

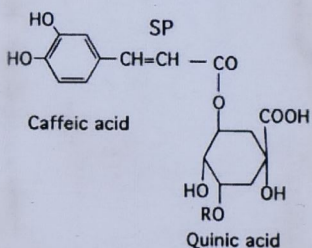
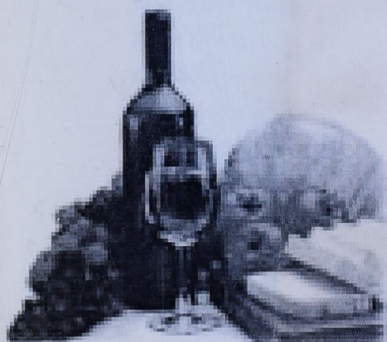


ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

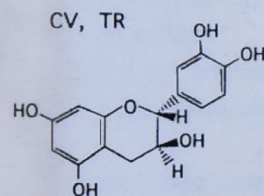
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-
ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ: ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΠΑΡΑΓΩΓΑ ΑΠΟ
ΦΥΤΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ. ΣΥΣΧΕΤΙΣΜΟΣ ΔΟΜΗΣ ΚΑΙ
ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

ΠΛΙΑΚΗΣ ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ ΑΜ 9928



R = H : Chlorogenic acid
R = Caffeoyl : Isochlorogenic acid



(+)-Catechin

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΑΝΤΩΝΟΠΟΥΛΟΥ ΣΜΑΡΑΓΔΗ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

ΑΝΤΩΝΟΠΟΥΛΟΥ ΣΜΑΡΑΓΔΗ
ΝΟΜΙΚΟΣ ΤΖΩΡΤΖΗΣ
ΦΡΑΓΚΟΠΟΥΛΟΥ ΕΛΙΣΣΑΒΕΤ

ΠΤΥ
ΠΑΙ

ΑΘΗΝΑ, 2003

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ	
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ	
Αρ. Κιβωτίου	
Αρ. Συλλογής	11.713
Εκπ. Υποσημειωτής	7492
Τομή κ. Αρ. βιβλ.	ΠΤΥ 001

ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΠΑΡΑΓΩΓΑ	ΠΤΥ 001
ΑΠΟ ΦΥΤΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ	
Η. Πηλίου	
11713	7492

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

Η πτυχιακή αυτή μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, υπό την επίβλεψη της Αναπλ. Καθηγήτριας κα. Σμαραγδής Αντωνοπούλου, την οποία ευχαριστώ για τις πολύτιμες υποδείξεις που μου έκανε σε όλη την διάρκεια της δημιουργίας της. Πάντα ήταν πρόθυμη να παρέχει όποια πληροφορία χρειαζόμουν, χαμογελαστή, συνεπής και ακούραστη. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω το Τμήμα Χημείας του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, και προσωπικά τον Καθηγητή κ. Δημόπουλο, για τις ουσιώδεις διευκολύνσεις που μου παρείχε από την αρχή μέχρι το τέλος της διπλωματικής αυτής μελέτης.

Τον πλέον καθοριστικό ρόλο σε όλη την διάρκεια της ενασχόλησης μου με αυτή την εργασία έπαιξε ο κ. Τζώρτζης Νομικός, ο οποίος αφιέρωσε πάρα πολλές ώρες για να με βοηθήσει. Ήταν παρών σε όλα τα στάδια της εργασίας, από την βιβλιογραφική ανασκόπηση μέχρι και την επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Τον ευχαριστώ πολύ για όλες τις προσπάθειες του και χαίρομαι που είχα την ευκαιρία να συνεργαστώ μαζί του.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτωρ κα. Λίζα Φραγκοπούλου για την υλική και ψυχολογική υποστήριξη που μου προσέφερε καθόλη την διάρκεια της εργασίας. Οι υποδείξεις και συμβουλές της στην διεξαγωγή των πειραμάτων καθώς και το αμέριστο ενδιαφέρον που έδειξε κατά την πορεία της εργασίας αυτής, ήταν σημαντικά για την ολοκλήρωσή της. Θα ήταν τιμή μου να συνεργαστώ μαζί της στο μέλλον.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Ευδοκία μου, η οποία στάθηκε δίπλα μου σε όλα στάδια της εργασίας αυτής. Την θεωρώ απαραίτητη και για όλα τα στάδια της ζωής μου.

Κλείνοντας, ευχαριστώ θερμά την οικογένεια μου για όλα όσα μου έχει προσφέρει και θα συνεχίσει με μου προσφέρει.

ΣΥΝΤΗΜΒΕΣΙΣ

Aggregometer: συσσωρευτικός μετρητής

Apo-AI: apolipoprotein A1

ESAs: ερυθρίνη βελώνες ερυθρά

ε-AMP: ελεύθερο αμινοπυριμιδικό οξύ

CRP/CRP: οξείνο οξύ/οξύ πρωτεΐνη και σύνδεση της φασφατασίνης

DNA: διπλοχρόμοιο οξύ

HDL: υψηλή πυκνότητα λιποπρωτεΐνες

HPLC: υψηλή πίεση υγρών αφαίρεση

Στον πολυαγαπημένο μου παππού και συνονόμάτό μου, Πλιάκη Μανώλη, ο οποίος αναπαύεται κάπου ειρηνικά.

LDL: χαμηλή πυκνότητα λιποπρωτεΐνες

PAF: παθητική οξείνη οξείνη οξείνη οξείνη

PC: πρωτεΐνη οξείνη οξείνη

TG: τριγλυκερίδια

Wt: βάρος

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

Aggregometer: συσσωρευματομέτρο

Apo-A1: απολιποπρωτεΐνη A₁

BSA: αλβουμίνη βοδινού ορού

c-AMP: κυκλικό αδενοσινο-μονοφωσφορικό οξύ

CP/CPK: ενζυμικό σύστημα φωσφοκρεατίνης και κινάσης της φωσφοκρεατίνης

DNA: δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ

HDL: υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες

HPLC: υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

IC₅₀: Συγκέντρωση ουσίας που προκαλεί 50% αναστολή της συσσώρευσης

LDL: χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες

PAF: παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων

PC: φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη

TG: τριγλυκερίδια

W: νερό

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Η ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗ ΔΙΑΙΤΑ.....	2
1.1 Η ελληνική εκδοχή της Μεσογειακής Δίαιτας.....	2
1.2 Οι ευεργετικές δράσεις της Μεσογειακής Δίαιτας.....	2
2. ΟΙ ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ.....	5
2.1 Κατάταξη-δομή φαινολικών ενώσεων.....	5
2.1.1 Φαινολικά οξέα.....	5
2.1.2 Στιλβένια.....	5
2.1.3 Φλαβονοειδή.....	6
2.2 Πηγές φαινολικών ενώσεων.....	8
2.3 Βιοδιαθεσιμότητα-Μεταβολισμός Φαινολικών ενώσεων.....	10
2.3.1 Απορρόφηση φαινολικών ενώσεων.....	10
2.3.2 Μεταβολισμός φαινολικών ενώσεων.....	11
2.4 Βιολογικές δράσεις φαινολικών ενώσεων.....	14
2.4.1 Αντιοξειδωτική δράση.....	14
2.4.2 Αντικαρκινική δράση.....	15
2.4.3 Αντιφλεγμονώδη δράση-Αντιθρομβωτική δράση.....	16
2.4.4 Αντιαλλεργική δράση.....	18
2.4.5 Αντιβακτηριακή δράση.....	18
2.4.6 Αντϊκή δράση.....	18
2.4.7 Ορμονική δράση.....	19
2.4.8 Φλαβονοειδή και γαστρεντερικό σύστημα.....	20
2.5 Σχέση δομής και βιολογικής δραστηρότητας.....	21
3. ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗ ΔΙΑΙΤΑ.....	27
3.1 Οι φαινολικές ενώσεις στα τρόφιμα της Μεσογειακής Δίαιτας.....	27
3.2 Γιατί τα τρόφιμα της Μεσογειακής Δίαιτας είναι πλούσια σε φαινολικές ενώσεις.....	28
3.3 Οι δράσεις των φαινολικών ενώσεων της Μεσογειακής Δίαιτας.....	28
4. Ο ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ.....	30
4.1 Εισαγωγή – δομή.....	31
4.2 Βιολογικές δράσεις.....	32
4.3 Εμπλοκή του PAF σε παθολογικές καταστάσεις.....	32

1. Η ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗ ΔΙΑΙΤΑ

1.1 Η ελληνική εκδοχή της Μεσογειακής Δίαιτας

Ο όρος Μεσογειακή Δίαιτα υποδεικνύει ότι όλοι οι άνθρωποι της Μεσογείου έχουν την ίδια μορφή δίαιτας, κάτι που φυσικά δεν ισχύει. Οι χώρες γύρω από την Λεκάνη της Μεσογείου έχουν διαφορετικού είδους δίαιτες, θρησκείες και πολιτισμούς. Οι δίαιτες διαφέρουν στο ποσοστό του συνολικού λίπους, στον τύπο του κρέατος, στην πρόσληψη αλκοόλ, στην πρόσληψη ελαιόλαδου, στην κατανάλωση φρούτων και λαχανικών. Η Ελλάδα έχει τα χαμηλότερα ποσοστά καρκίνου και καρδιοπαθειών, και το μεγαλύτερο προσδόκιμο επιβίωσης, κάτι που μπορεί να οφείλεται στην ελληνική εκδοχή της Μεσογειακής Δίαιτας. Αναλυτικές μελέτες στην ελληνική εκδοχή της Μεσογειακής δίαιτας, δηλαδή της δίαιτας που υπήρχε πριν το 1960, χαρακτηρίζουν την δίαιτα αυτή από μια υψηλή πρόσληψη φρούτων, λαχανικών, δημητριακών, ελαιολάδου, μέτριων ποσοτήτων γάλακτος και τυριού, ενώ σε εβδομαδιαία βάση καταναλώνονταν κοτόπουλο ή ψάρι. Μέτρια πρόσληψη κρασιού (1-2 ποτήρια) συνόδευε το μεσημεριανό γεύμα.

Αναλυτικότερα, η ελληνική εκδοχή της Μεσογειακής Δίαιτας χαρακτηρίζεται από πληθώρα φυτικών τροφίμων, τα οποία είναι πλούσια σε υδατάνθρακες, φυτικές αλλά και οσπριοειδείς ίνες. Τα φρέσκα φρούτα αποτελούν το καθημερινό επιδόρπιο. Το μεσημεριανό γεύμα αποτελείται κυρίως από ψάρια ή πουλερικά, ενώ είναι χαμηλή η κατανάλωση κόκκινου κρέατος (μόλις 1-2 φορές την εβδομάδα). Στο μεσημεριανό τραπέζι υπάρχει αρκετό ψωμί, το οποίο ψήνεται σε φούρνους με ξύλα, σαλάτα με λαχανικά, και 1-2 ποτήρια κρασί. Το ελαιόλαδο χρησιμοποιείται στις σαλάτες, στα γεύματα, στα γλυκά και αποτελεί την κύρια πηγή λίπους και μονοακόρεστων λιπαρών οξέων. Σε εβδομαδιαία βάση καταναλώνονται 0-4 αυγά, όσπρια και τυρί. Κατά μέσο όρο μια τέτοια δίαιτα παρέχει 2000 θερμίδες, είναι χαμηλή σε κορεσμένο λίπος (7-8% της συνολικής ενέργειας), παρέχει υψηλό ποσοστό μονοακόρεστων λιπαρών οξέων (μέχρι 22%), ενώ το συνολικό ποσοστό λίπους κυμαίνεται μεταξύ 25-40%.

1.2 Οι ευεργετικές δράσεις της Μεσογειακής Δίαιτας

Επιδημιολογικές έρευνες έχουν πιστοποιήσει τον ευεργετικό ρόλο της Μεσογειακής Δίαιτας. Τα αποτελέσματα της μελέτης των επτά χωρών δείχνουν ότι ο πληθυσμός της Κρήτης είχε τα χαμηλότερα ποσοστά καρδιοπαθειών και καρκίνου¹.

Το γεγονός αυτό αποδίδεται στην υψηλή πρόσληψη ελαιολάδου και την χαμηλή πρόσληψη κορεσμένων λιπών που χαρακτηρίζει την παραδοσιακή Κρητική Δίαιτα. Οι κάτοικοι της Κρήτης μάλιστα είχαν μια δίαιτα υψηλή σε λίπος (περίπου 37%), κάτι που δεν ήταν ιδιαίτερα επιβαρυντικό, αφού ένα μεγάλο ποσοστό λίπους προερχόταν από την κατανάλωση ψαριών.

Επιπλέον, η ευεργετική δράση της Μεσογειακής Δίαιτας ενισχύεται από το γεγονός ότι Ισπανοί μελετητές απέδωσαν την στατιστικά σημαντική μείωση του κινδύνου για το πρώτο έμφραγμα του μυοκαρδίου στην υψηλή κατανάλωση ελαιολάδου σε σχέση με αυτούς που δεν κατανάλωναν μεγάλες ποσότητες, με ταυτόχρονη προσαρμογή της ενεργειακής πρόσληψης και των άλλων κλασσικών παραγόντων κινδύνου για τις καρδιοπάθειες². Επιπλέον η πρόληψη απέναντι στο έμφραγμα του μυοκαρδίου ενισχύεται και από τη κατανάλωση ψαριού και ω-3 λιπαρών οξέων³. Τέλος, η υψηλή πρόσληψη φυτικών ινών, φρούτων και φολικού οξέος μέσω της κατανάλωσης κρασιού κατά την διάρκεια των μεσογειακών γευμάτων, επίσης σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης εμφράγματος.

Η Μεσογειακή Δίαιτα σχετίζεται με κλινικούς και βιοχημικούς παράγοντες κινδύνου των καρδιαγγειακών νοσημάτων. Πιο συγκεκριμένα, η μελέτη ATTICA⁴, έδειξε ότι ποσοστό 39% του δείγματος της ακολουθούσε την Μεσογειακή Δίαιτα, κάτι που σχετίζεται στατιστικά σημαντικά με την μείωση της ολικής χοληστερόλης ($p<0,05$), των τριγλυκεριδίων, της γλυκόζης του πλάσματος, του ινωδογόνου, της ομοκυστεΐνης και της συστολικής αρτηριακής πίεσης των ατόμων αυτών. Από την άλλη, στα άτομα αυτά παρατηρήθηκε αύξηση στα επίπεδα της HDL και της apoA1, ενώ δεν βρέθηκε συσχέτιση ανάμεσα στην Μεσογειακή Δίαιτα και στις τιμές της apoB, του ουρικού οξέος, της ηλικίας και του φύλου. Αυτές οι παρατηρήσεις πιθανώς να δίνουν μια ακόμη εξήγηση για τον προστατευτικό ρόλο της Μεσογειακής δίαιτας στην εμφάνιση καρδιοπαθειών.

Η σύσταση της Μεσογειακής δίαιτας δεν είναι ευεργετική μόνο για τον μεταβολισμό των λιπών, αλλά και για τον μεταβολισμό της γλυκόζης και ειδικότερα για την ινσουλινοαντοχή. Μερικές έρευνες έδειξαν ότι η χαμηλή πρόσληψη κορεσμένου λίπους σχετίζεται με αυξημένη ινσουλινοαντίσταση. Επιπλέον, μια δίαιτα χαμηλή σε κορεσμένο λίπος και σχετικά πλούσια σε υδαάνθρακες, διαλυτές φυτικές ίνες και μονοακόρεστα λίπη όπως η Μεσογειακή, είναι η πιο ιδανική διαιτητική προσέγγιση σε διαβητικούς ασθενείς, μιας και μειώνει τον σχηματισμό

αθηρογόνων λιποπρωτεϊνών, βελτιώνει τον έλεγχο της γλυκόζης και αυξάνει την ινσουλिनoαντίσταση.

Με βάση τα παραπάνω, η παραδοσιακή Μεσογειακή διαίτα του 1960, αντιπροσωπεύει ένα χρήσιμο διατροφικό μοντέλο για την γενική προώθηση υγείας και για την πρόληψη διαφόρων ασθενειών.

Τελευταίες μελέτες επισημαίνουν ότι οι ευεργετικές δράσεις της Μεσογειακής Δίαιτας οφείλονται σε διάφορα μικροσυστατικά, τα οποία αν και βρίσκονται σε μικρές ποσότητες στα τρόφιμα έχουν σημαντική βιολογική δράση. Σε αυτή την κατηγορία των μικροσυστατικών ανήκουν και οι φαινολικές ενώσεις, οι οποίες έχουν αντιφλεγμονώδη δράση και αντιοξειδωτική δράση, μιας και αναστέλλουν την δράση του PAF (Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων), που είναι σημαντικός φλεγμονώδης παράγοντας. Οι φαινολικές ενώσεις αλλά και η βιολογική τους δραστηριότητα βάση της οποίας μπορεί εν μέρει να εξηγηθεί η ευεργετική δράση της Μεσογειακής δίαιτας, μελετώνται αναλυτικότερα στο επόμενο κεφάλαιο.

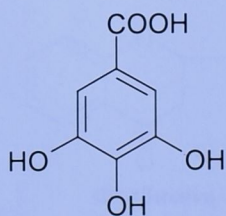
2. ΟΙ ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

2.1 Κατάταξη-δομή φαινολικών ενώσεων

Στις μέρες μας έχουν πιστοποιηθεί πιστοποιηθούν πάνω από 8000 φαινολικές ενώσεις των οποίων η δομή ποικίλει από απλά μόρια (φαινολικά οξέα με ένα ανθρακικό σκελετό 6 ατόμων άνθρακα) μέχρι πολυμερισμένα μόρια (ταννίνες). Οι φαινολικές ενώσεις είναι παράγωγα του βενζολίου με ένα ή περισσότερα υδροξύλια στον φαινολικό δακτύλιο και ανάλογα με την φύση του ανθρακικού σκελετού, κατατάσσονται στα φαινολικά οξέα, στα φλαβονοειδή και στα λιγότερο συχνά στυλβένια και λιγνάνες. Υπάρχουν πάνω από 5000 φλαβονοειδή, τα οποία χωρίζονται σε διάφορες υποκατηγορίες. Οι κυριότερες υποκατηγορίες είναι :οι φλαβόνες, οι φλαβονόλες, οι φλαβονόνες, οι απλές φαινόλες, οι φλαβανόλες, οι ανθοκυανιδίνες και οι ισοφλαβόνες.

2.1.1 Φαινολικά οξέα

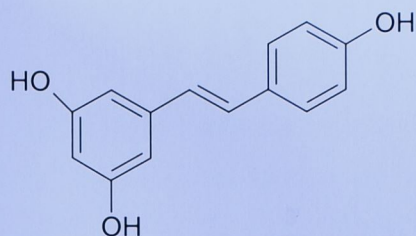
Μια βασική κατηγορία φαινολικών ενώσεων είναι τα φαινολικά οξέα, τα οποία βρίσκονται σχεδόν σε όλα τα φυτικά τρόφιμα. Το πιο αντιπροσωπευτικό φαινολικό οξύ είναι το καφεϊκό οξύ, το οποίο βρίσκεται με την εστεροποιημένη του μορφή στα τρόφιμα και λέγεται χλωρογενικό οξύ. Ευρέως διαδεδομένο είναι και το γαλλικό οξύ, του οποίου η δομή φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 1: Δομή του γαλλικού οξέος

2.1.2 Στυλβένια

Τα στυλβένια απαντώνται λιγότερο συχνά στα φυτικά τρόφιμα. Ένα από αυτά όμως, η ρεσβερατρόλη, της οποίας η δομή φαίνεται στο σχήμα 2, βρέθηκε στο κρασί και έχει σημαντικές αντικαρκινικές ιδιότητες.

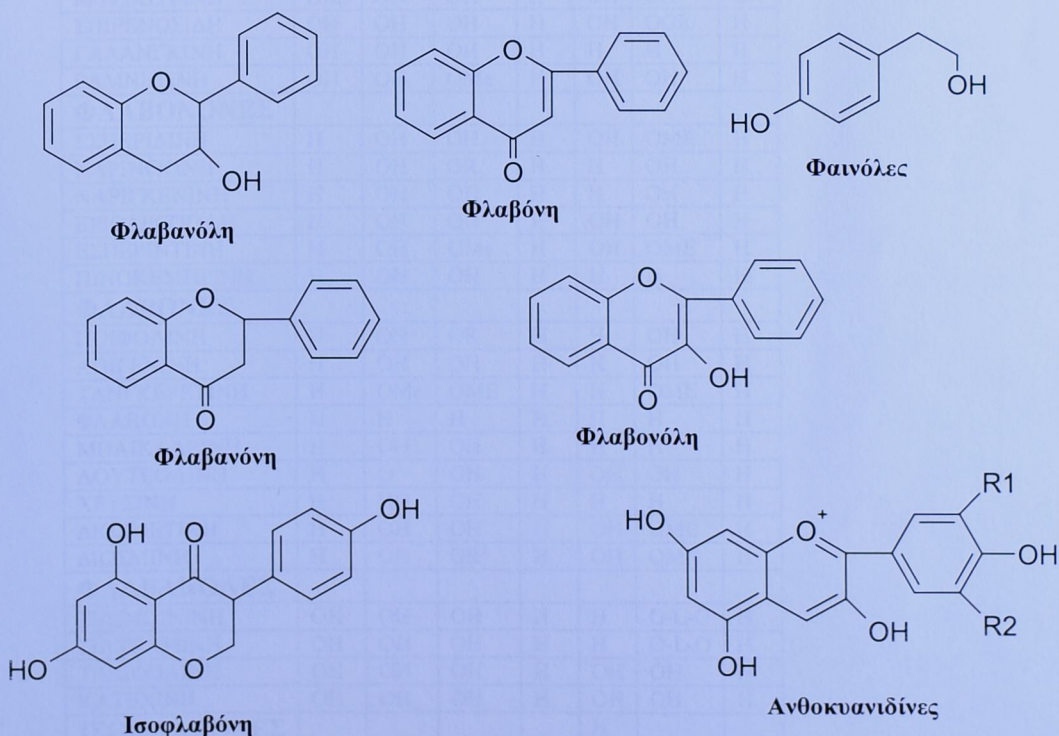


Σχήμα 2: Δομή ρεσβερατρόλης

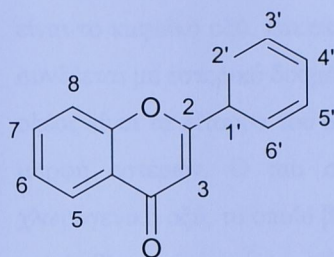
2.1.3 Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι η μεγαλύτερη τάξη φαινολικών ενώσεων, μιας και μέχρι σήμερα έχουν απομονωθεί περίπου 5000 μόρια. Βρίσκονται σχεδόν σε όλα τα τρόφιμα της καθημερινής μας διαίτας και αντιπροσωπεύουν μια υποκατηγορία πολυφαινολών με δομή C6-C3-C6. ανάλογα με τον βαθμό οξείδωσης του ετεροκυκλικού δακτυλίου του οξυγόνου χωρίζονται σε διάφορες κατηγορίες : φλαβόνες, φλαβονόλες, ισοφλαβόνες, ανθοκυανίνες, φλαβανόλες, προανθοκυανιδίνες και φλαβανόνες.

Η χαρακτηριστική δομή των διαφόρων υποκατηγοριών φαίνεται στο σχήμα 3.



Σχήμα 3. : Χαρακτηριστικές δομές των κυριότερων υποκατηγοριών των φλαβονοειδών



Σχήμα 4: Η δομή του μορίου της κατεχόλης, βάση της οποίας προσδιορίζονται οι υποκαταστάτες

Πίνακας 1: Η δομή των κυριότερων φλαβονοειδών με βάση τους υποκαταστάτες τους⁵.

ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ	3	5	7	2'	3'	4'	5'
ΦΛΑΒΟΝΟΛΕΣ							
ΚΑΕΜΠΦΕΡΟΛΗ	OH	OH	OH	H	H	OH	H
ΜΟΡΙΝΗ	OH	OH	OH	OH	H	OH	H
ΡΟΥΤΙΝΗ	OR ¹	OH	OH	H	OH	OH	H
ΜΥΡΙΚΕΤΙΝΗ	OH	OH	OH	H	OH	OH	OH
ΚΕΡΚΕΤΙΝΗ	OH	OH	OH	H	OH	OH	H
ΚΕΡΚΕΤΡΙΝΗ	OR _h	OH	OH	H	OH	OH	H
ΜΥΡΙΚΙΤΡΙΝΗ	OR _h	OH	OH	H	OH	OH	OH
ΣΠΙΡΕΝΟΣΙΔΗ	OH	OH	OH	H	OH	OGlu	H
ΓΑΛΑΝΓΚΙΝΗ	OH	OH	OH	H	H	H	H
ΡΑΜΝΕΤΙΝΗ	OH	OH	OMe	H	OH	OH	H
ΦΛΑΒΟΝΟΝΕΣ							
ΕΣΠΕΡΙΔΙΝΗ	H	OH	OH	H	OH	OME	H
ΝΑΡΙΝΓΚΙΝΗ	H	OH	OR	H	H	OH	H
ΝΑΡΙΓΚΕΝΙΝΗ	H	OH	OH	H	H	OH	H
ΕΡΙΟΔΙΚΤΙΟΛΗ	H	OH	OH	H	OH	OH	H
ΕΣΠΕΡΙΝΤΙΝΗ	H	OH	OMe	H	OH	OME	H
ΠΙΝΟΚΕΜΠΡΙΝΗ	H	OH	OH	H	H	H	H
ΦΛΑΒΟΝΕΣ							
ΠΟΙΦΟΛΙΝΗ	H	OH	OR	H	H	OH	H
ΑΠΙΓΕΝΙΝΗ	H	OH	OH	H	H	OH	H
ΤΑΝΓΚΕΡΕΤΙΝΗ	H	OMe	OME	H	H	OME	H
ΦΛΑΒΟΝΗ	H	H	H	H	H	H	H
ΜΠΑΙΚΑΛΕΙΝΗ	H	OH	OH	H	H	H	H
ΛΟΥΤΕΟΛΙΝΗ	H	O	OH	H	OH	OH	H
ΧΡΥΣΙΝΗ	H	HO	OH	H	H	H	H
ΔΙΟΣΜΕΤΙΝΗ	H	OH	OH	H	OH	OME	H
ΔΙΟΣΜΙΝΗ	H	OH	OR ¹	H	OH	OME	H
ΦΛΑΒΑΝΟΛΕΣ							
ΣΙΛΙΜΠΙΝΙΝΗ	OH	OH	OH	H	H	O-L-O	H
ΣΙΛΥΡΑΜΙΝΗ	OH	OH	OH	H	H	O-L-O	H
ΤΑΞΙΦΟΛΙΝΗ	OH	OH	OH	H	OH	OH	H
ΚΑΤΕΧΙΝΗ	OH	OH	OH	H	OH	OH	H
ΙΣΟΦΛΑΒΟΝΕΣ					H		
ΓΚΕΝΙΣΤΕΪΝΗ	-	OH	OH	H	H	OH	H
ΝΤΑΙΖΝΤΕΪΝΗ	-	H	O-Glu	H	H	OH	H

-OMe=Methoxy, -O-Glu=Glucosyl, -O-R'=Alkoxy, -O-L-O=Selane

2.2 Πηγές φαινολικών ενώσεων

Τα **φαινολικά οξέα** αφθονούν στα τρόφιμα. Αυτά που συναντώνται πιο συχνά είναι το καφεϊκό οξύ, και σε μικρότερο βαθμό, το φερουλικό οξύ. Το φερουλικό οξύ συνδέεται με εστερικό δεσμό με ημικυτταρίνες. Μια από τις κύριες πηγές φερουλικού οξέος είναι τα πίτουρα του αλεύρου (5 mg/g). Το καφεϊκό οξύ συναντάται και με την μορφή εστέρων. Ο πιο συνηθισμένος εστέρας του καφεϊκού οξέος είναι το χλωρογενικό οξύ, το οποίο βρίσκεται σε πολλά φρούτα και λαχανικά και φυσικά στον καφέ. Ένα ποτήρι στιγμιαίου καφέ (200 ml) περιέχει 50-150 mg χλωρογενικού οξέος⁶. Άλλα φαινολικά οξέα είναι είτε το γαλλικό οξύ στο μάνγκο, είτε άλλα φαινολικά οξέα που παράγονται από την οξείδωση των ταννινών στα μαύρα μούρα, στις φράουλες, στο κρασί και στο λικέρ που βρίσκεται σε βαρέλια βελανιδιάς, σε πολύ μικρότερες ποσότητες από τις αντίστοιχες ταννίνες.

Η κύρια πηγή **ισοφλαβονών** είναι η σόγια, η οποία περιέχει περίπου 1 mg γκενιστεΐνης και νταιζιντεΐνης ανά γραμμάριο ξηρού καρπού⁷. Μάλιστα οι δύο αυτές ενώσεις είναι γνωστές για τον ρόλο τους στην πρόληψη του καρκίνου του πνεύμονα και της οστεοπόρωσης⁸.

Τα εσπεριδοειδή είναι η κυριότερη πηγή **φλαβανόνων**. Η εσπεριδίνη βρίσκεται στα πορτοκάλια (125-250 mg/L χυμού)⁹.

Η κερκετίνη, η κυριότερη **φλαβονόλη** στην διαίτα μας, βρίσκεται σε πολλά φρούτα και λαχανικά, αλλά και σε διάφορα ποτά. Βρίσκεται σε μεγάλες ποσότητες στα κρεμμύδια (0,3mg/g), στο τσάι (10-25mg/L)¹⁰ και στο κρασί (5,2 mg/L)¹¹

Οι **φλαβόνες** είναι λιγότερο συχνές και βρίσκονται στις κόκκινες πιπεριές (λουτεολίνη) και στο σέλινο (απιγενίνη).

Οι κυριότερες **φλαβανόλες** είναι οι κατεχίνες. Βρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες στο τσάι. Μικροί βλαστοί περιέχουν 200-340 mg κατεχινών, γαλλοκατεχίνες και ανάλογων παραγώγων¹². Στο πράσινο τσάι, η περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες μειώνεται στο μισό, εξαιτίας της οξείδωσης κατά την ζύμωση¹³. Άλλες πηγές είναι το κόκκινο κρασί (270 mg/L) και η σοκολάτα.

Οι **προανθοκυανιδίνες** είναι πολυμερισμένες πολυφαινόλες. Βρίσκονται στα φυτά, με μέσο βαθμό πολυμερισμού από 4 μέχρι 11. Είναι υπεύθυνες για την στυπτικότητα των τροφίμων, και βρίσκονται κυρίως σε φρούτα όπως μήλα, ροδάκινα, σταφύλια, στο κόκκινο κρασί, στο τσάι και στην σοκολάτα¹⁴.

Οι **ανθοκυανίνες** είναι τμήματα κόκκινων φρούτων όπως κεράσια, δαμάσκηνα, φράουλες, σταφύλια. Το περιεχόμενο τους ποικίλει από 0,15 mg/g (φράουλα) μέχρι 4,5 mg/g (κεράσια)¹⁵. Η μέση περιεκτικότητα ανθοκυανινών στο κόκκινο κρασί είναι περίπου 26 mg/g¹⁶.

Τα **στιλβένια** δεν είναι τόσο διαδεδομένα σε φυτικά τρόφιμα. Παρόλαυτα, ένα από αυτά, η ρεσβερατρόλη, έχει σημαντικές αντικαρκινικές ιδιότητες¹⁷, και βρίσκεται στο κρασί, σε μικρή όμως περιεκτικότητα (0,3 mg/L στο κόκκινο κρασί)¹⁶. Οι **λιγνάνες** έχουν βρεθεί σε ανθρώπινο πλάσμα και σε ανθρώπινα ούρα. Τα μοναδικά τρόφιμα τα οποία περιέχουν σημαντικές ποσότητες από λιγνάνες είναι ο λιναρόσπορος και το λάδι λιναρόσπορου¹⁸. Στο παχύ έντερο μεταβολίζονται σε διάφορες ουσίες, και είναι γνωστές για την δράση τους ως αγωνιστές και ανταγωνιστές οιστρογόνων.

Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται η περιεκτικότητα σε φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή, συνολικές φαινόλες τροφίμων που υπάρχουν στην Ελληνική αγορά¹⁹.

Πίνακας 2: Η περιεκτικότητα σε φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή και συνολικές φαινόλες τροφίμων που υπάρχουν στην ελληνική αγορά.

ΤΡΟΦΙΜΟ	ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΟΞΕΑ(mg)	ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ (mg)	ΣΥΝΟΛΙΚΕΣ ΦΑΙΝΟΛΕΣ ¹ (mg)
ΠΑΤΑΤΕΣ, 200ΓΡ	28	-	28
ΝΤΟΜΑΤΑ, 100ΓΡ	8	0.5	8,5
ΜΑΡΟΥΛΙ, 100ΓΡ	8	1	9
ΚΡΕΜΜΥΔΙ, 20ΓΡ	-	7	7
ΜΗΛΟ, 200ΓΡ	11	228	239
ΚΕΡΑΣΙΑ, 50ΓΡ	37	239	276
ΣΟΚΟΛΑΤΑ, 20ΓΡ	-	102	102
ΧΥΜΟΣ ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ, 100ML	-	22	22
ΚΟΚΚΙΝΟ ΚΡΑΣΙ, 125 ML	12	85	97
ΚΑΦΕΣ, 200ML	150	-	150
ΜΑΥΡΟ ΤΣΑΪ, 200 ML	-	138	138

2.3 Βιοδιαθεσιμότητα-μεταβολισμός φαινολικών ενώσεων

2.3.1 Απορρόφηση φαινολικών ενώσεων

Οι πολυφαινόλες είναι τα πιο διαδεδομένα αντιοξειδωτικά στην ανθρώπινη διαίτα. Έχουν μια σημαντική δομική ποικιλότητα, η οποία και επηρεάζει την βιοδιαθεσιμότητά τους. Τα φαινολικά οξέα όπως το καφεϊκό οξύ, απορροφώνονται από τον εντερικό αυλό εύκολα, ενώ μεγάλου μοριακού βάρους πολυφαινόλες όπως οι προανθοκυανιδίνες απορροφώνται πολύ πιο δύσκολα. Οι πολυφαινόλες που φτάνουν στο παχύ έντερο μεταβολίζονται από την μικροχλωρίδα του εντέρου σε ένα ευρύ φάσμα χαμηλού μοριακού βάρους φαινολικών οξέων, ώστε να μπορούν να απορροφηθούν πιο εύκολα.

Έμμεση απόδειξη της απορρόφησης των πολυφαινολών αποτελεί το γεγονός ότι παρατηρήθηκε αύξηση της αντιοξειδωτικής δράσης του πλάσματος μετά την λήψη διαίτας πλούσια σε πολυφαινόλες²⁰. Η ανάκτηση φαινολικών ενώσεων στα ούρα μετά την λήψη συγκεκριμένης ποσότητας από το στόμα επιτρέπει την σύγκριση της βιοδιαθεσιμότητας για τα διάφορα φαινολικά μόρια, αν και αρκετές έρευνες έχουν δείξει πως οι ποσότητες των πολυφαινολών που βρίσκονται άθικτες στα ούρα ποικίλουν από το ένα φαινολικό μόριο στο άλλο²¹. Η δομή του μορίου των πολυφαινολών παίζει σημαντικό ρόλο στην εντερική απορρόφηση. Οι πιο σημαντικοί δομικοί παράγοντες είναι το μοριακό βάρος, η γλυκοζυλίωση και η εστεροποίηση. Για παράδειγμα οι θειαφλαβίνες, ενώσεις με μεγάλο μοριακό βάρος, απορροφώνονται δύσκολα από τον εντερικό βλεννογόνο. Οι περισσότερες πολυφαινόλες-με εξαίρεση τις κατεχίνες και τις προανθοκυανιδίνες-γλυκοζυλιώνονται στα τρόφιμα, κυρίως με την μορφή *O*-γλυκοσιδών²², και αυτή η γλυκοζυλίωση επιτρέπει και την καλύτερη απορρόφηση τους στον εντερικό αυλό. Η απορρόφηση της γλυκοζυλιωμένης κερκετίνης που υπάρχει στα κρεμμύδια, ήταν υψηλότερη (52%) σε σχέση με την απορρόφηση της μη γλυκοζυλιωμένης (24%)²³. Οι πιο πολλές πολυφαινόλες της διαίτας αποκρίνονται στα ούρα και στην χολή μετά την λήψη. Στον άνθρωπο, η μέγιστη αύξηση στο πλάσμα παρατηρείται 1-2 ώρες μετά την λήψη για διάφορες φλαβονόλες και φλαβανόλες, ενώ είναι μεγαλύτερη για τις ισοφλαβόνες και άλλες πολυφαινόλες οι οποίες απορροφώνται μόνο μετά από μερική αποικοδόμηση από την εντερική μικροχλωρίδα²⁹. Για τα περισσότερα μόρια τα οποία απορροφώνονται στο λεπτό έντερο η συγκέντρωσή τους στο πλάσμα αμέσως μετά μειώνεται (χρόνος ημισείας

ζωής 1-2 ώρες). Η διατήρηση μιας υψηλής συγκέντρωσης στο πλάσμα προϋποθέτει μια επαναλαμβανόμενη λήψη πολυφαινολών, όπως παρατηρήθηκε σε άτομα που κατανάλωναν τσάι κάθε 2 ώρες.²⁴

2.3.2 Μεταβολισμός φαινολικών ενώσεων

Από την στιγμή που απορροφώνται, οι πολυφαινόλες συνδέονται με γλυκουρονικές, σουλφουρονικές και μεθυλ-ομάδες, στον εντερικό βλενογόνο και στους εσωτερικούς ιστούς. Μη συζευγμένα (ελεύθερα) φαινολικά μόρια στην ουσία δεν βρίσκονται στο πλάσμα. Αυτές οι αντιδράσεις σύζευξης εμποδίζουν την πιθανή τοξικότητα των ελεύθερων μορίων.

Οι πολυφαινόλες μεταβολίζονται είτε στους ιστούς, από την στιγμή που απορροφώνται στο λεπτό έντερο, είτε για τα μη απορροφώμενα τμήματα και για τα τμήματα που επανεκκρίνονται μέσω χολής στην εντερική μικροχλωρίδα. Όλες οι πολυφαινόλες είναι συζευγμένες με *O*-γλυκουρονίδες,θειϊκούς εστέρες, και *O*-μεθυλαιθέρες. Η σύζευξη γίνεται στον εντερικό αυλό. Αυτές οι συζευγμένες ενώσεις κατόπιν φτάνουν στο συκώτι, όπου και μεταβολίζονται περαιτέρω. Για παράδειγμα, η κατεχίνη μεθυλιώνεται στο συκώτι. Στην πραγματικότητα, όλες οι πολυφαινόλες μεταβολίζονται (γλυκοζυλίωση ή σουλφούρωση), και δεν υπάρχουν ελεύθερες αγκυκόνες στο πλάσμα. Ο βαθμός της μεθυλίωσης των πολυφαινολών επηρεάζει τις βιολογικές τους δράσεις. Είναι πολύ πιθανό να συμβαίνει ένα ποσοστό μεθυλίωσης στον κατεχολικό δακτύλιο της κερκετίνης²⁵ και του καφεϊκού οξέος²⁶ in vivo.

Όσες πολυφαινόλες φτάσουν στο παχύ έντερο μεταβολίζονται από την μικροχλωρίδα του εντέρου. Η ρουτίνη, ένας γλυκοζίτης της κερκετίνης, δεν απορροφάται στο άνω τμήμα του γαστρεντερικού σωλήνα, αλλά μπορεί να υδρολυθεί στο παχύ έντερο, για να απορροφηθεί καλύτερα. Επίσης, την ίδια πορεία μπορούν να ακολουθήσουν και τα γλυκοζιωμένα μόρια που προέρχονται μέσω της έκκρισης της χολής. Και τα αντίστοιχα μη γλυκοζιωμένα πλέον μόρια μπορούν να μεταβολιστούν σε ένα ευρύ φάσμα αρωματικών οξέων χαμηλού μοριακού βάρους²⁷. Έτσι, όσο μικρότερη είναι η απορρόφηση των πολυφαινολών στο λεπτό έντερο, τόσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των μορίων που φτάνουν στο παχύ έντερο και μεταβολίζονται από την εντερική μικροχλωρίδα.

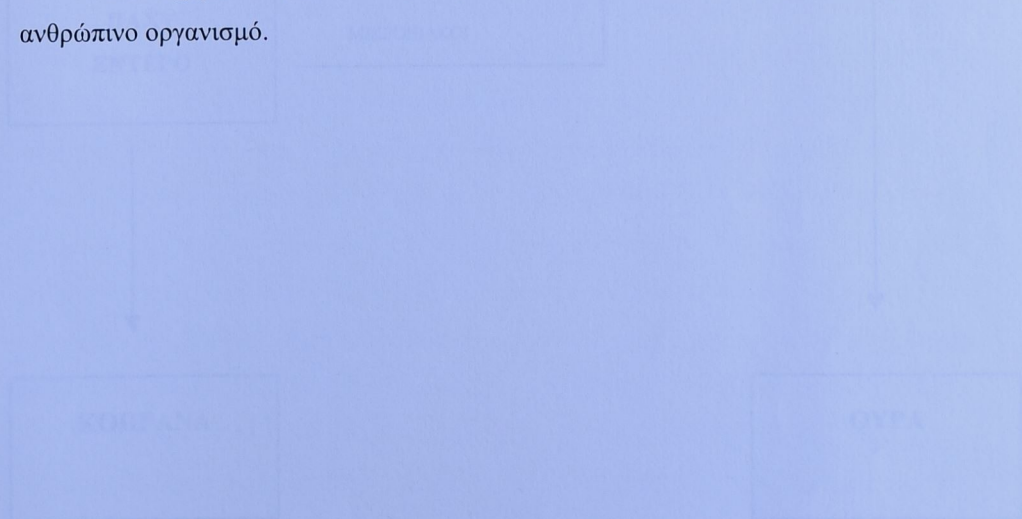
Τα συζευγμένα μόρια πολυφαινολών μπορεί να έχουν βιολογική δραστηριότητα μετά την αποσύζευξη τους σε κυτταρικό επίπεδο. Οι πιο πολλές

έρευνες για την βιολογική δραστικότητα των πολυφαινολών έχουν γίνει με την αρχική δομή του μορίου. Φαίνεται ότι το αρχικό μόριο μπορεί να αλληλεπιδρά με υποδοχείς, και να αναστέλλει την δράση ενζύμων. Όμως πολλές μικροβιακές δράσεις μπορεί να οφείλονται και στους μικροβιακούς μεταβολίτες.

Οι βιολογικές δραστικότητες τόσο των συζευγμένων μορίων όσο και των μεταβολιτών του παχέος εντέρου δεν έχουν μελετηθεί. Η μελέτη τους είναι απαραίτητη για να αξιολογηθούν καλύτερα οι θετικές επιπτώσεις στην υγεία από την πρόσληψη πολυφαινολών. Από την άλλη, μερικές από τις ευεργετικές δράσεις (συμπλοκοποίηση μετάλλων) των φαινολικών ενώσεων δεν προϋποθέτουν την απορρόφηση τους από τον εντερικό αυλό.

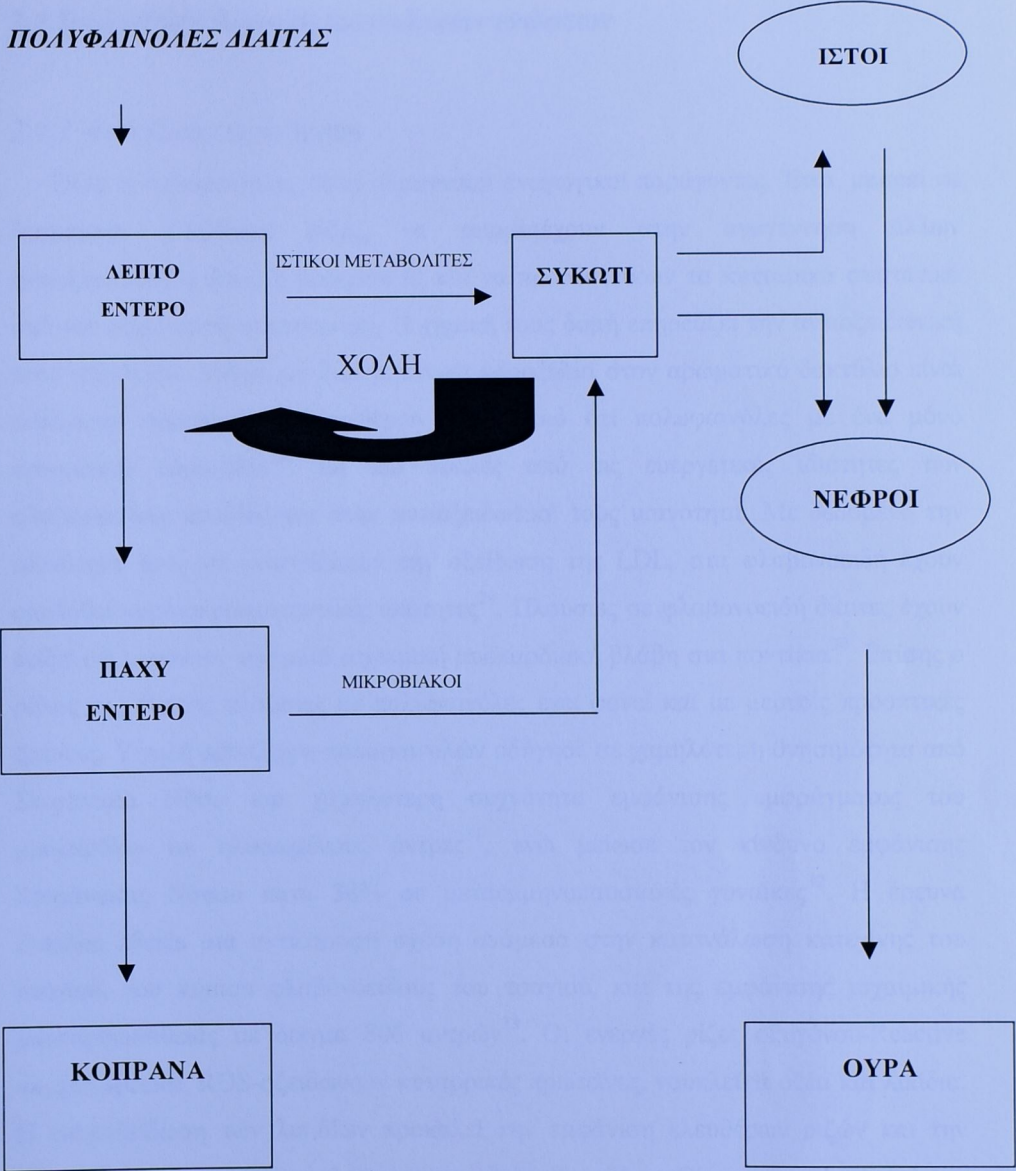
Αυτό που πρέπει ακόμη να μελετηθεί είναι ο βαθμός απορρόφησης σε σχέση με την δομή, η φαρμακοκινητική των μορίων στον άνθρωπο, ο βιολογικός ρόλος και η δομή των μεταβολιτών των φαινολικών ενώσεων στον οργανισμό.

Στο σχήμα 5 φαίνεται η πορεία των πολυφαινολών της δίαιτας στον ανθρώπινο οργανισμό.



Σχήμα 5. Η πορεία των πολυφαινολών της δίαιτας στον οργανισμό.

ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ ΔΙΑΙΤΑΣ



Σχήμα 5.: Η πορεία των πολυφαινολών στον ανθρώπινο οργανισμό

2.4 Βιολογικές δράσεις φαινολικών ενώσεων

2.4.1 Αντιοξειδωτική δράση

Όλες οι πολυφαινόλες είναι σημαντικοί αναγωγικοί παράγοντες. Έτσι, μπορεί να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες, να συμμετέχουν στην αναγέννηση άλλων αντιοξειδωτικών όπως η βιταμίνη E, και να προστατεύουν τα κυτταρικά συστατικά από την οξειδωτική καταστροφή. Η χημική τους δομή επηρεάζει την αντιοξειδωτική τους ικανότητα. Μόρια με δυο γειτονικά υδροξύλια στον αρωματικό δακτύλιο είναι καλύτεροι εκκαθαριστές ελευθέρων ριζών από ότι πολυφαινόλες με ένα μόνο αρωματικό υδροξύλιο²⁸. Οι πιο πολλές από τις ευεργετικές ιδιότητες των φλαβονοειδών αποδίδονται στην αντιοξειδωτική τους ικανότητα. Με δεδομένη την ικανότητα τους να αναστέλλουν την οξείδωση της LDL, στα φλαβονοειδή έχουν αποδοθεί καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες²⁹. Πλούσιες σε φλαβονοειδή δίαιτες έχουν δείξει ότι μειώνουν την μετά ισχαιμική μυοκαρδιακή βλάβη στα ποντίκια³⁰. Επίσης ο ρόλος της δίαιτας πλούσιας σε πολυφαινόλες έχει φανεί και με μερικές προοπτικές έρευνες. Υψηλή πρόσληψη πολυφαινολών οδήγησε σε χαμηλότερη θνησιμότητα από Στεφανιαία Νόσο και χαμηλότερη συχνότητα εμφάνισης εμφράγματος του μυοκαρδίου σε ηλικιωμένους άντρες³¹, ενώ μείωσε τον κίνδυνο εμφάνισης Στεφανιαίας Νόσου κατά 38% σε μεταεμμηνοπαυσιακές γυναίκες³². Η έρευνα Zutphen έδειξε μια αντίστροφη σχέση ανάμεσα στην κατανάλωση κατεχίνης του τσαγιού, του κύριου φλαβονοειδούς του τσαγιού, και της εμφάνισης ισχαιμικής μυοκαρδιοπάθειας σε δείγμα 806 αντρών³³. Οι ενεργές ρίζες οξυγόνου-Reactive oxygen species, ROS-οξειδώνουν κυταρρικές πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα και λιπίδια. Η υπεροξείδωση των λιπιδίων προκαλεί την εμφάνιση ελευθέρων ριζών και την περαιτέρω οξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Ο τερματισμός αυτού του κύκλου των οξειδώσεων σταματάει μέσω εκκαθάρισης αυτών των ελευθέρων ριζών. Οι ROS είναι υπεύθυνες για την οξείδωση της LDL, για την καρκινογένεση³⁴, την εμφάνιση Στεφανιαίας Νόσου³⁵, την καταστροφή του DNA³⁶. Ο προστατευτικός ρόλος των φλαβονοειδών στα διάφορα βιολογικά συστήματα έχει αποδοθεί στην ικανότητα τους να μεταφέρουν ελεύθερες ρίζες ηλεκτρονίων, να απενεργοποιούν μέταλλα υπεύθυνα για πρόκληση οξείδωσης³⁷, να ενεργοποιούν αντιοξειδωτικά ένζυμα³⁸, να μειώνουν της ελεύθερες ρίζες της α-τοκοφερόλης³⁹, και να εμποδίζουν την δράση οξειδωτικών ενζύμων⁴⁰. Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει πολλές μελέτες

στο να αποδοθεί η αντιοξειδωτική ικανότητα των πολυφαινολών στην χημική τους δομή.

2.4.2 Αντικαρκινική δράση

Ένας μεγάλος αριθμός φλαβονοειδών έχει σημαντική αντικαρκινική δράση σε διάφορα πειραματικά μοντέλα⁶⁸. Τα συστατικά αυτά φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορους μηχανισμούς που περιλαμβάνονται στην παθογένεση του καρκίνου. Η αντιοξειδωτική ικανότητα των φλαβονοειδών ήταν και η πρώτη που μελετήθηκε, μιας και αποδείχθηκε ευεργετική στην αντιμετώπιση των καρδιοπαθειών. Τα φλαβονοειδή, όπως έχει αναφερθεί, είναι σημαντικοί εκκαθαριστές πολλών οξειδωτικών μορίων, όπως του ατομικού οξυγόνου και πολλών ελευθέρων ριζών⁴², τα οποία πιθανώς εμπλέκονται στην καταστροφή του DNA και την δημιουργία όγκων⁴³.

Τα φλαβονοειδή έχουν επίσης σημαντική επίδραση στην βιοδραστικότητα των καρκινογόνων ουσιών. Τα περισσότερα χημικά καρκινογόνα θα πρέπει να μετατραπούν από μεταβολικά ένζυμα φάσης I σε μια πιο δραστική μορφή για μπορούν να συνδεθούν με το DNA. Εάν η προκαλούμενη κατά αυτόν τον τρόπο μετάλλαξη δεν επιδιορθωθεί, τότε μπορεί να έχουμε την έναρξη της διαδικασίας της καρκινογένεσης. Η αρχική ενεργή ομάδα μορίων, δηλαδή τα ένζυμα φάσης I (ή αρχικά καρκινογόνα), μπορεί να απενεργοποιηθεί μέσω σύζευξης με τα ένζυμα της φάσης II έτσι ώστε να σχηματισθεί ένα υδατοδιαλυτό μόριο το οποίο και αποβάλλεται από τον οργανισμό. Τα φλαβονοειδή κερκετίνη, καεμπερόλη, γαλανγίνη και η απιγκενίνη, μπορούν να αναστείλουν τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450 της οικογένειας CYP1A⁴⁴. Αυτά τα ένζυμα παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση πολλών ανθρώπινων καρκινογόνων, όπως οι πολοκυκλικοί υδρογονάνθρακες και οι ετεροκυκλικές αμίνες. Η κερκετίνη και η ναριγκίνη αναστέλουν το ένζυμο CYP3A4 και συμμετέχουν στην καταστροφή του ενζύμου αυτού μαζί με την αντίστοιχη δράση του χυμού γκρέιπφρουτ⁴⁵. Το CYP3A4 είναι το πιο συχνό P450 ένζυμο στο συκώτι και μεταβολίζει ένα σημαντικό αριθμό καρκινογόνων. Επιπλέον in vitro έρευνες έχουν δείξει ότι οι κατεχίνες του τσαγιού συμβάλλουν στην αύξηση της δράσης αρκετών αντιοξειδωτικών ενζύμων, όπως της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης, της καταλάσης, και της αναγωγάσης της κινόνης⁴⁶. Πολλά φλαβονοειδή (κερκετίνη, απιγενίνη, κατεχίνες) έχουν δείξει

σημαντική αντιφλεγμονώδη δράση με το να αναστέλλουν το ένζυμο της κυκλοοξυγενάσης (COX2) και της συνθάσης του νιτρικού οξέος⁴⁵. Η χρόνια φλεγμονή παίζει σημαντικό ρόλο στην αιτιολογία πολλών μορφών καρκίνου και οι αναστολλείς του ένζυμου της κυκλοοξυγενάσης (COX2) θεωρούνται σημαντικοί προστατευτικοί παράγοντες απέναντι στον καρκίνο του παχέος εντέρου.

Τα τελευταία χρόνια έχει φανεί μια σημαντική αντικαρκινική δράση πολλών φλαβονοειδών σε μια σειρά ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων. Σε πειραματικά μοντέλα όπου έχουμε καρκινικά κύτταρα που εξαρτώνται από οιστρογόνα, η αντικαρκινική δράση των φλαβονοειδών αποδόθηκε στις αντιοιστρογονικές ιδιότητες ορισμένων φλαβονοειδών (ισοφλαβόνες, κερκετίνη)⁴⁷. Σε άλλα *in vitro* πειράματα, τα φλαβονοειδή έδειξαν να επηρεάζουν τα κυτταρικά μηνύματα και την κυτταρική ανάπτυξη. Η γκενιστεΐνη και η κερκετίνη αναστέλλουν την κινάση της τυροσίνης η οποία επίσης εμπλέκεται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό⁴⁸. Τέλος, η απιγκενίνη, η λουτεόλη και η κερκετίνη προωθούν την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων μέσω του μηχανισμού p-53⁴⁹.

Όλες οι παραπάνω δράσεις των φλαβονοειδών επιτεύχθηκαν σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από αυτές που μπορεί κανείς να προσλάβει μέσω της ανθρώπινης διαίτας⁴¹. Επίσης στα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκε πρότυπη ένωση και πολύ λίγα πράγματα είναι γνωστά για την δράση είτε των συζευγμένων μορίων των φλαβονοειδών είτε των αντίστοιχων μεταβολιτών τους, οι βρίσκονται κατά κανόνα στην κυκλοφορία του αίματος.

2.4.3 Αντιφλεγμονώδη δράση-Αντιθρομβωτική δράση

Ένας μεγάλος αριθμός προθρομβωτικών παραγόντων παράγεται από τα αιμοπετάλια, όπως θρομβοξάνη A2, PAF, σεροτονίνη, μεταβολίτες της λιποοξυγενάσης οι οποίοι οδηγούν στην δημιουργία θρόμβου⁵⁰. Πολλές έρευνες έχουν δείξει την ικανότητα των πολυφαινολών του κρασιού να αναστέλλουν σημαντικά την συσσώρευση των αιμοπεταλίων⁵¹.

Πολύ σημαντική είναι η δράση της ρεσβερατρόλης, η οποία μπορεί να αναστείλει την δράση του PAF, ο οποίος είναι πολύ σημαντικός φλεγμονώδης παράγοντας και εμπλέκεται στον μηχανισμό ανάπτυξης φλεγμονής. Τα τελευταία χρόνια μάλιστα έχει πιστοποιηθεί η αντιθρομβωτική δράση και άλλων, ακετυλιωμένων παραγώγων του κρασιού⁵².

Οι αντιφλεγμονώδεις δράσεις των φλαβονοειδών έχουν μελετηθεί τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Μελετήθηκε η δράση των φλαβονοειδών στο να μεταβολίζουν το αραχιδονικό οξύ των αιμοπεταλίων⁵³. Στην ίδια έρευνα αναφέρθηκε επίσης ότι μερικά φλαβονοειδή όπως η μυρηκετίνη και η κερκετίνη, μπλοκάρουν τα μονοπάτια της λιποοξυγενάσης και κυκλοοξυγενάσης σε υψηλές συγκεντρώσεις. Η αναστολή της κυκλοοξυγενάσης και η αύξηση του κυκλικού AMP είναι και ο βασικότερος μηχανισμός της αντισυσσωρευτικής δράσης των φλαβονών, της απιγενίνης. Αντίθετα, ο μηχανισμός αντισυσσωρευτικής δράσης για την κερκετίνη και την μυρηκετίνη ήταν διαφορετικός και σχετίζεται με την ικανότητα τους να αναστέλλουν το πρώτο κύμα συσσώρευσης (που προκαλείται από το cAMP) καθώς και την απόκριση του cAMP στην PGI₂. Επίσης τα φλαβονοειδή έδειξαν σημαντικές *in vivo* αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Μάλιστα δεν είχαν παρενέργειες όπως άλλα αντιφλεγμονώδη φάρμακα (πρόκληση έλκους)⁵⁴.

Η αντιφλεγμονώδη δράση των φλαβονοειδών μπορεί να εκφραστεί και ως προς την ικανότητα τους να επηρεάζουν την δράση των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων. Ορισμένα φλαβονοειδή όπως η κερκετίνη έχουν την ικανότητα να αναστείλουν την δράση των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων μέσω της φωσφολιπάσης A₂⁵⁵, καθώς και την δράση της NADPH οξειδάσης⁵⁶. Η ενεργοποίηση της NADPH οξειδάσης οδηγεί στον σχηματισμό του ανιόντος του υπεροξειδίου, μιας ελεύθερης ρίζας οξυγόνου, η οποία και καταστρέφει τους ιστούς, από τα ουδετερόφιλα. Εκτός από αυτήν την ικανότητα, η κερκετίνη αναστέλλει την παραγωγή 3 H-αραχιδονικού οξέος από τα ουδετερόφιλα μέσω μιας ανοσολογικής διέγερσης. Η απελευθέρωση του αραχιδονικού οξέος καταλύεται από την φωσφολιπάση A₂, είναι ο μηχανισμός που οδηγεί στον σχηματισμό προφλεγμονωδών παραγόντων, όπως προσταγλαδίνες και λευκοτριένια.

Οι φαινολικές ενώσεις έχουν αντιθρομβωτική δράση, μιας και αναστέλλουν την συσσώρευση αιμοπεταλίων, προκαλούν μειωμένη σύνθεση προθρομβωτικών και προφλεγμονωδών παραγόντων, μειώνουν την έκφραση των μορίων προσκόλλησης καθώς και την δράση ιστικών παραγόντων⁵⁷. Επιπρόσθετα, οι πολυφαινόλες του κρασιού ρυθμίζουν την παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου από το ενδοθήλιο, προκαλώντας έτσι αγγειοδιαστολή⁵⁸.

2.4.4 Αντιαλλεργική δράση

Τα φλαβονοειδή είναι επίσης γνωστά για τις αντιαλλεργικές τους ιδιότητες. Αυτές αποδίδονται στην ικανότητα των φλαβονοειδών να επηρεάζουν την έκκριση της ισταμίνης⁵⁹. Συγκεκριμένα, τα φλαβονοειδή αναστέλλουν την δράση ενζύμων που αυξάνουν την έκκριση ισταμίνης από τα μαστοκύτταρα και τα βασεόφιλα, δηλαδή την δράση της φωσφοδιεστεράσης του cAMP και της ασβέστιο-εξαρτώμενης ΑΤΡάσης. Η φωσφοδιεστεράσης του cAMP μειώνει το cAMP: Μεγάλες ποσότητες cAMP μπλοκάρουν τις ενδοκυτταρικές αποθήκες ισταμίνης. Επίσης, η ασβέστιο-εξαρτώμενη ΑΤΡάση μέσω αποικοδομής του ATP απελευθερώνει ενέργεια ώστε να επιτρέψει την είσοδο του Ασβεστίου κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης. Υψηλά επίπεδα ενδοκυτταρικού ασβεστίου επίσης προκαλούν απελευθέρωση ισταμίνης από τις κυτταρικές αποθήκες.

2.4.5 Αντιβακτηριακή δράση

Έχει μελετηθεί *in vitro* η δυνατότητα κάποιων φλαβονοειδών απέναντι σε διάφορα βακτηριακά στελέχη τα οποία προκαλούν μολύνσεις στο αναπνευστικό και γαστρεντερικό σύστημα του ανθρώπου⁶⁰. Η υδρόξυτυροσόλη και η ελευροπαίνη είχαν και οι δύο αντιμικροβιακή δράση απέναντι στα ATCC βακτηριακά στελέχη. Η υδρόξυτυροσόλη μάλιστα είχε καλύτερη αντιμικροβιακή δράση από την ελευροπαίνη (προκαλούσε την ίδια αναστολή σε μικρότερες συγκεντρώσεις). Αν και οι δύο ενώσεις είχαν δομή *θ*-διφαινόλης, η οποία είναι υπεύθυνη για την αντιμικροβιακή δράση των μορίων αυτών, η μείωση της τοξικότητας της ελευροπαίνης οφείλεται στο ότι ο γλυκοζιτικός δεσμός εμποδίζει την ένωση να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη και να φτάσει στο σημείο στόχο.

2.4.6 Αντιϊκή δράση

Συγκεκριμένα φλαβονοειδή μπορούν να αναστείλουν την δράση ιών όπως τον ιό polio type1, parainfluentza type 3, herpes type 1. Τα φλαβονοειδή μελετήθηκαν για την ικανότητα τους να επηρεάζουν την μόλυνση από ιούς κάποιων κυτταρικών πληθυσμών ή το κατά πόσο αυτά τα φλαβονοειδή μπορούν να αναστείλουν τον πολλαπλασιασμό των ιών, από την στιγμή που έχουν μολύνει ήδη κυτταρικούς πληθυσμούς⁶¹. Η κερκετίνη, έδειξε τόσο αντιπολλαπλασιαστική όσο και προστατευτική δράση απέναντι και στους τέσσερις ιούς. Η εσπεριδίνη, μπόρεσε να

αναστείλει τον πολλαπλασιασμό των ιόν, δείχνοντας στην ουσία ότι ένα φλαβονοειδές μπορεί να εισέλθει στο εσωτερικό του κυττάρου. Η κατεχίνη, δεν μπόρεσε να αναστείλει τον πολλαπλασιασμό των ιόν, έδειξε όμως σημαντική δράση προστατευτική δράση απέναντι σε δύο ιούς. Η ναριγκίνη, δεν έδειξε καμία προστατευτική δράση σε κανενός τύπου ιό. Φαίνεται ότι υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στην δομή και στην αντιϊκή δράση των φλαβονοειδών. Συγκεκριμένα φλαβονοειδή επηρεάζουν την δράση τριών ενζύμων που σχετίζονται με τον κύκλο ζωής των ιών που επηρεάζουν τον άνθρωπο⁶².

2.4.7 Ορμονική δράση

Η οστεοπόρωση είναι μια παθολογική κατάσταση που χαρακτηρίζεται από χαμηλή οστική πυκνότητα και παρουσιάζεται πολύ συχνά σε ηλικιωμένες γυναίκες. Διαιτητικοί παράγοντες όπως η βιταμίνη D, οι πρωτεΐνες και το ασβέστιο είναι σημαντικοί για την διατήρηση της οστικής δύναμης και πυκνότητας. Τα οιστρογόνα έχουν πολλές φαρμακολογικές δράσεις στον σχηματισμό οστεοκλαστών: μείωση του σχηματισμού PTH η οποία προκαλεί τον σχηματισμό οστεοκλαστών, μετατροπή του $25(\text{OH})\text{D}_3$ σε $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ στον νεφρό, που είναι αποτελεσματικά στο να διατηρούν την πυκνότητα των οστών. Υποδοχείς οιστρογόνων βρίσκονται τόσο στους οστεοκλάστες όσο και στους οστεοβλάστες, κάτι που σχετίζεται με την δράση των φυτοοιστρογόνων. Ο Kuiper⁶³ βρήκε ότι οι ισοφλαβόνες γκενιστεΐνη και νταϊζεντεΐνη είχαν καλύτερη προσκόλληση στους β-υποδοχείς οιστρογόνων, από ότι τους α-υποδοχείς, κάτι που θεωρείται θετικό στην πρόληψη της οστεοπόρωσης μιας και ο σχηματισμός των οστών ενεργοποιείται μόνο μέσω β-υποδοχέων οιστρογόνων.

Μελετήθηκε η δράση των ισοφλαβονών σε 58 γυναίκες ηλικίας 50-70 ετών. Στα μισά άτομα δόθηκε πρώτα σκεύασμα που περιείχε 40 mg ισοφλαβονών κάθε μέρα για 4 μήνες και στα υπόλοιπα μισά σκεύασμα placebo. Η πρόσληψη ισοφλαβονών μέσω διαίτας διατηρήθηκε στα επίπεδα των 20 mg ανά ημέρα. Κατόπιν μετρήθηκε η πυκνότητα των οστών μέσω υπερήχων και ακτίνων X. Μετά την παρέμβαση παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντική μείωση στα επίπεδα της δεόξυυριδολίνης και μια αύξηση στα επίπεδα της οστεοκαλσίνης μετά από 4 μήνες.

Τα φλαβονοειδή λοιπόν παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόληψη της οστεοπόρωσης⁶⁴. Έχει φανεί μάλιστα ότι η θεραπεία με ιτριφλαβόνη, ένα παράγωγο των ισοφλαβονών, για μια περίοδο ενός χρόνου (3 x 200mg καθημερινά) μειώνει τον

πόνο και αυξάνει την κινητικότητα ασθενών με οστεοπόρωση. Η χρήση ιπριφλαβόνης αύξησε την πυκνότητα της μετάφυσης με δοσοεξαρτώμενο τρόπο και επίσης αύξησε την πυκνότητα της διάφυσης σε ποντίκια που είχαν προκλητή οστεοπόρωση μέσω γλυκοκορτικοειδών⁶⁵. Πειραματικές μελέτες έδειξαν επίσης ότι το μόριο αυτό αναστέλλει την επαναπορρόφηση οστεοκλαστών τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Αν και ο μηχανισμός δεν είναι απόλυτα γνωστός, πιστεύεται ότι η ιπριφλαβόνη αναστέλλει την δραστηριότητα των οστεοκλαστών μέσω του μηχανισμού του ενδοκυττάριου ελεύθερου ασβεστίου⁶⁶.

2.4.8 Φλαβονοειδή και γαστρεντερικό σύστημα

Κάποιες από τις παρενέργειες των αντιφλεγμονωδών φαρμάκων είναι ότι προκαλούν έλκος στομάχου. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, τα φλαβονοειδή έχουν σημαντική αντιφλεγμονώδη δράση, ενώ επίσης προστατεύουν τον γαστρικό βλεννογόνο από διάφορους ελκογόνους παράγοντες⁶⁷. Κάποια από τα φλαβονοειδή που φαίνεται να έχουν αντιελκογόνο δράση είναι η κερκετίνη και η ναριγκίνη. Σε πειράματα προκλήθηκε σε ποντίκια γαστρικό έλκος μέσω αιθανόλης. Και τα δύο αυτά φλαβονοειδή είχαν σημαντική προστατευτική δράση. Η ναριγκίνη, όταν δόθηκε σε δόσεις των 400mg/κilo 60 λεπτά πριν την απόλυτη αιθανόλη μείωσε σημαντικά την πρόκληση έλκους, ίσως μέσω του μηχανισμού δέσμευσης ελεύθερων ριζών⁶⁸. Η θεραπεία με κερκετίνη (δόσεις των 200mg/κilo) όχι μόνο μείωσε την «σοβαρότητα» ορισμένων ελκών, αλλά αύξησε το περιεχόμενο σε γλυκοπρωτεΐνη της εντερικής βλέννας⁶⁹. Τέλος, μια άλλη εξήγηση για την προστατευτική δράση των φλαβονοειδών απέναντι στο έλκος είναι η αναστολή σχηματισμού PAF, ενός σημαντικού παράγοντα καταστροφής του γαστρικού βλεννογόνου⁷⁰.

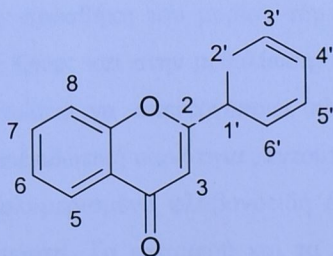
Πολλά φλαβονοειδή έχουν δείξει επίσης σημαντική προστατευτική δράση απέναντι στο ήπαρ. Η ρουτίνη και η βενουρουτίνη έδειξαν ότι μπορούν να αναγεννήσουν και προστατεύσουν το συκώτι σε πειραματικές κηρώσεις. Τα αποτελέσματα από πολλές κλινικές έρευνες έδειξαν την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια των φλαβονοειδών στην θεραπεία της χολικής δυσλειτουργία, αλλά και σε άλλες περιπτώσεις προβλημάτων πέψης, όπως στο αίσθημα του κορεσμού, την απώλεια όρεξης, την ναυτία. Η συλικμαρίνη δείχνει μια σημαντική ικανότητα κυτταρικής σύνθεσης φωσφολιπιδίων. Επίσης, θα πρέπει να διερευνηθεί ο ρόλος των

φλαβονοειδών όχι μόνο στην προστασία του ήπατος, αλλά και στην αντιμετώπιση της γαστροπάθειας από μη στεροειδικά αντιφλεγμονώδη φάρμακα. (ΜΣΑΦ).

2.5 Σχέση δομής και βιολογικής δραστηριότητας φαινολικών ενώσεων

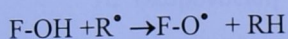
Τα τελευταία 15 χρόνια, ένας σημαντικός αριθμός in vitro ερευνών έχει γίνει για να κατατάξει τα μόρια των πολυφαινολών με βάση την αντιοξειδωτική τους ικανότητα. Επίσης έχει γίνει προσπάθεια να συσχετισθεί η δομή των μορίων αυτών με την βιολογική τους δραστηριότητα, έτσι ώστε να διερευνηθεί και σε ποιο βαθμό επηρεάζει η τροποποίηση της δομής που λαμβάνει χώρα κατά τον μεταβολισμό των ενώσεων αυτών. Όσο αφορά την αντιοξειδωτική ικανότητα, οι κυριότεροι παράγοντες δομής του μορίου που σχετίζονται με αντιοξειδωτική δράση είναι :

1. ο αριθμός των υδροξυλίων
2. η 0-μεθυλίωση
3. ο 2-3 διπλός δεσμός και η 4-όξο λειτουργία
4. ο βαθμός γλυκοζυλίωσης του μορίου
5. ο βαθμός πολυμερισμού



Σχήμα 6: Η δομή του μορίου των φλαβονοειδών

1. Η τοποθέτηση στο χώρο των ομάδων OH είναι πιο σημαντικός παράγοντας προσδιορισμού αντιοξειδωτικής ικανότητας από ότι ο ίδιος ο ανθρακικός σκελετός. Ο συνολικός αριθμός των υδροξυλομάδων επηρεάζει την αντιοξειδωτική ικανότητα.⁷¹. Η ικανότητα ανίχνευσης ελεύθερων ριζών αποδίδεται σε μεγάλο βαθμό στην συμμετοχή των υδροξυλομάδων στην αντίδραση:



Η διαμόρφωση των υδροξυλομάδων στον Β-δακτύλιο παρέχουν ένα υδρογόνο σε ρίζες υδροξυλίου, υπεροξυλίου και τις σταθεροποιούν, ενώ παράλληλα

σταθεροποιείται η ρίζα του φλαβονοειδούς. Ανάμεσα σε ομόλογης δομής φαινολικά μόρια, η αντιοξειδωτική ικανότητα αυξάνεται όσο αυξάνεται ο συνολικός αριθμός των υδροξυλομάδων⁷¹. Η ύπαρξη OH ομάδων στις 3', 4' θέσεις της δομής της κατεχόλης στον Β-δακτύλιο αυξάνει σημαντικά την ικανότητα αναστολής της υπεροξειδωσής των λιπιδίων⁷².

2. Η κερκετίνη είναι ένας πιθανός εκκαθαριστής ελεύθερων ριζών περοξυλίου, κυρίως λόγω των *ο*-μεθυλιωμένων και *Ο*-γλυκοζιωμένων παραγώγων της⁷³. Αν για παράδειγμα στην δομή του Β-δακτυλίου αντικατασταθεί η δομή 6'-OH/4'-OMe με την δομή 6'-OMe/4'-OH, χάνεται εξ ολοκλήρου η ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας του DPPH⁷⁴. Επίσης στις 3', 4' θέσεις της δομής της κατεχόλης στον Β-δακτύλιο, εάν γίνει μεθυλίωση στην 4' θέση, μειώνεται ποσοστιαία η αναστολή της υπεροξειδωσής λιπών απόθεικό σίδηρο από 98% σε -2,6%⁷³.

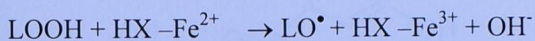
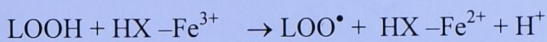
3. Πολλές έρευνες έχουν στραφεί στο να αποδείξουν την σημασία του ακόρεστου δεσμού στις θέσεις 2-3, καθώς και στην ύπαρξη καρβονυλομάδας στην 4 θέση του μορίου. Η σύγκριση κερκετίνης και ταξιφολίνης, δύο μορίων με παρόμοια δομικά στοιχεία, έδειξε ότι η κερκετίνη είναι καλύτερο αντιοξειδωτικό, καθώς έχει διπλό δεσμό στις θέσεις 2-3, κάτι που δεν έχει η ταξιφολίνη⁷⁵.

4. Τα μη γλυκοζιωμένα μόρια είναι καλύτερα αντιοξειδωτικά από τα αντίστοιχα γλυκοζιωμένα⁷⁶. Η μείωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας οφείλεται περισσότερο στην προσθήκη του μορίου του σακχάρου, παρά στην αντικατάσταση της ομάδας OH. Όπως και στην μεθυλίωση, η *Ο*-γλυκοζυλίωση εμποδίζει την ικανότητα του Β-δακτυλίου να απενεργοποιεί ηλεκτρόνια. Αν και η γλυκοζυλίωση μειώνει την αντιοξειδωτική ικανότητα, εντούτοις κάποιες φορές αυξάνει την βιοδιαθεσιμότητα⁷⁷.

5. Πολυμερισμένα φλαβονοειδή έχουν μια πολύπλοκη δομή η οποία είναι σχετικά δυσνόητη. Τα επταμερή και τα εξαμερή των ταννινών έχουν καλύτερη ικανότητα δέσμευσης ριζών υπεροξειδίου από ότι τα αντίστοιχα τριμερή ή τετραμερή⁷⁸. Φαίνεται ότι ο πολυμερισμός του μορίου και η σύνδεση μεταξύ της 3-OH και του Β-δακτυλίου, μαζί με μια πληθώρα β₄→₈ συνδέσεις, δίνει στο πολυμερές καλύτερες ικανότητες δέσμευσης ελεύθερων ριζών, αυξάνοντας την σταθερότητα της δικής του ελεύθερης ρίζας⁷⁹.

Τα φλαβονοειδή έχουν ικανότητες συμπλοκοποίησης ιόντων μετάλλων τα οποία μπορούν να προκαλέσουν οξειδωση (Fe, Cu). Με το να απομακρύνουν και να

ουδετεροποιούν ιόντα σιδήρου, αποτρέπουν την οξειδωτική καταστροφή⁸⁰, όπως φαίνεται από την παρακάτω αντιδράσεις:

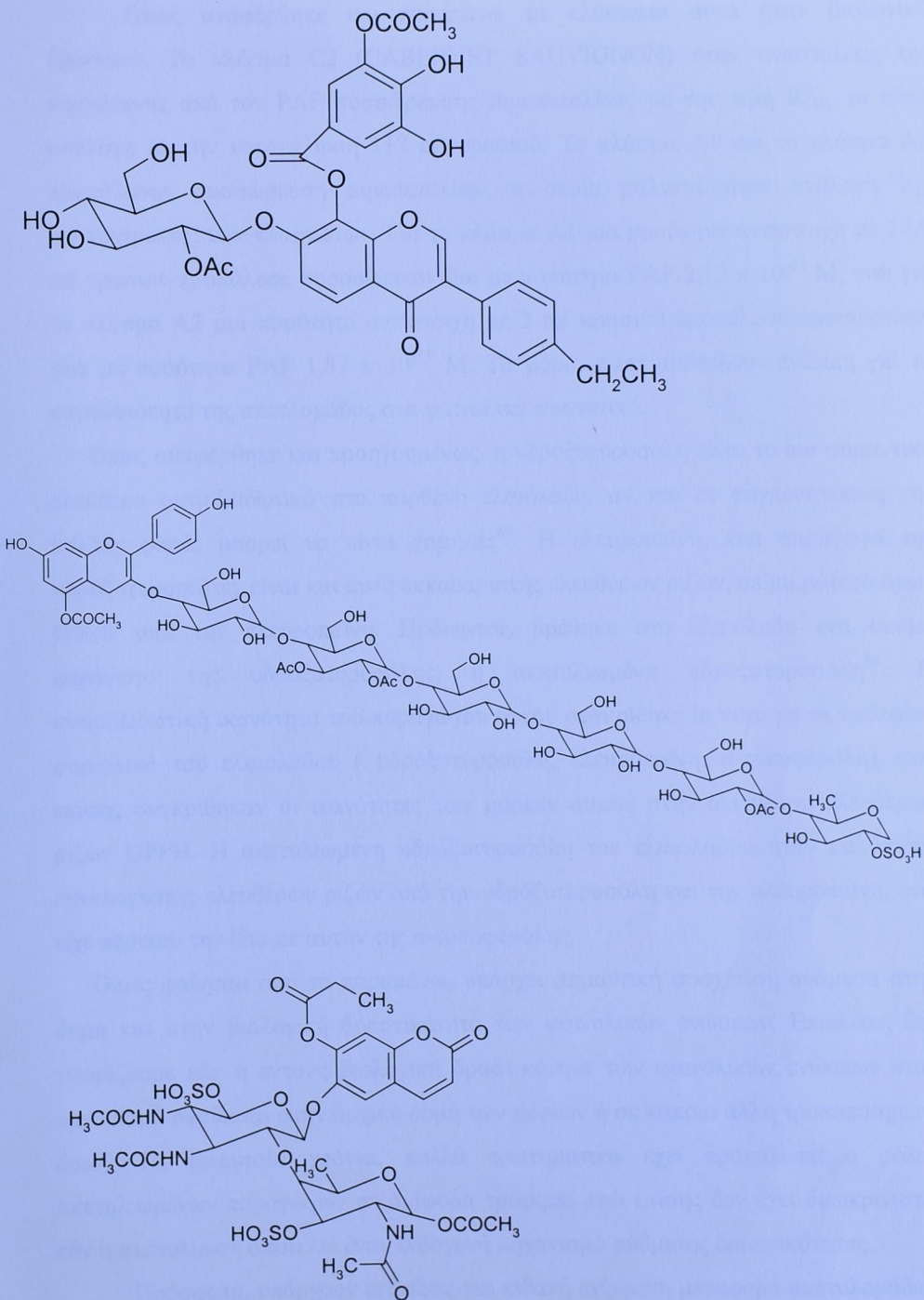


Οι παραπάνω αντιδράσεις μπορούν να ανασταλλούν από φλαβονοειδή με δομή 3', 4' κατεχόλης, 4-όξο και 5-OH δομή⁸¹. Το γεγονός ότι τα πολυυδροξυλιωμένα φλαβονοειδή είναι πιο αποτελεσματικοί αναστολείς της οξείδωσης που επάγεται από ιόντα μετάλλων, σε σχέση με την οξείδωση που δεν προκαλείται από ιόντα μετάλλων, τονίζει την σημασία της συμπλοκοποίησης των μετάλλων αυτών ως σημαντικό μηχανισμό αντιοξειδωτικής δράσης των φλαβονοειδών⁸².

Συνοπτικά, η αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινόλων εξηγείται από την ικανότητα των μορίων αυτών: α) να δημιουργούν χηλικά σύμπλοκα με ιόντα χαλκού μέσω της όρθο-διυδροξύ φαινολικής δομής β) να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες αλκοξυλίου και υπεροξυλίου διακόπτοντας την αλυσίδα οξείδωσης γ) αναγεννώντας την α-τοκοφερόλη μέσω της μείωσης της ελεύθερης ρίζας της α-τοκοφερόλης.

Πρόσφατα, υποστηρίχθηκε ότι η προστατευτική δράση του κρασιού απέναντι στην καρδιακή λειτουργία μπορεί να οφείλεται και στην ύπαρξη ανταγωνιστών του PAF στο λευκό ή κόκκινο κρασί, ή ακόμη και στην παρουσία αντιοξειδωτικών τα οποία μειώνουν τη οξείδωση της LDL με άμεσο αποτέλεσμα να μειώνουν την παραγωγή του PAF⁵².

Σε δύο ελληνικά κρασιά, στο Ambelon και στο Cabernet Sauvignon, όπου η κύρια ποικιλία είναι η Ρομπόλα και το Cabernet Sauvignon, απομονώθηκαν ακετυλιωμένα κλάσματα φαινολικών ουσιών με εξαιρετική βιολογική δραστηριότητα. Η δομή τριών βιολογικά δραστικών κλασμάτων φαίνεται παρακάτω.



Σχήμα 7: Οι δομές βιολογικά δραστικών κλασμάτων από κρασιά Ambelon και Cabernet Sauvignon

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω τα κλάσματα αυτά ήταν βιολογικά δραστικά. Το κλάσμα C2 (CABERNET SAUVIGNON) ήταν αναστολέας της επαγόμενης από τον PAF συσσώρευσης αιμοπεταλίων, με την τιμή IC_{50} , να είναι ανάλογη με την κατανάλωση 117 ml κρασιού. Το κλάσμα A1 και το κλάσμα A2 προκάλεσαν συσσώρευση αιμοπεταλίων, η οποία μάλιστα ήταν ανάλογη της συγκέντρωσης των κλασμάτων. Για το κλάσμα A1 μια ποσότητα αντίστοιχη με 14,9 ml κρασιού προκάλεσε συσσώρευση ίδια με ποσότητα PAF $2,12 \times 10^{-11}$ M, ενώ για το κλάσμα A2 μια ποσότητα αντίστοιχη με 3 ml κρασιού προκάλεσε συσσώρευση ίδια με ποσότητα PAF $1,87 \times 10^{-11}$ M. Τα μόρια αυτά αποτελούν ένδειξη για τη σπουδαιότητα της ακετλομάδας στα φαινολικά συστατικά.

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η υδρόξυτυροσόλη είναι το πιο σημαντικό ελεύθερο αντιοξειδωτικό στο παρθένο ελαιόλαδο, αν και οι συγκεντρώσεις της πολλές φορές μπορεί να είναι χαμηλές⁸³. Η ελευροπαΐνη, ένα παράγωγο της υδρόξυτυροσόλης, είναι και αυτή εκκαθαριστής ελευθέρων ριζών, σε μικρότερο όμως βαθμό από την ελευροπαΐνη. Πρόσφατα, βρέθηκε στο ελαιόλαδο ένα ακόμη παράγωγο της υδρόξυτυροσόλης, η ακετυλιωμένη υδρόξυτυροσόλη⁸⁴. Η αντιοξειδωτική ικανότητα του παραγώγου αυτού συγκρίθηκε *in vitro* με τα υπόλοιπα φαινολικά του ελαιολάδου (υδρόξυτυροσόλη, ελευροπαΐνη, α-τοκοφερόλη), ενώ επίσης συγκρίθηκαν οι ικανότητες των μορίων αυτών στην ανίχνευση ελευθέρων ριζών DPPH. Η ακετυλιωμένη υδρόξυτυροσόλη του ελαιολάδου ήταν καλύτερος εκκαθαριστής ελευθέρων ριζών από την υδρόξυτυροσόλη και την ολευροπαΐνη, ενώ είχε περίπου την ίδια με αυτήν της α-τοκοφερόλης.

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω, υπάρχει σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην δομή και στην βιολογική δραστηριότητα των φαινολικών ενώσεων. Επιπλέον, δεν γνωρίζουμε εάν η έντονη βιολογική δραστηριότητα των φαινολικών ενώσεων στον οργανισμό οφείλεται στην αρχική δομή των μορίων ή σε κάποια άλλη τροποποιημένη δομή. Τα τελευταία χρόνια, πολλά ερωτηματικά έχει προκαλέσει ο ρόλος ακετυλιωμένων παραγώγων σε διάφορα τρόφιμα, ενώ επίσης δεν έχει διευκρινιστεί εάν η ακετυλίωση αποτελεί έναν ενδογενή μηχανισμό ρύθμισης δραστηριότητας.

Πρόσφατα, υπάρχουν ενδείξεις για πιθανή ενζυμική μεταφορά ακετυλομάδων [που καταλύονται από μια τρανακετυλάση (TA) που βρίσκεται στα μικροσώματα], από ένα ακετυλιωμένο συστατικό (κυρίως ακετύλυ-4-μεθυλοκουμαρίνες) σε ενζυμικές πρωτεΐνες (κυτόχρωμα p-450, τρανσφεράση-S-γλουταθειόνης, ρεδοκτάση-C-κυτοχρώματος NADPH) οδηγώντας έτσι σε μετατροπή των

καταλυτικών τους ιδιοτήτων⁸⁵. Μάλιστα, έχει φανεί ότι οι ακετυλομάδες που βρίσκονται κοντά στο ετεροάτομο του οξυγόνου, δηλαδή στον άνθρακα C7 και C8, είχαν καλύτερη προσκόλληση στο μόριο της τρανσακετυλάσης. Επίσης έχει γίνει μελέτη της προσκόλλησης και άλλων ακετυλιωμένων φλαβονοειδών στην TA, με σκοπό να μελετηθεί η σημασία της πυρανικής ανθρακικής ομάδας στην καταλυτική ιδιότητα του ενζύμου. Είναι απαραίτητη η ύπαρξη της ανθρακικής ομάδας στον πυρανικό δακτύλιο του υποστρώματος, ώστε να δράσει το ένζυμο. Αυτό φάνηκε από το γεγονός ότι η δραστηριότητα της TA ήταν εξαιρετικά μειωμένη όταν χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα η πεντακετυλιωμένη κατεχίνη και η 7-ακετόξυ-3,4 διϋδρο-2,2διμεθυλοβενζοπυράνη, ουσίες που στερούνται πυρανικό ανθρακικό σκελετό. Η δραστηριότητα της TA ήταν χαμηλότερη από αυτήν των ακετόξυκουμαρινών, γεγονός που καθιστά αναγκαία την παρουσία της πυρανικής ανθρακικής ομάδας δίπλα στο ετεροάτομο του οξυγόνου. Οι βιοχημικές ιδιότητες των ακετυλιωμένων φλαβονοειδών, όπως η αντιστρεπτή ενεργοποίηση της ρεδοκτάση-C-κυτοχρώματος NADPH και της καταλυόμενης στα μικροσώματα αφλατοξίνης B1, σχετίζονται με την προσκόλληση τους με την TA. Με βάση τα παραπάνω, μπορούμε να υποθέσουμε ότι η ακετυλίωση ίσως αποτελεί ενδογενή μηχανισμό διαφοροποίησης της αρχικής δομής των μορίων, με σκοπό αυτά να γίνουν βιολογικά δραστικά.

3. ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗ ΔΙΑΙΤΑ

3.1 Οι φαινολικές ενώσεις στα τρόφιμα της Μεσογειακής Δίαιτας

Η μέση κατανάλωση πολυφαινολών μέσω της δίαιτας είναι περίπου 1 γραμμάριο την ημέρα⁸⁶. Οι κυριότερες πηγές, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, είναι τα φρούτα, τα αφεψήματα όπως το τσάι, ο καφές, το κρασί και οι χυμοί φρούτων, η σοκολάτα, και σε ένα μικρότερο βαθμό τα λαχανικά, τα δημητριακά, και οι σπόροι. Περισσότερες λεπτομέρειες δεν είναι γνωστές, μιας και δεν γνωρίζουμε το περιεχόμενο πολλών τροφίμων σε φλαβονοειδή. Τα τρόφιμα και τα ποτά παρέχουν το μεγαλύτερο ποσοστό φαινολικών ενώσεων. Τα φαινολικά οξέα αποτελούν περίπου το 1/3 της συνολικής πρόσληψης πολυφαινολών, ενώ τα υπόλοιπα 2/3 προέρχονται από τα φλαβονοειδή. Αυτή η αναλογία εξαρτάται από την κατανάλωση καφέ. Είναι λογικό άτομα που πίνουν πιο συχνά καφέ να έχουν και μεγαλύτερη πρόσληψη φαινολικών οξέων. Επίσης, η πρόσληψη των διαφόρων τάξεων των φλαβονοειδών εξαρτάται και από τα τρόφιμα που καταναλώνει κανείς. Υψηλή κατανάλωση κόκκινου κρασιού, τσαγιού, σοκολάτας ή μπίρας, προσδίδει μεγάλη ποσότητα φλαβονολών (κατεχίνες και προανθοκυανιδίνες), ανθοκυανίνες και τα προϊόντα οξείδωσής τους¹⁵. Είναι λογικό λοιπόν, η πρόσληψη πολυφαινολών να εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από τις διαιτητικές συνήθειες και προτιμήσεις. Οι φαινολικές ενώσεις υπάρχουν σε αρκετά τρόφιμα της Μεσογειακής Δίαιτας. Στο ελαιόλαδο έχουν απομονωθεί τουλάχιστον 30 φαινολικά συστατικά⁸⁷, τα οποία συνεισφέρουν στην αντοχή του ελαιολάδου και στην σταθερότητα του⁸⁸. Το περιεχόμενο του ελαιολάδου σε φαινολικά εξαρτάται από την παραγωγή και την αποθήκευση του⁸⁹, ενώ το συνολικό περιεχόμενο σε φαινολικά είναι υψηλότερο στο παρθένο ελαιόλαδο από ότι στο επεξεργασμένο παρθένο ελαιόλαδο⁹⁰.

Στον πίνακα 3 φαίνεται το είδος των πολυφαινολών που υπάρχουν σε διάφορα τρόφιμα της Μεσογειακής Δίαιτας.

Πίνακας 3: Το είδος των πολυφαινολών που υπάρχουν σε διάφορα τρόφιμα της Μεσογειακής Δίαιτας

ΤΡΟΦΙΜΟ	ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ
ΜΗΛΟ	Κερκετίνη, επικατεχίνη, χλωρογενικό οξύ
ΕΣΠΕΡΙΔΟΕΙΔΗ	Ναριγκίνη, εσπεριδίνη, ναριγκίνη
ΣΤΑΦΥΛΙΑ	Ταννικό οξύ, κερκετίνη, ρεσβερατρόλη
ΚΡΕΜΜΥΔΙΑ	Κερκετίνη, μυρκετίνη
ΚΑΡΟΤΑ	Λιγνίνη
ΣΟΓΙΑ	Γκενιστεΐνη, νταιζντεΐνη, φαινολικά οξέα
ΒΡΩΜΗ	Εστέρες καφεϊκού και φερουλικού οξέος
ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ	Τυροσόλη, υδροξύτυροσόλη, ελευροπαΐνη
ΚΡΑΣΙ	Ρεσβερατρόλη
ΝΤΟΜΑΤΕΣ	Κερκετίνη, ρουτίνη

3.2 Γιατί τα τρόφιμα της Μεσογειακής Δίαιτας είναι πλούσια σε φαινολικές ενώσεις;

Πολλές χιλιάδες φαινολικά μόρια έχουν απομονωθεί σε διάφορα φυτικά τρόφιμα, όπου και έχουν αρκετές σημαντικές ιδιότητες: εμποδίζουν την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών, παρέχουν προστασία από την υπεριώδη ακτινοβολία και το οξειδωτικό στρες. Τα φρούτα και τα λαχανικά-συμπεριλαμβανομένου και της ελιάς και των σταφυλιών- εκτίθενται στην υπεριώδη ακτινοβολία και στις υψηλές θερμοκρασίες της Μεσογείου, και έτσι είναι αναγκαία η ύπαρξη φαινολικών μορίων στα τρόφιμα αυτά, για να διατηρηθεί η ακεραιότητά τους⁹¹.

Οι ταννίνες αποτρέπουν τα φυτοφάγα από το να τρέφονται με στυπτικά φρούτα⁹². Οι φαινολικές ενώσεις όπως το σαλκυλικό οξύ είναι και μόρια μηνύματα, ενώ οι λιγνάνες παρέχουν μηχανική υποστήριξη⁹³. Οι ταννίνες προσδίδουν στυπτικότητα ή πικράδα σε διαφορετικά φρούτα, στο κρασί και στο τσάι, ενώ οι ανθοκυανίνες δίνουν χρώμα στα κόκκινα φρούτα (φράουλα, μούρα και σταφύλια)²².

3.3 Οι δράσεις των φαινολικών ενώσεων της Μεσογειακής Δίαιτας

Πολλές επιδημιολογικές έρευνες έδειξαν ότι η συχνότητα εμφάνισης Στεφανιαίας Νόσου και ορισμένων μορφών καρκίνου είναι χαμηλότερη στην λεκάνη της Μεσογείου⁹⁴, κάτι που αποδόθηκε στις διατροφικές συνήθειες της περιοχής. Στο παρελθόν, εκτός από την χαμηλή κατανάλωση κρέατος, έμφαση είχε δοθεί και στην χαμηλή πρόσληψη κορεσμένου λίπους-σε αντίθεση με την υψηλή πρόσληψη μονοακόρεστων λιπαρών οξέων-της Μεσογειακής Δίαιτας. Πιο πρόσφατα, στοιχεία έχουν αποδείξει την σημασία των φυτικών τροφίμων (τα οποία περιλαμβάνουν υδατάνθρακες και άπεπτες φυτικές ίνες) και μιας τακτικής πρόσληψης ελαιολάδου.

Οι κλασσικοί παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση Στεφανιαίας Νόσου όπως η χοληστερόλη του ορού και η αρτηριακή πίεση δεν διαφέρουν σημαντικά στους πληθυσμούς της Λεκάνης της Μεσογείου σε σχέση με τους πληθυσμούς των Δυτικών Χωρών, κάτι που υποδεικνύει πως και άλλοι παράγοντες κινδύνου μαζί με τους κλασσικούς, επηρεάζονται από την Μεσογειακή Δίαιτα⁹⁵. Πράγματι, υπάρχουν πολλές παρατηρήσεις που δεν συνδέουν την εμφάνιση Στεφανιαίας Νόσου και πρόσληψης λίπους. Αυτά τα στοιχεία οδήγησαν στον σχηματισμό της αντιοξειδωτικής/ αθηροσκληρωτικής υπόθεσης, η οποία δίνει μεγάλη σημασία στον πιθανό ρόλο των αντιοξειδωτικών, περιλαμβάνοντας τις φαινολικές ενώσεις, ως προστατευτικό μηχανισμό (κυρίως λόγω της προστασίας της LDL από την οξείδωση) στην χαμηλή συχνότητα εμφάνισης καρδιοπαθειών στην Λεκάνη της Μεσογείου.

Οι απλές φαινόλες του ελαιολάδου αναστέλλουν την οξείδωση της LDL in vitro⁹⁶. Η οξείδωση της LDL σχετίζεται με τον σχηματισμό αθηρωματικών πλακών, οι οποίες προκαλούν την εμφάνιση Στεφανιαίας Νόσου. Επίσης, η υδρόξυτυροσόλη του ελαιολάδου αναστέλλει την λιποοξυγενάση του αραχιδονικού οξέος⁹⁷, ενώ προκαλεί αναστολή της συσώρευσης αιμοπεταλίων⁹⁸, στοιχεία που ενισχύουν την προστατευτική δράση της Μεσογειακής Δίαιτας στην εμφάνιση καρδιοπαθειών και καρκίνου.

Το κόκκινο κρασί περιέχει ρεσβερατρόλη, η οποία σχετίζεται με τις ευεργετικές συνέπειες της μέτριας κατανάλωσης κρασιού. Η ρεσβερατρόλη εμποδίζει την οξείδωση της LDL⁹⁹, καθώς και την συσώρευση αιμοπεταλίων και την σύνθεση εικοσανοειδών¹⁰⁰. το μόριο της ρεσβερατρόλης σχετίζεται με την αναστολή της καρκινογένεσης¹⁰¹.

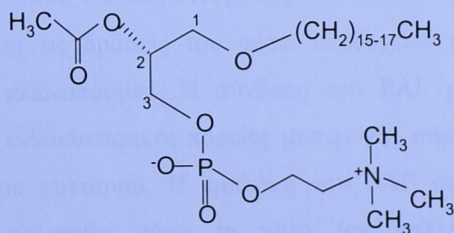
Επίσης, σημαντικό ρόλο διαδραματίζει η ικανότητα των φαινολικών ενώσεων να αναστέλλουν την δράση προφλεγμονοδών παραγόντων, όπως ο PAF, ο οποίος μελετάται αναλυτικότερα στο επόμενο κεφάλαιο.

4. Ο ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ

4.1 Εισαγωγή-Δομή

Ο Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (Platelet-Activating Factor, PAF) είναι το πρώτο βιολογικά δραστικό φωσφολιποειδές το οποίο βρέθηκε στην φύση και παραμένει μέχρι σήμερα ένας από τους πιο δραστικούς, φυσικά παραγόμενους, χημικούς μεσολαβητές. Συντίθεται και εκκρίνεται από πλήθος κυττάρων, τόσο σε βασικά επίπεδα, όσο και σε απόκριση διαφόρων ερεθισμάτων και συμμετέχει σε ένα μεγάλο αριθμό παθοφυσιολογικών καταστάσεων του οργανισμού.

Ο PAF είναι ένα γλυκεριναιθερικό φωσφολιποειδές. Στην πρώτη θέση του γλυκερινικού σκελετού συνδέεται, με αιθερικό δεσμό, μια λιπαρή αλυσίδα που περιλαμβάνει συνήθως 16 ή 18 άτομα άνθρακα και είναι κορεσμένη ή ακόρεστη με έναν ή δύο διπλούς δεσμούς, στη δεύτερη θέση βρίσκεται εστεροποιημένο ένα οξικό οξύ και στην τρίτη θέση υπάρχει μια ομάδα φωσφορυλοχολίνης. Η δομή του PAF φαίνεται στο σχήμα



Σχήμα 8: Η δομή του Παράγοντα Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων

4.2 Βιολογικές δράσεις

Μελέτες που έχουν με συνθετικά ανάλογα του PAF έχουν δείξει πως η δομή των μοριακών ειδών καθορίζει και την βιολογική τους δραστικότητα. Το σημαντικότερο δομικό χαρακτηριστικό για την ύπαρξη βιολογικής δραστικότητας είναι η παρουσία ακετυλομάδας στην sn-2 θέση του γλυκερινικού σκελετού. Απομάκρυνση της ακετυλομάδας οδηγεί στο λύσο -PAF, ο οποίος είναι ανενεργός. Αντικατάσταση της ακετυλομάδας με λιπαρά οξέα μεγαλύτερης ανθρακικής αλυσίδας οδηγεί σε μόρια με μικρότερη βιολογική δραστικότητα.

Ο παραγόμενος από τα κύτταρα PAF μπορεί να ακολουθήσει τις παρακάτω πορείες:

- να εκκριθεί από τα κύτταρα και να δράσει, είτε αυτοκρινώς πάνω στα κύτταρα από τα οποία παράχθηκε, είτε παρακρινικά ενεργοποιώντας γειτονικά κύτταρα του ίδιου ή διαφορετικού είδους.
- Να ενσωματωθεί στην πλασματική μεμβράνη του κυττάρου από το οποίο συντέθηκε και να δράσει από εκεί ως διακυτταρικός μεσολαβητής ενεργοποιώντας γειτονικά μόρια. Αυτός ο τρόπος δράσης του PAF είναι ιδιαίτερα σημαντικός κατά την ενεργοποίηση και προσκόλληση των ουδετερόφιλων στα ενδοθηλιακά κύτταρα σε καταστάσεις φλεγμονής.
- Να παραμείνει στα κύτταρα και να δράσει ως ενδοκυτταρικός μεσολαβητής

4.3 Εμπλοκή του PAF σε παθολογικές καταστάσεις

Ο PAF ασκεί τις δράσεις του μέσω υποδοχέων που έχουν απομονωθεί, χαρακτηριστεί και κλωνοποιηθεί. Η σύνδεση του PAF με τους υποδοχείς του, ενεργοποιεί πολλές ενδοκυτταρικές πορείες μεταγωγής σήματος που οδηγούν στην τελική απόκριση του κυττάρου. Η εμπλοκή του PAF σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις έχει μελετηθεί τόσο *in vitro* (σε καλλιέργειες κυττάρων και απομονωμένους ιστούς) όσο και *in vivo* (μετά από χορήγηση του PAF σε πειραματόζωα αλλά και στον άνθρωπο. Οι κυριότερες δράσεις του PAF φαίνονται στους παρακάτω πίνακες.

Πίνακας 4.: Δράσεις του PAF in vitro (σε κύτταρα και απομονωμένους ιστούς)

Είδος κυττάρου/ιστού	Δράσεις
Αιμοπετάλια	Αλλαγή σχήματος, συσσώρευση, έκκριση εικοσανοειδών
Ουδετερόφιλα	Αποκοκκίωση, συσσώρευση, χημειοταξία, αύξηση προσκολλητικής ικανότητας
Λεμφοκύτταρα	Βλαστική τροποποίηση, καταστολή παραγωγής IL-2
Νευρώνες	Ενεργοποίηση του κύκλου της φωσφατιδύλοϊνοσιτόλης
Σπερματοζώαρια	Αύξηση κινητικότητας
Πρωτόζωα	Σύνθεση εικοσανοειδών, αύξηση γλυκογονόλυσης
Ήπαρ	Αύξηση γλυκογονόλυσης, μεταβατική αύξηση στην πίεση της πυλαίας φλέβας
Πνεύμονας	Μείωση της επιφάνειας των τριχοειδών
Καρδιά	Μείωση της συσταλτικής ικανότητας της κοιλίας
Έντερο	Σύσπαση, ισχμική νέκρωση

Πίνακας 5: Δράσεις του PAF in vivo

Παθολογική κατάσταση	Δράση PAF
Καρδιαγγειακό σύστημα	Αρνητική ινóτροπη δράση, μείωση του κατά λεπτό όγκου αίματος, συμμετέχει στην παθογένεια της αρτηριοσκλήρυνσης
Πεπτικό σύστημα	Βλάβη γαστρικού βλεννογόνου, ισχμική νέκρωση εντέρου
Σύστημα αναπαραγωγής	Συμμετοχή στην κινητοποίηση του σπέρματος και στην ωορηξία
Εγκεφαλική λειτουργία	Συμμετέχει στο LTP και θεωρείται ανάδρομος μεσολαβητής
Ανοσολογικό σύστημα	Συμμετέχει στην ανοσολογική κυτταρική απόκριση

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

5. ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της εργασίας αυτής είναι να διερευνηθεί η επίδραση της αλλαγής της θερμοκρασίας στο μέγεθος των αερίων φυσαλίδων που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της βρασμού. Η μελέτη αυτή είναι σημαντική για την κατανόηση των μηχανισμών της αερίωσης και της μεταφοράς μάζας σε συστήματα που περιλαμβάνουν αέριο-υγρό μίγματα. Η εργασία θα πραγματοποιηθεί με τη βοήθεια ενός πειραματικού συστήματος που περιλαμβάνει έναν δοχείο με υγρό, έναν θερμαντήρα και έναν αισθητήρα πίεσης. Τα αποτελέσματα της μελέτης θα παρουσιαστούν με τη μορφή γραφημάτων και θα συζητηθούν σε σχέση με τα θεωρητικά μοντέλα που υπάρχουν στην βιβλιογραφία.

5. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της εργασίας αυτής ήταν να βρεθεί κατά πόσο η ακετυλίωση των φαινολικών ενώσεων επηρεάζει την βιολογική τους δραστικότητα, και πιο συγκεκριμένα την ικανότητά τους να προκαλούν συσσώρευση αιμοπεταλίων ή αναστολή συσσώρευσης που επάγεται από τον PAF. Απώτερος σκοπός ήταν η συσχέτιση της δομής των ακετυλιωμένων φαινολικών ενώσεων με την βιολογική τους δραστικότητα. Για τον σκοπό αυτό επιλέχθηκαν να μελετηθούν τα ακετυλιωμένα παράγωγα τριών βασικών φαινολικών ενώσεων της Μεσογειακής Δίαιτας, της τυροσόλης, της ρεσβερατρόλης και της κερκετίνης.

6. ΜΕΘΟΔΟΙ

6.1 Ακετυλίωση λιποειδών¹⁰²

Όργανα

- Θερμοστατούμενο Υδρόλουτρο

Αντιδραστήρια

- Οργανικοί διαλύτες (χλωροφόρμιο, μεθανόλη, οξικός ανυδρίτης) αναλυτικής καθαρότητας.

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος αυτή ακετυλιώνει τα ελεύθερα υδροξύλια των φαινολικών ενώσεων με κατεργασία του δείγματος με οξικό ανυδρίτη σε άνυδρο περιβάλλον.

Αναλυτική πορεία

Από το δείγμα εξατμίζεται ο διαλύτης σε ρεύμα αζώτου και στο βιδωτό σωληνάκι όπου βρίσκεται τοποθετείται 1 ml οξικού ανυδρίτη. Μετά από παραμονή του σωλήνα σε υδατόλουτρο 65° C για 45 λεπτά, ο οξικός ανυδρίτης εξατμίζεται σε ρεύμα αζώτου και το προϊόν της αντίδρασης αναδιαλύεται σε αιθανόλη.

6.2 Ήπια αλκαλική υδρόλυση ακετυλιωμένων φαινολικών ενώσεων¹⁰³

Όργανα

- Θερμοστατούμενο Υδρόλουτρο

Αντιδραστήρια

- Οργανικοί διαλύτες (χλωροφόρμιο, μεθανόλη, οξικό οξύ) αναλυτικής καθαρότητας
- Μεθανολικό διάλυμα καυστικού νατρίου 1,2 N σε μεθανόλη : νερό 1:1 (v/v)

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος αυτή διασπά μόνο τους εστερικούς δεσμούς της ανθρακικής αλυσίδας.

Αναλυτική πορεία

Ποσότητα δείγματος ακετυλιωμένων φαινολικών ενώσεων που περιέχει 1-10 μmol εστέρων φέρεται σε βιδωτό σωλήνα και εξατμίζεται ο διαλύτης σε ρεύμα αζώτου. Το δείγμα αναδιαλύεται σε 1 ml μίγματος χλωροφορμίου:μεθανόλης 1:4 (v/v) και στην συνέχεια προστίθενται 0,1 ml μεθανολικού διαλύματος καυστικού νατρίου. Το δείγμα παραμένει σε υδρόλουτρο 60 °C για 20 min και μετά από ψύξη εξουδετερώνεται το μίγμα αντίδρασης με 0,2 ml οξικό οξύ¹¹⁵. Στη συνέχεια το προϊόν της υδρόλυσης εξατμίζεται μέχρι ξηρού και αναδιαλύεται σε αιθανόλη.

6.3 Προσδιορισμός φαινολικών¹⁰⁴

Όργανα

- Φωτόμετρο Pharmacia Biotech/Novaspec II

Αντιδραστήρια

- Πρότυπο διάλυμα Folin-Ciocalteu(Merck)
- Πρότυπα διαλύματα: τυροσόλης (1 mg/ml), ρεσβερατρόλης (1 mg/ml), κερκετίνης (1 mg/ml).
- Διάλυμα Na_2CO_3 35% (w.v)

Αρχή Μεθόδου

Παρουσία του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu, οι φαινόλες οξειδώνονται προς τις αντίστοιχες κινόνες και τα προαναφερθέντα οξέα, ανάγονται μερικώς από την κατάσταση σθένους +6, σε ένα μείγμα ενώσεων με σθένη +6 και +5, που έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή συμπλόκου μπλέ χρώματος το οποίο και φωτομετρείται στα 725 nm.

Αναλυτική πορεία

Το προς εξέταση δείγμα εξατμίζεται μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου. Στην συνέχεια προστίθενται διαδοχικά 3,5 ml νερό, 0,1ml Folin-Ciocalteu και αναδεύουμε

ισχυρά. Μετά από παραμονή 3 λεπτών προστίθενται 0,4 ml Na_2CO_3 35% και το όλο μίγμα αφού αναδευτεί εντόνως, αφήνεται προς αντίδραση για μια ώρα και φωτομετρείται στα 725 nm. Παράλληλα γίνεται τυφλός προσδιορισμός καθώς και προσδιορισμός σε πρότυπα διαλύματα φαινολικών ενώσεων που περιέχουν από 1 έως 60 μg οπότε και κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη αναφοράς, βάση της οποίας προσδιορίζεται η συγκέντρωση σε φαινολικά του αγνώστου δείγματος.

6.4 Προσδιορισμός εστέρων¹⁰⁵

Όργανα

- Φωτόμετρο Pharmacia Biotech/Novaspec II
- Θερμοστατούμενο υδρόλουτρο

Αντιδραστήρια

- Διάλυμα υπερχλωρικού σιδήρου: Διαλύονται 5 g $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ σε 10 ml HClO_4 70% (v/v). Προστίθενται 10 ml H_2O και γίνεται αραίωση του δείγματος στα 100 ml με ψυχρή απόλυτη αιθανόλη. Το διάλυμα που προκύπτει είναι σταθερό στους 4°C για αρκετούς μήνες.
- Αντιδραστήριο υπερχλωρικού σιδήρου: Αναμιγνύονται 4 ml του stock διαλύματος $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ με 3 ml HClO_4 70% (v/v) και το όλο αραιώνεται στα 100 ml με απόλυτη αιθανόλη. Χρησιμοποιείται φρέσκο.
- Αλκοολικό διάλυμα καυστικού νατρίου 8% (w/v). Διαλύονται 4 g NaOH σε 5 ml νερό και το διάλυμα αραιώνεται στα 50 ml με απόλυτη αιθανόλη. Διατηρείται στους 4°C .
- Αλκοολικό διάλυμα υδροχλωρικής υδροξυλαμίνης 4% (w/v). Διαλύονται 2 g $\text{HONH}_2 \cdot \text{HCl}$ σε 2,5 ml νερό και το διάλυμα αραιώνεται στα 50 ml με απόλυτη αιθανόλη. Διατηρείται στους 4°C .
- Αλκαλικό διάλυμα υδροξυλαμίνης: Ίσοι όγκοι των ανωτέρω δύο αλκοολικών διαλυμάτων (υδροχλωρικής υδροξυλαμίνης 4% (w/v) και καυστικού νατρίου 8%(w/v)) αναμιγνύονται και το στερεό που σχηματίζεται απομακρύνεται με φυγοκέντρηση. Παραλαμβάνεται το υπερκείμενο διάλυμα που χρησιμοποιείται αμέσως.(Διατηρείται για 4 ώρες).
- Πρότυπο διάλυμα εστέρων: $1\mu\text{mol}/200\mu\text{l}$ στεαρύλο μονογλυκεριδίου

Αρχή μεθόδου

Το δείγμα των φαινολικών απακυλιώνεται με αιθανολικό διάλυμα αλκαλικής υδροξυλαμίνης και το υδροξαμικό οξύ που σχηματίζεται αντιδρά με αιθανολικό διάλυμα υπερχλωρικού σιδήρου υπερχλωρικού οξέος. Το χρώμα που προκύπτει φωτομετρείται στα 530 nm. Συγχρόνως εκτελείται τυφλός προσδιορισμός καθώς και προσδιορισμός σε πρότυπα διαλύματα εστέρων.

Αναλυτική πορεία

Το δείγμα των φαινολικών, περιεκτικότητας σε εστέρες 0,15-1 μmol , φέρεται σε σωλήνα pyrex και απομακρύνεται ο διαλύτης σε ρεύμα N_2 .

Στο ξηρό δείγμα προστίθεται 1 ml αλκαλικού διαλύματος υδροξυλαμίνης και θερμαίνεται σε υδρόλουτρο 65°C επί 5 λεπτά.

Αφήνεται να ψυχθεί για 5 λεπτά και προστίθεται 3 ml αντιδραστήριο υπερχλωρικού σιδήρου. Μετά την ανάμιξη αφήνεται 30 λεπτά για να αναπτυχθεί το χρώμα, το οποίο και φωτομετρείται στα 530 nm.

Παράλληλα γίνεται τυφλός προσδιορισμός καθώς και προσδιορισμός σε πρότυπα διαλύματα εστέρων περιεκτικότητας 0,25, 0,50, 1,0 μmol εστέρων οπότε και κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη αναφοράς, βάση της οποίας προσδιορίζεται η συγκέντρωση εστέρων του αγνώστου δείγματος.

6.5 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) φαινολικών ενώσεων.

Όργανα

- Υγρός χρωματογράφος Hewlett-packard series 1100, με 100 μl βρόγχο τοποθέτησης δείγματος
- Καταγραφέας-ολοκληρωτής: Hewlett-packard, HP-3396A
- Μικροσύριγγα ακρίβειας 50 μl
- Στήλη ανάστροφης φάσης: Nucleosil-300, C18 7 μ , 250x4 mm i.d., Analysentechnik
- Στήλη ανάστροφης φάσης: Zorbax Eclipse XDB-C8, 4.6 mm IDX 15 cm, 5 μ , Agilent Technologies

Αντιδραστήρια

- Οργανικοί διαλύτες χρωματογραφικής καθαρότητας (ακετονιτρίλιο, μεθανόλη)
- Νερό χρωματογραφικής καθαρότητας
- Πρότυπες φαινολικές ενώσεις: τυροσόλη, ρεσβερατρόλη, κερκετίνη (Sigma)

Αναλυτική πορεία

Η στήλη, πριν χρησιμοποιηθεί, καθαρίζεται με κατάλληλους διαλύτες ανάλογα με το υλικό πλήρωσής της, ακολουθεί η σταθεροποίηση της με τον πρώτο διαλύτη έκλουσης και στην συνέχεια η τοποθέτηση του δείγματος. Η έκλουση του δείγματος γίνεται, είτε με σταθερή, είτε με μεταβαλλόμενη σύσταση διαλυτών. Η έκλουση των διαχωρισμένων ουσιών ελεγχόταν με την μεταβολή της οπτικής απορρόφησης στα 256 nm και η παραλαβή τους γινόταν σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Σε περίπτωση μη μεταβολής της οπτικής απορρόφησης, λαμβανόταν κλάσματα κατά τακτά χρονικά διαστήματα.

6.6 Βιολογική δοκιμασία συσσώρευσης σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού¹⁰⁶

Όργανα

- Aggregometer (CHRONO-LOG)
- ΡΗμετρο (CHEMTRIX Type 60A)
- Φωτόμετρο Pharmacia Biotech/Novaspec II
- Υδρόλουτρο 37 °C
- Φυγόκεντρος Sorval

Αντιδραστήρια

- Διάλυμα 10xTyrodes stock: Σε 1 lt περιέχονται 80 g NaCl, 1,95g KCl, 2,13g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 10g γλυκόζη
- Διάλυμα 100x $CaCl_2$ stock: Ποσότητα 1,911 g $CaCl_2$ σε 100 ml H_2O .
- Διάλυμα 0,2 M EGTA stock: Ποσότητα 0,76 g EGTA / 10 ml H_2O . Ρυθμίζεται το pH του διαλύματος στα 7,5 με 5 M NaOH.

- Διάλυμα ζελατίνης 10% σε νερό.
- Ρυθμιστικά διαλύματα για ρύθμιση του pHμετρου.
- Διαλύματα Tyrodes-Gelatin pH 6,5 (Tg Ph6,5), Tyrodes-Gelatin-EGTA pH 6,5 (Tg pH6,5): Σε 80 ml νερό προστίθενται 10 ml Tyrodesxstock. Χρησιμοποιώντας μαγνητικό αναδευτήρα κατά την διάρκεια της προσθήκης, προστίθενται 2,5 ml ζελατίνης 10% (λιώμενης στο σημείο βρασμού). Κατόπιν προστίθενται 5 ml διαλύματος NaHCO_3 (0,203g NaHCO_3 σε 10 ml H_2O) που πρέπει να χρησιμοποιείται αμέσως μετά την προσθήκη του H_2O στο NaHCO_3 . Συμπληρώνεται ο όγκος στα 100 ml με νερό και χωρίζεται σε δύο τμήματα των 50 ml. Στο ένα προστίθενται 25 μl 0.2 M EGTA. Ρυθμίζεται το Ph και των δύο κλασμάτων στο 6,46 με 1 N HCl. Αμέσως γεμίζονται σωλήνες των 16 ml μέχρι επάνω (χωρίς φυσαλίδες αέρα) και σκεπάζονται με parafilm. Φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου
- Διάλυμα Tyrodes και ασβεστίου pH (Tg- Ca pH 7,2): Σε 5 10xTyrodes stock προστίθενται 40 ml νερό. Χρησιμοποιώντας μαγνητικό αναδευτήρα προστίθενται 1,25 ml 10% ζελατίνη. Στη συνέχεια προστίθενται 0,5 ml 100xCaCl₂ stock. Κατόπιν προστίθενται 2,5 ml διαλύματος NaHCO_3 (παρασκευάζεται όπως παραπάνω). Συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τα 50 ml με νερό και ρυθμίζεται το pH στο 7,16 με 1 N HCl. Διατηρείται στους 37 °C σε ερμητικά κλειστούς σωλήνες.
- Αντιδραστήριο ACD: Σε 1000 ml H_2O περιέχονται 13,65 g κιτρικού οξέος, 25 g κιτρικού νατρίου και 20 g δεξτρόζης.
- Αλβουμίνη βοδινού ορού (BSA) stock: Ποσότητα 100 mg BSA ελεύθερης λιπαρών οξέων (Sigma) / ml φυσιολογικού ορού. Φυλάσσεται στους 20 °C.
- Διάλυμα BSA 2,5 mg / ml φυσιολογικού ορού: Από 10 ml φυσιολογικού ορού αφαιρούνται 250 μl και προστίθενται 250 μl BSA stock.
- Διάλυμα θρομβίνης σε φυσιολογικό ορό.
- Ficoll-Paque (Pharmacia).
- Υλικό σιλικοναρίσματος (Serva).
- BN 52021: Διαλυτοποιείται σε 0,3% DMSO, συγκέντρωση 0,1 mM

Αναλυτική πορεία

1. Απομόνωση πλυμένων αιμοπεταλίων από αίμα κουνελιού

Σε πλαστικούς σωλήνες των 50 ml ίθενται 7 ml ACD. Το αίμα συλλέγεται από την κεντρική αρτηρία του αυτιού του κουνελιού και ο σωλήνας γεμίζεται με αίμα μέχρι τα 50 ml. Αναμιγνύεται ήπια με αναστροφή. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15 min στους 24°C στα 500 g (1850 rpm). Κατά την διάρκεια της φυγοκέντρησης μεταφέρουμε 2 ml Ficoll-Paque σε πλαστικούς σωλήνες των 14 ml. Αναρροφώντας τα 2/3 του υπερκείμενου πλάσματος (πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια, PRP) με πλαστικό σιφώνιο των 20 ml και μεταφέρονται σε άλλο πλαστικό σωλήνα των 50 ml. Τοποθετείται το πλάσμα πάνω στο στρώμα του Ficoll, με μέγιστο ποσό πλάσματος τα 9 ml για κάθε 2 ml Ficoll, χρησιμοποιώντας πλαστικά σιφόνια και μεταφέροντας ίσους όγκους πλάσματος σε 2 ή 3 σωλήνες ανάλογα με το συνολικό όγκο του πλάσματος. Σκεπάζουμε με parafilm. Οι σωλήνες φυγοκεντρώνονται για 20 min στους 24°C στα 750 g (2200 rpm), οπότε τα αιμοπετάλια εμφανίζονται σαν ταινία μεταξύ της στοιβάδας του πλάσματος και του στρώματος του Ficoll. Το υπερκείμενο πλάσμα (φτωχό σε αιμοπετάλια) αναρροφάται και απορρίπτεται με πλαστική σύριγγα των 20 ml. Το στρώμα των αιμοπεταλίων διαπερνάται με σιλικοναρισμένη πιπέτα Pasteur. Αναρροφάτε το Ficoll και απορρίπτεται.

A) Αν υπάρχουν 2 σωλήνες:

Προστίθενται 7 ml (Tg EGTA pH 6.5) σε κάθε σωλήνα. Το διάλυμα αφήνεται να τρέξει ήπια στα τοιχώματα του σωλήνα και χωρίς ανάμιξη αποχύνεται το αιώρημα σε άλλο πλαστικό σωλήνα των 14 ml, αφήνοντας έτσι τα ερυθρά αιμοσφαίρια στον αρχικό σωλήνα.

B) Αν υπάρχουν 3 σωλήνες:

Προστίθενται 3 ml (Tg EGTA pH 6.5) σε κάθε σωλήνα. Το διάλυμα αφήνεται να τρέξει ήπια στα τοιχώματα του σωλήνα και χωρίς ανάμιξη αποχύνεται το αιώρημα σε άλλο πλαστικό σωλήνα των 14 ml του οποίου το περιεχόμενο χωρίζεται σε 2 ίσα μέρη που μεταφέρονται σε δύο ξεχωριστούς σωλήνες και προστίθενται περίπου 3 ml (Tg EGTA pH 6.5).

Το περιεχόμενο του κάθε σωλήνα μεταφέρεται σε 2 ml Ficoll (8 ml αιμοπεταλίων σε κάθε σωλήνα) και καλύπτεται με parafilm. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15 min στους 24°C στα 2500 rpm.

Το υπερκείμενο ρυθμιστικό διάλυμα απορροφάται και απορρίπτεται. Διαπερνάται το στρώμα των αιμοπεταλίων με πιπέτα Pasteur, αναρροφάται το Ficoll και απορρίπτεται.

Προστίθενται ίσοι όγκοι (8 ml) Tg pH 6,5 σε κάθε σωλήνα αφήνοντας το διάλυμα να τρέξει στα τοιχώματα του σωλήνα και χωρίς ανάμιξη μεταφέρεται το αιώρημα σε καθαρό πλαστικό σωλήνα των 14 ml, ενώ καλύπτεται με parafilm. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15 min στους 24°C στα 2350 rpm.

Το υπερκείμενο ρυθμιστικό διάλυμα απορροφάται και απορρίπτεται με πιπέτα Pasteur αφαιρώντας και την τελευταία σταγόνα από τα τοιχώματα του δοχείου.

Προστίθενται με αυτόματη πιέτα 0,8 ml Tg pH 6,5 σε κάθε συσσωμάτωμα αιμοπεταλίων αναδιασπείροντας τα κύτταρα με προσοχή. Το περιεχόμενο των σωλήνων ενώνεται σε ένα πλαστικό σωλήνα.

Ετοιμάζεται αιώρημα αιμοπεταλίων σε Tg pH 6,5 που να περιέχει $1,25 \times 10^8$ κύτταρα / ml: Από το πυκνό διάλυμα αιμοπεταλίων παίρνω 10λ και 990λ Tg pH 6,5 και φωτομετρώ στα 530nm. Ο αριθμός των κυττάρων στα 10λ δίνεται : αριθμός κυττάρων/ 10λ = $A \times 1,25 \times 10^8$, όπου A η απορρόφηση. Με βάση πρότυπη καμπύλη της οπτικής απορρόφησης συναρτήσει του αριθμού αιμοπεταλίων υπολογίζεται ο αριθμός αιμοπεταλίων και ετοιμάζεται το επιθυμητό εναιώρημα¹⁰⁷

2. Συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού

Σε ειδικές πλαστικές κυψελίδες προστίθενται 100μL από το εναιώρημα αιμοπεταλίων και 400Ml Tg Ca pH 7,2 καθώς και μικρός μαγνητικός αναδευτήρας. Επωάζονται για 15 min σε υδρόλουτρο 37°C . Ρυθμίζεται το 100 της κλίμακας του aggregometer με Tg Ca pH 7,2 και το 0 με το εναιώρημα αιμοπεταλίων σε Tg Ca pH 7,2. Στη συνέχεια τοποθετείται η κυψελίδα με το εναιώρημα αιμοπεταλίων στην ειδική θερμοστατούμενη κυψελίδα του aggregometer και προστίθενται διάφορες συγκεντρώσεις PAF διαλυτοποιημένη σε BSA 2,5 mg/ml και καταγράφεται η καμπύλη της συσσώρευσης. Σαν 100% συσσώρευση ορίζεται εκείνη η συγκέντρωση PAF που προκαλεί την μέγιστη αντιστρεπτή συσσώρευση αιμοπεταλίων ενώ η τιμή EC_{50} αντιστοιχεί σε εκείνη την συγκέντρωση PAF που προκαλεί 50% συσσώρευση στα αιμοπετάλια. Η ίδια διαδικασία ακολουθείται και για την θρομβίνη.

3. Πειράματα απευαισθητοποίησης σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού

Με κάποια συγκέντρωση PAF ή θρομβίνης προκαλείται αντιστρεπτή συσσώρευση αιμοπεταλίων και όταν τα αιμοπετάλια επανέλθουν στην αρχική τους κατάσταση προστίθεται στην κυψελίδα η ίδια συγκέντρωση PAF ή θρομβίνης αντίστοιχα. Παρατηρείται ότι η δεύτερη προσθήκη του συσσωρευτικού παράγοντα προκαλεί μικρότερη συσσώρευση από την αρχική, λόγω απευαισθητοποίησης των

αιμοπεταλίων. Στα πειράματα διασταυρούμενης απευαισθητοποίησης το ίδιο πείραμα επαναλαμβάνεται με προσθήκη δύο διαφορετικών συσσωρευτικών παραγόντων.

4. Πειράματα ελέγχου του δρόμου, μέσω του οποίου προκαλείται η συσσώρευση, με χρήση ειδικών αναστολέων σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού.

Στη σειρά αυτών των πειραμάτων πριν από την προσθήκη του συσσωρευτικού παράγοντα προστίθεται ξεχωριστά ένας από τους παρακάτω αναστολείς: α) Ινδομεθακίνη (10λ ινδομεθακίνης διαλυμένη σε αιθανόλη προστίθενται σε 90λ νερού), η οποία αναστέλλει τη συσσώρευση αιμοπεταλίων που προκαλείται από τον δρόμο του αραχιδονικού οξέος, β) ενζυμικό σύστημα φωσφοκρεατίνης (CP) (0,795mg διαλύονται σε 100 λ φυσιολογικού ορού) και κινάσης της φωσφοκρεατίνης (CPK) (2,0 mg διαλύονται σε 420λ φυσιολογικού ορού), το οποίο αναστέλλει τη συσσώρευση αιμοπεταλίων που προκαλείται από το δρόμο του ADP και γ) BN 52021, το οποίο αναστέλλει την συσσώρευση αιμοπεταλίων που προκαλείται από τον δρόμο του PAF.

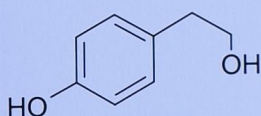
5. Πειράματα αναστολής της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού

στη σειρά αυτών των πειραμάτων πριν από τη προσθήκη του συσσωρευτικού παράγοντα προστίθενται διάφορες ποσότητες του εξεταζόμενου (για αναστολή) δείγματος, ακολουθεί επώαση για 1 min και στην συνέχεια προστίθεται PAF ή θρομβίνη για κάθε συγκέντρωση δείγματος, σχεδιάζεται η καμπύλη της επί της εκατό αναστολής, συναρτήσει της συγκέντρωσης και σαν τιμή IC_{50} ορίζεται εκείνη η συγκέντρωση του δείγματος που προκαλεί 50% αναστολή της συσσώρευσης.

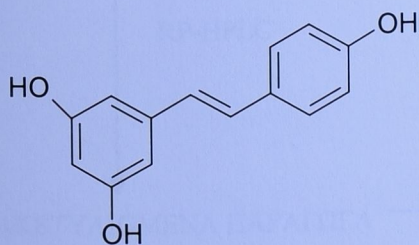
7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

7.1 Πειραματική πορεία

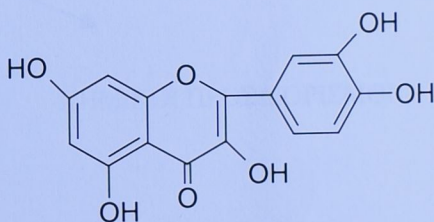
Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, για την πραγματοποίηση της συγκεκριμένης εργασίας επιλέχθηκαν τρεις χαρακτηριστικές ενώσεις της Μεσογειακής Δίαιτας. Η τυροσόλη, με δύο υδροξύλια, αποτελεί την κύρια φαινολική ένωση του ελαιολάδου, η ρεσβερατρόλη με τρία υδροξύλια που αποτελεί την κύρια φαινολική ένωση του κρασιού, και η κερκετίνη με πέντε υδροξύλια, που υπάρχει κυρίως στα φρούτα και στα λαχανικά. Η δομή των ενώσεων αυτών φαίνεται στο σχήμα



Τυροσόλη



Ρεσβερατρόλη



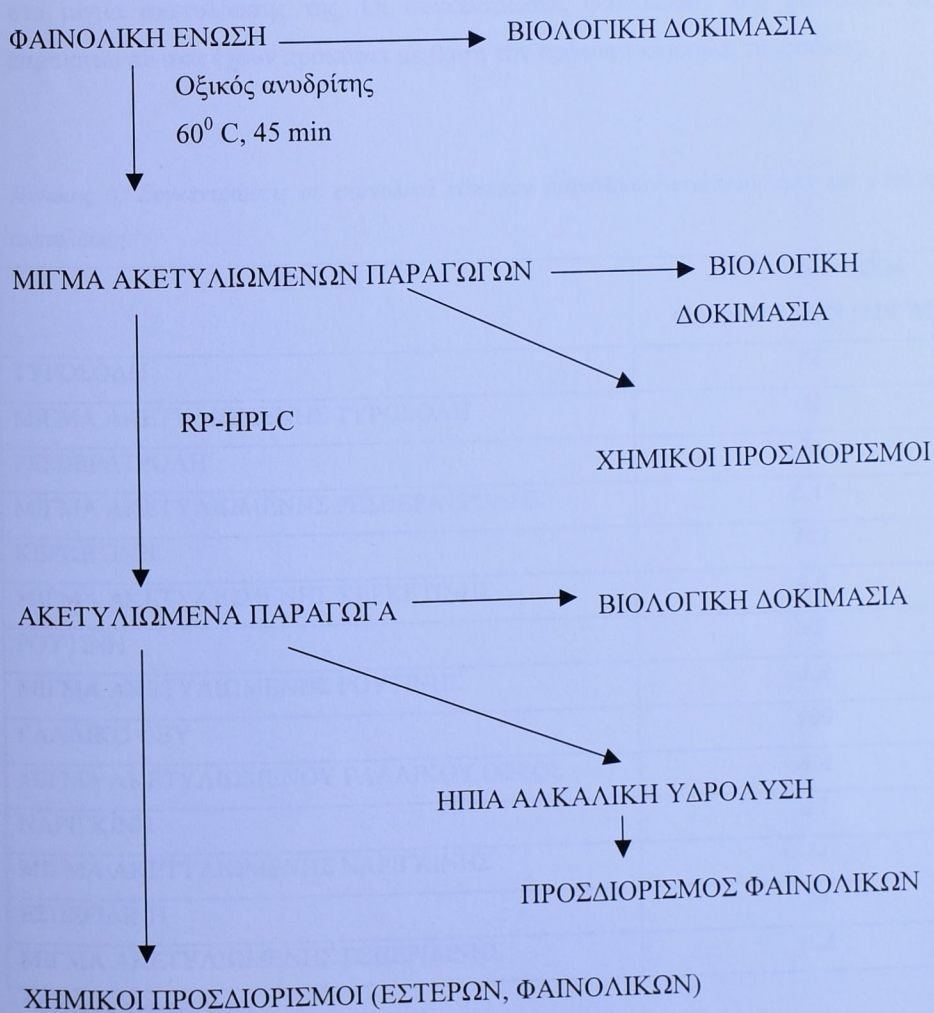
Κερκετίνη

Σχήμα 9.: Δομές Ρεσβερατρόλης, κερκετίνης, τυροσόλης

Αναλυτικότερα, μελετήθηκε η ικανότητα της αρχικής φαινολικής ένωσης να προκαλεί συσσώρευση ή αναστολή συσσώρευσης (επαγόμενης από PAF) πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού (βιολογική δοκιμασία). Στην συνέχεια η φαινολική ένωση ακετυλιώθηκε στις βέλτιστες συνθήκες (45 λεπτά στους 60⁰ C) όπως αυτές είχαν προσδιορισθεί από προηγούμενες μελέτες¹⁰². Ένα μέρος του ακετυλιωμένου μίγματος

μελετήθηκε ως προς την βιολογική του δραστικότητα, ενώ το υπόλοιπο διαχωρίστηκε με στήλη HPLC ανάστροφης φάσης C18 ή C8. Στα επί μέρους ακετυλιωμένα παράγωγα έγιναν χημικοί προσδιορισμοί (προσδιορισμός εστέρων και φαινολικών) τόσο πριν όσο και μετά από ήπια αλκαλική υδρόλυση. Τέλος, έγινε μελέτη της βιολογικής τους δραστικότητας, δηλαδή της ικανότητας τους να προκαλούν συσσώρευση ή να αναστέλλουν την συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού.

Η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε στο εργαστήριο φαίνεται στο παρακάτω σχήμα 10



Σχήμα 10: Διαγραμματικά η πορεία της μελέτης αυτής.

7.2 Προκαταρκτικά πειράματα σε μίγματα ακετυλιωμένων φαινολικών ενώσεων

Αρχικά, έγιναν κάποια προκαταρκτικά πειράματα με σκοπό να εκτιμηθεί η δυνατότητα της μεθόδου Folin-Ciocalteu να προσδιορίζει την ποσότητα των φαινολικών ενώσεων και στα μη ακετυλιωμένα παράγωγα.

Για τον σκοπό αυτό ποσότητα 30μg πρότυπων διαλυμάτων (1mg/ml) τυροσόλης, ρεσβερατρόλης, κερκετίνης, ρουτίνης, ναριγκίνης, εσπεριδίνης και γαλλικού οξέος ακετυλιώθηκε και έγινε προσδιορισμός φαινολικών τόσο στην αρχική ένωση όσο και στο μίγμα ακετυλίωσης της. Οι συγκεντρώσεις φαινολικών που φαίνονται στον παρακάτω πίνακα έχουν προκύψει με βάση την πρότυπη καμπύλη τυροσόλης.

Πίνακας 6: Συγκεντρώσεις σε φαινολικά κάποιων φαινολικών ενώσεων πριν και μετά από ακετυλίωση.

ΕΝΩΣΗ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ($\times 10^{-4} \text{M}$)
ΤΥΡΟΣΟΛΗ	72
ΜΙΓΜΑ ΑΚΕΤΥΛΙΩΜΕΝΗΣ ΤΥΡΟΣΟΛΗΣ	42
ΡΕΣΒΕΡΑΤΡΟΛΗ	76
ΜΙΓΜΑ ΑΚΕΤΥΛΙΩΜΕΝΗΣ ΡΕΣΒΕΡΑΤΡΟΛΗΣ	Δ.Α*
ΚΕΡΚΕΤΙΝΗ	102
ΜΙΓΜΑ ΑΚΕΤΥΛΙΩΜΕΝΗΣ ΚΕΡΚΕΤΙΝΗΣ	4,6
ΡΟΥΤΙΝΗ	45
ΜΙΓΜΑ ΑΚΕΤΥΛΙΩΜΕΝΗΣ ΡΟΥΤΙΝΗΣ	Δ.Α
ΓΑΛΛΙΚΟ ΟΞΥ	100
ΜΙΓΜΑ ΑΚΕΤΥΛΙΩΜΕΝΟΥ ΓΑΛΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ	Δ.Α
ΝΑΡΙΓΚΙΝΗ	27
ΜΙΓΜΑ ΑΚΕΤΥΛΙΩΜΕΝΗΣ ΝΑΡΙΓΚΙΝΗΣ	24
ΕΣΠΕΡΙΔΙΝΗ	14
ΜΙΓΜΑ ΑΚΕΤΥΛΙΩΜΕΝΗΣ ΕΣΠΕΡΙΔΙΝΗΣ	Δ.Α

*Δ.Α:δεν ανιχνευτηκε

Όπως φαίνεται και από τα αποτελέσματα του παραπάνω πίνακα, η ακετυλίωση είχε σαν αποτέλεσμα να μην μπορούν να προσδιορισθούν φαινολικά σε τέσσερα από τα εφτά ακετυλιωμένα μίγματα, ενώ και σταυπόλοιπα τρία, η συγκέντρωση των φαινολικών μειώθηκε σημαντικά. Η ακετυλίωση στην ουσία αντικαθιστά τα φαινολικά υδροξύλια με οξικές ομάδες, κάτι που φαίνεται πως εμποδίζει τον προσδιορισμό φαινολικών με βάση την μέθοδο Folin-Ciocalteu που ακολουθήσαμε, αφού ο προσδιορισμός αυτός βασίζεται ουσιαστικά στην οξείδωση των φαινολικών υδροξυλίων προς τις αντίστοιχες κινόνες.

Για να μπορέσουμε να ξεπεράσουμε το πρόβλημα αυτό με τον αναποτελεσματικό προσδιορισμό φαινολικών, επιχειρήθηκε ήπια αλκαλική υδρόλυση των ακετυλιωμένων παραγώγων με σκοπό να σπάσουν οι εστερικοί δεσμοί και να γίνει εφικτός ο προσδιορισμός φαινολικών. Ήπια αλκαλική υδρόλυση έγινε τόσο σε πρότυπη τυροσόλη όσο και στο μίγμα της ακετυλιωμένης τυροσόλης. Ακολούθησε προσδιορισμός φαινολικών στα δύο αυτά κλάσματα, αλλά και στα αντίστοιχα κλάσματα που δεν είχαν υποστεί αλκαλική υδρόλυση. Τα αποτελέσματα του προσδιορισμού φαινολικών φαίνονται στον παρακάτω πίνακα. Οι συγκεντρώσεις έχουν προκύψει με βάση την πρότυπη καμπύλη τυροσόλης.

Πίνακας 7: Προσδιορισμός φαινολικών στην πρότυπη τυροσόλη, στο μίγμα ακετυλιωμένων κλασμάτων της, αλλά και στα αντίστοιχα κλάσματα που είχαν υποστεί ήπια αλκαλική υδρόλυση.

Ένωση	Αρχική ποσότητα δείγματος	Συγκέντρωση φαινολικών πριν από ήπια αλκαλική υδρόλυση ($\times 10^{-4}$ M)	Συγκέντρωση φαινολικών μετά από ήπια αλκαλική υδρόλυση ($\times 10^{-4}$ M)
Τυροσόλη	30μg	77	66
Ακετυλιωμένη τυροσόλη	30μg	21	50

Τα αποτελέσματα του παραπάνω πίνακα δείχνουν ότι μετά από ήπια αλκαλική υδρόλυση και απελευθέρωση των ακετυλο-ομάδων από τα υδροξύλια του δακτυλίου, ο προσδιορισμός φαινολικών δείχνει παρόμοια αποτελέσματα με αυτά πριν την ακετυλίωση . Επίσης φαίνεται ότι η ήπια αλκαλική υδρόλυση δεν επηρεάζει τον φαινολικό δακτύλιο και την μέθοδο Folin-Ciocalteu, κάτι που προκύπτει από το

γεγονός ότι η συγκέντρωση φαινολικών στην πρότυπη τυροσόλη ήταν περίπου ίδια τόσο πριν ($7,7 \times 10^{-4}$ M) όσο και μετά ($6,6 \times 10^{-4}$ M) από ήπια αλκαλική υδρόλυση.

7.3 Μελέτη ακετυλιωμένων παραγώγων τυροσόλης

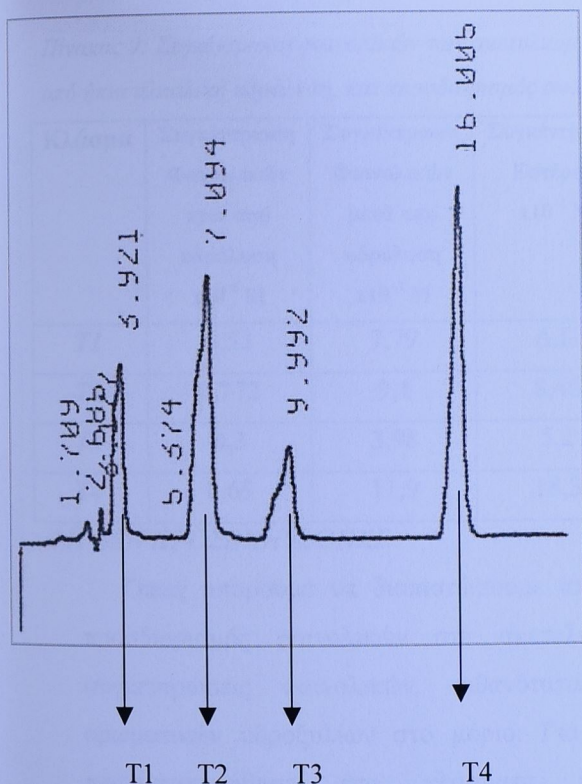
7.3.1 Χημικοί προσδιορισμοί

Αρχικά ζυγίσθηκαν 3000μg πρότυπης ένωσης τα οποία αναδιαλύθηκαν σε αιθανόλη, έτσι ώστε να σχηματισθεί πρότυπα διάλυμα τυροσόλης 1mg/ml. Ένα τμήμα της πρότυπης ένωσης κρατήθηκε για βιολογική δοκιμασία (ικανότητα συσσώρευσης ή αναστολής συσσώρευσης επαγόμενης από τον PAF). Στην συνέχεια το υπόλοιπο τμήμα ακετυλιώθηκε στις βέλτιστες συνθήκες (45 min στους 60 °C). Στο συνολικό μίγμα των ακετυλιωμένων πραγματοποιήθηκε βιολογική δοκιμασία και έγιναν χημικοί προσδιορισμοί (αναφέρονται στο κεφάλαιο 7.2). στην συνέχεια το μίγμα των ακετυλιωμένων παραγώγων διαχωρίστηκε στα επί μέρους ακετυλιωμένα κλάσματα με στήλη ανάστροφης φάσης HPLC. Δοκιμάστηκαν αρκετά συστήματα έκλουσης, ώστε να βρεθούν οι καταλληλότερες συνθήκες διαχωρισμού. Καταλήξαμε σε σύστημα έκλουσης με ροή 1 ml/ λεπτό στα 256 nm. Η σύσταση και ο χρόνος των διαλυτών έκλουσης φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 8: Σύσταση και χρόνος διαλυτών έκλουσης για τον διαχωρισμό ακετυλιωμένων κλασμάτων τυροσόλης

ΧΡΟΝΟΣ (min)	ΑΝΑΛΟΓΙΑ ΜΕΘΑΝΟΛΗΣ:ΝΕΡΟΥ
0.00	60:40
7.00	60:40
10.00	50:50

Από τον διαχωρισμό προέκυψαν τέσσερα ακετυλιωμένα κλάσματα, τα οποία ονομάστηκαν αντίστοιχα T1, T2, T3, T4. Τα κλάσματα αυτά συλλέχθηκαν σε ξεχωριστά σωληνάκια, στα οποία εξατμίστηκε ο διαλύτης και στην συνέχεια αναδιαλύθηκαν σε αιθανόλη. Στα τέσσερα αυτά ακετυλιωμένα κλάσματα έγιναν χημικοί προσδιορισμοί, ήπια αλκαλική υδρόλυση και βιολογική δοκιμασία. Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα από το διαχωρισμό των ακετυλιωμένων παραγώγων της τυροσόλης φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 11: Χρωματογράφημα διαχωρισμού των ακετυλιωμένων κλασμάτων τυροσόλης από την στήλη HPLC.

Με σκοπό να πιστοποιήσουμε την δομή των επί μέρους κλάσματος πραγματοποιήσαμε προσδιορισμό φαινολικών με την μέθοδο Folin-Ciocalteus και προσδιορισμό εστέρων στο κάθε κλάσμα. Αντίστοιχα, οι προσδιορισμοί αυτοί έγιναν στα κλάσματα και μετά από ήπια αλκαλική υδρόλυση. Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται η συγκέντρωση φαινολικών και εστέρων, με βάση την οποία προσδιορίστηκε η αναλογία εστέρων/ φαινολικά.

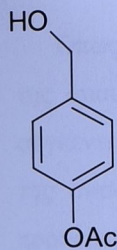
Πίνακας 9: Συγκέντρωση φαινολικών των ακετυλιωμένων κλασμάτων τυροσόλης πριν και μετά από ήπια αλκαλική υδρόλυση, και προσδιορισμός αναλογίας εστέρων/φαινολικά

Κλάσμα	Συγκέντρωση Φαινολικών πριν από υδρόλυση $\times 10^{-4}$ M	Συγκέντρωση Φαινολικών μετά από υδρόλυση $\times 10^{-4}$ M	Συγκέντρωση Εστέρων $\times 10^{-4}$ M	Εστέρες/φαινολικά πριν από υδρόλυση	Εστέρες/φαινολικά μετά από υδρόλυση
T1	6,53	7,79	Δ.Π	-	-
T2	0,772	9,1	8,46	10/1	1/1
T3	4,3	3,98	5,2	1/1	1/1
T4	0,69	11,9	18,3	26/1	2/1

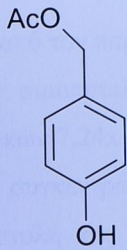
Δ.Π.: ΔΕΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΘΗΚΕ

Όπως μπορούμε να διαπιστώσουμε από τον παραπάνω πίνακα ο αρχικός προσδιορισμός φαινολικών στα ακετυλιωμένα παράγωγα έδειξε χαμηλές συγκεντρώσεις φαινολικών, πιθανότατα λόγω μη ύπαρξης ελευθέρων αρωματικών υδροξυλίων στο μόριο. Για να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα πραγματοποιήθηκε στα κλάσματα ήπια αλκαλική υδρόλυση και επαναπραγματοποιήθηκε προσδιορισμός φαινολικών. Με βάση τα αποτελέσματα του προσδιορισμού φαινολικών, μπορούμε να πούμε ότι τι κλάσμα T2 είναι πιθανόν το μονοακετυλιωμένο κλάσμα της τυροσόλης, με την ακετυλίωση να έχει γίνει στο υδροξύλιο του φαινολικού δακτυλίου, αφού μόνο η ακετυλίωση στο φαινολικό υδροξύλιο επηρεάζει τον προσδιορισμό φαινολικών. Πιο συγκεκριμένα, η συγκέντρωση φαινολικών αυξήθηκε σε σημαντικό βαθμό από $7,72 \cdot 10^{-5}$ πριν την ήπια αλκαλική υδρόλυση σε $9,1 \cdot 10^{-4}$ μετά. Αντίθετα, το κλάσμα T3 είναι και αυτό μονοακετυλιωμένο ισομερές, όμως εδώ η ακετυλίωση έχει γίνει στο υδροξύλιο της ανθρακικής αλυσίδας, γεγονός που δεν επηρεάζει την συγκέντρωση φαινολικών, όπως φαίνεται και από τον πίνακα. Τέλος, το κλάσμα T4 είναι πιθανόν το διακετυλιωμένο κλάσμα, συμπέρασμα που προκύπτει από την αναλογία εστέρων / φαινολικά.

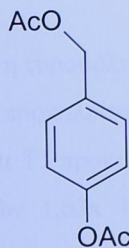
Με βάση τα παραπάνω, μπορούμε να υποθέσουμε τις δομές των κλασμάτων T2, T3, T4. Οι πιθανές δομές των κλασμάτων αυτών φαίνονται στα παρακάτω σχήματα.



Κλάσμα T2



Κλάσμα T3



Κλάσμα T4

Σχήμα 12: Πιθανή δομή κλάσματος T2, T3, T4

7.3.2 Βιολογική δοκιμασία

Τόσο στην πρότυπη τυροσόλη, στο μίγμα των ακετυλιωμένων παραγώγων, όσο και επιμέρους διαχωρισμένα κλάσματα, έγινε βιολογική δοκιμασία, δηλαδή εξετάστηκε η ικανότητα τους να προκαλούν συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού ή αντίστοιχα αναστολή συσσώρευσης αιμοπεταλίων, επαγόμενης από τον PAF. Η ικανότητα αναστολής, σε όσα κλάσματα υπήρχε, εκφράστηκε ως προς την συγκέντρωση φαινολικών που απαιτείται για να ανασταλεί το 50% της συσσώρευσης που επάγεται από τον PAF (IC₅₀). Αντίστοιχα, για το κλάσμα T3 στο οποίο παρατηρήσαμε συσσώρευση, μελετήθηκε εάν απευαισθητοποιείται από τον PAF ή εάν αναστέλλεται η δράση του από το BN 52021, που είναι ισχυρός αναστολέας του PAF. Τα αποτελέσματα φαίνονται στους παρακάτω πίνακες.

Πίνακας 10: Αποτελέσματα του βιολογικού πειράματος για την ικανότητα αναστολής των διαφόρων ακετυλιωμένων κλασμάτων τυροσόλης

Κλάσμα	Ποσότητα κλάσματος (μL)	Συγκέντρωση σε BSA x10 ⁻³ M	Είδος δράσης	Ποσότητα για IC ₅₀ (μL)	IC ₅₀ Συγκέντρωση φαινολικών x 10 ⁻³ M
Τυροσόλη	200	7,24	Αναστολή	15	0,4
Ακετυλιωμένη τυροσόλη	100	4,20	Αναστολή	2	0,033
T1	250	1,63	Αναστολή	12	0,074
T2	250	1,93	Αναστολή	17	0,0122
T4	250	1,73	Αναστολή	16	0,01

Όπως φαίνεται και από τον παραπάνω πίνακα η τυροσόλη προκαλεί αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων (η οποία προκαλείται από τον PAF) σε συγκεντρώσεις φαινολικών $7,24 \times 10^{-3}$. Το κλάσμα T1 προκαλεί επίσης αναστολή της συσσώρευσης σε συγκεντρώσεις φαινολικών $1,63 \times 10^{-3}$. Το κλάσμα T2 προκαλεί επίσης αναστολή της συσσώρευσης σε συγκεντρώσεις φαινολικών $1,93 \times 10^{-3}$. Το συνολικό μίγμα των ακετυλιωμένων είναι και αυτό αναστολέας της συσσώρευσης αιμοπεταλίων σε συγκεντρώσεις φαινολικών $4,20 \times 10^{-3}$. Τέλος, και το κλάσμα T4 θεωρείται αναστολέας της συσσώρευσης αιμοπεταλίων σε συγκεντρώσεις φαινολικών $1,73 \times 10^{-3}$

Πίνακας 11: Αποτελέσματα του βιολογικού πειράματος για την συσσωρευτική ικανότητα του κλάσματος T3

Κλάσμα	Είδος δράσης	Συσσω- ρευτική ικανότητα $\times 10^{-4} \text{ M}$	Απευαισθητοποίηση σε PAF	Αναστολή απόBN 52021
T3	Συσσώρευση	$0,4 \times 10^{-4}$ $= \text{PAF} 2 \times 10^{-11}$	$10 \mu\text{l} \rightarrow \text{PAF}$ κατά 45%	NAI

Το κλάσμα T3, το οποίο προκάλεσε συσσώρευση σε ποσότητα κλάσματος συγκέντρωσης $0,4 \times 10^{-4}$, η οποία αντιστοιχεί με την αντίστοιχη συσσωρευτική ικανότητα μιας ποσότητας PAF (συγκέντρωσης 2×10^{-11}). Στην προτελευταία στήλη φαίνεται η ικανότητα του κλάσματος να απευαισθητοποιεί τον PAF. Όπως φαίνεται και στον πίνακα, $10 \mu\text{l}$ κλάσματος συγκέντρωσης φαινολικών $0,4 \times 10^{-4}$ απευαισθητοποιούν τον PAF κατά 45%. Επιπλέον, το κλάσμα αναστέλλεται από το BN 52021, συστατικό του φυτού Ginkgo Biloba, που θεωρείται ισχυρός αναστολέας του PAF. Με βάση τα παραπάνω, μπορούμε να πούμε πως το κλάσμα T3 μπορεί να προκαλεί συσσώρευση και μέσω του δρόμου του PAF.

7.4 Μελέτη ακετυλιωμένων κλασμάτων ρεσβερατρόλης

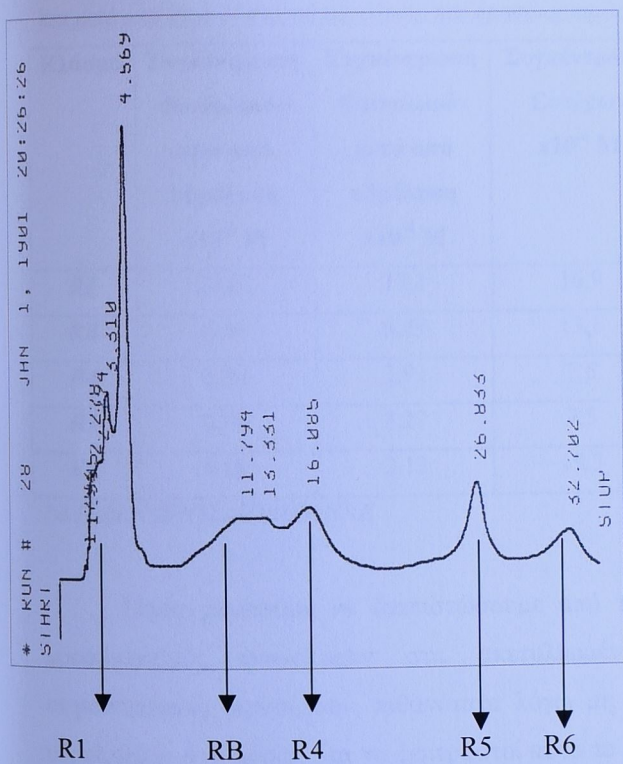
7.4.1 Χημικοί Προσδιορισμοί

Αρχικά ζυγίσθηκαν 1000μg πρότυπης ένωσης τα οποία αναδιαλύθηκαν σε αιθανόλη, έτσι ώστε να σχηματισθεί πρότυπα διάλυμα τυροσόλης 1mg/ml. Ένα τμήμα της πρότυπης ένωσης κρατήθηκε για βιολογική δοκιμασία (ικανότητα συσσώρευσης ή αναστολής συσσώρευσης επαγόμενης από τον PAF). Στην συνέχεια το υπόλοιπο τμήμα ακετυλιώθηκε στις βέλτιστες συνθήκες (45 min στους 60 °C). Το συνολικό μείγμα των ακετυλιωμένων δόθηκε για βιολογική δοκιμασία και έγιναν σε αυτό χημικοί προσδιορισμοί (αναφέρονται στο κεφάλαιο 7.2). στην συνέχεια το μίγμα των ακετυλιωμένων παραγώγων διαχωρίστηκε στα επί μέρους ακετυλιωμένα κλάσματα με στήλη ανάστροφης φάσης HPLC. Δοκιμάστηκαν αρκετά συστήματα έκλουσης, ώστε να βρεθούν οι καταλληλότερες συνθήκες διαχωρισμού. Καταλήξαμε σε σύστημα έκλουσης με ροή 1 ml/ λεπτό στα 256 nm. Η σύσταση και ο χρόνος των διαλυτών έκλουσης φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 12: Σύσταση και χρόνος διαλυτών έκλουσης για τον διαχωρισμό ακετυλιωμένων κλασμάτων ρεσβερατρόλης

ΧΡΟΝΟΣ (min)	ΑΝΑΛΟΓΙΑ ΜΕΘΑΝΟΛΗΣ:ΝΕΡΟΥ
0.00	45:55
08.00	45:55
18.00	30:70
25.00	45:55

Από τον διαχωρισμό προέκυψαν πέντε ακετυλιωμένα κλάσματα, τα οποία ονομάστηκαν αντίστοιχα R1, RB, R4, R5, R6. Τα κλάσματα αυτά συλλέχθηκαν σε ξεχωριστά σωληνάκια, στα οποία εξατμίστηκε ο διαλύτης και στην συνέχεια αναδιαλύθηκαν σε αιθανόλη. Στα πέντε αυτά ακετυλιωμένα κλάσματα έγιναν χημικοί προσδιορισμοί, ήπια αλκαλική υδρόλυση και βιολογική δοκιμασία. Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα από το διαχωρισμό των ακετυλιωμένων παραγώγων της τυροσόλης φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 13: Χρωματογράφημα διαχωρισμού των ακετυλιωμένων κλασμάτων ρεσβερατρόλης από την στήλη HPLC.

Με σκοπό να πιστοποιήσουμε την δομή των επί μέρους κλάσματος πραγματοποιήσαμε προσδιορισμό φαινολικών με την μέθοδο Folin-Ciocalteus και προσδιορισμός εστέρων στο κάθε κλάσμα. Αντίστοιχα, οι προσδιορισμοί αυτοί έγιναν στα κλάσματα και μετά από ήπια αλκαλική υδρόλυση. Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται η συγκέντρωση φαινολικών και εστέρων, με βάση την οποία προσδιορίστηκε η αναλογία εστέρων/ φαινολικά.

Πίνακας 13: Συγκέντρωση φαινολικών των ακετυλιωμένων κλασμάτων ρεσβερατρόλης πριν και μετά από ήπια αλκαλική υδρόλυση, και προσδιορισμός αναλογίας εστέρων/φαινολικά

Κλάσμα	Συγκέντρωση Φαινολικών πριν από υδρόλυση $\times 10^{-4}$ M	Συγκέντρωση Φαινολικών μετά από υδρόλυση $\times 10^{-4}$ M	Συγκέντρωση Εστέρων $\times 10^{-4}$ M	Εστέρες/φαινολικά πριν από υδρόλυση	Εστέρες/φαινολικά Μετά από υδρόλυση
R1	20,02	17,1	16,9	0,9	0,9
RB	6,49	6,49	13,1	Δ.Π*	2,0
R4	2,34	3,91	7,5	Δ.Π	1,9
R5	2,08	3,27	7,5	Δ.Π	2,3
R6	0,69	2,12	19,3	28/1	9,1

*Δ.Π.:ΔΕΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΘΗΚΕ

Όπως μπορούμε να διαπιστώσουμε από τον παραπάνω πίνακα ο αρχικός προσδιορισμός φαινολικών στα ακετυλιωμένα παράγωγα έδειξε χαμηλές συγκεντρώσεις φαινολικών, πιθανότατα λόγω μη ύπαρξης ελευθέρων αρωματικών υδροξυλίων στο μόριο. Για να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα πραγματοποιήθηκε στα κλάσματα ήπια αλκαλική υδρόλυση και επαναπραγματοποιήθηκε προσδιορισμός φαινολικών. Με βάση την αναλογία εστέρων προς φαινολικά, που προέκυψε μετά από ήπια αλκαλική υδρόλυση, μπορούμε να πούμε ότι τα κλάσμα R1 είναι το μονοακετυλιωμένο κλάσμα της ρεσβερατρόλης, ενώ τα κλάσματα RB, R4, R5 είναι πιθανόν τα διακετυλιωμένα ισομερή. Τέλος, ερωτηματικά προκαλεί η αναλογία εστέρων προς φαινολικά (9/1) του κλάσματος R6, κάτι που σίγουρα χρήζει παιρετέρω διερεύνησης.

7.4.2 Βιολογική δοκιμασία

Τόσο στην πρότυπη ρεσβερατρόλη, στο μίγμα των ακετυλιωμένων παραγώγων, όσο και επιμέρους διαχωρισμένα κλάσματα, έγινε βιολογική δοκιμασία, δηλαδή εξετάστηκε η ικανότητα τους να προκαλούν συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού ή αντίστοιχα αναστολή συσσώρευσης αιμοπεταλίων, επαγόμενης από τον PAF. Η ικανότητα αναστολής, σε όσα κλάσματα υπήρχε, εκφράστηκε ως προς την συγκέντρωση φαινολικών που απαιτείται για να ανασταλεί το 50% της συσσώρευσης που επάγεται από τον PAF(IC₅₀). Όλα τα κλάσματα της

ρεσβερατρόλης πλην ενός προκάλεσαν αναστολή της συσσώρευσης αιμοπεταλίων, κάτι που έγινε και από το συνολικό μίγμα των ακετυλιωμένων.

Πίνακας 14: Αποτελέσματα του βιολογικού πειράματος για την ικανότητα αναστολής των διαφόρων ακετυλιωμένων κλασμάτων ρεσβερατρόλης

Κλάσμα	Ποσότητα κλάσματος (μL)	Συγκέντρωση σε BSA $\times 10^{-3}$ M	Είδος δράσης	Ποσότητα για IC ₅₀ (μL)	IC ₅₀ Συγκέντρωση φαινολικών $\times 10^{-3}$ M
Ρεσβερατρόλη	100	3,50	Αναστολή	6	0,082
Ακετυλιωμένη Ρεσβερατρόλη	100	0,115	Αναστολή	26	0,108
R1	300	6,06	Αναστολή	1,6	0,038
RB	600	1,95	Αναστολή	2,3	0,017
R4	300	0,702	Αναστολή	9	0,0243
R5	300	0,624	Αναστολή	8	0,0193
R6	300	0,207	-	-	-

Όπως φαίνεται και από τον παραπάνω πίνακα η ρεσβερατρόλη προκαλεί αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων (η οποία προκαλείται από τον PAF) σε συγκεντρώσεις φαινολικών $0,082 \times 10^{-3}$. Το κλάσμα R1 προκαλεί επίσης αναστολή της συσσώρευσης σε συγκεντρώσεις φαινολικών $0,038 \times 10^{-3}$. Το κλάσμα RB προκαλεί επίσης αναστολή της συσσώρευσης σε συγκεντρώσεις φαινολικών $0,017 \times 10^{-3}$. Το συνολικό μίγμα των ακετυλιωμένων είναι και αυτό αναστολέας της συσσώρευσης αιμοπεταλίων σε συγκεντρώσεις φαινολικών $0,108 \times 10^{-3}$. Τέλος, και το κλάσμα R5 θεωρείται αναστολέας της συσσώρευσης αιμοπεταλίων σε συγκεντρώσεις φαινολικών $1,73 \times 10^{-3}$.

7.5. Μελέτη ακετυλιωμένων παραγώγων κερκετίνης

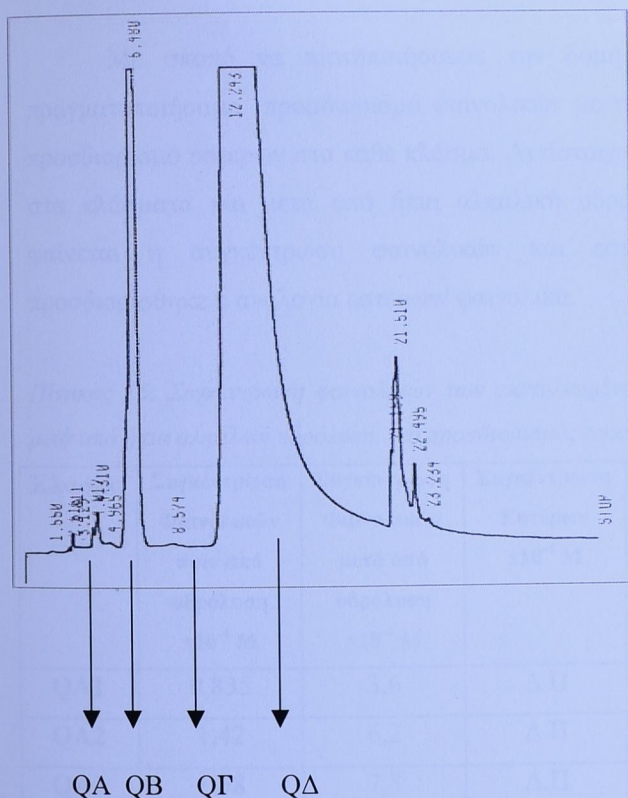
7.5.1 Χημικοί Προσδιορισμοί

Αρχικά ζυγίσθηκαν 1000μg πρότυπης ένωσης τα οποία αναδιαλύθηκαν σε αιθανόλη, έτσι ώστε να σχηματισθεί πρότυπα διάλυμα κερκετίνης 1mg/ml. Ένα τμήμα της πρότυπης ένωσης κρατήθηκε για βιολογική δοκιμασία (ικανότητα συσώρευσης ή αναστολής συσώρευσης επαγόμενης από τον PAF). Στην συνέχεια το υπόλοιπο τμήμα ακετυλιώθηκε στις βέλτιστες συνθήκες (45 min στους 60 °C). Το συνολικό μίγμα των ακετυλιωμένων δόθηκε για βιολογική δοκιμασία και έγιναν σε αυτό χημικοί προσδιορισμοί (αναφέρονται στο κεφάλαιο 7.2). Στην συνέχεια το μίγμα των ακετυλιωμένων παραγώγων διαχωρίστηκε στα επί μέρους ακετυλιωμένα κλάσματα με στήλη ανάστροφης φάσης HPLC. Δοκιμάστηκαν αρκετά συστήματα έκλουσης, ώστε να βρεθούν οι καταλληλότερες συνθήκες διαχωρισμού. Καταλήξαμε σε σύστημα έκλουσης με ροή 1 ml/ λεπτό στα 256 nm. Η σύσταση και ο χρόνος των διαλυτών έκλουσης φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 15: Σύσταση και χρόνος διαλυτών έκλουσης για τον διαχωρισμό ακετυλιωμένων κλασμάτων κερκετίνης

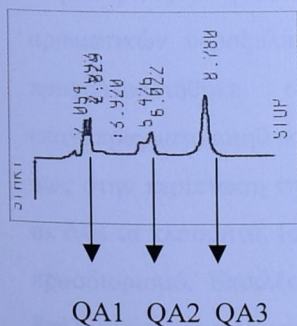
ΧΡΟΝΟΣ(min)	ΑΝΑΛΟΓΙΑ ΜΕΘΑΝΟΛΗΣ:ΝΕΡΟΥ
ΙΣΟΚΡΑΤΙΚΟΣ	60:40
ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ	

Από τον διαχωρισμό προέκυψαν τέσσερα ακετυλιωμένα κλάσματα, τα οποία ονομάστηκαν αντίστοιχα QA, QB, QΓ, QΔ. Τα κλάσματα αυτά συλλέχθηκαν σε ξεχωριστά σωληνάκια, στα οποία εξατμίστηκε ο διαλύτης και στην συνέχεια αναδιαλύθηκαν σε αιθανόλη. Στα πέντε αυτά ακετυλιωμένα κλάσματα έγιναν χημικοί προσδιορισμοί, ήπια αλκαλική υδρόλυση και βιολογική δοκιμασία. Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα από το διαχωρισμό των ακετυλιωμένων παραγώγων της τυροσόλης φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 14: Χρωματογράφημα διαχωρισμού των ακετυλιωμένων κλασμάτων κερκετίνης από την στήλη HPLC.

Στο κλάσμα QA έγινε περαιτέρω διαχωρισμός, και διαχωρίστηκαν τρία καινούρια κλάσματα. Ο διαχωρισμός αυτός φαίνεται παρακάτω. Και εδώ οι συνθήκες έκλουσης ήταν ισοκρατικές, με αναλογία Μεθανόλης/Νερού 50:50, ροή 1 ml/λεπτό στα 256 nm.



Σχήμα 15: Χρωματογράφημα διαχωρισμού του ακετυλιωμένου κλασμάτος QA από την στήλη HPLC.

Με σκοπό να πιστοποιήσουμε την δομή των επί μέρους κλάσμάτων πραγματοποιήσαμε προσδιορισμό φαινολικών με την μέθοδο Folin-Ciocalteus και προσδιορισμό εστέρων στο κάθε κλάσμα. Αντίστοιχα, οι προσδιορισμοί αυτοί έγιναν στα κλάσματα και μετά από ήπια αλκαλική υδρόλυση. Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται η συγκέντρωση φαινολικών και εστέρων, με βάση την οποία προσδιορίστηκε η αναλογία εστέρων/ φαινολικά.

Πίνακας 16: Συγκέντρωση φαινολικών των ακετυλιωμένων κλασμάτων κερκετίνης πριν και μετά από ήπια αλκαλική υδρόλυση, και προσδιορισμός αναλογίας εστέρων/φαινολικά

Κλάσμα	Συγκέντρωση Φαινολικών πριν από υδρόλυση $\times 10^{-4}$ M	Συγκέντρωση Φαινολικών μετά από υδρόλυση $\times 10^{-4}$ M	Συγκέντρωση Εστέρων $\times 10^{-4}$ M	Εστέρες/φαινολικά πριν από υδρόλυση	Εστέρες/φαινολικά Μετά από υδρόλυση
QA1	0,835	3,6	Δ.Π	-	-
QA2	1,42	6,2	Δ.Π	-	-
QA3	1,58	7,8	Δ.Π	-	-
QB	1,15	3,6	14,4	10/1	4/1
QΓ	0,29	1,0	Δ.Π	-	-
QΔ	11,8	11,2	24,5	2/1	2/1

*Δ.Π: Δεν προσδιορίστηκαν

Όπως μπορούμε να διαπιστώσουμε από τον παραπάνω πίνακα ο αρχικός προσδιορισμός φαινολικών στα ακετυλιωμένα παράγωγα έδειξε χαμηλές συγκεντρώσεις φαινολικών, πιθανότατα λόγω μη ύπαρξης ελευθέρων αρωματικών υδροξυλίων στο μόριο. Για να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα πραγματοποιήθηκε στα κλάσματα ήπια αλκαλική υδρόλυση και επαναπραγματοποιήθηκε προσδιορισμός φαινολικών. Θα πρέπει να τονίσουμε πως στην περίπτωση της κερκετίνης δεν ήταν εφικτός ο προσδιορισμός εστέρων σε όλα τα κλάσματα, ίσως επειδή δεν αρκετή η ποσότητα του κλάσματος για τον προσδιορισμό. Επιπλέον, η πολυπλοκότητα του μορίου δεν μας επιτρέπει να βγάλουμε κάποια συμπεράσματα σχετικά με την δομή των επιμέρους κλασμάτων.

7.5.2 Βιολογική δοκιμασία κερκετίνης

Τόσο στην πρότυπη κερκετίνη, στο μίγμα των ακετυλιωμένων παραγώγων, όσο και επιμέρους διαχωρισμένα κλάσματα, έγινε βιολογική δοκιμασία, δηλαδή εξετάστηκε η ικανότητα τους να προκαλούν συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού ή αντίστοιχα αναστολή συσσώρευσης αιμοπεταλίων, επαγόμενης από τον PAF. Η ικανότητα αναστολής, σε όσα κλάσματα υπήρχε, εκφράστηκε ως προς την συγκέντρωση φαινολικών που απαιτείται για να ανασταλεί το 50% της συσσώρευσης που επάγεται από τον PAF(IC₅₀). Αντίστοιχα, για τα κλάσματα της κερκετίνης, του QA1, του QA3 και του QΓ στα οποία παρατηρήσαμε συσσώρευση, μελετήθηκε εάν απευαισθητοποιούνται από τον PAF ή εάν αναστέλλεται η δράση τους από το BN 52021, που είναι ισχυρός αναστολέας του PAF. Τα αποτελέσματα φαίνονται στους παρακάτω πίνακες.

Πίνακας 17: Αποτελέσματα του βιολογικού πειράματος για την ικανότητα αναστολής των διαφόρων ακετυλιωμένων κλασμάτων κερκετίνης

Κλάσμα	Ποσότητα κλάσματος (μL)	Συγκέντρωση σε BSA $\times 10^{-3}$ M	Είδος δράσης	Ποσότητα για IC ₅₀ (μL)	IC ₅₀ Συγκέντρωση φαινολικών $\times 10^{-3}$ M
Ακετυλιωμένη κερκετίνη	100	0,23	Αναστολή	3,7	0,0033
QA1	500	0,04175	Αναστολή	0,34	0,00056
QA2	500	0,71	Αναστολή	1	0,0028
QB	200	0,23	Αναστολή	6,5	0,0058
QΓ	500	0,0145	Αναστολή	2,2	0,0012
QΔ	200	2,36	Αναστολή	3,5	0,032

Όπως φαίνεται και από τον παραπάνω πίνακα το κλάσμα QA1 προκαλεί αναστολή της συσσώρευσης σε συγκεντρώσεις φαινολικών $0,00056 \times 10^{-3}$. Το κλάσμα QA2 προκαλεί επίσης αναστολή της συσσώρευσης σε συγκεντρώσεις φαινολικών $0,0028 \times 10^{-3}$. Το συνολικό μίγμα των ακετυλιωμένων είναι και αυτό αναστολέας της συσσώρευσης αιμοπεταλίων σε συγκεντρώσεις φαινολικών $0,0033 \times 10^{-3}$. Τέλος, και τα κλάσματα QΓ και QΔ θεωρούνται αναστολείς της

συσσώρευσης αιμοπεταλίων που επάγεται από τον PAF σε συγκεντρώσεις φαινολικών $0,0012 \times 10^{-3}$, και $0,032 \times 10^{-3}$ αντίστοιχα. Μερικά κλάσματα της κερκετίνης είχαν συσσωρευτική ικανότητα, η οποία φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 18: Αποτελέσματα του βιολογικού πειράματος για την συσσωρευτική ικανότητα των κλάσματος της κερκετίνης, του QA1, QA3, QΓ.

Κλάσμα	Είδος δράσης	Συσσω-ρευτική ικανότητα $\times 10^{-4}$ M	Απευαισθητοποίηση σε PAF	Αναστολή από BN 52021
Κερκετίνη	Αργή συσσώρευση	$5,3 = \text{PAF } 4 \times 10^{-11}$	NAI	-
QA1	Λύση αιμοπεταλίων	$0,081 \rightarrow \text{λύση}$	NAI	OXI
QA3	Αργή συσσώρευση		$\text{PAF } 4 \times 10^{-11} \rightarrow 40\%$	OXI
QΓ	Συσσώρευση	$0,155 = \text{PAF } 4 \times 10^{-11}$	-	OXI

Παρά το γεγονός ότι η δομή και η πολυπλοκότητα του μορίου της κερκετίνης δεν μας επιτρέπει να βγάλουμε ασφαλή συμπεράσματα, μπορούμε να αναφερθούμε στην βιολογική δραστικότητα των επί μέρους ακετυλιωμένων κλασμάτων. Όπως φαίνεται και από τον παραπάνω πίνακα, το κλάσμα QA1 προκάλεσε λύση των αιμοπεταλίων σε συγκέντρωση φαινολικών $0,081 \times 10^{-4}$ M, την στιγμή που το ίδιο κλάσμα σε συγκεντρώσεις $0,0056 \times 10^{-4}$ M προκαλούσε αναστολή συσσώρευσης. Επιπλέον, από το γεγονός ότι το κλάσμα απευαισθητοποιείται από τον PAF και η δράση του δεν αναστέλλεται από το BN 52021, μπορούμε να πούμε πως προκαλεί συσσώρευση με διαφορετικό μηχανισμό από ότι ο PAF. Το κλάσμα QA3 προκάλεσε αργή συσσώρευση, ενώ απευαισθητοποιείται από PAF συγκέντρωσης 4×10^{-11} κατά 40%, χωρίς να αναστέλλεται από το BN 52021. Τέλος, και το κλάσμα QΓ προκάλεσε συσσώρευση ανάλογη με συσσώρευση που προκαλεί ο PAF συγκέντρωσης 4×10^{-11} M, ενώ σε συγκεντρώσεις $0,032 \times 10^{-3}$ M προκαλούσε αναστολή της επαγόμενης από τον PAF συσσώρευσης των αιμοπεταλίων.

8. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Πολλές επιδημιολογικές μελέτες έχουν πιστοποιήσει τις ευεργετικές δράσεις της Μεσογειακής Δίαιτας. Αρχικά έμφαση είχε δοθεί στον πιθανό προστατευτικό ρόλο της χαμηλής πρόσληψης χοληστερόλης και κορεσμένου λίπους στην εμφάνιση καρδιοπαθειών και καρκίνου. Όμως αποδείχθηκε πως οι κάτοικοι της Κρήτης (οι οποίοι έχουν την χαμηλότερη συχνότητα καρδιοπαθειών) δεν είχαν ιδιαίτερα χαμηλές τιμές χοληστερόλης σε σχέση με πληθυσμούς άλλων χωρών όπου η θνησιμότητα από Στεφανιαία Νόσο ήταν υψηλή. Επιπλέον, και οι κάτοικοι της Νότιας Γαλλίας, των οποίων η διαίτα ήταν ιδιαίτερα υψηλή σε κορεσμένο λίπος, είχαν πολύ χαμηλή συχνότητα καρδιοπαθειών γεγονός που αποδόθηκε στο ότι το καθημερινό τους γεύμα συνόδευε ένα ποτήρι κόκκινο κρασί. Όλα αυτά οδήγησαν τους ερευνητές στο να μελετήσουν τον ρόλο των μικροσυστατικών της Μεσογειακής Δίαιτας. Βρέθηκε τελικά πως πολλά μικροσυστατικά της Μεσογειακής Δίαιτας έχουν αντιοξειδωτική, αντιθρομβωτική και αντιφλεγμονώδη δράση, και συμβάλλουν στην ιδιαίτερη χαμηλή συχνότητα καρδιοπαθειών και καρκίνου.

Πολλές από τις ευεργετικές δράσεις της Μεσογειακής Δίαιτας έχουν αποδοθεί στις φαινολικές ενώσεις. Συγκεκριμένα, από *in vitro* και *in vivo* μελέτες έχει βρεθεί ότι τα φαινολικά είναι: α) ισχυρά αντιοξειδωτικά και αναστέλλουν την οξείδωση της LDL β) αναστέλλουν την συσσώρευση αιμοπεταλίων που επάγεται από διάφορους συσσωρευτικούς παράγοντες (Αραχιδονικό οξύ, ADP, PAF) γ) παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδη δράση, αφού αναστέλλουν την δράση του PAF, που είναι ισχυρός φλεγμονώδης παράγοντας λιποειδικής φύσης που θεωρείται ότι κατέχει κύριο ρόλο στην πρόκληση της αθηρογένεσης. Σημαντική επίσης είναι η αντικαρκινική δράση που παρουσιάζουν αρκετές ενώσεις (ρεσβερατρόλης, κερκετίνης).

Ήταν λογικό επομένως να στραφεί το ερευνητικό ενδιαφέρον στο συσχετισμό της δομής των φαινολικών ενώσεων με την βιολογική τους δραστηριότητα. Έχει αποδειχθεί ότι υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στην δομή και στην αντιοξειδωτική ικανότητα των φαινολικών ενώσεων, ενώ δεν υπάρχουν εργασίες που να συσχετίζουν την δομή με την αντιφλεγμονώδη και αντισυσσωρευτική δράση τους. Από την άλλη πλευρά η ύπαρξη ακετυλιωμένων φαινολικών στα τρόφιμα της Μεσογειακής Δίαιτας (ελαιόλαδο, κρασί) με ισχυρές βιολογικές δράσεις, μιας και

μπορούν να αναστείλουν *in vitro* την συσσώρευση αιμοπεταλίων καθώς τον σχηματισμό θρομβωτικών παραγόντων, επισημαίνει τον πιθανό συσχετισμό ακετυλομάδων και βιολογικής τους δράσης. Τα παραπάνω φαίνεται να ενισχύονται από πειράματα μεταβολισμού όπου έχουν ανακαλύψει την ύπαρξη ενζύμου (τρανσακετυλάση) στον ανθρώπινο οργανισμό που μπορεί να μεταφέρει ακετυλομάδες από ένα μόριο στα άλλο, γεγονός που αποδεικνύει ότι η ακετυλίωση κάποιων μορίων είναι σημαντική και μπορεί να συμβαίνει και ενδογενώς στον ανθρώπινο οργανισμό.

Με βάση τα παραπάνω, σκοπός της εργασίας αυτής ήταν να μελετήσει την βιολογική δραστικότητα ακετυλιωμένων παραγώγων φαινολικών ενώσεων και να κάνει έναν πιθανό συσχετισμό ανάμεσα στην δομή και την βιολογική τους δραστικότητα. Για τις ανάγκες της εργασίας αυτής επιλέχθηκαν τρεις χαρακτηριστικές ενώσεις της Μεσογειακής Δίαιτας με διαφορετικό μάλιστα αριθμό υδροξυλίων η κάθε μια. Η τυροσόλη (με δυο υδροξύλια), η οποία βρίσκεται συνήθως στο ελαιόλαδο, η ρεσβερατρόλη (με τρία υδροξύλια), η οποία βρίσκεται στο κόκκινο κρασί και η κερκετίνη (με πέντε υδροξύλια), η οποία βρίσκεται στα φρούτα, στα λαχανικά και στο κρασί.

Η ακετυλίωση των παραπάνω ενώσεων έγινε στις βέλτιστες συνθήκες που βρέθηκαν στο εργαστήριο μας. Το μίγμα των ακετυλιωμένων παραγώγων διαχωρίστηκε με στήλη HPLC ανάστροφης φάσης στα επί μέρους ακετυλιωμένα κλάσματα. Τόσο στην πρότυπη ένωση, στο μίγμα των ακετυλιωμένων, αλλά και στα επί μέρους ακετυλιωμένα παράγωγα της κάθε μιας έγιναν χημικοί προσδιορισμοί (προσδιορισμοί εστέρων και φαινολικών) αλλά και βιολογική δοκιμασία, δηλαδή η ικανότητα του κάθε κλάσματος να προκαλεί συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού ή αναστολή της συσσώρευσης αιμοπεταλίων κουνελιού που επάγεται από τον PAF.

Τα αποτελέσματα των παραπάνω πειραμάτων συνοψίζονται ως εξής:

Για να είναι αξιόπιστος ο προσδιορισμός φαινολικών με την μέθοδο Folin-Ciocalteu σε κάθε ακετυλιωμένο κλάσμα θα πρέπει να έχει προηγηθεί ήπια αλκαλική υδρόλυση του κλάσματος με άμεσο σκοπό να σπάσουν οι εστερικοί δεσμοί που υπάρχουν στα φαινολικά υδροξύλια.

Το συνολικό μίγμα των ακετυλιωμένων κλασμάτων της τυροσόλης ήταν καλύτερος αναστολέας από ότι η αρχική μη ακετυλιωμένη ένωση, αφού η τιμή

IC₅₀ από $0,4 \times 10^{-3}$ M στην τυροσόλη μειώθηκε στο $0,033 \times 10^{-3}$ M στο μίγμα των ακετυλιωμένων παραγώγων.

Περαιτέρω διαχωρισμός και μελέτη των ακετυλιωμένων κλάσματος της τυροσόλης έδειξε ότι ήταν καλύτεροι αναστολείς από την πρότυπη ένωση με βάση το αντίστοιχο IC₅₀.

Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η ακετυλίωση στο υδροξύλιο της ανθρακικής αλυσίδας της τυροσόλης και μόνο εκεί, αλλάζει την βιολογική δραστηριότητα του μορίου αφού τα υπόλοιπα ακετυλιωμένα κλάσματα προκάλεσαν αναστολή της επαγομένης από PAF συσσώρευσης ενώ μόνο το κλάσμα T3 προκάλεσε συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού.

Αντίστοιχα αποτελέσματα προέκυψαν και στην μελέτη της ρεσβερατρόλης όπου το συνολικό μίγμα των ακετυλιωμένων κλασμάτων της, όσο και τα επί μέρους κλάσματα ήταν καλύτεροι αναστολείς της επαγομένης από PAF συσσώρευσης σε σχέση με την πρότυπη μη ακετυλιωμένη ένωση.

Αξίζει να σημειωθεί ότι όσα περισσότερα φαινολικά υδροξύλια του μορίου της ρεσβατρόλης ακετυλιώνονται τόσο φαίνεται να αυξάνεται η αντισυσσωρευτική ικανότητα του μορίου.

Η πολυπλοκότητα και η δομή του μορίου της κερκετίνης δεν μας επιτρέπει να βγάλουμε ασφαλή συμπεράσματα για την συσχέτιση δομής και βιολογικής δραστηριότητας των επί μέρους ακετυλιωμένων κλασμάτων της κερκετίνης

Με βάση τα παραπάνω, μπορούμε να πούμε πως η μελέτη της δομής και της βιολογικής δραστηριότητας των φαινολικών ενώσεων όσο και των παραγώγων τους είναι πολύ σημαντική. Η σπουδαιότητα των ενώσεων αυτών προκύπτει αφενός από την ύπαρξη ακετυλιωμένων ενώσεων στα τρόφιμα της Μεσογειακής Δίαιτας και αφετέρου από την ύπαρξη μεταβολικών πορειών (γλυκοζυλίωση, μεθυλίωση, ακετυλίωση) στον οργανισμό. Παρόλαυτα σήμερα δεν γνωρίζουμε πλήρως τους μηχανισμούς δράσης των φαινολικών ενώσεων και των μεταβολιτών τους σε κυτταρικό επίπεδο. Είναι επομένως πιθανό η ακετυλίωση να αποτελεί έναν ενδογενή μηχανισμό ρύθμισης της βιολογικής δραστηριότητας των φαινολικών ενώσεων.

9. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η Μεσογειακή Δίαιτα και οι ευεργετικές δράσεις της, αποτελεί εδώ και πολλές δεκαετίες αντικείμενο μελέτης στον επιστημονικό χώρο. Κύρια χαρακτηριστικά της Ελληνικής εκδοχής της Μεσογειακής Δίαιτας είναι η άφθονη κατανάλωση ελαιολάδου, λαχανικών και φρούτων η οποία συνοδεύεται από μέτρια κατανάλωση κρασιού σε καθημερινή βάση. Κοινό χαρακτηριστικό όλων των παραπάνω τροφίμων είναι η υψηλή περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά. Οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν μια ετερογενή ομάδα λιποειδικής φύσης μορίων στην οποία ανήκουν τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή και τα στυλβένια, καθώς και τα γλυκοζυτικά παράγωγα αυτών. Οι ενώσεις αυτές που αριθμούν μερικές χιλιάδες χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη αρωματικών δακτυλίων με ένα ή περισσότερα υδροξύλια. Η αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη και αντικαρκινική δράση των φαινολικών ενώσεων μπορεί να παρέχει εν μέρει μια πιθανή εξήγηση για τα προφανή οφέλη της δίαιτας αυτής. Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει μια προσπάθεια συσχέτισης των δομικών χαρακτηριστικών των φαινολικών ενώσεων (θέση υδροξυλίου στο φαινολικό δακτύλιο, ύπαρξη μεθόξυ-ομάδων, ύπαρξη ακέτυλο-ομάδων) με τις παραπάνω βιολογικές δράσεις.

Σε προηγούμενες μελέτες έχουν συντεθεί ακετυλιωμένα παράγωγα λιποειδών τα οποία φαίνεται να έχουν βιολογική δράση συσσώρευσης αιμοπεταλίων ή αναστολής αυτής της συσσώρευσης. Την ίδια περίπου εποχή Ινδοί επιστήμονες απομόνωσαν από κύτταρα ένζυμα που ακετυλιώνουν λιποειδή. Η εξήγηση των παραπάνω ευρημάτων έγινε με την πιστοποίηση από ερευνητές του εξωτερικού της ύπαρξης λιποειδικών μορίων σε φυσικές πηγές με βιολογική δράση. Πρόσφατα, έχουν απομονωθεί και μελετηθεί ενώσεις με φαινολικό δακτύλιο σε κόκκινο και λευκό κρασί, τα οποία είτε προκαλούσαν συσσώρευση είτε δρούσαν ανασταλτικά στην συσσώρευση αιμοπεταλίων που επάγεται από τον PAF. Κοινό χαρακτηριστικό της πλειοψηφίας των μορίων αυτών ήταν η ύπαρξη ακετυλο-ομάδων στο σκελετό τους. Για το λόγο αυτό, τρεις χαρακτηριστικές ενώσεις των τροφίμων της Μεσογειακής Δίαιτας με διαφορετικό αριθμό στο μόριο τους (τυροσόλη, ρεσβερατρόλη, κερκετίνη) ακετυλιώθηκαν στις βέλτιστες συνθήκες που προσδιορίστηκαν στο εργαστήριο. Μελετήθηκε η ικανότητα των ολικών προϊόντων της ακετυλίωσης να επάγουν *in vitro* τη συσσώρευση που προκαλείται από τον PAF. Στη συνέχεια το μίγμα ακετυλίωσης διαχωρίστηκε

χρωματογραφικά με HPLC σε στήλη ανάστοφης φάσης και στα κλάσματα που προέκυψαν πραγματοποιήθηκαν χημικοί προσδιορισμοί και μελετήθηκε η βιολογική τους δραστικότητα, η οποία και συγκρίθηκε με αυτήν των πρόδρομων ενώσεων.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα πιο πολλά από τα παραπάνω ακετυλιωμένα φαινολικά μόρια αναστέλλουν την συσσώρευση αιμοπεταλίων. Η ύπαρξη ακετυλομάδων στο μόριο τους διαφοροποιεί τόσο το μέγεθος όσο και το είδος της βιολογικής τους δραστικότητας. Χαρακτηριστικά, η ύπαρξη ακετυλομάδων στο μόριο της ρεσβερατρόλης βελτιώνει την ανασταλτική της δράση, ενώ πιστοποιήθηκε ακετυλιωμένο παράγωγο της τυροσόλης, το οποίο προκαλούσε συσσώρευση, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα ακετυλιωμένα κλάσματα της τυροσόλης τα οποία προκαλούσαν αναστολή συσσώρευσης. Παρομοίως, πιστοποιήθηκαν ακετυλιωμένα κλάσματα κερκετίνης που παρουσίασαν ή ανασταλτική ή συσσωρευτική δράση. Η τροποποίηση της βιολογικής δράσης των φαινολικών μορίων με προσθήκη ακετυλο-ομάδων στο μόριο τους θα μπορούσε να αποτελέσει ενδογενή ρυθμιστικό μηχανισμό της βιολογικής τους δράσης.

10. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Keys A, **Coronary Heart Disease in seven countries**, *Circulation* (1970) 41: 1-211
2. Fernantez -Jarne E, Martinez- Losa E, Martinez -Gonzalez M.A. **Risk of first non-fatal myocardial infarction negatively associated with olive oil consupntion: a case control study in Spain**. *Int J Epidemiol* (2002) 31: 474-480
3. Fernantez -Jarne E, Allegre Garrlido F, Alonso A, de la Fuente Arrillagac, Martinez -Gonzalez M.A. **Ingestion de acidos grasos omega 3 de infarto de miocardio : un estydio de casos y controles**. *Med Clin Barc* (2002) 184 :121-125
4. Chrysohoou C, Pitsavos C, Skounas J, Panagiotakos D, Toutouza M, Papaioannou I, Zeimbeikis A, Stefanadis C, Toutouzas P. **Mediterranean Diet, and its association with clinical and biochemical markers related to cardiovascular risk: THE ATTICA STUDY**
5. Narayana KR, Spiral R, Claluvad MR, Krishna DR. **Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential**. *Indian Journal of Pharmacology* (2201) 33:2-16
6. Cifford M.N. **Chlorogenic acids and other cinnamtes: nature, occurrence and dietary burden**. *J Sci Food Agric* (1999) 79: 362-372
7. Reinli k, Bliock K. **Phytoestrogen content of foods: a compentium of literature values**. *Nutr Cancer Int J* (1996) 26: 123-148
8. Aldercreutz H, Mazur W. **Phytoestrogens and western Diseases**. *Ann Med* (1997) 29 : 95-120
9. Rousseff R.L, Martin SF, Youtsey CO. **Quantative survey of narirutin, naringin, heperidin, and neohesperidin in Citrus**. *J Agric Food Chem* (1987) 35: 1027-1030
10. Hertog MGL, Hollman PCH, van de Putte B. **Content of potentially anticarcinogenic flavonoids in tea infusions, wine and fruit juices**. *J Agric Food Chem* (1993) 41: 1242-1246
11. Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM. *Clinical.Bioshemistry* (1997) 30 :91-113

12. Hara Y, Luo SJ, Wickremasinghe RL, Yamashini T. **Special issue on tea.** *Food Rev Int* (1995) 11: 371-542
13. Ding Z, Kuhr S, Engelhardt UH. **Influence of catechins and theaflavins on the astrigent taste of black tea brews.** *Z. Lebensm. Unters. Forsh* (1992) 195:108-111
14. Scalbert A. **Quantative methods for the estimation of flavvins in plant tissues.** *Plant Polyphenols: Synthesis, properties, significance.* Plenum Press, NY (1992) :259-280
15. Cifford M.N. **Anthocyanidins in foods. Symposium on Polyphenols and Anthocyanidins as food colourants and Antioxidants.** *Brussels, Belgium* (1996) :1-19
16. Frankel EN, Waterhouse AL. **Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins.** *J Agric Food Chem* (1995) 43:890-894
17. Jang M, Cail E, Udeani GO, Slowing KU, Thomas EF, Beecher CW, Fong HHS, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG. **Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes.** *Science* (1997) 275:218-220
18. Axelsson M, Sjoval J, Gustafsson BE. **Origin of lignans in mammals and identification of a precursor from plants.** *Nature* (1982) 298: 659-660
19. Scalbert A, Williamson G. **Dietary intake and Bioavailability of Polyphenols.** *J. Nutr* (2000) 130: 2073-2085
20. Fuhrman B, Lary A, Aviran M. **Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein ti lipid peroxidation.** *Am J Clin Nutr* (1995) 61:549
21. Scalbert A, Manach C, Morand C, Remesy C. **Dietary intake and bioavailability of polyphenols.** *International Conference on Dietary factors: Cancer causes and prevention.* Vienna 2001
22. Hammerstone JF, Lazarus SA, Schimtz HH. **Procyanidin content and variation in some commonly consumed foods.** *J Nutr* (2000) 130: 2086-2092

23. Hollman PCH, Devries JHM, Vanleewen SD, Mengelers MJB, Katan MB. **Absorption of dietary querqetin in glycosides and querqetin in healthy ileostomy volunteers.** *Am J Clin Nutr* (1995) 62 :1276
24. Van de Hof KH, Wiseman SA, Yang CS, Tijburg LB. **Plasma and lipoprotein levels of tea catechins following repeated tea consumption.** *Proc Sci Exp Biol Med* (1999) 220:203
25. Morand C, Manach C, Crespy V, remesy C. **Querqetin 3-o-betaglusoside is better absorbed than other querqetin forms and is not present in the plasma.** *Free Rad Res* (2000) 33: 667
26. Donovan J, Gibson RS. **Iron and zinc status of young women aged 14 to 19 years consuming vegetarian and omnivorous diets.** *J Am College Nutr* (1995) 14: 463
27. Scheline RR. **CRC handbook of mammalian metabolism of plant compounds.** Boca Raton : *CRC Press* (1991) : 514
28. Kim DH, Jung ea, Sohng IS, Hang A, Kim TH, Han MJ. **Intestinal bacterial metabolism of flavonoids and its relation to some biological activities.** *Arch Pharmacol Res* (1998) 21:17
29. Kondo K, Hirano R, Matsumoto A, Igarashi O, Hakura H. **Inhibition of LDL oxidation by cacao.** *Lancet* (1996)348:1514-1518.
30. Facino MR, Carini M, Aldini G, Berti F, Rossomni G, Bombardelli E, Morazzani P. **Diet enriched with proacyanidins enhances antioxidant activity and reduces myocardial post-ischaemic damage in rats.** *Life Sci* (1999) 149 :943-949
31. Hertog MGL, Feskeus EJM, Hollman PCH, Katan MB, Kromhout D. **Dietary antioxidants flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study.** *Lancet* (1993) 342 :1007-1011
32. Yochum L, Kushi LH, Meyer K, Folsom AR. **Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women.** *Am J epidemiol* (1999) 149: 943-949
33. Arts IC, Hollman PC, Feskeus EJ. **Catechin intake might explain the inverse relation between tea consumption and ischaemic heart disease: the Zutphen elderly study.** *Am J Clin Nutr* (2001) 74: 227-232

34. Kawanishi S, Hiraku Y, oikawa S. **Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging.** *Mutat Res* (2001) 488: 65-76
35. Khan MS, Baseer A. **Increased malondialdehyde levels in coronary heart disease.** *J Park Med Assoc* (2000) 50 : 261-264
36. Takabe W, Niki E, Vchida K, Yamada S, Satoh K, Noguchi N. **Oxidative stress promotes the development of transformation: involment of a potent mutagenic lipid peroxidation product, acrolein.** *Carcinogenesis* (2001) 22:935-941
37. Ferrali M, Sighorini C, Caciotti B, Sugherini L, Ciccoli L, Giachetti D, Comporti M. **Protection against oxidative damage of erythrocyte membranes by the flavonoid querqetin and its relation to iron chelating activity.** *FEBS Lett*(1997) 46:123-129
38. Elliott AJ, Schreiber SA, Thomas C, Pardini RS. **Inhibition of glutathione reductase by flavonoids.** *Biochem Pharmacol* (1992) 44:1603-1608
39. Hirano R, Sasamoto W, Matsumoto A, Hakura H, Igarashi O, Kondo K. **Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation.** *J Nutr Sci Viatminl* (2001) 47: 357-362
40. Cos P, Ying L, Calomne M, Hu JP, Cimanga K, Van Poe IB, Pieters L, Vlietnck AJ, Van den Berghe D. **Strusture activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers.** *J Nat Prod* (1998) 61:71-76
41. Yang CS, Landou JM, Huang MT, Newmark HL. **Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds.** *Ann Rev Nutr* (2001) 21:381-406
42. Bravo L. **Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance.** *Nutr Rev* (1998) 11:317-333
43. Cervitti PA. **Prooxidant states and tumor promotion.** *Science* (1985) 227: 375-381
44. Lautraite S, Musonda AC, Doehmer J, Edwards GO, Chipman JK. **Flavonoids inhibit genetic toxicity produced by carcinogens in cells expressing CYP1A2 and CYP1A1.** *Mutagenesis* (2002) 17:45-53

45. Raso GM, Meli R, Carlo G, Pacilio M, Di carlo R. **Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.** *Life Sci* (2001) 68:921-931
46. Khan SG, Katiyar SK, Ararwai R, Mukhtar H. **Enhancement of antioxidant and phase II enzymes by oral feeding of green tea polyphenols in drinking water to SKH-1 hairless mice: possible role in cancer chemoprevention.** *Cancer Res* (1992) 52:4050-4052
47. Miodini P, Fiorantino L, Fronzo G, Cappelletti V. **The two -phyto oestrogens genistein and querqetin exert different effects on oestrogen receptor function.** *Br J Cancer* (1999) 80:1150-1155
48. Akiyama T, Ishida J, Nikagawa H, Watanbe S, Iton S, Shibug AM, Fukamo Y. **Genistein. A specific inhibitor of tyrosine specific protein kinases.** *J Biol Chem* (1987) 262: 5592-5595
49. Plaumann B, Fritsche M, Rimpler H, Bradner G, Hess RD. **Flavonoids activate wild-type p53.** *Oncogene* (1996) 13: 1605-1614
50. Ross R. **The pathogenesis of atherosclerosis : a perspective for the 1990s.** *Nature* (1993) 362: 801-809
51. Rein D, Paglieroni TG, pearson GA, Wun T, Schmitz HH, Gosselin R, Keen CL. **Cocoa and wine polyphenols modulate platelet activation and function.** *J Nutr* (2000) 130: 2120-2126
52. Fragopoulou E, Antonopoulou S, Nomikos G, Demopoulos C. **Structure elucidation of phenolic compounds from red/ white wine with antiatherofenic properties.** *Biochemica et Biophysica Acta* (2003) 1632:90-99
53. Landolfi R, Mower RL, Steiner M. *Biochem Pharmacol* (1984) 32: 1525-1530
54. Middleton E, Kandaswami K. *Biochem Pharmacol.* (1992) 43: 1167-1179
55. Lee T.P, Matteliano M.L, Middleton E. **Effect of quercetin on human polymorphonuclear leukocyte lysosomal enzyme release and phospholipid metabolism.** *Life Sci* (1982) 31: 2765
56. Tauber AI, Fay JR, Marletta M. **Flavonoid inhibition of human neutrophil NADPH- oxidase.** *Biochem. Pharmacol.* (1984) 33: 1367-1369

57. Rotonclo S, de Gaetano G. Protection from cardiovascular disease by wine and its derived products. Epidemiological evidence and biological mechanisms. *World Rev Nutr Diet.* (2000) 87: 90-113
58. Wollin SD, Jones PJH. Alcohol, red wine and cardiovascular disease. *J Nutr* (2001) 131:1401-1404
59. Berg P.A., Daniel P.T. Plant flavonoids in Biology and Medicine II. Progress in clinical and biological research. New York (1988) 280: 157-171
60. Bisignano G, Tomaino A, Lo Cascio R, Crisafi G, Uccella N, Aqija A. On the in vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *J. Pharm. Pharmacol.* (1999) 31: 971-974
61. Kaul T.N. , Middleton E., Ogra PL. Antiviral effect of flavonoids on human viruses. *J Med Virol* (1985) 15 : 71
62. Spedding G, Ratty A, Middleton E. Inhibition of reverse transcriptases by flavonoids. *Antiviral Res* (1989) 12:99
63. Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, Saag Van der PT, Burg van der B, Gustafsson JA. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* (1998) 61: 71-76
64. Eaton J, *Br J Biomed Sci.* (1994) 51: 358-370
65. Yamazaki I , Shino A , Shimizu Y, Tsukuda R, Shirokawa Y, Kinoshito M. *Life Sci* (1986) 38 : 951-958
66. Albanese CV, Codd A, Argentino L, Zamboni-Zalione A, Macintyre. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* (1994) 15: 930-936
67. Parma NS, Ghosh Mn. *Flavonoids and bioflavonoids.* Elsevier (1981) Amsterdam 513-516
68. Martin MJ, Marhenda E, Perez-Guerreo C, Franco JM. *Pharmacology* (1994) 49: 144-150
69. Alarconde Lastrac, Martin MJ, Motilva V. *Pharmacology* (1994) 48: 58-62
70. Izzo AA, Di Carlo G, Mascolo N, Autore G, Capasso F. *Phytother. Res* (1994) 8:179-181
71. Cao G, Sofic F, Prior RL. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure- activity relationships. *Free Radical Biol Med* (1997) 22:749-760

72. Mora A, Paya M, Rios JL, Alcaraz MJ. Structure-activity relationships of polymethoxyflavones and other flavonoids as inhibitors of non-enzymic lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol* (1990) 40: 793-797
73. Dogas AJ, Castaneda-Acosta J, Bonin GC, Price KJ, Fischer NH, Winston GW. Evaluation of the total peroxyl radical-scavenging capacity of flavonoids : structure activity relationships. *J Nat Products* (2000) 63:327-331
74. Matthieseu L, Matterud KF, Sund RB. Hydrogen bond formation as basis for radical scavenging activity: a structure activity study of C-methylated dihydrochalcones from *Myrica gale* and structurally related acetophenones. *Free Radical Biol Med* (1997) 2 : 307-311
75. Ratty AK, Pas NP. Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: structure activity relationship. *Biochem Med Metab Biol* (1988) 39: 69-79
76. Gao Z, Huang K, Yang X, Xu H. Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Biochem Biophys Acta*. (1999) 472: 643-650
77. Hollman PC, Bijlsman MN, Van Grameren Y, Luossen JH, Katan MB. The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free Radical Biol Med* (1999) 31: 569-573
78. Vennat B, Bos MA, Pourat A, Bastide P. Procyanidins from *Torreya* : fractionation and study of the anti-radical activity towards superoxide anion. *Biol Pharm Bull* (1994) 17 :1613-1615
79. Castillo J, Benavente-Garcia O, Lorente J, Alcaraz M, Redouello A, Ortuno A, Del Rio J.A. Antioxidant activity and radioprotective effects against chromosomal damage induced in vivo X-rays of flavan-3-ols from grape seeds: comparative study versus other phenolic and organic compounds. *J Agr Food Chem* (2000) 48 : 1738-1745
80. Morel I, Lescoat J, Cogrel P, Sergeant O, Padeloup N, Brissot P, Cillard P. Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures. *Biochem Pharmacol* (1993) 45: 13-19

81. Cheng IF, Breen K, On the ability of four flavonoids, baiclein, luteolin, naringenin and quercetin, to suppress the Fenton reaction of the iron-ATP complex. *Biometals* (2000) 13: 77-83
82. Arora A, Nair MG, Strasburg GM, Structure activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. *Free Radic Biol Med.* (1998) 24: 1355-1363
83. Gordon M, Paiva -Martins F, Almeida M. Antioxidant Activity of Hydroxytyrosol Acetate Compared with That of Other Olive Oil Polyphenols. *J. Agric Food Chem* (2001) 49: 2480-2485
84. Brenes M, Garcia A, Rios J, Garrido J,. Phenolic compounds in Spanish olive oils. *J. Agric Food Chem* (1999) 47: 3535-3540
85. Singh Ishwar, Kohli E, Raj H, Gyanda K, Jainsapan, Tyagi Y, Gupta G, Kumari R, Kumar A, Pal G, Prasad A, Rastogi R, Olsehl, Jain S, Parmar V. Mechanism of biochemical action of substituted 4-methylbenzopyran-2-ones. Part 9: comparison of Acetoxy 4-methylcoumarins and other polyphenolic acetates reveal the specificity to acetoxy drug: protein transacetylase for pyran carbonyl group in proximity to the oxygen heteroatom. *Bioorganic & medicinal chemistry* (2002) 10: 4103-4111
86. Kuhnav J. The flavonoids: a class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet* (1976) 24: 117
87. Kohyanna N, Nagata T, Fujimoto S, Sekiga K. Inhibition of arachidonate lipooxygenase activities by 2-(3,4-dihydroxyphenyl) ethanol, a phenolic compound from olives. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (1997) 61 :347-350
88. Boskov D. Olive oil chemistry and technology. AOCS Press, Illinois, USA. (1996): 115-117
89. Brenes M, Garcia A, Garcia P, Rios JJ, Garrido A. Phenolic compounds in Spanish olive oils. *J. Agric. Food. Chem.* (1999) 47 :3535-3540
90. Owen R.W, Giacosa A, Hull W.F, Haubner R, Spiegelhalter B., Bartsh H. The antioxidant/ anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *Europ J. Cancer* (2000) 36: 1235-1247
91. Soleas GJ, Diamantis E.P, Goldberg D.M. Wine as a biological fluid: history, production and role in disease prevention. *J Clin Lab Anal* (1999) 11: 287-313

92. Parr A.J, Bolwell G.P. Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content of profile. *J Agric Food Chem* (2000) 80: 985
93. Scalbert A. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* (1991) 30: 3875
94. Keys A. Mediterranean diet and public health: personal reflections. *Am J Clin Nutr* (1995) 61: 13215-13235
95. Mancini M, Rubba P. The Mediterranean diet in Italy In Simopoulos A, Visiol F, editors. *Mediterranean diets*. Basel: Karger press, *Wld Rev Nutr Diet* (2000) Vol 87:114-126
96. F. Visioli, G. Bellomo , G. Montedoro, C. Galli, Low density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents. *Atherosclerosis* (1995) 117: 25-32
97. A. Petroni, M. Blasevich, N. Papini, M. Salami, A Sala. C. Galli, inhibition of leukocyte leukotriene B.4 production by an olive oil- derived phenol identified by mass-spectrometry, *Thrombosis Res* (1997) 87: 315-322
98. A. Petroni, M. Blasevich, M. Salami, M. Servilli, G. F Montedoro. C. Galli, A phenolic antioxidant extracted from olive oil inhibits platelet aggregation and arachidonic acid metabolism in vitro, *World Rev Nutr Diet* (1994) 75: 169-172
99. Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E, Kinsella JE. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* (1993) 341: 454-457
100. Pace- Asciak. GR, Hahns, Diamantis EP, Soleas G, Goldberg DM. The red wine phenolics trans-resveratrol and querqetin block human platelet aggregoition and eicosanoid synthesis: Implications for protection against coronary heart disease. *Clin Chem Acta* (1993) 235: 207-219
101. Jang M, Cail, Udeani GO et al. Cancerchemoprotective activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* (1997) 275: 218-220
102. Demopoulos CA, Pinckard RN, Hanahan DJ, Platelet-Activating Factor. Evidence for 1-O-Alkyl-2- acetyl-sn-glyceryl-3-phosphorylcholine as the

active component (a new class of lipid chemical mediators). J. Biol. Chem., (1979), 254: 9355-9358.

103. Kapoulas V.M. Methods in enzymology, XIV, 518

104. Singleton, VL, Joseph A, Rossi JR. Am J Enol. Vitric, 144-158

105. Renkonen O. Biochim. Biophys. Acta (1961) 54: 361

106. Stephen M, Prescott M, Thomas M, McIntyre MD, Guy A, Zimmerman MD, Diana M, Stefforini MD. Japanese Circulation Journal (1996) 60-3: 137-141

107. Wells MA, (1996)

ΥΒΠ Χαροκόπειου Παν/μιου.9549169-70,libr

* 1 1 7 1 3 *



HJ

