonde voordelen voor onze gezondheid verschaft. De verbindingen maken deel uit van de antioxidantenfamilie. Ze strijden tegen de negatieve effecten van vrije radicalen: agressieve cellen, modificaties van het DNA, de oxidatie van lipiden.

Recente studies toonden aan dat hydroxytyrosol in olijfolie de mitochondriale functie verbetert, wat cel ouderdom verhindert en bijgevolg, het verouderen van het lichaam.

Deze informatie bevestigt dat de verbindingen werken bij het vertragen van ouderdom en de ziektes die hiermee gepaard gaan.

De polyfenolen in olijfolie dragen ook bij aan de bescherming en de behandeling van bepaalde kankers. In dit kader is vastgesteld dat hydroxytyrosol en oleuropein een kanker bestrijdend effect hebben op darmkanker, bloedkanker en borstkanker,... Deze speciale verbindingen reageren op kanker door middel van verschillende antiproliferatieve en apoptotische mechanismen.

Bovendien worden de voordelen van de polyfenolen in olijfolie op het hart- en vaatsysteem door verschillende auteurs benadrukt.

De polyfenolen in olijfolie verminderen de aanwezigheid van celadhesiemoleculen, verhogen de beschikbaarheid van stikstofmonoxide, onderdrukken de bloedplaataggregatie, beschermen de LDL tegen de oxidatie om arteriosclerose te vertragen en verminderen ontstekingsreacties.

Andere voordelen van polyfenolen in olijfolie zijn bekendgemaakt, zoals ook hun antibacteriële effect en de verhindering en de behandeling van diabetes en de ziekte van Alzheimer.

**Medicatrix**  
(marco pietteur)

[www.medicatrix.be](http://www.medicatrix.be)

**5,00 €**

ISBN 978-2-87211-160-2



9 782872 111602