ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
Σχολή Επιστημών Υγείας & Αγωγής
Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής

Μελέτη της επίδρασης φαινολικών ενώσεων και παραγώγων τους στις λειτουργίες κυττάρων σε φλεγμονώδεις καταστάσεις

Διδακτορική Διατριβή

Ιωάννα Χ. Βλαχογιάννη
Διαιτολόγος- Διατροφολόγος MSc

ΑΘΗΝΑ
ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ 2015

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
Σχολή Επιστημών Υγείας & Αγωγής
Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής

Μελέτη της επίδρασης φαινολικών ενώσεων και παραγώγων τους στις λειτουργίες κυττάρων σε φλεγμονώδεις καταστάσεις

Διδακτορική Διατριβή

Ιωάννα Χ. Βλαχογιάννη
Διαιτολόγος- Διατροφολόγος MSc

ΑΘΗΝΑ
ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ 2015

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Μελέτη της επίδρασης φαινολικών ενώσεων και παραγώγων τους στις λειτουργίες κυττάρων σε φλεγμονώδεις καταστάσεις

ΙΩΑΝΝΑ Χ. ΒΛΑΧΟΓΙΑΝΝΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΣΜΑΡΑΓΔΗ ΑΝΤΩΝΟΠΟΥΛΟΥ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ

Σ. ΑΝΤΩΝΟΠΟΥΛΟΥ, Καθηγήτρια Τμήματος Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο
Ε.ΦΡΑΓΚΟΠΟΥΛΟΥ, Επίκουρη Καθηγήτρια Τμήματος Επιστήμης Διαιτολογίας- Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο
Κ.Α. ΔΗΜΟΠΟΥΛΟΣ, Καθηγητής Τμήματος Χημείας, ΕΚΠΑ

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Σ. ΑΝΤΩΝΟΠΟΥΛΟΥ, Καθηγήτρια Τμήματος Επιστήμης Διαιτολογίας Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο
Ε.ΦΡΑΓΚΟΠΟΥΛΟΥ, Επίκουρη Καθηγήτρια Τμήματος Επιστήμης Διαιτολογίας- Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο
Κ.Α. ΔΗΜΟΠΟΥΛΟΣ, Καθηγητής Τμήματος Χημείας, ΕΚΠΑ
Ι. ΚΩΣΤΑΚΗΣ, Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ
Τ. ΝΟΜΙΚΟΣ, Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο
Ρ. ΤΕΝΤΑ, Επίκουρη Καθηγήτρια Τμήματος Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο
Γ. ΔΕΔΟΥΣΗΣ, Καθηγητής Τμήματος Επιστήμης Διαιτολογίας- Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 21/12/2015

Ευχαριστίες

Η παρούσα διδακτορική διατριβή υλοποιήθηκε την περίοδο 2009-2015. Το πειραματικό μέρος της εργασίας πραγματοποιήθηκε κυρίως στο Εργαστήριο Βιολογίας, Βιοχημείας και Φυσιολογίας του Ανθρώπου και των Μικροοργανισμών του Χαροκόπειου Πανεπιστημίου. Την επίβλεψη και άμεση καθοδήγηση είχε η Καθηγήτρια κυρία Σμαραγδή Αντωνοπούλου Διευθύντρια του Εργαστηρίου Βιολογίας-Βιοχημείας και Φυσιολογίας του Ανθρώπου και των Μικροοργανισμών του Τμήματος Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής.

Από τη θέση αυτή θα ήθελα να εκφράσω την βαθιά μου ευγνωμοσύνη, στην Επίκουρη Καθηγήτρια του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, κυρία Ελισάβετ Φραγκοπούλου για την πολύτιμη επιστημονική συμβολή της στην υλοποίηση και περάτωση της διατριβής μου. Βέβαια πέρα από την επιστημονική βοήθεια θα ήθελα να την ευχαριστήσω για το ανθρώπινο ενδιαφέρον της όλα αυτά τα χρόνια.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κύριο Κωνσταντίνο Δημόπουλο για την διάθεση των εργαστηριακών χώρων και του εξοπλισμού για την πραγματοποίηση μέρους αυτής της εργασίας στο εργαστήριο Βιοχημείας του τμήματος Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, αλλά και για την ουσιαστική συμμετοχή του στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή.

Μεγάλο ευχαριστώ και ευγνωμοσύνη αισθάνομαι για τη βοήθεια και την καλή συνεργασία που είχα με τον Επίκουρο Καθηγητή Ιωάννη Κωστάκη, όσο αφορά τη σύνθεση των παραγώγων των φαινολικών ενώσεων στο Εργαστήριο Φαρμακευτικής Χημείας της Φαρμακευτικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Πέρα από την τέλεια συνεργασία, ήταν πάντα δίπλα μου να μου εξηγήσει το παραμικρό επιστημονικό πρόβλημα που αντιμετώπιζα.

Συνεχίζοντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή Τζώρτζη Νομικό καταρχήν για τη συμμετοχή του στην επταμελή εξεταστική επιτροπή, αλλά κυρίως για την επιστημονική και προσωπική σχέση που έχουμε αναπτύξει από το 2005 που ξεκίνησα την πτυχιακή μου εργασία σε εκείνον.

Επίσης να ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην Επίκουρη Καθηγήτρια Ρωξάνη Τέντα και στον Καθηγητή Γεώργιο Δεδούση για τη συμμετοχή τους στην

επταμελή εξεταστική επιτροπή και τις εποικοδομητικές παρατηρήσεις τους στο κείμενο της διατριβής μου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους πραγματικούς φίλους που απέκτησα όλα αυτά τα χρόνια κατά τις ατέλειωτες ώρες που περνάγαμε παρέα στα εργαστήρια του ΕΚΠΑ και του Χαροκοπείου, τον Γεώργιο Σταματάκη Δρ. Χημικό, την Αναστασία Μικελλίδη και τον Παναγιώτη Κανέλλο, Υποψήφιους Διδάκτορες. Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το διδακτικό προσωπικό και τους μεταπτυχιακούς φοιτητές των Εργαστηρίων για την φιλική ατμόσφαιρα και την άριστη συνεργασία που είχαμε όλα αυτά τα χρόνια.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου που ήταν δίπλα μου σε ότι χρειάστηκα, αλλά και τις καλές μου φίλες Δώρα, Σωτηρία, Νίκη, Φιλίτσα, Γκέσα που με βοήθησαν ψυχολογικά και ηθικά όλο αυτό το χρονικό διάστημα με την αγάπη τους.

‘Η ζωή είναι σύντομη, η τέχνη απέραντη, η ευκαιρία στιγμιαία και το πείραμα αβέβαιο.’

Ουμπέρτο Έκο, Το Νησί της Προηγούμενης Ημέρας

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Μελέτη της επίδρασης φαινολικών ενώσεων στην επαγόμενη από IL-1β σύνθεση
PAF σε U-937
4^0 Συμπόσιο Ομάδων Εργασίας, Ελληνική Εταιρεία Αθηροσκλήρωσης,
Ξενοδοχείο Caravel, 2-3/12/2011. Προφορική Ανακοίνωση

Ι.Χ. Βλαχογιάννη, Ε. Φραγκοπούλου, Γ. Σταματάκης, Σ. Αντωνοπούλου

2. Η επίδραση φαινολικών ενώσεων στην επαγόμενη από IL-1β σύνθεση PAF στη κυτταρική σειρά U-937. 5ο Πανελλήνιο Συνέδριο. Ελληνικό Φόρουμ Επιστήμης και Τεχνολογίας Λιπιδίων (Greek Lipid Forum). Προφορική ανακοίνωση 3/2013

Ι.Χ. Βλαχογιάννη, Ε. Φραγκοπούλου, Γ. Σταματάκης, Σ. Αντωνοπούλου

3. Effect of phenolic compounds and their acetylated derivatives on PAF biosynthesis under inflammatory conditions in U-937 cells. 8th World Congress on Polyphenols Applications June 5-6, 2014 - Lisbon, Portugal. Poster

Ioanna C. Vlachogianni, Elizabeth Fragopoulou, George M. Stamatakis, Ioannis K. Kostakis, Smaragdi Antonopoulou.

4. PAF biosynthesis in U-937 cells under inflammatory conditions is inhibited by phenolic compounds. 6th international conference on Phospholipase A2 and Lipid Mediators. February 2015, Japan. **Best Poster Award**

Ioanna C. Vlachogianni, Elizabeth Fragopoulou, George M. Stamatakis, Ioannis K. Kostakis, Tzortzis Nomikos, Smaragdi Antonopoulou

5. Anti-inflammatory activity of tyrosol, resveratrol and their derivatives in U-937 cells. 6ο Πανελλήνιο Συνέδριο. Ελληνικό Φόρουμ Επιστήμης και Τεχνολογίας Λιπιδίων (Greek Lipid Forum). Προφορική ανακοίνωση 3/2015

Ioanna C. Vlachogianni, Elizabeth Fragopoulou, George M. Stamatakis, Ioannis K. Kostakis, Smaragdi Antonopoulou.

6. Effect of tyrosol, resveratrol and their derivatives on PAF synthesis under inflammatory conditions in U-937 cells. 9th World Congress on Polyphenols Applications June 2015 - Malta. Oral presentation

Ioanna C. Vlachogianni, Elizabeth Fragopoulou, George M. Stamatakis, Ioannis K. Kostakis, Smaragdi Antonopoulou.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. In vitro assessment of antioxidant activity of tyrosol, resveratrol and their acetylated derivatives. **Vlachogianni IC**, Fragopoulou E, Kostakis IK, Antonopoulou S. Food Chem. 2015 Jun 15;177:165-73.
2. Platelet Activating Factor (PAF) biosynthesis is inhibited by phenolic compounds in U-937 cells under inflammatory conditions. **Vlachogianni IC**, Fragopoulou E, Stamatakis GM, Kostakis IK, Antonopoulou S. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2015 Sep;121(Pt B):176-83.

Περιεχόμενα

1. Κεφάλαιο 1: Φλεγμονή και Οξειδωτικό στρες.....1
1.1 Φλεγμονή 1
1.2 Μεσολαβητές της Φλεγμονής..... 6
1.2.1 Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (PAF) 6
1.2.2 Ιντερλευκίνη 1-β (IL1- β)..... 16
1.3 Μοντέλο φλεγμονής στην κυτταρική σειρά U-937 17
1.4 Οξειδωτικό στρες 19
1.5 Λιποοξυγονάση 20
2. Κεφάλαιο 2: Φαινολικές ενώσεις.....23
2.1 Εισαγωγή 23
2.2 Ορισμός 23
2.3 Κατάταξη 23
2.3.1 Απλές φαινολικές ουσίες..... 24
2.3.2 Σύνθετες φαινολικές ουσίες, Πολυφαινόλες 25
2.4 Πηγές φαινολικών ενώσεων στα τρόφιμα 30
Ελαιόλαδο..... 30
Κρασί..... 31
Τσάι, Καφές..... 32
Λαχανικά..... 32
Φρούτα..... 33
Όσπρια (σόγια- φασόλια)..... 33
Σοκολάτα..... 34
Ξηροί καρποί..... 34
2.5 Μεταβολισμός Φαινολικών ενώσεων- Εισαγωγή..... 34
2.5.1 Η είσοδος των πολυφαινολών στο πεπτικό σύστημα/ Στομάχι 36
2.5.2 Λεπτό Έντερο/ Ήπαρ..... 37
2.5.3 Παχύ έντερο 41
2.5.4 Μεταφορά σε ιστούς και όργανα απέκκρισης 42
2.6 Μεταβολισμός και βιοδιαθεσιμότητα τυροσόλης..... 44
2.7 Μεταβολισμός και βιοδιαθεσιμότητα ρεσβερατρόλης 46
3. Κεφάλαιο 3: Δράσεις των φαινολικών ενώσεων και των μεταβολιτών τους.....51
3.1 Εισαγωγή 51
3.2 Επιδημιολογικές μελέτες 51
3.3 Πειράματα in vitro με φαινολικές ενώσεις 54
3.3.1 Αντιοξειδωτική ικανότητα 54
3.3.2 Αντιφλεγμονώδης δράση 58
3.3.3 Αντικαρκινική δράση 61
3.3.4 Αντιθρομβωτική δράση 62
3.4 Πειράματα in vivo με φαινολικές ενώσεις..... 62
3.4.1 Πειραματόζωα..... 62
3.4.2 Κλινικές μελέτες..... 63
3.5 Έρευνες με μεταβολίτες φαινολικών ενώσεων 68
3.5.1 Εισαγωγή..... 68
3.5.2 Αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας μέσω της αύξησης της λιποφιλικότητας..... 68
3.5.3 Πειράματα in vitro με μεταβολίτες φαινολικών ενώσεων..... 70
4. Κεφάλαιο 4: Σκοπός.....74
5. Κεφάλαιο 5: Μεθοδολογία.....75
5.1 Σύνθεση παραγώγων τυροσόλης..... 75
5.2 Σύνθεση των παραγώγων ρεσβερατρόλης..... 82
5.3 Καλλιέργεια μονοκυττάρων U937 91
5.4 Διαχωρισμός PAF με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) [308].. 95

5.5 Ποσοτικός προσδιορισμός PAF με βιολογική δοκιμασία συσσώρευσης πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού [309] 96
5.6 Προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford [310] 100
5.7 Προσδιορισμός δραστικότητας lyso-PAF:ακετυλο-CoA ακετυλοτρανσφεράσης (λυσο PAF-AT) σε ομογενοποίημα κυττάρων [311] 101
5.8 Προσδιορισμός δραστικότητας της ανεξάρτητης DTT-αλκυλοακετυλογλυκεροη:CDP-χολίνη φωσφοχολινοτρανσφεράσης (PAF-CPT) σε ομογενοποίημα κυττάρων [30] 104
5.9 Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (TLC) λιποειδών 105
5.10 Προσδιορισμός δραστικότητας της PAF-ακετυλοϋδρολάσης (PAF-AH) σε ομογενοποίημα κυττάρων [312] 107
5.11 Προσδιορισμός βιωσιμότητας κυττάρων με τη μέθοδο MTT [313] 109
5.12 *In vitro* Οξείδωση Ορού με $Cu2^{+}$ [314] 111
5.13 Εκκαθάριση ελευθέρων ριζών DPPH [315] 113
5.14 Μη ενζυμική υπεροξείδωση με λινελαϊκό οξύ [316] 114
5.15 Αναστολή του ενζύμου λιποοξυγονάση [317] 116
5.16 Ποσοτικός προσδιορισμός φαινολικών [318] 118
5.17 Ήπια αλκαλική υδρόλυση λιποειδών [224] 119
5.18 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων 120
6. Κεφάλαιο 6: Αποτελέσματα 121
6.1 Επίδραση τυροσόλης, ρεσβερατρόλης και των ακετυλιωμένων παραγώγων τους σε αντιοξειδωτικά τεστ ελεύθερα κυττάρων 121
6.1.1 Εκκαθάριση ελευθέρων ριζών DPPH 121
6.1.2 Μη ενζυμική λιποειδική υπεροξείδωση λινελαϊκού οξέος 122
6.1.3 *In vitro* οξείδωση του ορού με Cu^{2+} 124
6.1.4 Αναστολή του ενζύμου λιποοξυγονάσης (LOX) 126
6.2 Επιβεβαίωση του μοντέλου φλεγμονής στα U937 129
6.3 Επίδραση των αρχικών φαινολικών ενώσεων στη βιωσιμότητα των U937 131
6.4 Επίδραση των αρχικών φαινολικών ενώσεων στο μεταβολισμό του PAF στα μη διεγερμένα U937 κύτταρα 131
6.5 Επίδραση των αρχικών φαινολικών ενώσεων στο μεταβολισμό του PAF στα διεγερμένα U937 κύτταρα 132
6.5.1 Επίδραση των αρχικών φαινολικών ενώσεων στα ενδοκυτταρικά επίπεδα του PAF στα διεγερμένα U937 κύτταρα 132
6.5.2 Επίδραση των αρχικών φαινολικών ενώσεων στη δραστικότητα της PAF-CPT στα διεγερμένα U937 κύτταρα 134
6.5.3 Επίδραση των αρχικών φαινολικών ενώσεων στη δραστικότητα της λυσο PAF-AT στα διεγερμένα U937 κύτταρα 135
6.5.4 Επίδραση των αρχικών φαινολικών ενώσεων στη δραστικότητα της PAF-AH στα διεγερμένα U937 κύτταρα 136
6.6 Επίδραση των ακετυλιωμένων παραγώγων στη βιωσιμότητα των U937 136
6.7 Επίδραση των ακετυλιωμένων παραγώγων των φαινολικών ενώσεων στο μεταβολισμό του PAF στα διεγερμένα U937 κύτταρα 137
6.7.1 Επίδραση των ακετυλιωμένων φαινολικών ενώσεων στα ενδοκυτταρικά επίπεδα του PAF στα διεγερμένα U-937 κύτταρα 137
6.7.2 Επίδραση των ακετυλιωμένων φαινολικών ενώσεων στη δραστικότητα της PAF-CPT στα διεγερμένα U937 κύτταρα 140
6.7.3 Επίδραση των ακετυλιωμένων φαινολικών ενώσεων στη δραστικότητα της λυσο PAF-AT στα διεγερμένα U937 κύτταρα 141
6.7.4 Επίδραση των ακετυλιωμένων παραγώγων στη δραστικότητα της PAF-AH σε διεγερμένα U937 κύτταρα 142
6.8 Επίδραση των μεθυλιωμένων παραγώγων της ρεσβερατρόλης στη βιωσιμότητα των U937 142

6.9 Επίδραση των μεθυλιωμένων παραγώγων της ρεσβερατρόλης στο μεταβολισμό του PAF στα διεγερμένα U937 κύτταρα 143
6.9.1 Επίδραση των μεθυλιωμένων παραγώγων ρεσβερατρόλης στο μεταβολισμό του PAF σε διεγερμένα κύτταρα U-937 στη 0,5h 143
6.9.2 Επίδραση των μεθυλιωμένων παραγώγων ρεσβερατρόλης στο μεταβολισμό του PAF σε διεγερμένα κύτταρα U937 στις 3h 145
6.10 Επίδραση των γλυκουρονιωμένων παραγώγων των φαινολικών ενώσεων στη βιωσιμότητα των U937 146
6.11 Επίδραση των γλυκουρονιωμένων παραγώγων των φαινολικών ενώσεων στο μεταβολισμό του PAF στα διεγερμένα U937 κύτταρα 147
6.11.1 Επίδραση των γλυκουρονιωμένων παραγώγων των φαινολικών ενώσεων στο μεταβολισμό του PAF σε διεγερμένα κύτταρα U937 στη 0,5h 147
6.11.2 Επίδραση των γλυκουρονιωμένων παραγώγων των φαινολικών ενώσεων στο μεταβολισμό του PAF σε διεγερμένα κύτταρα U937 στις 3h 149
7. Κεφάλαιο 7: Συζήτηση 151
7.1 Σχολιασμός των αποτελεσμάτων που αφορούν την επίδραση της τυροσόλης, της ρεσβερατρόλης και των παραγώγων τους σε αντιοξειδωτικά τεστ ελεύθερα κυττάρων . 151
7.2 Σχολιασμός των αποτελεσμάτων που αφορούν την επίδραση της τυροσόλης, της ρεσβερατρόλης και των παραγώγων τους στο μεταβολισμό του PAF σε διεγερμένα U937 κύτταρα 157
8. Κεφάλαιο 8: Γενικά Συμπεράσματα.....164
9. Κεφάλαιο 9: Βιβλιογραφία 167

Ορολογία

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός Όρος
Adiponectin	Αδιπονεκτίνη
Apo lipoprotein B	Απολιποπρωτεΐνη Β
C reactive protein	C Αντιδρώσα πρωτεΐνη
Cytokine	Κυτταροκίνη
Diacylglycerol	Διακυλογλυκερόλη
Epidermal growth factor	Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας
Fibrinogen	Ινωδογόνο
Foam cells	Αφρώδη κύτταρα
Glutathione peroxidase	Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης
High performance liquid chromatography	Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης
Intima	Χιτώνας
Lipopolysaccharide	Λιποπολυσακχαρίτης
Low Density Lipoproteins	Λιποπρωτεΐνες Χαμηλής Πυκνότητας
Lyso-phospatidyl choline	Λυσοφωσφατιδυλοχολίνη
Matrix Metalloproteinases	Μεταλλοπρωτεάσες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας
Monocyte chemotactic protein-1	Χημειοτακτική πρωτεΐνη-1 των μονοκυττάρων
PAF acetyl hydrolase	PAF ακετυλουδρολάση
PAF like	Δραστικά και δομικά ανάλογα του PAF
PAF receptor	Υποδοχέας PAF
Phosphate buffered saline	Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και χλωριούχων αλάτων
Phospholipase	Φωσφολιπάση
Platelet Activating Factor	Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων
Smooth muscle cells	Λεία μυϊκά κύτταρα
Superoxide dismutase	Δισμουτάση του υπεροξειδίου
Thin layer chromatography	Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας
Thiobarbituric acid	Θειοβαρβιτουρικό οξύ
Triacylglycerol	Τριακυλογλυκερόλη
Tumor Necrosis Factor-a	Παράγοντας νέκρωσης όγκων-a

Συντομογραφίες

CRP	C reactive protein
DAG	Diacylglycerol
EGF	Epidermal growth factor
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor
GPx	Glutathione peroxidase
HPLC	High performance liquid chromatography
LDL	Low Density Lipoproteins
LPS	Lipopolysaccharide
lyso-PC	lyso-phospatidyl choline
MCP-1	Monocyte chemotactic protein-1
NF-kB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
PAF	Platelet Activating Factor
PAF-AH	PAF acetyl hydrolase
PAF-R	PAF receptor
PBS	Phosphate buffered saline
SOD	Superoxide dismutase
SULT	Sulfotransferase
TBA	Thiobarbituric acid
TLC	Thin layer chromatography
TNF-a	Tumor Necrosis Factor-a
TNFR	TNF receptor
UDPGT	UDP -Glucuronosyltransferase
Α.Π.	Ακετυλιωμένα παράγωγα
Γ.Π.	Γλυκουρονιωμένα παράγωγα
Μ.Π.	Μεθοξυ-παράγωγα

Περίληψη

Η κατανάλωση των φαινολικών ενώσεων σχετίζεται με ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία του ανθρώπου όπως αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη. Όμως η βιοδιαθεσιμότητά τους είναι χαμηλή αφού μεταβολίζονται γρήγορα. Για το λόγο αυτό τα τελευταία χρόνια το επιστημονικό ενδιαφέρον επικεντρώνεται στη μελέτη α) της αύξησης της βιοδιαθεσιμότητας και β) της δράσης των μεταβολιτών τους. Ο σκοπός αυτής της μελέτης ήταν να διερευνηθεί η *in vitro* αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση της τυροσόλης (T), της ρεσβερατρόλης (R) των ακετυλιωμένων (AcDs) και μεθόξυ (MethDs) παραγώγων τους που αυξάνουν τη λιποφιλικότητα, με σκοπό να βελτιωθεί η απορρόφηση. Αλλά και η δοκιμασία των γλυκουρονιωμένων παράγωγων (GluDs) της T, R, μορφή που αποτελεί μία από τις βασικές των μεταβολιτών των φαινολικών ενώσεων.

Τα AcDs και GluDs των T, R και τα MethDs της R που συντέθηκαν χημικά, διαχωρίστηκαν με χρωματογραφία στήλης και χαρακτηρίστηκαν δομικά με NMR, δοκιμάστηκαν για την ικανότητά τους να αναστέλλουν την δραστικότητα της λιποοξυγονάσης από σόγια (LOX). Οι αρχικές φαινολικές ενώσεις T, R και τα AcDs δοκιμάστηκαν για την ικανότητά τους να δεσμεύουν τις DPPH ρίζες, να αναστέλλουν τη μη ενζυμική υπεροξείδωση λινελαϊκού οξέος και να αναστέλλουν την οξείδωση ανθρώπινου ορού παρουσία ιόντων χαλκού.

Η T παρουσίασε ανασταλτική δράση μόνο στην οξείδωση του ορού, όπου το παράγωγο T-ακέτυλο στο αρωματικό-OH ήταν πιο δραστικό. Το T-ακέτυλο στο αλειφατικό-OH και το 3,5-διακετυλο-R παρουσίασαν την πιο ισχυρή δράση στη μη-ενζυμική υπεροξείδωση λινελαϊκού οξέος με τιμές IC_{50} 2,4 mM ± 0.21 και 0.055 ± 0.0018 mM αντίστοιχα. Στις άλλες δοκιμασίες η R εμφάνισε πιο ισχυρή δράση μεταξύ των AcD, GluD και της T, με εξαίρεση το παράγωγο 3,5-διμέθυλο R που βελτιώνει τη δράση έναντι της δραστικότητας της λιποοξυγονάσης.

Η αντιφλεγμονώδης δράση των T, R και των παραγώγων τους δοκιμάστηκαν έναντι της ικανότητας τους να επηρεάζουν τον μεταβολισμό του Παράγοντα Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (PAF) μετά τη διέγερση με ιντερλευκίνη 1β (IL-1β) στα κύτταρα U-937.

Τα U-937 διεγέρθηκαν με IL-1β (2,5 ng/mL) παρουσία ή απουσία T, R και παραγώγων τους στις 0,5 και 3h. Τα ενδοκυτταρικά επίπεδα PAF καθώς επίσης και η ειδική δραστικότητα της ανεξάρτητης DTT CDP-χολίνη 1-αλκυλο-2-ακετυλο-sn-γλυκερόλη χολινοφωσφοτρανσφεράσης (PAF-CPT) στη 0,5h και ακετυλο-CoA: lyso-PAF ακετυλοτρανσφεράσης (λυσο-PAF AT) στις 3h μετρήθηκαν σε ομογενοποιήματα κυττάρων. Η συγκέντρωση που είναι ικανή να επάγει 50% αναστολή στη δράση της IL-1β, υπολογίστηκε με την παρουσία της T και της R. Τα AcD και GluD T και R ελέγχθηκαν σε συγκεντρώσεις ίσες με την τιμή της αρχικής ένωσης, αλλά τα MethDs της R δοκιμάστηκαν σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις.

Η συγκέντρωση T και R που ήταν ικανή να επάγει 50% αναστολή στη δράση της IL-1β επί της λυσο-PAF-AT στις 3h ήταν 48 ± 11 μM και 157 μM ± 77, για PAF-CPT στη 0,5h 246 μM ± 61 και 294 ± 102 μM, αντίστοιχα. Η ίδια τάξη συγκέντρωσης παρατηρήθηκε στη μέτρηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων του PAF μετά από την διέγερση με την IL-1β. Όλα τα AcDs της T εμφάνισαν την ίδια δράση στη δραστικότητα της λυσο-PAF-AT και στα επίπεδα PAF στις 3h. Μεταξύ των πέντε AcDs της R, μόνο το 3,5-διακετυλο-R έδειξε παρόμοια δράση με τη R στα βιοσυνθετικά ένζυμα του PAF και τα επίπεδα του PAF στη 0,5h. Όλα τα MethD ήταν

πιο ισχυροί αναστολείς από το R στη PAF-CPT, ενώ μόνο τα δύο μονο- MethDs έδειξαν την ίδια δράση με την R στη δραστικότητα της λυσο-PAF-AT και στα ενδοκυτταρικά επίπεδα του PAF. Τα GluDs T και R φαίνεται να διατηρούν την ανασταλτική δράση τους στη σύνθεση του PAF.

Η αύξηση της λιποφιλικότητας με ακετυλίωση βελτιώνει την αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών ενώσεων στη μη-ενζυμική λιποειδική υπεροξείδωση και η μεθυλίωση στη ενζυμική λιπιδική υπεροξείδωση, έναντι του ενζύμου LOX.

Η T και η R αναστέλλουν την παραγωγή PAF με την T να εμφανίζει πιο ισχυρή δράση. Η ακετυλίωση φαίνεται να διατηρεί την ανασταλτική επίδραση της T. Στη περίπτωση της R, η ακετυλίωση σε συγκεκριμένες θέσεις είχε ως αποτέλεσμα ενώσεις με την ίδια ανασταλτική δραστικότητα, ενώ η μεθυλίωση βελτιώνει την ανασταλτική δράση της R κυρίως στη 0,5h. Οι γλυκουρονιωμένοι μεταβολίτες φαίνεται να διατηρούν την αντιφλεγμονώδη δράση των ενώσεων.

Συμπερασματικά, η σύνθεση μορίων με αυξημένη λιποφιλικότητα διατηρεί ή βελτιώνει την ευεργετική δράση των αρχικών φαινολικών ενώσεων. Ακόμα τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής αποτελούν απόδειξη ότι οι μεταβολίτες των φαινολικών ενώσεων έχουν βιολογική δράση.

Λέξεις-Κλειδιά: τυροσόλη, ρεσβερατρόλη, λιποφιλικότητα, μεταβολίτες, PAF

Abstract

Consumption of phenolic compounds is associated with beneficial effects in humans even though many of them are poorly absorbed and quickly metabolized. The aim of this study was to investigate the *in vitro* antioxidant and anti-inflammatory activity of tyrosol(T), resveratrol(R) and their acetylated (AcDs) and methylated (MethDs) derivatives which increase lipophilicity in order to improve absorption. Glucuronated (GluDs) derivatives of T, R, one of the most common phenolic compounds metabolites, were also tested.

The chemically synthesized AcDs and GluDs of T,R and MethDs of R tested for their ability to inhibit soybean lipoxygenase (LOX) activity. The AcDs T,R were evaluated for their ability to scavenge DPPH radicals, inhibit non-enzymatic linoleic acid peroxidation and inhibit human serum oxidation in the presence of copper ions.

T showed an inhibitory effect only in serum oxidation, where the T-acetylated at aromatic-OH was the most active. The T-acetylated at aliphatic-OH and 3,5-diacetyl-R exhibited the most powerful affect in non-enzymatic linoleic acid peroxidation with IC_{50} values 2.4mM ± 0.21 and 0.055mM ± 0.0018 respectively. In the other tests R was the most potent among all its AcD, GluD and T, with the exception of 3,5-dimethylated R which improves parent's compounds anti-LOX activity.

The anti-inflammatory activity of T, R and their derivatives tested against their ability to modulate Platelet Activating Factor (PAF) metabolism after the Interleukin 1beta (IL-1β) stimulation in U-937 cells.

The AcD and GluD of T, R and MethD of R were chemical synthesized, separated by column chromatography and structurally characterized by NMR. U-937 were stimulated by IL-1β (2.5ng/mL) in presence or absence of T, R and their derivatives for 0.5 and 3h. Intracellular PAF levels as well as the specific activity of DTT-insensitive CDP-choline 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol cholinephosphotransferase (PAF-CPT) at 0.5h and acetyl-CoA:lyso- PAF acetyltransferase (lyso-PAF AT) at 3h has been determined in cells homogenates. The concentration capable of inducing 50% inhibition in IL-1β effect was calculated in the presence of T and R. The AcD and GluD of T and R were tested at concentrations equal to this value of the initial compound, but the MethDs of R were tested in lower concentrations.

T and R concentration capable of inducing 50% inhibition in IL-1β effect on lyso-PAF-AT at 3 h was 48 μM ± 11 and 157 μM ± 77, for PAF-CPT at 0.5 h 246 μM ± 61 and 294 μM ± 102, respectively. The same order of concentration was also observed on inhibiting PAF levels produced by IL-1β. All the AcDs of T exhibited the same action on lyso-PAF-AT activity and PAF levels at 3h. Among the five AcDs of R, only the 3,5-diacetyl-R showed similar action with R on PAF biosynthetic enzymes and PAF levels at 0.5h. All MethDs of R were more potent inhibitors than R concerning PAF-CPT, while only the two mono-MethDs showed the same action with R on lyso-PAF-AT activity and intracellular PAF levels. The GluD of T and R seem to retain their inhibitory effect against PAF synthesis.

Increasing lipophilicity by acetylation improves antioxidant activity of phenolic compounds in non-enzymatic lipid peroxidation assays and by methylation improves the anti-LOX activity.

T and R inhibit PAF production with T being the more potent one. Acetylation seems to retain the inhibitory effect of T. In the case of R, acetylation and methylation

in specific positions resulted in compounds with the same inhibitory activity, whereas methylation improves the inhibitory action of R on PAF-CPT. The glucuronated metabolites seem to retain the inflammatory activity of the phenolic compounds.

In conclusion, the synthesis of derivatives with increased lipophilicity maintains or improves the beneficial effect of the parent phenolic compounds. The results of this study prove that metabolites of phenolic compounds have biological activity.

Keywords: tyrosol, resveratrol, lipophilicity, metabolites, PAF

Κεφάλαιο 1: Φλεγμονή και Οξειδωτικό στρες

1.1 Φλεγμονή

Η φλεγμονή αποτελεί την εντοπισμένη απόκριση του σώματος στη μόλυνση ή τον τραυματισμό. Ο μηχανισμός πυροδότησής της, περιλαμβάνει κυρίως τον ιστικό ή τον κυτταρικό τραυματισμό και έχει ως σκοπό την καταστροφή ή απενεργοποίηση των ξένων εισβολέων και την εγκατάσταση της επιδιόρθωσης της ιστικής βλάβης. Στους μηχανισμούς φλεγμονής λαμβάνουν χώρα κυρίως τα φαγοκυτταρικά κύτταρα (ουδετερόφιλα, μακροφάγα, μακροφαγομιμητικά κύτταρα). Στην πραγματικότητα η φλεγμονή αποτελεί μια προστατευτική διαδικασία για τον οργανισμό, αφού είναι η έναρξη της αποκατάστασης του τραύματος του ιστού που προσβλήθηκε.

Πολλά από τα κλασικά συμπτώματα της φλεγμονώδους αντίδρασης περιγράφονται ήδη από το 1600 π.Χ., σε Αιγυπτιακά συγγράμματα. Κατά τον $1^{ο}$ μ.Χ. αιώνα, περιγράφονται από τον Ρωμαίο γιατρό Celsus, τα "τέσσερα θεμελιώδη συμπτώματα της φλεγμονής" όπως ερυθρότητα (rubor), οίδημα (tumor), θερμότητα (calor) και πόνος (dolor). Στο $2^{ο}$ μ.Χ. αιώνα, ένας άλλος γιατρός ο Galen, προσέθεσε ένα πέμπτο σύμπτωμα, την απώλεια της λειτουργίας (laesa).

Ο τρόπος που ενεργοποιείται η φλεγμονώδης απόκριση είναι μια πολύπλοκη σειρά γεγονότων που περιλαμβάνουν ποικιλία χημικών μεσολαβητών των οποίων οι αλληλεπιδράσεις είναι εν μέρει μόνο κατανοητές. Μερικοί εκ των μεσολαβητών προέρχονται από την εισβολή των μικροοργανισμών, κάποιοι από τα κατεστραμμένα κύτταρα ως απάντηση της ιστικής βλάβης, ενώ άλλοι παράγονται από ενζυμικά συστήματα. Τέλος, ορισμένοι φλεγμονώδεις μεσολαβητές είναι προϊόντα των διαφόρων λευκοκυττάρων που συμμετέχουν στη φλεγμονώδη απόκριση [1].

Η αλληλουχία γεγονότων σε μία μη ειδική τοπική φλεγμονώδη απόκριση ξεκινάει με την αρχική είσοδο των βακτηρίων στους ιστούς ή τον τραυματισμό των ενδοθηλιακών κυττάρων. Αυτή οδηγεί σε αγγειοδιαστολή στη μικροκυκλοφορία της φλεγμαίνουσας περιοχής και αύξηση της διαπερατότητας του ενδοθηλίου, μέσω της έκκρισης μιας ποικιλίας μεσολαβητών. Με την αυξημένη αιματική ροή επιτυγχάνεται αυξημένη μεταφορά βιομορίων και λευκοκυττάρων με αποτέλεσμα να αυξάνεται η διαπερατότητα και να επιτυγχάνεται η μεταφορά τους από το πλάσμα στο μεσοκυττάριο υγρό. Παράλληλα προκαλείται διήθηση του πλάσματος προς το

μεσοκυττάριο υγρό και σχηματισμός οιδήματος. Ταυτόχρονα χημειοτακτικοί παράγοντες επάγουν την μετακίνηση λευκοκυττάρων-μονοκυττάρων στην φλεγμαίνουσα περιοχή και την ταυτόχρονη έκκριση μορίων προσκόλλησης τόσο στην επιφάνεια των μονοκυττάρων, όσο και στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων. Τα μόρια αυτά προσκόλλησης επιτρέπουν αρχικά την συγκράτηση των λευκοκυττάρων-μονοκυττάρων στο ενδοθήλιο και στη συνέχεια τη διαπίδυσή τους στον υποενδοθηλιακό χώρο. Τα λευκοκύτταρα, με την είσοδό τους στον υποενδοθηλιακό χώρο προκαλούν την καταστροφή βακτηρίων, είτε μέσω φαγοκυττάρωσης είτε μέσω μηχανισμών που δεν απαιτούν φαγοκυττάρωση. Το φαγοκύτταρο εγκολπώνει τον μικροοργανισμό και το εσωτερικό κυστίδιο που τον περικλείει λέγεται φαγόσωμα. Η μεμβράνη του φαγοσώματος συντήκεται με τα λυσοσώματα και το καινούργιο κυστίδιο λέγεται φαγολυσόσωμα. Εκεί τα μόρια του μικροοργανισμού διασπώνται από τα λυσοσωμικά ένζυμα. Τα φαγοκύτταρα μπορούν και χωρίς φαγοκυττάρωση να καταστρέψουν τους μικροοργανισμούς με το να εκκρίνουν αντιμικροβιακές ουσίες (π.χ. NO και H_2O_2). Κάποιες από αυτές τις ουσίες λειτουργούν και ως μεσολαβητές της φλεγμονής.

Ένας άλλος τρόπος εξολόθρευσης μικροοργανισμών χωρίς φαγοκυττάρωση είναι μέσω της οδού του συμπληρώματος. Το συμπλήρωμα είναι οικογένεια πρωτεϊνών του πλάσματος που ενεργοποιούνται με διαδοχικές πρωτεολύσεις και αποτελείται από 30 διαφορετικές πρωτεΐνες.

Πέντε από τις ενεργές πρωτεΐνες που προκύπτουν σχηματίζουν το μεμβρανοεπιθετικό σύμπλεγμα (MAC), το οποίο τοποθετείται στη μεμβράνη του μικροοργανισμού και σχηματίζει πόρους μέσα από τους οποίους διαρρέει νερό και ηλεκτρολύτες με αποτέλεσμα να διαταράσσεται το ενδοκυτταρικό ιοντικό περιβάλλον και να καταστρέφεται ο μικροοργανισμός. Μερικά από τα ενεργά μόρια του συμπληρώματος μπορούν και έμμεσα να εξολοθρεύσουν ένα μικροοργανισμό με το να προκαλέσουν αγγειοδιαστολή, αυξημένη διαπερατότητα, χημειοταξία.

Το τελευταίο στάδιο του μηχανισμού της φλεγμονής, είναι η ιστική επιδιόρθωση. Στη φάση αυτή γίνεται (όπου επιτρέπεται) πολλαπλασιασμός των ειδικών για κάθε ιστό κυττάρων ώστε να επουλωθεί η πληγή. Χαρακτηριστικός είναι ο πολλαπλασιασμός ινοβλαστών που εγκαθίστανται στη περιοχή, διαιρούνται ταχέως και αρχίζουν να εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες κολλαγόνου. Επίσης, τα κύτταρα των αγγείων πολλαπλασιάζονται με την διεργασία της νεοαγγειογένεσης. Οι διεργασίες

αυτές ενεργοποιούνται μέσω χημικών μεσολαβητών και ειδικότερα μέσω μίας ομάδας αυξητικών παραγόντων που παράγονται τοπικά. Τέλος παρατηρείται ιστικός επανασχεδιασμός, ο οποίος μπορεί να είναι ατελής και να αφήσει ουλή.

Οι χημικοί μεσολαβητές της φλεγμονής είναι δύο γενικών κατηγοριών:

α) πεπτίδια που παράγονται στο σημείο φλεγμονής μέσω ενζυμικών δράσεων σε πρωτεΐνες του πλάσματος και

β) ουσίες που εκκρίνονται από κύτταρα που υπάρχουν ήδη στη μολυσμένη περιοχή ή έρχονται σε αυτή κατά τη διάρκεια της φλεγμονής.

Οι σημαντικότεροι από αυτούς φαίνονται στον **Πίνακα 1**:

Πίνακας 1: Οι σημαντικότεροι χημικοί μεσολαβητές της φλεγμονής

Μεσολαβητής	Προέλευση
Κινίνες	Παράγονται μέσω ενζυμικής δράσης από τις πρωτεΐνες του πλάσματος
Πρωτεΐνες συμπληρώματος	Παράγονται μέσω ενζυμικής δράσης από τις πρωτεΐνες του πλάσματος
Παράγοντες πήξης	Παράγονται μέσω ενζυμικής δράσης από τις πρωτεΐνες του πλάσματος
Ισταμίνη	Εκκρίνεται από μαστοκύτταρα
Εικοσανοειδή	Εκκρίνεται από πολλούς τύπους κυττάρων
Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (PAF)	Παράγεται από πολλούς τύπους κυττάρων
Κυτταροκίνες	Εκκρίνονται από μονοκύτταρα, μακροφάγα, ουδετερόφιλα, λεμφοκύτταρα και από κύτταρα που δεν ανήκουν στο ανοσοποιητικό σύστημα όπως ενδοθηλιακά κύτταρα και ινοβλάστες
NO	Παράγεται από Ουδετερόφιλα, μακροφάγα
Λυσοσωμικά ένζυμα	Παράγονται από Ουδετερόφιλα, μακροφάγα

Η φλεγμονή μπορεί να ταξινομηθεί σε οξεία και χρόνια. Η οξεία είναι η αρχική απόκριση του οργανισμού στην εισβολή του αντιγόνου ή στη βλάβη και έχει σαν αποτέλεσμα την ταχεία μεταφορά των λευκών αιμοσφαιρίων, μέσω του αίματος στον προσβληθέντα ιστό. Η χρόνια φλεγμονή οδηγεί σε προοδευτική μετατόπιση του τύπου των κυττάρων που υπάρχουν στην περιοχή της φλεγμονής και χαρακτηρίζεται από ταυτόχρονη καταστροφή και επούλωση του ιστού από τη φλεγμονώδη διαδικασία [2-4].

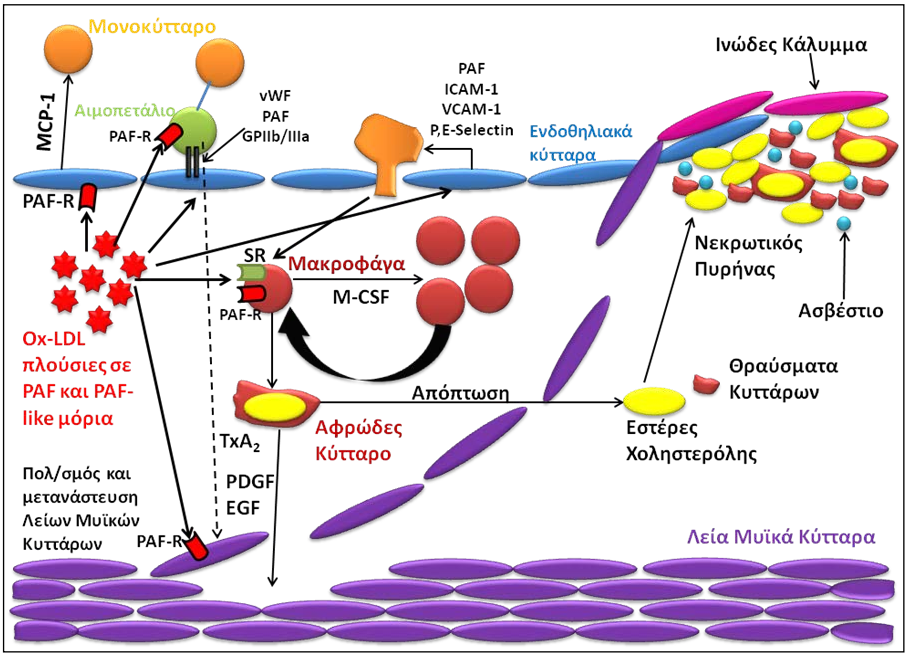
Η σύνδεση της φλεγμονής με χρόνια νοσήματα μελετάται από πολύ παλιά και είναι καλά τεκμηριωμένη. Η χρόνια επικράτηση της φλεγμονής στο ανθρώπινο σώμα έχει συνδεθεί με νόσους όπως αυτοάνοσες ασθένειες, συμπεριλαμβανομένων της ψωρίασης, της ψωριασικής αρθρίτιδας, της νόσου του Behcet, της αρθρίτιδας, φλεγμονωδών νόσων του εντέρου, της αλλεργίας καθώς και πολλές καρδιαγγειακές, νευρομυϊκές, και μολυσματικές ασθένειες. Τα νοσήματα αυτά χαρακτηρίζονται από την απορύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος και την ενεργοποίηση της παραγωγής κυτταροκινών όπως η IL-1β, IL-6 ή TNF-α που είναι γνωστές για την αύξηση τους σε φλεγμονώδεις καταστάσεις.

Η αθηροσκλήρωση είναι μία από τις πολλές νόσους που συνδέονται με την ενεργοποίηση της φλεγμονής, μέσα από την παραγωγή φλεγμονωδών παραγόντων όπως ο Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (Platelet Activating Factor PAF) που είναι ο δραστικότερος μέχρι σήμερα γνωστός λιποειδικός μεσολαβητής της φλεγμονής [5, 6].

Μόρια με PAF-like δράσεις μπορεί να προκύψουν μέσω της οξείδωσης από έκθεση σε μολυντές ή τοξίνες του περιβάλλοντος, σε ασυνήθιστα μεγάλες ποσότητες, από κύτταρα που δεν είναι παραγωγοί, αλλά ούτε και μεσολαβητές των σημάτων που προκαλεί ο PAF. Τα PAF-like φωσφολιποειδή παράγονται από μη ενζυμική δράση κυρίως κατά την οξείδωση των LDL, διαδικασία που εμπλέκεται σε πλήθος παθοφυσιολογικών καταστάσεων αλλά και της αθηροσκλήρωσης. Τα μόρια αυτά ενεργοποιούν τους ειδικούς υποδοχείς του PAF και λειτουργούν ως ανταγωνιστές.

Οι ox-LDL οι οποίες είναι πλούσιες σε PAF και PAF-like μόρια **(Εικόνα 1)** ενεργοποιούν τα ενδοθηλιακά κύτταρα, μέσω της σύνδεσης τους στον PAF-R, αυξάνοντας τη βιοσύνθεση κυτταροκινών και παραγόντων συγκόλλησης με ταυτόχρονη αύξηση της διακυτταρικής απόστασης επιφέροντας αύξηση της

διαπερατότητας του ενδοθηλίου [7]. Οι παράγοντες συγκόλλησης δεσμεύουν αιμοπετάλια και μονοκύτταρα τα οποία σε φυσιολογικές συνθήκες κυλούν πάνω στον αρτηριακό αυλό. Στη συνέχεια τα μονοκύτταρα εισέρχονται στον υποενδοθηλιακό χώρο όπου διαφοροποιούνται σε μακροφάγα. Τα μακροφάγα προσλαμβάνουν ανεξέλεγκτα τις ox-LDL σχηματίζοντας τα αφρώδη κύτταρα τα οποία τελικά οδηγούνται σε απόπτωση απελευθερώνοντας το περιεχόμενό τους σχηματίζοντας το νεκρωτικό πυρήνα. Ταυτόχρονα η έκκριση κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων από τα αφρώδη και τα αιμοπετάλια οδηγεί στο πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των λείων μυϊκών κυττάρων προς το ενδοθήλιο σχηματίζοντας το ινώδες κάλυμμα και άρα την αθηρωματική πλάκα.



Εικόνα 1: Συνοπτική σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού αθηρωμάτωσης με εμπλοκή του PAF

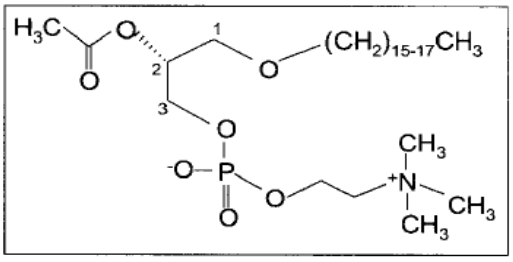
1.2 Μεσολαβητές της Φλεγμονής

1.2.1 Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (PAF)

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. Οι πρώτες ενδείξεις για την ύπαρξη του PAF εμφανίστηκαν το 1966 με την ανακάλυψη μηχανισμού ενεργοποίησης των λευκοκυττάρων κουνελιού από αντιγόνα, ο οποίος ήταν ανεξάρτητος από το συμπλήρωμα και προκαλούσε έκκριση ισταμίνης από τα αιμοπετάλια. Το 1977 αποδείχτηκε η φωσφολιποειδική φύση του μορίου και τελικά το 1979 οι Demopoulos et al. ανακοίνωσαν την ημισυνθετική παρασκευή της 1-O-αλκυλο-2-ακετυλο-*sn*-γλυκερο-3-φωσφοχολίνης, η οποία είχε την ίδια βιολογική, χημική, και χρωματογραφική συμπεριφορά με αυτή του φυσικά απομονωμένου PAF. Αμέσως μετά, η ομάδα του Benveniste ανακοίνωσε μια διαφορετική ημισυνθετική πορεία παρασκευής του PAF ενώ εννέα μήνες αργότερα διευκρινίστηκε και η δομή του φυσικά απαντώμενου PAF, από βασεόφιλα κουνελιού, η οποία ήταν η ίδια με αυτή του συνθετικού PAF. Την ίδια χρονική περίοδο οι *Blank et al* ανακοίνωσαν την ημισυνθετική παρασκευή του αντιϋπερτασικού πολικού λιποειδούς του νεφρού (antihypertensive polar renomedullary lipid, APRL) το οποίο είχε απομονωθεί από μυελό νεφρού κουνελιού, είχε σημαντικές αντιϋπερτασικές ιδιότητες και εμφάνιζε τα ίδια δομικά χαρακτηριστικά με τον PAF [8]. Τελικά αποδείχτηκε ότι το APRL και ο PAF αντιστοιχούσαν στο ίδιο μόριο. Η παρουσία του PAF είχε ανιχνευθεί και σε εκχυλίσματα εγκεφάλου βοδιού, από τα οποία απομονώθηκε το 1976, ο αγγειοδιασταλτικός παράγοντας που ονομάστηκε depressor-I, ο οποίος είχε χρωματογραφική συμπεριφορά παρόμοια με την λυσο-φωσφατιδυλοχολίνη. Αργότερα, αποδείχτηκε ότι ο παράγοντας αυτό ήταν ένα μίγμα μοριακών ειδών και αναλόγων του PAF.

Ο PAF είναι ένα ισχυρό προ-φλεγμονώδες φωσφολιποειδές το οποίο ευθύνεται για πλήθος παθολογικών και φυσιολογικών δράσεων. Βέβαια διευρύνοντας αυτή τη χημική δομή **Εικόνα 2** [9] αναφερόμαστε σε μια μεγάλη οικογένεια δραστικών

μορίων που περιέχει δομικά και μη, ανάλογα του PAF (PAF-like). Τα επίπεδα του PAF στους ιστούς και στα κύτταρα ρυθμίζονται μέσω των βιοσυνθετικών και των αποικοδομητικών ενζύμων [5, 10-13].



Εικόνα 2: Η χημική δομή του μορίου 1-O-αλκυλο-2-ακετυλ-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη

Το ανάλογο με την ακετυλομάδα στην *sn*-2 θέση προκαλεί λειτουργίες όπως επούλωση τραύματος, φλεγμονή, απόπτωση, αγγειογένεση και ευθύνεται για τις φυσιολογικές λειτουργίες που προκαλεί αυτή η ομάδα. Πολλοί παράγοντες μπορεί να διεγείρουν τη έκκριση του PAF, πιθανοί μεσολαβητές είναι φλεγμονώδεις και θρομβοτικοί παράγοντες, έτσι δρα σαν σήμα για την μετέπειτα ενεργοποίηση της φλεγμονής. Οι υποδοχείς του με το κατάλληλο ερέθισμα εκφράζονται στην επιφάνεια διαφόρων κυττάρων, ώστε να συνδεθούν τα PAF-like μόρια και να ενεργοποιήσουν ιστούς και όργανα. Ο PAF παράγεται από πληθώρα κυττάρων όπως τα αιμοπετάλια, τα μονοκύτταρα, τα μακροφάγα, τα αφρώδη και τα ενδοθηλιακά κύτταρα τόσο σε φυσιολογικές συνθήκες αλλά και στη φλεγμονή [14], ενώ υποδοχείς του υπάρχουν, εκτός από τα παραπάνω, και σε κύτταρα της καρδιάς, της σπλήνας, των νεφρών, του εγκεφάλου και του ήπατος [15].

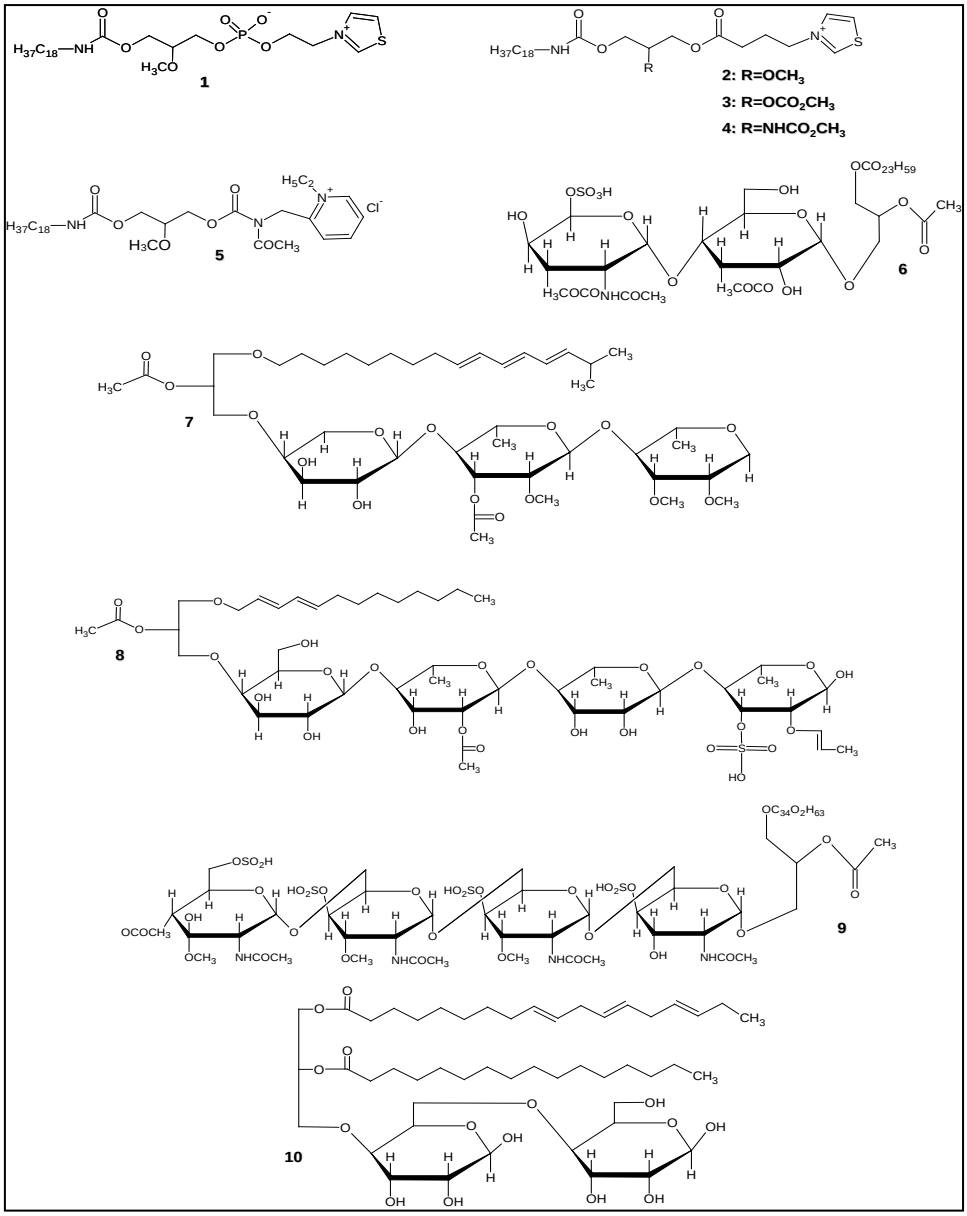
Τα επίπεδα του PAF στον οργανισμό αυξάνονται σε διάφορες παθοφυσιολογικές καταστάσεις όπως η φλεγμονή, η αλλεργία, το άσθμα, ο διαβήτης και το κάπνισμα, που ταυτόχρονα αποτελούν παράγοντες κινδύνου για την εξέλιξη της αθηρωματικής νόσου. Το πρώτο και κυριότερο στάδιο του μηχανισμού που έχει προταθεί και εμπλέκει την παραγωγή του PAF στη διαδικασία της αθηρογένεσης, είναι η αύξηση των επιπέδων του PAF στο αίμα, η οποία συμβαίνει κατά τη διάρκεια του οξειδωτικού στρες μέσω της οξείδωσης των LDL και της υπεροξείδωσης των φωσφολιποειδών των κυτταρικών μεμβρανών.

Βέβαια η πορεία με την οποία ενεργοποιείται η παραγωγή τους διαφέρει σε διάφορους τύπους κυττάρων, παρότι τα μόρια και τα γονίδια που εμπλέκονται στην πορεία μεταγωγής σήματος του PAF δεν έχουν ακόμα διευκρινιστεί πλήρως.

Οι συνεχείς έρευνες γύρω από το μόριο ανέδειξαν την ύπαρξη και άλλων μορίων με παρόμοια δομή και βιοχημικές δράσεις με τον PAF, την οικογένεια των «PAF-like» μορίων. Στην περίπτωση των δομικών αναλόγων του, μπορεί να είναι εστερικά ανάλογα στην *sn*-1 θέση ή υποκατεστημένα με λιπαρά οξέα μεγαλύτερης αλύσου στην *sn*-2, γεγονός βέβαια που μειώνει κατά πολλές τάξεις μεγέθους την βιολογική δραστικότητα των μορίων αυτών.

Οι ερευνητικές ομάδες του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου και του Τμήματος Χημείας του Ε.Κ.Π.Α έχουν μελετήσει πλήθος τροφίμων που βρίσκονται στο πλαίσιο της Μεσογειακής δίαιτας ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τις δράσεις του PAF. Παρακάτω παρουσιάζονται οι δομές αναστολέων/αγωνιστών του PAF αλλά και η ταυτοποίηση της δομής τους σε γνωστά μας τρόφιμα. Στην **Εικόνα 3** παρουσιάζονται αναστολείς που έχουν βρεθεί σε τρόφιμα της Μεσογειακής διατροφής, όπου το βασικό τους χαρακτηριστικό είναι ότι η φωσφορική τους ομάδα στη *sn-3* θέση της γλυκερόλης είτε έχει αντικατασταθεί ή υποκατασταθεί από γλυκοζυτικό δεσμό με υποκατεστημένους πολυσακχαρίτες, ενώ στη *sn-2* θέση παραμένει το οξικό οξύ, όπως στο μόριο του PAF [16].

Βέβαια ερευνητικές ομάδες έχουν αποδείξει την αντιφλεγμονώδη δράση φαινολικών ενώσεων έναντι των δράσεων του PAF, αποτελέσματα που θα παρουσιαστούν αναλυτικά σε επόμενο κεφάλαιο.

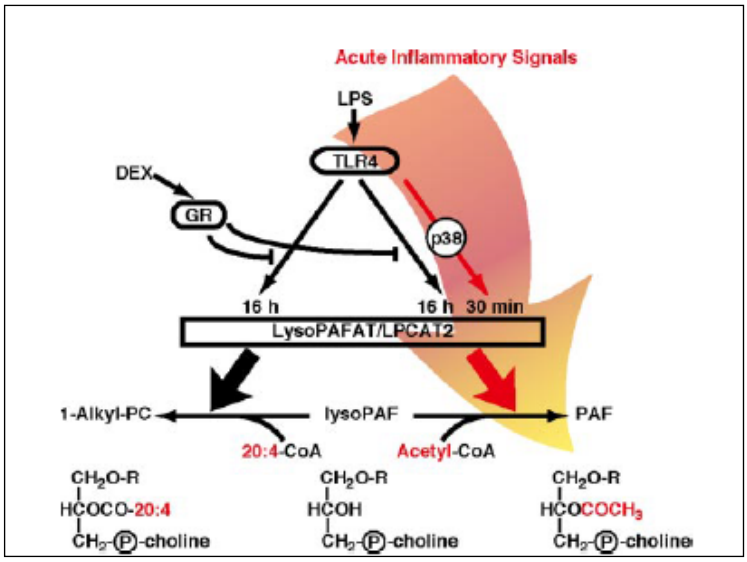


Εικόνα 3: Χαρακτηρισμένοι αναστολείς του PAF. 1: CV 3988, 2: Ro 18-7953, 3: Ro 19-1400, 4: Ro 18-8736, 5: CV 6209, 6: Αναστολέας απομονωμένος από ελαιοπυρήνα, 7: Αναστολέας απομονωμένος από λευκό κρασί, 8: Αναστολέας απομονωμένος από υγρά απόβλητα ελαιουργίας, 9: Αναστολέας απομονωμένος από ελαιόλαδο, 10: Αναστολέας απομονωμένος από Kalimeris indica.

1.2.1.1 Πορείες Βιοσύνθεσης

Η βιοσύνθεση του PAF γίνεται μέσω δύο οδών, της πορείας ανασχηματισμού (remodeling πορεία) που ενεργοποιείται σε καταστάσεις φλεγμονής και της εξ' υπαρχής πορείας ή *de novo* που πιστεύεται ότι ευθύνεται για την παραγωγή των βασικών επιπέδων του PAF στον οργανισμό.

Τα κύτταρα που έχουν μελετηθεί εκτενώς για τη ρύθμιση του μεταβολισμού του PAF είναι τα πολυμορφοπύρηνα λευκοκύτταρα (PMN) [17]. Άλλα κύτταρα που παράγουν PAF μετά από διέγερση είναι τα αιμοπετάλια, τα ουδετερόφιλα, τα μονοκύτταρα/μακροφάγα, τα βασεόφιλα, τα μεσαγγειακά και τα ιωσινόφιλα [13]. Η remodeling πορεία ή πορεία ανασχηματισμού, ξεκινά με τη απελευθέρωση του 1-O-αλκυλ- ή 1-O-ακυλ-2-λύσο-GPC (lyso-PAF) από 1-O-αλκυλ ή 1-O-ακυλ -2-αραχιδονουλ-GPC (AAGPC) από την κυτταροπλασματική φωσφολιπάση A_2 (PLA_2). Γίνεται δηλαδή μία αποακυλίωση. Το ένζυμο φωσφολιπάση A_2 ενεργοποιείται αφού φωσφορυλιωθεί από τις κινάσες MAP όπως η p38 και ERKs. Ένας δεύτερος τρόπος για να γίνει αυτό είναι με τη δράση του ενζύμου CoA-ανεξάρτητης τρανσακετυλλάσης (CoA IT), η οποία υδρολύει το λιπαρό οξύ από την *sn-2* θέση και το μεταφέρει σε ένα ακυλο-δέκτη που συνήθως είναι λυσο-πλασμαλογόνα, τα οποία με την σειρά τους προέρχονται από την δράση μιας φωσφολιπάσης-Α2 σε πλασμαλογόνα [18-20]. Το υπόστρωμα για τη δράση των δύο ενζύμων της πορείας ανασχηματισμού είναι η φωσφατιδυλοχολίνη (PC), και τα ανάλογα στην *sn-1* θέση άλκυλο ή άκυλο ή αλκένυλο (PC). Βέβαια δεν επηρεάζει μόνο ο δεσμός του λιπαρού οξέος, αλλά και το μέγεθος της αλυσίδας του καθώς και ο βαθμός ακορεστότητας. Φαίνεται ότι το πιο συχνά απαντώμενο πολυακόρεστο λιπαρό οξύ στην *sn-2* θέση είναι το αραχιδονικό οξύ. Το μόριο του λυσο-PAF ακετυλιώνεται στη συνέχεια με το ένζυμο ακετυλο-CoA:1-O-αλκυλο-2-λυσο-GPC ακετυλοτρανσφεράση (λυσο PAF-AT) για να παραχθεί ο PAF. Το ένζυμο αυτό δεν έχει καθαριστεί αλλά έχει κλωνοποιηθεί και έχει βρεθεί ότι το γονίδιο του ενζύμου, το οποίο παράγει μία πρωτεΐνη 544 αμινοξέων, έχει μοριακό βάρος 60 Kda [21]. Επιπλέον η λύσο PAF-AT/LPCAT2 έδειξε δραστικότητα εξαρτώμενη από το ασβέστιο (**Εικόνα 4)**. Όπως φαίνεται και στο παρακάτω σχήμα η δραστικότητα του ενζύμου λυσο PAF-AT ενεργοποιείται κατά την φλεγμονώδη απόκριση μέσω του μεταγραφικού παράγοντα p38 με τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή του PAF.



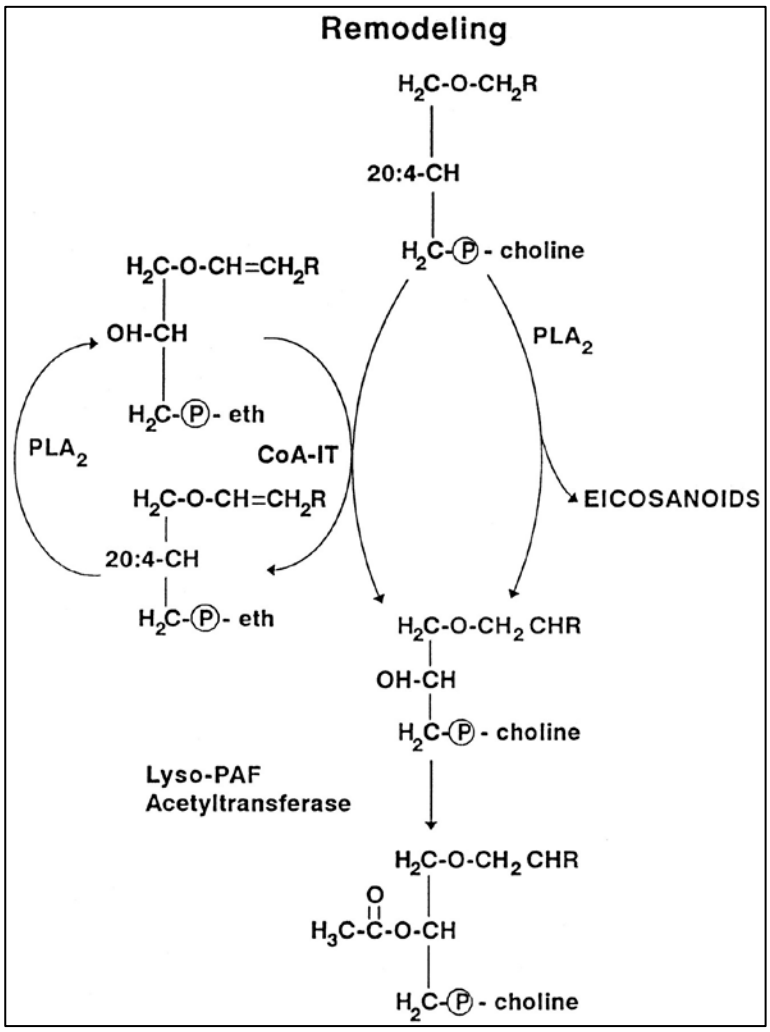
Εικόνα 4: Ρύθμιση της λυσο PAF-AT/LPCAT2 σε μακροφάγα κύτταρα ποντικού υπό συνθήκες φλεγμονής. Η δραστικότητα του ενζύμου αυξάνεται από δύο μονοπάτια, άκυλο και ακετυλοτρανσφεράσης μόνο η ακετυλοτρανσφεράση ενεργοποιείται κάτω από φλεγμονώδεις καταστάσεις [21].

Το ένζυμο λυσο PAF-AT έχει δύο ισομορφές την LPCAT1 και 2. Η LPCAT1 εκφράζεται κυρίως στους πνεύμονες όπου παράγει PAF και διπαλμιτουλ-φωσφατιδυλοχολίνη απαραίτητη για την αναπνοή, ενώ η LPCAT2 βιοσυνθέτει PAF και φωσφατιδυλοχολίνη υπό συνθήκες φλεγμονής. Οι Tarui M et al για πρώτη φορά πιστοποίησαν ειδικούς αναστολείς της LPCAT2 οι οποίοι είναι παράγωγα του N-φαινυλομαλεινιμίδιο (phenylmaleimide) [22].

Τη μεγαλύτερη δραστικότητα του ενζύμου φαίνεται να έχει ο σπλήνας και ακολουθούν ο πνεύμονας, ο θύμος αδένας και τα λεμφαγγεία. Έχει αποδειχθεί ότι είναι μεμβρανοσύνδετο και ότι προτιμά υποστρώματα με αλυσίδα 16 ή 18 ατόμων άνθρακα [23]. Βέβαια σε επόμενη δουλειά της ίδιας ερευνητικής ομάδας βρέθηκε το ακριβές μονοπάτι ενεργοποίησης του ενζύμου μέσω της φωσφορυλίωσης της Ser-34 [24].

Το ένζυμο έχει βρεθεί ότι ενεργοποιείται/απενεργοποιείται με φωσφορυλίωση /αποφωσφορυλίωση αντίστοιχα. Στη διαδικασία αυτή φαίνεται να παίρνουν μέρος το cAMP, η πρωτεϊνική κινάση, PKC, η ασβέστιο/καλμοδουλίνη- εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση και η p38 MAPK, από πειράματα που έχουν γίνει *in vitro*. Οι ERKs (εξωκυτταρικές κινάσες) και p38 MAPK, ρυθμίζουν τις κυτταρικές λειτουργίες στα πολυμορφοπύρηνα λευκοκύτταρα. Το ιονοφόρο A23187 και ο χημειοτακτικός

παράγοντας fMLP διεγείρουν τη σύνθεση PAF μέσω της διέγερσης της $cPLA_2$ από ERK1,2 και p38 MAPK και της λυσο PAF-AT από p38 MAPK. Η p38 MAPK φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση και των δύο ενζύμων της πορείας ανασχηματισμού. Από την άλλη το ένζυμο CoA IT δεν ενεργοποιείται από ERK και p38 MAPK (**Εικόνα 5**). Η ενεργοποίηση της λυσο PAF-AT μέσω της p38 MAPK, παρατηρείται και σε προκαλούμενη από το βακτηριακό λιποπολυσακχαρίτη (Lipopolysaccharide, LPS) διέγερση μακροφάγων αρουραίου, παρουσία ή όχι λυσο-PAF [21].



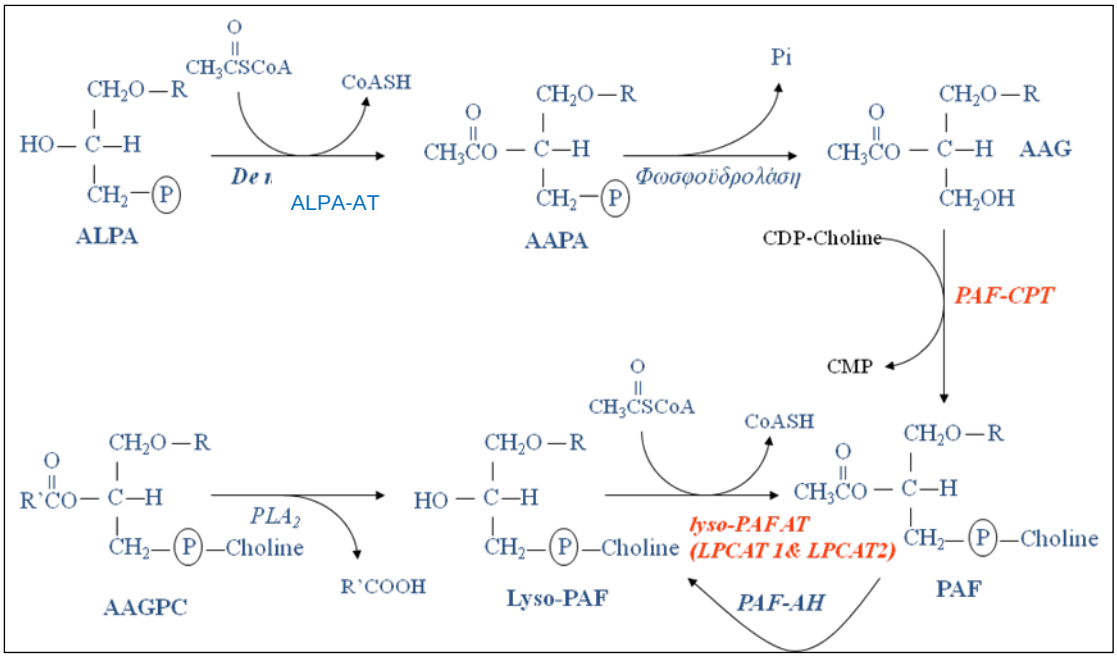
Εικόνα 5: Η πορεία ανασχηματισμού βιοσύνθεσης του PAF. Η σύνθεση του PAF ξεκινά με τη δράση της φωσφολιπάσης Α2, που συνήθως δρα σε 1-Ο-αλκυλο-2-αραχιδονουλο γλυκεροφωσφοχολίνη και παράγεται lyso-PAF και ελεύθερο αραχιδονικό οξύ. Ο lyso-PAF ακετυλιώνεται από το ένζυμο lyso PAF-AT για να παραχθεί ο PAF [25].

Πρέπει να επισημανθεί ότι κατά την πορεία ανασχηματισμού στο πρώτο στάδιο απελευθερώνεται αραχιδονικό οξύ, το οποίο με τη δράση ενζύμων όπως

λιποοξυγονάσες, κυκλοοξυγονάσες κ.α. σχηματίζει μόρια που δρουν ως τοπικές ορμόνες όπως είναι τα λευκοτριένια, θρομβοξάνια και οι προσταγλαδίνες [26].

Σε κυτταρική σειρά βασεόφιλων αρουραίου η ρύθμιση της παραγωγής PAF γίνεται μέσω της παραγωγής ελευθέρων ριζών. Οι ελεύθερες οξειδωτικές ρίζες παράγονται μέσω του αερόβιου μεταβολισμού των κυττάρων, ως προϊόντα των οξειδοαναγωγικών ενζύμων NADH/NADPH οξειδάση, μονοοξειδάση και άλλα. Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) είναι ένα αντιοξειδωτικό ένζυμο που συνδέεται με το σελήνιο και προστατεύει τα κύτταρα από την οξείδωση. Το ένζυμο GPx δρα ως αρνητικός ρυθμιστής της παραγωγής PAF, μέσω της ιδιότητας του να αναστέλλει την p38 MAPK, άρα δεν φωσφορυλιώνονται και δεν ενεργοποιούνται οι λυσο PAF-AT και PLA_2 [6].

Ένα συνοπτικό διάγραμμα του βασικών πορειών μεταβολισμού του PAF παρουσιάζεται στην **Εικόνα 6**.



Εικόνα 6: Ο μεταβολισμός του PAF. Στο σχήμα παρουσιάζονται οι βασικές βιοχημικές πορείες που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του PAF, μεταξύ των οποίων οι δύο πορείες βιοσύνθεσης *de novo*(απαρχής) και remodeling (ανασχηματισμού) και αποικοδόμησης. Τελικά και ρυθμιστικά ένζυμα στις παραπάνω πορείες είναι η PAF-CPT, η λυσο PAF-AT και η PAF-AH αντίστοιχα [6].

Εκτός από την πορεία ανασχηματισμού, πραγματοποιείται και η *de novo* πορεία που απαιτεί την ακετυλίωση και την αποφωσφορυλίωση του 1-*O*-αλκυλο-*sn*-γλυκερο-3-φωσφορικό, που είναι ένας ενδιάμεσος μεσολαβητής. Οι λειτουργίες αυτές καταλύονται από τα ένζυμα ακετυλο-CoA : αλκυλο-λυσο-γλυκεροφωσφατιδικό οξύ ακετυλοτρανσφεράση (ALPA- AT) και τη αλκυλοακετυλογλυκεροφωσφορική φωσφουδρολάση αντίστοιχα. Το ένζυμο ALPA-AT δεν έχει μελετηθεί όσο η λυσο-PAF ακετυλοτρανσφεράση, παρόλα αυτά πρόκειται για μία πρωτεΐνη μοριακού βάρους 64 kDA, με μέγιστη δραστικότητα σε όργανα όπως σπλήνας, εγκέφαλος και νεφρός [27, 28]. Ενώ φαίνεται να ενεργοποιείται/ απενεργοποιείται μέσω φωσφορυλίωσης/ αποφωσφορυλίωσης [13].

Το παραγόμενο μόριο 1-*O*-αλκυλο-2-ακετυλο-γλυκερόλη μετατρέπεται σε PAF με το ένζυμο ανεξάρτητη διθειοθρειτόλης CDP-χολίνη:1-αλκυλο-2-ακετυλο-sn-γλυκερο χολίνο- φωσφοτρανσφεράση (PAF-CPT). Η PAF CPT διαφέρει από τις άλλες φωσφοχολινοτρανσφεράσες επειδή δεν αναστέλλεται από τη διθειοθρειτόλη (DTT) [13]. Η δραστικότητα της PAF-CPT ανιχνεύεται σε διάφορα είδη κυττάρων όπως ουδετερόφιλα, αιμοπετάλια κουνελιών, ανθρώπινα μεσαγγειακά κ.α.. ενώ έχει αποδειχθεί ότι εντοπίζεται στην κυτταροπλασματική επιφάνεια του ενδοπλασματικού

δικτύου, όπου βρίσκονται επίσης η διακυλογλυκερόλη και η χολινοφωσφοτρανσφεράση. Φαίνεται ότι το ένζυμο προτιμά ως υπόστρωμα αιθερικό δεσμό συνδεδεμένο με υδρογονανθρακική αλυσίδα 18 ανθράκων στην *sn*-1 θέση, αλλά και αλυσίδες 16 ή 18 ατόμων άνθρακα με 1 διπλό δεσμό φαίνεται να έχουν εξίσου μεγάλη συγγένεια. Όσον αφορά την *sn*-2 θέση, φαίνεται ότι μεγαλύτερη συγγένεια έχει η ακετυλομάδα ή η προπιονυλομάδα [29, 30].

1.2.1.2 Πορεία Αποικοδόμησης

Ο PAF αποικοδομείται μέσω βιοχημικής πορείας που έχει ως βασικό ένζυμο την PAF ακετυλοϋδρολάση (PAF-AH) [31]. Η PAF-AH ανήκει στην ομάδα των ενζύμων της οικογένειας των φωσφολιπασών A_2. Μέσα σε αυτή την οικογένεια των φωσφολιπασών A_2, ανήκουν οι ενδοκυτταρικές υδρολάσες του PAF, που είναι τα είδη VII και Ib. Η PAF-AH ή ομάδα VIIA PLA_2 ή λιποπρωτεϊνική συνδεόμενη PLA_2 (Lp-PLA_2) κυκλοφορεί στο πλάσμα συνδεδεμένη στις LDL και HDL, ενώ έχει βρεθεί ότι η δραστικότητα του ενζύμου μειώνεται κατά την οξείδωση των λιποπρωτεϊνών [32]. Έχουν επίσης χαρακτηριστεί δύο ενδοκυτταρικά είδη, οι PAF-AH Ib και PAF-AH II. Το cDNA της PAF-AH πλάσματος κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη 441 αμινοξέων με μοριακό βάρος 45 kDA [33]. Το ένζυμο αυτό αποικοδομεί τον PAF και παράγει ακετυλομάδες, ενώ όταν δρα σε δομικά ανάλογα του PAF ελευθερώνει οξειδωμένα λιπαρά οξέα που ήταν συνδεδεμένα με εστερικό δεσμό [13].

Η καταλυτική δράση της PAF-AH, δεν επηρεάζεται από το είδος του δεσμού που είναι συνδεδεμένο το λιπαρό οξύ στην *sn-1* θέση [34-36]. Η PAF- AH του πλάσματος και η PAF-AH II έχει και δράση τρανσακετυλλάσης, μεταφέροντας την ακετυλομάδα από τον PAF είτε σε λυσοφωσφολιποειδή (TAL), είτε σε σφιγγοσινούχα λιποειδή (TAS).

Η δράση της PAF-AH, έχει διχάσει την επιστημονική κοινότητα αφού για κάποιους η ύπαρξη της στις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος προστατεύει από την αθηροσκλήρωση, υδρολύοντας PAF και μόρια που είναι δομικά ανάλογα του PAF [37-39]. Από την άλλη η καταλυτική της δράση μπορεί να δημιουργήσει μεταβολίτες, όπως λυσοφωσφατιδυλοχολίνη ή οξειδωμένα λιπαρά οξέα που μπορεί να έχουν προ-αθηρογόνες δράσεις. Για το λόγο αυτό κλινικές μελέτες δοκιμάζουν τη θεραπεία ασθενειών όπως η αθηροσκλήρωση με αναστολείς της λειτουργίας της PAF-AH [40,

41]. Αξίζει να αναφερθεί ότι πολυμορφισμοί στο γονίδιο της έχουν συσχετιστεί με πληθώρα ασθενειών [42].

Τέλος η ρύθμιση της δραστικότητας της PAF-AH εξαρτάται από την ισομορφή της. Η ισομορφή του πλάσματος ρυθμίζεται σε μεταγραφικό επίπεδο. Η αύξηση της έκφρασης της PAF-AH του πλάσματος φαίνεται να είναι σημαντικός μηχανισμός για την απενεργοποίηση του PAF και των οξειδωμένων φωσφολιποειδών. Σε διεγερμένα ανθρώπινα μακροφάγα από LPS των σειρών RAW264.7 και THP-1, η p38 MAPK ενεργοποιεί το μεταγραφικό μονοπάτι του γονιδίου της PAF-AH, μέσω φωσφορυλίωσης του SP1 (σημείο σύνδεσης του εκκινητή του γονιδίου) [43].

Από την άλλη η ρύθμιση της ισομορφής της PAF-AH II γίνεται μέσω υποκυτταρικών μεταφορών ή μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, όπως η φωσφορυλίωση. Για παράδειγμα η ενεργοποίηση των ERKs και p38MAPK, δεν είναι απαραίτητη για την αύξηση της έκφρασης της PAF-AH II σε διαφοροποιημένα μακροφάγα [44].

1.2.2 Ιντερλευκίνη 1-β (IL1- β)

Η ιντερλευκίνη 1 (IL-1) ανακαλύφθηκε από τον Igal Gery το 1972 που την ονόμασε στην αρχή παράγοντα ενεργοποίησης λεμφοκυττάρων (LAF) επειδή ήταν ένα μιτογόνο των λεμφοκυττάρων [45]. Περίπου το 1985 ανακαλύφθηκε ότι η IL-1 αποτελείται από δύο ξεχωριστές πρωτεΐνες, που τώρα ονομάζονται ιντερλευκίνη-1α (IL-1α) και ιντερλευκίνη-1β (IL-1β).

Η IL-1β γνωστή και ως καταβολίνη (catabolin) βρέθηκε αρχικά σε ποντίκια, στην συνέχεια στον άνθρωπο και μετά χαρακτηρίστηκε σε διάφορα είδη θηλαστικών. Η IL-1β παράγεται από πλήθος κυττάρων, όπως ουδετερόφιλα, NK κύτταρα, Β και Τ λεμφοκύτταρα, σε νεφρικά κύτταρα όπως τα μεσαγγειακά και τα ποδοκύτταρα, καθώς και κύτταρα του κεντρικού νευρικού συστήματος. Τα κύτταρα όμως που κυρίως την παράγουν είναι τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα, τα οποία βρίσκονται σε στρατηγικές θέσεις και μπορούν να επεξεργάζονται την πρόδρομη μορφή της [46]. Συγκεκριμένα, για να αποκτήσει η IL-1β τη δραστικότητά της πρέπει να υδρολυθεί πρωτεολυτικά κατά 80%. Η διαδικασία αυτή γίνεται κατά κύριο λόγο από το ένζυμο κασπάση 1 (ICE) [47], που απελευθερώνεται από το κύτταρο στο εξωκυττάριο περιβάλλον [48]. Γενικά δεν έχει εξακριβωθεί ακόμα η ακριβής διαδικασία με την

οποία εκκρίνεται η IL-1β, αλλά έχει προταθεί ότι αυτό μπορεί να γίνεται με εξωκύττωση, ή ενεργή μεταφορά ή ύστερα από κυτταρικό θάνατο [49]. Το βιοχημικό μονοπάτι για τη σύνθεση της IL-1β είναι πολύπλοκο και έχει μελετηθεί *in vitro* κυρίως σε μονοκύτταρα και μακροφάγα. Η διέγερση ξεκινά μετά από έκθεση στον LPS και την δέσμευση του στον Toll-like receptor 4 (TLR4). Σε μελέτες που έγιναν σε μικρογλοία φαίνεται ότι η απελευθέρωση της IL-1β εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον NF-kB, αλλά και μονοπάτια στα οποία εμπλέκονται οι MAP κινάσες και κυρίως η p38 MAP κινάση [50, 51].

1.3 Μοντέλο φλεγμονής στην κυτταρική σειρά U-937

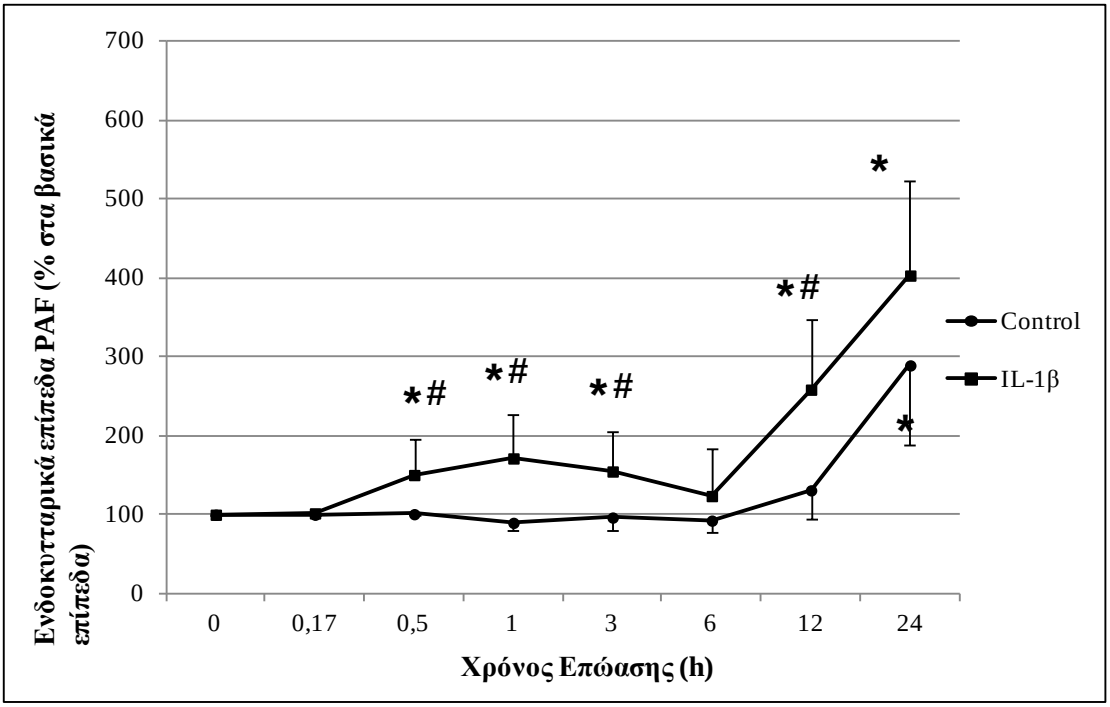
Τα μονοκύτταρα είναι η κυκλοφορούσα πρόδρομη μορφή των μακροφάγων, τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στην ειδική και μη, ανοσία του ανθρώπινου οργανισμού μέσω της ικανότητας τους να φαγοκυτταρώνουν μικροοργανισμούς και να ενεργοποιούν μηχανισμούς φλεγμονής, μέσω της έκκρισης κυτταροκινών. Τα μονοκύτταρα μέσω της σύνδεσης των TLR από συστατικά του βακτηριακού τοιχώματος εκκρίνουν IL-1β, η οποία στη συνέχεια θα ενεργοποιήσει τη φλεγμονώδη απόκριση. Η ικανότητα των μονοκυττάρων να συνθέτουν και να εκκρίνουν IL-1β, υπό την επίδραση διαφόρων παραγόντων είναι ιδιαίτερα μελετημένη. Ωστόσο φαίνεται ότι η IL-1β δεν παράγεται μόνο από τα μονοκύτταρα αλλά μπορεί να δράσει σε αυτά με αυτακοειδείς ή άλλους μηχανισμούς [52].

Η δράση της IL-1β έχει μελετηθεί στην κυτταρική σειρά U937 που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία. Μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχει υποδοχέας στα U937, μέσω του οποίου δρα η IL-1β και επάγει την παραγωγή άλλων μεσολαβητών της φλεγμονής όπως ο GM-CSF, ο MCP-1 [53]. Ωστόσο η δράση της IL-1β ως διεγέρτης στα μονοκύτταρα είναι σε μικρό βαθμό μελετημένη, αν και θα μπορούσε να αποτελέσει μηχανισμό ενίσχυσης της φλεγμονώδους απόκρισης, ιδιαίτερα σε καταστάσεις όπως η συστηματική φλεγμονή η οποία χαρακτηρίζει χρόνιες ασθένειες (π.χ. την ινσουλινοαντίσταση, την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και την αθηροσκλήρωση) [54].

Πρέπει να τονιστεί ότι μία μόνο μελέτη έχει γίνει όσο αφορά την παραγωγή PAF σε ανθρώπινα μονοκύτταρα [55]. Η ερευνητική μας ομάδα σε προηγούμενη εργασία έχει μελετήσει τη δράση της IL-1β στα μονοκύτταρα και συγκεκριμένα στην

προμονοκυτταρική σειρά U937, όπου μελετήθηκε η επαγωγή της σύνθεσης και έκκρισης PAF, με ταυτόχρονη μελέτη της επίδρασης της IL-1β στα ρυθμιστικά για το μεταβολισμό του PAF ένζυμα. Η κυτταρική σειρά U937 διατηρεί τα χαρακτηριστικά των ανθρώπινων μονοκυττάρων για αυτό αποτελεί καλό μοντέλο για την μελέτη τους [56].

Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι η IL-1β σε συγκέντρωση 2,5ng/mL, μπορεί να επάγει την αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων PAF με δοσοεξαρτώμενο και χρονοεξαρτώμενο τρόπο. Ο παραγόμενος PAF παραμένει κυρίως ενδοκυτταρικά. Η IL-1β ενεργοποιεί τα βιοσυνθετικά ένζυμα του PAF λυσο PAF-AT και PAF CPT αλλά και το αποικοδομητικό του ένζυμο PAF AH. Τα σχετικά επίπεδα ενδοκυτταρικού και εξωκυτταρικού PAF που επάγονται από την IL-1β εξαρτώνται και από την σχετική μεταβολή στη δραστικότητα αυτών των ενζύμων [57].



Εικόνα 7: Η IL-1β επάγει τη σύνθεση του PAF ενδοκυτταρικά στην κυτταρική σειρά U937 με την ενεργοποίηση της δραστικότητας των δυο βιοσυνθετικών του ενζύμου (#p<0.05 σε σχέση με τα βασικά επίπεδα σε κατάσταση ηρεμίας την ίδια χρονική στιγμή, * p<0.05 σε σχέση με το χρόνο 0).

Αναλυτικά, η IL-1β όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 7**, μπορεί να αυξήσει τα ενδοκυτταρικά επίπεδα του PAF, ο οποίος μπορεί να παίξει το ρόλο του ενδοκυτταρικού μεσολαβητή των δράσεών της. Το διάγραμμα κινητικής μελέτης της

δράσης της IL-1β στα επίπεδα του ενδοκυτταρικού PAF δείχνει δύο χρόνους βέλτιστης δράσης στις 0,5 και 3h. Αυτό συμβαίνει γιατί η αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων του PAF στη 0,5 h συνοδεύεται με την ταυτόχρονη ενεργοποίηση κατά 50% της δραστικότητας της PAF-CPT και στις 3h κατά 100% την αύξηση της λυσο PAF-AT.

Πρέπει επίσης να τονιστεί ότι τα επίπεδα του εξωκυτταρικού PAF δεν ξεπερνούσαν ποτέ το 10% της συνολικής συγκέντρωσης του (άθροισμα ενδοκυτταρικής και εξωκυτταρικής συγκέντρωσης), τόσο στα πειράματα ελέγχου όσο και ύστερα από την ενεργοποίηση με IL-1β. Αυτό υποδεικνύει ότι ο παραγόμενος ενδοκυτταρικός PAF, είτε δεν εκκρίνεται στο εξωκυτταρικό μέσο, είτε εκκρίνεται και αποικοδομείται ταχύτατα, είτε δρα αυτακοειδώς συνδεόμενος σε υποδοχείς του στο κύτταρο, με αποτέλεσμα να μην είναι ανιχνεύσιμος.

1.4 Οξειδωτικό στρες

Οι ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS) και αζώτου (NOS), είναι πολύ δραστικά μόρια που παράγονται κατά τη διάρκεια πολυάριθμων φυσιολογικών βιολογικών αντιδράσεων, όπως για παράδειγμα η λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας στο μιτοχόνδριο αλλά και η ύπαρξη χρόνιων φλεγμονωδών καταστάσεων όπως η καρδιαγγειακή νόσος, ο καρκίνος και η γήρανση. Η απελευθέρωση αυτών των μορίων αποτελεί μέρος της άμυνας του σώματος, αφού απελευθερώνονται από τα μακροφάγα ως μέρος του αμυντικού μηχανισμού του ανθρώπου στην φλεγμονή, παρόλα αυτά ο οργανισμός διαθέτει αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς για να τις εξουδετερώσει. Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι δεν υπάρχει πάντα ισορροπία μεταξύ παραγωγής ενεργών μορφών και ενδογενών αντιοξειδωτικών συστημάτων, γιατί διάφορες μεταβολικές καταστάσεις προκαλούν μεγαλύτερη παραγωγή ριζών από αυτή που προλαβαίνει το σώμα να εξουδετερώσει. Έτσι λοιπόν όταν το σώμα δεν καταφέρνει να αποκαταστήσει την ισορροπία, προκαλείται μία χρόνια κατάσταση αυξημένου στρες στο σώμα (οξειδωτικό στρες), που έχει ως αποτέλεσμα την οξείδωση της LDL- χοληστερόλης, του DNA και άλλων βιομορίων σημαντικών για τη λειτουργία του ανθρώπινου σώματος [58].

Οι ROS σχηματίζονται από πολλά είδη κυττάρων συμπεριλαμβανομένων των μονοκυττάρων και των ουδετερόφιλων. Η διέγερση του κυττάρου έχει ως αποτέλεσμα τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το κυτοσολικό NADPH στο οξυγόνο

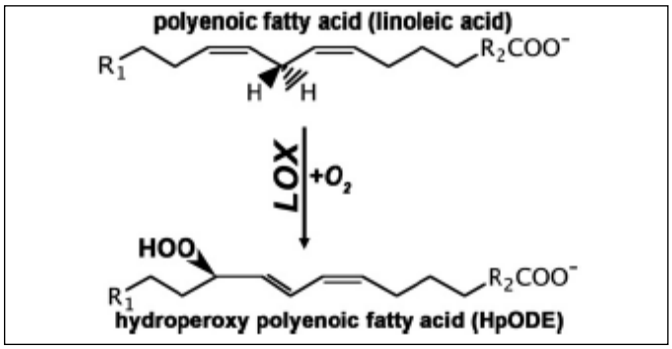
μέσω του μεμβρανικού συστήματος NADPH-οξειδάση σχηματίζοντας το ασταθές ιόν υπεροξειδίου O_2-. Το ένζυμο δισμουτάση του υπεροξειδίου μετατρέπει δυο μόρια O_2- σε H_2O_2, ένα σταθερό ισχυρό οξειδωτικό μόριο, που όμως αποικοδομείται από το ένζυμο καταλάση σε H_2O. Παράπλευρες όμως αντιδράσεις αυτής της πορείας μπορούν να δημιουργήσουν επικίνδυνα παραπροϊόντα όπως τις ρίζες υδροξυλίου HO• και οξυγόνου O• και κυρίως υποαλογονικά οξέα, που προκύπτουν από την οξείδωση των αλογόνων κυρίως χλωρίου, από τη μυελοπεροξειδάση των ουδετερόφιλων [59]. Στην διαδικασία εξουδετέρωσης αυτών των παραπροϊόντων παίρνουν μέρος, εκτός από ένζυμα όπως η καταλάση και η υπεροξειδική δισμουτάση κ.α., μικρά μόρια όπως το ουρικό οξύ, η γλουταθειόνη, η αλβουμίνη κ.α και οι βιταμίνες όπως το ασκορβικό οξύ, οι τοκοφερόλες και τα καροτενοειδή κ.α. Βέβαια οι ROS έχουν ευεργετική δράση στην καταπολέμηση εισβαλλόντων οργανισμών, όμως η υπερίσχυση τους μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τον τραυματισμό ιστών οξειδώνοντας βασικά βιομόρια του οργανισμού όπως οι πρωτεΐνες, τα λιποειδή, και τα νουκλεϊνικά οξέα.

Είναι γνωστό ότι έχουν αναπτυχθεί εργαστηριακές μέθοδοι που εξετάζουν την ικανότητα μορίων ή εκχυλισμάτων τροφίμων/φυτών να απενεργοποιούν τις ελεύθερες ρίζες όπως η DPPH [2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl] ή η ABTS [2,2-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)]. Η δοκιμασία για παράδειγμα με την ρίζα DPPH είναι φωτομετρική και βασίζεται στο γεγονός ότι όταν η ρίζα ανάγεται αποχρωματίζεται και μετατρέπεται το αιθανολικό της διάλυμα από μωβ σε κίτρινο. Από την άλλη βέβαια υπάρχουν και δοκιμασίες που ελέγχουν αν οι ουσίες έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν την ενζυμική (δράση του ενζύμου λιποοξυγονάση) ή μη λιποειδική υπεροξείδωση (με τη χρήση μετάλλου όπως ο σίδηρος) με υπόστρωμα κυρίως το λινελαικό οξύ, αλλά και την *ex vivo* οξείδωση συστατικών του ορού. Σκοπός όλων αυτών των δοκιμασιών είναι να προσομοιάσουν τις δράσεις των ελευθέρων ριζών στο ανθρώπινο σώμα και τη αλληλεπίδραση τους με μακρομόρια του οργανισμού όπως για παράδειγμα τα λιποειδή.

1.5 Λιποοξυγονάση

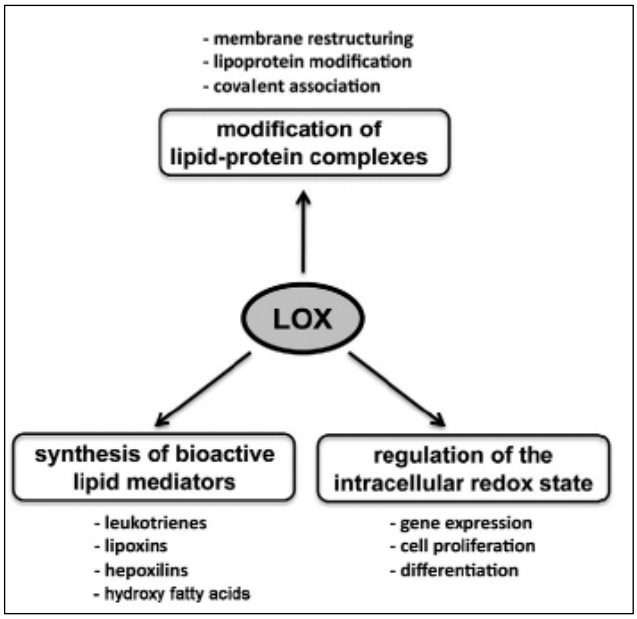
Οι Λιποοξυγονάσες (LOXs) είναι διοξυγονάσες χωρίς αίμη σιδήρου που καταλύουν την οξείδωση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων που περιέχουν τουλάχιστον δύο cis διπλούς δεσμούς όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 8**. Συγκεκριμένα η

λιποοξυγονάση που βρίσκεται στα φυτά, όπως η LOX τύπου I από σόγια, παράγει 13- ή 9-υδροϋπεροξείδια λινελαϊκού οξέος (13-HPOD και 9-HPOD) [60].



Εικόνα 8: Στην εικόνα παρουσιάζεται η αντίδραση που καταλύει η LOX, μετατρέποντας τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα στο αντίστοιχο υδροϋπεροξείδιο-παράγωγο μετά τη δράση του οξυγόνου [61].

Στα κύτταρα των θηλαστικών τα πολυακόρεστα (πολυενοικά-polyenoic) λιπαρά οξέα που βρίσκονται σε αφθονία είναι το λινελαικό οξύ (C18:Δ2, n−6) και το αραχιδονικό οξύ (C20:Δ4, n−6), τα οποία αποτελούν το υπόστρωμα των διαφόρων ισομορφών των LOX. Γενικά οι LOX που υπάρχουν στα θηλαστικά προτιμούν ως υπόστρωμα ελεύθερα λιπαρά οξέα σε σχέση με τα πολυενοικά λιπαρά οξέα, όμως στα κύτταρα η συγκέντρωση των ελεύθερων λιπαρών οξέων είναι πολύ μικρή. Έτσι το ενεργό μονοπάτι της LOX απαιτεί την απελευθέρωση των εστεροποιημένων λιπαρών οξέων που υπάρχουν στα λιποειδή των κυτταρικών μεμβρανών. Μετά την υδρολυτική διάσπαση των μεμβρανικών λιπαρών οξέων που καταλύονται από την κυτοσολική φωσφολιπάση A_2 τα ελεύθερα λιπαρά οξέα, κυρίως το αραχιδονικό (AA), το εικοσαπεντανοικό (EPA) και το εικοσιδυοεξανοικό (DHA) οξειδώνονται εναλλακτικά από τις κυκλοοξυγονάσες σε G-προσταγλανδίνες ή από τις ισομορφές των LOX σε παράγωγα υδροϋπεροξείδια. Τα πρωτογενή προϊόντα που προκύπτουν από τη δράση της LOX μετατρέπονται σε μεγάλη ποικιλία βιοδραστικών λιποειδικών μεσολαβητών μεταξύ των οποίων τα λευκοτριένια, οι λιποξίνες, οι ρεσολβίνες και άλλα. Οι LOX βέβαια δε δρουν μόνο με υπόστρωμα το αραχιδονικό, αφού υπάρχουν και εναλλακτικοί τρόποι δράσης σύμφωνα με την **Εικόνα 9.**



Εικόνα 9: Στην εικόνα δείχνει το ρόλο των (LOX) μέσω της σύνθεσης βιοδραστικών λιποειδικών μεσολαβητών, της ρύθμισης του ενδοκυτταρικού οξειδοαναγωγικού επιπέδου και την μετατροπή των συμπλόκων λιποειδών-πρωτεΐνης [61]

Οι LOX δρουν:

α) οξειδώνοντας πολυακόρεστα λιπαρά οξέα αν είναι συστατικά φωσφολιποειδών ή εστέρων χοληστερόλης. Η εισαγωγή μίας υδρόφιλης ομάδας υπεροξειδίου μέσα στην υδρόφοβη αλυσίδα ενός λιπαρού οξέος μεταβάλλει τις φυσικοχημικές ιδιότητες των εστεροποιημένων λιποειδών. Η ομαδοποίηση των οξειδωμένων λιποειδών στο εσωτερικό της λιποειδικής διπλοστοιβάδας της μεμβράνης οδηγεί στο σχηματισμό των "υδρόφιλων πόρων". Με το μηχανισμό αυτό η λειτουργία φραγμού της μεμβράνης διαταράσσεται και οδηγεί σε κυτταρική δυσλειτουργία.

β) Η κυτταρική οξειδοαναγωγική κατάσταση είναι μείζονος σημασίας για τη φυσιολογία των κυττάρων, αφού επηρεάζει την έκφραση του γονιδίου σε μεταγραφικό και μετα-μεταγραφικό επίπεδο καθορίζοντας τον κυτταρικό φαινότυπο. Σε κάθε κύτταρο η οξειδοαναγωγική ομοιόσταση διατηρείται από την αρμονική ισορροπία των προ- και αντι-οξειδωτικών διαδικασιών και οι LOXs είναι ‘παίκτες’ κλειδιά στην προ-οξειδωτική ομοιόσταση [61]. Η πιο γνωστή μορφή λιποοξυγονάσης στα κύτταρα των θηλαστικών μεταξύ των οποίων και του ανθρώπου είναι η 15-LOX για της οποίας την μελέτη σε *ex vivo* επίπεδο ιδανική είναι η 5- LOX από τη σόγια [62].

Κεφάλαιο 2: Φαινολικές ενώσεις

2.1 Εισαγωγή

Η υιοθέτηση της Μεσογειακής διατροφής έχει συσχετιστεί με την μείωση της εμφάνισης διάφορων χρόνιων νοσημάτων αλλά και ασθενειών που σχετίζονται με την επικράτηση της φλεγμονής. Έτσι η παρατήρηση αυτή από τις επιδημιολογικές έρευνες οδήγησε στην μελέτη της δράσης διαφόρων τροφίμων, εκχυλισμάτων τους, αλλά και των επιμέρους συστατικών τους. Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα της ολεοκανθάλης που είναι ένα φαινολικό συστατικό που βρίσκεται στο ελαιόλαδο με ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση παρόμοια με αυτή της ιβουπροφένης, στρέφοντας το ενδιαφέρον των επιστημόνων στη μελέτη ουσιών που υπάρχουν στα τρόφιμα και παρουσιάζουν φαρμακολογική δράση [63].

2.2 Ορισμός

Οι φαινολικές ενώσεις χαρακτηρίζονται ως μία μεγάλη ομάδα ενώσεων, με ένα ή περισσότερα υδροξύλια, απευθείας συνδεδεμένα σε έναν ή περισσότερους αρωματικούς ή και ετεροκυκλικούς δακτυλίους. Οι περισσότερες από αυτές ενώνονται με υδατανθρακικές ομάδες μέσω των υδροξυλίων τους σχηματίζοντας γλυκοζίτες. Οι πιο συχνά απαντώμενες υδατανθρακικές ομάδες είναι η γλυκόζη, η γαλακτόζη, η ραμνόζη κ.α. Επίσης υπάρχει η περίπτωση να συνδεθούν και άλλα μόρια με τις φαινολικές ενώσεις όπως οι αμίνες, τα καρβοξυλικά οξέα, τα οργανικά οξέα, τα λιποειδή κ.α. Οι πολυφαινόλες είναι ευρέως διαδεδομένες στο φυτικό βασίλειο, έχοντας ταυτοποιηθεί ήδη πάνω από 8000 φαινολικές δομές, περαιτέρω ανάλυση της δομής τους γίνεται παρακάτω [64-66].

2.3 Κατάταξη

Οι φαινολικές ενώσεις κατατάσσονται σε δύο κατηγορίες:

1) Στις μονομοριακές φαινόλες ή απλές φαινόλες οι οποίες έχουν έναν φαινολικό δακτύλιο, όπως το γαλλικό οξύ και το καφεϊκό οξύ. Ονομάζονται και μη φλαβονοειδείς φαινόλες

2) Στις πολυμοριακές φαινόλες ή πολυφαινόλες κατατάσσονται εκείνες που έχουν δύο ή περισσότερους φαινολικούς δακτυλίους. Κύριοι εκπρόσωποι αυτών είναι οι τανίνες και οι ανθοκυανίνες [67].

2.3.1 Απλές φαινολικές ουσίες

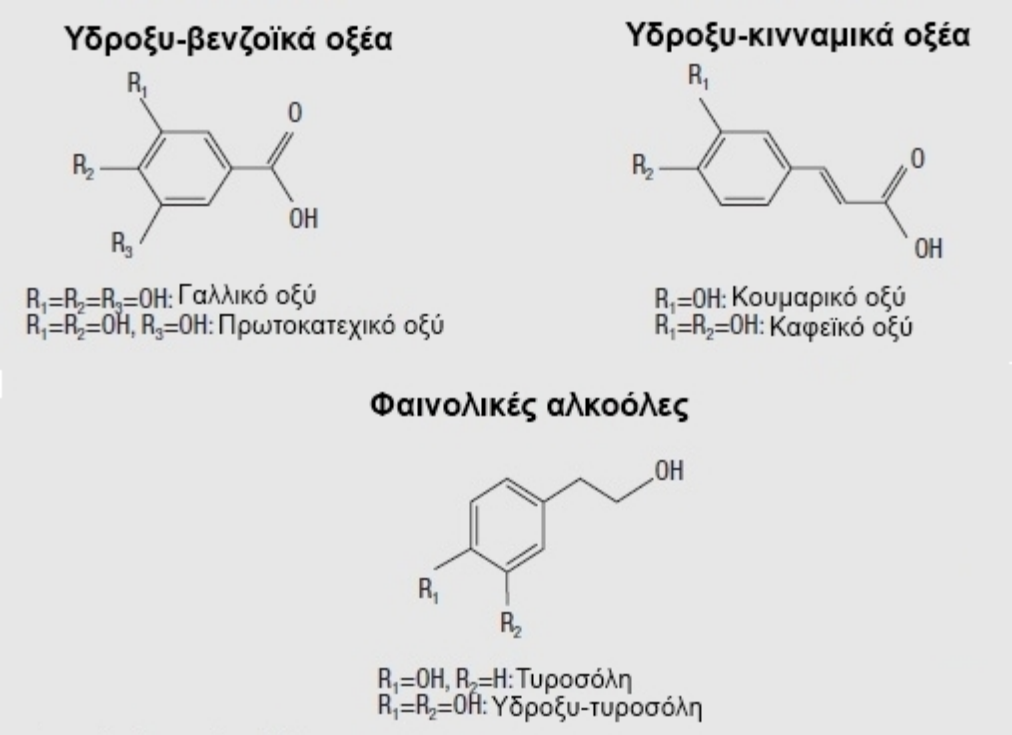
Φαινολικά Οξέα

Τα φαινολικά οξέα χωρίζονται σε 2 τάξεις: τα παράγωγα του βενζοϊκού οξέος και τα παράγωγα του κινναμωμικού οξέος, τα κυριότερα εκ των οποίων παρουσιάζονται στην **Εικόνα 10**. Κάποια οξέα βρίσκονται σε φυτά που δεν είναι βρώσιμα από τον άνθρωπο και άρα παρουσιάζουν μικρό επιστημονικό ενδιαφέρον ή η συγκέντρωση τους σε κάποια εδώδιμα φρούτα είναι πολύ μικρή για να υπάρξει κάποιο ευεργετικό αποτέλεσμα στον άνθρωπο [68].

Τα υδροξυκινναμικά οξέα, δηλαδή το κουμαρικό, το καφεϊκό και το φερουλικό οξύ, που σπάνια βρίσκονται στη φύση σε ελεύθερη μορφή, συνήθως είναι γλυκοζυλιωμένα ή εστερικά παράγωγα κουινικού, σικιμικού και ταρταρικού οξέος. Το καφεϊκό και το κουινικό συνθέτουν το χλωρογενικό οξύ που είναι το κυρίαρχο φαινολικό οξύ του καφέ. Η συγκέντρωση του μειώνεται με την ωρίμανση, μεγαλώνει όμως η συνολική ποσότητα καθώς αναπτύσσεται ο καρπός. Πρέπει να σημειωθεί ότι βασικό χαρακτηριστικό των φαινολικών οξέων είναι η αντισηπτική, συντηρητική και αντιμικροβιακή τους δράση [69, 70].

Φαινολικές Αλκοόλες

Οι κυριότεροι εκπρόσωποι των φαινολικών αλκοολών είναι η τυροσόλη και η υδροξυτυροσόλη που περιέχονται κυρίως στο έξτρα παρθένο ελαιόλαδο. Η τυροσόλη υπάρχει επίσης στο κόκκινο και άσπρο κρασί, ενώ η υδροξυτυροσόλη παράγεται μετά από την *in vivo* πέψη του κρασιού [71]. Η περιεκτικότητα του ελαιολάδου στις αλκοόλες αυτές εξαρτάται από την ποικιλία, το κλίμα, το χώμα, το γεωγραφικό πλάτος και το βαθμό ωρίμανσης της ελιάς [72-75].



Εικόνα 10: Οι χημικές δομές των απλών φαινολικών ενώσεων [67]

2.3.2 Σύνθετες φαινολικές ουσίες, Πολυφαινόλες

Μη Φλαβονοειδή

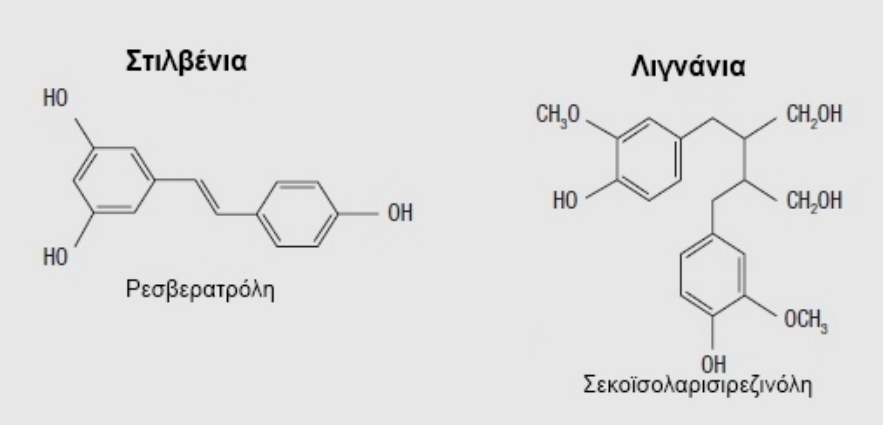
Στιλβένια

Τα στιλβένια είναι υδροξυλιωμένα παράγωγα του στιλβενίου (1,2-διφαίνυλο-αιθυλένιο). Τα στιλβένια περιέχονται σε μικρές ποσότητες στη δίαιτα του ανθρώπου, υπάρχουν σε *cis* και *trans* μορφή, καθώς και γλυκοζυλιωμένα ή άγλυκα. Έχουν ταυτοποιηθεί σε περισσότερα από 70 είδη φυτών, ανάμεσα στα οποία είναι τα σταφύλια, τα μούρα και τα φιστίκια. Η φλούδα των κόκκινων σταφυλιών είναι πλούσια σε ρεσβερατρόλη (**Εικόνα 11**), η οποία αποτελεί το πιο γνωστό εκπρόσωπο της ομάδας αυτής. Η ρεσβερατρόλη απαντάται και στη γλυκοζυλιωμένη μορφή της (piceid) [76].

Λιγνάνια

Τα λιγνάνια όπως φαίνεται στην **Εικόνα 11** έχουν γενική δομή 2,3 – διβενζυλοβουτανίου και ανήκουν στα φυτοοιστρογόνα αφού με την εντερική

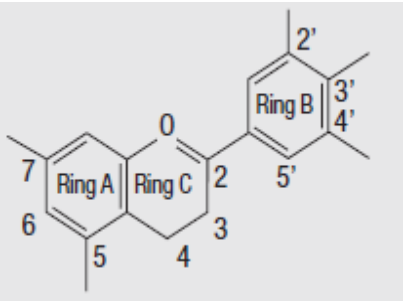
μικροχλωρίδα μεταβολίζονται σε εντεροδιόλη και εντερολακτόνη, όπου μιμούνται τη δράση των οιστρογόνων [77]. Τα λιγνάνια προκύπτουν από τον οξειδωτικό διμερισμό δύο φαινυλοπροπανικών μερών. Στη φύση υπάρχουν κυρίως σε ελεύθερη μορφή. Επειδή η περιεκτικότητα των τροφίμων σε λιγνάνια είναι μικρή, δεν ανιχνεύονται οι προαναφερθέντες μεταβολίτες τους σε πλάσμα και ούρα. Όμως το ενδιαφέρον είναι μεγάλο εξαιτίας των βιολογικών και φαρμακολογικών επιδράσεων που παρουσιάζουν [78, 79].



Εικόνα 11: Οι χημικές δομές των σύνθετων μη φλαβονοειδών φαινολικών ενώσεων [67]

Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή μοιράζονται ένα κοινό ανθρακικό σκελετό από διφαινυλοπροπάνια, δύο βενζοϊκούς δακτυλίους που ενώνονται με ευθεία αλυσίδα τριών ατόμων άνθρακα, όπως φαίνεται στο σχήμα της **Εικόνας 12**. Η κεντρική αλυσίδα μπορεί να δημιουργήσει ένα κλειστό πυρανικό δακτύλιο με έναν από τους βενζοϊκούς δακτυλίους. Αυτή η ομάδα χωρίζεται σε έξι υποομάδες, ανάλογα με το επίπεδο οξείδωσης του κεντρικού πυρανικού δακτυλίου: φλαβονόλες, φλαβόνες, φλαβονόνες, ισοφλαβόνες, ανθοκυανιδίνες και φλαβανόλες (κατεχίνες και προκυανιδίνες). Περισσότερα από 4000 φλαβονοειδή έχουν ανακαλυφθεί σε φυτά και ο αριθμός ολοένα και αυξάνεται. Αυτό συμβαίνει γιατί υπάρχουν πολλές ομάδες υποκαταστατών οι οποίες μπορεί να αλλάξουν χημική ομάδα και άρα να προκύψουν διαφορετικά μόρια με εντελώς ξεχωριστές ιδιότητες [67]. Μια συνοπτική παρουσίαση των μορίων γίνεται στην **Εικόνα 12.**



Εικόνα 12: Ο χημικός τύπος των φλαβονοειδών φαινολών [67]

Φλαβόνες

Οι φλαβόνες έχουν ένα διπλό δεσμό ανάμεσα στον C_2 και C_3, και απαντώνται κυρίως σε λουλούδια, φύλλα και ιστούς φρούτων, συνήθως με τη γλυκοζυλιωμένη τους μορφή (Εικόνα 12). Πήραν το όνομα τους από το κίτρινο χρώμα τους το οποίο συνήθως ελκύει τα έντομα που επικονιάζουν τα φυτά. Μπορεί να παρουσιάζουν γλυκιά και πικρή γεύση, διαφοροποίηση που μπορεί να οφείλεται σε μικρές αλλαγές της δομής τους. Καλή πηγή τους αποτελούν γενικά τα φρούτα και τα λαχανικά αλλά κυρίως τα εσπεριδοειδή. Κάποια χαρακτηριστικά είδη είναι η λουτεολίνη, η απιγενίνη και η τανγκερίνη [80].

Φλαβονόλες

Οι φλαβονόλες έχουν ένα διπλό δεσμό ανάμεσα στον C_2 και C_3 όπως οι φλαβόνες και επιπλέον ο C_3 έχει υποκαταστάτη ένα υδροξύλιο και από αυτή τη μικρή διαφορά εξαρτώνται οι δράσεις που έχει το μόριο στη φύση. Η ομάδα αυτή αντιπροσωπεύει τα πιο διαδεδομένα φλαβονοειδή των τροφών, με την κερκετίνη να είναι ο κύριος εκπρόσωπος (Εικόνα 12). Οι κύριες πηγές φλαβονολών είναι κάποια είδη λαχανικών, ενώ το τσάι και το κόκκινο κρασί επίσης περιέχουν σημαντικές ποσότητες φλαβονολών [81]. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η βιοσύνθεση των φλαβονολών διεγείρεται από το φως, έτσι η περιεκτικότητα των φρούτων του ίδιου δέντρου στις ενώσεις αυτές, διαφέρει ανάλογα με τη θέση τους σε αυτό, αλλά και στο ίδιο το φρούτο μπορεί να διαφέρει από έξω προς τα μέσα αφού εξαρτάται από την έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία [82].

Φλαβανόνες

Οι φλαβανόνες χαρακτηρίζονται από την παρουσία μιας κορεσμένης αλυσίδας τριών ατόμων άνθρακα και την ύπαρξη ενός οξυγόνου στον C_4. Γενικά γλυκοζυλιώνονται από ένα δισακχαρίτη στον C_7. Κάποια είδη αυτών περιέχουν τα εσπεριδοειδή και αρωματικά φυτά όπως η μέντα. Τα κυριότερα άγλυκα φαινολικά παράγωγα είναι η ναριγγίνη, εσπεριτίνη και εριδιοκτυόλη (Εικόνα 12). Τη μεγαλύτερη ποσότητα φλαβανόνων περιέχει η άσπρη μεμβράνη ανάμεσα στη φλούδα και την 'καρδιά' των φρούτων [83].

Ισοφλαβόνες

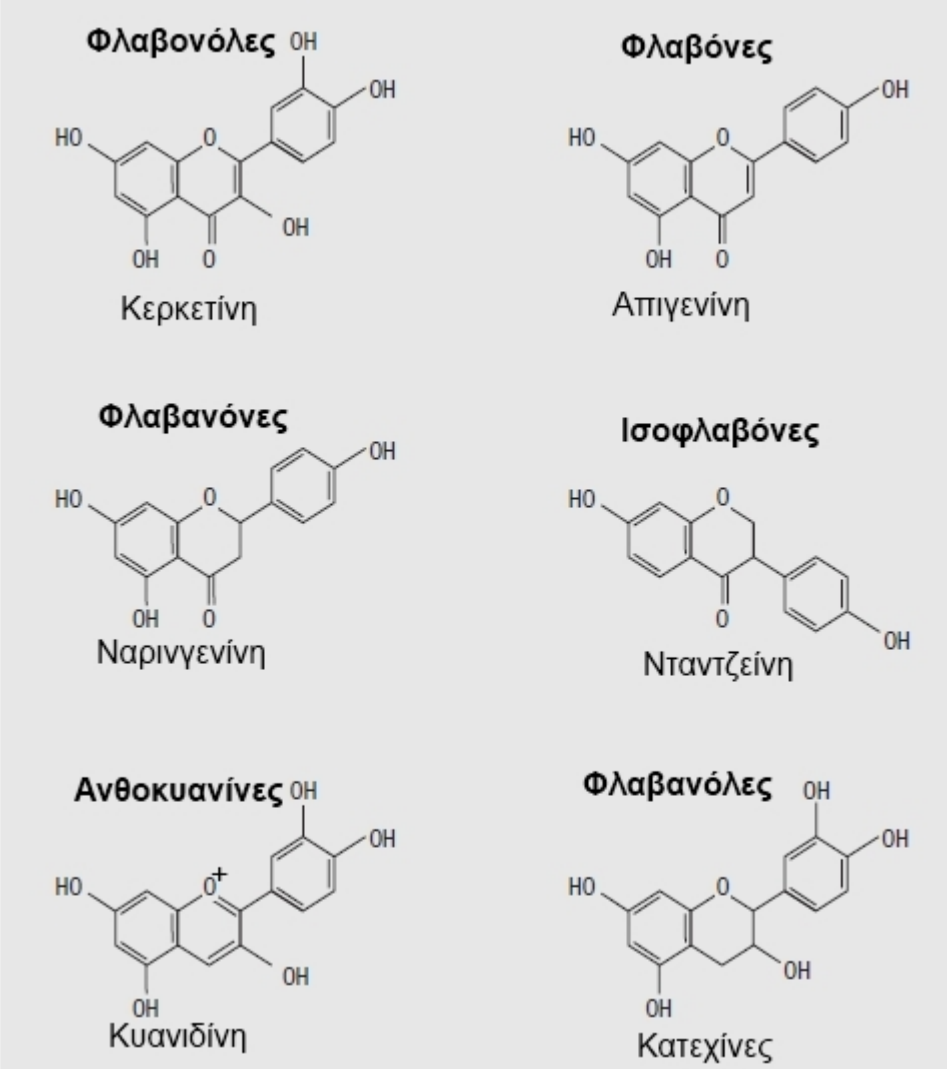
Οι ισοφλαβόνες διαφέρουν από τις φλαβόνες στη θέση του φαινολικού δακτυλίου, που βρίσκεται στη θέση 3 αντί για θέση 2 **(Εικόνα 13)**. Τα μόρια αυτά έχουν παρόμοια χημική δομή με τα οιστρογόνα, αφού έχουν υδροξύλια στους $C_{4'}$ και C_7 και μπορούν να προσδένονται στους υποδοχείς των οιστρογόνων και να λειτουργούν σαν φυτοοιστρογόνα. Άγλυκο παράγωγο της ομάδας αυτής είναι η γενιστείνη, αλλά απαντώνται στη φύση και γλυκοζυλιωμένα. Οι ισοφλαβόνες είναι θερμοευαίσθητες και μπορεί να υδρολυθούν κατά την επεξεργασία των διαφόρων τροφών [84].

Ανθοκυανίνες

Τα μόρια αυτά είναι υδρόφιλα και βρίσκονται κυρίως σε κόκκινα, μπλε και μωβ φρούτα και φυτά. Στη γλυκοζυλιωμένη μορφή τους ονομάζονται ανθοκυανιδίνες, με το σάκχαρο συνήθως να προσδένεται στη τρίτη θέση του τρίτου δακτυλίου είτε στη 5 είτε στην 7 του πρώτου δακτυλίου. Η γλυκοζυλίωση στις θέσεις 3'-4' και 5' του δεύτερου δακτυλίου είναι σπάνια αλλά έχει παρατηρηθεί. Οι υδατανθρακικές αυτές ομάδες μπορεί να έχουν ακυλιωθεί και έτσι να αποτελούν τα κινναμωνικά οξέα. Οι ανθοκυανίνες υπάρχουν σε διάφορα τρόφιμα όπως είναι τα δημητριακά και τα λαχανικά, μα καλές πηγές τους αποτελούν τα φρούτα [67].

Φλαβανόλες

Οι φλαβανόλες χαρακτηρίζονται από την παρουσία μιας κορεσμένης αλυσίδας τριών ατόμων άνθρακα και την ύπαρξη ενός υδροξυλίου στον C_3. Υπάρχουν στη φύση τόσο ως μονομερή όσο και πολυμερή, δηλαδή κατεχίνες και προανθοκυανιδίνες αντίστοιχα. Οι προανθοκυανιδίνες είναι αφυδρογονωμένες κατεχίνες και ο όρος αυτός προκύπτει από το όνομα που εισήγαγαν οι Haslam και Weinges (προκυανιδίνες), περιγράφοντας τα μόρια αυτά που μετά τη θέρμανση τους έδιναν κυανιδίνη το πιο διαδεδομένο ανθοκυανικό άγλυκο στη φύση. Σήμερα λέγονται και ταννίνες και είναι τα μόρια που προσδίδουν τη γεύση του πικρού και της στιφότητας στα τρόφιμα. Αντίθετα με τις άλλες τάξεις των φλαβονοειδών, οι φλαβανόλες δε βρίσκονται γλυκοζυλιωμένες στα τρόφιμα. Οι πιο συχνά απαντώμενες φλαβανόλες στα φρούτα είναι η κατεχίνη και η επικατεχίνη [85].



Εικόνα 13: Χαρακτηριστικές χημικές δομές των σύνθετων φαινολικών ενώσεων [67]

2.4 Πηγές φαινολικών ενώσεων στα τρόφιμα

Οι φαινολικές ενώσεις βρίσκονται στα περισσότερα αν όχι σε όλα τα φυτά και παράγονται ως προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών. Η περιεκτικότητα των διαφόρων φυτικών τροφίμων σε φαινολικές ενώσεις εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως το είδος, η ποικιλία, η έκθεση στο φως, η επεξεργασία και η αποθήκευση [64]. Παρακάτω παρουσιάζονται τρόφιμα που θεωρούνται καλές διαιτητικές πηγές φαινολικών ενώσεων.

Ελαιόλαδο

Το ελαιόλαδο ανάλογα με τις χημικές του ιδιότητες χωρίζεται σε διάφορες κλάσεις. Για παράδειγμα το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο διαφέρει από το απλό

ελαιόλαδο εξαιτίας των περιεχόμενων μικροσυστατικών. Σημαντικό επίσης είναι το γεγονός ότι κατά το ραφινάρισμα, το οποίο λαμβάνει χώρα όταν η οξύτητα του ελαιόλαδου υπερβαίνει τα επιτρεπτά όρια, καταστρέφονται οι περιεχόμενες πολυφαινόλες και αυτό αλλάζει την αψάδα της γεύσης. Γεγονός είναι ότι στις ελαιοπαραγωγικές χώρες μόνο το 10% του παραγόμενου ελαιόλαδου είναι έξτρα παρθένο.

Το ελαιόλαδο είναι πιο σταθερό στην οξείδωση σε σχέση με άλλα φυτικά έλαια, η ιδιότητα αυτή όπως δείχνουν οι μελέτες φαίνεται να οφείλεται στις περιεχόμενες πολυφαινόλες και όχι στις τοκοφερόλες στις οποίες το ελαιόλαδο είναι πλούσιο. Η υψηλή περιεκτικότητα σε φαινολικά αντικατοπτρίζεται και στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά αφού του προσδίδουν την πικρή και στιφή γεύση. Η επίδραση της πικρότητας και της στυφότητας στη γεύση είναι αλληλεπίδραση των μικροσυστατικών αυτών και της γεύσης του φύτρου. Στο ελαιόλαδο οι ουσίες που ευθύνονται για τη γεύση αυτή είναι οι φαινολικές ενώσεις όπως η τυροσόλη και το κιναμμωνικό οξύ.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η περιεκτικότητα του ελαιόλαδου σε φαινόλες δεν συνεπάγεται μόνη της την ποιότητα του ελαιολάδου. Τα κυριότερα φαινολικά που περιέχει το ελαιόλαδο είναι η τυροσόλη και η υδροξυτυροσόλη σε συγκεντρώσεις 40,2 και 3,8mg/kg αντίστοιχα [74], ενώ υπάρχουν και άλλα όπως η ελαιοευρωπείνη, το καφεϊκό οξύ, το λιγστροσίδιο, το βανιλλικό οξύ, το σιναπικό οξύ, το συριγκικό οξύ, οι εστέρες της υδροξυτυροσόλης, που μαζί με την τυροσόλη και την υδροξυτυροσόλη που αναφέρθηκαν πριν, φτάνουν σε περιεκτικότητα τα 50-800mg/kg [86-91]. Τα τελευταία χρόνια η ολεοκανθάλη, ένα ακόμα φαινολικό συστατικό του ελαιολάδου μελετάται για διάφορες ευεργετικές επιδράσεις σε πλήθος νοσημάτων με επίκεντρο την αντι-φλεγμονώδη και τη χημειοπροστατευτική δράση [92].

Κρασί

Η αντίστροφη σχέση κατανάλωσης αλκοόλ και θνησιμότητας από καρδιαγγειακά νοσήματα οδήγησε τους ερευνητές να εξετάσουν εκτενέστερα τα μικροσυστατικά του κρασιού. Η διαφορά του κρασιού με άλλα αλκοολούχα ποτά είναι ότι περιέχει φυτοχημικές ουσίες οι οποίες παράγονται από τα ίδια τα σταφύλια για να προστατεύονται από τις υψηλές θερμοκρασίες. Στην πραγματικότητα το κρασί

περιέχει 0,8-1,2g φαινολικών ενώσεων ανά λίτρο. Οι ουσίες αυτές βρίσκονται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στο κόκκινο σε σχέση με το λευκό κρασί και του προσδίδουν τη στιφή χαρακτηριστική του γεύση. Αναλυτικά το κρασί περιέχει φαινολικές ουσίες όπως: ανθοκυανίνες, φλαβόνες, φλαβανόνες αλλά και κερκετίνη και γαλλικό οξύ [93]. Στο κόκκινο κρασί ανευρίσκονται κυρίως η ρεσβερατρόλη και η υδροξυτυροσόλη [94-96]. Η συγκέντρωση της ρεσβερατρόλης αλλάζει ανάλογα με τον τύπο του κρασιού, αναλυτικά στα άσπρα κρασιά κυμαίνεται στα 0,1 μg/mL, ενώ στα κόκκινα 0,65μg/mL [97]. Το κόκκινο κρασί περιέχει επίσης κατεχίνες σε ποσότητα μεγαλύτερη από 300mg/L [93].

Τσάι, Καφές

Το τσάι είναι το πρώτο σε κατανάλωση ρόφημα με τόσο υψηλή περιεκτικότητα σε μικροσυστατικά που παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση. Κάποιες από τις ουσίες αυτές στις οποίες οφείλεται η αντιοξειδωτική του δράση είναι η κερκετίνη, η καμπεφερόλη, η μυρικιτίνη και η επιγαλλοκατεχίνη, σε ποσοστό μεγαλύτερο του 35% επί του ξηρού βάρους των φύλλων του τσαγιού [98]. Επίσης, αποτελεί ίσως την καλύτερη πηγή κατεχινών, αφού το πράσινο τσάι περιέχει περισσότερα από 800mg/L [67].

Ένα άλλο ρόφημα που καταναλώνεται συχνά είναι ο καφές, που σχετίζεται με υψηλή πρόσληψη υδροξυκιναμμωνικού οξέος και χλωρογενικού οξέος. Τα άτομα που καταναλώνουν καφέ μέσα στη μέρα προσλαμβάνουν 500-800mg υδροξυκιναμμωνικού οξέος την ημέρα, καθώς και καφεϊκό οξύ σε ποσότητα 206mg ανά ημέρα [99].

Λαχανικά

Τα λαχανικά αποτελούν σημαντικό είδος τροφίμου της Μεσογειακής Δίαιτας, ενώ πρέπει να καταναλώνονται καθημερινά καθώς είναι πλούσια πηγή βιταμινών, ινών και πολυφαινολών. Η τομάτα για παράδειγμα είναι σημαντική πηγή λουτεολίνης, το κρεμμύδι περιέχει φλαβονόλες 0,3mg/g νωπού βάρους, η κόκκινη πιπεριά λουτεολίνη, το σπανάκι απιγενίνη. Βέβαια το σπανάκι εκτός από φλαβονόλες περιέχει και υδροξυκιναμμωνικά οξέα. Σημαντική πηγή φλαβονολών αποτελεί το μπρόκολο και η κατσαρή κράμβη, ενώ τα κρεμμύδια περιέχουν περισσότερα από 1,2g/kg του νωπού βάρους τους [81]. Τέλος σημαντικό είναι να αναφερθεί πώς το μαγείρεμα των λαχανικών επηρεάζει την περιεκτικότητα τους σε φαινόλες, αφού το

βράσιμο τομάτας ή κρεμμυδιών για 15min προκαλεί την καταστροφή του 75% της περιεχόμενης κερκετίνης, το ψήσιμο σε φούρνο μικροκυμάτων το 65% και το τηγάνισμα το 30%. Η επίδραση βέβαια του μαγειρέματος στο περιεχόμενο των φαινολών εξαρτάται από το είδος του λαχανικού [100].

Φρούτα

Σημαντική πηγή φαινολών αποτελούν φρούτα όπως τα εσπεριδοειδή αλλά και εκείνα που έχουν κόκκινο χρώμα, αφού κατέχουν την πρώτη θέση. Τα πορτοκάλια περιέχουν φλαβανόνες με κυριότερη την εσπεριδίνη σε περιεκτικότητα 125-250mg/L χυμού. Πλούσιες πηγές είναι όμως και άλλα εσπεριδοειδή όπως το μανταρίνι, το γκρέιπφρουτ, το λεμόνι και το μοσχολέμονο. Από την άλλη όταν γίνεται αναφορά στα κόκκινα φρούτα εννοούνται τα δαμάσκηνα, οι φράουλες, τα κεράσια, τα σταφύλια τα μαύρα και κόκκινα μούρα τα οποία περιέχουν κυρίως ανθοκυανίνες. Επίσης το ρόδι είναι σημαντική πηγή φαινολών, όπως οι ανθοκυανίνες, οι κατεχίνες, οι ταννίνες, το ελλαγικό και γαλλικό οξύ, σε ποσοστό 0,2-1% του χυμού του. Τα συστατικά αυτά υπάρχουν και στη φλούδα των φρούτων, για παράδειγμα η φλούδα του κόκκινου σταφυλιού περιέχει ρεσβερατρόλη σε συγκεντρώσεις 50-100mg/kg επί του καθαρού βάρους [101], ενώ η φλούδα του μανταρινιού είναι πλούσια σε φλαβόνες [80]. Τα φρούτα που θεωρούνται καλές πηγές κατεχινών είναι τα ροδάκινα αφού περιέχουν 250mg/kg επί του νωπού βάρους και τα κεράσια με την ίδια ακριβώς περιεκτικότητα. Επίσης πλούσια σε υδροξυκινναμωνικά οξέα είναι το ακτινίδιο και το μήλο, συγκεκριμένα το καφεϊκό οξύ βρίσκεται σε μεγάλη περιεκτικότητα στο ακτινίδιο, με το μεγαλύτερο μέρος του να υπάρχει στη φλούδα. Τέλος τα βερίκοκα θεωρούνται καλή πηγή φλαβονολών [102, 103].

Όσπρια (σόγια- φασόλια)

Οι καρποί της σόγιας περιέχουν αρκετή ποσότητα ισοφλαβονών (5mg/kg πρωτεΐνης), μόρια που ευθύνονται για τα ευεργετικά αποτελέσματα που παρουσιάζει σε διάφορα νοσήματα. Συγκεκριμένα η περιέχουσα γενιστείνη και η νταζείνη δρουν ως προοιστρογόνα ή αντιοιστρογόνα και αυτός είναι ένας τρόπος που ασκούν τις δράσεις τους. Επίσης, τα όσπρια περιέχουν ισοφλαβόνες, ισοφλαβονοειδή και λιγνάνια, σε ποσότητα που κυμαίνεται από 37,3mg/100g έως 140,3mg/100g [104, 105]. Η ποικιλία και η πιθανή συνεργιστική δράση όλων αυτών των συστατικών που

περιέχονται στα όσπρια, τα καθιστούν ένα είδος τροφίμου με σημαντικές θετικές επιδράσεις σε πλήθος νοσημάτων μεταξύ των οποίων τα καρδιαγγειακά [106].

Σοκολάτα

Το κακάο περιέχει σημαντικά ποσά φαινολικών στοιχείων, όπως για παράδειγμα την επικατεχίνη. Από μελέτες φαίνεται ότι 20% της πρόσληψης της κατεχίνης σε νέους προέρχεται από την κατανάλωση της σοκολάτας, αποτέλεσμα που δείχνει ότι η ημερήσια πρόσληψη αντιοξειδωτικών των νέων προέρχεται από τη σοκολάτα. Η σοκολάτα περιέχει κατεχίνες σε ποσότητα μεγαλύτερη από 600mg/L [67].

Ξηροί καρποί

Οι ξηροί καρποί είναι ένα ακόμα είδος τροφίμου που περιέχει φλαβονοειδή, ισοφλαβονοειδή, φυτικό οξύ (ινοσιτολικό εξαφωσφατίδιο-IP 6) και φυτοστερόλες. Σημαντική πηγή λιγνανίων στη διατροφή του ανθρώπου αποτελεί ο λιναρόσπορος, ο οποίος έχει βρεθεί ότι έχει σημαντικές βιολογικές δράσεις στον άνθρωπο και δεν είναι ακόμα γνωστός στο ευρύ κοινό. Στον κολοκυθόσπορο έχουν βρεθεί λιγνάνια με δράση φυτοοιστρογόνων (secoisolariciresinol, lariciresinol) [107]. Οι φαινολικές ενώσεις που περιέχονται στο αμύγδαλο είναι οι γλυκοζίτες της 3-O'-μεθυλοκερκετίνης, καμφερόλης και ναριγενίνης καθώς και κατεχίνη, πρωτοκατεχοικό οξύ, βανιλλικό οξύ, π-υδροξυβενζοϊκό οξύ και καφεϊκό οξύ [108, 109], αλλά και ρεσβερατρόλη καθώς και παράγωγα της όπως η οξυρεσβερατρόλη, γλυκοσίδιο και πτεροστιλβένιο [110]. Η trans-ρεσβερατρόλη έχει ανιχνευθεί σε ποικιλίες κελυφωδών φιστικιών Τουρκίας και τα επίπεδα της κυμαίνονταν από 0,03 έως 1,92μg/g [111]. Στους ηλιόσπορους η κύρια φαινολική ένωση είναι το χλωρογενικό οξύ [112], ενώ αρκετά είδη ταννινών έχουν απομονωθεί από το εκχυλίσματα καρυδιού [85].

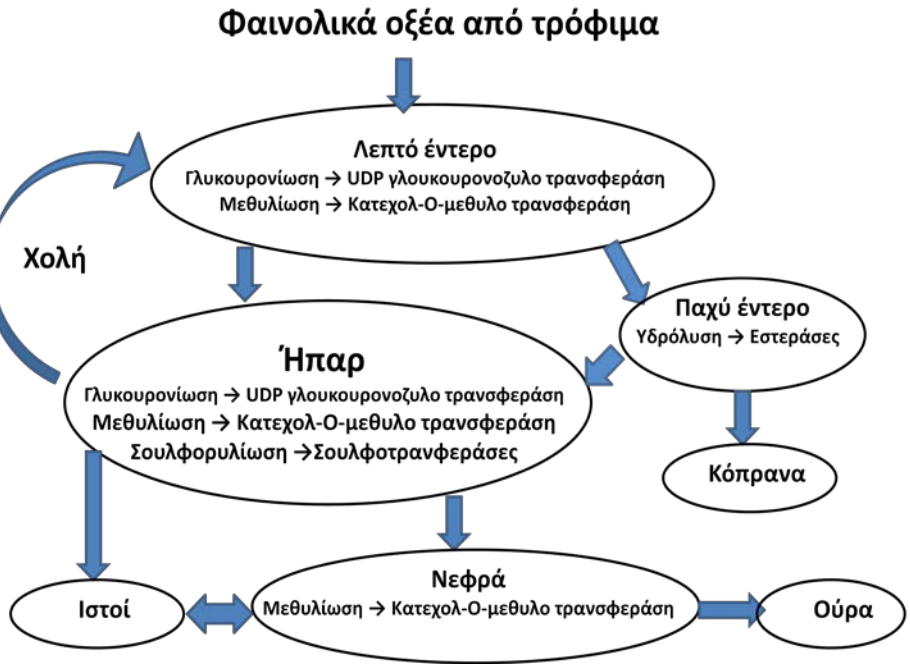
2.5 Μεταβολισμός Φαινολικών ενώσεων- Εισαγωγή

Παρόλο που οι φαινολικές ενώσεις υπάρχουν σε διάφορα είδη τροφίμων που καταναλώνονται καθημερινά από τον άνθρωπο, δεν έχει ακόμα εξακριβωθεί ο ευεργετικός τους ρόλος στην υγεία του ανθρώπου. Οι λόγοι που συμβαίνει αυτό είναι ότι, α) μπορεί να έχουν μικρή δράση στον ανθρώπινο οργανισμό, β) μεταβολίζονται από το πεπτικό σύστημα και γ) αποβάλλονται με σχετικά γρήγορο ρυθμό από το

σώμα. Όταν τα μόρια αυτά μεταβολίζονται στο ανθρώπινο σώμα, η συγκέντρωση τους στο πλάσμα φτάνει τα nmol/L, δηλαδή η ποσότητα που τελικά υπάρχει μέσα στον οργανισμό είναι πιο μικρή από την προσληφθείσα. Τα μόρια αυτά εισέρχονται στο σώμα γλυκοζυλιωμένα ή άγλυκα, σε μικρές ή μεγάλες δόσεις (μmol/L, mmol/L). Για αυτό είναι σημαντικό να εξεταστούν οι παράγοντες που εμπλέκονται στην απελευθέρωση των πολυφαινολών από τα τρόφιμα, τον βαθμό απορρόφησης τους στο σώμα, τον ενδογενή μεταβολισμό τους αλλά και τη βιοδιαθεσιμότητα, που με βάση τη φαρμακολογία αντιπροσωπεύει τον ρυθμό και το βαθμό που ένα φάρμακο εκτελεί τον σκοπό για τον οποίο δημιουργήθηκε. Η κατανόηση της βιοδιαθεσιμότητας των φαινολικών ενώσεων (ξενοβιοτικών) θα δώσει την πληροφορία για τη μορφή που τελικά παίρνουν αυτές οι ουσίες μέσα στο σώμα αλλά και πως ασκούν τις ευεργετικές τους δράσεις. Η γνώση αυτή στο μέλλον θα δώσει την δυνατότητα στους ειδικούς α) να δίνουν σωστές συστάσεις για την πρόσληψη των πολυφαινολών, αφού θα έχει εξακριβωθεί ποια είδη ασκούν πραγματικά προστατευτικές δράσεις στην υγεία και ποιες ενώσεις απορροφώνται καλύτερα σε σχέση με άλλες, β) να διαπιστώσουν ποιοι μεταβολίτες σχετίζονται με ποιες δράσεις [113].

Οι γλυκοζυλιωμένες φαινολικές ενώσεις για να απορροφηθούν πρέπει να απομακρυνθεί ο γλυκοζίτης τους, με τη βοήθεια ενζύμων που βρίσκονται στο έντερο ή μικροοργανισμούς του παχέος εντέρου. Αφού μετατραπούν σε άγλυκα φαινολικά ακολουθεί η απορρόφηση και ο μεταβολισμός, ξεκινώντας από τον αυλό του λεπτού εντέρου και συνεχίζοντας με κάποιες τροποποιήσεις που γίνονται στο ήπαρ και άλλα όργανα [114]. Κατά τη διαδικασία του μεταβολισμού των φαινολικών συστατικών πραγματοποιούνται αρχικά αντιδράσεις που αυξάνουν τη λιποφιλικότητα τους, οι οποίες ανήκουν στη φάση Ι. Στη συνέχεια γίνονται οι αντιδράσεις της φάσης ΙΙ που περικλείουν τη γλυκουρονίωση, τη μεθυλίωση και την σουλφονυρυλίωση. Ισομορφές ενζύμων για αυτές τις αντιδράσεις υπάρχουν στο λεπτό και παχύ έντερο. Γενικά σημαντικό είναι να σημειωθεί ότι υπάρχει μια αλληλεπίδραση του λεπτού εντέρου και του ήπατος μέσω της εντεροηπατικής κυκλοφορίας. Επίσης υπάρχουν ενδείξεις ότι τα φαινολικά συστατικά, δεν μεταβολίζονται στο λεπτό έντερο αλλά περνούν στο παχύ έντερο και εκεί μεταβολίζονται σε φαινολικά οξέα που είναι πιο εύκολα απορροφήσιμα από την μικροκυκλοφορία του ανθρώπου. Τα προϊόντα του μεταβολισμού των φαινολικών ενώσεων φαίνεται να ασκούν πρεβιοτικές δράσεις

αφού βελτιώνουν την εντερική μικροχλωρίδα [115]. Τέλος σημαντικό είναι να αναφερθεί εδώ ότι τα προϊόντα μεταβολισμού των πολυφαινολών απεκκρίνονται μέσω του ουροποιητικού αλλά και του πεπτικού συστήματος. Πιθανός τρόπος μεταβολισμού των φαινολικών οξέων φαίνεται στην παρακάτω **Εικόνα 14** [116].



Εικόνα 14: Μεταβολισμός των φαινολικών οξέων στο ανθρώπινο σώμα. Τα φαινολικά οξέα μετατρέπονται αρχικά σε γλυκουρονιωμένα και μεθυλιωμένα παράγωγα στο λεπτό έντερο, στη συνέχεια μεταφέρονται είτε στο ήπαρ, για περαιτέρω μετατροπή σε θειο παράγωγα, είτε στο παχύ έντερο για τροποποιήσεις με σκοπό την αποβολή μέσω των κοπράνων. Μετά τις μετατροπές στο ήπαρ μπορεί τα παράγωγα να μεταφερθούν μέσω των χολικών οξέων στο λεπτό έντερο, είτε να αποβληθούν μέσω των νεφρών, είτε να αποθηκευτούν στους ιστούς[116].

2.5.1 Η είσοδος των πολυφαινολών στο πεπτικό σύστημα/ Στομάχι

Η πιο συνήθης μορφή που υπάρχουν οι πολυφαινόλες στα τρόφιμα είναι η γλυκοζυλιωμένη, εκτός από τις φλαβανόλες. Η ακριβής διαδικασία που λαμβάνει χώρα στο στομάχι κατά την είσοδο των πολυφαινολών δεν είναι πλήρως εξακριβωμένη μέχρι σήμερα. Το σίγουρο είναι ότι το πρώτο βήμα της διάσπασης του γλυκοζίτη και της μετατροπής της πολυφαινόλης σε άγλυκο προϊόν δε συμβαίνει από το όξινο περιβάλλον του στομάχου [117].

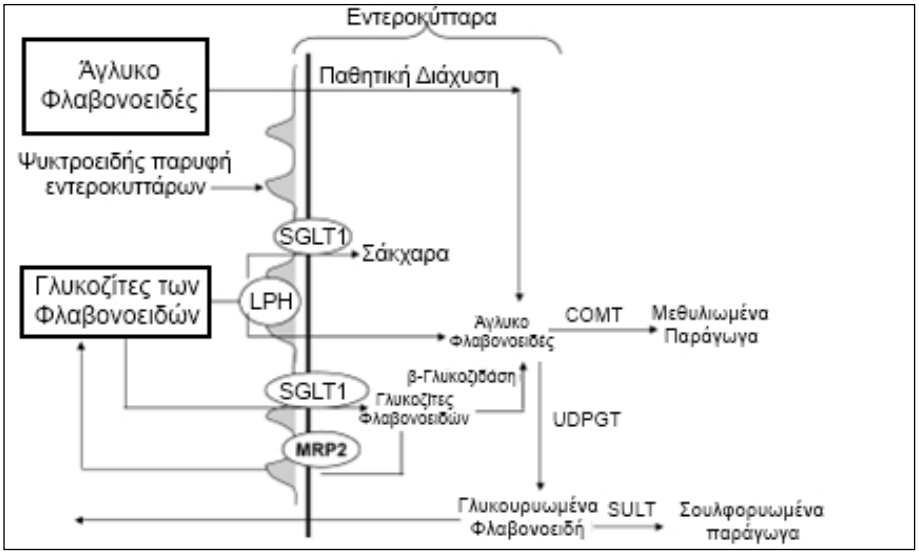
Ένας δείκτης που δίνει πληροφορίες για τις ιδιότητες της πολυφαινόλης είναι ο συντελεστής διάχυσης που υπολογίζει την σχετική συγγένεια που έχει ένα μόριο με την υδατική ή την οργανική φάση, προσδιορίζει δηλαδή την ικανότητα του μορίου να υφίσταται παθητική διάχυση σε μία βιολογική μεμβράνη και αντίστοιχα την

ικανότητα του να μετακινείται μέσα σε ένα κύτταρο. Φαίνεται λοιπόν ότι οι γλυκοζυλιωμένες πολυφαινόλες έχουν μικρότερο συντελεστή διάχυσης και άρα μεγαλύτερη υδροφιλικότητα. Γεγονός που τις βοηθάει να περάσουν το αρκετά όξινο περιβάλλον του στομάχου και να οδηγηθούν κατευθείαν στο δωδεκαδάκτυλο, αλλά από την άλλη δυσκολεύει την περαιτέρω απορρόφησή τους. Για αυτό και η απομάκρυνση του υδατανθρακικού τμήματος είναι απαραίτητη. Είναι γεγονός ότι διάφορες τάξεις των φλαβονοειδών όπως είναι οι φλαβονόλες, οι φλαβόνες και οι ισοφλαβόνες, ανευρίσκονται στη φύση γλυκοζυλιωμένες είτε με ραμνόζη ή γαλακτόζη ή άλλα σάκχαρα [118].

Υπάρχουν έρευνες όμως που δείχνουν ότι κάποια φλαβονοειδή καθώς και οι ανθοκυανίνες όπως η κερκετίνη και η νταντζείνη, απορροφώνται από το στομάχι μη γλυκοζυλιωμένες [119-121].

2.5.2 Λεπτό Έντερο/ Ήπαρ

Τα γλυκοζυλιωμένα φαινολικά συστατικά μετατρέπονται σε άγλυκα προκειμένου να περάσουν τη ψυκτροειδή παρυφή του εντέρου. Τα ένζυμα που καταλύουν αυτή τη διάσπαση ονομάζονται γλυκοζιδάσες. Υπάρχει η CBG (β-glucosidase), που βρίσκεται σε πληθώρα ιστών αλλά κυρίως στο ήπαρ. Επίσης υπάρχει και η LPH (Lactase Phlorizin Hydrolase) όπως φαίνεται στην **Εικόνα 15**, η οποία βρίσκεται μόνο στο λεπτό έντερο. Η LPH είναι μία β- γλυκοζιδάση και καταλύει αντιδράσεις με υπόστρωμα τη λακτόζη, όπως τα γλυκοζύλο και λακτοσύλο-κηραμίδια (βρίσκονται σε σφαιρίδια λίπους του γάλακτος) [122]. Το 5% των Ευρωπαίων και το 90% Αφρικανών και Ασιατών ενηλίκων έχουν ανεπάρκεια στο ένζυμο αυτό [103]. Το ένζυμο αυτό, η LPH, τείνει να πάρει κυρίαρχη θέση γιατί φαίνεται να καταλύει την υδρόλυση γλυκοζιτών που δεν καταλύει το ένζυμο CBG, όπως για παράδειγμα ο 3-O-γλυκοζίτης της κερκετίνης [123]. Οι άγλυκες μορφές των φαινολικών συστατικών περνούν με παθητική διάχυση στο εσωτερικό των εντεροκυττάρων. Υπάρχουν όμως και δεδομένα τα οποία υποστηρίζουν ότι οι γλυκοζυλιωμένες μορφές εισέρχονται στο εντεροκύτταρο με τη βοήθεια μεταφορέα γλυκόζης εξαρτώμενου από το νάτριο (SGLT1, Sodium Dependent Glucose Transport) [124] και εκεί μετατρέπονται σε άγλυκες μορφές με τη δράση κυτοσολικής β-γλυκοζιδάσης, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 15** [125].



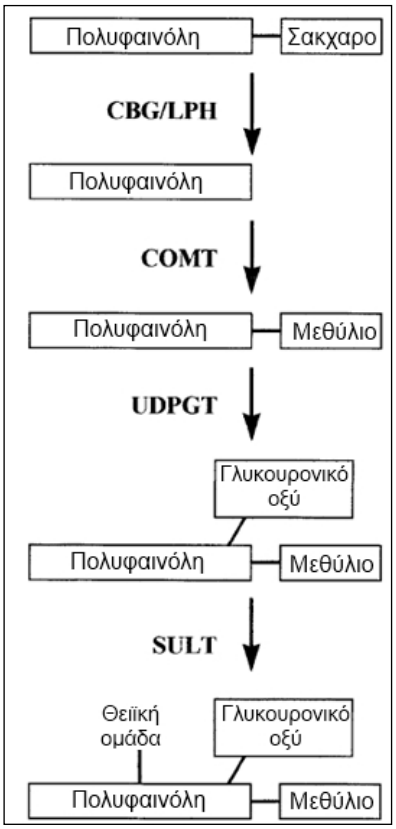
Εικόνα 15: Οι μεταφορείς που συμμετέχουν στην είσοδο των φαινολικών ενώσεων στο εντεροκύτταρο και οι αντιδράσεις που ακολουθούν [126].

Η είσοδος των φαινολικών ενώσεων στο εντεροκύτταρο πραγματοποιείται μέσω αντλιών εκροής φαινολικών όπως οι μεταφορείς που δεσμεύουν ATP (ABC), οι P-γλυκοπρωτεΐνης (Pgp/ABCB1/MDR1), αυτοί που σχετίζονται με την πρωτεΐνη 2 (multidrug resistance-associated protein 2 MRP2/ABCC2) και αυτοί που σχετίζονται με την πρωτεΐνη αντίστασης στον καρκίνο του μαστού (breast cancer resistance protein BCRP/ABCG2), οι οποίοι μεταφέρουν τα φαινολικά συστατικά, αλλά και τους μεταβολίτες τους πίσω στον εντερικό φραγμό. Δηλαδή συμμετέχουν τόσο στην αρχική εισαγωγή των μορίων στο έντερο για να αρχίσει ο μεταβολισμός, αλλά και στην επανείσοδο των μεταβολιτών [127].

Σημαντικό στάδιο για το μεταβολισμό των φαινολικών ενώσεων είναι τα ένζυμα της φάσης Ι και ΙΙ που υπάρχουν στα εντεροκύτταρα. Η φάση Ι περικλείει αντιδράσεις οξείδωσης, αναγωγής, ακετυλίωσης και υδρόλυσης που έχει ως στόχο να γίνουν τα μόρια πιο υδρόφιλα. Αναλυτικά στη φάση αυτή προστίθεται ή μένει εκτεθειμένη μία λειτουργική ομάδα (π.χ. υδροξυλίου) ούτως ώστε να λάβει μέρος η φάση ΙΙ. Στη φάση ΙΙ αυτή γίνονται αντιδράσεις σύζευξης, όπως γλυκουρονίωση, μεθυλίωση και προσθήκη θειοομάδας (σουλφορυλίωση) [128]. Σημαντική παράμετρος για την πορεία του φαινολικού συστατικού είναι η δόση, γιατί αν είναι μεγάλη μεταβολίζεται κυρίως στο ήπαρ, ενώ αν είναι μικρή μεταβολίζεται από το

εντεροκύτταρο και το ήπαρ παίζει ένα δευτερεύοντα ρόλο στην δημιουργία των συζεύξεων με άλλες ομάδες [129].

Στον μεταβολισμό των πολυφαινολών παίρνουν μέρος διάφορα ένζυμα όπως φαίνεται στην **Εικόνα 16**, τα οποία παρουσιάζουν διάφορους γενετικούς πολυμορφισμούς και διαφέρουν ανάμεσα στους ανθρώπους. Η συγκέντρωσή τους και ο ρυθμός που δρουν επηρεάζει τον μεταβολισμό των πολυφαινολών. Οι τροποποιήσεις που γίνονται μέσω αυτών των ενζύμων αντιπροσωπεύουν μεταβολικές διαδικασίες που βοηθούν στην αποτοξίνωση, είναι κοινό χαρακτηριστικό για τα ξενοβιοτικά, και βοηθά στην απέκκρισή τους μέσω χολικών αλάτων και ούρων, αφού αυξάνουν την υδροφιλικότητα τους.



Εικόνα 16: Τα ένζυμα που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των πολυφαινολών στον ανθρώπινο οργανισμό [103].

Μετά την αποσύζευξη από τον γλυκοζίτη αλλά και τις τροποποιήσεις της φάσης Ι γίνεται μία σύζευξη με τη βοήθεια του ενζύμου COMT (Ο- μεθυλοτρανσφεράση κατεχολαμινών), το οποίο όπως λέει και το όνομα του μεταφέρει το μεθύλιο. Μεγαλύτερη δραστικότητα παρουσιάζει στο ήπαρ και τους νεφρούς [129, 130]. Η

εξειδίκευση του ενζύμου για τις πολυφαινόλες, μπορεί να καθορίσει πια υδροξυλομάδα του δακτυλίου της πολυφαινόλης θα μεθυλιωθεί [131].

Το επόμενο βήμα είναι η δράση του ενζύμου UDP -γλυκουρονοτρανσφεράση (UDPGT, UGT), το οποίο καταλύει τη σύζευξη των πολυφαινολών με γλυκουρονικό οξύ πρόκειται για μεγάλη οικογένεια ενζύμων. Η διαδικασία αυτή γίνεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο των κυττάρων και κυρίως από την οικογένεια των UGT1A ενζύμων που υπάρχουν στο έντερο, το ήπαρ και τους νεφρούς. Τα ένζυμα UGT1A1, -1A3, -1A4, -1A6 και -1A9 βρίσκονται στο ανθρώπινο ήπαρ και γενικά οι νεφροί είναι πλούσιοι σε UGT1A9. Το κύριο όργανο για την γλυκουρονίωση είναι το ήπαρ [132-134].

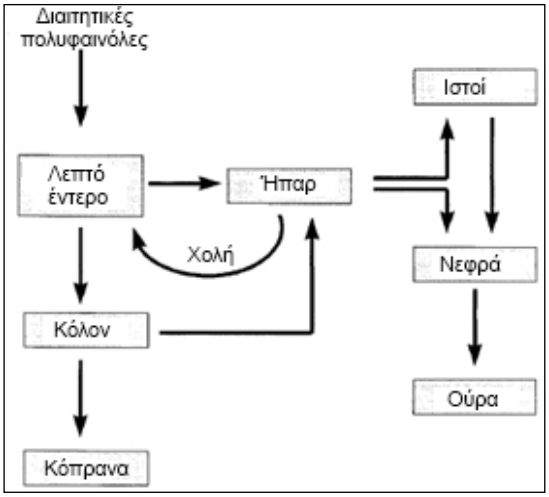
Στη συνέχεια δρα η ομάδα των ενζύμων, σουλφοτρανσφεράσες των φαινολών SULT και P- PST, που είναι μικρά σε αριθμό κυτοσολικά ένζυμα, τα οποία είναι εκτενώς κατανεμημένα. Τα ενδογενή υποστρώματα είναι οι ιωδοθυρονίνες και φυσικά οι φαινολικές ενώσεις [135]. Υπάρχουν διάφορες ισομορφές του ενζύμου, όπως η SULT1A1 που υπάρχει κυρίως στο ήπαρ. Οι σουλφοτρανσφεράσες, αντίθετα με τις γλυκουρονοτρανσφεράσες, δεν επηρεάζονται από τη δίαιτα ή το περιβάλλον [136]. Κάποια είδη φαινολικών συστατικών παρουσιάζουν ανασταλτική δράση στις σουλφοτρανσφεράσες, όπως η κερκετίνη που αναστέλλει την SULT1A1 μη ανταγωνιστικά με K_i 0,10mM [137], ακόμα το μη αλκοολούχο κόκκινο κρασί ή ένας δυνατός καφές που έχει αραιωθεί 10000 φορές αναστέλλει την SULT1A1 κατά 50% [138].

Παρόλο που τα ένζυμα μεταβολισμού της φάσης Ι και ΙΙ βρίσκονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα του εντερικού αυλού, οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αυτών είναι στο ήπαρ. Αυτό γίνεται γιατί εκεί είναι ο μεγαλύτερος φραγμός για την περαιτέρω διανομή σε όργανα όπως η καρδιά, οι νεφροί, οι πνεύμονες και ο εγκέφαλος. Το ήπαρ βρίσκεται σε τοποθεσία κλειδί, αφού το αίμα της πυλαίας κυκλοφορίας τροφοδοτείται από το έντερο, γεγονός που το καθιστά ικανό να προστατεύει το σώμα από πιθανά τοξικά ξενοβιωτικά που υπάρχουν στη διατροφή του ανθρώπου. Έτσι λοιπόν κάποιες πολυφαινόλες όταν εισέρχονται στον οργανισμό υφίσταται πλήρη απορρόφηση και μεταβολισμό, διαδικασία γνωστή ως μεταβολισμός πρώτης εισόδου (first pass metabolism). Τα μεταβολικά προϊόντα που προκύπτουν εξέρχονται από το ήπαρ και μέσω του αίματος μεταφέρονται στους νεφρούς για να εκκριθούν με τα ούρα ή μέσω των χολικών αλάτων στον εντερικό

αυλό. Από εκεί και πέρα οι μεταβολίτες είτε εκκρίνονται στα κόπρανα και αποβάλλονται, είτε δρουν ως μικροβιακά ένζυμα όπως οι β-γλυκοζιδάσες, που έχουν την ικανότητα να απομακρύνουν την γλυκουρονυλοομάδα και να μετατρέπουν την πολυφαινόλη σε άγλυκο προϊόν για να επαναπορροφηθεί. Αυτός ο κύκλος ονομάζεται εντεροηπατική επανακυκλοφορία και ίσως είναι επακόλουθο της μακροχρόνιας έκθεσης του σώματος στα φαινολικά συστατικά. Ευρήματα για αυτή τη διαδικασία υπάρχουν για την 7-O- γλυκουρονιωμένη μπαϊκαλεΐνη (baicalein) σε αρουραίους, αλλά κατά πόσο κάποια φλαβονοειδή παίρνουν μέρος σε μία τέτοια διαδικασία στον άνθρωπο, δεν είναι γνωστό [128].

2.5.3 Παχύ έντερο

Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή όταν οι πολυφαινόλες δεν απορροφώνται από το στομάχι ή το λεπτό έντερο μεταφέρονται στο παχύ έντερο. Αναλυτικά οι πολυφαινόλες που απορροφώνται, μεταβολίζονται στο ήπαρ μεταφέρονται με τα χολικά οξέα ή κατευθείαν από το εντεροκύτταρο πίσω στο λεπτό έντερο με κατεύθυνση το παχύ έντερο, αλλά σε διαφορετική χημική μορφή π.χ. γλυκουρονίδιο (**Εικόνα 17**). Το παχύ έντερο περιέχει 10^{12} μικροοργανισμούς/cm^3, έτσι έχει μεγάλο καταλυτικό και υδρολυτικό δυναμικό. Αρκετά φαινολικά συστατικά όπως η κερκετίνη συνδεδεμένη με ραμνόζη, δεν υδρολύονται από ενδογενή ένζυμα του οργανισμού αλλά από μικροοργανισμούς που υπάρχουν εκεί όπως *Bacteroides distasonis* (α- ραμνοζιδάση και β- γλυκοζιδάση), *B.uniformis* (β- γλυκοζιδάση) και B. ovatus (β- γλυκοζιδάση) [139]. Ο μικροοργανισμός *Enterococcus casseliflavus* καταλύει την αντίδραση απομάκρυνσης της υδατανθρακικής ομάδας και την παραγωγή του άγλυκου φαινολικού, από εκεί και πέρα παίρνουν μέρος και άλλοι μικροοργανισμοί, όπως ο *Eubacterium ramulus* που μετατρέπει τις πολυφαινόλες σε φαινολικά οξέα [140]. Σε αρουραίους το 33-44% της δόσης κατεχίνης εκκρίνεται στη χολή ως γλυκουρονιωμένα παράγωγα, ενώ παράγωγα όπως m και p-υδροξυφαινυλοπροπιονικό οξύ και άλλα οξέα είναι παράγωγα του μεταβολισμού από τη μικροχλωρίδα του εντέρου [141]. Τέλος στο παχύ έντερο υπάρχουν και οι παρακάτω ισομορφές του ενζύμου UDP-γλυκουρονοτρανσφεράση, UGT1A1, -1A3, -1A4, -1A6, -1A8, -1A9 και -1A10 [132]. Η SULT1A3 παρουσιάζει μεγάλη δραστικότητα στις ομάδες κατεχόλης που υπάρχουν στις πολυφαινόλες και βρίσκεται κυρίως στο παχύ έντερο.



Εικόνα 17: Ο μεταβολισμός των πολυφαινολών στον ανθρώπινο οργανισμό [103]

2.5.4 Μεταφορά σε ιστούς και όργανα απέκκρισης

Όταν λοιπόν οι πολυφαινόλες περάσουν τους αμυντικούς μηχανισμούς του εντέρου και του ήπατος εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος και μεταφέρονται στα διάφορα όργανα όπως φαίνεται στην **Εικόνα 18**. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται βιοδιαθεσιμότητα, είναι δηλαδή η ποσότητα των απορροφούμενων ξενοβιωτικών που υπάρχουν στην αγγειακή κυκλοφορία. Για αυτό και η βιοδιαθεσιμότητα μετράται αναλύοντας δείγματα περιφερικού αίματος κάποιες ώρες μετά την απορρόφηση. Συνολικά τα στοιχεία αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η επιτυχής απορρόφηση από τον εντερικό φραγμό δεν σημαίνει και ισοδύναμη βιοδιαθεσιμότητα.



Εικόνα 18: Ο μεταβολισμός και η βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών στον ανθρώπινο οργανισμό [128].

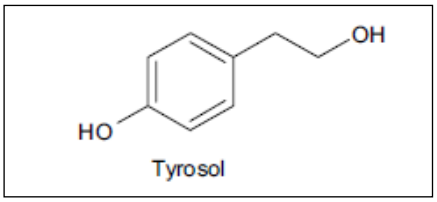
Οι μεταβολίτες που ανευρίσκονται στο αίμα είναι αποτέλεσμα εντερικής και ηπατικής λειτουργίας και διαφέρουν από τις αρχικές φαινολικές ενώσεις. Οι συγκεντρώσεις του πλάσματος σε συνολική ποσότητα μεταβολιτών κυμαίνεται από 0-4μmol/L μετά από πρόσληψη 50mg άγλυκης φαινολικής ένωσης. Βέβαια οι μεταβολίτες των πολυφαινολών στο αίμα κυκλοφορούν με τη βοήθεια πρωτεϊνών και η αλβουμίνη είναι η πρωταρχική πρωτεΐνη που προσδένεται με αυτά τα μόρια. Η συγγένεια που θα έχουν τα μόρια με την αλβουμίνη εξαρτάται από τη χημική τους δομή. Η πρόσδεση των μεταβολιτών με την αλβουμίνη μπορεί να επηρεάσει παράγοντες όπως τον χρόνο μεταφοράς τους στους ιστούς και τον ρυθμό απέκκρισης. Επίσης δεν έχει ξεκαθαριστεί πλήρως αν οι μεταβολίτες ασκούν τις δράσεις τους συνδεδεμένοι με την αλβουμίνη όπως συμβαίνει με την κερκετίνη ή πρέπει να είναι ελεύθεροι [142-144].

Η μέτρηση των μεταβολιτών στους ιστούς είναι ίσως πολύ πιο σημαντική από εκείνη του πλάσματος, όμως η έρευνα στο πεδίο αυτό τόσο σε πειραματόζωα όσο και στον άνθρωπο είναι σε αρχικά επίπεδα. Στα ούρα η συγκέντρωση των μεταβολιτών κυμαίνεται από 0,3% έως 43% της δόσης που έχει απορροφηθεί και εξαρτάται από το είδος της πολυφαινόλης. Το γαλλικό οξύ και οι ισοφλαβόνες είναι οι πιο καλά απορροφούμενες φαινολικές ενώσεις, ακολουθούν οι κατεχίνες, οι φλαβανόνες και γλυκοζίτες της κερκετίνης. Από την άλλη οι προανθοκυανιδίνες, οι κατεχίνες και οι ανθοκυανίνες δεν είναι τόσο καλά απορροφούμενες φαινολικές ενώσεις [145].

Από μία ερευνητική ομάδα μελετήθηκε η βιοδιαθεσιμότητα της ρεσβερατρόλης, για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε σημασμένη ρεσβερατρόλη σε ποσότητα 7.4 kBq ^{14}C-trans-ρεσβερατρόλη και δόθηκε εκ του στόματος σε αρουραίους. Από τις μετρήσεις της ραδιενέργειας σε χρόνους 1,5, 3 και 6h μετά τη χορήγηση φάνηκε ότι στη 1,5h η ραδιενέργεια ήταν χαμηλή και ανιχνεύθηκε μόνο στον δωδεκαδάκτυλο, στους νεφρούς, το ήπαρ και το παχύ έντερο. Στις 3h η ραδιενέργεια ανιχνεύτηκε σε όργανα όπως ο εγκέφαλος, οι πνεύμονες, το ήπαρ, ο σπλήνας, η καρδιά, ο δωδεκαδάκτυλος, το παχύ έντερο και οι όρχεις. Η υψηλότερη συγκέντρωση μετρήθηκε στον δωδεκαδάκτυλο, το όργανο με την αμέσως μικρότερη συγκέντρωση ήταν οι νεφροί και ακολουθούν οι πνεύμονες και το ήπαρ. Ενώ όλα τα υπόλοιπα όργανα που αναφέρθηκαν παρουσίαζαν μικρότερες συγκεντρώσεις [146].

Άλλα ευρήματα δείχνουν ότι η ποσότητα των αρχικών μορφών φλαβονοειδών στο πλάσμα του ανθρώπου (η χημική δομή που υπάρχει στη φύση) σπάνια ξεπερνά το 1μM, όταν η ποσότητα που προσλαμβάνεται είναι αυτή που προσλαμβάνεται με μία τυπικά ισορροπημένη διατροφή. Οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στο πλάσμα ανευρίσκονται 1-2h μετά την πέψη [147, 148] για τα περισσότερα φλαβονοειδή, με εξαίρεση τις πολυφαινόλες που απορροφώνται μετά από μερική αποικοδόμηση από την εντερική μικροχλωρίδα. Για τα περισσότερα φλαβανοειδή λοιπόν που απορροφώνται από το λεπτό έντερο, η συγκέντρωση του πλάσματος μειώνεται δραματικά μετά το πέρας των 2h. Αυτή η γρήγορη απέκκριση οφείλεται στη σύζευξη της άγλυκης φαινολικής ένωσης με σούλφο- και γλυκουρονυλο- ομάδες [149]. Η κερκετίνη από την άλλη έχει χρόνο ημιζωής απέκκρισης πολύ μεγαλύτερο, περίπου 24h και αυτό οφείλεται στην υψηλή συγγένεια που έχει με την αλβουμίνη [150]. Έτσι για να υπάρχει μια συνεχόμενα υψηλή συγκέντρωση στο πλάσμα θα πρέπει η πρόσληψη να είναι πολύ συχνή [151]. Επίσης ένα άλλο σημαντικό στοιχείο είναι ότι ο χρόνος ημιζωής των μεταβολιτών που δημιουργούνται από την εντερική μικροχλωρίδα είναι πολύ μεγαλύτερος λόγω του μεγάλου χρόνου παραμονής αυτών των μορίων στο παχύ έντερο. Και αυτό αποδεικνύεται από έρευνα που έδειξε ότι οι μεταβολίτες των φυτοοιστρογόνων του γάλακτος σόγιας και του λιναρόσπορου για να φτάσουν τις αναμενόμενες τιμές στο πλάσμα και τα ούρα χρειάστηκαν 2 μέρες [124, 152].

2.6 Μεταβολισμός και βιοδιαθεσιμότητα τυροσόλης



Εικόνα 19: Η χημική δομή της τυροσόλης

Μία φαινολική ένωση η οποία θα μελετηθεί στην παρούσα διατριβή είναι η τυροσόλη, η δομή της οποίας παρουσιάζεται στην **Εικόνα 19**. Η τυροσόλη αποτελεί το βασικότερο είδος φαινολικής ένωσης που υπάρχει στο ελαιόλαδο γι' αυτό και οι

περισσότερες μελέτες που γίνονται για τη μελέτη μεταβολισμού και βιοδιαθεσιμότητας της είναι μετά την κατανάλωση έξτρα παρθένου ελαιολάδου.

Στις μελέτες αυτές καταναλώνονται συνήθως 50mL ελαιολάδου και πραγματοποιείται μέτρηση της τυροσόλης και των μεταβολιτών της για τις επόμενες ώρες έως και μέρες. Τα βασικά συμπεράσματα είναι ότι η κύρια μορφή απέκκρισης της τυροσόλης στα ούρα είναι η γλυκουρονιωμένη στη θέση 4', ενώ της υδροξυτυροσόλης στις θέσεις 3' και 4'. Τα παράγωγα αυτά παρουσίασαν μέγιστη απέκκριση στις 6h [153].

Συγκεκριμένα 11 υγιείς εθελοντές μετά από τις 3 μέρες δίαιτας χαμηλής σε πολυφαινόλες κατανάλωσαν 50mL παρθένο ελαιόλαδο μαζί με 200g ψωμί, στη συνέχεια συλλέχθηκαν ούρα στις 0, 6 και 24 h. Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι ανιχνεύθηκαν γλυκουρονιωμένα παράγωγα τυροσόλης στη θέση 4΄ και στις 3΄και 4΄ της υδροξυτυροσόλης. Τα παράγωγα αυτά παρουσίασαν μέγιστη απέκκριση στις 6 h. Το δεδομένο αυτό αποδεικνύει ότι η τυροσόλη του ελαιολάδου μεταβολίζεται γρήγορα και κυρίως σε γλυκουρονιωμένα παράγωγα. Η τυροσόλη αυξήθηκε στα ούρα από την πρώτη δόση, ενώ με τις επαναλαμβανόμενες δόσεις μειώθηκε μετά από 7 ημέρες. Εν τούτοις, παρέμεινε σε υψηλότερα επίπεδα από τα αρχικά, πριν τη χορήγηση δηλαδή. Η ανάκτηση στα ούρα είναι περίπου 16,9 ±4,8% μετά τη πρώτη δόση και 19,4 ± 12,2% στις επαναλαμβανόμενες καθημερινές δόσεις [154]. Η ανάκτηση της ολικής τυροσόλης (ελεύθερη και υδρολυμένα γλυκουρονιωμένα παράγωγα μετά τη δράση της γλυκουρονάσης) στα ούρα ήταν 20-22%, αυτό σημαίνει ότι κάποια ποσότητα αποβάλλεται με τα κόπρανα, κάποια μεταβολίζεται στο έντερο, κατανέμεται στους ιστούς, βρίσκεται στα κυκλοφορούντα κύτταρα όπως τα ερυθρά και κάποια αποβάλλεται μετά από 24h από τα ούρα [155].

Η βιοδιαθεσιμότητα της τυροσόλης φαίνεται να επηρεάζεται από το τρόφιμο που βρίσκεται όπως έδειξε μελέτη όπου προστέθηκε σε ελαιόλαδο και σε υδατικό διάλυμα γνωστή ποσότητα ραδιενεργούς τυροσόλης, τα διαλύματα χορηγήθηκαν ενδοφλέβια και οι αναλύσεις έγιναν στα ούρα αρουραίου. Ενώ για να γίνει εκτίμηση της βιοδιαθεσιμότητας δόθηκε και από του στόματος δόση για να συγκριθεί με την ενδοφλέβια. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η βιοδιαθεσιμότητα ανάμεσα στο έλαιο και το υδατικό δ/μα που δόθηκαν από του στόματος ήταν 98% και 71% αντίστοιχα στα ούρα. Ενώ όσο αφορά τους δύο τρόπους χορήγησης, στις 24h δεν υπήρχε διαφορά στην ποσότητα της τυροσόλης του λαδιού στα ούρα. Στατιστικά σημαντικά

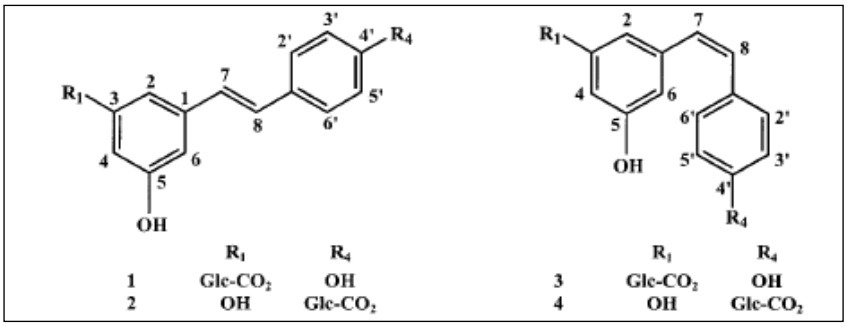
μεγαλύτερη ήταν η απέκκριση 24ώρου από την ενδοφλέβια υδατική δόση σε σχέση με την υδατική δόση από του στόματος. Τέλος όσον αφορά την από του στόματος δόση μεγαλύτερη είναι η 24ωρη απέκκριση από το λάδι σε σχέση με το υδατικό διάλυμα. Ο λόγος βέβαια που η βιοδιαθεσιμότητα είναι μεγαλύτερη στο ελαιόλαδο σε σχέση με το υδατικό διάλυμα οφείλεται στο γεγονός ότι το λάδι προστατεύει την τυροσόλη από την οξείδωση και αυτό προλαμβάνει τυχόν τροποποιήσεις που μπορεί να συμβούν στο μόριο πριν την απορρόφηση. Άλλο εύρημα της μελέτης είναι ότι στην ανάλυση ούρων βρέθηκε κορυφή που εξαφανίστηκε μετά τη δράση της σουλφατάσης και όχι της γλυκουρονάσης, αυτό αποδεικνύει την ύπαρξη θείο παραγώγου της τυροσόλης στα ούρα αρουραίου [156].

Τελευταία μελέτη με 28 υγιείς εθελοντές, έδειξε ότι τα επίπεδα της υδρόξυ-τυροσόλης μετά την κατανάλωση κρασιού οφείλονται και στην ενδογενή μετατροπή της τυροσόλης σε υδρόξυ-τυροσόλη [71].

Η ικανότητα της τυροσόλης να συνδέεται στις λιποπρωτεΐνες LDL είναι γνωστή, η απέκκριση της από τα ούρα μεγιστοποιείται μέχρι τις 4h μετά την κατανάλωση παρθένου ελαιολάδου, ενώ είναι δοσοεξαρτώμενη και διαφοροποιείται σε άντρες και γυναίκες [73].

2.7 Μεταβολισμός και βιοδιαθεσιμότητα ρεσβερατρόλης

Η ρεσβερατρόλη είναι ένα είδος στιλβενίου που ασκεί σημαντικές βιολογικές δράσεις και για αυτό το σκοπό έχουν γίνει προσπάθειες για την κατανόηση του μεταβολισμού και της βιοδιαθεσιμότητας της. Από *in vitro* μελέτες είτε σε συστήματα ελεύθερα κυττάρων είτε σε συστήματα κυτταροκαλλιεργειών έχει φανεί ότι τα μικροσώματα ήπατος εμφανίζουν ενζυμική δράση γλυκουρονίωσης της ρεσβερατρόλης κυρίως στις θέσεις 3 και 4’ (**Εικόνα 20)** [157] και ότι καρκινικά κύτταρα μαστού μεταβολίζουν την ρεσβερατρόλη σε 3-Ο-θειο παράγωγο [158].



Εικόνα 20: Συνθετικά παράγωγα της ρεσβερατρόλης. 1: *trans*-ρεσβερατρόλη-3-*O*-γλυκουρονίδιο, 2: *trans* ρεσβερατρόλη-4'-*O*- γλυκουρονίδιο, 3: *cis*- ρεσβερατρόλη -3-*O*- γλυκουρονίδιο, 4: *cis*-ρεσβερατρόλη -4'-*O*- γλυκουρονίδιο. Glc-CO2, γλυκουρονικό οξύ

Σε μελέτη έγινε η μέτρηση της ρεσβερατρόλης και των μεταβολιτών της σε ιστούς αρουραίου. Η ποσότητα της ρεσβερατρόλης που χορηγήθηκε ήταν 15mg/kg και εισήχθη στους αρουραίους ενδοφλέβια. Η μέτρηση της ρεσβερατρόλης στους ιστούς έγινε στα 90min μετά τη χορήγηση, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η υψηλότερη συγκέντρωση ταυτοποιήθηκε στους νεφρούς 1,45±0,35nmol/g και τους πνεύμονες 1,13±0,34nmol/g. Επίσης μετρήθηκαν τα γλυκουρονιωμένα παράγωγα της ρεσβερατρόλης και η υψηλότερη συγκέντρωση τους ήταν στους νεφρούς 2,91±0,19nmol/g, ενώ χαμηλότερη ανιχνεύτηκε σε όρχεις, ήπαρ και πνεύμονες. Δε βρέθηκαν γλυκουρονιωμένα παράγωγα στον εγκέφαλο. Η υψηλότερη ποσότητα θείο παραγώγων ανιχνεύθηκε στους πνεύμονες 0,42±0,10nmol/g, ακολουθούν οι όρχεις 0,23±0,01nmol/g, το ήπαρ 0,11±0,02nmol/g και ο εγκέφαλος 0,04±0,10nmol/g. Σημαντικό είναι να σημειωθεί ότι σε αυτή τη μελέτη δεν ανιχνεύθηκαν καθόλου παράγωγα ρεσβερατρόλης με θειο ομάδες στους νεφρούς και ένας λόγος που το εξηγεί αυτό ίσως είναι η γρήγορη αποβολή τους μέσω των ούρων [159].

Σε άλλη μελέτη, δόθηκε σε αρουραίους ρεσβερατρόλη σε ποσότητα 20mg/kg, έγινε συλλογή ούρων και μετά τη δράση σουλφατασών και γλυκουρονασών, ταυτοποιήθηκαν μεταβολίτες όπως 3 θειϊκή ρεσβερατρόλη, 4'- θειϊκή ρεσβερατρόλη και *trans*- ρεσβερατρόλη -3-γλυκουρονίδιο. Αναλυτικά τα πειράματα έδειξαν ότι ο μεταβολίτης *trans*- ρεσβερατρόλη-3-γλυκουρονίδιο είναι πρώιμος μεταβολίτης της ρεσβερατρόλης από το ανθρώπινο ήπαρ, τα *trans*- ρεσβερατρόλη -3-γλυκουρονίδιο και σουλφατίδιο είναι και τα δύο μεταβολίτες που παράγονται σε ούρα αρουραίου και πλάσμα ποντικιού, μετά από τη δράση ηπατοκυττάρων αρουραίου. Σημαντικό είναι ότι παράγωγα αντιδράσεων φάσης Ι δεν ανιχνεύτηκαν. Ακόμα συζευγμένα

παράγωγα ρεσβερατρόλης και όχι η ελεύθερη μορφή βρίσκονται στην αιματική κυκλοφορία και αυτό δίνει ώθηση για περαιτέρω έρευνα στο μέλλον [160].

Στους ανθρώπους έχει φανεί ότι μετά από δόση 0,03mg/kg η μεγαλύτερη ποσότητα ρεσβερατρόλης αποβάλλεται στα ούρα μετά από 2 έως 3h. Ενώ αν αυξηθεί η δόση σε 1mg/kg η αποβολή απαιτεί 7-10h. Η συνολική απέκκριση ρεσβερατρόλης όταν η δόση είναι 0,03 και 1mg/kg είναι αντίστοιχα 0,79 και 15,4mg, τιμές που αντιστοιχούν στο 26 έως 52% της προσληφθείσας δόσης αντίστοιχα. Η κυκλοφορούσα ποσότητα συνολικής ρεσβερατρόλης στο πλάσμα είναι περίπου 2,7mg στη 1½ h πέψης. Στην ίδια μελέτη αλλά σε αρουραίους που προσλαμβάνουν ρεσβερατρόλη 2mg/kg, δεν ανιχνεύεται στο πλάσμα μέχρι τη μισή ώρα. Η ποσότητα αυτή είναι 2 φορές περισσότερη μετά από 1½h και στη συνέχεια αυξάνεται μερικώς μέχρι τις 4 h. Η μεγαλύτερη ποσότητα ρεσβερατρόλης υπάρχει σε συζευγμένη μορφή και στις δύο δόσεις, με την ελεύθερη μορφή να αποτελεί το 10-11% της συνολικής ποσότητας τις πρώτες ώρες, ενώ το ποσοστό αυτό μειώνεται στο 5-7% στις 4h [161].

Μελέτη που έγινε σε ανθρώπους για το μεταβολισμό της ρεσβερατρόλης δείχνει ότι η απορρόφηση της μετά από πρόσληψη από του στόματος είναι πολύ υψηλή, αλλά η ρεσβερατρόλη ανιχνεύεται σε ίχνη στο πλάσμα < 5ng/ml. Αφού το κυριότερο τμήμα της ρεσβερατρόλης μεταβολίζεται σε μορφές με γλυκουρονυλο, θειο ομάδες και υδρογονωμένους τους διπλούς δεσμούς του αλειφατικού δακτυλίου [162].

Μία άλλη ερευνητική ομάδα μελέτησε τον μεταβολισμό της ρεσβερατρόλης στον άνθρωπο με τη χρήση ραδιοϊσοτόπου. Έτσι χορηγήθηκε από του στόματος δόση 25mg ^{14}C-ρεσβερατρόλη (110μmol) σε 6 υγιείς εθελοντές. Η πρώτη αύξηση στο πλάσμα ήταν της τάξης των 2μM στη 1h και η δεύτερη αύξηση ήταν 1,3μM στις 6h. Στη συνέχεια τα επίπεδα του πλάσματος μειώνονται εκθετικά. Ενώ στην ενδοφλέβια ένεση των 0,2mg ^{14}C-ρεσβερατρόλη (0,8μmol), τα επίπεδα του πλάσματος μειώνονται από την πρώτη κιόλας ώρα, χωρίς να εμφανίζεται η δεύτερη αύξηση όπως στην από του στόματος δόση. Οι τελικοί χρόνοι ημιζωής απέκκρισης κυμαίνονται από 7 έως 14h και στις δύο δόσεις. Η ολική ραδιενέργεια του πλάσματος διαφέρει από άτομο σε άτομο και αυτό έχει να κάνει με τις διαφορετικές τροποποιήσεις που γίνονται από άτομο σε άτομο. Στη συνέχεια μετρήθηκε η ραδιενέργεια στα ούρα, στην στοματική χορήγηση (στ.χ.) υπάρχει ανάκτηση της τάξης του 53,4- 84,9%, ενώ στα κόπρανα 0,3-38,1%, όπου η μέτρηση παρουσιάζει μεγάλη διαφοροποίηση. Από την άλλη στην ενδοφλέβια χορήγηση (εν.χ.) οι

αντίστοιχες τιμές είναι 42,3-83,2% στα ούρα και 0,6-22,7% στα κόπρανα. Έτσι η ολική ανάκτηση στα ούρα και στα κόπρανα είναι 70,5% - 97,6% στην στ.χ. και 53,5% - 91,2% αντίστοιχα στην εν.χ., ο χρόνος ημιζωής απέκκρισης στα ούρα είναι παρόμοιος με αυτόν του πλάσματος [163].

Από άλλο άρθρο που γίνεται μελέτη για τον μεταβολισμό και τη βιοδιαθεσιμότητα της ρεσβερατρόλης προκύπτει ότι, η ρεσβερατρόλη απορροφάται σε ικανοποιητικό βαθμό από τον ανθρώπινο οργανισμό και μετατρέπεται σε μεταβολίτες με γλυκουρονο και θείο ομάδες. Οι μεταβολίτες της ρεσβερατρόλης ανιχνεύονται κυρίως στα ούρα και όχι στο πλάσμα, πράγμα που δείχνει ότι η ρεσβερατρόλη μεταβολίζεται από το λεπτό έντερο και στη συνέχεια οι μεταβολίτες της μετακινούνται στους διάφορους ιστούς. Από την άλλη αντιδράσεις της φάσης Ι δεν έχουν ταυτοποιηθεί για την ρεσβερατρόλη. Τόσο στους ανθρώπους όσο και στους αρουραίους έχει βρεθεί ότι υπάρχει ένα σύστημα επανακυκλοφορίας των μεταβολιτών, λόγω της επαναρρόφησης μετά την εντερική υδρόλυση. Προκύπτει επίσης ότι το κυριότερο όργανο μεταβολισμού είναι το ήπαρ και απέκκρισης είναι οι νεφροί. Αν επεκτείνουμε την σκέψη ότι η ρεσβερατρόλη βρίσκεται στα τρόφιμα με άλλα είδη πολυφαινολών δεν έχει αποδειχθεί ότι η απορρόφηση της δρα ανταγωνιστικά με αυτή των άλλων ουσιών. Όμως περαιτέρω έρευνα απαιτεί το πώς οι μεταβολίτες μπορεί να επηρεάζονται από την συνύπαρξη άλλων ουσιών [164].

Όπως φαίνεται πολλές μελέτες μετρούν τους μεταβολίτες που εμφανίζονται τόσο στον άνθρωπο όσο και στους αρουραίους, όμως πρέπει να σκεφτεί κανείς αν υπάρχει *in vivo* δράση αυτών των μεταβολιτών. Αφού μία δόση της τάξης το ανώτερο των 5g έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση μέγιστης τιμής 2,4μM στη 1½h μεταπορρόφησης. Όταν οι περισσότερες *in vitro* μελέτες δείχνουν ότι οι προστατευτικές δράσεις της ρεσβερατρόλης απαιτούν ποσότητες τουλάχιστον των 5μM [165]. Σε άρθρο ανασκόπησης οι συγγραφείς καταλήγουν ότι μετά από κατανάλωση κόκκινου κρασιού το ποσό της ρεσβερατρόλης που ανιχνεύεται είναι το ανώτερο 1μmol, ενώ αυτό δεν συμβαίνει όταν η ρεσβερατρόλη καταναλώνεται μέσω συμπληρώματος διατροφής αφού με κατανάλωση 5g τα ποσά ρεσβερατρόλης μπορεί να είναι πολύ χαμηλά ή και μη ανιχνεύσιμα. Μία πιθανή εξήγηση αυτού είναι ότι η βιοδιαθεσιμότητα είναι πολύ χαμηλή σε αυτές τις περιπτώσεις αφού το ποσό της ρεσβερατρόλης πρέπει να αποβληθεί από ούρα μέσω της δημιουργίας των μεταβολιτών της [166].

Όταν έγινε σύγκριση των μεταβολιτών σε ούρα και πλάσμα εθελοντών που είχαν καταναλώσει είτε συμπλήρωμα διατροφής με εκχύλισμα κόκκινου σταφυλιού είτε ήταν μετριοπαθείς καταναλωτές κόκκινου κρασιού, φάνηκε ότι υπήρχαν διαφορές στην ανίχνευση των μεταβολιτών εξαιτίας προφανώς της διαφοράς στην περιεκτικότητα ρεσβερατρόλης. Βέβαια το πιο ενδιαφέρον ήταν ότι η κατανάλωση του συμπληρώματος φάνηκε να καθυστερεί την απορρόφηση ρεσβερατρόλης, παρέτεινε δηλαδή την παραμονή της στο έντερο, έτσι μεταβολίστηκε σε μεγαλύτερο βαθμό, με αποτέλεσμα να μετρηθούν από 2,1 έως 3,6-φορές υψηλότερες συγκεντρώσεις μεταβολιτών στα ούρα, 12 με 24h μετά την κατανάλωση του συμπληρώματος [167].

Κεφάλαιο 3: Δράσεις των φαινολικών ενώσεων και των μεταβολιτών τους

3.1 Εισαγωγή

Τα τελευταία χρόνια οι περισσότερες επιδημιολογικές μελέτες συσχετίζουν την υιοθέτηση της μεσογειακής δίαιτας με μειωμένο επιπολασμό και επίπτωση διαφόρων νοσημάτων όπως ο καρκίνος, τα αυτοάνοσα νοσήματα, τα καρδιαγγειακά νοσήματα, ο σακχαρώδης διαβήτης κ.α. Οι επιστήμονες αποδίδουν αυτά τα δεδομένα στην ύπαρξη τρόφιμων όπως το ελαιόλαδο, τα φρούτα, τα λαχανικά, τα όσπρια και τα δημητριακά. Πολλές έρευνες δείχνουν ότι η συχνή πρόσληψη πολυφαινολών σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης διάφορων χρόνιων νοσημάτων. Για το λόγο αυτό η μελέτη και η ανάλυση των τροφών που περιέχουν φαινολικά συστατικά, έχει προχωρήσει αρκετά τα τελευταία χρόνια. Τα φαινολικά συστατικά έχει αποδειχθεί ότι έχουν αντιοξειδωτική, αντικαρκινική και αντιαθηρογόνο δράση τόσο σε *in vivo*, όσο και *in vitro* μελέτες [168]. Το ενδιαφέρον των διατροφολόγων και των επιστημόνων υγείας έχει επικεντρωθεί τα τελευταία χρόνια στα στοιχεία αυτά φέρνοντας στο φως όλο και περισσότερες μελέτες για την ευεργετική επίδραση των φαινολικών ενώσεων στην υγεία. Ο λόγος όμως που η μελέτη τους βρίσκεται σε πρωταρχικά στάδια, οφείλεται στη χημική δομή των πολυφαινολών η οποία παρουσιάζει αρκετή ποικιλία και πολυπλοκότητα [95, 169-173].

3.2 Επιδημιολογικές μελέτες

Αρκετές επιδημιολογικές μελέτες έχουν γίνει για τις πολυφαινόλες, από 12 μελέτες φαίνεται ότι η πρόσληψη φλαβονοειδών μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων, ενώ σε άλλες 5 μελέτες σχετίζεται με τη μείωση εμφάνισης εγκεφαλικού επεισοδίου. Σε προοπτικές μελέτες φαίνεται ότι υπάρχει ισχυρή αρνητική συσχέτιση της πρόσληψης των φλαβονοειδών και του καρκίνου πνεύμονα και εντέρου. Επίσης τα φλαβονοειδή φαίνεται να σχετίζονται αρνητικά και με άλλα χρόνια νοσήματα όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, ο διαβήτης τύπου ΙΙ, ο καταρράκτης και το άσθμα. Τα λιγνάνια φαίνεται να έχουν παρόμοια επίδραση αφού η συγκέντρωση τους στο πλάσμα ή στα ούρα φαίνεται να σχετίζεται αρνητικά με την εμφάνιση τόσο νοσημάτων του καρδιαγγειακού συστήματος, όσο και καρκίνου [174].

Άλλες επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν ότι η πρόσληψη κερκετίνης σε ποσότητα 16-24mg/μέρα αλλά και της ρεσβερατρόλης σχετίζεται με προστασία από την εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων.

Από την άλλη φαίνεται ότι υπάρχει μία αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στην πρόσληψη κερκετίνης και εμφάνιση διαφόρων τύπων καρκίνου.

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν προτείνει τα ευεργετικά αποτελέσματα των πολυφαινολών στην πρόληψη των ασθενειών που σχετίζονται με τη γήρανση, δηλαδή αγγειακών παθήσεων, νευροεκφυλισμό, καρκίνου και συναφών φλεγμονωδών διεργασιών. Ένα από αυτά τα μόρια είναι η ρεσβερατρόλη που μέσα από κλινικές μελέτες, αλλά και μελέτες σε πειραματόζωα έχουν φανεί οι ευεργετικές της δράσεις [175].

Τα δεδομένα των ανωτέρω επιδημιολογικών μελετών συνοψίζονται στον **Πίνακα 2.**

Πίνακας 2: Δυνητικά οφέλη στην υγεία, βιοδραστικών μορίων στην καρδιαγγειακή νόσο και τον καρκίνο

Βιοδραστικές Ενώσεις/ Μίγμα	Παράδειγμα	Πηγές	Θεωρητική Ευεργετική Βιολογική Δράση
Φλαβονόλες	Κερκετίνη Καμπεφερόλη Κατεχίνη	κρεμμύδι μήλο, τσάι μπρόκολο μαρούλι κακάο	↓ TC, ↓ LDL-C οξείδωση,↑HDL-C, AOx, αντιμεταλλαξογόνο, ↓ έναρξης και προαγωγής όγκων, ↓ συσσώρευσης αιμοπεταλίων, ↓ σύνθεσης εικοσανοειδών
Φλαβονόλες	Επικατεχίνη Επιγαλλοκατεχίνη και τα οξέα τους	πράσινο μαύρο τσάι κακάο	↓ LDL-C οξείδωση, AOx, αντιμεταλλαξογόνο, ↓ έναρξης και προαγωγής όγκων, ↓ συσσώρευσης αιμοπεταλίων, απόπτωση
Λιγνάνια	Εντερολακτόνη	Λιναρόσπορος	↓ LDL-C , AOx, οιστρογόνο/

	Εντεροδιάλη Κουμεστρόλη		αντιοιστρογόνο, αντίθετη δράση (CVD): προοξειδωτική δράση με μερικώς αποβουτυρωμένο καρπό
Ισοφλαβόνες	Γενιστείνη Ντατζείνη	φασόλια σόγια όσπρια	↓ TC και LDL-C , ↓ LDL-C οξείδωση, ↑HDLC, ↓ TG, AOx, αντιμεταλλαξογόνο,οιστρογόνο/ αντιοιστρογόνο, ↓ θρόμβωσης, ↓ αγγειογένεσης, ↑απόπτωσης
Στιλβένια	Ρεσβερατρόλη	σταφύλια κόκκινο κρασί φιστίκια	↓ LDL-C οξείδωση,↑HDL-C, AOx, αντιμεταλλαξογόνο, ↓ έναρξης και προαγωγής όγκων, ↓ συσσώρευσης αιμοπεταλίων/θρόμβωσης, ↓ σύνθεσης εικοσανοειδών, οιστρογόνο/αντιοιστρογόνο
Ελαιόλαδο	Τυροσόλη Υδροξυτυροσόλη ολευροπαίνη καφεϊκό οξύ κουμαρικό οξύ	έξτρα παρθένο ελαιόλαδο	↓ LDL-C οξείδωση, AOx

AOx= αντιοξειδωτική δράση, BP= αρτηριακή πίεση, CVD= καρδιαγγειακή νόσος, HDL-C= υψηλής πυκνότητας σε χοληστερόλη λιποπρωτεΐνη, HMGR= αναγωγάση χοληστερόλης, LDL-C= χαμηλής πυκνότητας σε χοληστερόλη λιποπρωτεΐνη, TC= ολική χοληστερόλη, TG= τριγλυκερίδια.

3.3 Πειράματα in vitro με φαινολικές ενώσεις

3.3.1 Αντιοξειδωτική ικανότητα

Οι φαινολικές ενώσεις έχουν λόγω δομής την ικανότητα να δρουν ως αντιοξειδωτικά μόρια. Ουσία με αντιοξειδωτική δράση θεωρείται κάθε ένωση η οποία βρίσκεται σε μικρές συγκεντρώσεις σε σύγκριση με το υπόστρωμα που οξειδώνεται και η οποία καθυστερεί σημαντικά ή αποτρέπει την οξείδωση του υποστρώματος αυτού.

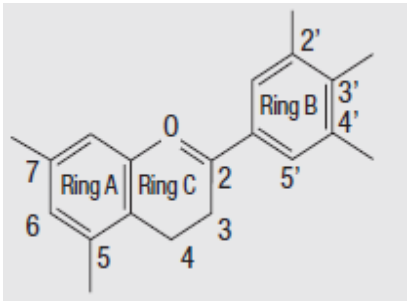
Μετρήσεις αντιοξειδωτικής ικανότητας τροφίμων έχουν γίνει από αρκετές ερευνητικές ομάδες και με διαφορετικές μεθόδους. Σίγουρα υπάρχουν διαφορές από έρευνα σε έρευνα και αυτό γιατί διαφέρει η μεθοδολογία μέτρησης αλλά και η ποικιλία των τροφίμων που μετράται. Δηλαδή η αντιοξειδωτική ικανότητα ενός τροφίμου μπορεί να επηρεάζεται από την γεωγραφική περιοχή, το κλίμα, το βαθμό ωρίμανσης ή την ποικιλία του γονότυπου [176, 177]. Με βάση τη μέθοδο ABTS την υψηλότερη τιμή έχουν οι φράουλες (11,9μmol/g), ενώ ακολουθεί το σπανάκι (8,49μmol/g) και παρόμοιες τιμές έχουν η αγκινάρα, το κρεμμύδι και η τομάτα. Αξιοσημείωτη είναι η τιμή που φαίνεται να έχει το κόκκινο κρασί (13,28μmol/mL), όμως διαφέρει αρκετά από είδος σε είδος [178, 179].

3.3.1.1 Εκκαθάριση ελευθέρων ριζών

Οι φαινολικές ενώσεις έχουν την ικανότητα να δρουν ως δότες υδρογόνου ή ηλεκτρονίου και να απεντοπίζουν τα ελεύθερα ηλεκτρόνια, λόγω του αρωματικού δακτυλίου που διαθέτουν. Έχει αναφερθεί ότι η αντιοξειδωτική λειτουργία των φυσικών πολυφαινολών εξαρτάται από τον αριθμό και τη θέση των αρωματικών υδροξυλίων [180-182]. Τα φαινολικά οξέα που έχουν τα περισσότερα ελεύθερα υδροξύλια πάνω στο φαινολικό τους δακτύλιο, παρουσιάζουν υψηλή TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) αξία μετρούμενη με τις ABTS και DPPH μεθόδους [183, 184]. Για τις φλαβόνες και τις ισοφλαβόνες ο αριθμός των υδροξυλίων είναι ανάλογος των τιμών/ μετρήσεων ORAC σε μόρια με παρόμοια χημική δομή [185]. Άλλη επιστημονική ομάδα έχει αποδείξει ότι υπάρχει σχέση ανάμεσα στην ικανότητα εκκαθάρισης των ριζών υπεροξειδίου και των αριθμών των υδροξυλίων στα φλαβονοειδή. Αυτή είναι γραμμική για τις φλαβόνες και καμπυλόγραμμη για τις φλαβανόνες [182]. Ενώ οι αυξημένες τιμές ABTS των εστέρων κατεχίνης και

γαλλικού οξέος σε σχέση με τις κατεχίνες δείχνει την επιπλέον συμβολή των τριυδροξυ βενζοϊκού δακτυλίου και γαλλικού οξέος [186]. Σημαντικό είναι επίσης να αναφερθεί μελέτη που δείχνει πόσο σημαντικό είναι το υδροξύλιο στη θέση 3 του Β δακτυλίου (π.χ. ρουτίνη), αφού όταν δεσμεύτηκε εκεί ομάδα υποκατάστατης έχασε την αντιοξειδωτική του ικανότητα. Αυτό συμβαίνει επειδή η παρουσία δύο όρθο-υδροξυλίων προσφέρει σταθερότητα στο μόριο και του προσδίδει την ικανότητα να έχει μη εντοπισμένα ηλεκτρόνια. Για το λόγο αυτό φαινολικές ενώσεις όπως η προκατεχίνη, καφεϊκά οξέα, επικατεχίνη, κατεχίνη και κερκετίνη που παρουσιάζουν αυτή τη χημική δομή είχαν τις υψηλότερες ORAC τιμές σε σύγκριση με τις άλλες πολυφαινόλες [183, 186, 187]. Η δομή κατεχόλης των φλαβονοειδών φάνηκε να είναι σημαντικός εκκαθαριστής σε δοκιμασία εξουδετέρωσης υπεροξυνιτρικών ριζών [188]. Ένας 2,3 διπλός δεσμός σε σύνδεση με 4- οξο λειτουργία του C δακτυλίου φαίνεται να βοηθά στην απεντόπιση των ηλεκτρονίων του δεύτερου δακτυλίου [187]. Από άλλη ερευνητική ομάδα φαίνεται ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα αυξάνεται όταν μεγαλώνει ο αριθμός των υδροξυλίων που είναι συνδεδεμένα πάνω στον αρωματικό δακτύλιο. Επίσης η παρουσία στα φλαβονοειδή δομής κατεχόλης ή 2΄-3΄ διπλός δεσμός σε σύζευξη με 4΄καρβοξυλική λειτουργία αυξάνει την αντιοξειδωτική ικανότητα [189].

Έτσι η κερκετίνη παρουσιάζει αυξημένες τιμές TEAC, ενώ άλλη ερευνητική ομάδα που μέτρησε την αντιοξειδωτική ικανότητα των ανθοκυανιδινών βρήκε ότι καμία δεν είχε παρόμοιες τιμές με αυτές των φλαβονών, παρόλο που είχαν παρόμοιους υποκαταστάτες υδροξύλιων [186]. Συμπερασματικά άλλη επιστημονική ομάδα, διατύπωσε ότι τα υδροξύλια στις θέσεις 3 και 5 μαζί με 4 οξο λειτουργία του Α και C δακτυλίου είναι σημαντικά για την ικανότητα τους να εξουδετερώνουν ελεύθερες ρίζες [190].



Εικόνα 21: Η χημική δομή των φλαβονοειδών φαινολών [67]

3.3.1.2 Αναστολή της οξείδωσης της LDL-χοληστερόλης

Ένας άλλος τρόπος που δρουν οι ενώσεις αυτές στην πρόληψη των καρδιαγγειακών νοσημάτων είναι μέσω της μείωσης της δημιουργίας αθηρωματικών πλακών, αφού αναστέλλουν την οξείδωση της LDL- χοληστερόλης, μια πορεία κλειδί για την δημιουργία των αφρωδών κυττάρων [191-193].

Από άλλους ερευνητές μελετήθηκε η *in vitro* ικανότητα οξείδωσης συστατικών του ελαιολάδου όπως είναι η υδροξυτυροσόλη [194], που είναι υδροξυ ανάλογο της τυροσόλης και βρέθηκε ότι αναστέλλει την επαγόμενη από χαλκό οξείδωση της LDL-χοληστερόλης σε συγκεντρώσεις 10^{-6} με 10^{-4} M και σε αυτή την περίπτωση η αντιοξειδωτική ικανότητα αυξάνεται όσο μεγαλώνει ο αριθμός των υποκαταστατών υδροξυλίου και τα υδροξύλια βρίσκονται σε όρθο θέση. Για το λόγο αυτό η υδροξυτυροσόλη είναι καλύτερος αναστολέας από την τυροσόλη [185]. Η τυροσόλη φαίνεται να είναι εκκαθαριστής του υπεροξυνιτρικού (peroxynitrite) [195] και O_2^- [196] οπότε αποτρέπει την οξείδωση της LDL- χοληστερόλης, δε δρουν τα μακροφάγα και έτσι βοηθά στη διατήρηση της κυτταρικής άμυνας στην οξείδωση [74]. Σε άλλη δοκιμασία φάνηκε ότι η τυροσόλη αναστέλλει με δοσοεξαρτώμενο τρόπο την υδροξυλίωση του σαλικιλικού οξέος που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες με IC_{50} 2,51mM [197].

Δεδομένα που υπάρχουν για τη ρεσβερατρόλη δείχνουν ότι αναστέλλει *in vitro* την οξείδωση της LDL- χοληστερόλης [198].

Σύμφωνα με τη μέθοδο TRAP πλούσια αντιοξειδωτική ικανότητα έχει το σπαράγγι, η αγκινάρα και τα μανιτάρια. Φαίνεται λοιπόν ότι παρόλο που οι τιμές αλλάζουν από μέθοδο σε μέθοδο πάνω κάτω ανακυκλώνονται τα ίδια φρούτα-λαχανικά και το κόκκινο κρασί [178].

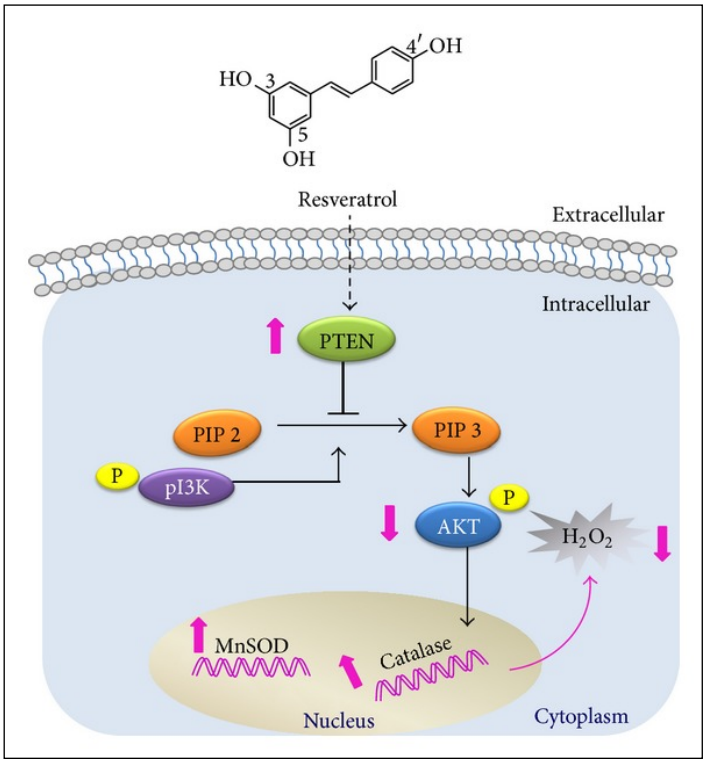
Ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την αντιοξειδωτική ικανότητα των τροφίμων είναι ο τρόπος μαγειρέματος και η μέθοδος συντήρησης. Η ακτινοβόληση που γίνεται σε φρούτα και λαχανικά για να απενεργοποιήσει το ένζυμο οξειδάση δε φαίνεται να επηρεάζει ούτε την αντιοξειδωτική ικανότητα, ούτε τη συνολική περιεκτικότητα τους σε πολυφαινόλες [199]. Έχει φανεί επίσης ότι η συντήρηση σε θερμοκρασίες -20 και -30^0C, διατηρούσε στο μέγιστο την αντιοξειδωτική τους ικανότητα [200]. Η θέρμανση (180^0C) από την άλλη παρουσίασε τα ακριβώς αντίθετα αποτελέσματα [201]. Ακόμα η κονσερβοποίηση είναι ένας τρόπος

συντήρησης που μειώνει την αντιοξειδωτική ικανότητα περισσότερο από την ψύξη [202].

3.3.1.3 Αντιοξειδωτική δράση σε κύτταρα

Σε άλλη μελέτη δοκιμάστηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα της υδροξυτυροσόλης (HT) και της τυροσόλης (T) σε κυτταρική σειρά νεφρικών κυττάρων χοίρου (LLC-PKI). Το οξειδωτικό στρες προκλήθηκε με H_2O_2, ενώ τα κύτταρα είχαν προεπωαστεί με HT και T σε συγκέντρωση 1-10μM. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μόνο η HT κατάφερε να αναστείλει την υπεροξείδωση των λιποειδών που προκάλεσε στα κύτταρα το H_2O_2 [203].

Σε άλλη μελέτη σε καρκινικά κύτταρα της σειράς MCF-7 που επωάστηκαν με ρεσβερατρόλη σε ποσότητα 1nM για 48h μειώθηκαν τα επίπεδα υπεροξειδίου. Αυτό γινόταν μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού PTEN/Akt, που έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων του mRNA της καταλάσης και της εξαρτώμενης από το μαγγάνιο δισμουτάσης του υπεροξειδίου (MnSOD). Έτσι η ρεσβερατρόλη ασκεί την αντιοξειδωτικής της δράση, μέσω της ενεργοποίησης αντιοξειδωτικών ενζύμων με μηχανισμό σηματοδότησης που εμπλέκει το μονοπάτι PTEN/Akt, όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 22** [204].



Εικόνα 22: Η ρεσβερατρόλη μειώνει τα επίπεδα του υπεροξειδίου με την ενεργοποίηση της καταλάσης και της δισμουτάσης MnSOD μέσω του μονοπατιού PTEN/Akt [204].

Η κυκλοοξυγονάση (COX), είναι το ένζυμο που μετατρέπει το αραχιδονικό οξύ σε προσταγλαδίνες. Η ανασταλτική δράση που παρουσιάζουν σε αυτό το ένζυμο οι φαινολικές ουσίες εξαρτάται από τη δομή, με ισχυρότερο το φλαβονοειδές γαλανγίνη [205, 206]. Επίσης παρουσιάζουν ανασταλτική δράση και στην 15- λιποοξυγονάση των θηλαστικών, η οποία είναι ένας σημαντικός καταλύτης την ενζυμικής λιποειδικής υπεροξείδωσης των μεμβρανών και των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος [207, 208]. Σε αυτό το ένζυμο, μελετήθηκε η αναστολή που προκαλούν τα φλαβονοειδή του κακάο που είναι κυρίως η επικατεχίνη και οι προκυανιδίνες. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα οι ενώσεις αναστέλλουν τόσο την 15- λιποοξυγονάση της σόγιας όσο και την 12-λιποοξυγονάση των θηλαστικών στα λευκοκύτταρα και τα αιμοπετάλια, γεγονός που δείχνει ότι είναι γενικώς αναστολείς των λιποοξυγονασών. Σε συνέχεια αυτών των ευρημάτων μελέτησαν την επίδραση τους στην ανθρώπινη 5- λιποοξυγονάση που είναι το κύριο ένζυμο για την σύνθεση προφλεγμονωδών λευκοτριενιών, όπου φάνηκε ότι τα φλαβονοειδή που περιέχονται στο κακάο αναστέλλουν το ένζυμο, με καλύτερο αναστολέα την κερκετίνη, γεγονός που οφείλεται στη χημική της δομή, δηλαδή τον αριθμό και την θέση των υδροξυλίων [209].

Βέβαια από την άλλη οι πολυφαινόλες δρουν και ως προοξειδωτικά και μπορεί να προκαλέσουν απόπτωση και αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού [210]. Τέλος πρέπει να γίνει κατανοητό το γεγονός ότι μπορεί να μετράται η αντιοξειδωτική ικανότητα ενός τροφίμου *in vitro*, αλλά αυτό δε συνεπάγεται ότι θα δρα το ίδιο *in vivo*. Από διάφορες μελέτες φαίνεται το ενδιαφέρον των επιστημόνων να ερευνήσουν τι ακριβώς γίνεται όταν οι πολυφαινόλες διασπόνται από τη μικροχλωρίδα του εντέρου και παράγονται άλλα μικρότερα μόρια, οι λεγόμενοι μεταβολίτες τους. Σε κάποιες περιπτώσεις οι μεταβολίτες έχουν ελεύθερη υδροξυλομάδα σε ευνοϊκότερη θέση από πριν και έτσι ενισχύεται η αντιοξειδωτική δράση. Όμως η μελέτη της διαδικασίας που δρουν οι μεταβολίτες και ποιοι ακριβώς είναι για κάθε είδος φαινολών είναι σε αρχικά στάδια [211, 212].

3.3.2 Αντιφλεγμονώδης δράση

Σημαντική είναι η ευεργετική βιολογική δράση των φαινολικών ενώσεων στη φλεγμονή.

3.3.2.1 Αναστολή της παραγωγής των κυτταροκινών

Η κερκετίνη έχει ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση αφού αναστέλλει την παραγωγή κυτταροκινών που προκαλεί ο LPS. Αναλυτικά αναστέλλει την προκαλούμενη από LPS παραγωγή TNF-a σε μακροφάγα και την προκαλούμενη από LPS παραγωγή IL-18 σε κύτταρα πνεύμονα. Επίσης μειώνει την προκαλούμενη από LPS παραγωγή mRNA των TNF-a και IL1-a σε νευρογλοιακά κύτταρα. Οι δράσεις αυτές οφείλονται στην ικανότητα της να επηρεάζει τις δράσεις του NF-κB, μεταγραφικού παράγοντα που σχετίζεται με την παραγωγή κυτταροκινών [213].

Γεγονός είναι ότι έχει μελετηθεί εκτενώς η επίδραση της ρεσβερατρόλης σε διάφορους παράγοντες φλεγμονής αφού αποτελεί τη πιο γνωστή φαινολική ένωση του κόκκινου κρασιού. Έτσι η ρεσβερατρόλη αναστέλλει με δοσοεξαρτώμενο τρόπο την επαγόμενη από IL-β, TNF-a και LPS παραγωγή TF (ιστικού παράγοντα) σε ενδοθηλιακά κύτταρα. Μία παρόμοια αναστολή είχε η προεπώαση με ρεσβερατρόλη μονοκύτταρων στην παραγωγή TF, μετά από διέγερση με LPS. Τέλος η ρεσβερατρόλη φαίνεται να αναστέλλει την ενεργοποίηση του mRNA του TNF-α σε ενδοθηλιακά κύτταρα μετά από διέγερση με LPS, καθώς και την παραγωγή TNF-α και IL-1β mRNA σε μονοκύτταρα με τον ίδιο διεγέρτη [214]. Η ρεσβερατρόλη in vitro φαίνεται να αναστέλλει την επαγόμενη από LPS προσκόλληση των μονοκυττάρων της σειράς U937 σε κυτταρική σειρά ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων σαφηνής φλέβας (HSVEC) [215].

Παραδόξως στα μεσαγγειακά κύτταρα ανθρώπινης κυτταρικής σειράς δοκιμάστηκε η επίδραση της ρεσβερατρόλης στον μεταγραφικό παράγοντα NF-kB όταν διεγείρεται από προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες. Στη μελέτη αυτή η ρεσβερατρόλη φάνηκε να ενισχύει τη δράση του NF-kB όταν αυτός διεγείρεται από την IL-1β. Το φαινόμενο αυτό είναι δοσοεξαρτώμενο και η μεγαλύτερη επίδραση φαίνεται στα 50-75mM. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρείται και όταν επιδρά ο TNF-a [216].

3.3.2.2 Αναστολή της παραγωγής του μονοξειδίου του αζώτου (NO)

Η κυριότερη πολυφαινόλη του πράσινου τσαγιού, ο εστέρας γαλλικού οξέους και επικατεχίνης, φαίνεται να μειώνει την αγγειακή φλεγμονή αυξάνοντας την παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου [217]. Επίσης η παρατηρούμενη καρδιοπροστατευτική

δράση της ρεσβερατρόλης μέσω της αύξησης της παραγωγής μονοξειδίου του αζώτου οδηγεί τους ερευνητές στη περαιτέρω μελέτη της δράσης της, σε ισχαιμικά επεισόδια [218].

3.3.2.3 Αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων

Σε άλλη μελέτη με την ενεργοποίηση της μετακασπάσης και του κυτοχρώματος c, η ρεσβερατρόλη προκάλεσε την απόπτωση του παθογόνου στελέχους, που προσβάλει τον άνθρωπο, του μύκητα Candida albicans [219].

Σε άλλη μελέτη φαίνεται η επίδραση της υδροξυτυροσόλης (DPE) σε μονοκύτταρα της ανθρώπινης κυτταρικής σειράς HL60. Όπου η συγκέντρωση DPE 50-100μM, ποσότητα που είναι ανάλογη αυτής που υπάρχει στο ελαιόλαδο, προκαλεί διακοπή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων HL60 και επάγει την απόπτωση. Αυτός ο δρόμος είναι ένας από αυτούς που μπορεί να εξηγήσει την αντιφλεγμονώδη δράση του ελαιόλαδου, το οποίο είναι πλούσιο σε DPE [220].

Ο παράγοντας PDGF είναι μιτογόνο που σχετίζεται με τη σύνθεση DNA στα μεσαγγειακά κύτταρα και παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της σπειραματονεφρίτιδας. Όταν η ρεσβερατρόλη προστίθεται σε καλλιέργεια μεσαγγειακών κυττάρων ανθρώπου ή αρουραίου προκαλεί δοσοεξαρτώμενη αναστολή της δράσης του PDGF και άρα της σύνθεσης DNA. Τα δεδομένα αυτά αποδεικνύουν ότι η ρεσβερατρόλη προκαλεί την αναστολή της σύνθεσης DNA στα μεσαγγειακά και άρα την εξασθένηση του πολλαπλασιασμού τους [221].

3.3.2.4 Αναστολή του PAF και των ενζύμων του μεταβολισμού του

Μελέτη που έγινε σε περιφερικά λευκά κύτταρα απομονωμένα από αρουραίο, εξετάστηκε η επίδραση της λουτεολίνης και τη κερκετίνης στην παραγωγή PAF μετά από διέγερση με ιονοφόρο ασβεστίου A23187. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η λουτεολίνη αναστέλλει την παραγωγή του PAF, ενώ η λουτεολίνη και η κερκετίνη μειώνουν τη δραστικότητα του βιοσυνθετικού ενζύμου λυσο PAF ακετυλοτρανσφεράση (λυσο PAF-AT), με IC_{50} 45μM έως 80μM. Όταν δοκιμάστηκαν φαινολικές ενώσεις με παρόμοια χημική δομή δεν είχαν καμία επίδραση στο βιοσυνθετικό ένζυμο [222]

Από άλλους ερευνητές έγινε μελέτη της επίδρασης εκχυλισμάτων τσαγιού σε απομονωμένα από αρουραίο πολυμορφοπύρηνα κύτταρα (PMNs). Στη μελέτη αυτή

έγινε διέγερση των κυττάρων με A23187 και μετρήθηκε η αναστολή της παραγωγής του PAF και της δραστικότητας του βιοσυνθετικού του ενζύμου λυσο PAF-AT. Φαίνεται λοιπόν ότι η θεοφλαβίνη και οι εστέρες του γαλλικού οξέος είναι ισχυροί αναστολείς τόσο του PAF όσο και του βιοσυνθετικού του ενζύμου [223].

Η Ρεσβερατρόλη το βασικό στιλβένιο του κόκκινου κρασιού αλλά και η τυροσόλη η κυριότερη φαινολική αλκοόλη του ελαιολάδου αναστέλλουν την προκαλούμενη από PAF συσσώρευση αιμοπεταλίων [224], ενώ οι Milde J et al έδειξαν ότι φαινολικά συστατικά όπως τα καροτενοειδή και η ρουτίνη μπορούν να τροποποιήσουν τον μεταβολισμό του PAF, ασκώντας αντιοξειδωτική δράση μέσω της μείωσης της οξείδωσης των LDL [225] και άρα την παραγωγή PAF και PAF-like μορίων [226]. Ακόμα η ρεσβερατρόλη παρουσιάζει ανασταλτική δράση στη δραστικότητα των λυσο PAF-AT και PAF-CPT σε κατάσταση ηρεμίας στην κυτταρική σειρά U937 [227]. Εκχύλισμα από το φλοιό του φυτού *Yucca schidigera* πλούσιο σε φαινολικά συστατικά, μεταξύ των οποίων η ρεσβερατρόλη ανέστειλε τη δράση του ενζύμου λυσο PAF-AT αλλά και άλλες δράσεις του PAF σε ενδοθηλιακά κύτταρα [228].

3.3.2.5 Αναστολή μονοπατιών κυτταρικής σηματοδότησης

Οι πολυφαινόλες επιδρούν σε μηνυματοφόρα μονοπάτια και κυτταρικούς υποδοχείς [229-231]. Φαίνεται ότι οι πολυφαινόλες επιδρούν και επηρεάζουν α) την κασπάση 1 σε μονοκύτταρα της κυτταρικής σειράς U937 και προκαλούν απόπτωση [232, 233], β) την ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου [234] και γ) τις λειτουργίες των αιμοπεταλίων [235].

Η δράση της ρεσβερατρόλης στην κυτταρική σηματοδότηση έχει μελετηθεί σε ανθρώπινη κυτταρική σειρά ερυθρολευχαιμικών κυττάρων (K562). Η ρεσβερατρόλη επηρεάζει τη δράση κινασών που έχουν σημαντική επίδραση στις λειτουργίες των κυττάρων όπως η PI3 και η κινάση ιανός (JNK) [236].

3.3.3 Αντικαρκινική δράση

Πολλά δεδομένα επιστημονικών μελετών αποδεικνύουν τις αντικαρκινικές ιδιότητες της ρεσβερατρόλης, σε ένα από αυτά φαίνεται ότι μειώνει την έκφραση του NF-kB p65 και προκαλεί απόπτωση στο LNCaP, στοιχεία που αναστέλλουν την

εξέλιξη του καρκίνου στο προστάτη [237]. Επίσης η ρεσβερατρόλη αναστέλλει την αναγωγάση των ριβονουκλεοτιδίων και άλλους κυτταρικούς μηχανισμούς που σχετίζονται με την έναρξη, την προαγωγή και την εξέλιξη της καρκινογένεσης [238].

Η ρεσβερατρόλη επιτυγχάνει την απόπτωση καρκινικών κυττάρων μαστού, επηρεάζοντας τη δράση της κυκλοοξυγονάσης 2 (COX-2). Επίσης φαρμακολογική δόση ρεσβερατρόλης αναστέλλει την αρωματάση, τόσο τη δράση της όσο και την παραγωγή mRNA, και έτσι επηρεάζει την βιοσύνθεση των οιστρογόνων [239].

Σε έρευνες έχει αποδειχθεί ότι οι ενώσεις αυτές μπορεί να αναστείλουν ή να μειώσουν τη δραστικότητα της τελομεράσης, η οποία είναι ένζυμο που εμπλέκεται στην καρκινογένεση [240, 241].

3.3.4 Αντιθρομβωτική δράση

Έχει αποδειχθεί ότι η ρεσβερατρόλη αναστέλλει την έκφραση του γονιδίου του ιστικού παράγοντα, του οποίου η παραγόμενη πρωτεΐνη ξεκινά τον καταρράκτη των αντιδράσεων της πήξης που έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία θρόμβων [214]. Οι πολυφαινόλες επιδρούν στις λειτουργίες των αιμοπεταλίων, αφού οι πολυφαινόλες που βρίσκονται στα σταφύλια μειώνουν τη συσσώρευση τους και άρα παρουσιάζουν αντιθρομβωτική δράση [242]. Φαινολικά όπως η κερκετίνη, η φισετίνη και η μυρικετίνη αναστέλλουν την επαγόμενη από ADP συσσώρευση των αιμοπεταλίων *in vitro* [243].

Σε μελέτη που έγινε από μέλος της ερευνητικής μας ομάδας, φάνηκε ότι η ρεσβερατρόλη αναστέλλει με δοσοεξαρτώμενο τρόπο την επαγόμενη από PAF συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού [244].

3.4 Πειράματα in vivo με φαινολικές ενώσεις

3.4.1 Πειραματόζωα

Παρακάτω ακολουθούν χαρακτηριστικές μελέτες σε πειραματόζωα. Σε μία μελέτη που χορηγήθηκαν 25μmol ρεσβερατρόλης, μειώθηκε ο αριθμό των όγκων του δέρματος σε ποντίκια κατά 98% [238]. Η κερκετίνη φαίνεται να έχει ανασταλτική δράση στην έναρξη, την εξέλιξη και τον πολλαπλασιασμό των όγκων σε θηλυκά ποντίκια.

Όταν αρουραίοι τράφηκαν με ρεσβερατρόλη αυξήθηκε η δράση των ενζύμων που εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες, δοσοεξαρτώμενα. Τέτοια ένζυμα είναι η

υπεροξειδική δισμουτάση, η αναγωγάση του κυτοχρώματος P450 κ.α. [245]. Επίσης προ-έγχυση ρεσβερατρόλης αποτρέπει την εμφάνιση αρρυθμιών και θνησιμότητας σε αρουραίους κατά την επαναιμάτωση, πιθανότατα λόγω της αντιοξειδωτικής της ικανότητας, αλλά και της ικανότητάς της να αυξάνει την απελευθέρωση μονοξειδίου του αζώτου [246].

Σε πρόσφατο άρθρο ανασκόπησης καταγράφεται ότι οι *in vivo* επιδράσεις της ρεσβερατρόλης στη θεραπεία του καρκίνου του μαστού, του παχέος εντέρου, του ήπατος, του παγκρέατος, και του προστάτη σε ζωικά μοντέλα καρκίνου, μπορεί να θετικές, ουδέτερες αλλά και μηδενικές, ανάλογα με την οδό χορήγησης της ρεσβερατρόλης, τη δόση, το μοντέλο, το είδος καθώς και άλλους παράγοντες [247].

Μελέτη που έγινε σε πιθήκους έδειξε ότι η πρόσληψη πρωτεΐνης σόγιας πλούσια σε ισοφλαβόνες μειώνει την LDL χοληστερόλη, σε σχέση με την πρόσληψη πρωτεΐνης απαλλαγμένης από τις ισοφλαβόνες [248].

Σε αναισθητοποιημένα σκυλιά που χρησιμοποιήθηκαν ως μοντέλα θρόμβωσης και αρτηριακής καταστροφής φάνηκε ότι, η επίδραση των μικροσυστατικών του κόκκινου κρασιού και των σταφυλιών, βελτίωσε την αιματική ροή στις αρτηρίες [249].

Σε μελέτη που έγινε σε αρουραίους που λάμβαναν υπερχοληστερολαιμική δίαιτα, παρατηρήθηκε η επίδραση της πρόσληψης προανθοκυανιδών σταφυλιού σε ποσότητα 345mg/kg. Φαίνεται ότι οι πολυφαινόλες μειώνουν τα επίπεδα διάφορων προφλεγμονωδών παραγόντων όπως ο TNF-a, IL-6, CRP και αυξάνουν αντιφλεγμονώδεις παράγοντες όπως η αδιπονεκτίνη [250].

Επιπλέον όταν αρουραίοι προσλάμβαναν ρεσβερατρόλη για 110 εβδομάδες σε ποσότητα 22,4±0,4mg/kg/ημέρα, στα πλαίσια δίαιτας πλούσιας σε θερμίδες, φάνηκε ότι αυτή προκάλεσε αναστολή της πρόσληψης βάρους από την θερμιδογόνα δίαιτα, βελτίωση της εικόνας του ήπατος, του παγκρέατος και της μορφολογίας της καρδιάς [162].

3.4.2 Κλινικές μελέτες

Αντιφλεγμονώδης –Αντιοξειδωτική δράση

Η κερκετίνη έχει φανεί ότι μειώνει την παραγωγή θρομβοξανίων *in vivo* [251]. Σε δύο όμως κλινικές μελέτες φάνηκε ότι παρόλο που αυξήθηκε η συγκέντρωση της κερκετίνης στο πλάσμα κατά 23 φορές, δεν φάνηκε να υπάρχει ευεργετική επίδραση

στα λιποειδή και τις λιποπρωτεΐνες, στην παραγωγή θρομβοξανίων B_2 από τα αιμοπετάλια και την αρτηριακή πίεση. Η κατανάλωση συμπληρώματος κερκετίνης από υγιείς εθελοντές σε ποσότητα 1g για 28 μέρες δεν είχε καμία ευεργετική επίδραση στους παράγοντες κινδύνου καρδιαγγειακής νόσου παρόλο που αυξήθηκε η συγκέντρωσή της στο πλάσμα. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι αφού δεν είχαν κάποιο πρόβλημα υγείας και άρα δεν βρισκόντουσαν σε κατάσταση αυξημένου οξειδωτικού στρες δεν υπήρχαν περιθώρια για περαιτέρω βελτίωση [252].

Τα φαινολικά συστατικά που υπάρχουν στο ελαιόλαδο μειώνουν την υπεροξείδωση της LDL σε υπερχοληστερολαιμικές μεταεμμηνοπαυσιακές γυναίκες [253].

Επίσης έχει μελετηθεί η επίδραση της κερκετίνης σε ασθενείς με σαρκοείδωση, μία κατάσταση χρόνιου οξειδωτικού στρες. Αυτή η κατάσταση σχετίζεται με την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών TNF-a και IL-8. Η σαρκοείδωση μειώνει την αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος κατά 75%, όμως η χρήση συμπληρώματος διατροφής κερκετίνης σε δοσολογία 4×500mg για 24h, ενισχύει και βελτιώνει την αντιοξειδωτική ικανότητα [213].

Η ευεργετική δράση των πολυφαινολών μεταξύ των οποίων οι κατεχίνες του πράσινου τσαγιού, οι πολυφαινόλες του ελαιολάδου, η ναριγγίνη, η κερκετίνη αλλά και η ρεσβερατρόλη ασκούν προστατευτική και θεραπευτική δράση στη διαχείριση των Ιδιοπαθών Φλεγμονωδών Νόσων του Εντέρου (ΙΦΝΕ), μέσω α) της αρνητικής ρύθμισης των φλεγμονωδών κυτταροκινών και ενζύμων, β) της ενίσχυσης της αντιοξειδωτικής άμυνας και γ) της καταστολής φλεγμονωδών μονοπατιών καθώς και των κυτταρικών μηχανισμών σηματοδότησης τους. Βέβαια περαιτέρω προκλινικές και κλινικές μελέτες απαιτούνται προκειμένου να κατανοήσουμε την ασφάλεια, τη βιοδιαθεσιμότητα και τη βιοδραστικότητα των διατροφικών πολυφαινολών σε ασθενείς με ΙΦΝΕ [254].

Μετα-ανάλυση από 38 κλινικές μελέτες έδειξε ότι η πρόσληψη 47g πρωτεΐνης σόγιας, η οποία είναι πλούσια σε ισοφλαβόνες, μειώνει την ολική και την LDL χοληστερόλη κατά 13%, τα τριγλυκερίδια κατά 11% και αυξάνει την HDL χοληστερόλη κατά 2,4%. Φαίνεται ότι οι ισοφλαβόνες που παρουσιάζουν αυτή τη δράση είναι η γενιστείνη και η ντανζείνη [104].

Η χρήση συμπληρώματος κερκετίνης σε υγιείς εθελοντές (11mg/μέρα για 28 μέρες καταναλώνοντας χυμό φρούτων πλούσιων σε κερκετίνη) αυξάνει τη

συγκέντρωση της κερκετίνης στο πλάσμα αλλά και την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος. Επίσης μείωσε κατά 41% το *ex vivo* προκαλούμενο οξειδωτικό στρες, αποτέλεσμα που δείχνει ότι η δράση των αντιοξειδωτικών συστατικών είναι μεγαλύτερη όταν το σώμα βρίσκεται σε οξειδωτικό στρες [213].

Μελέτες που έχουν γίνει για την επίδραση των συμπληρωμάτων πολυφαινολών στον άνθρωπο δείχνουν ότι προκαλούν μία προοξειδωτική κατάσταση. Αυτό ίσως συμβαίνει επειδή οι ποσότητες που περιέχονται στα συμπληρώματα είναι πολύ μεγαλύτερες από αυτές που προσλαμβάνονται από τον άνθρωπο μέσω των τροφών. Έτσι πριν ακόμα ξεκαθαριστεί το τοπίο στον τομέα αυτό καλό θα ήταν να προτιμάται η καθημερινή κατανάλωση φρούτων, λαχανικών και γενικά τροφίμων που έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε φαινολικές ουσίες [255].

Στις παρακάτω μελέτες εξετάστηκε η επίδραση της δόσης φαινολικών ουσιών στην επίδραση της εξέλιξης διαφόρων νοσημάτων. Έτσι κατανάλωση 730mg κερκετίνης σε καθημερινή βάση για 4 εβδομάδες από ανθρώπους με προ υπερτασικό στάδιο και στάδιο Ι χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας, οδήγησε στη μείωση της αρτηριακής πίεσης, ενώ δεν επηρέασε το οξειδωτικό στρες που μετρήθηκε στο αίμα και στα ούρα [256].

Η κατανάλωση 2,66g πολυφαινολών κάθε μέρα για 5 εβδομάδες από ασθενείς με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια δεν παρουσίασε κανένα ευεργετικό αποτέλεσμα, όπως επίσης και η κατανάλωση 444mg φλαβονολών ανά ημέρα για 6 εβδομάδες από ασθενείς με στεφανιαία νόσο [257].

Η χρόνια κατανάλωση εκχυλισμάτων πράσινου τσαγιού χωρίς καφεΐνη, από αιμοκαθαιρούμενους ασθενείς μειώνει την παραγωγή διάφορων παραγόντων που σχετίζονται με τις αθηροσκληρωτικές βλάβες, όπως ο παράγοντας νέκρωσης (TNF-a), η χημειοτακτική πρωτεΐνη των μονοκυττάρων (MCP-1), το διαλυτό μεσοκυττάριο μόριο προσκόλλησης (sICAM) και η C αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP), σε σχέση με ασθενείς που λάμβαναν ψευδοφάρμακο. Η μείωση αυτή επιτυγχάνεται μέσω της εξουδετέρωσης των ελευθέρων ριζών που δημιουργούνται κάτω από αυτές τις συνθήκες. Η κατανάλωση από υγιείς εθελοντές κακάο πλούσιου σε φλαβανόλες (821mg/ημέρα) οδηγεί στην αγγειοδιαστολή και άρα στην προστασία από καρδιαγγειακά νοσήματα [258].

Σε μία μελέτη που έγινε σε μεγάλο δείγμα Φιλανδών αντρών, 1.950 σε αριθμό και ηλικίας 42-60 χρόνων, φάνηκε ότι η κατανάλωση 5 υποομάδων φλαβονοειδών

μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο για ισχαιμικό επεισόδιο και τη θνησιμότητα από καρδιαγγειακή νόσο [259, 260].

Η ευεργετική δράση της ρεσβερατρόλης στο διαβήτη τύπου ΙΙ εξακριβώθηκε *in vivo,* αφού φάνηκε ότι επηρεάζει τη δράση και τον αριθμό των υποδοχέων-μεταφορέων της γλυκόζης GLUT-4. Αυτό συμβαίνει γιατί επηρεάζει τη δράση της καβεολίνης 1 και 3. Οι αλλαγές αυτές οδηγούν στη μεγαλύτερη είσοδο γλυκόζης στο κύτταρο και άρα στη βελτίωση της κλινικής εικόνας του διαβήτη. Η δράση αυτή έχει αποδειχθεί και από άλλους ερευνητές σε αρουραίους αλλά και *ex vivo* σε κύτταρα της σειράς HepG2[261].

Αντιθρομβωτική Δράση

Σε 10 μελέτες εξετάστηκε η *in vivo* επίδραση τροφίμων που είναι πλούσια σε κατεχίνη, επικατεχίνη και προκυανιδίνη. Από αυτές οι 5 μετρούν τη δράση των αιμοπεταλίων με τη βοήθεια τεστ που μετρά το κολλαγόνο, το ADP και την επινεφρίνη, παράγοντες που εμπλέκονται στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι καθημερινή πρόσληψη 100mg φλαβονολών μειώνει το χρόνο ενεργοποίησης του συστήματος κολλαγόνου- επινεφρίνης και του ADP, δοσοεξαρτώμενα. Η ποσότητα αυτή των φλαβονολών περιέχεται για παράδειγμα σε 11g σοκολάτας χωρίς γάλα και περιεκτικότητα σε κακάο 70% w/w. Σε άλλη μελέτη η συσσώρευση των αιμοπεταλίων αναστέλλεται κατά 21-65%, μετά από πρόσληψη 150mg κερκετίνη-3-O- γλυκοσίδιο, ποσότητα που περιλαμβάνεται σε 400-700g ωμών κρεμμυδιών. Επίσης έχει γίνει μελέτη επίδρασης ροφημάτων πλούσιων σε φαινόλες στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, στην οποία φαίνεται ότι η κατανάλωση ενός λίτρου μαύρου τσαγιού καθημερινά προκαλεί αναστολή κατά 4-10%, ενώ πρόσληψη μίας δόσης καφέ έχει αντιθρομβωτικές ιδιότητες. Η πρόσληψη κρασιού έχει φανεί ότι αναστέλλει τη δράση του ADP στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Τα μούρα φαίνεται να επηρεάζουν τις δράσεις των αιμοπεταλίων, αφού σε μελέτη φαίνεται ότι η καθημερινή πρόσληψη φρέσκων μούρων σε ποσότητα 160g και για 8 εβδομάδες προκαλεί σημαντική αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων που προκαλείται από τη δράση κολλαγόνου- ADP σε ανθρώπους με μεγάλο κίνδυνο για εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου [235, 262-270].

Υπολιπιδαιμική δράση

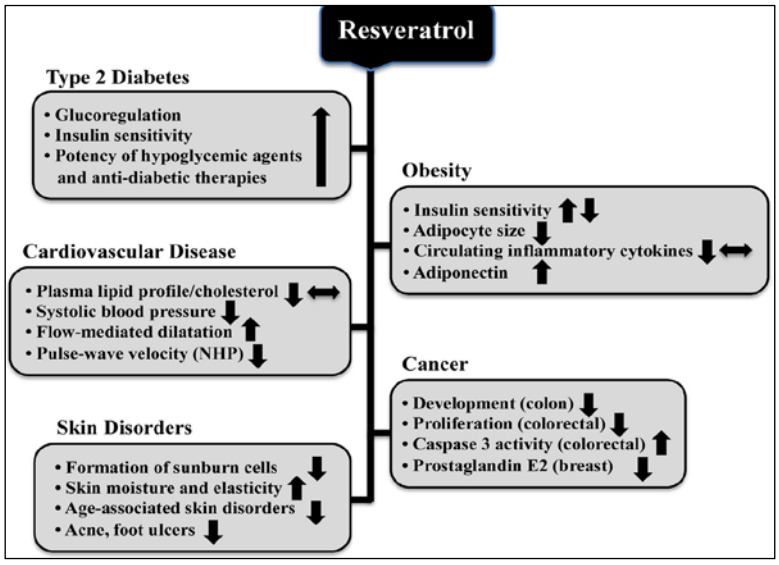
Σε άλλη μελέτη φάνηκε ότι συμπλήρωμα διατροφής ισοφλαβονών δεν έχει επίδραση στα επίπεδα χοληστερόλης του πλάσματος σε νορμοχοληστερολαιμικές γυναίκες [271].

Η πρόσληψη λιναρόσπορου, που είναι πλούσιος σε λιγνάνια, μείωσε την LDL χοληστερόλη κατά 8% [272].

Έχει μελετηθεί επίσης η επίδραση της κατανάλωσης σκόνης κακάο (που περιέχει κατεχίνες και προανθοκυανιδίνες) σε φυσιολογικούς και υπερχοληστερολαιμικούς άντρες. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η καθημερινή δόση 13g για 4 εβδομάδες οδήγησε σε ευεργετικές επιδράσεις στην LDL και την HDL χοληστερόλη. Ακόμα μείωσε τη συγκέντρωση της οξειδωμένης LDL στο πλάσμα [273].

Η κατανάλωση, από παχύσαρκα ή με τάση για παχυσαρκία παιδιά από την Ιαπωνία, πράσινου τσαγιού σε τέτοια ποσότητα για να λαμβάνουν καθημερινά 576mg κατεχινών, για 24 εβδομάδες, έδειξε ότι η κατανάλωση κατεχινών μειώνει την περιφέρεια μέσης, την LDL χοληστερόλη και τη συστολική αρτηριακή πίεση και στις δύο ομάδες παιδιών [274, 275].

Η πιο μελετημένη φαινολική ένωση είναι η ρεσβερατρόλη, όπου στην **Εικόνα 23** που ακολουθεί συνοψίζονται οι ευεργετικές δράσεις της κατανάλωσης ρεσβερατρόλης σε διάφορες ασθένειες.



Εικόνα 23: Οι δράσεις της ρεσβερατρόλης (αποτελέσματα από κλινικές μελέτες) σύμφωνα με πρόσφατο άρθρο ανασκόπησης. Το σύμβολο ↔ δηλώνει τη μη δράση και το ↓↑ τα αντιφατικά αποτελέσματα [276].

3.5 Έρευνες με μεταβολίτες φαινολικών ενώσεων

3.5.1 Εισαγωγή

Οι έρευνες που επικεντρώνονται στις θετικές επιδράσεις των πολυφαινολών είναι πάρα πολλές. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω υπάρχουν επιδημιολογικές μελέτες που συσχετίζουν αρνητικά πρόσληψη τροφίμων πλούσιων σε πολυφαινόλες, αλλά και των ίδιων των φαινολικών ουσιών, με πλήθος φλεγμονωδών νοσημάτων. Υπάρχουν κλινικές μελέτες, με υγιείς ή μη εθελοντές, όπου μελετάται η επίδραση της πρόσληψης διαφόρων ποσοτήτων φαινολικών ουσιών με βελτίωση δεικτών φλεγμονής. Τέτοιες μελέτες έχουν γίνει και σε πειραματόζωα για τον ίδιο σκοπό, αλλά και για την εξακρίβωση του τρόπου δράσης τους, με στόχο την κατανόηση ώστε να υπάρξουν ακριβείς συστάσεις πρόσληψης στον άνθρωπο. Όμως το κομμάτι της μελέτης των μεταβολιτών των φαινολικών ουσιών είναι ακόμα σε αρχικά στάδια. Αυτό μπορεί να συμβαίνει γιατί τα μόρια αυτά διαφέρουν πολύ στη δομή, άρα και οι μεταβολίτες τους, αλλά και γιατί είναι δύσκολο να μετρηθούν στα βιολογικά υγρά του ανθρώπου. Η γνώση ότι μόνο ένα μικρό μέρος των φαινολικών ενώσεων που καταναλώνουμε μέσω της τροφής, βρίσκεται στην αρχική της μορφή καθώς και το γεγονός ότι οι φαινολικές ενώσεις μεταβολίζονται *in vivo* σε ακετυλο- , μεθυλο-, θειο-, και γλυκουρονυλο παράγωγα οδήγησε στη μελέτη της δράσης των μεταβολιτών των φαινολικών ενώσεων. Έτσι κάποιοι ερευνητές προχώρησαν στη χημική σύνθεση αυτών των μεταβολιτών και τη μελέτη της επίδρασης τους σε πλήθος αντιοξειδωτικών, αντιφλεγμονωδών, αντιαθηρογόνων και αντιθρομβωτικών διαδικασιών.

3.5.2 Αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας μέσω της αύξησης της λιποφιλικότητας

Παρά το αυξανόμενο επιστημονικό ενδιαφέρον για τις ευεργετικές δράσεις των φαινολικών ενώσεων, οι ουσίες αυτές φαίνεται να έχουν χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα αφού μεταβολίζονται πολύ γρήγορα και απεκκρίνονται. Ειδικά για τη ρεσβερατρόλη φαίνεται ότι η χαμηλή σταθερότητα, η αυξημένη οξείδωση σε θερμότητα ή έκθεση στο φως, η χαμηλή διαλυτότητα στο νερό αλλά και η υψηλή ηπατική πρόσληψή της, έχουν σαν αποτέλεσμα τη χαμηλή βιοδιαθεσιμότητά της [277]. Έτσι, έχουν αναπτυχθεί πολύ τρόποι αύξησης της βιοδιαθεσιμότητας όπως η ενσωμάτωσή της σε

λιποσώματα, σε πολυμερή νανοσωματίδια, κυκλοδεξτρίνες αλλά και σε μεταφορείς όπως κύτταρα μυκήτων. Πιο συχνή και εύκολη διαδικασία είναι η προσθήκη λιπόφιλου τμήματος όπως είναι η ακετυλομάδα και η μεθυλομάδα. Ο στόχος είναι βέβαια τα μόρια που θα φτιαχτούν να μπορούν να αντιδράσουν με τους μεταφορείς των μεμβρανών, για να μπορέσει να περάσει το μόριο στο εσωτερικό του κυττάρου και να ασκήσει τις δράσεις του [278].

Τα μεθυλιωμένα παράγωγα ρεσβερατρόλης εμφανίζουν καλύτερη βιοδιαθεσιμότητα μέσω της καλύτερης μεταφοράς μέσα στο κύτταρο αλλά και της πιο δύσκολης αποικοδόμησης σε σχέση με το αρχικό μόριο. Σε μελέτη φάνηκε ότι παράγωγα τρι, δι, και μονο μεθυλιωμένης ρεσβερατρόλης μπορούν να παραχθούν μέσω της ο-μεθυλοτρανσφεράσης στην E.coli [279].

Σε άλλη κυτταρική σειρά ανθρώπινων νευρικών κυττάρων SH-SY5Y, αμφίφυλα παράγωγα της ρεσβερατρόλης με ομάδες χοληστερόλης και διακυλογυκερόλης είχαν καλύτερη αντικαρκινική δράση από τη ρεσβερατρόλη, με δοσοεξαρτώμενο τρόπο [280].

Προηγούμενη μελέτη από την ερευνητική ομάδα του Χαροκόπειου Πανεπιστημίου έχει δείξει ότι τα ακετυλιωμένα παράγωγα τυροσόλης και ρεσβερατρόλης έχουν ίδια ή και καλύτερη αντιθρομβωτική δράση σε σχέση με τις αρχικές ενώσεις αναστέλλοντας την επαγόμενη από PAF συσσώρευση αιμοπεταλίων σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού [224].

Σε άλλη μελέτη εξετάστηκε η επίδραση της 3,5,4’ τριμεθοξυρεσβερατρόλη και του υδροξυλιωμένου αναλόγου της, 2 υδροξυ- 3,5,4’ τριμεθοξυρεσβερατρόλη, στην αντιοξειδωτική ικανότητα σε κοκκιώδη κύτταρα. Φάνηκε ότι ο μεταβολίτης που είχε το ελεύθερο υδροξύλιο είχε καλύτερη αντιοξειδωτική δράση, σε σχέση με το μεταβολίτη 3,5,4’ τριμεθοξυρεσβερατρόλη [281].

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω η ρεσβερατρόλη είναι γνωστό ότι έχει αντικαρκινική και αντιοξειδωτική δράση. Σε αυτή τη μελέτη φαίνεται η νευροπροστατευτική δράση που ασκούν 4 μεθυλιωμένοι μεταβολίτες της ρεσβερατρόλης, με ισχυρότερο το 3,4'-διυδροξυ -5-μεθοξυρεσβερατρόλη. Το παράγωγο 3,4'-διυδροξυ -5-μεθοξυρεσβερατρόλη σε συγκέντρωση 0,1-10μM ανέστειλε την επαγόμενη από 6-υδροξυντοπαμίνη (25μM) νευροτοξικότητα σε νευρικά κύτταρα της σειράς SH-SY5Y [282].

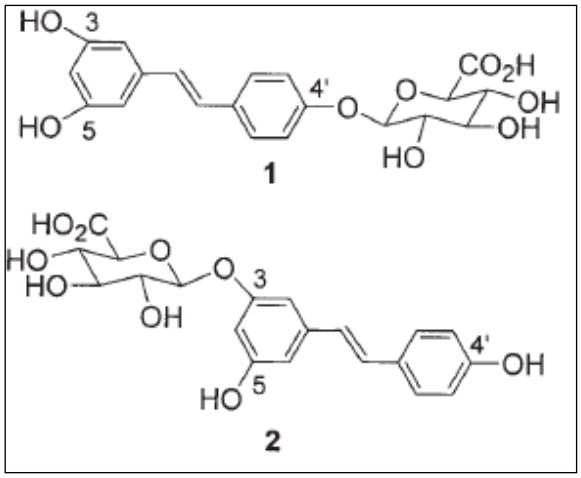
3.5.3 Πειράματα in vitro με μεταβολίτες φαινολικών ενώσεων

Αντιοξειδωτική δράση

Σε μελέτη μετρήθηκε η *in vitro* ικανότητα των μεταβολιτών 3'-O- και 4'-O-υδροξυτυροσόλη-γλυκουρονίδια και 4'-O-γλυκουρονίδιο τυροσόλης απομονωμένων από ούρα ανθρώπου, να αναστέλλουν την οξείδωση της LDL που προκαλείται από το χαλκό, αλλά και να εκκαθαρίζουν τη ρίζα DPPH. Οι συγκεντρώσεις των μεταβολιτών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν της τάξης 0,01-10μM, αυτές δηλαδή που ανιχνεύονται στα βιολογικά υγρά μετά την κατανάλωση αυτής της ποσότητας ελαιολάδου. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στη ποσότητα αυτή δεν εκδηλώνουν *in vitro* αντιοξειδωτική δράση [153].

Είναι γνωστό ότι η ρεσβερατρόλη έχει πλειοτροπικές δράσεις σε διάφορα είδη ενζύμων. Για το λόγο αυτό μελετήθηκε η επίδραση των μεταβολιτών της, 3 και 4'-O-θειορεσβερατρόλη. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι ο μεταβολίτης 4'-O-θειορεσβερατρόλη αναστέλλει τις κυκλοοξυγονάσες 1 και 2, ενώ και οι δύο ενεργοποιούν την σιρτουίνη 1 (SIRT1), όπως κάνει και η ρεσβερατρόλη [283].

Από άλλη, ομάδα ερευνητών έγινε μελέτη της επίδρασης των μεταβολιτών 3-O-γλυκουρονίδιο και 4'-O- γλυκουρονίδιο ρεσβερατρόλης (χημική δομή στην **εικόνα 24**), στην φλεγμονή που δημιουργείται από τον ιό του HIV-1. Ενώ λοιπόν η ρεσβερατρόλη έχει ευεργετικά αποτελέσματα, δε φαίνεται να συμβαίνει το ίδιο και με τους μεταβολίτες της, ακόμα και όταν έφτασαν σε συγκέντρωση 300μM σε καλλιέργειες κυττάρων PBMCs (περιφερικά μονοκύτταρα αίματος) απομονωμένα από ανθρώπινο αίμα. Βέβαια το άρθρο καταλήγει ότι το γεγονός, ότι δεν έχουν δράση *in vitro* δε σημαίνει ότι συμβαίνει το ίδιο και *in vivo* [284].



Εικόνα 24: Η χημική δομή των γλυκουρονιωμένων παραγώγων της ρεσβερατρόλης, όπου 1: 4'-O- γλυκουρονίδιο και 2: 3-O- γλυκουρονίδιο ρεσβερατρόλης [284].

Σε άλλη μελέτη που έγινε *in vitro* σύνθεση μεταβολιτών της κερκετίνης, φάνηκε να παρουσιάζουν ανασταλτική δράση στην οξειδάση της ξανθίνης και της λιποοξυγονάσης από σόγια. Αναλυτικά τα γλυκουρονιωμένα παράγωγα 3' και 4' της κερκετίνης είναι ισχυροί αναστολείς της οξειδάσης της ξανθίνης, επίσης η 4΄ γλυκουρονιωμένη κερκετίνη εξουδετερώνει τις ρίζες υπεροξειδίου. Τα γλυκουρονιωμένα παράγωγα της κερκετίνης είναι μέτριοι αναστολείς της λιποοξυγονάσης, με εξαίρεση την 3-γλυκουρονιωμένη κερκετίνη που φαίνεται να μην παρουσιάζει ανασταλτική δράση [285].

Τα γλυκουρονιωμένα παράγωγα της τυροσόλης αναστέλλουν την οξείδωση της LDL από χαλκό. Ενώ από την άλλη δεν επιδρούν στην αντίδραση DPPH [153].

Αντικαρκινική δράση

Υπάρχουν ενδείξεις ότι οι μεταβολίτες της ρεσβερατρόλης εκδηλώνουν αντικαρκινική δράση αφού έχει φανεί ότι τα 3 και 4' μονογλυκουρονίδια της ρεσβερατρόλης αναστέλλουν την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου, αναστέλλοντας την κυτταρική ανάπτυξη μέσω της τροποποίησης της φάσης G1 και της μείωσης της κυκλίνης D1 [286]. Ανασταλτική δράση παρουσίασαν όλοι οι μεταβολίτες της ρεσβερατρόλης τόσο τα θείο παράγωγα όσο και τα γλυκουρονιωμένα σε κυτταρική σειρά καρκινικών κυττάρων εντέρου. Το άρθρο μάλιστα καταλήγει ότι παρόλο που η ρεσβερατρόλη παρουσιάζει χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα, οι σημαντικές δράσεις της φαίνεται να διενεργούνται μέσω των μεταβολιτών της [287].

Παρόλα αυτά σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε 3 κυτταρικές σειρές καρκινικών κυττάρων του μαστού τα παράγωγα *trans*-ρεσβερατρόλη 3- Ο-θειο, *trans*- ρεσβερατρόλη 4'- Ο- θειο και *trans*- ρεσβερατρόλη 3- Ο- 4'- Ο- διθειο δεν είχαν τα αποτελέσματα που είχε η ρεσβερατρόλη [288].

Αντιφλεγμονώδης Δράση

Οι *Hoshino et al.* συνέθεσαν πέντε θείο παράγωγα ρεσβερατρόλης και δοκιμάστηκαν οι δράσεις τους σε διαδικασίες που είναι γνωστό ότι μπορεί να αναστείλει η ρεσβερατρόλη. Ο μεταβολίτης 3-θειορεσβερατρόλη προκαλεί επαγωγή της αναγωγάσης της κινόνης (QR1) και αναστολή των κυκλοοξυγονασών 1 και 2. Ο μεταβολίτης 4’ θειορεσβερατρόλη εκτός από την αναστολή των κυκλοοξυγονασών 1 και 2 προκαλεί και αναστολή των δράσεων του NFkB. Οι μεταβολίτες 3΄και 4 θειορεσβερατρόλη μειώνουν την παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου, μέσω της μείωσης της έκφρασης του iNOS σε κύτταρα RAW 264.7 (μακροφάγα). Επίσης, οι προαναφερθέντες μεταβολίτες έχουν μικρή αντιπολλαπλασιαστική δράση στα MCF7 κύτταρα (ανθρώπινα μαστικά καρκινικά κύτταρα) [289].

Το παράγωγο 3’- θειοπαράγωγο της κερκετίνης σε ποσότητα 25μmol/mL, αναστέλλει την επαγόμενη από IL-1β παραγωγή IL-8 και IL-6 σε κύτταρα της σειράς A549 (επιθηλιακά κύτταρα πνεύμονα). Τα κύτταρα αυτά σχετίζονται με τη χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, η οποία προκαλεί αυξημένα επίπεδα προφλεγμονωδών κυτταροκινών, αφού είναι μία κατάσταση χρόνιου οξειδωτικού στρες [290].

Διάφορα φαινολικά συστατικά (4’ μέθυλο κερκετίνη, καμπεφερόλη κ.α.) που απομονώθηκαν μετά από εκχύλιση των φύλλων του φυτού Chromolaena odorata, φαίνεται να αναστέλλουν τη δράση του PAF σε αιμοπετάλια κουνελιού, μέσω δέσμευσης στον υποδοχέα του. Τα IC_{50} κυμαίνονταν από 19,5 έως 62,1μM [291].

Από μελέτες που έχουν γίνει αποδεικνύεται ότι υπάρχουν ακετυλιωμένες μορφές ρεσβερατρόλης, κερκετίνης και κουμαρίνες σε τρόφιμα. Εκτός από το γεγονός ότι τα μόρια αυτά παρουσιάζουν βιολογικές δράσεις δηλαδή αναστολή της λιποειδικής υπεροξείδωσης, μείωση της δραστικότητας της συνθάσης του NO σε μακροφάγα κ.α., αναστέλλουν την προκαλούμενη από PAF συσσώρευση των αιμοπεταλίων *in vitro*, έχουν δηλαδή και αντιθρομβωτική δράση [224].

Η επίδραση της κερκετίνης στην υπερτροφία των λείων μυϊκών αγγειακών κυττάρων, που έχουν απομονωθεί από αορτές αρουραίων, έχει αποδειχθεί αφού αναστέλλει τη δράση της αγγειοτενσίνης ΙΙ που προκαλεί την υπερτροφία, μέσω της αναστολής της κινάσης Ιανός (JNK). Η κερκετίνη-3-Οβ-γλυκουρονίδιο δρα με τον ίδιο ακριβώς τρόπο στην αναστολή της υπερτροφίας των λείων μυϊκών αγγειακών κυττάρων, αναστέλλοντας την JNK, την ERK 1/ 2 και την ρ38 [292].

Σε πείραμα που έγινε σε απομονωμένα από αίμα μονοκύτταρα και ουδετερόφιλα φάνηκε ότι τόσο η κερκετίνη όσο και οι μεταβολίτες της, 3'-Ο-θειο κερκετίνη, 3'-Ο-μεθυλκερκετίνη, κερκετίνη-3-Ο-γλυκουρονίδιο και 3'-Ο-μεθυλοκερκετίνη -3-Ο-γλυκουρονίδιο, αναστέλλουν την παραγωγή λευκοτριενίων Β4 όταν διεγείρονται με ιονοφόρο ασβεστίου Α23187. Δεν είναι όμως πιο ισχυροί αναστολείς από τη κερκετίνη [293].

Κεφάλαιο 4: Σκοπός

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν αρχικά να α) συντεθούν λιπόφιλα μόρια της τυροσόλης και της ρεσβερατρόλης με σκοπό την αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας αυτών των μορίων β) συντεθούν κάποιοι από τους βασικούς μεταβολίτες (γλυκουρονιωμένα παράγωγα) και στη συνέχεια να γ) εξεταστεί η αντιφλεγμονώδης και η αντιοξειδωτική δράση των παραγώγων της ρεσβερατρόλης και τυροσόλης και να συγκριθεί με αυτή των αρχικών φαινολικών ενώσεων.

Πιο αναλυτικά η αντιοξειδωτική δράση των ενώσεων θα δοκιμαστεί α) σε συστήματα ελεύθερα κυττάρων όπου θα εξεταστεί η ικανότητά τους να εκκαθαρίζουν ελεύθερες ρίζες DPPH, να αναστέλλουν την ενζυμική και μη ενζυμική λιποειδική υπεροξείδωση αλλά και την οξείδωση του ορού παρουσία χαλκού, και β) σε καλλιέργειες κυττάρων (μονοκυττάρων της σειράς U937) όπου θα εξετασθεί η ικανότητα των αρχικών ενώσεων και των παραγώγων τους να επιδρούν στην παραγωγή και τον μεταβολισμό του PAF ύστερα από τη διέγερση των κυττάρων με μία βασική κυτταροκίνη της φλεγμονής, την IL1-β.

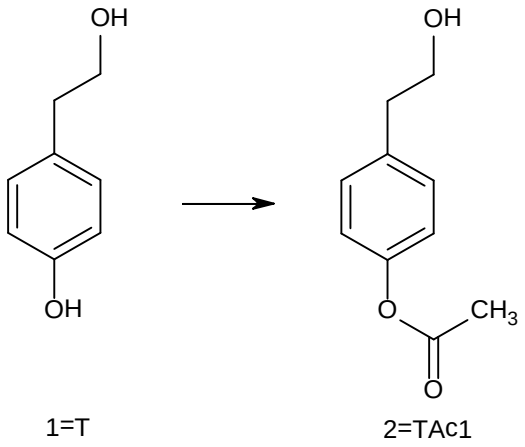
Κεφάλαιο 5: Μεθοδολογία

5.1 Σύνθεση παραγώγων τυροσόλης

Σύνθεση των ακετυλιωμένων παραγώγων

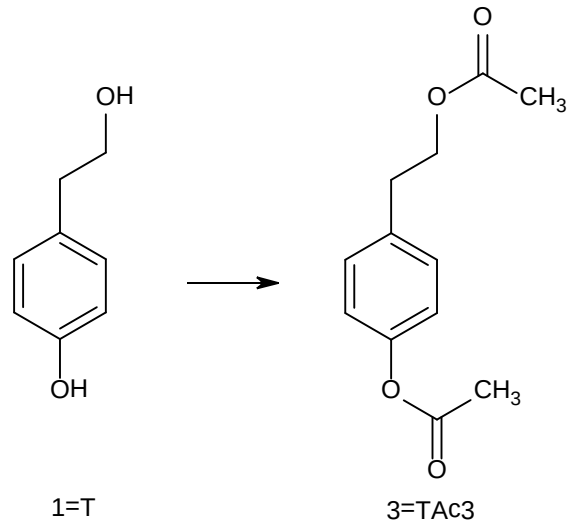
Η σύνθεση των παραγώγων της τυροσόλης παρουσιάζεται στα Σχήματα 1-4.

Για την σύνθεση χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη ύλη η εμπορικά διαθέσιμη τυροσόλη από την οποία με επίδραση οξικού ανυδρίτη, παρουσία υδατικού διαλύματος NaOH, λαμβάνεται εκλεκτικά το επιθυμητό μονοακετυλιωμένο παράγωγο **2** (**Σχήμα 1**). Η αντίδραση είναι εφικτή λόγω της μεγαλύτερης δραστικότητας του φαινολικού υδροξυλίου σε σχέση με το αλειφατικό.



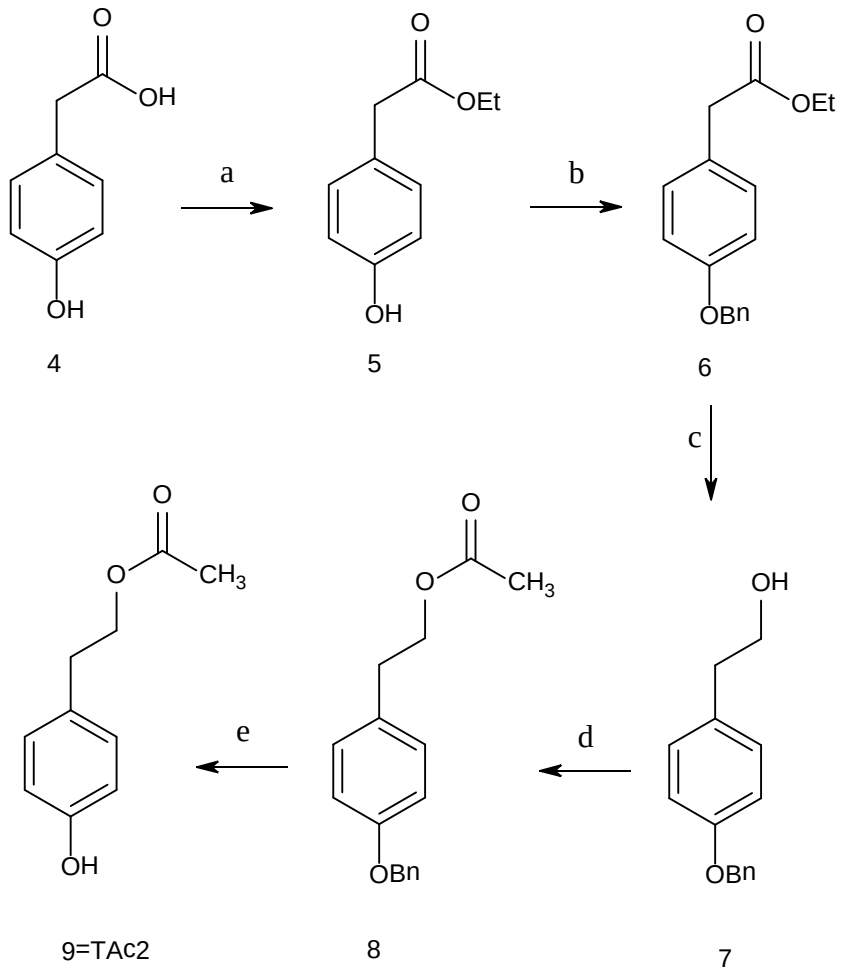
Σχήμα 1: Αντιδραστήρια και Συνθήκες:Ac_2O, υδατικό διάλυμα NaOH, 0 ºC.

Αντίθετα, η σύνθεση του διακετυλιωμένου παραγώγου **3** πραγματοποιήθηκε με επίδραση περίσσειας οξικού ανυδρίτη επί της τυροσόλης, παρουσία τριαιθυλαμίνης (**Σχήμα 2**).



Σχήμα 2: Αντιδραστήρια και Συνθήκες: Ac_2O, Et_3N, CH_2Cl_2, θ.π.

Για την σύνθεση του μονοακετυλιωμένου παραγώγου στο αλειφατικό υδροξύλιο αναπτύχθηκε μία πιο πολύπλοκη πορεία. Η χρήση της πορείας αυτής ήταν αναγκαία καθώς, όπως ήδη αναφέρθηκε, το φαινολικό υδροξύλιο είναι περισσότερο δραστικό από το αλειφατικό και άρα αντιδρά πιο εύκολα. Έτσι, με πρώτη ύλη το 4-υδροξυφαινυλοξικό οξύ **4** παρασκευάζεται ο εστέρας **5** από τον οποίο, με μία απλή αντίδραση βενζυλίωσης, λαμβάνεται το προστατευμένο παράγωγο **6** (**Σχήμα 3**). Ακολούθως, από τον εστέρα **6**, μετά από αναγωγή με $LiAlH_4$ και ακετυλίωση της ενδιάμεσης αλκοόλης **7** λαμβάνεται ο οξικός εστέρας **8**. Τελικά, το επιθυμητό μονοακετυλιωμένο παράγωγο **9** λαμβάνεται σε υψηλή καθαρότητα μετά από αναγωγική απομάκρυνση της βενζυλομάδας με απλή υδρογόνωση. Αξίζει να αναφερθεί ότι η συνολική απόδοση της νέας πορείας, αν και αποτελείται από 5 στάδια, είναι της τάξεως του 40%.



Σχήμα 3: Αντιδραστήρια και Συνθήκες: a) EtOH απόλυτη., H_2SO_4 98%, βρασμός.; b) BnCl, Na_2CO_3, ακετόνη, βρασμός.; c) $LiAlH_4$, THF άνυδρο, 50 ºC.; d) Ac_2O, Et_3N, CH_2Cl_2, θ.π.; e) H_2, Pd/C, 50 psi, EtOH απόλυτη.

Σύνθεση του οξικού εστέρα της 4-(2-υδροξυαιθυλο)φαινόλης(**2**).

Σε εναιώρημα τυροσόλης (70mg, 0,51mmol, **1**) σε υδατικό διάλυμα KOH (5 mL, 6,4 N) προστίθεται οξικός ανυδρίτης (60 μL, 0,64 mmol) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται στους 2 ºC για 1,5 h. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το μίγμα εκχυλίζεται με CH_2Cl_2, η οργανική στιβάδα ξηραίνεται με Na_2SO_4, συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση και το ελαιώδες υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (silica gel, κυκλοεξάνιο-οξικός αιθυλεστέρας 3-1 έως 1-1). Λαμβάνονται 70mg καθαρού προϊόντος (76%).

^{1}HNMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.18 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.98 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 3.70 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, CH_2), 2.76 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, CH_2), 2.24 (s, 3H, CH_3).

^{13}CNMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 170.02, 149.23, 136.47, 130.52, 121.60, 63.36, 38.47, 21.04.

Σύνθεση του οξικού εστέρα της 4-(2-ακετοξυαιθυλο)φαινόλης(**3**).

Διάλυμα τυροσόλης (95 mg, 0,69 mmol, **1**), οξικού ανυδρίτη (130 μL, 1,38 mmol) και τριαιθυλαμίνης (0,19mL, 2,76 mmol) σε άνυδρο CH_2Cl_2 (10 mL), αναδεύεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 12h. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το μίγμα συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση, εκχυλίζεται με μίγμα διχλωρομεθανίου/νερού και η οργανική στιβάδα ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου Na_2SO_4 και συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Το ελαιώδες υπόλλειμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (silica gel, κυκλοεξάνιο-οξικός αιθυλεστέρας 3-1) λαμβάνοντας 141mg καθαρού προϊόντος (92%) [294].

^{1}HNMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.20 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.01 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 4.25 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH_2), 2.90 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH_2), 2.25 (s, 3H, CH_3), 2.01 (s, 3H, CH_3).

^{13}CNMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 21.04, 34.33, 64.57, 121.50, 129.77, 135.41, 149.12, 169.53, 170.88.

Σύνθεση του 2-(4-υδροξυφαινυλο)οξικού αιθυλεστέρα(**5**).

Σε διάλυμα του (4-υδροξυφαινυλο)οξικού οξέος (2g, 13,16mmol, **4**) σε απόλυτη αιθανόλη (40mL) προστίθεται H_2SO_4 98% (0,2mL) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται σε θερμοκρασία βρασμού για 14h. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το μίγμα συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση και εκχυλίζεται με διχλωρομεθάνιο/νερό. Η οργανική στιβάδα ξηραίνεται με Na_2SO_4, συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση και το ελαιώδες υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (silica gel, κυκλοεξάνιο-οξικός αιθυλεστέρας 3-1) λαμβάνοντας 1,9g καθαρού προϊόντος (80%) [295].

^{1}HNMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.15 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.78 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 4.13 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, C$H_2$$CH_3$), 3.53 (s, 2H, C$H_2$), 1.26 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH_2CH_3).

Σύνθεση του 2-(4-(βενζυλοξυ)φαινυλο)οξικού αιθυλεστέρα (**6**).

Εναιώρημα 2-(4-υδροξυφαινυλο)οξικού αιθυλεστέρα (1,3g, 7,22mmol, **5**), βένζυλο χλωριδίου (2,58 mL, 21,7 mmol) και K_2CO_3 (4,98 g, 36,1 mmol) σε ακετόνη (50mL) αναδεύεται σε θερμοκρασία βρασμού για 3h. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το μίγμα συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση και εκχυλίζεται με διχλωρομεθάνιο/νερό. Η οργανική στιβάδα ξηραίνεται με Na_2SO_4, συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση και το ελαιώδες υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (silica gel, κυκλοεξάνιο-οξικός αιθυλεστέρας 4-1) λαμβάνοντας 1,38g καθαρού προϊόντος (71%) [296].

^{1}HNMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.45 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H), 7.40 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H), 7.34 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H), 7.22 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.96 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 5.07 (s, 2H, C*H*$_2$O), 4.16 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H,C*H*$_2$CH$_3$), 3.57 (s, 2H, C*H*$_2$CO), 1.27 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH$_2$C*H*$_3$).

^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 171.93, 157.94, 137.07, 130.32, 128.61, 127.97, 127.48, 126.58, 114.97, 70.06 (*C*H$_2$O), 60.80 (*C*H$_2$CH$_3$), 40.56 (CO*C*H$_2$), 14.26 (CH$_2$*C*H$_3$).

Σύνθεση της 2-(4-(βενζυλοξυ)φαινυλο)αιθανόλης (**7**).

Διάλυμα 2-(4-(βενζυλοξυ)φαινυλο)οξικού αιθυλεστέρα (1,9g, 7,04mmol, **6**) σε άνυδρο THF (10mL) προστίθεται στάγδην σε εναιώρημα $LiAlH_4$ (704mg, 17,6mmol) σε άνυδρο THF (20mL), στους 0ºC, υπό ατμόσφαιρα αργού. Μετά την ολοκλήρωση της προσθήκης το μίγμα αναδεύεται στους 50ºC για 2h, αφήνεται να ψυχθεί και ακολούθως κατεργάζεται με ψυχρό νερό (0,76ml), 15% διάλυμα NaOH (0,76mL) και νερό (0,76mL). Το στερεό που λαμβάνεται διηθείται υπό κενό, πλένεται εντατικά διχλωρομεθάνιο και το σύνολο του διηθήματος, μετά από ξήρανση με Na_2SO_4, συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (silica gel, κυκλοεξάνιο-οξικός αιθυλεστέρας 2-1) λαμβάνοντας 1,16g καθαρού προϊόντος (72%) [297].

Στ.: 84-85 ºC (πετρελαϊκός αιθέρας).

^{1}HNMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.43 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H), 7.40 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H), 7.35 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H), 7.14 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.93 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 5.07 (s, 2H, C*H*$_2$O), 3.74 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, C*H*$_2$), 2.76 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, C*H*$_2$).

^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 157.47, 137.13, 130.88, 129.99, 128.57, 127.93, 127.45, 114.98, 70.03 (*C*H_2O), 63.71 (CH_2*C*H_2OH), 38.26 (*C*H_2CH_2OH).

Σύνθεση του οξικού εστέρα της 2-[4-(βενζυλοξυ)φαινυλο]αιθανόλης (**8**).

Το παράγωγο **8** συντίθεται με διαδικασία ανάλογη με αυτή που χρησιμοποιήθηκε για την σύνθεση του παραγώγου **3**.

Απόδοση: 94% [298]

^{1}HNMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.50 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H'), 7.45 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.39 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.21(d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.00(d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 5.11 (s, 2H, C*H*$_2$), 4.32 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, C*H*$_2$), 2.95 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, C*H*$_2$), 2.10 (s, 3H, COC*H*$_3$).

^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 170.93, 157.57, 137.12, 130.13, 129.87, 128.56, 127.91, 127.45, 114.90, 69.99 (*C*H_2Bn), 65.11 (*C*H_2), 34.22 (*C*H_2), 20.93 (*C*H_3).

Σύνθεση του οξικού εστέρα της 2-(4-υδροξυφαινυλ)αιθανόλης(**9**).

Εναιώρημα του οξικού εστέρα της 2-[4-(βενζυλοξυ)φαινυλ]αιθανόλης (200mg, 0,74mmol, **8**) και 10%Pd σε άνθρακα (30mg), σε απόλυτη αιθανόλη (90mL), αναδεύεται σε πίεση H_2 50 psi και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, για 4h.Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το μίγμα διηθείται υπό κελίτη, συμπυκνώνεται υπό κενό και το υπόλειμμα που λαμβάνεται καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (silica gel, κυκλοεξάνιο-οξικός αιθυλεστέρας 2-1) λαμβάνοντας 114mg καθαρού προϊόντος (86%).

Στ: 57-59 ºC (μεθανόλη–*n*-εξάνιο) [299]

^{1}HNMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.05 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, 6.72 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 4.28 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, C*H*$_2$), 2.78 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, C*H*$_2$), 2.00 (s, 3H, C*H*$_3$).

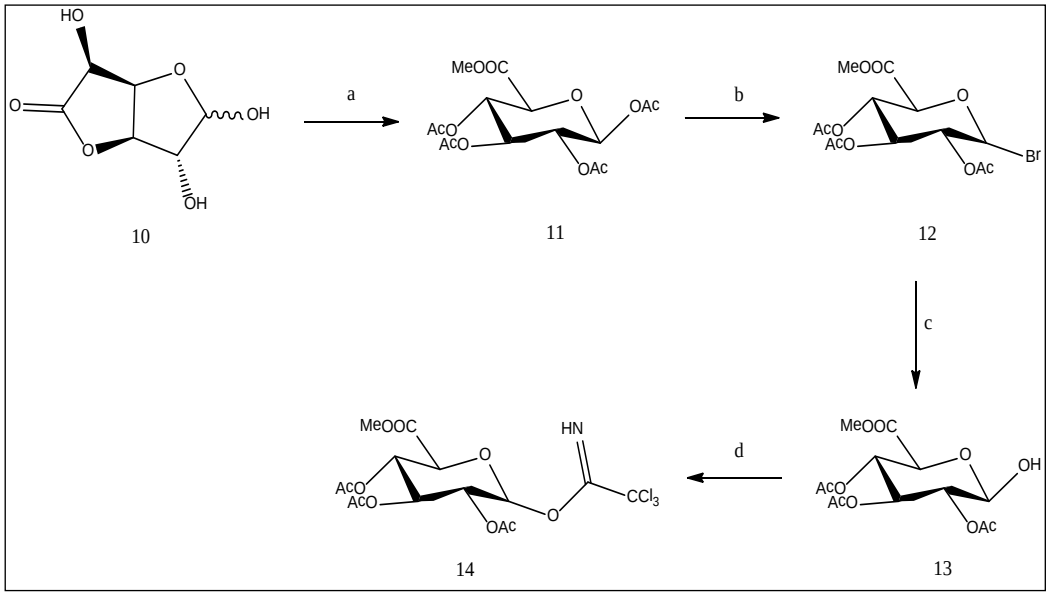
^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 170.13, 156.57, 129.87, 127.91, 115.14, 65.05 (*C*H_2), 34.11 (*C*H_2), 20.83 (*C*H_3).

Σύνθεση γλυκουρονιδίου της τυροσόλης

Η σύνθεση της γλυκουρονιωμένης τυροσόλης στο φαινολικό υδροξύλιο παρουσιάζεται στο Σχήμα 4. Για την σύνθεση γλυκουρονιδίων, στη διεθνή βιβλιογραφία χρησιμοποιούνται διάφοροι δότες της ομάδας του γλυκουρονιδίου,

όπως ο οξικός εστέρας **9**, το βρωμίδιο **11** αλλά και το αντίστοιχο τριχλωροακεταμίδιο **13** (**Σχήμα 4**). Στην παρούσα εργασία, η σύνθεση των γλυκουρονιδίων επιχειρήθηκε και με τους τρεις αυτούς δότες, όμως η απόδοση της αντίδρασης με τον οξικό εστέρα και το βρωμίδιο ήταν ιδιαίτερα χαμηλή ενώ ο καθαρισμός και η απομόνωση του προϊόντος αποδείχτηκε ιδιαίτερα δύσκολος. Τελικά η γλυκουρονίωση επιτεύχθηκε με χρήση του τριχλωροακεταμιδίου **12**, σε ικανοποιητική απόδοση και με εύκολο καθαρισμό. Πρέπει να τονιστεί ότι το τριχλωροακεταμίδιο **12** παρασκευάστηκε στο εργαστήριο σε 4 στάδια χρησιμοποιώντας καλά περιγραφόμενη μέθοδο της βιβλιογραφίας [300] (**Σχήμα 4**). Η σύνθεση αυτού κρίθηκε αναγκαία λόγω του υψηλού του κόστους αλλά και της μεγάλης αστάθειας του.

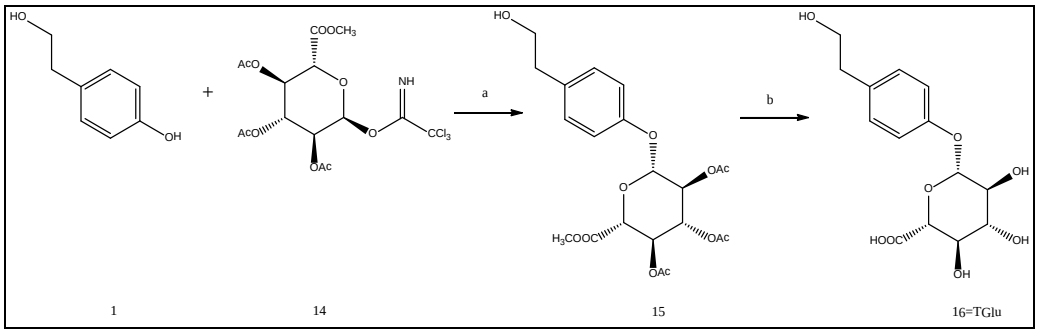
Αρχικά λοιπόν, με επίδραση μεθανόλης παρουσία καταλυτικής ποσότητας διϊσοπροπυλοαιθυλαμίνης και ακολούθως οξικού ανυδρίτη επί του παραγώγου **10** παρελήφθη ο εστέρας **11**, από τον οποίο με επίδραση διαλύματος HBr σε οξικό οξύ παρασκευάστηκε το βρωμίδιο **12**. Στην συνέχεια, μετά από ήπια υδρόλυση του βρωμιδίου με επίδραση Ag_2CO_3 λαμβάνεται το υδρόξυ παράγωγο **13** από το οποίο με επίδραση CCl_3CN, παρουσία DBU, παρασκευάζεται τελικά το επιθυμητό τριχλωροακεταμίδιο **14** (**Σχήμα 4**).



Σχήμα 4: Αντιδραστήρια και Συνθήκες: a) MeOH, Hünig's base (DIPEA); Ac_2O, I_2; b) HBr, CH_2Cl_2; c) Ag_2CO_3, CH_3CN/H_2O; d)CCl_3CN, DBU.

Για την σύνθεση του επιθυμητού γλυκουρονιδίου **16**, αρχικά με επίδραση του τριχλωροακεταμιδίου **14** επί της τυροσόλης, παρουσία κατάλληλου οξέος κατά Lewis

ως καταλύτη, παρασκευάστηκε εκλεκτικά ο εστέρας **15**, από τον οποίο με αλκαλική υδρόλυση λαμβάνεται αποκλειστικά το επιθυμητό β-D-γλυκουρονικό οξύ **16** (**Σχήμα 5**).



Σχήμα 5: Αντιδραστήρια και Συνθήκες: a) $BF_3{\cdot}Et_2O$, CH_2Cl_2; b) MeONa, MeOH

Σύνθεση του 4'-O-β-D-γλυκουρονιδίου της τυροσόλης(16)

Σε διάλυμα του παραγώγου **15** (454mg, 1mmol) σε άνυδρη μεθανόλη (10mL), στους -10ºC, υπό ατμόσφαιρα αργού, προστίθεται στάγδην διάλυμα μεθοξυνατρίου (270mg, 5mmol) σε άνυδρη μεθανόλη (2mL)και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται στους 0ºC για 2h. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το μίγμα κατεργάζεται με οξικό οξύ (pH~5) και συμπυκνώνεται υπό κενό. Το υπόλειμμα που λαμβάνεται καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (silica gel, οξικός αιθυλεστέρας-οξικό οξύ 98-2) λαμβάνοντας 169mg καθαρού προϊόντος (54%) που συμφωνεί με αυτό της βιβλιογραφίας.

^{1}HNMR (400 MHz, MeOD) δ (ppm) 7.11 (d, J=8.2Hz, 2H), 7.00 (d, J=8.3Hz, 2H), 4.95 (d, J=7.0 Hz, 1H), 3.71 (bs, 1H), 3.66 (t, J= 7.0Hz, 1H), 3.4 (m, 3H), 2.82 (t, J=7.0Hz, 1H).

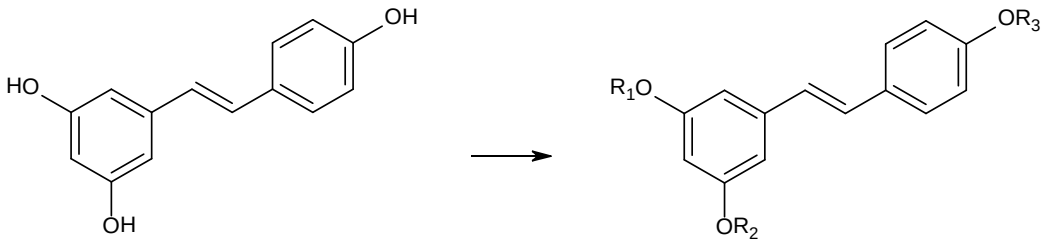
^{13}C NMR (151 MHz, MeOD) δ (ppm) 177.1, 156.9, 134.7, 131.2, 118.3, 102.2, 77.9, 76.1, 75.4, 73.3, 63.9, 39.8 [301].

5.2 Σύνθεση των παραγώγων ρεσβερατρόλης

Σύνθεση ακετυλιωμένων παραγώγων

Τα ακετυλιωμένα παράγωγα της ρεσβερατρόλης **18-22**, παρασκευάστηκαν με επίδραση οξικού ανυδρίτη, παρουσία τριαιθυλαμίνης, επί της ρεσβερατρόλης **17**. Ο διαχωρισμός των παραγώγων πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία στήλης

κανονικής φάσεως (**Σχήμα 6**). Λόγω της παραπλήσιας πολικότητας των μονοϋποκατεστημένων αλλά και των δισυποκατεστημένων παραγώγων, η υψηλή τους καθαρότητα διασφαλίστηκε με την βοήθεια ανακρυστάλλωσης με οξικό αιθυλεστέρα, μετά την χρωματογραφία στήλης.



17=R

18=RAc1: R_1=R_2=H, R_3=$COCH_3$
19=RAc2: R_1=$COCH_3$, R_2=R_3=H
20=RAc3: R_1=R_2=$COCH_3$, R_3=H
21=RAc4: R_1=H, R_2= R_3=$COCH_3$
22=RAc5: R_1=R_2=R_3=$COCH_3$

Σχήμα 6: Αντιδραστήρια και Συνθήκες: Ac_2O, Et_3N, CH_2Cl_2, θ.π.

Σύνθεση των ακετυλιωμένων παραγώγων 18-22 της ρεσβερατρόλης

Εναιώρημα ρεσβερατρόλης (950mg, 4,17mmol, **17**), οξικού ανυδρίτη (553μL, 5.84mmol) και τριαιθυλαμίνης (1.8mL, 11,68mmol) σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (100mL) αναδεύεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 12h. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το μίγμα συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση και εκχυλίζεται με διχλωρομεθάνιο/νερό. Η οργανική στιβάδα ξηραίνεται (Na_2SO_4), συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση και το ελαιώδες υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (silica gel, κυκλοεξάνιο-οξικός αιθυλεστέρας 100-4 έως 10-2) λαμβάνοντας τα παράγωγα **18**-**22**.

4-ακετυλο ρεσβερατρόλη(**18) [302]**:

^{1}HNMR (600 MHz, MeOD) δ (ppm) 7.55 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.09 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.05 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 6.99 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 6.52 (d, *J* = 2 Hz, 2H), 6.23 (t, *J* = 2 Hz, 1H), 2.29 (s, 3H).

^{13}C NMR (151 MHz, MeOD) δ (ppm) 169.72, 158.28, 150.10, 139.19, 135.14, 128.81, 126.95, 126.86, 121.46, 104.68, 101.83, 19.44.

3-ακετυλο ρεσβερατρόλη (**19**) [303]:

^{1}HNMR (600 MHz, MeOD) δ (ppm) 7.40 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.05 (d, *J* = 16.3 Hz, 1H), 6.89 (d, *J* = 16.3 Hz, 1H), 6.85 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.80 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.75 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.42 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H), 2.29 (s, 3H).

^{13}C NMR (151 MHz, MeOD) δ (ppm) 170.04, 158.11, 157.16, 151.92, 140.10, 129.95, 129.09, 128.71, 127.53, 124.48, 115.04, 110.07, 109.93, 107.17, 19.48.

3,5-διακετυλορεσβερατρόλη (**20**) [303]:

^{1}HNMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.39 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.11 (d, *J* = 2.0 Hz, 2-H), 7.03 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 6.89 (d, *J*= 16.2 Hz, 1H), 6.84(d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.82 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H), 2.34 (s, 6H).

^{13}CNMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 169.14, 155.76, 151.29, 140.14, 130.21, 129.60, 128.19, 124.84, 116.67, 115.70, 113.87, 21.15.

3,4’-διακετυλορεσβερατρόλη (**21**) [303]:

^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 7.49 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.11 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.03 (d, *J* = 16.3 Hz, 1H), 6.93 (d, *J* = 16.3 Hz, 1H), 6.84 (br s, 1H), 6.81 (br s, 1H), 6.53 (br s, 1H), 5.28 (br s, 1H), 2.34 (s, 3H), 2.34 (s, 3H).

^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ 169.64, 169.54, 156.61, 151.80, 150.28, 139.69, 134.71, 129.01, 127.78, 127.61, 121.86, 112.00, 111.09, 108.48, 21.17.

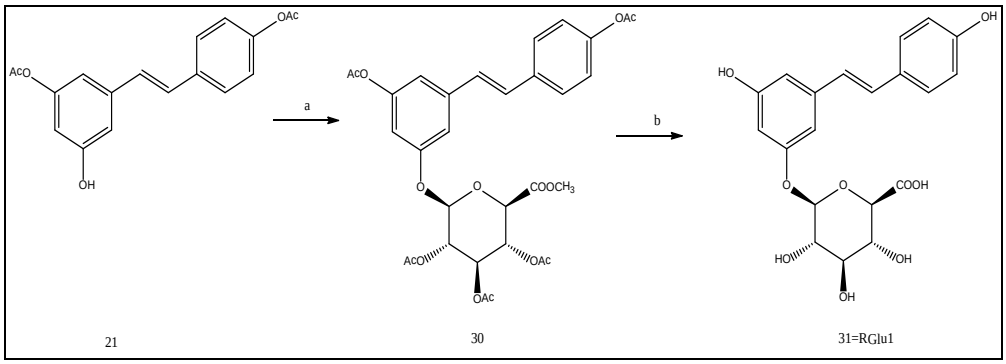
Τριακετυλορεσβερατρόλη (**22**) [304]:

^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.51 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.15 (d, *J* = 1.9 Hz, 2H), 7.12 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.09 (d, *J* = 16.3 Hz, 1H), 7.00 (d, *J* = 16.3 Hz, 1H), 6.86 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H), 2.33 (s, 9H).

^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 169.31, 168.91, 151.26, 150.38, 139.47, 134.40, 129.59, 127.59, 127.14, 121.83, 116.84, 114.34, 21.05.

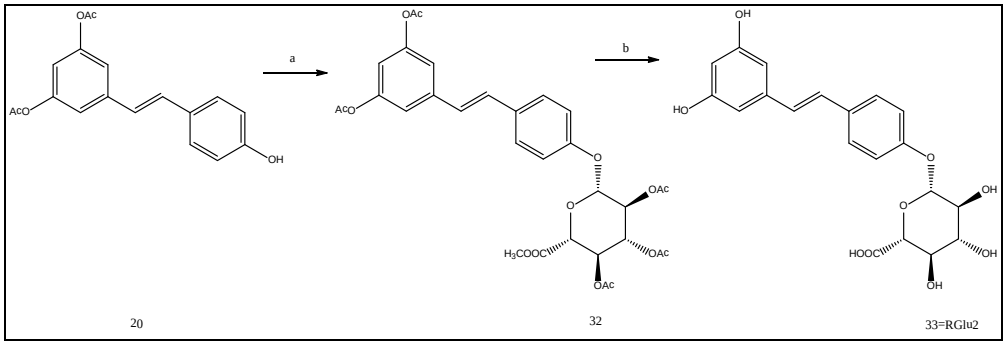
Σύνθεση γλυκουρονιωμένων παραγώγων της ρεσβερατρόλης

Η σύνθεση των γλυκουρονιδίων της ρεσβερατρόλης παρουσιάζεται στα **Σχήματα 7 και 8**.



Σχήμα 7: Αντιδραστήρια και Συνθήκες: a) $BF_3{\cdot}Et_2O$, CH_2Cl_2; b) MeONa, MeOH

Ως πρώτη ύλη χρησιμοποιήθηκαν τα κατάλληλα μονοακετυλιωμένα παράγωγα **20** και **21**. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με συνθήκες ανάλογες με αυτές που χρησιμοποιήθηκαν για την σύνθεση του γλυκουρονιδίου της τυροσόλης **16**. Έτσι, με επίδραση του τριχλωροακεταμιδίου **14** επί της κατάλληλης μονοακετυλιωμένης ρεσβερατρόλης **20** ή **21**, παρουσία $BF_3{\cdot}Et_2O$, λαμβάνονται οι αντίστοιχοι εστέρες **30** και **32**. Τα τελικά, επιθυμητά γλυκουρονίδια **31** και **33** παρασκευάστηκαν μετά από αλκαλική υδρόλυση των εστέρων **30** και **32** αντίστοιχα.



Σχήμα 8: *Αντιδραστήρια και Συνθήκες*: a) BF3.Et2O, CH2Cl2; b) MeONa, MeOH

Σύνθεση του 4-O-β-D-(2,3,4-τρι-O-ακετυλο)-γλυκουρονικού μεθυλεστέρα της τυροσόλης (**15)**

Σε εναιώρημα της τυροσόλης (552mg, 3mmol, **1**) σε άνυδρο CH_2Cl_2 (30mL), στους -10ºC, υπό ατμόσφαιρα αργού, προστίθενται μοριακά κόσκινα 4 A (1g) και το τριχλωροακεταμίδιο **14** (1,9g, 4mmol) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται στην θερμοκρασία αυτή για 10min. Ακολούθως, στο μίγμα προστίθεται στάγδην $BF_3{\cdot}Et_2O$ (0,15mL, 1,2mmol) και η ανάδευση συνεχίζεται στην θερμοκρασία αυτή για 30min. Στην συνέχεια, το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται να έλθει στους 0ºC όπου η ανάδευση συνεχίζεται για άλλες 8h. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το μίγμα κατεργάζεται με τριαιθυλαμίνη, διηθείται υπό κελίτη και συμπυκνώνεται υπό κενό. Το υπόλειμμα που λαμβάνεται καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (silica gel, κυκλοεξάνιο-οξικός αιθυλεστέρας 2-1) λαμβάνοντας 365mg καθαρού προϊόντος (27%).

^{1}HNMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.12 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.91 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 5.34 – 5.28 (m, 1H), 5.27 – 5.21 (m, 1H), 5.09 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 4.17 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 3.77 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H), 3.70 (s, 2H), 2.78 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H), 2.02 (s, 1H), 2.01 (s, 3H).

Σύνθεση του 3-O-β-D-γλυκουρονιδίου της ρεσβερατρόλης(**31**)

Σε εναιώρημα της 3,4’-διακετυλορεσβερατρόλης (312mg, 1 mmol, **21**) σε άνυδρο CH_2Cl_2 (30mL), στους -10ºC, υπό ατμόσφαιρα αργού, προστίθενται μοριακά κόσκινα 4 A (1g) και το τριχλωροακεταμίδιο **14** (0,95g, 2mmol) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται στην θερμοκρασία αυτή για 10min. Ακολούθως, στο μίγμα προστίθεται στάγδην $BF_3{\cdot}Et_2O$(0,075mL, 0,6mmol)και η ανάδευση συνεχίζεται στην θερμοκρασία αυτή για 30min. Στην συνέχεια, το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται να έλθει στους 0ºC όπου και η ανάδευση συνεχίζεται για άλλες 6h. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το μίγμα κατεργάζεται με τριαιθυλαμίνη, διηθείται υπό κελίτη και συμπυκνώνεται υπό κενό. Το υπόλειμμα που λαμβάνεται καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (silica gel, κυκλοεξάνιο-οξικός αιθυλεστέρας 3-1) λαμβάνοντας 264mg (42%) του εστέρα **30**.

^{1}HNMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.52 (d, J=8.8 Hz, 2H), 7.14 (d, J=8.8 Hz, 2H), 7.02 (d, J=16 Hz, 1H), 6.97 (t, J =1.5 Hz, 1H), 6.98 (t, J=1.5 Hz, 1H), 6.94 (d, J=16 Hz, 1H), 6.62 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 5.34-5.40 (m, 3H), 5.16 (d, J=9 Hz, 1H), 4.32 (d, J =9 Hz, 1H), 3.69 (s, 3H), 2.34 (s, 6H), 2.11 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 2.07 (s, 3H).

Ακολούθως, σε διάλυμα του εστέρα **30** (200mg, 0,32mmol) σε άνυδρη μεθανόλη (10mL), στους -10ºC, υπό ατμόσφαιρα αργού, προστίθεται στάγδην διάλυμα μεθοξυνατρίου (174mg, 3,2mmol) σε άνυδρη μεθανόλη (2mL) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται στους 0ºC για 2h. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το μίγμα κατεργάζεται με οξικό οξύ (pH~5) και συμπυκνώνεται υπό κενό. Το υπόλειμμα που λαμβάνεται καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (silica gel, οξικός αιθυλεστέρας-οξικό οξύ-μεθανόλη 96-4-10) λαμβάνοντας 56mg καθαρού προϊόντος (44%) που τα φασματοσκοπικά του χαρακτηριστικά συμφωνούν με αυτά της βιβλιογραφίας [305].

^{1}HNMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ (ppm) 9.56 (s,1H), 9.46 (s, 1H), 7.41 (d, J=8.5 Hz, 2H), 7.01 (d, J=16 Hz, 1H), 6.90 (d, J=16 Hz, 1H), 6.82(d, J=8.5 Hz, 2H), 6.67 (s, 1H), 6.60 (s, 1H), 6.30 (t, J=2 Hz, 1H), 5.42 (d, J=5.5 Hz,1H), 5.28 (s, 1H), 4.96 (d, J=7.5 Hz, 1H), 3.87 (d, J=9.5 Hz,1H), 3.36-3.24 (m, 3H).

^{13}C NMR (50 MHz,DMSO-*d6*) δ (ppm) 171.0, 159.2, 158.9, 158.2, 140.2, 129.1, 128.4, 128.2, 125.6, 116.7, 107.9, 105.5, 102.8, 100.4, 76.7, 76.4, 73.1, 72.2.

Σύνθεση του 4-O-β-D-γλυκουρονιδίου της ρεσβερατρόλης (**33**)

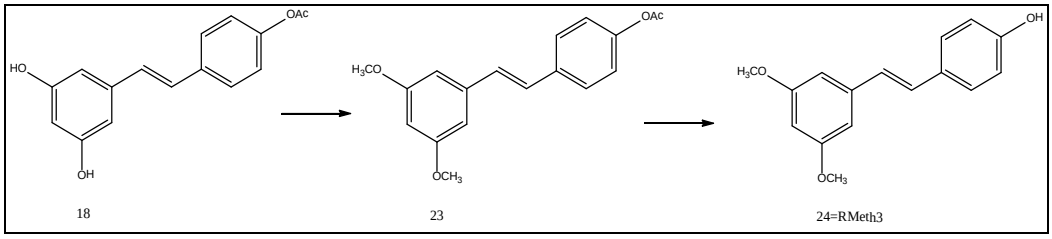
Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για την σύνθεση του παραγώγου **31** χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη 3,5-διακετυλορεσβερατρόλη (**20**) [305].

^{1}HNMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ (ppm) 9.24 (s, 2H), 7.50 (d, J=8.5 Hz, 2H), 7.04(d, J=8.5 Hz, 2H), 6.96(d, J=16 Hz, 1H), 6.90 (d, J=16 Hz, 1H), 6.46 (d, J=2Hz, 2H), 6.17 (s, 1H), 5.50 (s, 1H), 5.28 (s, 1H), 4.99 (d, J=7.5 Hz, 1H), 3.86 (d, J=9.5 Hz, 1H), 3.30-3.42 (m, 3H).

^{13}C NMR (50 MHz,DMSO-*d6*) δ (ppm) 171.4, 159.6, 158.9, 140.6, 133.4, 128.5, 128.3, 128.1, 118.0, 106.7, 103.5, 102.3, 77.8, 76.7, 75.1, 73.1.

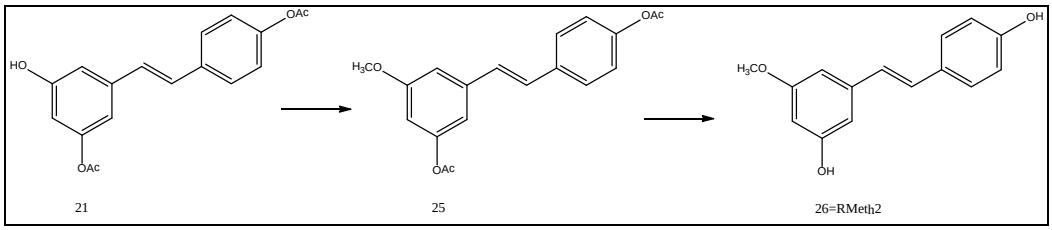
Σύνθεση μεθόξυ παραγώγων ρεσβερατρόλης

Η σύνθεση των μεθυλιωμένων παραγώγων της ρεσβερατρόλης **24**, **26**, **28** και **29** παρουσιάζεται στα **Σχήματα 9-12**.



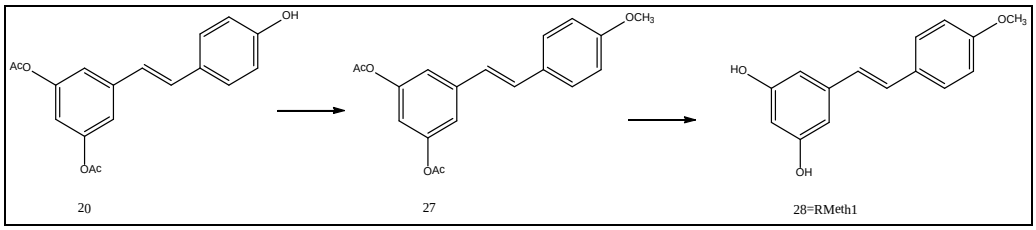
Σχήμα 9: ***Αντιδραστήρια και Συνθήκες:*** **a) Na_2CO_3, θειικό διμεθύλιο, χλωριούχο βενζυλοτριαιθυλαμμώνιο, ακετόνη; b) Na_2CO_3, MeOH/H_2O.**

Για την σύνθεση των παραγώγων **24**, **26** και **28** χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη ύλη το κατάλληλο μόνο- ή δι- ακετυλιωμένο παράγωγο από το οποίο παρασκευάστηκε το αντίστοιχο μόνο- ή δι- μεθυλιωμένο παράγωγο **23**, **25** και **27.** Τα τελικά παράγωγα παρασκευάστηκαν μετά από υδρόλυση της ακετόξυ ομάδας σε αλκαλικό περιβάλλον.



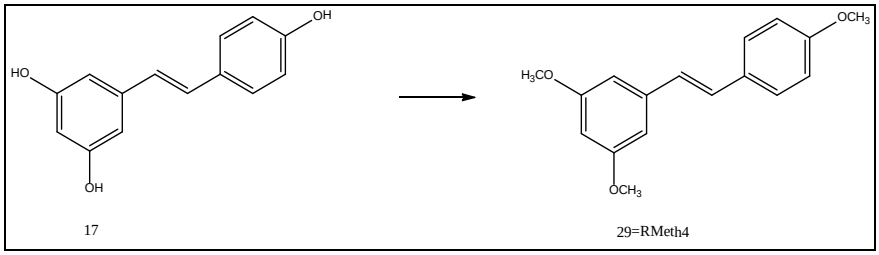
Σχήμα 10: ***Αντιδραστήρια και Συνθήκες:*** **a) Na_2CO_3, θειικό διμεθύλιο, χλωριούχο βενζυλοτριαιθυλαμμώνιο, ακετόνη; b) Na_2CO_3, MeOH/H_2O.**

Η αντίδραση της μεθυλίωσης πραγματοποιήθηκε, λόγω του κινδύνου υδρόλυσης του εστερικού δεσμού, σε ιδιαίτερα ήπιες συνθήκες.



Σχήμα 11: ***Αντιδραστήρια και Συνθήκες:*** **a) Na_2CO_3, θειικό διμεθύλιο, χλωριούχο βενζυλοτριαιθυλαμμώνιο, ακετόνη; b) Na_2CO_3, MeOH/H_2O.**

Η σύνθεση του τριμεθυλιωμένου παραγώγου **29** έγινε με επίδραση περίσσειας θειικού διμεθυλίου επί της ρεσβερατρόλης σε αλκαλικό περιβάλλον (**Σχήμα 12**)



Σχήμα 12: ***Αντιδραστήρια και Συνθήκες:*** **a) Na_2CO_3, θειικό διμεθύλιο, χλωριούχο βενζυλοτριαιθυλαμμώνιο, ακετόνη; b) Na_2CO_3, MeOH/H_2O.**

Σύνθεση της 3,5-διμεθοξυλο-ρεσβερατρόλης (**24**)

Σε σφαιρική που φέρει διάλυμα του ακετυλιωμένου παραγώγου **18** (78mg, 0,29mmol), σε άνυδρη ακετόνη (30L) προστίθεται Na_2CO_3 (60mg, 0,58mmol), θειικοδιμεθύλιο (55μL, 0,58mmol) και καταλυτική ποσότητα χλωριούχου βενζυλοτριαιθυλαμμωνίου (15mg) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται σε θερμοκρασία βρασμού για 48h. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το μίγμα συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση και εκχυλίζεται με διχλωρομεθάνιο/νερό. Η οργανική στιβάδα ξηραίνεται με Na_2SO_4, συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση και το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (silica gel, κυκλοεξάνιο-οξικός αιθυλεστέρας 6-1) λαμβάνοντας 54mg του παραγώγου **23** (63%).

^{1}HNMR (400 MHz, MeOD) δ (ppm) 7.48 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.11 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H), 7.00 – 6.93 (m, 2H), 6.91 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.87 (s, 1H), 6.57 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H), 3.82 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 2.29 (s, 3H).

Ακολούθως, σε διάλυμα του διμέθυλο παραγώγου **23** (51mg, 0,17mmol) σε μίγμα νερού/μεθανόλης (10mL/10mL) προστίθεται Na_2CO_3 (60mg, 0,58mmol) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 2h. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης η μεθανόλη συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση (Προσοχή: σε όλη τη διάρκεια της συμπύκνωσης η θερμοκρασία δεν θα πρέπει να υπερβεί τους 25°C) και το μίγμα εκχυλίζεται με διχλωρομεθάνιο/νερό. Η οργανική στιβάδα ξηραίνεται με Na_2SO_4, συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση και το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (silica gel, κυκλοεξάνιο-οξικός αιθυλεστέρας 4-1) λαμβάνοντας λαμβάνοντας 23mg του παραγώγου **24** (53 %), τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του οποίου συμφωνούν με αυτά της βιβλιογραφίας [306].

^{1}H NMR (400 MHz, acetone-d6) δ (ppm): 7.39 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.04 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H), 6.91 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H), 6.85 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.66 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H), 6.37 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H), 3.80 (s, 6H).

^{13}C NMR(50 MHz, acetone-d6) δ (ppm): 160.7, 156.4, 140.5, 129.8, 129.1, 127.5, 125.9, 115.8, 104.6, 99.4, 54.9.

Σύνθεση της 3- μεθόξυ-ρεσβερατρόλης (**26**)

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για την σύνθεση της 3,5-διμεθοξυλο-ρεσβερατρόλης(**24**) χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την 3,4’-διακετυλορεσβερατρόλη **21**.

Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της **25**

Απόδοση: 56%

^{1}HNMR (400 MHz, acetone-d6) δ (ppm) 7.54 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.21 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.07(d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 6.93 – 6.86 (m, 3H), 6.82 (s, 1H), 6.62 (s, 1H), 3.4 (s, 3H), 2.27 (s, 6H).

Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της **26**

Απόδοση:

^{1}H NMR (400 MHz, acetone-d6) δ (ppm): 8.42 (s, 1H), 8.26 (s, 1H), 7.40 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.02 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H), 6.93 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H), 6.85 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.65 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H), 6.32 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H), 3.82 (s, 6H).

^{13}C NMR (50 MHz, acetone-d6) δ (ppm): 162.3, 159.4, 157.4, 140.2, 129.3, 129.0, 128.6, 126.8, 116.2, 105.9, 104.2, 100.8, 54.6.

Σύνθεση της 4’- μεθόξυ-ρεσβερατρόλης (**28**)

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για την σύνθεση της 3,5-διμεθοξυλο-ρεσβερατρόλης (**24**) χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την 3,5-διακετυλορεσβερατρόλη (**20**).

Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της **27**

Απόδοση:

^{1}H NMR (400 MHz, Aceton) δ 7.62 (d, *J* = 8.6 Hz, 3H), 7.28 (d, *J* = 16.4 Hz, 2H), 7.18 (d, *J* = 16.4 Hz, 2H), 7.13 (d, *J* = 8.6 Hz, 3H), 7.04 (d, *J* = 1.3 Hz, 2H), 6.95 (s, 1H), 6.63 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H), 3.83 (s, 5H), 2.26 (s, 9H).

Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της **28**

Απόδοση:

^{1}HNMR (400 MHz, acetone-d6) δ (ppm) 7.47 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.08 (d, *J* = 16.3 Hz, 2H), 6.93 – 6.82 (m, 3H), 6.65 (d, *J* = 1.9 Hz, 2H), 6.33 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H), 3.79 (s, 3H).

^{13}C NMR (50 MHz, acetone-d6) δ (ppm) 160.1, 158.1, 141.23, 130.1, 129.2, 128.1, 127.0, 114.2, 105.8, 102.1, 55.8.

Σύνθεση της 3,4',5-τριμεθοξυλο-ρεσβερατρόλης (**29**)

Σε διάλυμα της ρεσβερατρόλης (228mg, 1mmol) σε άνυδρο DMF (10mL), στους 0°C, υπό ατμόσφαιρα αργού, προστίθεται NaH (160mg, 4 mmol, 60% σε έλαιο) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 10min. Στη συνέχεια ψύχεται στους 0°C και προστίθεται σε μία δόση θειικό διμεθύλιο (0,56mL, 6mmol) και στη συνέχεια αναδεύεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 1h. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης στο μίγμα προστίθεται λίγο μεθανόλη, αποχύνεται σε διαχωριστική χοάνη και εκχυλίζεται με διχλωρομεθάνιο. Η οργανική στιβάδα ξηραίνεται με Na_2SO_4, συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση και το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (silica gel, κυκλοεξάνιο-οξικός αιθυλεστέρας 5-1) λαμβάνοντας λαμβάνοντας 220mg του παραγώγου **29** (82%) [307].

^{1}HNMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.39 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.00 (d, *J* = 16.3 Hz, 1H), 6.84-6.92 (m, 3H), 6.56 (d, *J* = 2.1 Hz, 2H), 6.42 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H), 3.82 (s, 9H).

^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 160.2, 159.4, 140.2, 130.0, 129.2, 128.6, 127.5, 126.0, 114.1, 103.2, 100.3, 55.6.

5.3 Καλλιέργεια μονοκυττάρων U937

Όργανα - Αναλώσιμα

- Εξακριβωμένη σταθερή σειρά ανθρώπινων προμονοκυττάρων U937

- RPMI 1640 (Gibco BRL, Paisley, UK).
- Ορός νεογέννητου βοός, Newborn Calf Serum (NCS): Το διάλυμα χωρίζεται σε αποστειρωμένους σωλήνες και φυλάσσεται στους -20^{0}C. NCS: GIBCO 500mL 26010-074
- L- Γλουταμίνη (Sigma): η συσκευασία των 100mL χωρίζεται σε αποστειρωμένα eppendorf και φυλάσσεται στους -20^{0}C. L-Glutamine 200mM G7513
- Πενικιλίνη-Στρεπτομυκίνη (Sigma): η συσκευασία των 100mL χωρίζεται σε αποστειρωμένα eppendorf και φυλάσσεται στους -20^{0}C. Penicillin (5.000 μονάδες πενικιλίνη, 5 mg στρεπτομυκίνη) P4083
- Trypan blue Κυανό του τρυπανίου (Sigma) T8154
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS): Διαλύονται 0.71 gr Na_2HPO_4, 0,207gr $NaH_2PO_4.H_2O$, 9gr NaCl σε απεσταγμένο νερό, ρυθμίζεται το pH στο 7,4 και συμπληρώνεται ο όγκος στο 1L σε ογκομετρική φιάλη. Ακολουθεί αποστείρωση για 20min στους 121^{0}C.
- Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας ΘΥ: [Για 100mL θρεπτικού υλικού αναμιγνύονται: 88mL RPMI, 10mL NCS (10%), 1 ml L- Γλουταμίνη (1%) και 1mL Πενικιλίνη-Στρεπτομυκίνη (1%)]
- Διάλυμα IL-1β σε 0,1% BSA σε PBS
- Αμπούλες DMSO (Sigma)
- Διάλυμα συντήρησης των κυττάρων στο υγρό άζωτο: περιέχει διάλυμα NCS 20% (v/v) σε DMSO (10*10^6 κύτταρα αναλύονται σε 1350μL NCS και προστίθενται 450 NCS 20% DMSO)
- Διάλυμα αιθανόλης 70% (v/v)
- Δοχεία καλλιέργειας 75cm^2 και 25cm^2
- Αποστειρωμένα σιφώνια των 10mL
- Αποστειρωμένοι πλαστικοί σωλήνες των 15 και 50mL
- Αποστειρωμένες γυάλινες πιπέτες Pasteur
- Αυτόματες πιπέτες

- Κρυοφιαλίδια
- Αιμοτοκυττόμετρο
- Οπτικό μικροσκόπιο
- Δοχείο ισοπροπανόλης για σταδιακή μείωση της θερμοκρασίας
- Επωαστήρας κυττάρων: CO_2 cell, MMM group. Οι συνθήκες επώασης ήταν 37^oC θερμοκρασία και 5% παροχή CO_2.
- Απαγωγός κάθετης νηματικής ροής: Bio air, biohazard, aura B4
- Φυγόκεντρος: Eppendorf centrifuge 5810R

Αναλυτική πορεία

Η καλλιέργεια των U937 ξεκινούσε με απόψυξη stock καλλιέργειας, η οποία φυλασσόταν σε δοχείο υγρού αζώτου. Η απόψυξη των κυττάρων γινόταν με τοποθέτηση του κρυοφυαλιδίου που περιείχε τη stock καλλιέργεια κατευθείαν από το υγρό άζωτο σε υδατόλουτρο στους 37^{o}C. Αμέσως μετά την υγροποίηση του διαλύματος διασποράς των κυττάρων ακολουθούσε τοποθέτησή τους σε πλαστικό σωλήνα που περιείχε 20mL RPMI 1640. Στη συνέχεια ακολουθούσε φυγοκέντρηση στα 235g για 10min για να απομακρυνθεί το DMSO της stock καλλιέργειας και το οποίο σε αυτή την ποσότητα ήταν τοξικό για τα κύτταρα. Το υπερκείμενο αναρροφόταν με τη βοήθεια γυάλινης πιπέτας και αντλίας. Το ίζημα των κυττάρων αναδιασπειρόταν σε 10mL φρέσκο θρεπτικό υλικό και ακολουθούσε η μέτρηση του αριθμού τους στο αιμοτοκυττόμετρο. Για την μέτρηση, 40μL από το διάλυμα των κυττάρων αναμιγνύονταν με 40μL χρωστική κυανό του τρυπανίου και το διάλυμα που προέκυπτε μεταφερόταν στο αιμοτοκυττόμετρο για μέτρηση. Ανάλογα την συγκέντρωση που προέκυπτε προσθέτονταν κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού υλικού ώστε τα κύτταρα να αποκτήσουν συγκέντρωση 0,7x10^6 κύτταρα/mL.

Κάθε 2-3 μέρες γινόταν αλλαγή στο μέσο καλλιέργειας. Για το σκοπό αυτό τα κύτταρα μεταφέρονταν με σιφώνια από τα δοχεία καλλιέργειας σε αποστειρωμένους πλαστικούς σωλήνες. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση στα 235g για 10min. Το υπερκείμενο αναρροφόταν με τη βοήθεια γυάλινης πιπέτας και αντλίας. Τα κύτταρα αναδιασπείρονταν σε γνωστό όγκο θρεπτικού υλικού και γινόταν μέτρηση της

συγκέντρωσης των κυττάρων με αιμοτοκυττόμετρο, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Ανάλογα την συγκέντρωση που προέκυπτε προσθέτονταν κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού υλικού ώστε τα κύτταρα να αποκτήσουν συγκέντρωση $0,7x10^6$ κύτταρα/ mL. Το εναιώρημα μοιραζόταν σε δοχεία καλλιέργειας των $25cm^2$ ή των $75cm^2$ και παρέμενε στον επωαστικό θάλαμο μέχρι την επόμενη αλλαγή θρεπτικού υλικού.

Στην περίπτωση που ένα μέρος των κυττάρων έπρεπε να αποθηκευτεί ως stock καλλιέργεια, τότε τα κύτταρα τοποθετούνταν σε σωλήνα των 50mL και φυγοκεντρούνταν στα 235g για 10min. Αναρροφόταν το υπερκείμενο με βοήθεια γυάλινης πιπέτας και αντλίας. Το ίζημα των κυττάρων αναδιασπείρεται σε 1350μL NCS και 450μL διαλύματος 20% DMSO σε NCS. Το εναιώρημα τοποθετούνταν σε κρυοφιαλίδιο τα 1,8mL, το οποίο έμπαινε σε ειδικό δοχείο ισοπροπανόλης στους -80^{o}C για τουλάχιστον 4h και τέλος στο υγρό άζωτο για μακρόχρονη αποθήκευση.

Διέγερση κυττάρων

Πριν από κάθε πείραμα τα κύτταρα συγχρονίζονταν για 24h σε μέσο ελεύθερο ορού (SFM). Τα κύτταρα σε συγκέντρωση $1x10^6$ κύτταρα/mL και 2 mL ανά συνθήκη, επωάζονταν με ή χωρίς IL-1β (2,5ng/mL) με την παρουσία ή απουσία τυροσόλης(T) και ρεσβερατρόλης(R) (10-400μM) για 0,5 και 3h. Η συγκέντρωση ικανή να επάγει 50% αναστολή στη δράση της IL-1β υπολογίστηκε (δηλαδή IC_{50} τιμή όταν υπάρχει γραμμική συσχέτιση) με την παρουσία των T και R. Τα ακετυλιωμένα παράγωγα (AcDs), τα μεθόξυ παράγωγα (MethDs) και τα γλυκουρονιωμένα παράγωγα (GluDs) της T και R ελέγχθηκαν σε συγκεντρώσεις ίσες με τη συγκέντρωση των αρχικών φαινολικών ενώσεων που επάγουν 50% αναστολή στη δράση της IL-1β. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης, ακολουθούσε φυγοκέντρηση 500g στους 4^{o}C για 10min, το υπερκείμενο παραλαμβάνοταν και φυλάσσονταν στους -80^{o}C, ενώ το ίζημα των κυττάρων αναδιαλύονταν σε 1mL PBS, ακολουθούσε μία ακόμα φυγοκέντρηση και το ίζημα αναδιαλύονταν σε 1mL 50 mM Tris-HCl (pH 7.4). Από τα 1000μL του κυτταρικού εναιωρήματος, τα 30 μL χρησιμοποιούνταν για τον προσδιορισμό της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford, τα 360μL για τον προσδιορισμό του ενδοκυτταρικού PAF μετά την εκχύλιση του λιποειδικού εκχυλίσματος με τη μέθοδο Bligh-Dyer και το υπόλοιπο ομογενοποιούνταν με υπερήχους (4 φορές X 10s, 35% μέγιστης ισχύος με διαστήματα 1min). Το ομογενοποίημα φυγοκεντρούταν στα 500g για 10min στους 4^{o}C και τα υπερκείμενα ισομοιράζονταν και διατηρούνταν

στους -80^{o}C μέχρι την ημέρα που θα χρησιμοποιούνταν για τον προσδιορισμό της δραστικότητας των ενζύμων του PAF.

5.4 Διαχωρισμός PAF με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) [308]

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Οργανικοί διαλύτες χρωματογραφικής καθαρότητας (ακετονιτρίλιο, μεθανόλη)
- Νερό χρωματογραφικής καθαρότητας
- Πρότυπα λιποειδή από Supelco, Sigma
- Υγρός χρωματογράφος:Hewlett-Packard series 1100, με 100μL βρόγχο τοποθέτησης δείγματος
- Καταγραφέας-ολοκληρωτής Hewlett-Packard, HP-3396A
- Μικροσύριγγες ακριβείας 250 και 50μL
- Στήλη κατιονανταλλαγής Whatman Analytical Column PARTISIL 10 SCX 4,6mm x250mm

Αναλυτική πορεία

Η στήλη, πριν χρησιμοποιηθεί, εκπλυνόταν με κατάλληλους διαλύτες (μεθανόλη, ακετονιτρίλιο) και ακολουθούσε η σταθεροποίησή της με το σύστημα έκλουσης και στη συνέχεια η τοποθέτηση του δείγματος (εκχύλισμα λιποειδών από κύτταρα ή μέσο επώασης), το οποίο ήταν διαλυμένο σε μικρό όγκο (100μL) του κατάλληλου διαλύτη.

Η έκλουση του PAF γινόταν με σταθερή σύσταση διαλυτών. Το σύστημα έκλουσης ήταν μεθανόλη: ακετονιτρίλιο: νερό (42:50:8, v/v/v) Η έκλουση των διαχωρισμένων ουσιών ελέγχονταν με τη μεταβολή της οπτικής απορρόφησης στο κατάλληλο μήκος κύματος (208nm) και η παραλαβή τους γινόταν σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Η ποσότητα του PAF στα δείγματα δεν ήταν αρκετή για να δώσει σήμα απορρόφησης, η παραλαβή της περιοχής έκλουσης του γινόταν βάση του χρόνου ανάσχεσης. Ο χρόνος ανάσχεσης υπολογιζόταν βάση του χρόνου έκλουσης της σφιγγομυελίνης και της lyso-PC και παραλαμβανόταν η περιοχή μεταξύ αυτών των

δύο κορυφών ως κλάσμα Β (το κλάσμα του PAF), ταυτόχρονα παραλαμβάνονταν οι περιοχές πριν και μετά το κλάσμα Β, τα κλάσματα Α και Γ. Για να βρεθεί η περιοχή έκλουσης, καθημερινά, πριν τον διαχωρισμό των δειγμάτων, γινόταν έκλουση από την στήλη πρότυπου διαλύματος φωσφολιποειδών. Η ποσοτικοποίηση του PAF γινόταν με βιολογική δοκιμασία συσσώρευσης αιμοπεταλίων κουνελιού, διαδικασία που περιγράφεται παρακάτω μέθοδος **5.5.**

5.5 Ποσοτικός προσδιορισμός PAF με βιολογική δοκιμασία συσσώρευσης πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού [309]

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Φυσιολογικός ορός (NaCl 0,1%) ελεύθερος πυρετογόνων.
- Διάλυμα φύλαξης (stock) 10x Tyrodes : Σε 1L απεσταγμένο νερό διαλύονται 80g NaCl, 1,95g $MgCl_2.6H_2O$ και 10g γλυκόζης.
- Διάλυμα φύλαξης 100x $CaCl_2$: Σε 100mL νερού διαλύονται 1,911g $CaCl_2$.
- Διάλυμα φύλαξης EGTA 0,2M: Ποσότητα 0,76g EGTA διαλύεται σε 10mL νερό. Ρυθμίζεται το pH του διαλύματος στο 7,5 με NaOH 5M.
- Υδατικό διάλυμα ζελατίνης 10% (w/v).
- Διαλύματα Tyrodes με ζελατίνη pH = 6,5 (Tg pH = 6,5), και Tyrodes με ζελατίνη και EGTA pH=6,5 (Tg EGTA pH = 6,5): Σε 80mL νερό προσθέτονται 10mL από το αντιδραστήριο φύλαξης Tyrodes 10x. Υπό συνεχή ανάδευση με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα, προστίθενται 2,5mL υδατικού διαλύματος ζελατίνης 10% (w/v) που έχει υποστεί τήξη στο σημείο βρασμού. Ακολούθως, διαλύονται 0,2030g $NaHCO_3$ σε 10mL νερό και από το διάλυμα αυτό προστίθενται 5mL αμέσως μετά την παρασκευή του. Συμπληρώνεται ο όγκος στα 100mL με νερό και χωρίζεται σε δύο τμήματα των 50mL. Στο ένα από τα δύο προσθέτονται 25μL EGTA 0,2M και ρυθμίζεται το pH και των δύο κλασμάτων στο 6,46 με HCl 1N. Αμέσως γεμίζονται γυάλινοι σωλήνες των 20mL και κλείνονται με απομονωτική ταινία στερεής παραφίνης (parafilm), αποφεύγοντας τον εγκλεισμό φυσαλίδων αέρα. Τα διαλύματα φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου.

- Διάλυμα Tyrodes με ασβέστιο pH=7,2 (Tg-Ca pH=7,2): Σε 40mL νερό προστίθενται 5 mL διαλύματος φύλαξης tyrodes 10x. Υπό συνεχή ανάδευση με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα προστίθενται 1,25mL υδατικού διαλύματος ζελατίνης 10% (w/v). Στη συνέχεια προστίθενται 0,5mL διαλύματος φύλαξης $CaCl_2$ 100x και αμέσως μετά 2,5 mL διαλύματος $NaHCO_3$ που παρασκευάζεται εκείνη τη στιγμή διαλύοντας 0,2030g $NaHCO_3$ σε 10mL νερό. Συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τα 50mL με νερό και ρυθμίζεται το pH στο 7,16 με HCl 1N. Διατηρείται στους 37^oC σε ερμητικά κλειστούς σωλήνες με απομονωτική ταινία στερεής παραφίνης (parafilm).

- Αντιπηκτικό διάλυμα κιτρικών με γλυκόζη (ACD): Σε 1000mL νερού διαλύονται 13,65g κιτρικού οξέος, 25g κιτρικού νατρίου και 20g δεξτρόζης.

- Διάλυμα φύλαξης βοείας αλβουμίνης ορού (BSA) 100mg/mL: Ποσότητα 100mg BSA (Sigma) ελεύθερης λιπαρών οξέων διαλύεται σε 1mL φυσιολογικού ορού ελεύθερου πυρετογόνων. Φυλάσσεται στους -20^oC.

- Διάλυμα εργασίας βόειας αλβουμίνης ορού (BSA) 2,5mg/mL: Από 10mL φυσιολογικού ορού ελεύθερου πυρετογόνων αφαιρούνται 250μL και προστίθενται 250μL διαλύματος φύλαξης BSA.

- Ficoll-Paque (Pharmacia).

- Πλαστικοί σωλήνες των 50mL.

- Πλαστικά σιφώνια των 20mL.

- Συσσωρευματόμετρο, Chrono-log.

- Πεχάμετρο WTW inolab 720

- Φωτόμετρο

- Θερμοστατούμενο υδατόλουτρο στους 37^oC.

- Φυγόκεντρος: Eppendorf centrifuge 5810R

- Διάλυμα φύλαξης PAF συγκέντρωσης 10^{-7}M μετά την αναδιάλυση σε 500μL διάλυμα εργασίας BSA

Αναλυτική πορεία

Α) Απομόνωση πλυμένων αιμοπεταλίων από αίμα κουνελιού

Σε πλαστικούς σωλήνες των 50mL προστίθενται 7mL αντιπηκτικού ACD. Το αίμα συλλέγεται από την κεντρική αρτηρία του αυτιού του κουνελιού. Ο σωλήνας γεμίζεται με αίμα μέχρι τα 50mL και αναμιγνύεται ήπια με αναστροφή. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 13min στους 24^{o}C στα 500g. Κατά την διάρκεια της φυγοκέντρησης μεταφέρουμε 2 mL Ficoll-Paque σε πλαστικούς σωλήνες των 14mL. Αναρροφώνται τα 2/3 του υπερκείμενου πλάσματος που είναι πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP, Platelet Rich Plasma) με πλαστικό σιφώνιο των 20mL και μεταφέρονται σε άλλο πλαστικό σωλήνα των 50mL. Το πλάσμα το πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP), τοποθετείται πάνω στο στρώμα του Ficoll, με μέγιστο ποσοστό PRP τα 9mL για κάθε 2mL Ficoll, χρησιμοποιώντας πλαστικά σιφώνια. Μεταφέρονται ίσοι όγκοι PRP σε 2 ή 3 σωλήνες ανάλογα με το συνολικό όγκο του πλάσματος. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 21min στους 24^{o}C στα 750g. Μετά την φυγοκέντρηση τα αιμοπετάλια εμφανίζονται σαν ταινία μεταξύ της στιβάδας του υπερκείμενου πλάσματος του φτωχού σε αιμοπετάλια (PPP, Platelet Poor Plasma) και του στρώματος του Ficoll. Το PPP αναρροφάται και απορρίπτεται με πλαστικό σιφώνιο των 20mL. Το στρώμα των αιμοπεταλίων διαπερνάται με πλαστικό tip, αναρροφάται το Ficoll και απορρίπτεται. Προσθέτουμε 4 mL Tg EGTA pH = 6,5 σε κάθε σωλήνα και αναδεύουμε ήπια. Το διάλυμα αφήνεται να τρέξει ήπια στα τοιχώματα του σωλήνα και χωρίς ανάμιξη αποχύνεται το αιώρημα σε άλλο πλαστικό σωλήνα των 14mL, αφήνοντας έτσι τα ερυθρά αιμοσφαίρια στον αρχικό σωλήνα. Το περιεχόμενο του κάθε σωλήνα μεταφέρεται σε 2mL Ficoll και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15min στους 24^{o}C στα 750 g. Το υπερκείμενο ρυθμιστικό διάλυμα απορροφάται και απορρίπτεται με σιφώνιο των 20mL. Διαπερνάται το στρώμα αιμοπεταλίων με πλαστικό tip, αναρροφάται το Ficoll και απορρίπτεται. Στη συνέχεια προστίθονται περίπου 8mL διαλύματος Tg pH=6,5 σε κάθε σωλήνα αφήνοντας το διάλυμα να τρέξει στα τοιχώματα του σωλήνα και χωρίς ανάμιξη μεταφέρεται το εναιώρημα σε καθαρό πλαστικό σωλήνα των 14mL. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15min στους 24^{o}C στα 750g. Το υπερκείμενο ρυθμιστικό διάλυμα απορροφάται και απορρίπτεται μέχρι και την τελευταία σταγόνα. Ακολούθως προστίθενται 0,8mL Tg pH=6,5 σε κάθε συσσωμάτωμα αιμοπεταλίων αναδιασπείροντας τα κύτταρα με ήπιο τρόπο. Το περιεχόμενο των σωλήνων ενώνεται σε πλαστικό σωλήνα.

Ετοιμάζεται εναιώρημα αιμοπεταλίων σε Tg pH=6,5 που να περιέχει $1,25x10^8$ κύτταρα/mL. Από το πυκνό διάλυμα αιμοπεταλίων λαμβάνονται 10μL τα οποία αραιώνονται με 990μL Tg pH=6,5 και το διάλυμα φωτομετρείται στα 530nm. Ο αριθμός των κυττάρων στα 10 μL δίνεται από τον τύπο: κύτταρα/10μL = A x $1,25x10^8$ όπου A είναι η απορρόφηση. Με βάση πρότυπη καμπύλη της οπτικής απορρόφησης συναρτήσει του αριθμού αιμοπεταλίων υπολογίζεται ο αριθμός αιμοπεταλίων και ετοιμάζεται το επιθυμητό εναιώρημα αιμοπεταλίων.

Β) Ποσοτικός προσδιορισμός PAF με συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού

Σε γυάλινες κυψελίδες συσσωρευματομέτρου των 0,5mL προστίθενται 50μL από το εναιώρημα αιμοπεταλίων που περιέχει $1.25x10^8$ κύτταρα/mL και 200μL διαλύματος Tg-Ca pH=7.2 καθώς και μικρός μαγνητικός αναδευτήρας που περιστρέφεται με 1200 στροφές το λεπτό (rpm, rounds per min). Ακολουθεί επώαση για 30min σε θερμοστατούμενο υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37^oC. Στην συνέχεια η κυψελίδα με το εναιώρημα των αιμοπεταλίων τοποθετείται στην ειδική θερμοστατούμενη κυψελίδα του συσσωρευματομέτρου και προστίθενται BSA εργασίας και PAF ή δείγμα το οποίο είναι διαλυτοποιημένο σε BSA 2,5mg/mL με τελικό όγκο 80μL. Τέλος καταγράφεται η καμπύλη συσσώρευσης, ως αύξηση της διαπερατότητας. Η αύξηση της διαπερατότητας στηρίζεται στο γεγονός ότι κατά την συσσώρευση των αιμοπεταλίων διαυγάζεται το περιεχόμενο της κυψελίδας μέσα από την οποία διέρχεται η δέσμη ακτινοβολίας. Το ύψος και η μορφή της καμπύλης είναι ανάλογα με την συσσώρευση, το δε φαινόμενο της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων εξαρτάται από τη συγκέντρωση του συσσωρευτικού παράγοντα.

Με βάση γνωστής συγκέντρωσης διαλύματα συνθετικού PAF σχεδιάζεται η καμπύλη της επί τοις εκατό συσσώρευσης συναρτήσει της συγκέντρωσης του PAF. Ως 100% συσσώρευση ορίζεται η μέγιστη αντιστρεπτή συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Βάση της πρότυπης αυτής καμπύλης και το ύψος της καμπύλης συσσώρευσης που προκαλεί το εξεταζόμενο δείγμα, γίνεται ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του δείγματος, ως συγκέντρωση ανάλογη της συγκέντρωσης του PAF στην κυψελίδα του συσσωρευματομέτρου (τελική συγκέντρωση) που έχει την ίδια βιολογική δραστικότητα. Εξετάζεται επίσης, αν η μορφή της καμπύλης συσσώρευσης που δίνει το δείγμα μοιάζει με εκείνη της καμπύλης συσσώρευσης του PAF (γρήγορη

συσσώρευση με αντιστρεπτή μορφή σε μικρές συγκεντρώσεις και μη αντιστρεπτή σε μεγάλες συγκεντρώσεις).

5.6 Προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford [310]

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Διάλυμα stock αλβουμίνης βοδινού ορού (BSA) 100μg/mL
- Διάλυμα εργασίας BSA 25μg/mL: 375μL από το stock αναμιγνύονται με 1125μL νερό
- Αντιδραστήριο Bradford stock: Σε 50mL μεθανόλης διαλύονται 100mg Commasie G250 Brilliant Blue G (Fluka 27815), στη συνέχεια προστίθονται σε 100mL διαλύματος 85% φωσφορικού οξέος και αραιώνονται μέχρι τα 200mL με νερό. Φυλάσσεται σε σκουρόχρωμη φιάλη στους 4^{o}C
- Αντιδραστήριο Bradford εργασίας: αραίωση 1 στα 5
- Απεσταγμένο νερό
- Πλαστικοί δοκιμαστικοί σωλήνες των 10 mL μιας χρήσης
- Plate 96 well
- Κυκλοαναδευτήρας (vortex)
- Καυστικό νάτριο 0,5N
- Φωτόμετρο

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος Bradford περιλαμβάνει την τοποθέτηση της όξινης χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G στο διάλυμα των πρωτεϊνών. Η χρωστική συμπλέκεται με τα βασικά και αρωματικά αμινοξέα των πρωτεϊνών προκαλώντας αύξηση της απορρόφησης από τα 465nm στα 595nm σε μπλε χρώμα. Το σύμπλοκο της πρωτεΐνης –χρωστικής σταθεροποιείται σε 5min και μένει σταθερό για 45min. Η απορρόφηση είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης.

Αναλυτική πορεία

Παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα BSA των οποίων οι συγκεντρώσεις κυμαίνονται από 0,125-2μg. Από το ομογενοποίημα των κυττάρων δοκιμάζονταν συνήθως 5μL, ενώ από το ίζημα κυττάρων 20μL μετά το πέρας της 1h σε NaOH 0,5N. Παρασκευάζεται διάλυμα του άγνωστου δείγματος σε νερό ώστε η τελική του συγκέντρωση να βρίσκεται στην περιοχή από 0,125-2μg. Τα διαλύματα των προτύπων και των αγνώστων δειγμάτων πρέπει να έχουν τελικό όγκο 0,25mL. Προστίθεται 0,05mL αντιδραστηρίου Bradford. Προσδιορίζεται η απορρόφηση των προτύπων και των δειγμάτων μετά από 5min. Το σύμπλοκο πρωτεΐνης χρωστικής είναι σταθερό για 60min. Ο υπολογισμός της περιεκτικότητας του δείγματος σε πρωτεΐνη γίνεται με βάση την πρότυπη καμπύλη αναφοράς και εκφράζεται σε mg BSA.

Για τον προσδιορισμό της κυτταρικής πρωτεΐνης σε 30μL ποσότητα εναιωρήματος κυττάρων προστίθονταν 30μL NaOH (0,5N) και ακολουθούσε παραμονή για μια ώρα για να σπάσουν οι μεμβράνες. Στο μίγμα αυτό γινόταν ο προσδιορισμός πρωτεΐνης. Αντίθετα, ο προσδιορισμός της πρωτεΐνης στο ομογενοποίημα των κυττάρων γινόταν χωρίς καμία προεργασία.

5.7 Προσδιορισμός δραστικότητας lyso-PAF:ακετυλο-CoA ακετυλοτρανσφεράσης (λυσο PAF-AT) σε ομογενοποίημα κυττάρων [311]

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Οργανικοί διαλύτες αναλυτικής καθαρότητας (χλωροφόρμιο, μεθανόλη, ακετόνη, οξικό οξύ)
- Πιπέτες 1-10, 10-100, 100-1000μL
- Φυγόκεντρος
- Ανακινούμενο υδατόλουτρο
- Σωλήνες πολυπροπυλενίου
- Tips κίτρινα, μπλε

- Διάλυμα φύλαξης (stock) λυσο-PAF (Sigma L5016): Διαλύονται 10mg λυσο-PAF σε 4mL EtOH, το M.B.=481.7 έτσι προκύπτει δ/μα συγκέντρωσης 5,19mM. Το διάλυμα φυλάσσεται σε βιδωτό σωλήνα στους -20 ^{o}C.

- Διάλυμα ακετυλο-CoA (Sigma A2056 93% καθαρότητας) 20mM σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (50mM-pH 7.4): Διαλύονται 5mg σε 287μL ρυθμιστικού διαλύματος

- Διάλυμα BSA 10mg/mL: Διαλύονται 100mg BSA ελεύθερης λιπαρών οξέων (Sigma) σε 10mL ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl (50mM-pH 7.4)

- Διάλυμα λυσο-PAF σε BSA (10mg/mL) συγκέντρωσης 800μM (διάλυμα εργασίας): ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων που θα μετρηθούν φέρονται τα μL λυσο-PAF stock διαλύματος σωλήνα πολυπροπυλενίου, εξατμίζεται ο διαλύτης σε ρεύμα αζώτου και το ίζημα αναδιαλύεται σε ανάλογη ποσότητα BSA 10 mg/mL για να προκύψει το δ/μα εργασίας 800μM. Παρασκευάζεται καινούριο διάλυμα κάθε φορά. Προσθήκη 5μL από το διάλυμα αυτό στον ενζυμικό προσδιορισμό δίνουν τελική συγκέντρωση λυσο-PAF 20μM και τελική συγκέντρωση BSA 0,25mg/mL.

- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (50mM-pH 7,4): Διαλύονται 0,605g Tris σε νερό, ρυθμίζεται το pH με HCl 1M στο 7,4 και αραιώνεται το διάλυμα στα 100mL νερό.

- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 50mM με $CaCl_2$ 2,8mM-pH 7,4: Διαλύονται 0,605g Tris και 0,322 $CaCl_2$ σε νερό, ρυθμίζεται το pH με HCl 1M στο 7,4 και αραιώνεται το διάλυμα στα 100mL νερό.

Αρχή μεθόδου

Ο προσδιορισμός της δραστικότητας της λυσο PAF-AT βασίζεται στη μέτρηση του παραγόμενου PAF μετά την επώαση του ενζυμικού παρασκευάσματος με λυσο-PAF και ακετυλο-CoA, παρουσία BSA. Ο παραγόμενος PAF εκχυλίζεται από το μίγμα της αντίδρασης με όξινη εκχύλιση Bligh-Dyer, διαχωρίζεται από τα υπόλοιπα συστατικά με TLC και προσδιορίζεται με βιολογική δοκιμασία συσσώρευσης πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού.

Αναλυτική πορεία

Σε σωλήνα πολυπροπυλενίου φέρονται το ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl με $CaCl_2$, 5μL διαλύματος εργασίας λυσο-PAF (τελική συγκέντρωση 20μM), 2μL διαλύματος ακετυλο-CoA (τελική συγκέντρωση 200μM) και το ομογενοποίημα κυττάρων. Επειδή η προστιθέμενη ποσότητα του ενζυμικού παρασκευάσματος /ομογενοποίημα κυττάρων, το οποίο είναι διαλυμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl, μπορεί να κυμαίνεται από 10-50μL που θα πρέπει να αντιστοιχεί σε 10μg πρωτεΐνης, προστίθεται κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος ώστε όλοι οι προσδιορισμοί να περιέχουν 50μL ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl. Ο τελικός όγκος του μίγματος επώασης είναι 200μL. Γίνεται προεπώαση για 5min στους 37^oC. Η αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη του ενζυμικού παρασκευάσματος, η επώαση γίνεται σε θερμοστατούμενο υδατόλουτρο υπό ανάδευση στους 37^oC για 10min. Μετά το τέλος της αντίδρασης προστίθενται 300μL παγωμένου H_2O και 1111μL μίγματος $CHCl_3$/MeOH (2% AcOH). Το μίγμα αναδεύεται έντονα και φυγοκεντρείται στις 1200rpm για 10min ώστε να διαχωριστούν οι δύο φάσεις, παραλαμβάνεται η χλωροφορμική φάση. Ξεπλένεται η υδατική φάση με 0,5mL χλωροφόρμιο, ακολουθεί φυγοκέντρηση και οι ενωμένες χλωροφορμικές φάσεις φυλάσσονται στους -20^oC μέχρι τον διαχωρισμό τους με TLC.

Ο διαχωρισμός του παραγόμενου PAF από τα άλλα συστατικά του ενζυμικού μίγματος γίνεται με TLC. Συγκεκριμένα, η χλωροφορμική φάση εξατμίζεται μέχρι ξηρού, αναδιαλύεται σε 100μL και φέρεται σε πλάκα TLC επιστρωμένη με Silica gel G. Η πλάκα αναπτύσσεται σε προεξισορροπημένο θάλαμο με σύστημα ανάπτυξης C:M:AcOH:W (100:57:16:8, v/v/v/v). Μετά το τέλος της ανάπτυξης, εξατμίζεται ο διαλύτης και εμφανίζεται η πλάκα σε ατμούς I_2. Εντοπίζεται η περιοχή του PAF (μεταξύ Sm και lyso-PC) και ξύνεται με γυάλινη αντικειμενοφόρο πλάκα. Ακολουθεί παραλαβή του PAF από το ξύσμα και ποσοτικός προσδιορισμός του PAF με βιολογική δοκιμασία συσσώρευσης πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού, όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο **5.5**. Η ειδική δραστικότητα του ενζύμου προσδιορίζεται διαιρώντας την ποσότητα του PAF με τον χρόνο επώασης και την ποσότητα πρωτεΐνης του ενζυμικού παρασκευάσματος όπως προσδιορίζεται με την μέθοδο Bradford κεφάλαιο **5.6**, δηλαδή pmol/min/mg.

5.8 Προσδιορισμός δραστικότητας της ανεξάρτητης DTT-αλκυλοακετυλογλυκερολη:CDP-χολίνη φωσφοχολινοτρανσφεράσης (PAF-CPT) σε ομογενοποίημα κυττάρων [30]

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Οργανικοί διαλύτες αναλυτικής καθαρότητας (χλωροφόρμιο, μεθανόλη, ακετόνη, οξικό οξύ)
- Πιπέτες 1-10, 10-100, 100-1000μL
- Φυγόκεντρος
- Ανακινούμενο υδατόλουτρο
- Σωλήνες πολυπροπυλενίου
- Tips κίτρινα, μπλε
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (100mM-pH 8,0)/EDTA 0,5mM/MgCl2 10mM/DTT 15mM : Διαλύονται 1,2114g Tris, 0,2033g MgCl2, 0,0146g EDTA και 0,2313g DTT σε απεσταγμένο νερό και ρυθμίζεται το pH με HCl 1M στο 8,0. Αραιώνεται το διάλυμα στα 100mL νερό.
- Διάλυμα AAG 10mM : Διαλύονται τα 5mg του φιαλιδίου(EI-150-005 ENZO) καθαρότητας 95% σε 1325μL EtOH. Το διάλυμα φυλάσσεται σε βιδωτό σωλήνα στους -20^{o}C.
- Διάλυμα φύλαξης (stock) CDP-Choline 100mM: Διαλύονται τα 100mg του Sigma C0256 καθαρότητας 99% σε 2032μL απεσταγμένου νερού. Το διάλυμα ισομοιράζεται σε eppendorfs ανά 100μL και φυλάσσεται στους -20^{0}C.
- Διάλυμα εργασίας (working) CDP-Choline 4mM
- Διάλυμα BSA 40mg/mL : Διαλύονται 200mg BSA ελεύθερης λιπαρών οξέων (Sigma) σε 5mL ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl 50mM

Αρχή μεθόδου

Ο προσδιορισμός της δραστικότητας της PAF-CPT βασίζεται στη μέτρηση του παραγόμενου PAF μετά την επώαση του ενζυμικού παρασκευάσματος με CDP-χολίνη και AAG παρουσία BSA. Ο παραγόμενος PAF εκχυλίζεται από το μίγμα της

αντίδρασης με όξινη εκχύλιση Bligh-Dyer, διαχωρίζεται από τα υπόλοιπα συστατικά με TLC και προσδιορίζεται με βιολογική δοκιμασία συσσώρευσης πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού.

Αναλυτική πορεία

Σε σωλήνα πολυπροπυλενίου φέρονται το ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (100mM-pH 8,0, 5μL διαλύματος CDP-choline 4mM (τελική συγκέντρωση 100μM), 5μL διαλύματος BSA 40mg/mL (τελική συγκέντρωσης 1mg/mL) και ομογενοποίημα κυττάρων. Επειδή η προστιθέμενη ποσότητα του ενζυμικού παρασκευάσματος, το οποίο είναι διαλυμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (50 mM-pH 7,4), μπορεί να κυμαίνεται από 10-50μL που θα πρέπει να αντιστοιχεί σε 5μg, προστίθεται κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος έτσι ώστε όλοι οι προσδιορισμοί να περιέχουν 50μL ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl (50mM-pH 7.4). Ο τελικός όγκος του μίγματος επώασης είναι 200μL. Γίνεται προεπώαση για 5min στους 37^{o}C, η αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη του ενζυμικού παρασκευάσματος και μετά από 30s προστίθενται 2μL διαλύματος AAG 10mM διαλυμένο σε DMSO (τελική συγκέντρωση 100μM). Η επώαση της αντίδρασης γίνεται σε θερμοστατούμενο υδατόλουτρο υπό ανάδευση στους 37^{o}C για 5min. Ο προσδιορισμός του παραγόμενου PAF και της ενζυμικής δραστικότητας γίνεται όπως περιγράφεται στη μέθοδο **5.7.**

5.9 Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (TLC) λιποειδών

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Οργανικοί διαλύτες αναλυτικής καθαρότητας (χλωροφόρμιο, μεθανόλη, ακετόνη, οξικό οξύ)
- Υάλινοι θάλαμοι χρωματογραφίας
- Θάλαμος ιωδίου
- Υάλινες πλάκες 20X20cm
- Προσροφητικό υλικό: πηκτή SiO_2 (Silica gel G 60)

- Συσκευή Desaga για την επίστρωση των πλακών
- Πρότυπο διάλυμα φωσφολιποειδών διαλυμένο σε C:M 1:1
- Φυγόκεντρος: Eppendorf centrifuge 5810R
- Γυάλινες πιπέτες Pasteur

Αναλυτική πορεία

Α) Επίστρωση και ενεργοποίηση των πλακών.

Παρασκευάζεται εναιώρημα πυριτικού οξέος σε νερό, με ανάμειξη των συστατικών. Σε 60g Silica gel G προσθέτουμε 120mL νερού και ακολουθεί έντονη ανάδευση για 2min. Στη συνέχεια, το εναιώρημα επιστρώνεται γρήγορα και ομοιόμορφα στις πλάκες με τη συσκευή Desaga, με πάχος επίστρωσης 0,5mm. Οι πλάκες φυλάσσονται σε ξηραντήρα και λίγο πριν την χρησιμοποίηση τους ενεργοποιούνται με αφαίρεση της υγρασίας που περιέχει η πυριτική πηκτή. Για το σκοπό αυτό, τοποθετούνται σε θερμοστατούμενο κλίβανο υπό σταθερή θερμοκρασία 110^{o}C για 1h.

Β) Προετοιμασία θαλάμων ανάπτυξης και ανάπτυξη χρωματογραφήματος.

Προετοιμάζεται ο θάλαμος χρωματογραφίας με σύστημα ανάπτυξης $CHCl_3$/CH_3OH/AcOH/H_2O 100:57:16:8 v:v:v:v. Ο θάλαμος καλύπτεται εσωτερικά με διηθητικό χαρτί και αφήνεται να κορεσθεί για τουλάχιστον 1h. Το δείγμα ή οι πρότυπες ουσίες διαλυμένες σε μικρό όγκο (100μL) κατάλληλου κάθε φορά διαλύτη, τοποθετούνται στις πλάκες (σε ύψος 3cm), οι οποίες έχουν χωριστεί σε παράλληλες κάθετες λωρίδες και μετά την εξάτμιση του διαλύτη αναπτύσσονται (μέχρι ύψος 15cm), σε προκορεσμένο θάλαμο με το κατάλληλο σύστημα ανάπτυξης. Όταν ολοκληρωθεί η ανάπτυξη, οι πλάκες αφήνονται να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου στον απαγωγό.

Γ) Εμφάνιση χρωματογραφήματος.

Οι πλάκες εισάγονται σε γυάλινο κλειστό θάλαμο που περιέχει στο πυθμένα του κρυστάλλους ιωδίου, οι ατμοί του οποίου προσδίδουν στις διαχωριζόμενες ουσίες φαιά απόχρωση σε ανοιχτοκίτρινη επιφάνεια.

Δ) Συλλογή περιοχών του χρωματογραφήματος.

Αφού καθοριστούν οι περιοχές όπου βρίσκονται τα διάφορα είδη πολικών λιποειδών, αυτές ξύνονται και το ξύσμα συλλέγεται σε γυάλινους σωλήνες. Στους σωλήνες προστίθενται 2mL μίγματος $CH_3CI:CH_3OH:H_2O$ (1:2:0.8 v/v/v). Το εναιώρημα αφού αφεθεί για 10 min στον πάγκο για την εκχύλιση των λιποειδών, φυγοκεντρείται στις 1500 rpm για 10 min και παραλαμβάνεται το υπερκείμενο με γυάλινη πιπέτα pasteur. Ακολουθεί η ίδια διαδικασία με άλλα 2mL μίγματος $CH_3CI:CH_3OH:H_2O$ (1:2:0.8 v/v/v). Στα ενωμένα υπερκείμενα προστίθονται 1mL C και 1mL W ώστε το σύστημα να γίνει διφασικό και παραλαμβάνεται η κάτω χλωροφορμική φάση. Η υδατική φάση εκπλένεται με 0,5mL C και οι ενωμένες χλωροφορμικές φάσεις φυλάσσονται στους -20^oC για περαιτέρω ανάλυση.

5.10 Προσδιορισμός δραστικότητας της PAF-ακετυλοϋδρολάσης (PAF-AH) σε ομογενοποίημα κυττάρων [312]

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Πιπέτες 1-10, 10-100, 100-1000μL
- Φυγόκεντρος eppendorf
- Vortex
- Υδατόλουτρο
- Πλαστικά φιαλίδια μιας χρήσης (vials) όγκου 20mL
- Μετρητής σπινθηρισμού υγρών Wallac 1209 Racbeta, Pharmacia, συνδεδεμένος με καταγραφέα Facit B3100
- Σωλήνες eppendorf
- Tips κίτρινα, μπλε

- Διοξάνη

- Υγρό σπινθηρισμού Dioxane base : Το διάλυμα παρασκευάζεται διαλύοντας 7g PPO, 0,3g POPOP και 100g ναφθαλινίου σε 1 L διοξάνης και 200 mL νερό.

- Διάλυμα φύλαξης (stock) PAF 10^{-4} M

- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (100mM-pH 7.2) με 1 mM EGTA : Διαλύονται 1,21 Tris και 38,035mg EGTA σε νερό, ρυθμίζεται το pH με HCl 1M στο 7,2 και αραιώνεται το διάλυμα στα 100mL νερό.

- Διάλυμα BSA 100mg/mL : Διαλύονται 500mg BSA ελεύθερης λιπαρών οξέων (Sigma) σε 5mL ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl (100mM-pH 7,2). Το διάλυμα φυλάσσεται στο ψυγείο.

- Διάλυμα BSA 10mg/mL : Το διάλυμα BSA 100mg/mL αραιώνεται 1/10 με Tris Tris-HCl (100mM-pH 7,2). Το διάλυμα φυλάσσεται στο ψυγείο.

- Διάλυμα PAF/PAF ραδιενεργό σε BSA (10mg/mL) συγκέντρωσης 800μM και ειδικής δραστικότητας 4.000cpm/μL (διάλυμα εργασίας): Φέρεται κατάλληλη ποσότητα διαλύματος PAF 15,11mM καθώς και ραδιενεργού PAF σε βιδωτό σωλήνα, εξατμίζεται ο διαλύτης σε ρεύμα αζώτου και το ίζημα αναδιαλύεται σε κατάλληλη ποσότητα διαλύματος BSA 10mg/mL έτσι ώστε να προκύψει συγκέντρωση PAF 800μM ειδικής δραστικότητας 4.000cpm/μL. Παρασκευάζεται καινούριο διάλυμα κάθε φορά. Προσθήκη 5μL από το διάλυμα αυτό στον ενζυμικό προσδιορισμό δίνουν τελική συγκέντρωση PAF 20μM (20.000cpm) και τελική συγκέντρωση BSA 0.25mg/mL.

- Διάλυμα TCA 40% : Διαλύονται 40g TCA σε 100mL απεσταγμένο νερό.

Αρχή μεθόδου

Ο προσδιορισμός της δραστικότητας της PAF-AH βασίζεται στη μέτρηση της ραδιενέργειας του ραδιενεργού προϊόντος ($[H^3]$-CH_3COOH) που απελευθερώνεται στο υπερκείμενο διάλυμα μετά την επώαση του ενζυμικού παρασκευάσματος με $[H^3]$-PAF, παρουσία BSA και την καταβύθιση των πρωτεϊνών με TCA. Το επισημασμένο οξικό οξύ διαχωρίζεται από τον μη αντιδρών $[H^3]$-PAF αφού αυτός καταβυθίζεται ως σύμπλοκο με την BSA.

Αναλυτική πορεία

Σε σωλήνα eppendorf φέρονται το ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (100mM-pH 7.2) με 1mM EGTA, 5μL διαλύματος εργασίας μίγματος PAF (τελική συγκέντρωση 20μM), το ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (50mM-pH 7.4) για τη ρύθμιση του όγκου και η αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη του ενζυμικού παρασκευάσματος. Επειδή, η προστιθέμενη ποσότητα του ενζυμικού παρασκευάσματος, το οποίο είναι διαλυμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (50mM-pH 7,4) και πρέπει να αντιστοιχεί σε 20μg πρωτείνης, μπορεί να κυμαίνεται από 10-50μL προστίθεται κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος ώστε όλοι οι προσδιορισμοί να περιέχουν 50μL ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl (50mM-pH 7,4). Ο τελικός όγκος του μίγματος επώασης είναι 200μL. Η επώαση της αντίδρασης γίνεται σε θερμοστατούμενο υδατόλουτρο υπό ανάδευση στους 37^{o}C για 60min. Μετά το τέλος της αντίδρασης προσθέτονται 2μL πρωτεΐνης BSA 100 mg/ml και μετά από 30s 64μL ψυχρού διαλύματος TCA 40% (τελική συγκέντρωση TCA 10%). Το διάλυμα αφήνεται σε πάγο για 30min ώστε να καταβυθιστούν οι πρωτεΐνες και στην συνέχεια φυγοκεντρείται σε μικροφυγόκεντρο στις 12000rpm για 12min. Παραλαμβάνονται 100μL από το υπερκείμενο και μεταφέρονται σε vials που περιέχουν 5mL υγρό σπινθηρισμού (dioxane base) για την μέτρηση της ραδιενέργειας. Αναλύεται επίσης και δείγμα αναφοράς, το οποίο δεν περιέχει ενζυμικό παρασκεύασμα, το control. Η ειδική δραστικότητα της PAF-AH υπολογίζεται από τον τύπο :

Ειδική δραστικότητα PAF-AH (nmol/min/mg πρωτεΐνης) :

$$\frac{[RA_{\delta\epsilon\acute{\iota}\gamma\mu\alpha\tau\circ\varsigma}\ (cpm)-RA_{\tau\upsilon\phi\lambda\circ\acute{\upsilon}}\ (cpm)] \times \text{ειδική δραστικότητα } [H^3]\text{-PAF (nmol/cpm)}}{\text{Χρόνος επώασης (min) x Ποσότητα ενζυμικού παρασκευάσματος (mg πρωτεΐνης)}}$$

5.11 Προσδιορισμός βιωσιμότητας κυττάρων με τη μέθοδο MTT [313]

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Αντιδραστήριο MTT (Sigma:M5655) 3-(4,5-διμεθυλοθριαζόλη-2-yl)-2,5-διφαινυλοτετραζολιο βρωμίδιο, ένα τετραζόλιο

- Πυκνό υπερχλωρικό οξύ 37%
- Απεσταγμένο νερό
- RPMI 1640
- Φίλτρα
- Πλαστική σύριγγα
- Αποστειρωμένα eppendorfs
- Ισοπροπανόλη
- Οξινισμένη ισοπροπανόλη (23,75mL ισοπροπανόλη+ 1,25mL HCL 2N)
- Πλαστικά plate 96 well αποστειρωμένα με καπάκι
- Κυκλοαναδευτήρας (vortex)
- Πλαστικά Πηγαδάκια
- Αποστειρωμένα πλαστικά tips
- Elisa Reader: BioTek Power Wave XS2

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος MTT μετράει την βιωσιμότητα ή την κυτταροτοξικότητα που προκαλείται από φάρμακα η άλλους τοξικούς παράγοντες. Στηρίζεται στην δραστικότητα των ενζύμων των μιτοχονδρίων. Συγκεκριμένα μετρά τη δραστικότητα των μιτοχοδριακών αναγωγασών, οι οποίες λειτουργούν όταν τα κύτταρα είναι ζωντανά. Το κίτρινο MTT μετατρέπεται σε χρώμα μωβ την φορμαζάνη, όταν τα κύτταρα είναι ζωντανά. Χρησιμοποιείται ένα διαλυτό μίγμα ούτως ώστε να διαλυθεί η στερεή μωβ φορμαζάνη και να δημιουργηθεί ένα έγχρωμο διάλυμα. Η απορρόφηση αυτού του διαλύματος μετράται σε μήκος κύματος 500-600nm.

Αναλυτική πορεία –Πρότυπη καμπύλη αναφοράς

Φτιάχνεται πρότυπη καμπύλη με γνωστές συγκεντρώσεις κυττάρων από 0,05 -1* 10^6/mL διαλυμένα σε SFM. Τα κύτταρα μετά την παραμονή τους για 24h σε SFM, με

τους κατάλληλους χειρισμούς μπαίνουν σε συγκέντρωση $1*10^6$ κύτταρα/mL και αραιώνονται διαδοχικά στο plate με τελικό όγκο 200μL. Προστίθενται 20μL MTT (αρχική συγκέντρωση 2,5mg/mL σε SFM) και ακολουθεί επώαση για 2h στον επωαστήρα στους 37^{o}C και 5% CO_2. Μετά το πέρασμα αυτού του χρονικού διαστήματος προστίθεται 100μL οξινισμένη ισοπροπανόλη. Τα δείγματα ανακατεύονται με το πλαστικό ρύγχος μέχρι να διαλυθούν οι κρύσταλλοι της φορμαζάνης, έτσι μετράται η απορρόφηση στα 570nm.

Η πρότυπη καμπύλη επαληθεύτηκε 3 φορές και οι προς εξέταση ουσίες θα δοκιμάζονται σε συγκέντρωση κυττάρων 10^6/mL.

Αναλυτική πορεία –Έλεγχος των ουσιών

Αφού τα κύτταρα παραμείνουν για 24h σε SFM, τοποθετούνται σε συγκέντρωση 10^6/1mL παρουσία IL-1β τελική συγκέντρωση 2,5ng/mL παρουσία ή απουσία φαινολικών συστατικών σε εύρος συγκεντρώσεων 50-400μM. Η επώαση με τις προς μελέτη ουσίες γίνεται ανάλογα με την ώρα που δοκιμάζονται οι ουσίες στα πειράματα, αφού όμως πρώτα προσομοιαστούν όλοι οι όγκοι των προς εξέταση παραγόντων και αναδιαλυθούν σε DMSO. Το μίγμα των κυττάρων μοιράζεται, 100 μL ανά πηγαδάκι, στο αποστειρωμένο plate και τοποθετείται στον επωαστήρα για να ξεκινήσει η επώαση. Μετά το πέρας του θεμιτού χρόνου επώασης, προστίθενται 20μL MTT (αρχική συγκέντρωση 2,5mg/ml σε SFM), μετά τις 2h επώασης προστίθενται 100μL οξινισμένη ισοπροπανόλη και τα δείγματα φωτομετρούνται στα 570nm.

5.12 *In vitro* Οξείδωση Ορού με $Cu2^+$ [314]

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) pH = 7,4, 146mM σε NaCl: Σε 240mL H_2O που βρίσκονται υπό συνεχή ανάδευση με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα προστίθενται προς διαλυτοποίηση 0,2269g $Na_2HPO_4.2H_2O$, 0,0602g $NaH_2PO_4.2H_2O$ και 2,1332g NaCl. Στη συνέχεια ρυθμίζεται το pH στο 7,4 και προστίθεται H_2O έως τελικό όγκο 250mL.
- Υδατικό διάλυμα $CuSO_4.5H_2O$ συγκέντρωσης 20mM stock

- Πλαστικοί δοκιμαστικοί σωλήνες των 10mL.
- Πλαστικά σιφώνια των 20mL.
- Plate eliza UV 250μL
- Αυτόματες πιπέτες των 1000 και 100μL
- Φωτόμετρο Eliza Reader: BioTek Power Wave XS2

Αρχή μεθόδου

Η μέτρηση της προκαλούμενης από ιόντα Cu^{2+} *in vitro* οξείδωσης του πλάσματος, βασίζεται στη συνεχή καταγραφή της απορρόφησης στα 245nm. Η απορρόφηση σε αυτό το μήκος κύματος οφείλεται κυρίως στην παραγωγή συζυγών διενίων των υδροϋπεροξειδίων και κατά μικρότερο βαθμό σε άλλες ενώσεις όπως συζυγή διένια υδροξειδίων, που παράγονται κατά την οξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs) που απαντούν στις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος.

Καταγράφοντας την απορρόφηση στα 245nm παρέχεται η δυνατότητα να παρακολουθείται η κινητική της οξείδωσης που λαμβάνει χώρα στο πλάσμα. Η κινητική αυτή είναι περίπλοκη καθώς οι λιποπρωτεΐνες του πλάσματος περιέχουν πληθώρα αντιοξειδωτικών τα οποία οξειδώνονται πρώτα εκδηλώνοντας την αντιοξειδωτική τους δράση. Στο διάστημα της οξείδωσης των αντιοξειδωτικών η απορρόφηση στα 245 αυξάνεται ελάχιστα. Ο χρόνος που απαιτείται για να οξειδωθούν τα αντιοξειδωτικά καλείται χρόνος λανθάνουσας φάσης και αποτελεί μέτρο της αντίστασης του πλάσματος στην οξείδωση.

Μόνο όταν οξειδωθούν τα αντιοξειδωτικά αρχίζουν να παράγονται τα συζυγή διένια και να αυξάνεται η απορρόφηση στα 245nm. Η καταγραφή της απορρόφησης παρέχει μια σιγμοειδή καμπύλη, η οποία έχει τα εξής χαρακτηριστικά: 1) χρόνος της λανθάνουσας φάσης (lag time), 2) η μέγιστη ταχύτητα (Vmax) της συσσώρευσης των προϊόντων που απορροφούν στα 245nm που εκφράζεται σε μονάδες απορρόφησης ανά min, 3) ο χρόνος (tmax) κατά τον οποίο παρατηρείται η Vmax και 4) η μέγιστη συσσώρευση προϊόντων που απορροφούν που εκφράζεται σε μονάδες απορρόφησης.

Αναλυτική πορεία

Σε vacutaiter χωρίς αντιπηκτικό λαμβάνεται αίμα. Το αίμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 40min. Στη συνέχεια ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 1500g για 10min σε θερμοκρασία 24^{o}C. Λαμβάνεται ο ορός (υπερκείμενο), ισομοιράζεται σε eppendorfs και φυλάσσεται στους -80^{o}C για περαιτέρω αναλύσεις.

Ο ορός αραιώνεται 1:12 με PBS και στη συνέχεια για την αντίδραση προστίθενται στα πηγαδάκια 20μL. Το διάλυμα εργασίας του $CuSO_4$ είναι 200μM, από το οποίο προστίθενται 200μL στο πηγάδι πριν ξεκινήσει η αντίδραση. Τα προς μελέτη δείγματα έχουν αναδιαλυθεί σε 5μL αιθανόλης σε eppendorf όπου προστίθενται 145μL από το δ/μα εργασίας του $CuSO_4$. Από το διάλυμα αυτό προστίθενται τελικά 30μL στο πηγαδάκι του plate όπου θα γίνει η αντίδραση. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 250μL. Η αντίδραση γίνεται στους 37^{o}C στα 245nm για 7h.

5.13 Εκκαθάριση ελευθέρων ριζών DPPH [315]

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Σωληνάκια eppendorf
- Πλάκες (plate) 96 βοθρίων (πηγαδιών) για φωτομέτρηση στο ορατό φως
- Επωαστήρας στους 37^{o}C
- Φωτόμετρο Eliza Reader: BioTek Power Wave XS2
- Διάλυμα DPPH συγκέντρωσης 0,4mg/mL: Σε κάθε πείραμα ζυγίζονται 0,8mg DPPH και αναδιαλύονται σε 2mL απόλυτης αιθανόλης, σε σωλήνα προπυλενίου που τυλίγεται με αλουμινόχαρτο και φυλάσσεται από το φως.
- Αρχικό Διάλυμα των προς μελέτη ενώσεων 20mM, κάθε ουσία αραιώνεται με αιθανόλη ούτως ώστε οι τελικές συγκεντρώσεις των ενώσεων στο plate να είναι μεταξύ του εύρους 5-800μM, με τουλάχιστον 10 σημεία ανάμεσα σε αυτές τις συγκεντρώσεις. Όλες οι ουσίες δοκιμάστηκαν σε 10 συγκεκριμένες συγκεντρώσεις ανάμεσα σε αυτό το εύρος ώστε να υπολογιστεί το EC_{50} της κάθε ουσίας.

Αρχή μεθόδου

Το DPPH (1,1 διφαινυλο-2-πικρυλ-υδραζύλιο) είναι μια σταθερή ελεύθερη ρίζα, η οποία έχει ένα μονήρες ηλεκτρόνιο. Λόγω του μη εντοπισμένου ηλεκτρονίου αυτού στο μόριο, η ρίζα έχει χαρακτηριστικό μπλε-μοβ χρώμα σε διάλυμα αιθανόλης, που απορροφά στα 492nm. Όταν στο διάλυμα βρεθεί ένωση δότης προκύπτει η ανηγμένη μορφή του DPPH η οποία δεν είναι ελεύθερη ρίζα, το μωβ χρώμα χάνεται και τη θέση του παίρνει το κίτρινο που οφείλεται στις πικρυλ-ομάδες του μορίου. Η μείωση της απορρόφησης στα 492 nm είναι αντιστρόφως ανάλογη της ποσότητας των ελευθέρων ριζών DPPH στο διάλυμα.

Αναλυτική πορεία

Σε πλάκα 96 πηγαδιών τοποθετείται κατάλληλη ποσότητα αιθανόλης ώστε ο τελικός όγκος της δοκιμασίας μαζί με το προς μελέτη δείγμα να είναι 200μL. Για να ξεκινήσει η αντίδραση προστίθονται τα 35μL DPPH (έναρξη αντίδρασης). Πραγματοποιείται επώαση στους 37^{o}C για 30min και πραγματοποιείται φωτομέτρηση στα 492nm. Ταυτόχρονα γίνεται και τυφλός προσδιορισμός. Τα αποτελέσματα υπολογίζονται από τους τύπους και εκφράζονται τελικά ως EC_{50} (η συγκέντρωση που απαιτείται για 50% δέσμευση της ρίζας DPPH), που υπολογίζεται από την καμπύλη % Δέσμευση = f($C_{δείγματος}$) και αντιστοιχεί στη συγκέντρωση που προκαλεί το 50% της αναστολής.

% Δέσμευση = 100*($A_{τυφλού}$ - $A_{δείγματος}$)/$A_{τυφλού}$, όπου $A_{τυφλού}$ είναι η απορρόφηση των 200μL αιθανόλης + 35μL αιθανολικού διαλύματος DPPH. Το πείραμα εκτελείται τουλάχιστον 3 φορές και οι συνθήκες γίνονται διπλές σε κάθε πείραμα.

5.14 Μη ενζυμική υπεροξείδωση με λινελαϊκό οξύ [316]

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Tris HCl 100mM: Ζυγίζονται 1,2114g Tris (Τρι-υδοξυλαμινομεθάνιο) και αναδιαλύονται σε νερό. Ρυθμίζεται το pH στα 7,5 με διάλυμα HCl και συμπληρώνεται ο όγκος σε ογκομετρική φιάλη μέχρι τα 100mL.

- Διάλυμα Λινελαϊκού οξέος (cis –Δ9,Δ12- δεκαοκταδιενοϊκό) 20mM: Ζυγίζονται 0,0284g λινελαϊκού οξέος σε 5mL Tris HCl. Στους 25^{o}Cρ=0,902g/ml και

το MB=280,45. Αυτό σημαίνει ότι τα 0,0284g είναι 31,5μL λινελαϊκού που πρέπει να αραιωθούν σε τελικό όγκο 5mL του Tris HCl 100mM.

- Διάλυμα $FeSO_4x7H_2O$ 40mM σε H_2O: Ζυγίζονται 0,056g $FeSO_4x7H_2O$ και αναδιαλύονται σε 5mL νερό.

- Διάλυμα Ασκορβικού οξέος 20mM. Ζυγίζονται 3,5mg ασκορβικού οξέος και αναδιαλύονται σε 1mL H_2O. Το διάλυμα συντηρείται στους 4^0C.

- Διάλυμα NaOH 50mM: Για 10mL H_2O ζυγίζονται 0,02g NaOH. MB=40

- Διάλυμα TBA (2-θειοβαρβιτουρικό) 1% w/v: Ζυγίζεται 0,05g TBA και αναδιαλύεται σε 5mL NaOH 50mM. Το διάλυμα αυτό φτιάχνεται τη μέρα του πειράματος.

- TCA (τριχλωροξικό οξύ) 40% w/v: Ζυγίζονται 40g TCA σε 100mL H_2O.

- Πλαστικά σωληνάκια των 10mL

- Σωληνάκια eppendorf

- Ογκομετρική φιάλη των 100mL

- 96 well plate

- Φυγόκεντρος με κεφαλή για eppendorf

- Φωτόμετρο Eliza Reader: BioTek Power Wave XS2

Αρχή μεθόδου

Το λινελαϊκό οξύ παρουσία του ασκορβικού οξέος και των ιόντων σιδήρου (Fe^{2+}) οξειδώνεται σε μηλονυλοδιαλδεΰδη (MDA). Η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη τριχλωροξικού οξέος (TCA). Η προσθήκη στη συνέχεια του θειοβαρβιτουρικού οξέος οδηγεί στη δημιουργία ροζ-κόκκινου συμπλόκου MDA-TBA το οποίο φωτομετρείται στα 532nm. Παρουσία αντιοξειδωτικών ενώσεων, η ποσότητα του λινελαϊκού που οξειδώνεται είναι μικρότερη και άρα είναι μικρότερες και οι ποσότητες MDA και συμπλόκου MDA-TBA που σχηματίζονται.

Αναλυτική πορεία

Σε eppendorf προστίθονται 80μL Tris HCl, 500μL διάλυμα λινελαϊκού οξέος, κατάλληλη ποσότητα αιθανόλης ή αιθανόλης με το προς μελέτη δείγμα στα 50μL, 10μL ασκορβικού οξέως και τέλος 10μL FeSO4x7 H_2O (έναρξη αντίδρασης), ώστε ο τελικός όγκος της κάθε αντίδρασης να είναι 650μL.

Παράλληλα μετρώνται τα εξής διαλύματα:

α) τυφλό: περιέχει όλα τα αντιδραστήρια εκτός των εκχυλισμάτων και το σίδηρο

β) δείγμα αναφοράς: περιέχει όλα τα αντιδραστήρια εκτός των εκχυλισμάτων

Για τον υπολογισμό των αποτελεσμάτων από όλες τις απορροφήσεις αφαιρείται η $A_{τυφλού}$. Ο υπολογισμός της τελικής συγκέντρωσης των υπό μελέτη ενώσεων γίνεται στα 650μL.

Τα δείγματα τοποθετούνται στους 37^oC για 10min. Στη συνέχεια γίνεται διακοπή της αντίδρασης με την προσθήκη 103,5μL διαλύματος TCA. Από το κάθε δείγμα λαμβάνονται 500μL και τοποθετούνται σε καινούργια eppendorf και στη συνέχεια προστίθενται 200μL TBA σε κάθε δείγμα. Τα δείγματα τοποθετούνται σε υδατόλουτρο των 95^oC για 10min. Μετά από ψύξη στο σκοτάδι για 5min, τα δείγματα φυγοκεντρούνται στα 3500g για 10min. Από το κάθε δείγμα λαμβάνονται προσεκτικά 200μL από το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης και τοποθετούνται στο plate. Στη συνέχεια πραγματοποιείται φωτομέτρηση στα 532nm, ενώ τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσοστό της αναστολής σχηματισμού του συμπλόκου MDA-TBA.

% Αναστολή =100- 100*[($A_{δείγματος}$-$A_{τυφλού}$) /($A_{δείγματος\ αναφοράς}$-$A_{τυφλού}$)]

Το πείραμα εκτελείται τουλάχιστον 3 φορές και οι συνθήκες γίνονται διπλές σε κάθε πείραμα.

5.15 Αναστολή του ενζύμου λιποοξυγονάση [317]

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Ρυθμιστικό Διάλυμα Βορικών ιόντων 0.2M pH 9: Σε ποτήρι ζέσεως των 500mL, ζυγίζονται 6,18g βορικού οξέος και προστίθεται H_2O. Η ρύθμιση του pH

στην τιμή 9 γίνεται με διάλυμα NaOH 50% w/v. Προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα ύδατος ώστε ο όγκος του διαλύματος να γίνει 500mL σε ογκομετρική φιάλη.

- Διάλυμα λιποοξυγονάσης 100units/μL: Το διάλυμα του ενζύμου που παρασκευάζεται για τα πειράματα περιέχει προσεγγιστικά 100 μονάδες ενζύμου ανά μL ρυθμιστικού διαλύματος. Σύμφωνα με τα παραπάνω και λαμβάνοντας υπόψη τον αριθμό των μονάδων ανά mg παρασκευάσματος (80000 μονάδες), ζυγίζονται 1mg παρασκευάσματος για κάθε 800μL ρυθμιστικού διαλύματος που προστίθενται.

- Λινελαϊκό οξύ σε μορφή λαδιού σε αμπούλα: 5μL λινελαικού +338,15μL DMSO προκύπτει 46,875mM (το διάλυμα υποστρώματος εργασίας αυτού, δίνουν τελική συγκέντρωση στο plate τα 150μM)

- Διάλυμα υποστρώματος εργασίας: το υπόστρωμα είναι το λινελαικό οξύ, παίρνουμε 25μL από το διάλυμα με τις συγκεντρώσεις που έχουμε φτιάξει στο DMSO και προσθέτουμε 1225μL buffer βορικών. Τελικές συγκεντρώσεις υποστρώματος που χρησιμοποιήθηκαν είναι 40,50,75,100,150μM.

- Διάλυμα υπό μελέτης ένωσης εργασίας: Οι ενώσεις ήταν αναδιαλυμένες σε αιθανόλη, υπολογίζοντας την ποσότητα που έπρεπε να εξατμιστεί για την κάθε συγκέντρωση που έπρεπε να μελετηθεί, η εξάτμιση γινόταν μέχρι ξηρού σε eppendorf. Στη συνέχεια το ίζημα αναδιαλυόταν σε 20μL DMSO, και τελευταία στιγμή πριν ξεκινήσει η αντίδραση προστίθονταν τα 980 μL buffer βορικών, από αυτό το διάλυμα τα 20 μL χρησιμοποιούνταν για την αντίδραση. Το control ήταν απλά 20μL DMSO σε 980 μL buffer βορικών.

- Σωληνάκια eppendorf
- Ογκομετρική φιάλη των 100 mL
- 96 well plate
- Φωτόμετρο Eliza Reader: BioTek Power Wave XS2

Αρχή μεθόδου

Για την μελέτη της επίδρασης των ενώσεων στην καταλυτική δράση του ενζύμου λιποοξυγονάση, προσδιορίζεται κινητικά με τη χρήση φασματοσκοπίας υπεριώδους η αύξηση στην απορρόφηση που προκαλείται από την παραγωγή του προϊόντος της

οξείδωσης του λινελαϊκού οξέος, του υδροπεροξυλινελαϊκού οξέος. Ο προσδιορισμός γίνεται στα 234nm.

Αναλυτική πορεία

Για τελικό όγκο μίγματος 125μL: Σε πηγαδάκι στο UV plate τοποθετούνται 80μL ρυθμιστικού διαλύματος βορικών, 20μL υπό μελέτης ένωσης από το διάλυμα εργασίας και 5μL διαλύματος ενζύμου, αφού γίνει προσεκτική ανάδευση με την πιπέτα γίνεται προεπώαση 5min και η αντίδραση ξεκινά με 20μL υποστρώματος εργασίας, το μίγμα αναδεύεται με την πιπέτα και ο σχηματισμός του προϊόντος της αντίδρασης μελετάται καταγράφοντας την αύξηση της απορρόφησης στα 234nm για 10min.

Προσδιορίζεται η ταχύτητα σχηματισμού (ΔΑ/min) του προϊόντος 50-100s μετά την έναρξη της αντίδρασης από την κλίση της καμπύλης της κινητικής. Και στις δύο περιπτώσεις μελετάται και η επίδραση διαλύματος που δεν περιέχει την υπό μελέτη ουσία, αλλά περιέχει την ποσότητα του διαλύτη ο οποίος επιλέχθηκε για την διαλυτοποίησή της και γίνεται σύγκριση, ώστε να προσδιοριστεί η δράση της υπό μελέτη ουσίας.

5.16 Ποσοτικός προσδιορισμός φαινολικών [318]

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Πρότυπο διάλυμα Folin-Ciocalteu (Merck)
- Πρότυπο διάλυμα τυροσόλης και ρεσβερατρόλης 1mg/mL
- Διάλυμα Na_2CO_3 35% (w/v)
- Γυάλινα σωληνάκια
- Φωτόμετρο Elisa Reader: BioTek Power Wave XS2

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 μπλε χρώματος το οποίο και φωτομετρείται στα 725nm.

Αναλυτική πορεία

Το προς εξέταση δείγμα εξατμίζεται μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου. Στην συνέχεια προστίθενται διαδοχικά 3,5mL νερό, 0,1mL Folin-Ciocalteu και αναδεύουμε ισχυρά. Μετά από παραμονή 3min προστίθενται 0,4mL Na_2CO_3 35% και το όλο μίγμα αφού αναδευτεί εντόνως, αφήνεται προς αντίδραση για 1h και φωτομετρείται στα 725nm. Παράλληλα γίνεται τυφλός προσδιορισμός καθώς και προσδιορισμός σε πρότυπα διαλύματα φαινολικών ενώσεων που περιέχουν από 1 έως 60μg οπότε και κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη αναφοράς, βάση της οποίας προσδιορίζεται η συγκέντρωση σε φαινολικά του αγνώστου δείγματος.

5.17 Ήπια αλκαλική υδρόλυση λιποειδών [224]

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Μεθανολικό διάλυμα 50% NaOH 1,2N
- Οργανικοί διαλύτες αναλυτικής καθαρότητας (χλωροφόρμιο, μεθανόλη)
- Δ/μα CH_3COOH 1N
- Βιδωτοί σωλήνες
- Ανακινούμενο υδατόλουτρο

Αρχή Μεθόδου

Με την μέθοδο αυτή διασπώνται μόνο οι εστερικοί δεσμοί των λιποειδών ενώ παραμένουν ανέπαφοι οι αιθερικοί και οι αμιδικοί δεσμοί

Αναλυτική πορεία

Το δείγμα, που ήταν αιθανολικό διάλυμα ακετυλιωμένων φαινολικών ενώσεων, φέρεται σε βιδωτό σωλήνα, εξατμίζεται ο διαλύτης σε ρεύμα αζώτου και

αναδιαλύεται σε 1mL μίγματος $CHCl_3$:MeOH (1:4, v/v), στη συνέχεια προστίθενται 0.1mL μεθανολικού διαλύματος NaOH 12N. Ο σωλήνας παραμένει σε υδατόλουτρο 60^oC για 20min και μετά από ψύξη εξουδετερώνεται το μίγμα της αντίδρασης με 0,15mL CH_3COOH 1N. Τέλος εξατμιζόταν οι διαλύτες και το ίζημα αναδιαλυόταν σε αιθανόλη για να λάβει χώρα ο προσδιορισμός των ολικών φαινολικών συστατικών.

5.18 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

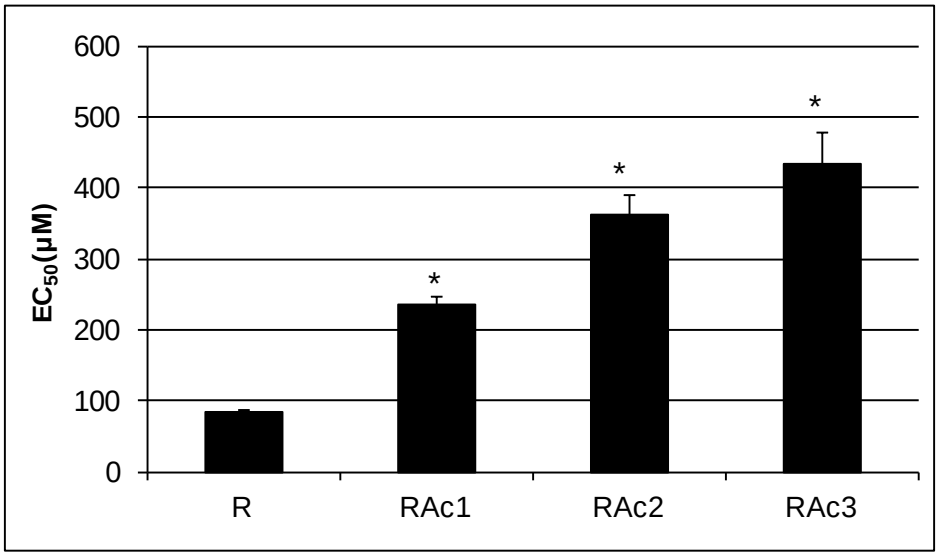
Όλα τα πειράματα διεξήχθησαν τουλάχιστον τρεις φορές με διπλά δείγματα εκτός αν αναφερθεί αλλιώς. Τα δεδομένα ελέγχτηκαν αν είναι κανονικά κατανεμημένα σύμφωνα με τη δοκιμή Kolmogorov-Smirnov. Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέσες τιμές ± SD ή ως μέση ποσοστιαία διαφορά από την IL-1β αποτέλεσμα που εκφράζεται για κάθε χρονικό σημείο στην περίπτωση των πειραμάτων με κύτταρα, ενώ στα συστήματα κυττάρων ποσοστιαία διαφορά από το δείγμα αναφοράς. Χρησιμοποιήθηκε ανάλυση διακύμανσης για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις προκειμένου να ελεγχεί οποιαδήποτε αλλαγή στα επίπεδα του PAF και της δραστικότητας των ενζύμων του. Post hoc ανάλυση διεξήχθη, κατά περίπτωση, χρησιμοποιώντας ζευγαρωμένα δείγματα t τεστ (για ANOVA) με τη διόρθωση Bonferroni για τη διόρθωση του σφάλματος τύπου I, προκειμένου να προσεγγίσει το επίπεδο σημαντικότητας για τις στατιστικές δοκιμές που πραγματοποιούνται στην παρούσα μελέτη. Όλα τα διαστήματα εμπιστοσύνης 95% και οι τιμές πιθανότητας (P) με βάση two-tailed δοκιμές, και το επίπεδο σημαντικότητας που χρησιμοποιείται είναι 5%. Όλοι οι στατιστικοί υπολογισμοί έγιναν με το πρόγραμμα SPSS έκδοση 22.0 (στατιστικό πακέτο για κοινωνικές επιστήμες, SPSS Inc., Chicago, Illinois, ΗΠΑ).

Κεφάλαιο 6: Αποτελέσματα

6.1 Επίδραση τυροσόλης, ρεσβερατρόλης και των ακετυλιωμένων παραγώγων τους σε αντιοξειδωτικά τεστ ελεύθερα κυττάρων

6.1.1 Εκκαθάριση ελευθέρων ριζών DPPH

Η Τυροσόλη (T) και τα τρία ακετυλιωμένα παράγωγά της δεν δέσμευσαν τις ελεύθερες ρίζες DPPH. Αντίθετα, η ρεσβερατρόλη (R) έδειξε την πιο ισχυρή δεσμευτική δράση με EC_{50}=85±2,7μM, που ακολουθείται από το RAc1 (4'-ακέτυλο-ρεσβερατρόλη), RAc2 (3-ακετυλο-ρεσβερατρόλη) και το RAc3 (3,5-διακετυλιωμένη-ρεσβερατρόλη) με τιμές EC_{50} 236 ± 13μM (ρ <0,000 σε σχέση με την R), 364 ± 29μM (ρ <0,000 σε σχέση με την R), και 434 ± 46μM (ρ <0,000 σε σχέση με την R) αντίστοιχα (**Γράφημα 1**). Η διαφορά μεταξύ των δυο μονο-ακετυλιωμένων RAc1, RAc2 ήταν σημαντική (ρ <0,000). Από τα δύο δι-ακετυλιωμένα μόνο το RAc3 είχε δράση έναντι των ριζών DPPH με υψηλότερη τιμή EC_{50} σε σχέση με τα δύο μονο-ακετυλιωμένα παράγωγα (ps <0,05), ενώ τα παράγωγα RAc4 (3,4'-διακετυλιωμένης-ρεσβερατρόλη) και το RAc5 (3,5,4-τριακετυλιωμένη ρεσβερατρόλη) δεν εμφάνισαν δράση έναντι των ριζών DPPH μέχρι τα 600μM που δοκιμάστηκαν. Επισημαίνεται ότι η υψηλότερη τιμή EC_{50}, υποδηλώνει ότι απαιτείται μεγαλύτερη συγκέντρωση για να επιτευχθεί 50% εκκαθάριση των ριζών DPPH, αποτέλεσμα που συνεπάγεται ένωση με μικρότερη δεσμευτική ικανότητα.



Γράφημα 1: Η επίδραση της ρεσβερατρόλης και των ακετυλιωμένων παραγώγων της στην εκκαθάριση των ελεύθερων ριζών DPPH

Οι ενώσεις δοκιμάστηκαν σε διάφορες συγκεντρώσεις σε εύρος τιμών 5-600μM. Το μίγμα της αντίδρασης επωάστηκε στους 37°C για 30min και η απορρόφηση μετρήθηκε στα 492nm. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως EC_{50}.

* $p<0,001$ σε σύγκριση με ρεσβερατρόλη

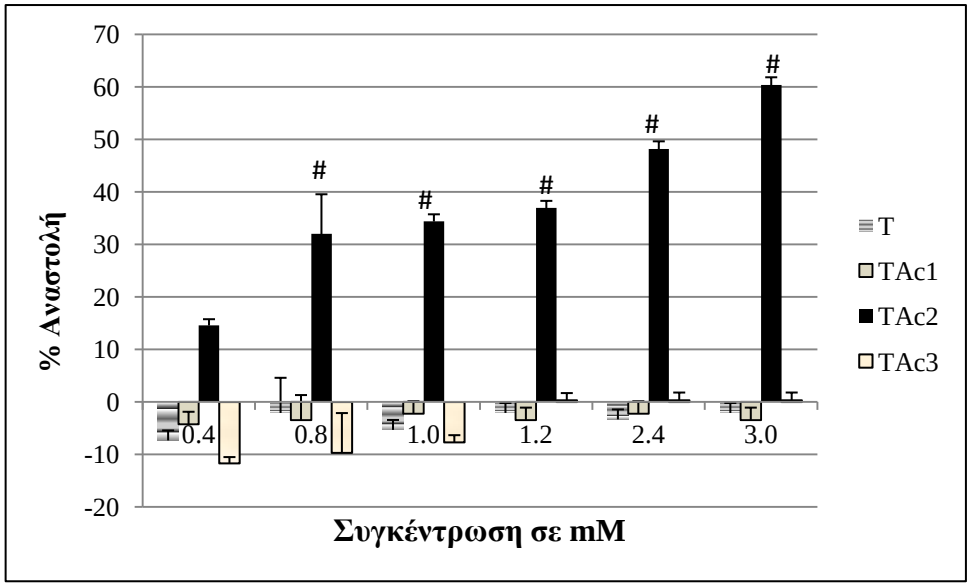
RAc1: 4'-ακετυλιωμένη ρεσβερατρόλη, RAc2: 3-ακετυλιωμένη ρεσβερατρόλη, RAc3: 3,5-διακετυλιωμένη ρεσβερατρόλη

6.1.2 Μη ενζυμική λιποειδική υπεροξείδωση λινελαϊκού οξέος

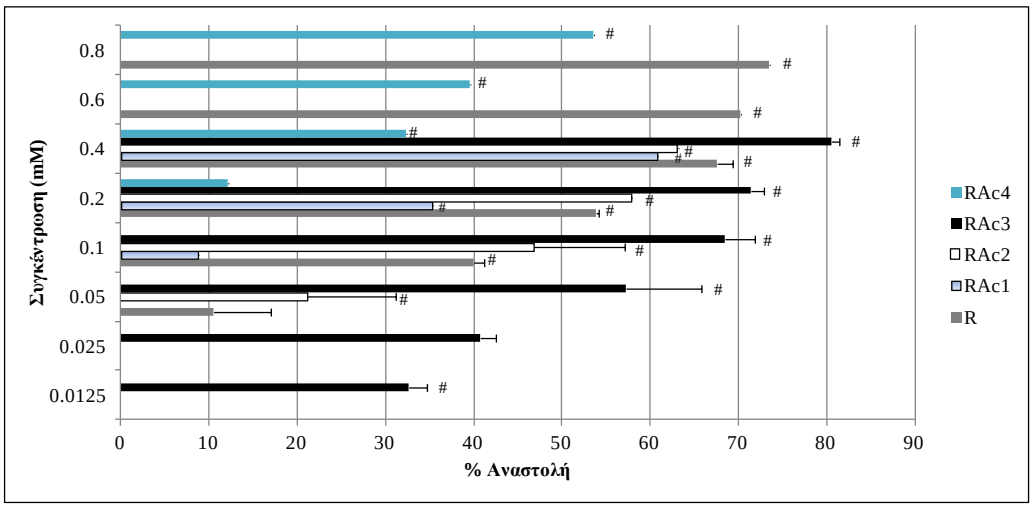
Η Τυροσόλη δεν είχε επίδραση στη μη ενζυμική υπεροξείδωση λινελαϊκού οξέος στις συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν (έως 3mM- **Γράφημα 2Α**). Το παράγωγο TAc2 (μονο-ακετυλιωμένο παράγωγο στο αλειφατικό υδροξύλιο) ανέστειλε την υπεροξείδωση λινελαϊκού οξέος που προκαλείται από Fe^{2+} με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Η τιμή IC_{50} (η συγκέντρωση που προκαλεί 50% αναστολή) υπολογίστηκε στα 2,4 ± 0,21mM (**Γράφημα 2Α**). Τα άλλα δύο ακετυλιωμένα παράγωγα δεν επηρέασαν τη μη ενζυμική υπεροξείδωση λινελαϊκού στις συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν (έως 3mM- **Γράφημα 2Α)**. Η ρεσβερατρόλη ανέστειλε την Fe^{2+} επαγόμενη υπεροξείδωση λινελαϊκού με δοσοεξαρτώμενο τρόπο έως την τιμή 0,4mM τελική συγκέντρωση (**Γράφημα 2Β**). Η τιμή IC_{50} της ρεσβερατρόλης ήταν 0,24 ± 0,041mM. Όσον αφορά τα ακετυλιωμένα παράγωγα της R με εξαίρεση το παράγωγο RAc5, όλα τα άλλα ανέστειλαν την επαγόμενη από Fe^{2+} υπεροξείδωση λινελαϊκού με δοσοεξαρτώμενο τρόπο (**Γράφημα 2Β**). Το διακετυλιωμένο παράγωγο RAc3 με τιμή IC_{50} 0,055 ± 0,0018mM εμφάνισε ισχυρότερη ανασταλτική δράση σε σχέση με την ρεσβερατρόλη ($p <0,000$) αλλά και από τα υπόλοιπα παράγωγα ($p \leq 0,05$), ενώ το RAc2 με IC_{50}

0,15 ± 0,05mM διέφερε οριακά από τη ρεσβερατρόλη (p = 0,1). Τα παράγωγα RAc4 και RAc1 εμφάνισαν πιο ασθενή δράση από την ρεσβερατρόλη, με τιμές IC_{50} 0,97 ± 0,034mM (p <0,000) και 0,33 ± 0,037mM (ρ = 0,04) αντίστοιχα (**Γράφημα 2Γ**). Τέλος, το RAc5 δεν εμφάνισε 50% αναστολή μέχρι τη συγκέντρωση 1mM. Συγκεκριμένα, το RAc5 σε συγκέντρωση 0,8mM ανέστειλε την υπεροξείδωση του λινελαϊκού κατά 23%±7,8 ενώ πάνω από αυτή τη συγκέντρωση δεν παρατηρήθηκε καμία βελτίωση της ανασταλτικής δράσης.

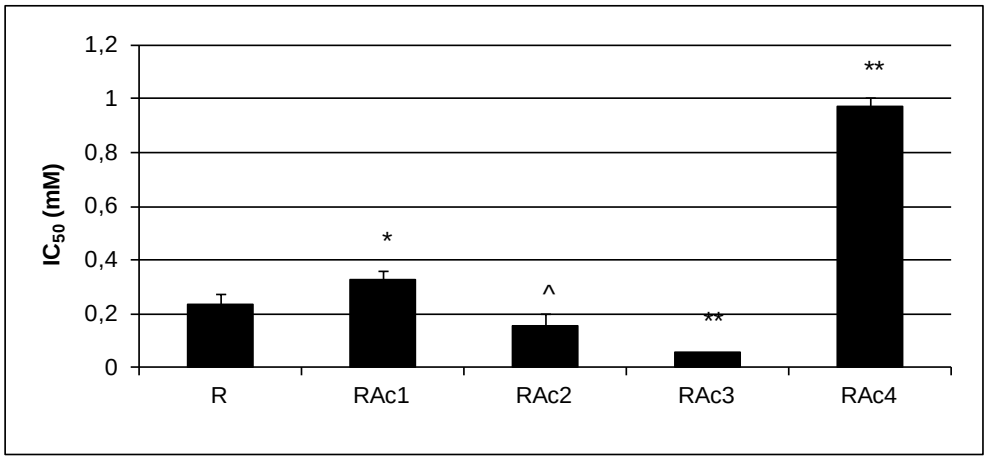
2A



2B



2Γ



Γράφημα 2: Η επίδραση της τυροσόλης και των ακετυλιωμένων παραγώγων της (Α), της ρεσβερατρόλης και των ακετυλιωμένων παραγώγων της (Β,Γ) στη μη ενζυμική λιποειδική υπεροξείδωση του λινελαϊκού οξέος

Οι ενώσεις ελέγχθηκαν σε συγκεντρώσεις 0.0125-3mM. Η προσθήκη στη συνέχεια του θειοβαρβιτουρικού οξέος οδηγεί στη δημιουργία ροζ-κόκκινου συμπλόκου MDA-TBA το οποίο φωτομετρείται στα 532nm.

2Α: Η επίδραση της τυροσόλης και των ακετυλιωμένων παραγώγων τους. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % αναστολή σε σχέση με το δείγμα του ελέγχου.

# $p<0,05$ σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου

2Β: Η δοσοεξαρτώμενη επίδραση της ρεσβερατρόλης και των 4 ακετυλιωμένων παραγώγων τους. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % αναστολή σε σχέση με το δείγμα του ελέγχου.

# $p<0,05$ σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου

2Γ: IC_{50} ρεσβερατρόλης και των παραγώγων της RAc1,2,3,4. Το IC_{50} εκφράζει τη συγκέντρωση που απαιτείται για να εμφανιστεί 50% αναστολή.

^ $p = 0,1$, * $p<0,05$, ** $p<0,001$ σε σύγκριση με ρεσβερατρόλη

RAc1: 4'-ακετυλιωμένη ρεσβερατρόλη, RAc2: 3-ακετυλιωμένη ρεσβερατρόλη, RAc3: 3,5-διακετυλιωμένη ρεσβερατρόλη, RAc4: 3,4'-διακετυλιωμένη ρεσβερατρόλη

6.1.3 *In vitro* οξείδωση του ορού με Cu^{2+}

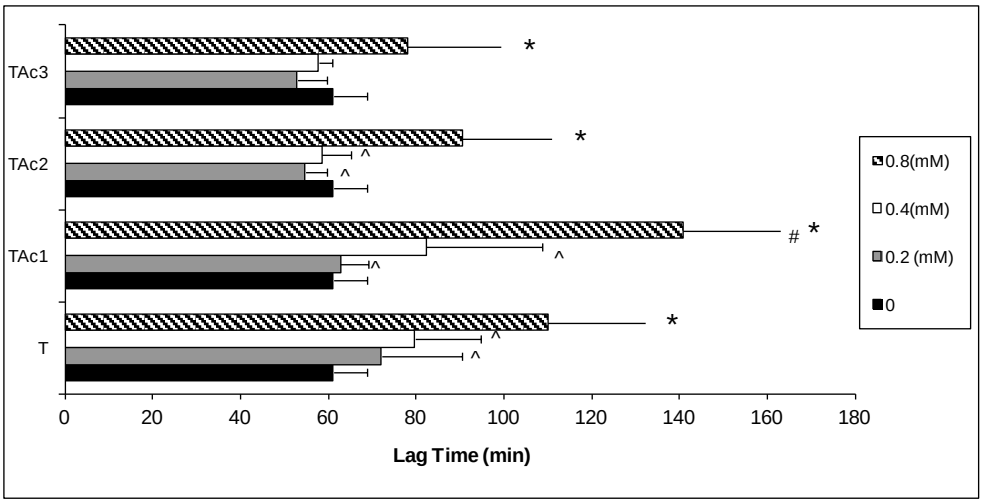
Η επίδραση της τυροσόλης και της ρεσβερατρόλης στην επαγόμενη από Cu^{2+} *in vitro* οξείδωση του ορού, ελέγχθηκε στις συγκεντρώσεις 0,1, 0,2, 0,4 και 0,8mM. Ο χρόνος που απαιτούνταν για την οξείδωση του ορού (lag time) χωρίς την παρουσία φαινολικής ένωσης ήταν 77±6,1min. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στην συγκέντρωση 0,1mM οι φαινολικές ενώσεις και τα ακετυλιωμένα παράγωγα τους δεν ήταν ικανές να αναστείλουν την οξείδωση του ορού.

Δοσοεξαρτώμενη ανασταλτική δράση έναντι της οξείδωσης του ορού από το χαλκό παρατηρήθηκε στις ενώσεις Τ, ΤΑc1 και ΤΑc2, αφού η συγκέντρωση 0,8mM διαφέρει ($\rho < 0,05$) από τις 0,2 και 0,4mM. Από όλες τις ενώσεις που δοκιμάστηκαν, τα 0,8mM του παραγώγου ΤΑc1 (Τ-ακετυλιωμένη στο αρωματικό υδροξύλιο) παρουσίασε τη μεγαλύτερη χρονική καθυστέρηση lag time (140±22min), ενώ τα άλλα δύο παράγωγα ΤΑc2 και ΤΑc3 σε συγκέντρωση 0.8mM με lag time 91±20min

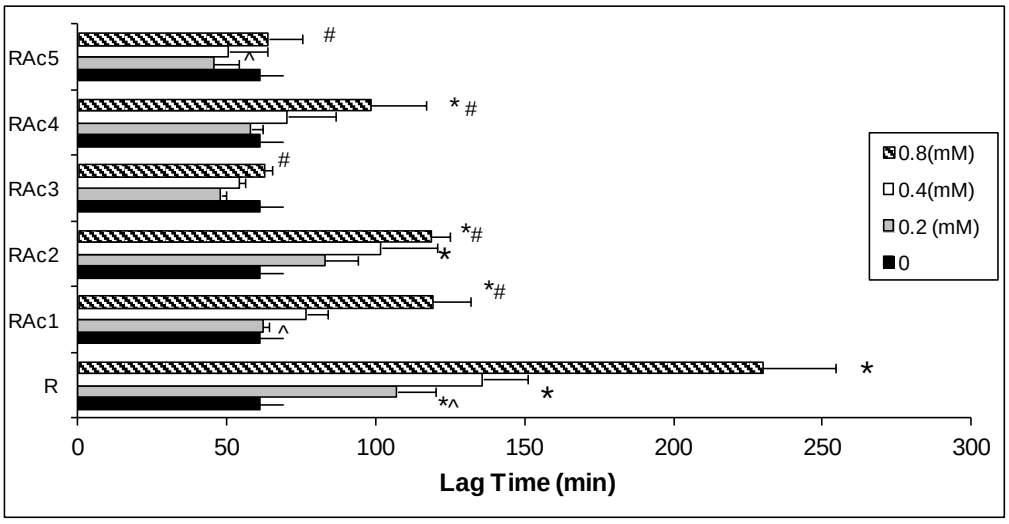
και 78±21min αντίστοιχα, δεν διέφεραν από την τυροσόλη (110 ± 22min) (**Γράφημα 3Α)**.

Η ρεσβερατρόλη και τα ακετυλιωμένα παράγωγά της δοκιμάστηκαν επίσης σε συγκεντρώσεις 0,2- 0,4 -0,8mM όπως φαίνεται στο **Γράφημα 3Β**. Σε όλες τις συγκεντρώσεις η ρεσβερατρόλη είχε καλύτερη ανασταλτική δράση με lag time 230±24min από τα ακετυλιωμένα παράγωγά της ($\rho<0,05$). Δοσοεξαρτώμενη δράση εμφάνισαν η ρεσβερατρόλη και τα ακετυλιωμένα παράγωγα της RAc1 και RAc5, όπου η αναστολή που επάγεται από τα 0,8mM διέφερε από εκείνη των 0,2mM.

3A



3B



Γράφημα 3: Η επίδραση της τυροσόλης, της ρεσβερατρόλης και των ακετυλιωμένων παραγώγων τους στην *in vitro* οξείδωση ορού

Η οξείδωση ορού επάγεται από $CuSO_4$ σε απουσία (δείγμα ελέγχου σε αιθανόλη) ή παρουσία φαινολικών ενώσεων (διαλύονται σε αιθανόλη). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως χρόνος καθυστέρησης lag time (αντίσταση του ορού στην οξείδωση).

Α: Η τυροσόλη και τα ακετυλιωμένα παράγωγα της

TAc1: ακετυλιωμένη τυροσόλη στο αρωματικό- OH TAc2: ακετυλιωμένη τυροσόλη στο αλειφατικό -OH

TAc3:διακετυλιωμένη τυροσόλη
B: Η ρεσβερατρόλη και τα ακετυλιωμένα παράγωγα της
RAc1: 4'-ακετυλιωμένη ρεσβερατρόλη, RAc2: 3-ακετυλιωμένη ρεσβερατρόλη, RAc3: 3,5-διακετυλιωμένη ρεσβερατρόλη, RAc4: 3,4'-διακετυλιωμένη ρεσβερατρόλη, RAc5: 3,5,4'-τριακετυλιωμένη ρεσβερατρόλη
*p<0.05 σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου
# p<0.05 σε σύγκριση με 0,8 mM του T ή R, μεταξύ διαφορετικών ενώσεων
^ p<0.05 σε σύγκριση με 0,8 mM, μεταξύ των διάφορων συγκεντρώσεων για την ίδια ένωση

6.1.4 Αναστολή του ενζύμου λιποοξυγονάσης (LOX)

Η Τυροσόλη, τα 3 ακετυλιωμένα αλλά και το γλυκουρονιωμένο παράγωγό (Γ.Π.) της δοκιμάστηκαν σε διάφορες συγκεντρώσεις (0,05-0,4mM), αλλά δεν εμφάνισαν ανασταλτική δράση έναντι της λιποοξυγονάσης.

Από την άλλη, η επίδραση της ρεσβερατρόλης στην δραστικότητα LOX ήταν δοσοεξαρτώμενη (**Γράφημα 4Α**) με τις συγκεντρώσεις 0,2, 0,25, 0,3mM να παρουσιάζουν 41%, 59% και 74% ανασταλτική δράση, αντίστοιχα (ρ<0,05 σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου). Για τη ρεσβερατρόλη η τιμή IC_{50} υπολογίστηκε στα 0,22 ± 0,025mM, και για το λόγο αυτό η συγκέντρωση που επιλέχθηκε να εξεταστεί η δράση των ακετυλιωμένων παραγώγων της ήταν τα 0,2mM.

Επίσης πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη της λιποοξυγονάσης απουσία και παρουσία της ρεσβερατρόλης προκειμένου να προσδιοριστεί ο τύπος της αναστολής που προκαλεί η ρεσβερατρόλη. Τα πειράματα που έγιναν έδειξαν ότι οι τιμές Km ήταν 51,5μM±2,3 και Vmax 0,073 ± 0,0013 ΔΑ/Δt, για τη λιποοξυγονάση. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σύμφωνα με τους Lineweaver-Burk (**Γράφημα 4Β**). Οι εκτιμώμενες τιμές με την παρουσία της ρεσβερατρόλης ήταν Kp 244 μM ± 30 και Vp 0,064 ΔΑ / Δt ± 0,006 (**Γράφημα 4Β**), τιμές που διέφεραν με το Km (p <0,001) και τη Vmax (p = 0,002), άρα εμφανίζεται μικτή αναστολή αφού το Kp > Km και

Vp < Vmax.

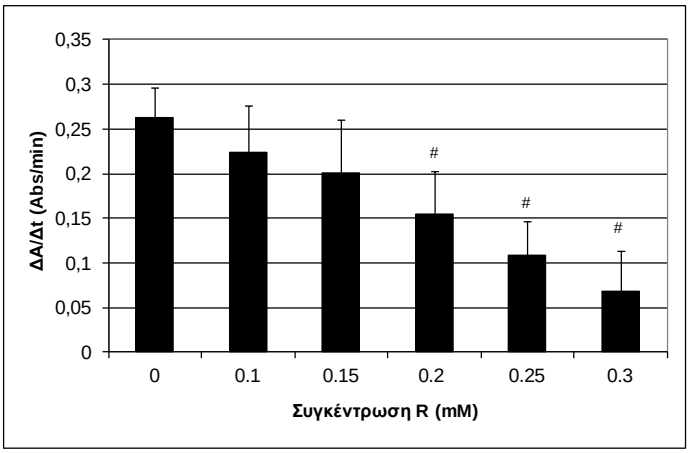
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο **Γράφημα 5Α**, τα παράγωγα RAc1 (4'-ακέτυλο-ρεσβερατρόλη) και RAc2 (5-ακετυλο-ρεσβερατρόλη) ανέστειλαν περίπου στο 20% τη δραστικότητα της LOX (p≤0,05 σε σύγκριση με τη ρεσβερατρόλη και το δείγμα ελέγχου). Αντίθετα τα ακετυλιωμένα παράγωγα της τυροσόλης όπως και η αρχική ένωση σε συγκεντρώσεις 0,05-0,4mM, δεν εμφάνισαν ανασταλτική δράση έναντι της λιποοξυγονάσης.

Τα μεθυλιωμένα παράγωγα της ρεσβερατρόλης δοκιμάστηκαν στη συγκέντρωση των 0,2mM, που σύμφωνα με προηγούμενα πειράματα είναι η τιμή που αποτελεί το

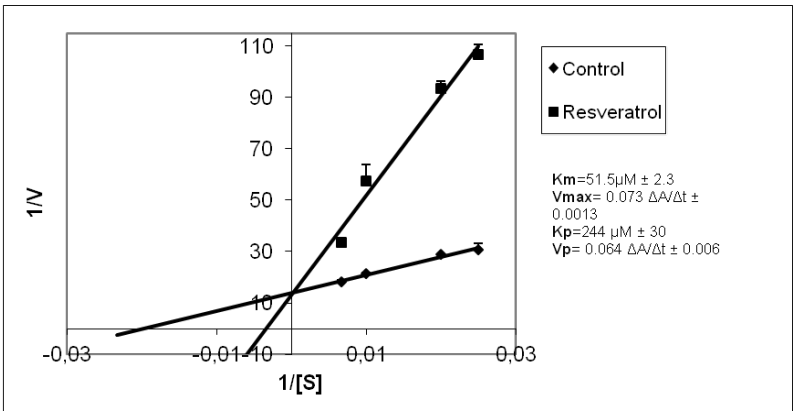
IC_{50} της ρεσβερατρόλης. Όπως φαίνεται στο **Γράφημα 5Β**, το παράγωγο RMeth1 σχεδόν διατήρησε τη δράση της ρεσβερατρόλης αφού παρουσίασε αναστολή της τάξης του 41±22%. Το παράγωγο RMeth2 εμφάνισε μικρότερη δράση από τη ρεσβερατρόλη με ποσοστό αναστολής 26±17% (#p ≤0,05 σε σύγκριση με συνθήκες πειράματος χωρίς φαινολική ένωση, *p≤0,05 σε σύγκριση με τη ρεσβερατρόλη), ενώ το RMeth4 δεν επηρέασε τη δραστικότητα του ενζύμου LOX. Από την άλλη πλευρά, το παράγωγο RMeth3 εμφάνισε βελτιωμένη δράση έναντι της ρεσβερατρόλης, αφού το ποσοστό αναστολής που παρουσίασε είναι της τάξης του 70±18% (*p≤0,05 σε σύγκριση με την αρχική φαινολική ένωση).

Όσο αφορά τα Γ.Π. της ρεσβερατρόλης (**Γράφημα 5Γ**), το παράγωγο RGlu1 εμφάνισε πιο μειωμένη δράση σε σχέση με τη ρεσβερατρόλη με ποσοστό αναστολής της τάξης του 24±9%, ενώ το RGlu2 δεν επηρέασε τη δραστικότητα του ενζύμου LOX (* p ≤ 0,05 σε σύγκριση με την R).

4A



4B



Γράφημα 4: Η επίδραση της ρεσβερατρόλης στη δραστικότητα του ενζύμου λιποοξυγονάσης (LOX)

Το μίγμα επωάσεως αποτελείται από το ένζυμο σε ρυθμιστικό διάλυμα βορικού οξέος 0,2M (pH 9.0) σε απουσία (δείγμα ελέγχου με DMSO) ή παρουσία της φαινολικής ένωσης διαλυμένη σε DMSO. Μετά από προ-επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5min στο σκοτάδι, η αντίδραση ξεκίνησε με την προσθήκη λινελαϊκού οξέος. Η μετατροπή του λινελαϊκού οξέος προς 13-υδροξυπεροξυλινελαικού οξέος καταγράφηκε στα 234nm (σε θερμοκρασία 37ºC).

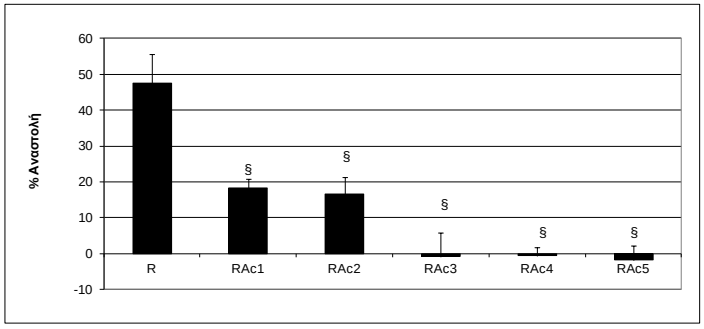
4Α. Δοσοεξαρτώμενη επίδραση της ρεσβερατρόλης (0,1-0,3mM τελική συγκέντρωση) στη δραστικότητα της LOX. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ταχύτητα ΔΑ/Δt (Abs/ min).

# p<0,05 σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου

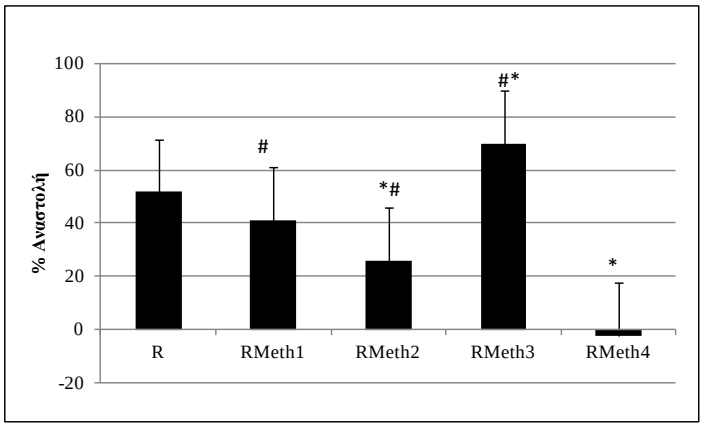
4Β. Κινητική μελέτη της λιποοξυγονάσης από σόγια

Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε Lineweaver-Burk καμπύλες και ο υπολογισμός των τιμών Km και Vmax (χωρίς R) ήταν 51,5 ± 2,3μM και 0,073 ± 0,0013 ΔΑ / Δt αντίστοιχα. Ο υπολογισμός των τιμών Kp και VP (με R) ήταν 244 ± 30 μM και 0,064 ± 0,006 ΔΑ / Δt αντίστοιχα.

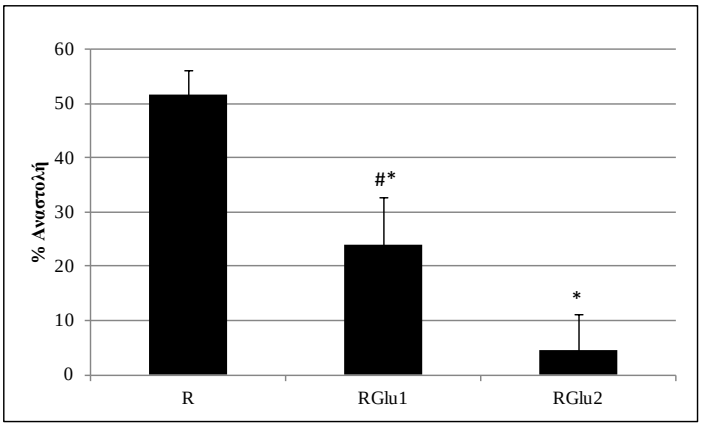
5A



5B



5Γ



Γράφημα 5: Η επίδραση της ρεσβερατρόλης και των παραγώγων της στη δραστικότητα του ενζύμου λιποοξυγονάσης (LOX)

5Α: Επίδραση της ρεσβερατρόλης και των ακετυλιωμένων παραγώγων σε συγκέντρωση ίση με τη τιμή IC_{50} της ρεσβερατρόλης (0,2mM) στη δραστικότητα της LOX. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % αναστολή σε σχέση με τα δείγμα ελέγχου, δηλαδή χωρίς την προσθήκη φαινολικής ένωσης.

§ $\rho<0,02$ σε σύγκριση με την R

RAc1: 4'-ακετυλιωμένη ρεσβερατρόλη, RAc2: 3-ακετυλιωμένη ρεσβερατρόλη, RAc3: 3,5-διακετυλιωμένη ρεσβερατρόλη, RAc4: 3,4'-διακετυλιωμένη ρεσβερατρόλη, RAc5: 3,5,4'-τριακετυλιωμένη ρεσβερατρόλη

5Β: Επίδραση της ρεσβερατρόλης και των μεθοξυ-παραγώγων σε συγκέντρωση ίση με τη τιμή IC_{50} της ρεσβερατρόλης (0,2mM) στη δραστικότητα της LOX. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % αναστολή σε σχέση με τα δείγμα ελέγχου, δηλαδή χωρίς την προσθήκη φαινολικής ένωσης.

#$\rho<0,05$ σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου *$\rho<0,05$ σε σύγκριση με την R

RMeth1: 4'-μεθοξυ ρεσβερατρόλη, RMeth2: 3- μεθοξυ ρεσβερατρόλη, RAc3: 3,5-διμεθοξυ ρεσβερατρόλη, RMeth4: 3,4',5-τριμεθοξυ ρεσβερατρόλη

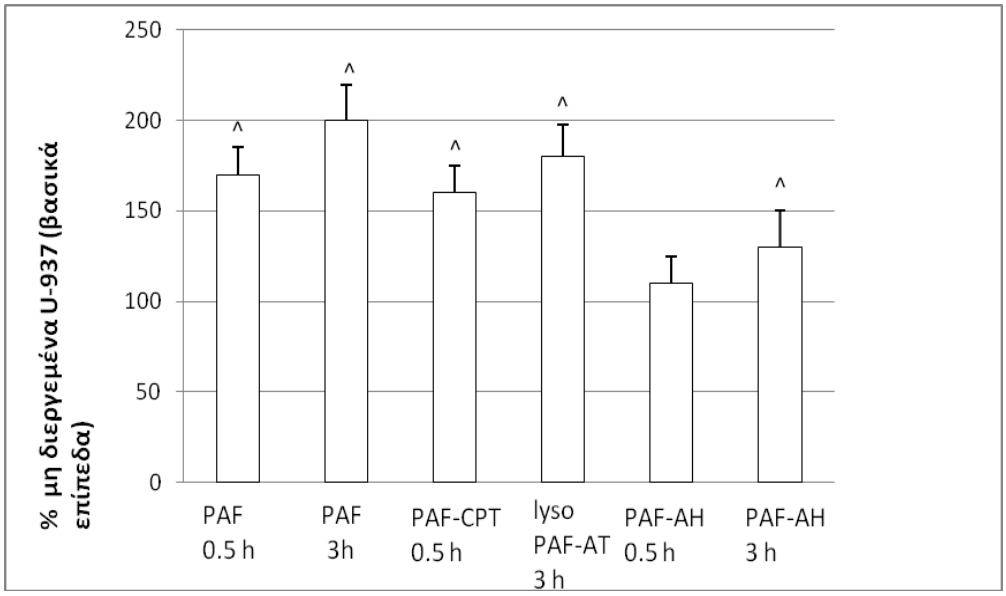
5Γ: Επίδραση της ρεσβερατρόλης και των γλυκουρονιωμένων παραγώγων σε συγκέντρωση ίση με τη τιμή IC_{50} της ρεσβερατρόλης (0,2mM) στη δραστικότητα της LOX. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % αναστολή σε σχέση με τα δείγμα ελέγχου, δηλαδή χωρίς την προσθήκη φαινολικής ένωσης.

#$\rho<0,05$ σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου *$\rho<0,05$ σε σύγκριση με την R

RGlu1: 3-γλυκουρονιωμένη ρεσβερατρόλη, RGlu2: 4'- γλυκουρονιωμένη ρεσβερατρόλη

6.2 Επιβεβαίωση του μοντέλου φλεγμονής στα U937

Πρόδρομα πειράματα διεξήχθησαν για τη επιβεβαίωση του μοντέλου φλεγμονής, που παρουσιάστηκε σε προηγούμενη μελέτη [57], όπου η διέγερση με IL-1β οδηγεί σε αύξηση των ενδοκυτταρικών επίπεδων του PAF (**Γράφημα 6**). Τα ευρήματα της μελέτης επιβεβαιώθηκαν, δηλαδή η IL-1β σε συγκέντρωση 2,5ng/mL, διεγείρει κατά 100% τα ενδοκυτταρικά επίπεδα του PAF σε σχέση με τα μη διεγερμένα κύτταρα (PAF αρχικές τιμές: 1fmol/μg πρωτεΐνης ± 0,2, τα επίπεδα του PAF μετά τη διέγερση με IL-1β στη 0,5h είναι 1,5fmol/μg πρωτεΐνης ± 0,1 και στις 3h είναι 2,3fmol/μg πρωτεΐνης ± 0,3), καθώς και την ειδική δραστικότητα της λυσο PAF-AT στις 3h, ενώ αυξάνεται η ειδική δραστικότητα της PAF-CPT και τα ενδοκυτταρικά επίπεδα του PAF κατά 50% στη 0,5h. Η IL-1β διεγείρει επίσης την ειδική δραστικότητα της PAF-AH κατά 30% στις 3h, ενώ δεν παρουσιάζει καμία επίδραση στη 0,5h.



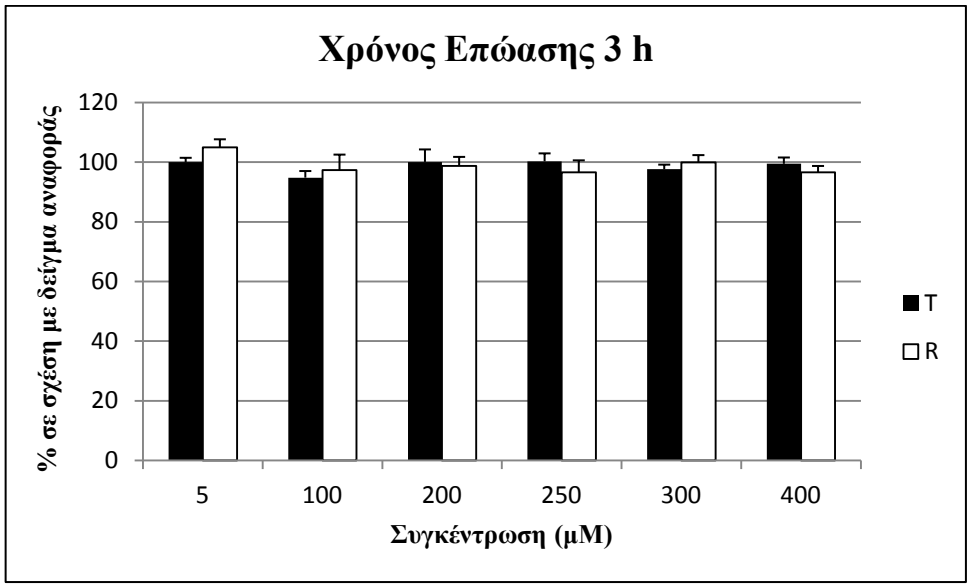
Γράφημα 6: Η επίδραση της IL-1β στο μεταβολισμό του PAF στα κύτταρα U937

Η IL-1β σε συγκέντρωση 2,5ng/mL προκάλεσε την αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων του PAF στη 0,5 και 3h. Η IL-1β προκαλεί αύξηση της δραστικότητας της λυσο PAF-AT στις 3 h και της PAF CPT στη 0,5h. Τέλος, μια παροδική διέγερση της ενδοκυτταρικής PAF-AH προκλήθηκε από την IL-1β στις 3h, χωρίς να εμφανίζεται επίδραση στη 0,5h.

^ $p \leq 0,05$ σε σύγκριση με τα μη διεγερμένα κύτταρα (αρχικά επίπεδα)

6.3 Επίδραση των αρχικών φαινολικών ενώσεων στη βιωσιμότητα των U937

Η Τυροσόλη(T) και η Ρεσβερατρόλη(R) στο εύρος συγκεντρώσεων από 5 έως 400μM δοκιμάστηκαν σε όλες τις χρονικές στιγμές που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα. Στο παρακάτω γράφημα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από το μέγιστο χρόνο επώασης που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα, δηλαδή τις 3h. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν υπήρχε σημαντική επίδραση στη βιωσιμότητα των κυττάρων (**Γράφημα 7**).



Γράφημα 7: Η επίδραση των διάφορων συγκεντρώσεων τυροσόλης (T) και της ρεσβερατρόλης (R) στη βιωσιμότητα των κυττάρων U-937.

Τα U937 επωάστηκαν με διάφορες συγκεντρώσεις της τυροσόλης ή της ρεσβερατρόλης για 3h και ακολούθησε η δοκιμασία βιωσιμότητας MTT. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % σε σχέση με το δείγμα αναφοράς στις 3h.

6.4 Επίδραση των αρχικών φαινολικών ενώσεων στο μεταβολισμό του PAF στα μη διεγερμένα U937 κύτταρα

Η T και η R δοκιμάστηκαν σε συγκεντρώσεις από 10 έως 400μM σε μη διεγερμένα κύτταρα U937, προκειμένου να εξεταστεί η επίδρασή τους στα ενδοκυτταρικά επίπεδα του PAF και στην ειδική δραστικότητα των ενζύμων του, στη 0,5 και 3h. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η R μόνο στα 300μM αυξάνει στατιστικώς σημαντικά τα ενδοκυτταρικά επίπεδα του PAF, επίσης διεγείρει την ειδική δραστικότητα της PAF-CPT στη 0,5h με τρόπο παρόμοιο με τη δράση της IL-1β. Από την άλλη πλευρά, η R στα 50μM αυξάνει τα επίπεδα του PAF στατιστικώς

σημαντικά στις 3h, χωρίς να επηρεάζεται η δραστικότητα της λυσο PAF-AT, ενώ στα 100μM διεγείρεται η ειδική δραστικότητα της PAF-AH στα δύο χρονικά σημεία κατά τρόπο παρόμοιο με τη δράση της IL-1β. Όλες οι άλλες συγκεντρώσεις της ρεσβερατρόλης δεν επηρέασαν τα επίπεδα του PAF ή την ειδική δραστικότητα των ενζύμων του στις 0,5 και 3h (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται). Η T δεν επηρέασε το μεταβολισμό και τα επίπεδα του PAF στα μη διεγερμένα κύτταρα (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται).

6.5 Επίδραση των αρχικών φαινολικών ενώσεων στο μεταβολισμό του PAF στα διεγερμένα U937 κύτταρα

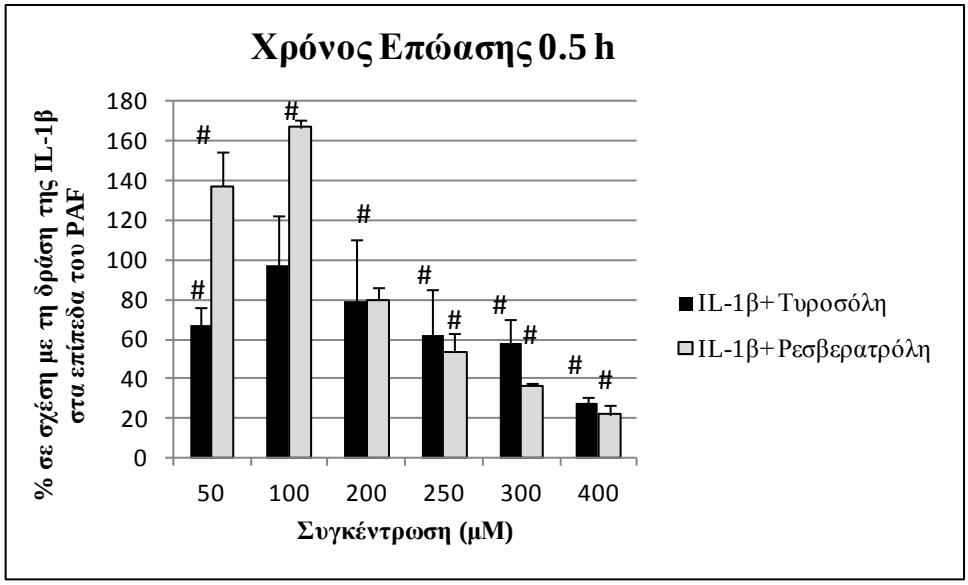
6.5.1 Επίδραση των αρχικών φαινολικών ενώσεων στα ενδοκυτταρικά επίπεδα του PAF στα διεγερμένα U937 κύτταρα

Η T και η R ελέγχθηκαν για τη δράση τους, σε διάφορες συγκεντρώσεις, στην επαγόμενη από την IL-1β αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων του PAF στη 0,5 και 3h.

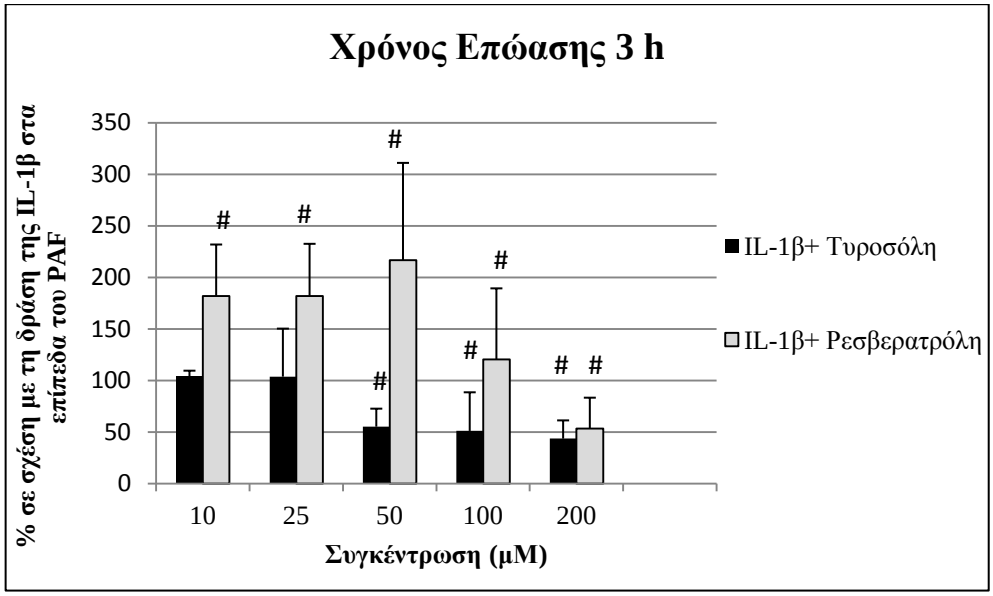
Η T παρουσίασε ανασταλτική δράση στην επαγόμενη από IL-1β αύξηση των επιπέδων του PAF στη 0,5h με μορφή κώδωνα, όπως φαίνεται στο Γράφημα 8A με στατιστική σημαντικότητα στις συγκεντρώσεις 50, 250, 300 και 400μM (# $p \leq 0.05$ σε σύγκριση με τη δράση της IL-1β). Η συγκέντρωση που ήταν ικανή να επάγει 50% αναστολή στη δράση της IL-1β υπολογίστηκε στα 304±18μM. Η επίδραση της ρεσβερατρόλης στα ενδοκυτταρικά επίπεδα του PAF στη 0,5h ήταν πιο περίπλοκη, δεδομένου ότι η ρεσβερατρόλη σε χαμηλές συγκεντρώσεις (50 και 100μM) προκαλούσε τη μεγαλύτερη αύξηση των επιπέδων του PAF (# $p \leq 0.05$ σε σύγκριση με τη δράση της IL-1β). Από τα 200 έως τα 400μM παρατηρήθηκε μείωση των επίπεδων του PAF (**Γράφημα 8A**) και η συγκέντρωση της ρεσβερατρόλης που προκαλεί 50% αναστολή στη δράση της IL-1β υπολογίστηκε στα 281 ± 3μM. Όσον αφορά τα ενδοκυτταρικά επίπεδα του PAF στις 3h η τυροσόλη σε συγκεντρώσεις 10 και 25μM δεν επηρέασε την επαγόμενη από IL-1β αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων του PAF, ενώ ανασταλτική δράση παρατηρήθηκε από τα 50 έως τα 200μM (**Γράφημα 8B**). Η συγκέντρωση που είναι ικανή να επάγει 50% αναστολή στη δράση της IL-1β υπολογίστηκε στα 82 ± 40μM. Η ρεσβερατρόλη σε συγκεντρώσεις 10, 25, και 50μM προκάλεσε επιπλέον αύξηση στα ενδοκυτταρικά επίπεδα του PAF στις 3h.

Αντιθέτως, σε εύρος συγκεντρώσεων 100-200μM μειώνει τα επίπεδα του PAF σε σχέση με τη δράση της IL-1β (Γράφημα 8B) και η συγκέντρωση που προκαλεί 50% αναστολή στη δράση της υπολογίστηκε στα 200 ± 32μM.

8A



8B



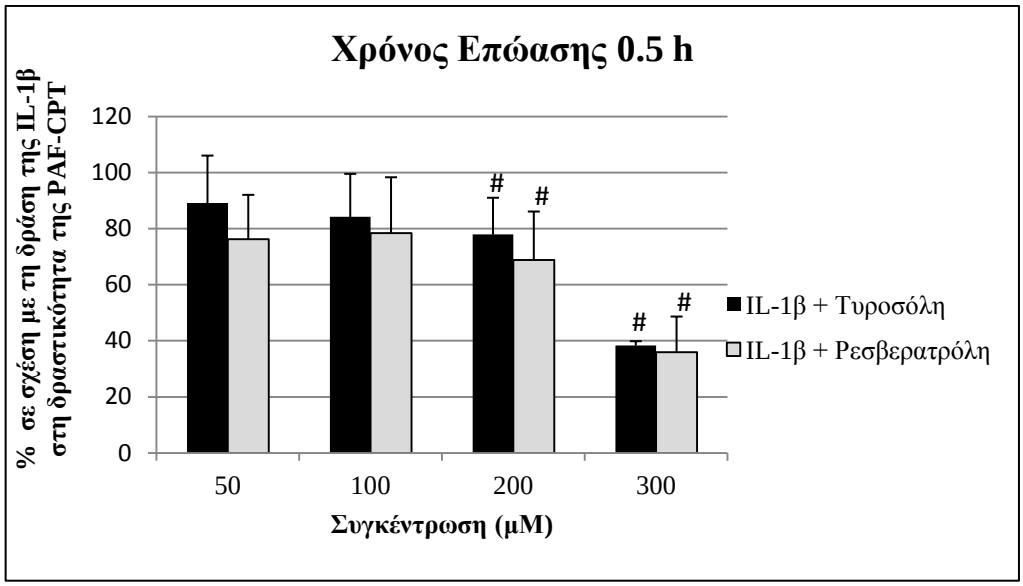
Γράφημα 8: Η επίδραση της τυροσόλης και της ρεσβερατρόλης στα ενδοκυτταρικά επίπεδα του PAF στα διεγερμένα U937

Τα U937 συν-επωάστηκαν με IL-1β (2,5ng/mL) και διαφορετικές συγκεντρώσεις της τυροσόλης ή της ρεσβερατρόλης. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % της δράσης της IL-1β στα επίπεδα του PAF A) στη 0,5h και B) στις 3h.

$p \leq 0,05$ σε σχέση με τη δράση της IL-1β

6.5.2 Επίδραση των αρχικών φαινολικών ενώσεων στη δραστικότητα της PAF-CPT στα διεγερμένα U937 κύτταρα

Η παρατηρούμενη ανασταλτική δράση των T, R στην επαγόμενη από την IL-1β αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων του PAF μπορεί να αποδοθεί στη ρύθμιση της δραστικότητας των βιοσυνθετικών του ενζύμων. Προκειμένου να διευκρινιστεί αυτό, εξετάστηκε η επίδραση των αρχικών φαινολικών ενώσεων στη δραστικότητα του βιοσυνθετικού ενζύμου PAF-CPT στη 0,5h (**Γράφημα 9**). Η Τυροσόλη και η Ρεσβερατρόλη ελέγχθηκαν σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται ανάμεσα στα 50-300μM. Η ανασταλτική δράση της T και της R στη δραστικότητα της PAF-CPT παρατηρήθηκε σε συγκεντρώσεις 200 και 300μM (# $p \leq 0,05$ σε σύγκριση με τη δράση της IL-1β). Οι συγκεντρώσεις που επάγουν 50% αναστολή υπολογίστηκαν στα 246 ± 61μM και κατά 294 ± 102μM αντίστοιχα για την T και την R.



Γράφημα 9: Η επίδραση της τυροσόλης και της ρεσβερατρόλης στη δραστικότητα της PAF CPT στα διεγερμένα U937

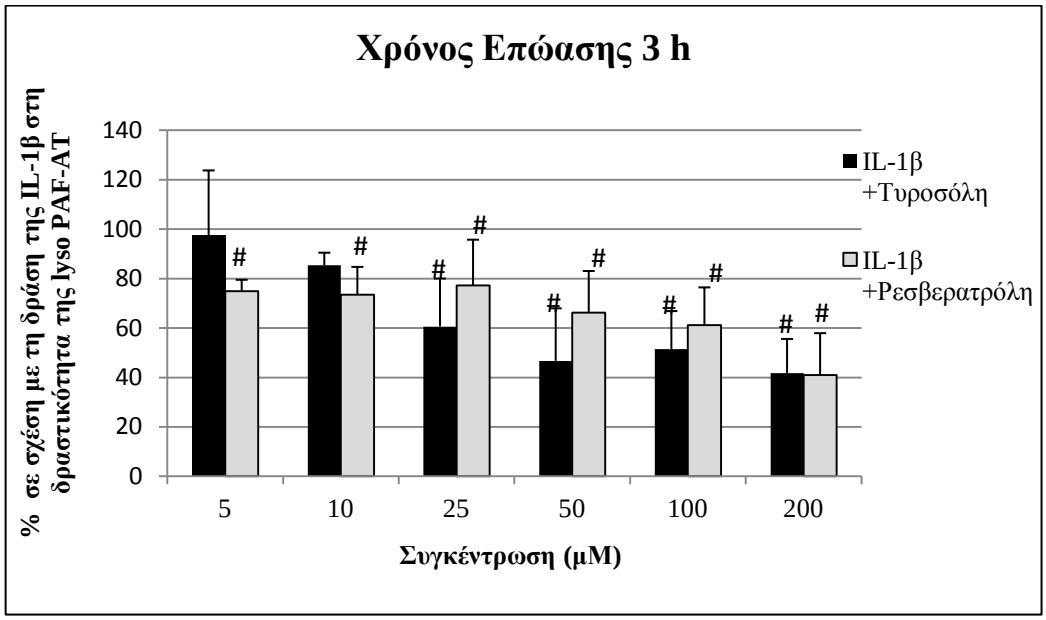
Τα U937 συν-επωάστηκαν με IL-1β (2,5ng/mL) και διαφορετικές συγκεντρώσεις της τυροσόλης ή της ρεσβερατρόλης. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % της δράσης της IL-1β στη δραστικότητα της PAF-CPT στη 0,5h.

$p \leq 0,05$ σε σχέση με τη δράση της IL-1β

6.5.3 Επίδραση των αρχικών φαινολικών ενώσεων στη δραστικότητα της λυσο PAF-AT στα διεγερμένα U937 κύτταρα

Η επίδραση των T, R μελετήθηκε επίσης στη δραστικότητα του άλλου βιοσυνθετικού ενζύμου του PAF, δηλαδή της λυσο PAF-AT στις 3h όπου σύμφωνα με την προηγούμενη μελέτη εμφανιζόταν η μέγιστη αύξηση της δραστικότητας του ύστερα από διέγερση με IL-1β.

Η Τυροσόλη δοκιμάστηκε σε ένα εύρος συγκεντρώσεων από 5 έως 200μM. Αναλυτικά, μέχρι τα 50μM παρατηρήθηκε προοδευτική μείωση στη δραστικότητα του ενζύμου (**Γράφημα 10**), ενώ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις παρατηρήθηκε μία σταθερή ανασταλτική δράση της τάξης του 60%. Η συγκέντρωση που επάγει 50% αναστολή υπολογίστηκε στα 48±11μM. Η δράση της ρεσβερατρόλης ήταν διαφορετική από την τυροσόλη αφού στις χαμηλές συγκεντρώσεις των 5, 10 και 25μM, ανέστειλε την ειδική δραστικότητα της λυσο PAF-AT κατά 20%, ενώ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις αυξάνεται σταδιακά η ανασταλτική δράση. Η συγκέντρωση που επάγει 50% αναστολή έναντι της δράσης της IL-1β υπολογίστηκε στα 157 ± 77μM.

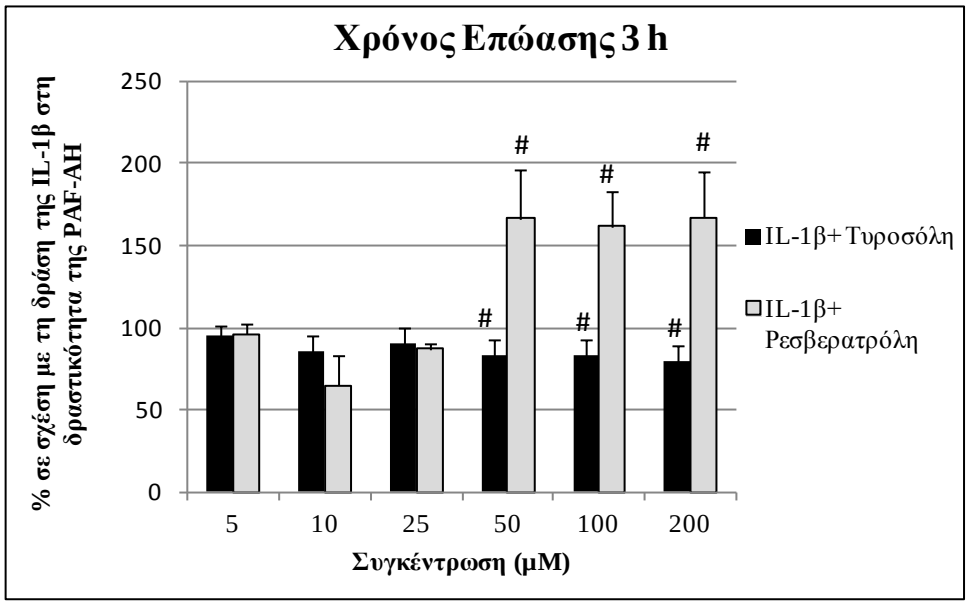


Γράφημα 10: Η επίδραση της τυροσόλης και της ρεσβερατρόλης στη δραστικότητα της λυσο PAF-AT στα διεγερμένα U-937

Τα U937 συν-επωάστηκαν με IL-1β (2,5ng/mL) και διαφορετικές συγκεντρώσεις της τυροσόλης ή της ρεσβερατρόλης. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % της δράσης της IL-1β στη δραστικότητα της λυσο PAF-AT στις 3h. # $p \leq 0,05$ σε σχέση με τη δράση της IL-1β

6.5.4 Επίδραση των αρχικών φαινολικών ενώσεων στη δραστικότητα της PAF-AH στα διεγερμένα U937 κύτταρα

Στις πειραματικές μας συνθήκες η τυροσόλη και η ρεσβερατρόλη δεν επηρέασαν την ειδική δραστικότητα του ενζύμου PAF-AH στη 0,5h, ακόμη και όταν δοκιμάστηκαν σε μια ευρεία περιοχή συγκεντρώσεων (50-400μM). Τα πειράματα επίσης έγιναν και στις 3h, όπου η T στις συγκεντρώσεις 50, 100 και 200μM ανέστειλε τη δράση της IL-1β στην ειδική δραστικότητα της PAF-AH (#p ≤ 0.05 σε σύγκριση με τη δράση της IL-1β), κατά 15-20% (**Γράφημα 11**). Από την άλλη, η R στις ίδιες συγκεντρώσεις οδηγεί σε αύξηση της ειδικής δραστικότητας της PAF-AH σε σχέση με την IL-1β (#p ≤ 0,05 σε σύγκριση με τη δράση της IL-1β), κατά 50-60% (**Γράφημα 11**).



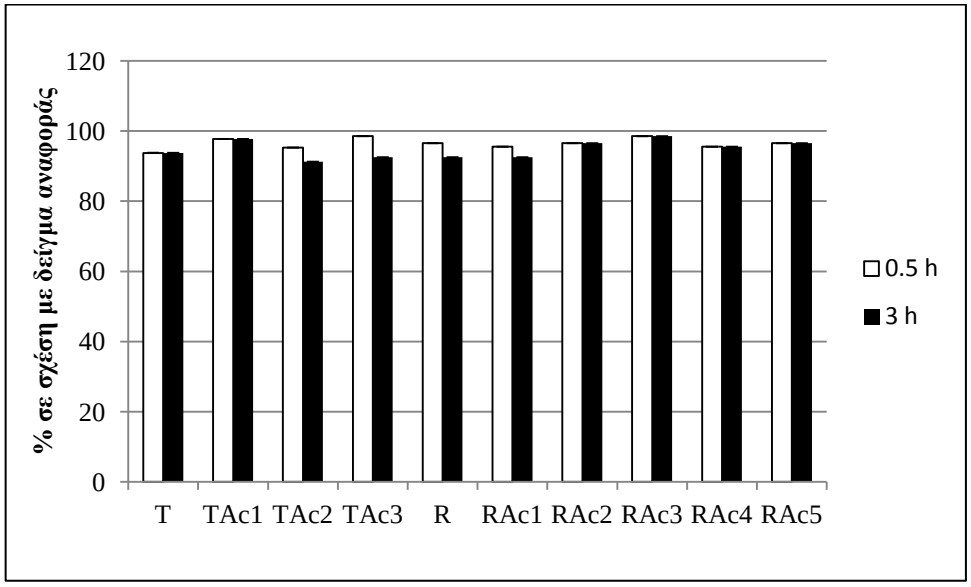
Γράφημα 11: Η επίδραση της τυροσόλης και της ρεσβερατρόλης στη δραστικότητα της PAF-AH στα διεγερμένα U937

Τα U937 συν-επωάστηκαν με IL-1β (2,5ng/mL) και διαφορετικές συγκεντρώσεις της τυροσόλης ή της ρεσβερατρόλης. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % της δράσης της IL-1β στη δραστικότητα της PAF-AH στις 3h. # p ≤ 0,05 σε σχέση με τη δράση της IL-1β

6.6 Επίδραση των ακετυλιωμένων παραγώγων στη βιωσιμότητα των U937

Τα ακετυλιωμένα παράγωγα (Α.Π.) της τυροσόλης και της ρεσβερατρόλης, δοκιμάστηκαν σε όλες τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα. Τα

αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν υπήρχε σημαντική επίδραση στη βιωσιμότητα των κυττάρων (**Γράφημα 12**).



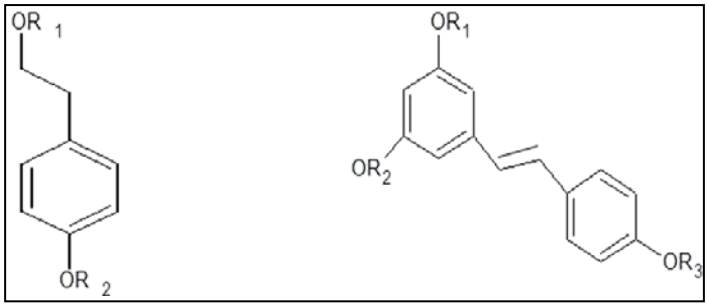
Γράφημα 12: Η επίδραση των ακετυλιωμένων παραγώγων της τυροσόλης (T) και της ρεσβερατρόλης (R) στη βιωσιμότητα των κυττάρων U-937

Τα U937 επωάστηκαν με τα ακετυλιωμένα παράγωγα της τυροσόλης σε συγκέντρωση 250μM και της ρεσβερατρόλης στη 0,5 h. Στις 3 h τα ακετυλιωμένα παράγωγα τυροσόλης δοκιμάστηκαν στα 50μM και της ρεσβερατρόλης στα 150μM. Στη συνέχεια ακολούθησε η δοκιμασία βιωσιμότητας MTT. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % σε σχέση με το δείγμα αναφοράς την αντίστοιχη χρονική στιγμή.

6.7 Επίδραση των ακετυλιωμένων παραγώγων των φαινολικών ενώσεων στο μεταβολισμό του PAF στα διεγερμένα U937 κύτταρα

6.7.1 Επίδραση των ακετυλιωμένων φαινολικών ενώσεων στα ενδοκυτταρικά επίπεδα του PAF στα διεγερμένα U-937 κύτταρα

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της επίδρασης των αρχικών ενώσεων στα ενδοκυτταρικά επίπεδα του PAF στη 0,5 h, η συγκέντρωση των 250μM (περίπου 50% αναστολή) επιλέχθηκε προκειμένου να εξεταστεί η επίδραση των Α.Π. της τυροσόλης και της ρεσβερατρόλης.



T: R_1=R_2=H	R: R_1=R_2=R_3=H
TAc1: R_1=H R_2=$COCH_3$	RAc1: R_1=R_2=H R_3= $COCH_3$
TAc2: R_1=$COCH_3$ R_2=H	RAc2: R_1= $COCH_3$ R_2=R_3=H
TAc3: R_1=$COCH_3$ R_2= $COCH_3$	RAc3: R_1= R_2=$COCH_3$ R_3=H
	RAc4: R_1= H R_2= R_3=$COCH_3$
	RAc5: R_1=R_2=R_3= $COCH_3$

Σχήμα 13: Η δομή των ακετυλιωμένων παραγώγων της τυροσόλης και της ρεσβερατρόλης. Η χημική σύνθεση, ο διαχωρισμός και η ταυτοποίηση τους αναφέρεται στη μεθοδολογία.

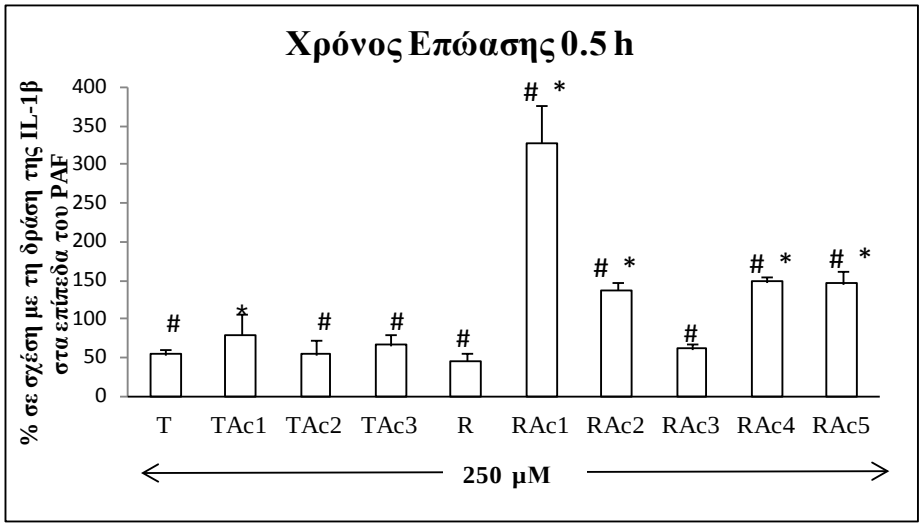
Τα αποτελέσματα που αφορούν τα ενδοκυτταρικά επίπεδα του PAF στη 0,5 h παρουσιάζονται στο **Γράφημα 13Α** και δείχνουν ότι τα παράγωγα TAc2 και TAc3, έχουν ισοδύναμη ανασταλτική δράση με την τυροσόλη. Από την άλλη πλευρά, η ακετυλίωση του υδροξυλίου στο φαινολικό δακτύλιο, δηλαδή το TAc1 παράγωγο, οδήγησε σε μειωμένη ανασταλτική δράση (*p≤0,05 σε σύγκριση με την T). Μεταξύ των πέντε ακετυλιωμένων παραγώγων της ρεσβερατρόλης (**Γράφημα 13Α**), μόνο το παράγωγο RAc3 εμφάνισε την ίδια ανασταλτική δράση με τη ρεσβερατρόλη έναντι της δράσης της IL-1β, ενώ τα άλλα παράγωγα RAc1, RAc2, RAc4 και RAc5 φαίνεται να επάγουν την αύξηση των επιπέδων του PAF (* p≤0,05 σε σύγκριση με την R, # p≤0,05 σε σύγκριση με τη δράση της IL-1β), με το RAc1 να είναι το πιο ισχυρό.

Με βάση τις τιμές των IC_{50} T και R έναντι της δράσης της IL-1β στα ενδοκυτταρικά επίπεδα του PAF στις 3 h, τα ακετυλιωμένα παράγωγα της T ελέγχθηκαν στα 50μM και αυτά της R στα 150μM. Όπως φαίνεται στο **Γράφημα**

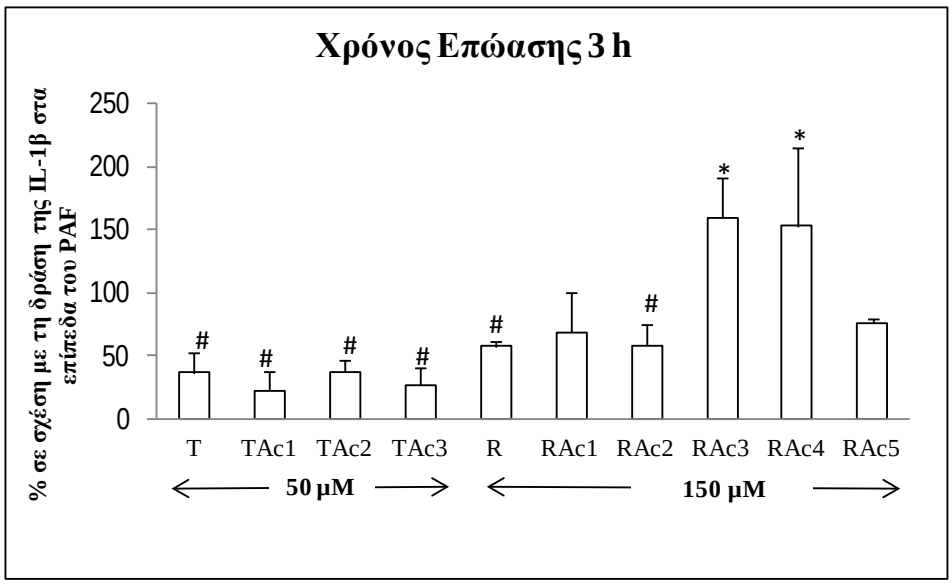
13B, και τα τρία Α.Π. της τυροσόλης διατήρησαν την ανασταλτική της δράση στα ενδοκυτταρικά επίπεδα του PAF στις 3h έναντι της δράσης της IL-1β.

Όσο αφορά τα παράγωγα της R, το παράγωγο RAc2 είχε παρόμοια δράση με τη ρεσβερατρόλη, ενώ το RAc1 είχε την τάση να εμφανίσει ανασταλτική επίδραση (p=0,06 σε σύγκριση με τη δράση της IL-1β). Τα παράγωγα RAc3 και RAc4 διέγειραν περαιτέρω την αύξηση των επιπέδων του PAF και άρα είχαν διαφορετική δράση σε σχέση με τη ρεσβερατρόλη (*p ≤ 0,05). Το παράγωγο RAc5 δεν επηρέασε τα επίπεδα του PAF στις 3h.

13 A



13 B



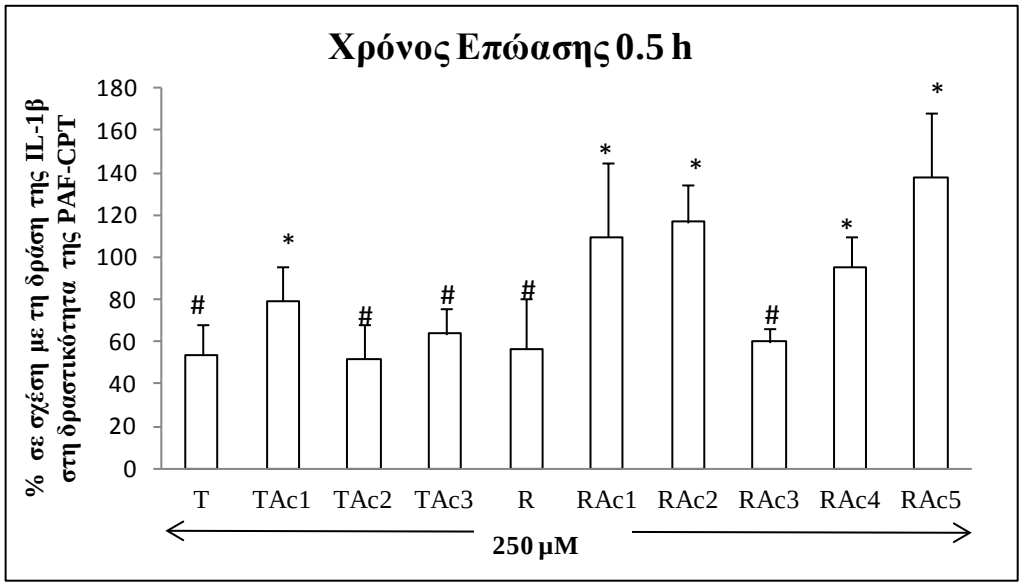
Γράφημα 13: Η επίδραση των ακετυλιωμένων παραγώγων τυροσόλης, ρεσβερατρόλης στα ενδοκυτταρικά επίπεδα του PAF στα διεγερμένα U937

Τα U937 συν-επωάστηκαν με IL-1β (2,5ng/mL) με τη τυροσόλη ή τη ρεσβερατρόλη και τα ακετυλιωμένα παράγωγα τους. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % της δράσης της IL-1β στα επίπεδα του PAF A) στη 0,5h και B) στις 3h.

$p \leq 0,05$ σε σχέση με τη δράση της IL-1β * $p \leq 0,05$ σε σχέση με την αρχική φαινολική ένωση

6.7.2 Επίδραση των ακετυλιωμένων φαινολικών ενώσεων στη δραστικότητα της PAF-CPT στα διεγερμένα U937 κύτταρα

Τα Α.Π. της Τυροσόλης ελέγχθηκαν στα 250μM. Τα παράγωγα TAc2 και TAc3 είχαν παρόμοια ανασταλτική δράση με την τυροσόλη (**Γράφημα 14**). Αντίθετα, η ακετυλίωση του φαινολικού δακτυλίου, δηλαδή το παράγωγο TAc1, εμφάνισε μειωμένη ανασταλτική δράση σε σχέση με τη δράση της αρχικής φαινολικής ένωσης (* $p \leq 0,05$ σε σύγκριση με T). Μεταξύ των πέντε ακετυλιωμένων παραγώγων της ρεσβερατρόλης, που δοκιμάστηκαν στα 250μM, το RAc3 ήταν ο πιο ισχυρός αναστολέας σε σχέση με τα άλλα παράγωγα αφού εμφάνισε δράση παρόμοια με τη ρεσβερατρόλη (**Γράφημα 14**). Το παράγωγο RAc4 παρουσίασε μειωμένη ανασταλτική δράση (* $p \leq 0,05$ σε σύγκριση με την R), ενώ τα παράγωγα RAc1, RAc2 και RAc5 εμφάνισαν χειρότερη δράση από τη R, σχεδόν διατηρώντας την επαγόμενη από IL-1β αύξηση της δραστικότητας της PAF-CPT (* $p \leq 0,05$ σε σύγκριση με την R).



Γράφημα 14: Η επίδραση των ακετυλιωμένων παραγώγων τυροσόλης, ρεσβερατρόλης στη δραστικότητα της PAF-CPT στα διεγερμένα U937

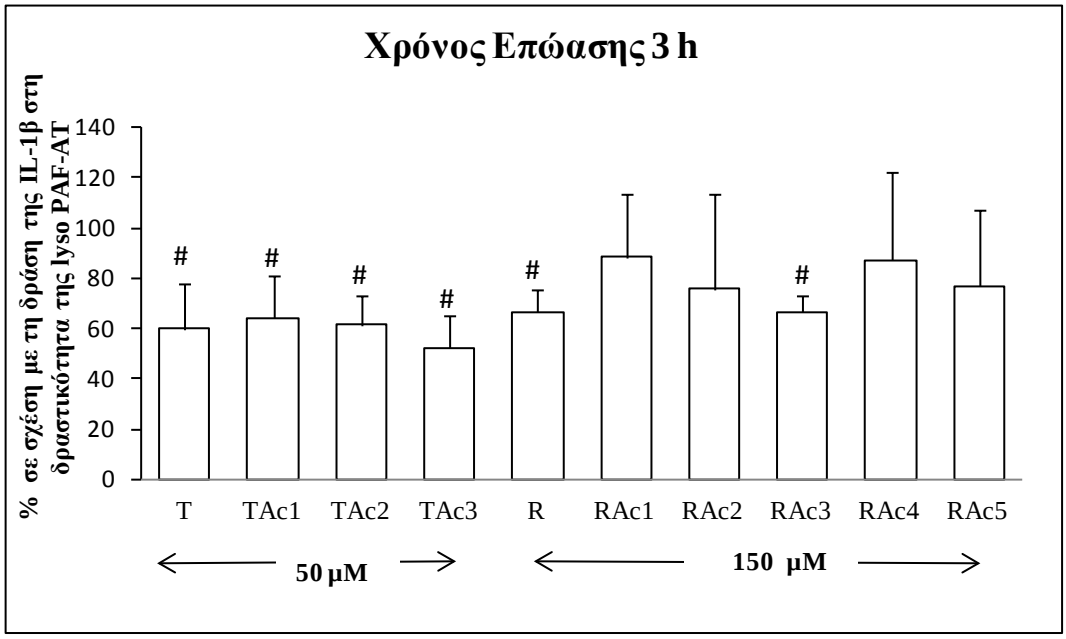
Τα U-937 συν-επωάστηκαν με IL-1β (2,5ng/mL) και με τη τυροσόλη ή τη ρεσβερατρόλη και τα ακετυλιωμένα παράγωγα τους. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % της δράσης της IL-1β στη δραστικότητα της PAF-CPT στη 0,5h.

$p \leq 0,05$ σε σχέση με τη δράση της IL-1β * $p \leq 0,05$ σε σχέση με την αρχική φαινολική ένωση

6.7.3 Επίδραση των ακετυλιωμένων φαινολικών ενώσεων στη δραστικότητα της λυσο PAF-AT στα διεγερμένα U937 κύτταρα

Η επίδραση των Α.Π. της T, R μελετήθηκε επίσης στη δραστικότητα του άλλου βιοσυνθετικού ενζύμου του PAF, δηλαδή της λυσο PAF-AT στις 3h όπου σύμφωνα με προηγούμενη μελέτη εμφανιζόταν η μέγιστη αύξηση της δραστικότητας του μετά τη δράση της IL-1β. Τα Α.Π. των αρχικών φαινολικών ενώσεων δοκιμάστηκαν σε συγκεντρώσεις που ήταν κοντά σε αυτή όπου οι αρχικές φαινολικές ενώσεις προκαλούσαν 50% της αναστολής στη δράση της IL-1β.

Έτσι όλα τα ακετυλιωμένα παράγωγα της τυροσόλης ελέγχθηκαν στα 50μM και είχαν την ίδια ανασταλτική δράση με το αρχικό μόριο (**Γράφημα 15**). Τα ακετυλιωμένα παράγωγα της ρεσβερατρόλης ελέγχθηκαν στα 150μM. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μόνο το παράγωγο RAc3 είχε παρόμοια ανασταλτική δράση με τη ρεσβερατρόλη (**Γράφημα 15**), ενώ τα υπόλοιπα τέσσερα παράγωγα δεν φαίνεται να αναστέλλουν τη δράση της IL-1β στη δραστικότητα του βιοσυνθετικού ενζύμου λυσο PAF-AT.



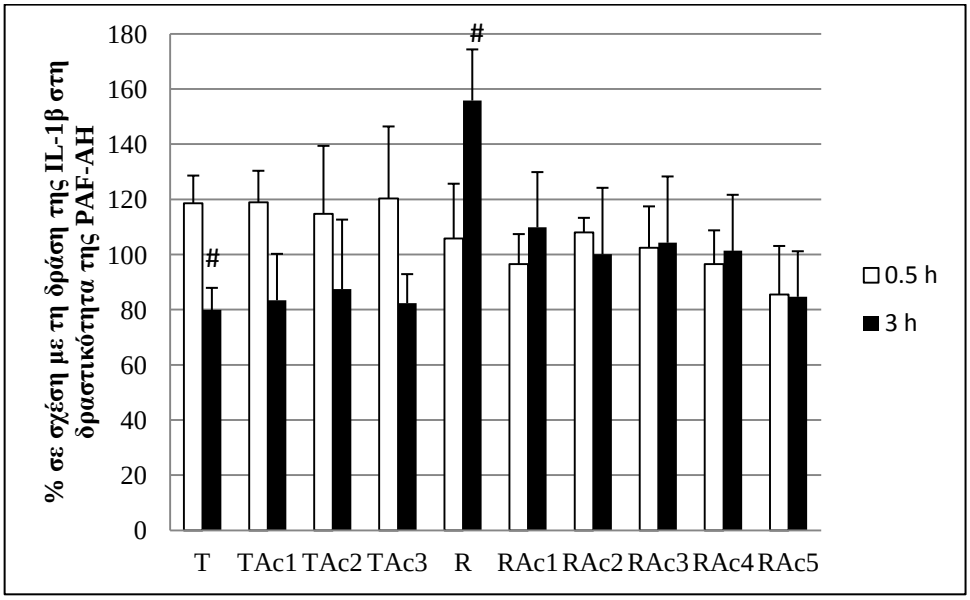
Γράφημα 15: Η επίδραση των ακετυλιωμένων παραγώγων τυροσόλης, ρεσβερατρόλης στη δραστικότητα της λυσο PAF-AT στα διεγερμένα U937

Τα U937 συν-επωάστηκαν με IL-1β (2,5ng/mL) και με τη τυροσόλη ή τη ρεσβερατρόλη και τα ακετυλιωμένα παράγωγα τους. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % της δράσης της IL-1β στη δραστικότητα της λυσο PAF-AT στις 3h.

$p \leq 0,05$ σε σχέση με τη δράση της IL-1β * $p \leq 0,05$ σε σχέση με την αρχική φαινολική ένωση

6.7.4 Επίδραση των ακετυλιωμένων παραγώγων στη δραστικότητα της PAF-AH σε διεγερμένα U937 κύτταρα

Τα Α.Π. των αρχικών φαινολικών ενώσεων ελέγχθηκαν στα 250μM στη 0,5h, αλλά κανένα από τα παράγωγα δεν επηρέασε τη δραστικότητα του αποικοδομητικού ενζύμου PAF-AH (**Γράφημα 16**). Επίσης τα Α.Π. της τυροσόλης και της ρεσβερατρόλης ελέγχθηκαν στα 50μM και 150μM αντίστοιχα, αλλά καμία επίδραση στην δραστικότητα της PAF-AH δεν ανιχνεύθηκε στις 3h (**Γράφημα 16**).



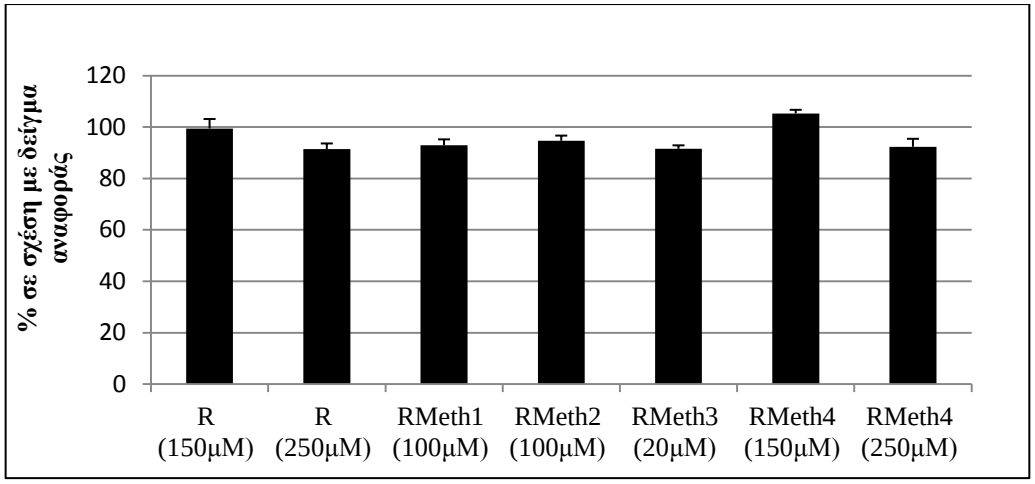
Γράφημα 16: Η επίδραση των ακετυλιωμένων παραγώγων τυροσόλης, ρεσβερατρόλης στη δραστικότητα της PAF-AH στα διεγερμένα U937

Τα U937 συν-επωάστηκαν με IL-1β (2,5ng/mL) και με τη τυροσόλη ή τη ρεσβερατρόλη και τα ακετυλιωμένα παράγωγα τους. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % της δράσης της IL-1β στη δραστικότητα της PAF-AH στη 0,5 h και στις 3h.

$p \leq 0,05$ σε σχέση με τη δράση της IL-1β

6.8 Επίδραση των μεθυλιωμένων παραγώγων της ρεσβερατρόλης στη βιωσιμότητα των U937

Τα μεθυλιωμένα παράγωγα (Μ.Π.) της ρεσβερατρόλης δοκιμάστηκαν σε όλες τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι μέγιστες δυνατές συγκεντρώσεις των παραγώγων που δεν επηρεάζουν τη βιωσιμότητα των κυττάρων είναι τα 100μM για τα μονο-μεθόξυ παράγωγα RMeth1, RMeth2 και τα 20μM για το 3,5-διμεθόξυ παράγωγο RMeth3. Ενώ το τριμεθόξυ παράγωγο RMeth4 δεν επηρέασε τη βιωσιμότητα των κυττάρων τόσο στα 150μM όσο και στα 250μM (**Γράφημα 17**).



Γράφημα 17: Η επίδραση των ακετυλιωμένων παραγώγων της τυροσόλης (T) και της ρεσβερατρόλης (R) στη βιωσιμότητα των κυττάρων U-937

Τα U937 επωάστηκαν με τη ρεσβερατρόλη και το παράγωγο RMeth4 σε συγκέντρωση 250μM στη 0,5 h και στα 150μM στις 3h. Ενώ τα παράγωγα RMeth1,2,3 παρουσιάζονται στις μέγιστες δυνατές συγκεντρώσεις που δεν επηρέαζαν τη βιωσιμότητα των κυττάρων στις 3h. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % σε σχέση με το δείγμα αναφοράς την αντίστοιχη χρονική στιγμή.

6.9 Επίδραση των μεθυλιωμένων παραγώγων της ρεσβερατρόλης στο μεταβολισμό του PAF στα διεγερμένα U937 κύτταρα

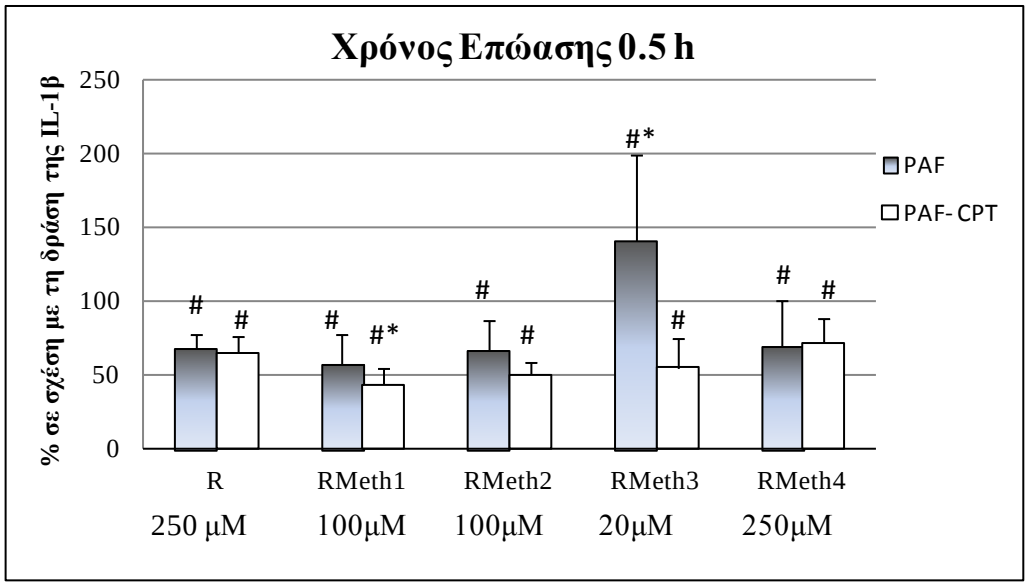
6.9.1 Επίδραση των μεθυλιωμένων παραγώγων ρεσβερατρόλης στο μεταβολισμό του PAF σε διεγερμένα κύτταρα U-937 στη 0,5h

Τα Μ.Π. της ρεσβερατρόλης ελέγχθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, το τριμεθόξυ παράγωγο δοκιμάστηκε στα 250μM, τιμή που ήταν κοντά στη συγκέντρωση της R που προκαλούσε 50% αναστολή στη δράση της IL-1β. Τα άλλα παράγωγα δοκιμάστηκαν σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις γιατί επηρέαζαν τη βιωσιμότητα των κυττάρων. Σε αυτές τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις τα παράγωγα RMeth1, RMeth2 και RMeth3 είχαν παρόμοια ανασταλτική δράση με τη ρεσβερατρόλη όσο αφορά τη δραστικότητα της PAF-CPT (# $p \leq 0,05$ σε σύγκριση με τη δράση της IL-1β) (**Γράφημα 18Α**). Βέβαια, το RMeth1 διαφοροποιούνταν και με τη ρεσβερατρόλη εμφανίζοντας υψηλότερα ποσοστά αναστολής (* $p \leq 0,05$ σε σύγκριση με R). Όσον αφορά τα ενδοκυτταρικά επίπεδα του PAF τα παράγωγα RMeth1 και RMeth2 διατήρησαν την ανασταλτική δράση, ενώ η χαμηλότερη συγκέντρωση που δοκιμάστηκε το RMeth3 δεν ήταν αρκετή για να εμφανίσει ανασταλτική δράση, ενώ φαίνεται ότι επάγει περαιτέρω την αύξηση των επιπέδων του PAF(# $p \leq 0,05$ σε σύγκριση με τη δράση της IL-1β, * $p \leq 0,05$ σε σύγκριση με την R). Το RMeth4 διατήρησε την ανασταλτική δράση της αρχικής ένωσης στην ίδια

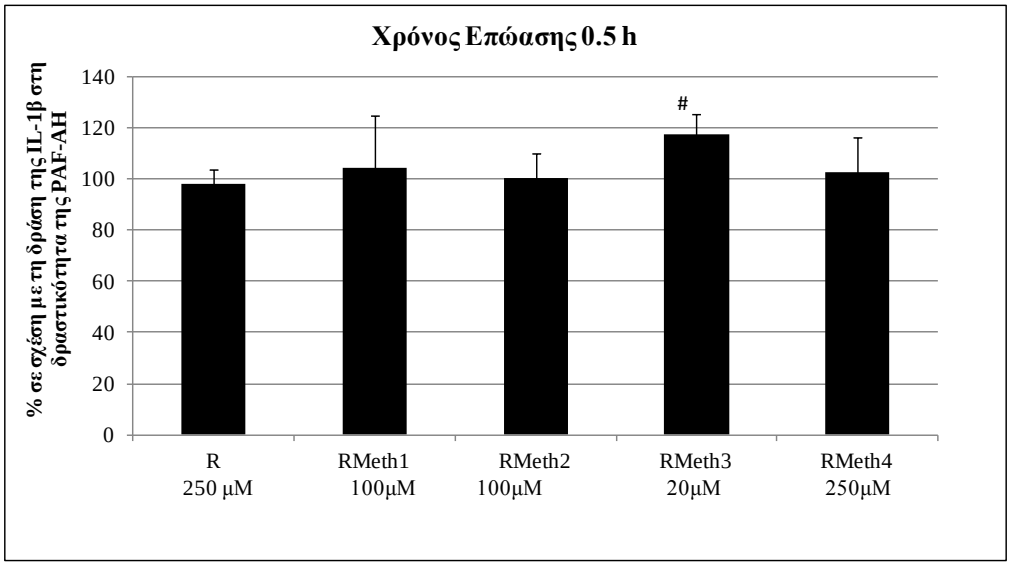
συγκέντρωση με τη ρεσβερατρόλη τόσο στα ενδοκυτταρικά επίπεδα του PAF όσο και στη δραστικότητα της PAF-CPT.

Όσο αφορά το αποικοδομητικό ένζυμο του PAF, την PAF-AH αυτό ενεργοποιείται κατά 15% μόνο από το παράγωγο RMeth3 (# p≤0,05 σε σύγκριση με τη δράση της IL-1β, **Γράφημα 18Β**).

18A



18B



Γράφημα 18: Η επίδραση των μεθυλιωμένων παραγώγων ρεσβερατρόλης στο μεταβολισμό του PAF σε διεγερμένα κύτταρα U937 στη 0,5h

Τα U937 συν-επωάστηκαν με IL-1β (2,5ng/mL) και με τη ρεσβερατρόλη και τα μεθυλιωμένα παράγωγα τους. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % της δράσης της IL-1β στα Α) ενδοκυτταρικά επίπεδα του PAF και στη δραστικότητα της PAF-CPT στη 0,5h Β) στη δραστικότητα της PAF-AH στη 0,5h

p ≤ 0,05 σε σχέση με τη δράση της IL-1β * p≤0,05 σε σχέση με την αρχική φαινολική ένωση

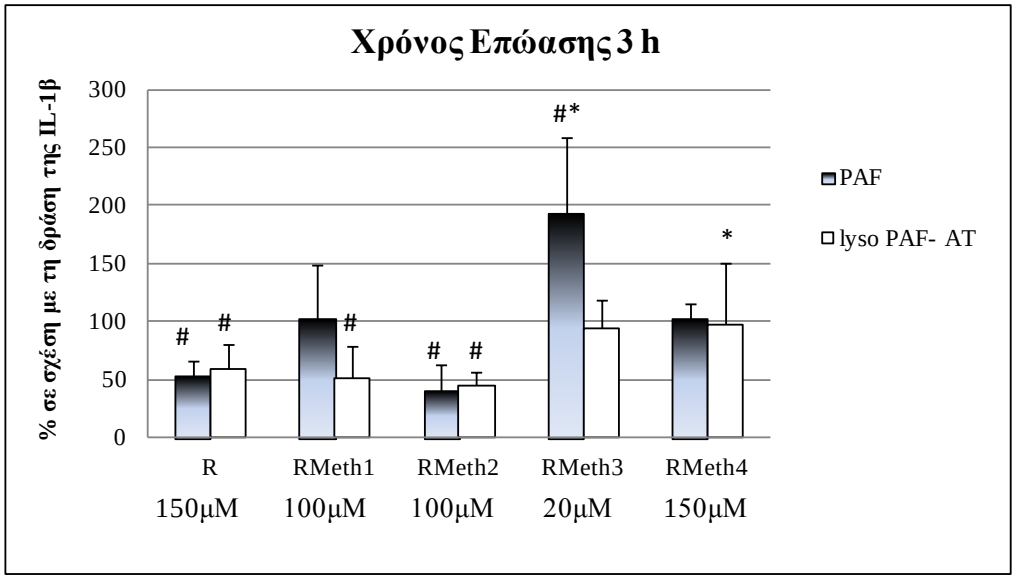
RMeth1: 4'-μεθοξυ ρεσβερατρόλη, RMeth2: 3- μεθοξυ ρεσβερατρόλη, RMeth3: 3,5-διμεθοξυ ρεσβερατρόλη, RMeth4: 3,4',5-τριμεθοξυ ρεσβερατρόλη

6.9.2 Επίδραση των μεθυλιωμένων παραγώγων ρεσβερατρόλης στο μεταβολισμό του PAF σε διεγερμένα κύτταρα U937 στις 3h

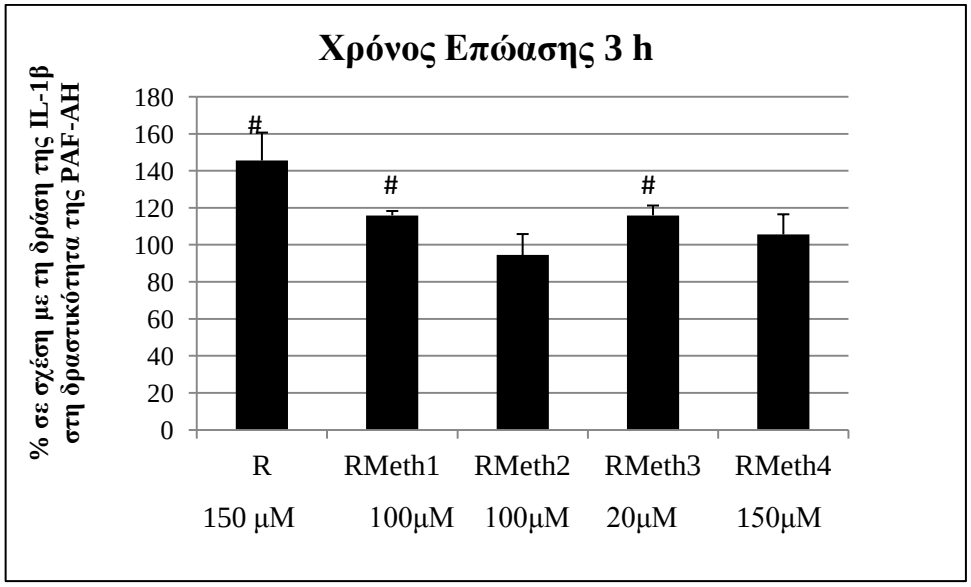
Από τα Μ.Π. η R και το παράγωγο RMeth4 δοκιμάστηκαν στα 150μM, ενώ τα άλλα παράγωγα δοκιμάστηκαν σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Οι οποίες αντιστοιχούσαν στις μέγιστες δυνατές που δεν επηρέαζαν τη βιωσιμότητα των κυττάρων. Μόνο τα παράγωγα RMeth1, RMeth2 διατήρησαν την ανασταλτική δράση της ρεσβερατρόλης στη δραστικότητα της λυσο PAF-AT (# $p \leq 0,05$ σε σύγκριση με τη δράση της IL-1β) (**Γράφημα 19Α**). Το παράγωγο RMeth2 διατήρησε τη δράση του αρχικού μορίου και στα επίπεδα του PAF, ενώ το RMeth3 είχε την ίδια διεγερτική δράση στα επίπεδα του PAF στις 3h όπως και στη 0,5h (# $p \leq 0,05$ σε σύγκριση με τη δράση της IL-1β, * $p \leq 0,05$ σε σύγκριση με R), αλλά δεν επηρέασε τη δραστικότητα της λυσο PAF-AT. Τέλος το RMeth4 δεν επηρέασε σημαντικά τα επίπεδα του PAF αλλά ούτε και τη δραστικότητα της λυσο PAF-AT.

Όσο αφορά την δραστικότητα της PAF-AH, μόνο τα παράγωγα RMeth1 και RMeth3 την αυξάνουν σε σχέση με τη δράση της IL-1β, κατά 15% (# $p \leq 0,05$ σε σύγκριση με τη δράση της IL-1β, **Γράφημα 19Β**).

19A



19Β



Γράφημα 19: Η επίδραση των μεθυλιωμένων παραγώγων ρεσβερατρόλης στο μεταβολισμό του PAF σε διεγερμένα κύτταρα U937 στις 3h

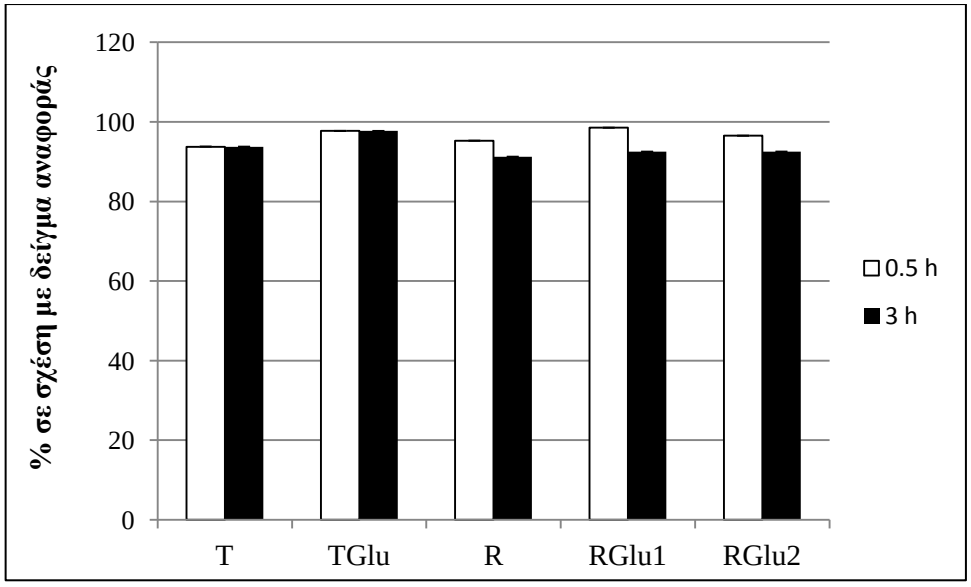
Τα U937 συν-επωάστηκαν με IL-1β (2,5ng/mL) και με τη ρεσβερατρόλη και τα μεθυλιωμένα παράγωγα της. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % της δράσης της IL-1β Α) στα ενδοκυτταρικά επίπεδα του PAF και στη δραστικότητα της λυσο PAF-AT στις 3h Β) στη δραστικότητα της PAF-AH στις 3h

$p \leq 0,05$ σε σχέση με τη δράση της IL-1β * $p \leq 0,05$ σε σχέση με την αρχική φαινολική ένωση

RMeth1: 4'-μεθοξυ ρεσβερατρόλη, RMeth2: 3- μεθοξυ ρεσβερατρόλη, RMeth3: 3,5-διμεθοξυ ρεσβερατρόλη, RMeth4: 3,4',5-τριμεθοξυ ρεσβερατρόλη

6.10 Επίδραση των γλυκουρονιωμένων παραγώγων των φαινολικών ενώσεων στη βιωσιμότητα των U937

Τα γλυκουρονιωμένα παράγωγα (Γ.Π.) της τυροσόλης και της ρεσβερατρόλης δοκιμάστηκαν στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα γλυκουρονιωμένα παράγωγα τόσο της τυροσόλης όσο και της ρεσβερατρόλης στη συγκέντρωση 250μΜ στη 0,5h και στα 50 μΜ το γλυκουρονιωμένο παράγωγο της τυροσόλης και στα 150μΜ τα παράγωγα της ρεσβερατρόλης στις 3h δεν επηρεάζουν τη βιωσιμότητα των κυττάρων (**Γράφημα 20**).



Γράφημα 20: Η επίδραση των γλυκουρονιωμένων παραγώγων της τυροσόλης (T) και της ρεσβερατρόλης (R) στη βιωσιμότητα των κυττάρων U-937

Τα U937 επωάστηκαν με τα γλυκουρονιωμένα παράγωγα της τυροσόλης σε συγκέντρωση 250μM και της ρεσβερατρόλης στη 0,5 h. Στις 3h τα γλυκουρονιωμένα παράγωγα τυροσόλης δοκιμάστηκαν στα 50μM και της ρεσβερατρόλης στα 150μM. Στη συνέχεια ακολούθησε η δοκιμασία βιωσιμότητας MTT. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % σε σχέση με το δείγμα αναφοράς την αντίστοιχη χρονική στιγμή.

6.11 Επίδραση των γλυκουρονιωμένων παραγώγων των φαινολικών ενώσεων στο μεταβολισμό του PAF στα διεγερμένα U937 κύτταρα

6.11.1 Επίδραση των γλυκουρονιωμένων παραγώγων των φαινολικών ενώσεων στο μεταβολισμό του PAF σε διεγερμένα κύτταρα U937 στη 0,5h

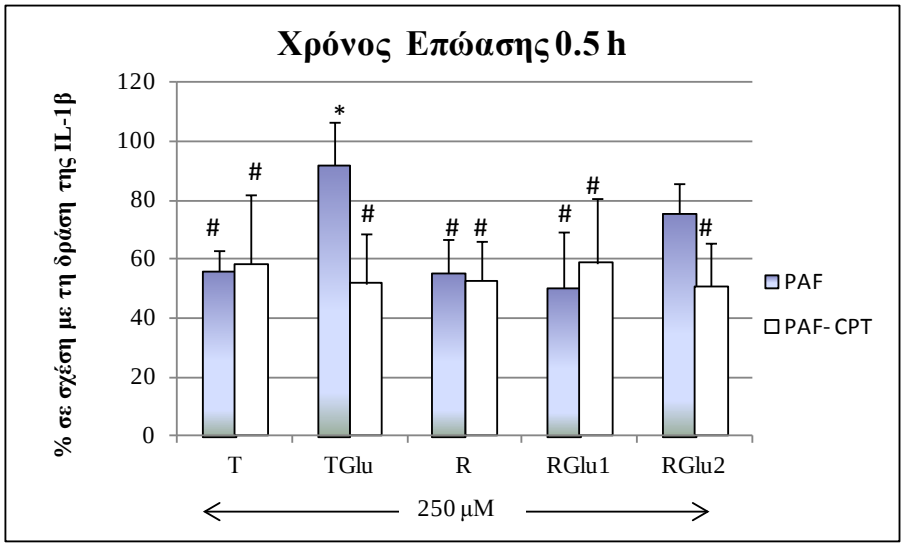
Τα Γ.Π. της τυροσόλης και της ρεσβερατρόλης δοκιμάστηκαν στα 250μM, τιμή που ήταν κοντά στη συγκέντρωση τόσο της T αλλά και της R που προκαλούσε 50% αναστολή στη δράση της IL-1β στα επίπεδα του ενδοκυτταρικού PAF αλλά και της δραστικότητας της PAF-CPT στη 0,5h (**Γράφημα 21Α**). Το γλυκουρονιωμένο παράγωγο της τυροσόλης διατήρησε την ανασταλτική δράση της τυροσόλης έναντι της δράσης της IL-1β, μόνο στη δραστικότητα της PAF-CPT (# $p \leq 0,05$ σε σύγκριση με τη δράση της IL-1β), ενώ δε φαίνεται να επηρεάζει τα ενδοκυτταρικά επίπεδα του PAF (*$p \leq 0,05$ σε σύγκριση με αρχική φαινολική ένωση).

Τα δύο γλυκουρονιωμένα παράγωγα της ρεσβερατρόλης διατηρούν την ανασταλτική της δράση (**Γράφημα 21Α**), όσο αφορά την δραστικότητα του ενζύμου PAF-CPT(# $p \leq 0,05$ σε σύγκριση με τη δράση της IL-1β). Μόνο το παράγωγο RGlu1

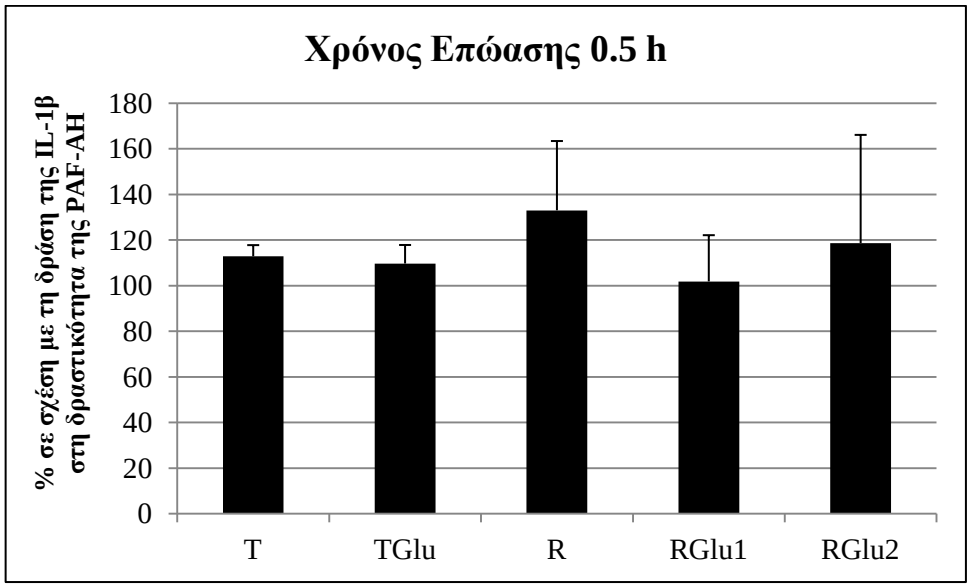
διατηρεί την ανασταλτική δράση της ρεσβερατρόλης στα επίπεδα του PAF, ενώ το RGlu2 δεν επιδρά στα επίπεδα του PAF.

Κανένα από τα γλυκουρονιωμένα παράγωγα τόσο της τυροσόλης όσο και της ρεσβερατρόλης, δεν επηρεάζει τη δραστικότητα της PAF-AH (**Γράφημα 21Β**).

21A



21B



Γράφημα 21: Η επίδραση των γλυκουρονιωμένων παραγώγων τυροσόλης και ρεσβερατρόλης στο μεταβολισμό του PAF σε διεγερμένα κύτταρα U937 στη 0,5h

Τα U937 συν-επωάστηκαν με IL-1β (2,5ng/mL) και με την τυροσόλη ή τη ρεσβερατρόλη και τα γλυκουρονιωμένα παράγωγα τους. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % της δράσης της IL-1β Α) στα ενδοκυτταρικά επίπεδα του PAF και στη δραστικότητα της PAF-CPT στη 0,5h Β) στη δραστικότητα της PAF-AH στη 0,5h

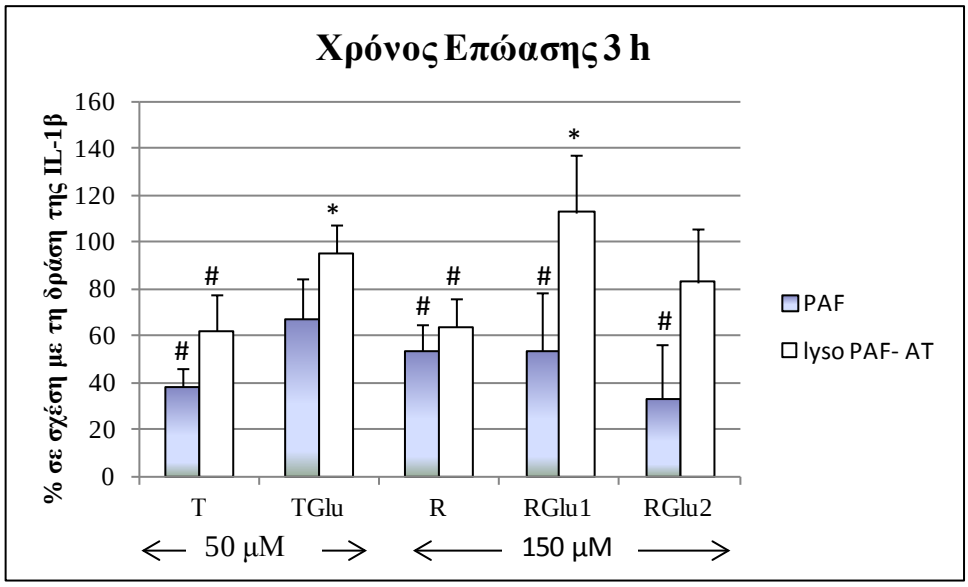
$p \leq 0,05$ σε σχέση με τη δράση της IL-1β * $p \leq 0,05$ σε σχέση με την αρχική φαινολική ένωση

6.11.2 Επίδραση των γλυκουρονιωμένων παραγώγων των φαινολικών ενώσεων στο μεταβολισμό του PAF σε διεγερμένα κύτταρα U937 στις 3h

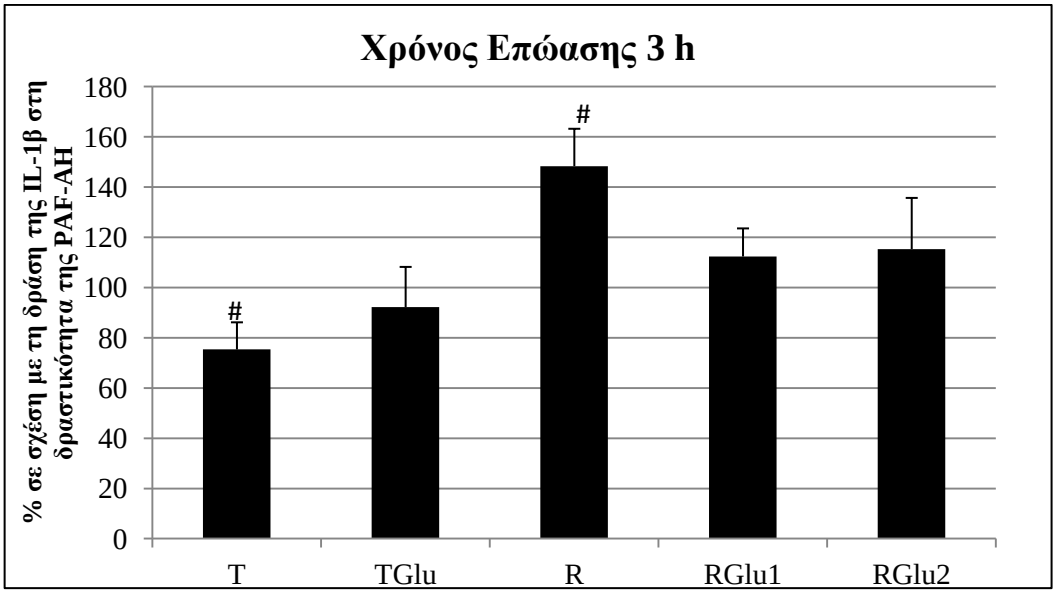
Τα Γ.Π. της τυροσόλης δοκιμάστηκαν στα 50μM και της ρεσβερατρόλης στα 150μM. Οι τιμές ήταν κοντά στη συγκέντρωση που προκαλούσε 50% αναστολή στη δράση της IL-1β στα επίπεδα του ενδοκυτταρικού PAF αλλά και της δραστικότητας της λυσο PAF-AT, αντίστοιχα στις 3h. Το γλυκουρονιωμένο παράγωγο της τυροσόλης (TGlu), δεν εμφάνισε ανασταλτική δράση ούτε στα ενδοκυτταρικά επίπεδα του PAF ούτε στη δραστικότητα της λυσο PAF-AT, στις 3h (**Γράφημα 22Α**).

Από την άλλη πλευρά, τα παράγωγα RGlu1 και RGlu2 εμφάνισαν ανασταλτική δράση μόνο στα ενδοκυτταρικά επίπεδα του PAF και δεν επηρέασαν τη δραστικότητα του ενζύμου λυσο PAF-AT. Ακόμα εξετάστηκε η δράση τους στο αποικοδομητικό ένζυμο PAF-AH όπου φαίνεται ότι έχουν την τάση να ενεργοποιούν τη δραστικότητα του ενζύμου, χωρίς όμως να είναι στατιστικώς σημαντικό το αποτέλεσμα αυτό (**Γράφημα 22Β**).

22Α



22B



Γράφημα 22: Η επίδραση των γλυκουρονιωμένων παραγώγων τυροσόλης και ρεσβερατρόλης στο μεταβολισμό του PAF σε διεγερμένα κύτταρα U-937 στις 3h

Τα U-937 συν-επωάστηκαν με IL-1β (2,5 ng/mL) την τυροσόλη ή τη ρεσβερατρόλη και τα μεθυλιωμένα παράγωγά τους. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % της δράσης της IL-1β Α) στα ενδοκυτταρικά επίπεδα του PAF και στη δραστικότητα της λυσο PAF-AT στις 3h Β) στη δραστικότητα της PAF-AH στις 3h

$p \leq 0,05$ σε σχέση με τη δράση της IL-1β * $p \leq 0,05$ σε σχέση με την αρχική φαινολική ένωση

TGlu1: γλυκουρονιωμένη τυροσόλη στο αρωματικό-OH, RGlu1: 3-γλυκουρονιωμένη ρεσβερατρόλη, RGlu2: 4'- γλυκουρονιωμένη ρεσβερατρόλη

.

Κεφάλαιο 7: Συζήτηση

7.1 Σχολιασμός των αποτελεσμάτων που αφορούν την επίδραση της τυροσόλης, της ρεσβερατρόλης και των παραγώγων τους σε αντιοξειδωτικά τεστ ελεύθερα κυττάρων

Η αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας της τυροσόλης, της ρεσβερατρόλης και των ακετυλιωμένων παραγώγων τους, έγινε μέσω διάφορων δοκιμασιών (τεστ) ούτως ώστε να γίνει προσομοίωση με τους μηχανισμούς που εμπλέκονται στο οξειδωτικό στρες στον ανθρώπινο οργανισμό. Αναλυτικά έγιναν δοκιμασίες για να εκτιμηθεί, α) η ικανότητά τους να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες, συγκεκριμένα μελετήθηκε η δράση τους έναντι της ρίζας DPPH, β) η δράση τους στη μη ενζυμική υπεροξείδωση λινελαϊκού οξέος παρουσία των προ-οξειδωτικών ιόντων Fe^{2+}, γ) η ικανότητά τους να αναστέλλουν την οξείδωση του ορού παρουσία Cu^{2+} αλλά και δ) η ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με ένζυμα που εμπλέκονται στην οξείδωση και συγκεκριμένα τη λιποοξυγονάση (LOX). Οι φαινολικές ενώσεις είναι μόρια που κατά την διάρκεια της *in vivo* απορρόφησής τους αλληλεπιδρούν με τις λιποπρωτεΐνες, τις πρωτεΐνες του ορού, λιπαρά οξέα και κυτταρικούς υποδοχείς [319]. Οι συγκεκριμένες δοκιμασίες χρησιμοποιήθηκαν με στόχο να εκτιμηθούν όσο το δυνατόν περισσότερες διαδικασίες που εμπλέκονται στο οξειδωτικό στρες.

Η αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών ενώσεων εξαρτάται από τη δομή και τον αριθμό των υδροξυλίων τους, αφού ενεργούν είτε ως δότες ηλεκτρονίων ή υδρογόνου και μπορούν επίσης να οδηγούν σε τροχιακά με μη εντοπισμένα (delocalized) ηλεκτρόνια στον αρωματικό δακτύλιο [320]. Η τυροσόλη, με μία αρωματική ομάδα υδροξυλίου, σε ένα εύρος συγκεντρώσεων 5-400μM, δεν κατάφερε να δεσμεύσει τις ελεύθερες ρίζες DPPH, μολονότι χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικοί διαλύτες για την πραγματοποίηση της αντίδρασης (70% αιθανόλη ή DMSO ή μεθανόλη), σύμφωνα με άλλους ερευνητές που ανίχνευσαν δράση της τυροσόλης στη συγκεκριμένη διαδικασία [321, 322]. Από την άλλη πλευρά, η ρεσβερατρόλη παρουσίασε μεγάλη ικανότητα να δεσμεύει τις ελεύθερες ρίζες DPPH με τιμή EC_{50} 85 ± 2,7μM, που είναι σε συμφωνία με αποτελέσματα άλλων ερευνητικών ομάδων όπου δηλώνουν τα 40μM [282]. Τα ακετυλιωμένα παράγωγα RAc1, RAc2, RAc3 εμφάνισαν πιο ασθενή δράση έναντι των ελευθέρων ριζών, σε σχέση με τη ρεσβερατρόλη. Αυτό το φαινόμενο έχει παρατηρηθεί και σε άλλες μελέτες, όπου η

ρεσβερατρόλη ήταν πιο αποτελεσματική στη DPPH δοκιμασία σε σύγκριση με τα μεθυλιωμένα παράγωγά της [282]. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, μεταξύ των δυο μονο-ακετυλιωμένων παραγώγων της ρεσβερατρόλης, το πιο ισχυρό ήταν το ακετυλιωμένο στη θέση 4 ', ενώ ανάμεσα στα δύο δι-ακετυλιωμένα ήταν το RAc3 που έχει ελεύθερη την ομάδα υδροξυλίου στη θέση 4'. Αυτό το αποτέλεσμα είναι σύμφωνο με προηγούμενη μελέτη, η οποία καταλήγει στο συμπέρασμα ότι η υποκατάσταση του OH στη θέση 3 με μία ομάδα ακυλίου οδήγησε σε μεγαλύτερη απώλεια της αντιοξειδωτικής δραστικότητας σε σχέση με την υποκατάσταση στη 4'-OH [323]. Τέλος, όπως ήταν αναμενόμενο η τρι-ακετυλιωμένη ρεσβερατρόλη (RAc5) δεν εμφάνισε καμία δεσμευτική δράση έναντι της ρίζας DPPH. Οι *Stojanović, S. et al* πρότειναν ότι το p-OH στη θέση 4'-OH του αρωματικού δακτυλίου είναι πιο ενεργό στην εκκαθάριση ελευθέρων ριζών από τα υδροξύλια που βρίσκονται στην ομάδα της m-υδροκινόνης [324]. Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι ο αριθμός των ελεύθερων ομάδων υδροξυλίου σχετίζεται με την αντιοξειδωτική ικανότητα του μορίου. Επιπλέον, το γεγονός ότι το παράγωγο RAc4, το οποίο έχει μία ελεύθερη ομάδα υδροξυλίου στην m-υδροκινόνη, δεν είχε καμία επίδραση, μπορεί να αποδοθεί εν μέρει στη στερεοχημική παρεμπόδιση λόγω της παρουσίας της ακετυλο ομάδας στη θέση 5, δηλαδή κοντά στην ομάδα υδροξυλίου στη θέση 3 της ρεσβερατρόλης.

Επίσης εξετάστηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα των αρχικών μορίων και των ακετυλιωμένων παραγώγων τους, στη μη ενζυμική υπεροξείδωση λιποειδών που επάγεται από Fe^{2+}. Ο Σίδηρος (Fe) είναι ένα κοινό μέταλλο στο ανθρώπινο σώμα συνδεδεμένο με αιμοσφαιρίνη ή φερριτίνη [325]. Μόρια όπως οι φαινολικές ενώσεις, θα μπορούσαν να αναστείλουν την αντίδραση μεταξύ λινελαϊκού οξέος και Fe^{2+}, μέσω του σχηματισμού συμπλόκου με το σίδηρο ή μέσω της εκκαθάρισης ριζών που παράγονται κατά την οξείδωση. Η τυροσόλη δεν εμφάνισε καμία ανασταλτική επίδραση, ενώ μόνο το μονο-ακετυλιωμένο παράγωγο TAc2 εμφάνισε δοσοεξαρτώμενη ανασταλτική δράση, και η τιμή που αντιστοιχούσε στο 50% της αναστολής (IC_{50}) ήταν τα 2,4mM. Το αποτέλεσμα αυτό κατά πάσα πιθανότητα οφείλεται στο γεγονός ότι η ακετυλίωση οδηγεί σε περισσότερο λιπόφιλο μόριο, αλλά εξακολουθεί η ομάδα υδροξυλίου στον αρωματικό δακτύλιο να είναι ελεύθερη. Ένα παρόμοιο φαινόμενο έχει αναφερθεί για την υδροξυτυροσόλη, δεδομένου ότι ακετυλιωμένο παράγωγο της στο αλειφατικό-OH βελτίωσε την αντιοξειδωτική δράση της και οδήγησε σε πιο δραστική ένωση [326]. Όσον αφορά τη δράση των

παραγώγων της ρεσβερατρόλης, το RAc3 (3,5-διακετυλιωμένη-ρεσβερατρόλη) έδειξε τέσσερις φορές ισχυρότερη ανασταλτική δράση σε σχέση με τη ρεσβερατρόλη, το RAc2 που έχει επίσης ελεύθερη την ομάδα υδροξυλίου στη 4’ θέση, έτεινε να έχει καλύτερη δράση σε σχέση με τη ρεσβερατρόλη. Τα παράγωγα RAc1 και RAc4 στα οποία το υδροξύλιο στη θέση 4’ ήταν υποκατεστημένο με την ακετυλομάδα παρουσίασαν την μικρότερη ανασταλτική δράση. Τα ανωτέρω αποτελέσματα υποστηρίζουν περαιτέρω την υπόθεση ότι η ομάδα υδροξυλίου της θέσης 4’ είναι απαραίτητη για τη βέλτιστη βιολογική δράση. Επιπλέον, τα αποτελέσματα άλλης μελέτης όπου η ρεσβερατρόλη δοκιμάστηκε σε διαφορετικά συστήματα (NADPH-, Fe-ασκορβικού και το σύστημα Fe-μικροσώματα), με παρόμοιες τιμές IC_{50}, έδειξαν ότι η ρεσβερατρόλη δεν δημιουργεί χηλικό σύμπλοκο με το Fe αλλά λειτουργεί ως διεγέρτης παραγωγής •OH, συμμετέχοντας στην αναγωγή του O_2 σε O_2^-, H_2O_2 και •OH, αντιδράσεις που καταλύονται από το κυτόχρωμα P-450 [325].

Η ανασταλτική δράση εκχυλισμάτων ελαιολάδου, τα οποία περιέχουν τυροσόλη, στην οξείδωση της LDL από χαλκό έχει ήδη αναφερθεί από άλλους ερευνητές [327]. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η τυροσόλη έχει την ικανότητα να δεσμεύεται από τις LDL και έτσι να ασκεί την προστατευτική της δράση έναντι της οξείδωσης [328]. Στην παρούσα μελέτη, η T και τα παράγωγά της TAc1, TAc2 παρουσίασαν δοσοεξαρτώμενη ανασταλτική δράση έναντι της οξείδωσης του ορού, με το παράγωγο TAc1 να είναι ο ισχυρότερος αναστολέας. Αυτό το αποτέλεσμα μπορεί να υποδεικνύει ότι η TAc1 συνδέεται ευκολότερα με τις λιποπρωτεΐνες ή τα λιποειδή του ορού και έτσι να δρα με πιο αποτελεσματικό τρόπο σε σχέση με τη τυροσόλη. Από όσο γνωρίζουμε δεν υπάρχουν σχετικές μελέτες προκειμένου να συγκριθούν τα παραπάνω αποτελέσματα.

Σε αντίθεση με την τυροσόλη, η ρεσβερατρόλη ήταν πιο δραστικός καλός αναστολέας της *in vitro* οξείδωσης του ορού σε σχέση με τα ακετυλιωμένα παράγωγά της. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει την *in vitro* προστατευτική δράση της ρεσβερατρόλης έναντι της υπεροξείδωσης των λιποειδών στο ανθρώπινο πλάσμα [329], ενώ άλλοι έχουν δείξει ότι η κατανάλωση μωβ σταφυλιών Nagano, πλούσιων σε ρεσβερατρόλη, ανέστειλε την *ex vivo* οξείδωση της LDL σε ανθρώπους [330].

Επιπλέον πραγματοποιήθηκε δοκιμασία με σκοπό να εξεταστεί η ικανότητα των αρχικών μορίων και των παραγώγων τους να αναστέλλουν τη δραστικότητα της λιποοξυγονάσης (LOX) από σόγια. Η LOX από σόγια προσομοιάζει τη δραστικότητα

της 15-LOX των θηλαστικών [331]. Στην παρούσα μελέτη προσδιορίστηκαν τα χαρακτηριστικά του ενζύμου: δηλαδή το Km και το Vmax με τιμές στα 51,5 μM ± 2,3 και 0,073 ΔA / min ± 0,0013 αντίστοιχα. Οι López-Nicolás et al., υπολόγισαν τιμή Km στα ίδια επίπεδα (44,39μM), αλλά το Vmax ήταν υψηλότερο με τιμή 1,03ΔA/min, αποτέλεσμα που ίσως οφείλεται στις διαφορετικές πειραματικές συνθήκες [332], δηλαδή στη μεγαλύτερη ποσότητα ενζύμου. Τα αποτελέσματα για τις τιμές Km από άλλες ερευνητικές ομάδες είναι αρκετά κοντά με τα παρόντα δεδομένα και συγκεκριμένα στα 10,9 και 23,3 μM [333]. Και οι δύο μελέτες υπολόγισαν τις τιμές του Vmax χρησιμοποιώντας μια διαφορετική μεθοδολογική προσέγγιση που καθιστά αδύνατη τη σύγκρισή τους με τα παρόντα αποτελέσματα. Υπάρχουν επίσης ορισμένες μελέτες που αναφέρουν αρκετά διαφορετικό Km και Vmax για τη LOX από σόγια με υπόστρωμα το λινελαϊκό οξύ, πιθανόν λόγω διαφορετικών πειραματικών συνθηκών [334].

Η ρεσβερατρόλη εμφάνισε την πιο ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι της LOX, με IC_{50} 0,22 ± 0,025mM, τιμή η οποία είναι σύμφωνη με τα αποτελέσματα από Shibata T, et al, όπου οι συγκεντρώσεις ρεσβερατρόλης έως 50μM δεν προκαλούσαν 50% αναστολή στη δράση της LOX [335]. Πιθανότατα οι διαφορετικές συνθήκες δοκιμασίας, η διαφορετική συγκέντρωση του βορικού οξέος στο ρυθμιστικό διάλυμα και το υπόστρωμα οδήγησε σε διαφορετικές τιμές IC_{50} [333].

Η κινητική μελέτη της LOX παρουσία της ρεσβερατρόλης οδήγησε σε τιμές Kp και Vp 244 μM ± 30 και 0,064 ΔA / min ± 0.006 αντίστοιχα, υποδεικνύοντας μικτή αναστολή. Δεν υπάρχουν άλλες σχετικές μελέτες για να συγκριθούν τα αποτελέσματα.

Η τυροσόλη, τα Α.Π. της αλλά και το γλυκουρονιωμένο παράγωγο, δεν εμφάνισαν επίδραση στην υπεροξείδωση του λινελαικού με τη LOX από σόγια. Μόνο μία μελέτη έχει διερευνήσει την αποτελεσματικότητα της τυροσόλης στην 5- LOX σε λευκοκύτταρα όπου η ανασταλτική της δράση ήταν η χαμηλότερη μεταξύ των άλλων φαινολικών ενώσεων που εξετάστηκαν [336].

Η υποκατάσταση των ελεύθερων υδροξυλίων της ρεσβερατρόλης με ακετυλο-ομάδες μείωσε την ανασταλτική επίδραση στην LOX. Τα δύο μονο-ακετυλιωμένα παράγωγα παρουσίασαν 20% αναστολή όταν δοκιμάστηκαν στην τιμή που αντιστοιχεί στο IC_{50} της ρεσβερατρόλης, ενώ τα διακετυλιωμένα παράγωγα και το

τριακετυλιωμένο δεν επηρέασαν τη δραστικότητα της LOX, ακόμη και όταν δοκιμάστηκαν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (μέχρι 0,4mM). Όσον αφορά την σταδιακή υποκατάσταση με ακετυλο-ομάδες φαίνεται ότι αυτή οδηγεί σε μειωμένη ανασταλτική δράση, χωρίς να έχει σημασία η θέση του υδροξυλίου. Βέβαια δεν συμβαίνει το ίδιο όταν η αύξηση της λιποφιλικότητας γίνεται μέσω της υποκατάστασης με μέθυλο-ομάδες. Η άποψη αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι το παράγωγο RMeth3 εμφάνισε βελτιωμένη ανασταλτική δράση σε σχέση με τη ρεσβερατρόλη, αποτέλεσμα που είναι σε συμφωνία με άλλες ομάδες όπου έδειξαν ότι η αύξηση της λιποφιλικότητας αναστολέων της LOX, βελτιώνει τη δράση τους [337]. Ακόμα μία μελέτη με πιο λιπόφιλα παράγωγα του κινναμικού οξέος δείχνει ότι κάποια παράγωγα εμφανίζουν καλύτερη αντι- LOX δράση και κάποια άλλα όχι ανάλογα με τη θέση υποκατάστασης με τη λιπόφιλη ομάδα [338].

Η υποκατάσταση μίας ομάδας –OH με τη μέθυλο ομάδα, φαίνεται ότι πρέπει να γίνεται στη θέση 4’ για μην επηρεάζεται η δράση της ρεσβερατρόλης αφού το παράγωγο RMeth1 διατήρησε την ανασταλτική δράση της αρχικής φαινολικής ένωσης. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε αντίθεση με τα αντίστοιχα από τα ακετυλιωμένα παράγωγα όπου και τα δύο μονοακετυλιωμένα παράγωγα παρουσίαζαν την μειωμένη δράση. Αυτό σημαίνει ότι η σύνδεση με τις διαφορετικές ομάδες φέρνει αλλαγές στη στερεοχημεία του μορίου και άρα τροποποιεί τη δράση της ρεσβερατρόλης έναντι της δραστικότητας του ενζύμου LOX. Ειδικά η πρόσδεση της μέθυλομάδας στα υδροξύλια φαίνεται να αλλάζει δραστικά τη δομή του αρχικού μορίου στο χώρο και άρα την πρόσδεση του στο ένζυμο και τελικά τη δραστικότητα του ενζύμου της λιποοξυγονάσης [339].

Το συμπέρασμα αυτό επιβεβαιώνεται και από τα αποτελέσματα των γλυκουρονιωμένων παραγώγων ρεσβερατρόλης. Το γλυκουρονιωμένο παράγωγο στη θέση 3 ήταν πιο δραστικό από αυτό στη θέση 4’, παρόλα αυτά όμως παρουσίασε μικρότερη δράση από το αρχικό μόριο. Άλλη μελέτη σε γλυκουρονιωμένα παράγωγα της κερκετίνης έδειξε ότι μπορεί να είναι μέτριοι αναστολείς του ενζύμου της λιποοξυγονάσης από σόγια, το αποτέλεσμα όμως εξαρτάται από τη θέση σύνδεσης της γλυκουρονομάδας. Τα δεδομένα αυτά έχουν ιδιαίτερη σημασία, αφού τα παράγωγα αυτά δημιουργούνται στο ανθρώπινο σώμα κατά την απέκκριση τους [340].

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη δοκιμή DPPH και την ενζυμική υπεροξείδωση των λιποειδών, αποδεικνύουν ότι η ακετυλίωση μειώνει τη συγκεκριμένη δράση των φαινολικών ενώσεων. Όσον αφορά τη μη ενζυμική υπεροξείδωση λιποειδών και την *in vitro* οξείδωση ορού, συγκεκριμένα ακετυλιωμένα παράγωγα της τυροσόλης και της ρεσβερατρόλης παρουσιάζουν ενισχυμένη αντιοξειδωτική δράση, πιθανώς λόγω της παρουσίας λιποειδών και στις δύο δοκιμασίες.

Συμπερασματικά, η αντιοξειδωτική δράση της ρεσβερατρόλης υπερέχει της τυροσόλης, ενώ η αύξηση της λιποφιλικότητας, μέσω της ακετυλίωσης, βελτίωσε την αντιοξειδωτική δράση και των δύο φαινολικών ενώσεων στις δοκιμασίες μη-ενζυμικής λιποειδικής υπεροξείδωσης. Η αύξηση της λιποφιλικότητας της ρεσβερατρόλης μέσω της μεθυλίωσης βελτίωσε την ανασταλτική δράση του αρχικού μορίου έναντι της δραστικότητας της λιποοξυγονάσης (LOX). Η μελέτη της δράσης των γλυκουρονιωμένων παραγώγων της τυροσόλης και της ρεσβερατρόλης έναντι του ενζύμου LOX, έδειξε ότι είτε διατηρείται είτε μειώνεται η δράση του αρχικού μορίου. Βέβαια περισσότερες δοκιμασίες απαιτούνται για την περαιτέρω αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των φαινολικών ενώσεων, λόγω του γεγονότος ότι η θέση, ο αριθμός και το είδος του υποκαταστάτη φαίνεται να επιδρά στην βιολογική τους δραστικότητα.

7.2 Σχολιασμός των αποτελεσμάτων που αφορούν την επίδραση της τυροσόλης, της ρεσβερατρόλης και των παραγώγων τους στο μεταβολισμό του PAF σε διεγερμένα U937 κύτταρα

Τα αποτελέσματα δείχνουν για πρώτη φορά ότι η τυροσόλη και η ρεσβερατρόλη, δύο φαινολικές ενώσεις άρρηκτα συνδεδεμένες με τη Μεσογειακή Δίαιτα, μπορούν να αναστείλουν τη σύνθεση του PAF υπό συνθήκες φλεγμονής. Τα κύρια ευρήματα της παρούσας μελέτης είναι ότι:

α) η τυροσόλη είναι πιο ισχυρός αναστολέας της επαγόμενης από IL-1β σύνθεσης του PAF σε σχέση με τη ρεσβερατρόλη

β) η συγκέντρωση της φαινολικής ένωσης που προκαλεί 50% αναστολή στην επαγόμενη από IL-1β αύξηση των επιπέδων του PAF είναι της ίδιας τάξης με αυτή που αναστέλλει τη δραστικότητα του ενζύμου που είναι διεγερμένο την αντίστοιχη χρονική στιγμή

γ) τα ακετυλιωμένα παράγωγα της τυροσόλης φαίνεται να διατηρούν την ανασταλτική δράση της αρχικής ένωσης ενώ στην περίπτωση της ρεσβερατρόλης, η ακετυλίωση παρουσιάζει διττό ρόλο αφού είτε διατηρεί την ανασταλτική επίδραση του αρχικού μορίου, είτε προκαλεί αντίθετη βιολογική δράση λειτουργώντας συνεργιστικά με την IL-1β,

δ) η μεθυλίωση της ρεσβερατρόλης είχε ως αποτέλεσμα παράγωγα με βελτιωμένη ανασταλτική δράση κυρίως ως προς τη δράση της IL-1β στο μεταβολισμό του PAF στη 0,5h και τέλος

ε) οι γλυκουρονιωμένοι μεταβολίτες τυροσόλης και ρεσβερατρόλης διατηρούν την ανασταλτική δράση των αρχικών μορίων κυρίως όσον αφορά την επίδραση τους στη δραστικότητα του ενζύμου PAF-CPT και στα ενδοκυτταρικά επίπεδα του PAF στη 0,5h.

Στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής αρχικά, δοκιμάστηκαν συγκεντρώσεις των φαινολικών ενώσεων ανάλογες με εκείνες που δοκιμάστηκαν σε έρευνες που χρησιμοποιούσαν τη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά [341], αν και σε ορισμένες περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκαν υψηλότερες συγκεντρώσεις με σκοπό να υπολογισθεί η συγκέντρωση εκείνη που προκαλεί 50% αναστολή της δράσης της IL-1β.

Όσον αφορά την Τυροσόλη υπολογίστηκε ότι η συγκέντρωση που προκαλεί 50% αναστολή της δράσης της IL-1β στη 0,5h είναι στα 300μM, ενώ στις 3h παρουσίασε

πιο ισχυρή δράση αφού απαιτείται σχεδόν 4 φορές χαμηλότερη συγκέντρωση για να επιτευχθεί το ίδιο αποτέλεσμα ($p \leq 0,05$). Όσον αφορά τις δράσεις της ρεσβερατρόλης, φάνηκε μία διττή δράση αφού στις χαμηλές συγκεντρώσεις δηλαδή στα 50-100μM στη 0,5h και στα 10-100μM στις 3h ενισχύει τη δράση της IL-1β στην αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων του PAF. Αντίθετα σε υψηλότερες συγκεντρώσεις η δράση ήταν ανασταλτική.

Προκειμένου να μελετηθεί η αντι-φλεγμονώδης δράση των δύο αυτών φαινολικών ενώσεων, μελετήθηκε η δράση τους στη δραστικότητα των ενζύμων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του PAF, δηλαδή των δύο βιοσυνθετικών αλλά και του αποικοδομητικού. Στο μοντέλο φλεγμονής που χρησιμοποιήθηκε, η IL-1β προκαλεί τη μέγιστη αύξηση της δραστικότητας της PAF-CPT στη 0,5h και της λυσο PAF-AT στις 3h. Η Τυροσόλη σε συγκέντρωση περίπου 250μM αναστέλλει κατά 50% τη δράση της IL-1β στην ειδική δραστικότητα της PAF-CPT, τιμή που είναι της ίδιας τάξης με αυτή που απαιτείται για το 50% της αναστολής στα ενδοκυτταρικά επίπεδα του PAF την αντίστοιχη χρονική στιγμή. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και στη δραστικότητα της λυσο PAF-AT και στα επίπεδα του PAF στις 3h, μόνο που η συγκέντρωση της τυροσόλης που απαιτούνταν ήταν σχεδόν 4-φορές μικρότερη με αυτή που υπολογίστηκε στη 0,5h. Η τυροσόλη φάνηκε να αναστέλλει την ειδική δραστικότητα της PAF-AH μόνο στις 3h κατά 15% σε σύγκριση με τη δράση της IL-1β.

Με παρόμοιο τρόπο η ρεσβερατρόλη είχε πιο ισχυρή δράση στη λυσο PAF-AT στις 3h, σε σχέση με την PAF-CPT στη 0,5h, δεδομένου ότι σχεδόν το ήμισυ της συγκέντρωσης απαιτείται για να προκληθεί το 50% της αναστολής ($p \leq 0,05$). Θα πρέπει να αναφερθεί ότι η συγκέντρωση της ρεσβερατρόλης που οδήγησε σε 50% αναστολή της δράσης της IL-1β στα επίπεδα του PAF ήταν σχεδόν ίδια με εκείνη που απαιτείται για το ίδιο ποσοστό αναστολής για την αντίστοιχη δραστικότητα του ενζύμου σε κάθε χρονικό σημείο. Τέλος, η ρεσβερατρόλη φάνηκε να επάγει την ειδική δραστικότητα της PAF-AH μόνο στις 3h κατά 50-60% σε σύγκριση με τη δράση της IL-1β.

Τα προαναφερθέντα αποτελέσματα δείχνουν ότι τα βιοσυνθετικά ένζυμα του PAF παίζουν καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση των ενδοκυτταρικών επιπέδων του, σε αυτές τις πειραματικές συνθήκες. Ωστόσο, η ξεχωριστή δράση και των δύο φαινολικών ενώσεων στα βιοσυνθετικά ένζυμα PAF-CPT και λυσο PAF-AT ($p \leq 0,05$), δείχνει ότι λειτουργούν με διαφορετικό μηχανισμό. Τα μονοπάτια

μεταγωγής σήματος που οδηγούν σε ενεργοποίηση του ενζύμου PAF-CPT δεν είναι ακόμη γνωστά, ενώ στην περίπτωση της λυσο PAF-AT, έχει αναφερθεί η εμπλοκή των MAP κινασών. Η IL-1β επάγει μονοπάτια μεταγωγής σήματος που εμπλέκουν την ενεργοποίηση των MAP κινασών [342] και του NF-κB [53]. Οι MAP κινάσες θα μπορούσαν να διαδραματίσουν κεντρικό ρόλο, δεδομένου ότι απαιτούνται για τη σύνθεση τόσο της λυσο PAF-AT [17], αλλά και της PAF-AH [343]. Είναι τεκμηριωμένο από άλλους ότι η IL-1β ενεργοποιεί τις κινάσες p38 MAPK [344] και διεγείρει τη σύνθεση του PAF μέσω της αύξησης της δραστικότητας της λυσο PAF–AT, σε μια άλλη κυτταρική σειρά [21].

Η ανασταλτική δράση της τυροσόλης στη διεγερτική δράση της IL-1β στα U937 στις 3h είναι πιο ισχυρή σε σχέση με τη ρεσβερατρόλη, αποτέλεσμα που θα μπορούσε να εξηγηθεί μέσω της ικανότητας της να καταστέλλει τα μονοπάτια σηματοδότησης που εμπλέκουν τον NF-κB και p38/ERK MAPK [345]. Οι φαινολικές ενώσεις μπορούν επίσης να εμπλέκονται στα μονοπάτια μεταγωγής σήματος μέσω της διαμόρφωσης των επιπέδων του οξειδωτικού στρες στα κύτταρα. Προηγούμενα αποτελέσματα έχουν δείξει ότι η τυροσόλη θα μπορούσε να αναστείλει την παραγωγή O_2^- και H_2O_2 σε συγκεντρώσεις 50-250μM [346]. Η ρεσβερατρόλη μπορεί να ασκήσει ανασταλτική δράση μέσω της καταστολής των μονοπατιών της MAPK [347] και NF-κB [348]. Η αντιφλεγμονώδης δράση της ρεσβερατρόλης έναντι της IL-1β έχει επίσης αναφερθεί σε ανθρώπινα αρθρικά χονδροκύτταρα μέσω αναστολής του μονοπατιού TLRAC4/MyD88/NF-κB [349] και σε ανθρώπινα τενοντοκύτταρα μέσω χρόνο και δοσοεξαρτώμενης καταστολής της επαγόμενης από IL-1β ενεργοποίησης των μονοπατιών του NF -κB και PI3K [350]. Από την άλλη πλευρά, θα πρέπει να επισημανθεί ότι η ρεσβερατρόλη σε χαμηλές συγκεντρώσεις ενίσχυσε τη διεγερτική δράση της IL-1β στα επίπεδα του PAF, φαινόμενο που δεν μπορεί να αποδοθεί στην επίδραση της στη δραστικότητα των βιοσυνθετικών ενζύμων του PAF εφόσον δεν ανιχνεύθηκε αντίστοιχη αύξηση. Εν μέρει μπορεί να εξηγηθεί από την δράση της ρεσβερατρόλης στα μη διεγερμένα κύτταρα όπου η ρεσβερατρόλη σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις παρουσίασε διεγερτική δράση παρόμοια με εκείνη της IL-1β. Ακόμα κάτι άλλο που παρατηρήθηκε στα πειράματα, είναι ότι η συνεπώαση της ρεσβερατρόλης σε χαμηλές συγκεντρώσεις με την IL-1β είχε συνεργιστική δράση ενώ οι υψηλότερες συγκεντρώσεις τής ανασταλτική. Αυτές οι παρατηρήσεις δείχνουν μια πιθανή κοινή οδό μεταγωγής σήματος της IL-1β και της ρεσβερατρόλης. Επιπλέον άλλες ερευνητικές ομάδες έχουν αναφέρει ότι η ρεσβερατρόλη ενεργοποιεί

τις p38 MAPK κινάσες σε Τ κύτταρα [351], διεγείρει την επαγόμενη από IL-1β ενεργοποίηση του NF-κΒ σε μεσαγγειακά κύτταρα [216] και ενισχύει την παραγωγή TNF-α σε ανθρώπινα μονοκύτταρα [352].

Όσον αφορά τα Α.Π. της τυροσόλης, η ακετυλίωση του αρωματικού δακτυλίου φαίνεται να παίζει κρίσιμο ρόλο για την δράση του μορίου στη δραστικότητα της PAF-CPT και τα επίπεδα του PAF στη 0,5h. Το ακετυλιωμένο παράγωγο στο αρωματικό υδροξύλιο (TAc1) εμφανίζει ασθενέστερη δράση (2 φορές χαμηλότερα) σε σχέση με τη τυροσόλη, ενώ το ακετυλιωμένο παράγωγο στο αλειφατικό υδροξύλιο (TAc2) και διακετυλιωμένο παράγωγο (TAc3) είχαν δράση παρόμοια με την αρχική ένωση. Ωστόσο, όλα τα ακετυλιωμένα παράγωγα της τυροσόλης παρουσίασαν το ίδιο αποτέλεσμα με τη μητρική ένωση στα ενδοκυτταρικά επίπεδα του PAF και στη δραστικότητα της λυσο PAF-AT στις 3h. Αυτά τα αποτελέσματα μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η ακετυλίωση της τυροσόλης δεν φαίνεται να επηρεάζει την αντι-φλεγμονώδη δράση του μορίου έναντι του PAF, στα κύτταρα U937.

Από την άλλη πλευρά, τα ακετυλιωμένα παράγωγα της ρεσβερατρόλης έχουν διττή επίδραση στο μεταβολισμό του PAF. Μόνο το παράγωγο RAc3 είχε παρόμοια επίδραση με τη ρεσβερατρόλη στα επίπεδα του PAF και της PAF-CPT στη 0,5h, αλλά και στη δραστικότητα της λυσο PAF-AT στις 3h. Το παράγωγο αυτό σύμφωνα με αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, φάνηκε ότι παρουσιάζει βελτιωμένη δράση στη μη-ενζυμική λιποειδική υπεροξείδωση, υποστηρίζοντας την υπόθεση ότι η ομάδα του υδροξυλίου στη θέση 4’ της ρεσβερατρόλης, είναι απαραίτητη για τη βέλτιστη βιολογική δράση [324]. Στις 3h, το παράγωγο RAc2 είχε παρόμοια δράση με τη ρεσβερατρόλη στη μείωση των επιπέδων του PAF, ενώ τα RAc3 και RAc4 ασκούν ασθενέστερες δράσεις σε σύγκριση με τη ρεσβερατρόλη. Τέλος, κανένα από τα ακετυλιωμένα παράγωγα δεν εμφάνισε οποιαδήποτε επίδραση στην ειδική δραστικότητα της PAF -AH.

Η αύξηση της λιποφιλικότητας της ρεσβερατρόλης μέσω της μεθυλίωσης και συγκεκριμένα τα μονο-μεθόξυ παράγωγα, βελτίωσαν τη δράση στη 0,5h έναντι της δραστικότητας της PAF-CPT και των επιπέδων του PAF αφού η συγκέντρωση που απαιτήθηκε ήταν 2,5 φορές χαμηλότερη. Το τριμεθόξυ παράγωγο που δοκιμάστηκε στην ίδια συγκέντρωση με την αρχική ένωση διατήρησε την ανασταλτική δράση της ρεσβερατρόλης. Εδώ βέβαια θα πρέπει να αναφερθεί ότι τα μεθυλιωμένα παράγωγα δοκιμάστηκαν στις μέγιστες δυνατές συγκεντρώσεις που δεν επηρέαζαν τη βιωσιμότητα των κυττάρων U937.

Τα μέθυλο παράγωγα RMeth 1, 2, 3 παρουσίασαν το ίδιο αποτέλεσμα στη δραστικότητα του ενζύμου, δηλαδή βελτίωσαν την ανασταλτική δράση, αφού δοκιμάστηκαν σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις 100, 100 και 20μM αντίστοιχα, σε σχέση με την αρχική ένωση που δοκιμάστηκε στα 250μM (συγκέντρωση που είναι κοντά σε αυτή που προκαλεί 50% αναστολή).

Αυτό το αποτέλεσμα διατηρείται και στον ενδοκυτταρικό PAF για όλα τα μεθυλιωμένα παράγωγα εκτός από το 3,5-διμεθόξυ RMeth3, αφού η συγκέντρωση που δοκιμάστηκε δεν ήταν αρκετή (20μM έναντι των 250 μM τιμή IC_{50} της αρχικής φαινολικής ένωσης) για να μειώσει τα ενδοκυτταρικά επίπεδα του PAF στη 0,5h. Συγκεκριμένα το διμεθόξυ-παράγωγο της R, το οποίο δοκιμάστηκε σε υποδεκαπλάσια συγκέντρωση εμφάνισε ισχυρή ανασταλτική δράση όσον αφορά την PAF-CPT αλλά προκαλούσε επαγωγή των επιπέδων του PAF. Επιπλέον το παράγωγο RMeth3 αύξησε κατά 15% τη δραστικότητα της PAF-AH πιθανά για να ρυθμιστούν τα αυξημένα ενδοκυτταρικά επίπεδα.

Στις 3h τα αποτελέσματα ήταν λίγο διαφορετικά όπου μόνο τα δύο μονομεθόξυ παράγωγα διατήρησαν την ανασταλτική δράση έναντι της δραστικότητας της λυσο PAF-AT. Σε συμφωνία με τη 0,5h το παράγωγο RMeth3 διέγειρε τα ενδοκυτταρικά επίπεδα του PAF, ενώ σε αυτή τη χρονική στιγμή εκτός από το RMeth3 και το RMeth1 αυξάνει τη δραστικότητα του αποικοδομητικού ενζύμου.

Η αντιφλεγμονώδης δράση του παραγώγου 3-μονομεθόξυ ρεσβερατρόλη σε νευρικά κύτταρα φαίνεται να πραγματοποιείται μέσω της τροποποίησης/φωσφορυλίωσης των JNK c-Jun [282]. Επιπλέον έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία βελτίωση της αντι-καρκινικής δράσης της ρεσβερατρόλης σε κύτταρα του καρκίνου προστάτη (LNCaP) και μελανώματος (M-14), μέσω της μεθυλίωσής της [353]. Σε άλλη μελέτη η μεθυλίωση των φλαβονοειδών βελτίωσε την χημειοπροστατευτική δράση των αρχικών μορίων μέσω της μεγαλύτερης ηπατικής μεταβολικής σταθερότητας και εντερικής απορρόφησης που πετυχαίνεται [354].

Για το 3,5 διμεθόξυ παράγωγο ή pterostilbene, καταγράφεται ότι διατηρεί τη δράση της ρεσβερατρόλης, αφού αναστέλλει την ενεργοποίηση του NF-kβ από το TPA(tetradecanoylphorbol-13-acetate) σε επιδερμικά κύτταρα ποντικού, μέσω της μετατόπισης του p65 στον πυρήνα. Η δράση αυτή σύμφωνα με τους ερευνητές οφείλεται στην αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας μέσω της υποκατάστασης των υδροξυλίων με μεθυλο ομάδα, που αυξάνει την λιποφιλικότητα [355]. Η ύπαρξη αρκετών μελετών για την αντιφλεγμονώδη δράση της pterostilbene, οδήγησε στον

έλεγχο της ασφάλειας χορήγησής της στους ανθρώπους όπου η δόση μέχρι 250mg/μέρα θεωρείται ασφαλής [356].

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα το παράγωγο RMeth2 δρα και στις δύο χρονικές στιγμές με τον ίδιο τρόπο, ενώ το RMeth1 που παρουσιάζει ανασταλτική δράση τόσο στο βιοσυνθετικό ένζυμο όσο και στα ενδοκυτταρικά επίπεδα στη 0,5h, στις 3h διατηρεί την ανασταλτική δράση της R στο βιοσυνθετικό ένζυμο ενώ δεν επηρεάζει τα ενδοκυτταρικά επίπεδα του PAF.

Το τρίτο και τελευταίο κομμάτι των παραγώγων αφορά τους γλυκουρονιωμένους μεταβολίτες τυροσόλης και ρεσβερατρόλης. Αναλυτικά το γλυκουρονιωμένο παράγωγο της τυροσόλης TGlu, φαίνεται να διατηρεί την ανασταλτική δράση του αρχικού μορίου μόνο όσον αφορά τη δραστικότητα της PAF-CPT στη 0,5h, ενώ δε φαίνεται να επηρεάζει τη δραστικότητα του βιοσυνθετικού ενζύμου λυσο PAF-AT, του αποικοδομητικού PAF-AH αλλά ούτε και τα ενδοκυτταρικά επίπεδα του PAF σε καμία χρονική στιγμή. Είναι γνωστό από διάφορες κλινικές μελέτες ότι η τυροσόλη απεκκρίνεται με τη μορφή γλυκουρονιδίου από τον οργανισμό κυρίως μέσω των ούρων [357], για το λόγο αυτό είναι σημαντική η μελέτη της αντιφλεγμονώδους δράσης του μεταβολίτη.

Μόνο μία εργασία υπάρχει όπου μελετήθηκε η βιολογική δράση του γλυκουρονιωμένου μεταβολίτη της τυροσόλης και συγκεκριμένα η αντιοξειδωτική δράση του, αφού ενσωματώνεται στις LDL-λιποπρωτεΐνες και πιθανώς έτσι δρα ως in vivo αντιοξειδωτικό. Τα αποτελέσματα της μελέτης δεν παρουσίασαν σημαντική αντιοξειδωτική δράση των γλυκουρονιωμένων μεταβολιτών [358].

Οι γλυκουρονιωμένοι μεταβολίτες της ρεσβερατρόλης που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα μελέτη, είναι αυτοί που ανιχνεύονται σε βιολογικά υγρά μετά την κατανάλωση ρεσβερατρόλης από διατροφικές πηγές [359] και φαίνεται να διατηρούν εν μέρει την αντιφλεγμονώδη δράση του αρχικού μορίου στο κυτταρικό μοντέλο φλεγμονής που μελετήθηκε. Τα γλυκουρονιωμένα παράγωγα της ρεσβερατρόλης RGlu1 και 2, φαίνεται να διατηρούν την ανασταλτική δράση στη 0,5h. Εξαίρεση αποτελεί το RGlu2 που παρόλο που αναστέλλει τη δραστικότητα του βιοσυνθετικού ενζύμου, δεν επηρεάζει τα ενδοκυτταρικά επίπεδα του PAF. Στις 3h η δράση των δύο μονο-γλυκουρονιωμένων παραγώγων της ρεσβερατρόλης διαφέρει αφού τα παράγωγα διατηρούν τη δράση της αρχικής ένωσης μόνο στα ενδοκυτταρικά επίπεδα του PAF. Το αποτέλεσμα αυτό πιθανώς να οφείλεται στην τάση των παραγώγων να

ενεργοποιούν τη δραστικότητα της PAF-AH, αφού δεν επηρεάζουν τη δραστικότητα του βιοσυνθετικού ενζύμου λυσο PAF-AT.

Το αποτέλεσμα αυτό είναι σε συμφωνία με άλλη μελέτη όπου οι γλυκουρονιωμένοι μεταβολίτες εμφάνισαν αντιφλεγμονώδη δράση μετά από διέγερση με τον LPS στα U937. Βέβαια στη μελέτη αυτή δύο γλυκουρονιωμένα παράγωγα σε συγκεκριμένη χρονική στιγμή διέγειραν την παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών, σε αντίθεση με τα θείο παράγωγα που εμφάνισαν ισχυρότερη αντιφλεγμονώδη δράση σε όλες τις χρονικές στιγμές [360].

Η ίδια ερευνητική ομάδα έδειξε επίσης ότι τα γλυκουρονιωμένα παράγωγα δεν εμφάνισαν την ανασταλτική δράση του αρχικού μορίου στην παραγωγή IL-6 και IL-1 μετά από διέγερση με LPS στην κυτταρική σειρά U937 [361].

Επιπλέον τα γλυκουρονιωμένα παράγωγα δεν επηρέασαν τη δραστικότητα του ενζύμου eNOS, ούτε την παραγωγή NO και τα επίπεδα των ελευθέρων ριζών σε αντίθεση με τη ρεσβερατρόλη, με αποτέλεσμα να είναι δύσκολο να εξηγηθεί η *in vivo* αντιοξειδωτική δράση της ρεσβερατρόλης [362].

Συμπερασματικά, τα δεδομένα της παρούσας διατριβής δείχνουν ότι η αντι-φλεγμονώδης δράση των φαινολικών ενώσεων θα μπορούσε να εξηγηθεί εν μέρει μέσω διαμόρφωσης του μεταβολισμού του PAF. Ωστόσο, περαιτέρω πειράματα πρέπει να διεξαχθούν για την διαλεύκανση του μηχανισμού δράσης αυτών των φαινολικών ενώσεων.

Κεφάλαιο 8: Γενικά Συμπεράσματα

- ✓ **Η αντιοξειδωτική δράση της ρεσβερατρόλης υπερέχει αυτή της τυροσόλης**

- ✓ **Η ακετυλίωση βελτίωσε τη δράση των αρχικών φαινολικών ενώσεων σε δοκιμασίες μη ενζυμικής λιποειδικής υπεροξείδωσης**

- ✓ **Η μεθυλίωση βελτίωσε την ανασταλτική δράση της ρεσβερατρόλης έναντι της λιποοξυγονάσης (LOX)**

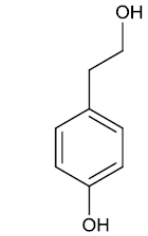
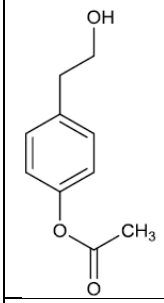
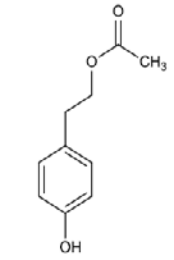
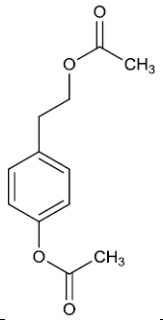
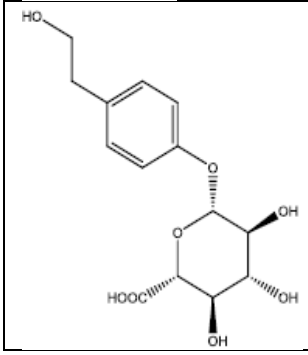
- ✓ **Η τυροσόλη έχει πιο ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση έναντι της ρεσβερατρόλης, στο μοντέλο φλεγμονής που μελετήσαμε**

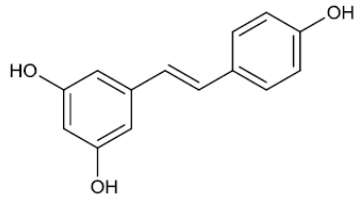
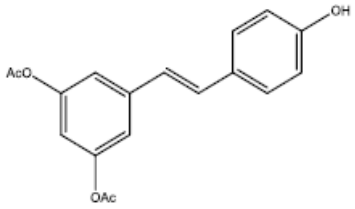
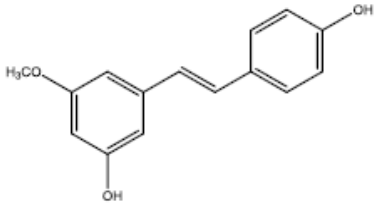
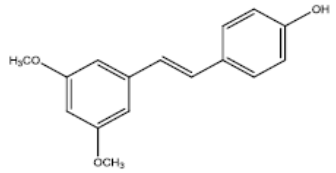
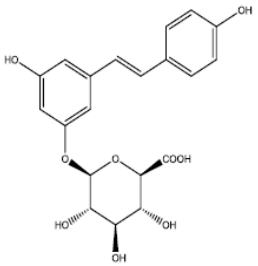
- ✓ **Η ανασταλτική δράση της τυροσόλης και της ρεσβερατρόλης στα επίπεδα του PAF, οφείλεται στη μείωση της δραστικότητας των βιοσυνθετικών του ενζύμων**

- ✓ **Η ακετυλίωση διατηρεί την ανασταλτική δράση της τυροσόλης, ενώ στην περίπτωση της ρεσβερατρόλης οδηγεί σε παράγωγα με διττό ρόλο**

- ✓ **Η μεθυλίωση της ρεσβερατρόλης είχε ως αποτέλεσμα παράγωγα με βελτιωμένη αντιφλεγμονώδη δράση**

- ✓ **Οι γλυκουρονιωμένοι μεταβολίτες τυροσόλης και ρεσβερατρόλης φαίνεται να διατηρούν εν μέρει την ανασταλτική δράση των αρχικών μορίων**

Δομή τυροσόλης και παραγώγων της	**U-937 0,5h**	**U-937 3h**
	**IC_{50}: 304±18 μM PAF** **IC_{50}: 246±61 μM PAF-CPT** **nd PAF-AH**	**IC_{50}: 82±40 PAF** **IC_{50}:48±11 λυσοPAF-AT** **↓ 15%PAF-AH**
	**- PAF** **- PAF-CPT** **nd PAF-AH**	**≈PAF** **≈λυσοPAF-AT** **nd PAF-AH**
	**≈ PAF** **≈ PAF-CPT** **nd PAF-AH**	**≈PAF** **≈ λυσοPAF-AT** **nd PAF-AH**
	**≈ PAF** **≈ PAF-CPT** **nd PAF-AH**	**≈ PAF** **≈ λυσοPAF-AT** **nd PAF-AH**
	**- PAF** **≈ PAF-CPT** **nd PAF-AH**	**nd PAF** **- λυσο PAF-AT** **nd PAF-AH**

Δομή ρεσβερατρόλης και παραγώγων της	**U-937 0,5h**	**U-937 3h**
	**IC_{50}: 281±3μM PAF** **IC_{50}: 294±102μM PAF-CPT** **nd PAF-AH**	**IC_{50}: 200±32μM PAF** **IC_{50}:157±77μM λυσο PAF-AT** **↑ 50% PAF-AH**
	**≈ PAF** **≈ PAF-CPT** **nd PAF-AH**	**- PAF** **≈ λυσοPAF-AT** **nd PAF-AH**
	**+ PAF** **+PAF-CPT** **nd PAF-AH**	**≈PAF** **≈ λυσοPAF-AT** **nd PAF-AH**
	**- PAF** **+ PAF-CPT** **↑ 20% PAFAH**	**- PAF** **nd λυσοPAF-AT** **nd PAF-AH**
	**≈ PAF** **≈ PAF-CPT** **nd PAF-AH**	**≈ PAF** **- λυσο PAF-AT** **nd PAF-AH**

Πίνακας 3: Η δομή των παραγώγων τυροσόλης και ρεσβερατρόλης με σημαντική βιολογική δράση. Τα παράγωγα της τυροσόλης παρουσιάζονται όλα, ενώ της ρεσβερατρόλης τα τέσσερα που εμφάνισαν σημαντική βιολογική δράση, σε σχέση με τα έντεκα που συντέθηκαν συνολικά. Το ≈ σημαίνει διατήρηση της ανασταλτικής δράσης της αρχικής ένωσης/ - σημαίνει χειρότερη δράση σε σχέση με την ανασταλτική της αρχικής ένωσης/+ σημαίνει βελτίωση της δράσης σε σχέση με την ανασταλτική της αρχικής ένωσης/ nd δεν ανιχνεύτηκε επίδραση σε σχέση με τη δράση της IL-1β/ ↑ αύξηση ή ↓ μείωση της δράσης της IL-1β

Κεφάλαιο 9: Βιβλιογραφία

1. Goldsby, R.A., T.J. Kindt, J. Kuby, and B.A. Osborne, Immunology. 2002, New York, NY: W.H. Freeman and Company.
2. Andreoli, T.E., C.C.J. Carpenter, R. Briggs, and J. Loscalzo, Cecil Essentials of Medicine. 2000: Elsevier Science.
3. Vander, A.J., D. Luciano, and J. Sherman, Physiology. The mechanisms of body functions. 2001, Boston, MA: McGraw-Hill Higher Education.
4. Pinchuk, G., Schaum's Outline of Theory and Problems of Immunology. 2001, US: Mcgraw-Hill Education - Europe (United States).
5. Prescott, S.M., G.A. Zimmerman, D.M. Stafforini, and T.M. McIntyre, Platelet-activating factor and related lipid mediators, in Annual Review of Biochemistry. 2000. p. 419-445.
6. Antonopoulou, S., T. Nomikos, H.C. Karantonis, E. Fragopoulou, and C.A. Demopoulos, PAF, a potent lipid mediator, in *Bioactive Phospholipids. Role in inflammation and Atherosclerosis*, A.D. Tselepis, Editor. 2008, Transworld Research Network: Kerala, India. p. 85-134.
7. Montrucchio, G., G. Alloatti, and G. Camussi, Role of platelet-activating factor in cardiovascular pathophysiology. Physiological Reviews, 2000. 80(4): p. 1669-1699.
8. Hubbard, J.W., R.H. Cox, J.E. Lawler, M.L. Blank, and F. Snyder, Cardiac output and peripheral vascular resistance during intravenous infusion of 1-hexadecyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine in conscious normotensive and spontaneously hypertensive rats. Res Commun Chem Pathol Pharmacol, 1985. 49(3): p. 459-62.
9. Demopoulos, C.A., in The 2nd International Conference on Platelet Activating Factor and structurally related alkyl-ether lipids. 1986: Tennesse, USA.
10. Hanahan, D.J., Platelet activating factor: A biologically active phosphoglyceride. Annual Review of Biochemistry, 1986. VOL. 55: p. 483-509.
11. Snyder, F., Platelet-activating factor and related acetylated lipids as potent biologically active cellular mediators. American Journal of Physiology - Cell Physiology, 1990. 259(5 28-5): p. C697-C708.
12. Snyder, F., Platelet-activating factor and its analogs: metabolic pathways and related intracellular processes. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Lipids and Lipid Metabolism, 1995. 1254(3): p. 231-249.
13. Snyder, F., Platelet-activating factor: The biosynthetic and catabolic enzymes. Biochemical Journal, 1995. 305(3): p. 689-705.
14. Dentan, C., P. Lesnik, M.J. Chapman, and E. Ninio, Phagocytic activation induces formation of platelet-activating factor in human monocyte-derived macrophages and in macrophage-derived foam cells - Relevance to the inflammatory reaction in atherogenesis. European Journal of Biochemistry, 1996. 236(1): p. 48-55.
15. Chao, W. and M.S. Olson, Platelet-activating factor: Receptors and signal transduction. Biochemical Journal, 1993. 292(3): p. 617-629.
16. Karantonis, H.C., S. Antonopoulou, D.N. Perrea, D.P. Sokolis, S.E. Theocharis, N. Kavantzas, D.G. Iliopoulos, and C.A. Demopoulos, In vivo antiatherogenic properties of olive oil and its constituent lipid classes in hyperlipidemic rabbits. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2006. 16(3): p. 174-85.
17. Baker, P.R.S., J.S. Owen, A.B. Nixon, L.N. Thomas, R. Wooten, L.W. Daniel, J.T. O'Flaherty, and R.L. Wykle, Regulation of platelet-activating factor synthesis in human neutrophils by MAP kinases. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research, 2002. 1592(2): p. 175-184.
18. Lee, T.C., Y. Uemura, and F. Snyder, A novel CoA-independent transacetylase produces the ethanolamine plasmalogen and acyl analogs of platelet-activating factor (PAF) with PAF as the acetate donor in HL-60 cells. Journal of Biological Chemistry, 1992. 267(28): p. 19992-20001.
19. Ninio, E., M. Breton, J. Bidault, and O. Colard, Biosynthesis of paf-acether XVII. Regulation by the CoA-independent transacylase in human neutrophils. FEBS Letters, 1991. 289(2): p. 138-140.
20. Snyder, F., T.C. Lee, and M.L. Blank, The role of transacylases in the metabolism of arachidonate and platelet activating factor. Progress in Lipid Research, 1992. 31(1): p. 65-86.
21. Shindou, H., D. Hishikawa, H. Nakanishi, T. Harayama, S. Ishii, R. Taguchi, and T. Shimizu, A single enzyme catalyzes both platelet-activating factor production and membrane biogenesis of inflammatory cells: Cloning and characterization of acetyl-CoA:lyso-PAF acetyltransferase. J. Biol. Chem, 2007. 282(9): p. 6532-6539.
22. Tarui, M., H. Shindou, K. Kumagai, R. Morimoto, T. Harayama, T. Hashidate, H. Kojima, T. Okabe, T. Nagano, T. Nagase, and T. Shimizu, Selective inhibitors of a PAF biosynthetic enzyme lysophosphatidylcholine acyltransferase 2. Journal of Lipid Research, 2014. 55(7): p. 1386-1396.
23. Baker, R.R., Lipid acetylation reactions and the metabolism of platelet-activating factor. Neurochemical Research, 2000. 25(5): p. 677-683.
24. Morimoto, R., H. Shindou, M. Tarui, and T. Shimizu, Rapid production of platelet-activating factor is induced by protein kinase Cα-mediated phosphorylation of lysophosphatidylcholine acyltransferase 2 protein. Journal of Biological Chemistry, 2014. 289(22): p. 15566-15576.
25. Montrucchio, G., G. Alloatti, and G. Camussi, Role of platelet-activating factor in cardiovascular pathophysiology. Physiol Rev, 2000. 80(4): p. 1669-99.

26. Clark, J.D., N. Milona, and J.L. Knopf, Purification of a 110-kilodalton cytosolic phospholipase A2 from the human monocytic cell line U937. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1990. 87(19): p. 7708-7712.
27. Jaffrey, S.R. and F. Snyder, in 6Th International Congress on PAF and related lipid mediators. 1998.
28. Nomikos, T.N., C. Iatrou, and C.A. Demopoulos, Application of a TCA-precipitation method for the determination of 1-alkyl-sn-glycero-3-phosphate: Acetyl-CoA acetyltransferase in human renal tissue. Prostaglandins and Other Lipid Mediators, 2004. 73(1-2): p. 123-140.
29. Snyder, F., CDP-choline: Alkylacetylglycerol cholinephosphotransferase catalyzes the final step in the de novo synthesis of platelet-activating factor. Biochim. Biophys. Acta, 1997. 1348(1-2): p. 111-116.
30. Tsoupras, A.B., E. Fragopoulou, T. Nomikos, C. Iatrou, S. Antonopoulou, and C.A. Demopoulos, Characterization of the de novo biosynthetic enzyme of platelet activating factor, DDT-insensitive cholinephosphotransferase, of human mesangial cells. Mediators of inflammation, 2007. 2007: p. 27683.
31. Dennis, E.A., The growing phospholipase A2 superfamily of signal transduction enzymes. Trends in Biochemical Sciences, 1997. 22(1): p. 1-2.
32. Liapikos, T.A., S. Antonopoulou, S.A.P. Karabina, D.C. Tsoukatos, C.A. Demopoulos, and A.D. Tselepis, Platelet-activating factor formation during oxidative modification of low-density lipoprotein when PAF-acetylhydrolase has been inactivated. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Lipids and Lipid Metabolism, 1994. 1212(3): p. 353-360.
33. Tjoelker, L.W., C. Wilder, C. Eberhardt, D.M. Stafforinit, G. Dietsch, B. Schimpf, S. Hooper, H.L. Trong, L.S. Cousens, G.A. Zimmerman, Y. Yamadat, T.M. McLntyre, S.M. Prescott, and P.W. Gray, Anti-inflammatory properties of a platelet-activating factor acetylhydrolase. Nature, 1995. 374(6522): p. 549-553.
34. Karasawa, K., A. Harada, N. Satoh, K. Inoue, and M. Setaka, Plasma platelet activating factor-acetylhydrolase (PAF-AH). Progress in Lipid Research, 2003. 42(2): p. 93-114.
35. Stafforini, D.M., S.M. Prescott, G.A. Zimmerman, and T.M. McIntyre, Mammalian platelet-activating factor acetylhydrolases. Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism, 1996. 1301(3): p. 161-173.
36. Tselepis, A.D. and M.J. Chapman, Inflammation, bioactive lipids and atherosclerosis: Potential roles of a lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet activating factor-acetylhydrolase. Atherosclerosis Supplements, 2002. 3(4): p. 57-68.
37. Miwa, M., T. Miyake, T. Yamanaka, J. Sugatani, Y. Suzuki, S. Sakata, Y. Araki, and M. Matsumoto, Characterization of serum platelet-activating factor (PAF) acetylhydrolase. Correlation between deficiency of serum PAF acetylhydrolase and respiratory symptoms in asthmatic children. Journal of Clinical Investigation, 1988. 82(6): p. 1983-1991.
38. Stafforini, D.M., K. Satoh, D.L. Atkinson, L.W. Tjoelker, C. Eberhardt, H. Yoshida, T.A. Imaizumi, S. Takamatsu, G.A. Zimmerman, T.M. McIntyre, P.W. Gray, and S.M. Prescott, Platelet-activating factor acetylhydrolase deficiency: A missense mutation near the active site of an anti-inflammatory phospholipase. Journal of Clinical Investigation, 1996. 97(12): p. 2784-2791.
39. Yamada, Y. and M. Yokota, Loss of activity of plasma platelet-activating factor acetylhydrolase due to a novel Gln281→Arg mutation. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1997. 236(3): p. 772-775.
40. Macphee, C.H., K.E. Moores, H.F. Boyd, D. Dhanak, R.J. Ife, C.A. Leach, D.S. Leake, K.J. Milliner, R.A. Patterson, K.E. Suckling, D.G. Tew, and D.M.B. Hickey, Lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet-activating factor acetylhydrolase, generates two bioactive products during the oxidation of low-density lipoprotein: Use of a novel inhibitor. Biochemical Journal, 1999. 338(2): p. 479-487.
41. Macphee, C.H., Lipoprotein-associated phospholipase A2: A potential new risk factor for coronary artery disease and a therapeutic target. Current Opinion in Pharmacology, 2001. 1(2): p. 121-125.
42. Yamada, Y., S. Ichihara, T. Fujimura, and M. Yokota, Identification of the G994 → T missense mutation in exon 9 of the plasma platelet-activating factor acetylhydrolase gene as an independent risk factor for coronary artery disease in Japanese men. Metabolism: Clinical and Experimental, 1998. 47(2): p. 177-181.
43. Wu, X., G.A. Zimmerman, S.M. Prescott, and D.M. Stafforini, The p38 MAPK pathway mediates transcriptional activation of the plasma platelet-activating factor acetylhydrolase gene in macrophages stimulated with lipopolysaccharide. Journal of Biological Chemistry, 2004. 279(34): p. 36158-36165.
44. Servillo, L., C. Balestrieri, A. Giovane, P. Pari, D. Palma, G. Giannattasio, M. Triggiani, and M.L. Balestrieri, Lysophospholipid transacetylase in the regulation of PAF levels in human monocytes and macrophages. The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 2006. 20(7): p. 1015-1017.
45. Gery, I., R.K. Gershon, and B.H. Waksman, Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens. I. The responding cell. J Exp Med, 1972. 136(1): p. 128-42.
46. Bird, S., J. Zou, T. Wang, B. Munday, C. Cunningham, and C.J. Secombes, Evolution of interleukin-1β. Cytokine and Growth Factor Reviews, 2002. 13(6): p. 483-502.
47. Fogal, B. and S.J. Hewett, Interleukin-1β: A bridge between inflammation and excitotoxicity? Journal of Neurochemistry, 2008. 106(1): p. 1-23.
48. Dinarello, C.A., Biologic basis for interleukin-1 in disease. Blood, 1996. 87(6): p. 2095-2147.
49. Brough, D. and N.J. Rothwell, Caspase-1-dependent processing of pro-interlukin-1β is cytosolic and precedes cell death. Journal of Cell Science, 2007. 120(5): p. 772-781.

50. Simi, A., M. Porsmyr-Palmertz, A. Hjertén, M. Ingelman-Sundberg, and N. Tindberg, The neuroprotective agents chlomethiazole and SB203580 inhibit IL-1β signalling but not its biosynthesis in rat cortical glial cells. Journal of Neurochemistry, 2002. 83(3): p. 727-737.
51. Kim, S.H., C.J. Smith, and L.J. Van Eldik, Importance of MAPK pathways for microglial pro-inflammatory cytokine IL-1β production. Neurobiology of Aging, 2004. 25(4): p. 431-439.
52. Wang, X., H. Xue, Q. Xu, K. Zhang, X. Hao, L. Wang, and G. Yan, p38 kinase/cytosolic phospholipase A2/cyclooxygenase-2 pathway: a new signaling cascade for lipopolysaccharide-induced interleukin-1beta and interleukin-6 release in differentiated U937 cells. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2008. 86(1-4): p. 61-7.
53. Bonizzi, G., J. Piette, M.P. Merville, and V. Bours, Cell type-specific role for reactive oxygen species in nuclear factor- kappaB activation by interleukin-1. Biochemical Pharmacology, 2000. 59(1): p. 7-11.
54. Dinarello, C.A., Interleukin-1beta. Crit. Care. Med, 2005. 33(12 Suppl): p. S460-2.
55. Valone, F.H. and L.B. Epstein, Biphasic platelet-activating factor synthesis by human monocytes stimulated with IL-1-β, tumor necrosis factor, or IFN-γ. Journal of Immunology, 1988. 141(11): p. 3945-3950.
56. Sundstrom, C. and K. Nilsson, Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U 937). International Journal of Cancer, 1976. 17(5): p. 565-577.
57. Vlachogianni, I.C., T. Nomikos, E. Fragopoulou, G.M. Stamatakis, H.C. Karantonis, S. Antonopoulou, and C.A. Demopoulos, Interleukin-1beta stimulates platelet-activating factor production in U-937 cells modulating both its biosynthetic and catabolic enzymes. Cytokine, 2013. 63(2): p. 97-104.
58. Rajendran, P., N. Nandakumar, T. Rengarajan, R. Palaniswami, E.N. Gnanadhas, U. Lakshminarasaiah, J. Gopas, and I. Nishigaki, Antioxidants and human diseases. Clin Chim Acta, 2014. 436: p. 332-47.
59. Johnson, R.J., S.J. Klebanoff, R.F. Ochi, S. Adler, P. Baker, L. Sparks, and W.G. Couser, Participation of the myeloperoxidase-H2O2-halide system in immune complex nephritis. Kidney International, 1987. 32(3): p. 342-349.
60. Nunez, A., T.A. Foglia, and G.J. Piazza, Characterization of lipoxygenase oxidation products by high-performance liquid chromatography with electron impact-mass spectrometric detection. Lipids, 2001. 36(8): p. 851-6.
61. Kuhn, H., S. Banthiya, and K. Van Leyen, Mammalian lipoxygenases and their biological relevance. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids, 2015. 1851(4): p. 308-330.
62. Yamamoto, S., Mammalian lipoxygenases: molecular structures and functions. Biochimica et Biophysica Acta, 1992. 1128(2-3): p. 117-31.
63. Parkinson, L. and R. Keast, Oleocanthal, a phenolic derived from virgin olive oil: a review of the beneficial effects on inflammatory disease. Int J Mol Sci, 2014. 15(7): p. 12323-34.
64. Bravo, L., Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. Nutr Rev, 1998. 56(11): p. 317-33.
65. Visioli, F., L. Borsani, and C. Galli, Diet and prevention of coronary heart disease: the potential role of phytochemicals. Cardiovasc Res, 2000. 47(3): p. 419-25.
66. Williams, C.A., J.B. Harborne, H. Geiger, and J.R. Hoult, The flavonoids of Tanacetum parthenium and T. vulgare and their anti-inflammatory properties. Phytochemistry, 1999. 51(3): p. 417-23.
67. D'Archivio, M., C. Filesi, R. Di Benedetto, R. Gargiulo, C. Giovannini, and R. Masella, Polyphenols, dietary sources and bioavailability. Ann Ist Super Sanita, 2007. 43(4): p. 348-61.
68. Vitaglione, P., G. Donnarumma, A. Napolitano, F. Galvano, A. Gallo, L. Scalfi, and V. Fogliano, Protocatechuic acid is the major human metabolite of cyanidin-glucosides. J Nutr, 2007. 137(9): p. 2043-8.
69. Lempereur, I., X. Rouau, and J. Abecassis, Genetic and agronomic variation in arabinoxylan and ferulic acid contents of durum wheat (Triticum durum l.) grain and its milling fractions. Journal of Cereal Science, 1997. 25(2): p. 103-110.
70. Sosulski, F., K. Krygier, and L. Hogge, Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 3. Composition of phenolic acids in cereal and potato flours. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1982. 30(2): p. 337-340.
71. Perez-Mana, C., M. Farre, J. Rodriguez-Morato, E. Papaseit, M. Pujadas, M. Fito, P. Robledo, M.I. Covas, V. Cheynier, E. Meudec, J.L. Escudier, and R. de la Torre, Moderate consumption of wine, through both its phenolic compounds and alcohol content, promotes hydroxytyrosol endogenous generation in humans. A randomized controlled trial. Mol Nutr Food Res, 2015. 59(6): p. 1213-6.
72. Cabrini, L., V. Barzanti, M. Cipollone, D. Fiorentini, G. Grossi, B. Tolomelli, L. Zambonin, and L. Landi, Antioxidants and total peroxyl radical-trapping ability of olive and seed oils. J Agric Food Chem, 2001. 49(12): p. 6026-32.
73. Covas, M.I., E. Miro-Casas, M. Fito, M. Farre-Albadalejo, E. Gimeno, J. Marrugat, and R. De La Torre, Bioavailability of tyrosol, an antioxidant phenolic compound present in wine and olive oil, in humans. Drugs Exp Clin Res, 2003. 29(5-6): p. 203-6.
74. Di Benedetto, R., R. Varì, B. Scazzocchio, C. Filesi, C. Santangelo, C. Giovannini, P. Matarrese, M. D'Archivio, and R. Masella, Tyrosol, the major extra virgin olive oil compound, restored intracellular antioxidant defences in spite of its weak antioxidative effectiveness. Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases, 2007. 17(7): p. 535-545.
75. Fito, M., M. Guxens, D. Corella, G. Saez, R. Estruch, R. de la Torre, F. Frances, C. Cabezas, C. Lopez-Sabater Mdel, J. Marrugat, A. Garcia-Arellano, F. Aros, V. Ruiz-Gutierrez, E. Ros, J. Salas-Salvado, M.

Fiol, R. Sola, and M.I. Covas, Effect of a traditional Mediterranean diet on lipoprotein oxidation: a randomized controlled trial. Arch Intern Med, 2007. 167(11): p. 1195-203.
76. Baliga, M.S., S. Meleth, and S.K. Katiyar, Growth inhibitory and antimetastatic effect of green tea polyphenols on metastasis-specific mouse mammary carcinoma 4T1 cells in vitro and in vivo systems. Clin Cancer Res, 2005. 11(5): p. 1918-27.
77. Lampe, J.W., Isoflavonoid and lignan phytoestrogens as dietary biomarkers. J Nutr, 2003. 133 Suppl 3: p. 956s-964s.
78. Heinonen, S., T. Nurmi, K. Liukkonen, K. Poutanen, K. Wahala, T. Deyama, S. Nishibe, and H. Adlercreutz, In vitro metabolism of plant lignans: new precursors of mammalian lignans enterolactone and enterodiol. J Agric Food Chem, 2001. 49(7): p. 3178-86.
79. Saleem, M., H.J. Kim, M.S. Ali, and Y.S. Lee, An update on bioactive plant lignans. Nat Prod Rep, 2005. 22(6): p. 696-716.
80. Ververidis, F., E. Trantas, C. Douglas, G. Vollmer, G. Kretzschmar, and N. Panopoulos, Biotechnology of flavonoids and other phenylpropanoid-derived natural products. Part I: Chemical diversity, impacts on plant biology and human health. Biotechnol J, 2007. 2(10): p. 1214-34.
81. Graefe, E.U., J. Wittig, S. Mueller, A.K. Riethling, B. Uehleke, B. Drewelow, H. Pforte, G. Jacobasch, H. Derendorf, and M. Veit, Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. J Clin Pharmacol, 2001. 41(5): p. 492-9.
82. Cortell, J.M. and J.A. Kennedy, Effect of shading on accumulation of flavonoid compounds in (Vitis vinifera L.) pinot noir fruit and extraction in a model system. J Agric Food Chem, 2006. 54(22): p. 8510-20.
83. Leuzzi, U., C. Caristi, V. Panzera, and G. Licandro, Flavonoids in pigmented orange juice and second-pressure extracts. J Agric Food Chem, 2000. 48(11): p. 5501-6.
84. Eisen, B., Y. Ungar, and E. Shimoni, Stability of isoflavones in soy milk stored at elevated and ambient temperatures. J Agric Food Chem, 2003. 51(8): p. 2212-5.
85. Haslam, E., Symmetry and promiscuity in procyanidin biochemistry. Phytochemistry, 1977. 16(11): p. 1625-1640.
86. Tubaro, F., E. Micossi, and F. Ursini, The antioxidant capacity of complex mixtures by kinetic analysis of crocin bleaching inhibition. JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society, 1996. 73(2): p. 173-179.
87. Gutfinger, T., Polyphenols in olive oils. Journal of the American Oil Chemists Society, 1981. 58(11): p. 966-968.
88. Papadopoulos, G. and D. Boskou, Antioxidant effect of natural phenols on olive oil. Journal of the American Oil Chemists Society, 1991. 68(9): p. 669-671.
89. Tsimidou, M., G. Papadopoulos, and D. Boskou, Phenolic compounds and stability of virgin olive oil-Part I. Food Chemistry, 1992. 45(2): p. 141-144.
90. Blekas, G., M. Tsimidou, and D. Boskou, Contribution of α-tocopherol to olive oil stability. Food Chemistry, 1995. 52(3): p. 289-294.
91. Baldioli, M., M. Servili, G. Perretti, and G.F. Montedoro, Antioxidant activity of tocopherols and phenolic compounds of virgin olive oil. JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society, 1996. 73(11): p. 1589-1593.
92. Scotece, M., J. Conde, V. Abella, V. Lopez, J. Pino, F. Lago, A.B. Smith, III, J.J. Gómez-Reino, and O. Gualillo, New drugs from ancient natural foods. Oleocanthal, the natural occurring spicy compound of olive oil: A brief history. Drug Discovery Today, 2015. 20(4): p. 406-410.
93. Du, F. and Y.S. Fung, Development of CE-dual opposite carbon-fiber micro-disk electrode detection for peak purity assessment of polyphenols in red wine. Electrophoresis, 2010. 31(13): p. 2192-9.
94. Soleas, G.J., E.P. Diamandis, and D.M. Goldberg, Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention. J Clin Lab Anal, 1997. 11(5): p. 287-313.
95. Renaud, S. and M. de Lorgeril, Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. Lancet, 1992. 339(8808): p. 1523-6.
96. Fauconneau, B., P. Waffo-Teguo, F. Huguet, L. Barrier, A. Decendit, and J.M. Merillon, Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from Vitis vinifera cell cultures using in vitro tests. Life Sci, 1997. 61(21): p. 2103-10.
97. Bianchini, F. and H. Vainio, Wine and resveratrol: mechanisms of cancer prevention? Eur J Cancer Prev, 2003. 12(5): p. 417-25.
98. Balentine, A.D., Manufacturing and chemistry of tea, in *Phenolic compounds in food and their effects on health I.*, H. Chi-Tang, Y.L. Chang, and H. Mou-Tan, Editors. 1992, ACS: Washington DC. p. 103-117.
99. Clifford, M.N., Chlorogenic acids and other cinnamates - Nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2000. 80(7): p. 1033-1043.
100. Friedman, M., Chemistry, Biochemistry, and Dietary Role of Potato Polyphenols. A Review. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997. 45(5): p. 1523-1540.
101. Li, X., B. Wu, L. Wang, and S. Li, Extractable amounts of trans-resveratrol in seed and berry skin in Vitis evaluated at the germplasm level. J Agric Food Chem, 2006. 54(23): p. 8804-11.
102. Ortega, R.M., Importance of functional foods in the Mediterranean diet. Public Health Nutrition, 2006. 9(8A): p. 1136-1140.
103. Scalbert, A. and G. Williamson, Dietary intake and bioavailability of polyphenols. J Nutr, 2000. 130(8S Suppl): p. 2073s-85s.

104. Anderson, J.W., B.M. Johnstone, and M.E. Cook-Newell, Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. N Engl J Med, 1995. 333(5): p. 276-82.
105. Anderson, J.W., B.M. Smith, and C.S. Washnock, Cardiovascular and renal benefits of dry bean and soybean intake. Am J Clin Nutr, 1999. 70(3 Suppl): p. 464s-474s.
106. Bouchenak, M. and M. Lamri-Senhadji, Nutritional quality of legumes, and their role in cardiometabolic risk prevention: a review. J Med Food, 2013. 16(3): p. 185-98.
107. Sicilia, T., H.B. Niemeyer, D.M. Honig, and M. Metzler, Identification and stereochemical characterization of lignans in flaxseed and pumpkin seeds. J Agric Food Chem, 2003. 51(5): p. 1181-8.
108. Sang, S., K. Lapsley, W.S. Jeong, P.A. Lachance, C.T. Ho, and R.T. Rosen, Antioxidative phenolic compounds isolated from almond skins (Prunus amygdalus Batsch). J Agric Food Chem, 2002. 50(8): p. 2459-63.
109. Kayano, S., H. Kikuzaki, N. Fukutsuka, T. Mitani, and N. Nakatani, Antioxidant activity of prune (Prunus domestica L.) constituents and a new synergist. J Agric Food Chem, 2002. 50(13): p. 3708-12.
110. Xie, L. and B.W. Bolling, Characterisation of stilbenes in California almonds (Prunus dulcis) by UHPLC-MS. Food Chem, 2014. 148: p. 300-6.
111. Tokusoglu, O., M.K. Unal, and F. Yemis, Determination of the phytoalexin resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) in peanuts and pistachios by high-performance liquid chromatographic diode array (HPLC-DAD) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). J Agric Food Chem, 2005. 53(12): p. 5003-9.
112. Aramendia, M.A., I.M. Garcia, F. Lafont, J. Lizaso, J.M. Marinas, and F.J. Urbano, Rapid determination of chlorogenic acid and related compounds in sunflower seeds by high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom, 2000. 14(12): p. 1019-22.
113. Kountouri, A.M., A. Mylona, A.C. Kaliora, and N.K. Andrikopoulos, Bioavailability of the phenolic compounds of the fruits (drupes) of Olea europaea (olives): impact on plasma antioxidant status in humans. Phytomedicine, 2007. 14(10): p. 659-67.
114. Del Rio, D., L.G. Costa, M.E. Lean, and A. Crozier, Polyphenols and health: what compounds are involved? Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2010. 20(1): p. 1-6.
115. Tzounis, X., J. Vulevic, G.G. Kuhnle, T. George, J. Leonczak, G.R. Gibson, C. Kwik-Uribe, and J.P. Spencer, Flavanol monomer-induced changes to the human faecal microflora. Br J Nutr, 2008. 99(4): p. 782-92.
116. Heleno, S.A., A. Martins, M.J.R.P. Queiroz, and I.C.F.R. Ferreira, Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. Food Chemistry, 2014. 173: p. 501-513.
117. Gee, J.M., M.S. DuPont, M.J. Rhodes, and I.T. Johnson, Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway. Free Radic Biol Med, 1998. 25(1): p. 19-25.
118. Brown, J.E., H. Khodr, R.C. Hider, and C.A. Rice-Evans, Structural dependence of flavonoid interactions with Cu2+ ions: implications for their antioxidant properties. Biochem J, 1998. 330 (Pt 3): p. 1173-8.
119. Matuschek, M.C., W.H. Hendriks, T.K. McGhie, and G.W. Reynolds, The jejunum is the main site of absorption for anthocyanins in mice. J Nutr Biochem, 2006. 17(1): p. 31-6.
120. Talavera, S., C. Felgines, O. Texier, C. Besson, J.L. Lamaison, and C. Remesy, Anthocyanins are efficiently absorbed from the stomach in anesthetized rats. J Nutr, 2003. 133(12): p. 4178-82.
121. Passamonti, S., U. Vrhovsek, A. Vanzo, and F. Mattivi, Fast access of some grape pigments to the brain. J Agric Food Chem, 2005. 53(18): p. 7029-34.
122. Leese, H.J. and G. Semenza, On the identity between the small intestinal enzymes phlorizin hydrolase and glycosylceramidase. J Biol Chem, 1973. 248(23): p. 8170-3.
123. Day, A.J., F.J. Canada, J.C. Diaz, P.A. Kroon, R. McLauchlan, C.B. Faulds, G.W. Plumb, M.R. Morgan, and G. Williamson, Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. FEBS Lett, 2000. 468(2-3): p. 166-70.
124. Nesbitt, P.D., Y. Lam, and L.U. Thompson, Human metabolism of mammalian lignan precursors in raw and processed flaxseed. Am J Clin Nutr, 1999. 69(3): p. 549-55.
125. Day, A.J., M.S. DuPont, S. Ridley, M. Rhodes, M.J. Rhodes, M.R. Morgan, and G. Williamson, Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity. FEBS Lett, 1998. 436(1): p. 71-5.
126. Prasain, J.K. and S. Barnes, Metabolism and bioavailability of flavonoids in chemoprevention: current analytical strategies and future prospectus. Mol Pharm, 2007. 4(6): p. 846-64.
127. Hu, M., J. Chen, and H. Lin, Metabolism of flavonoids via enteric recycling: Mechanistic studies of disposition of apigenin in the Caco-2 cell culture model. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2003. 307(1): p. 314-321.
128. Scheepens, A., K. Tan, and J.W. Paxton, Improving the oral bioavailability of beneficial polyphenols through designed synergies. Genes and Nutrition, 2010. 5(1): p. 75-87.
129. Piskula, M.K. and J. Terao, Accumulation of (-)-epicatechin metabolites in rat plasma after oral administration and distribution of conjugation enzymes in rat tissues. Journal of Nutrition, 1998. 128(7): p. 1172-1178.
130. Tilgmann, C. and I. Ulmanen, Purification methods of mammalian catechol-O-methyltransferase. Journal of Chromatography B: Biomedical Applications, 1996. 684(1-2): p. 147-161.

131. Nielsen, S.E., V. Breinholt, U. Justesen, C. Cornett, and L.O. Dragsted, In vitro biotransformation of flavonoids by rat liver microsomes. Xenobiotica, 1998. 28(4): p. 389-401.
132. Mojarrabi, B. and P.I. Mackenzie, Characterization of two UDP glucuronosyltransferases that are predominantly expressed in human colon. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1998. 247(3): p. 704-709.
133. Strassburg, C.P., N. Nguyen, M.P. Manns, and R.H. Tukey, Polymorphic expression of the UDP-glucuronosyltransferase UGT1A gene locus in human gastric epithelium. Molecular Pharmacology, 1998. 54(4): p. 647-654.
134. Strassburg, C.P., N. Nguyen, M.P. Manns, and R.H. Tukey, UDP-glucuronosyltransferase activity in human liver and colon. Gastroenterology, 1999. 116(1): p. 149-160.
135. Coughtrie, M.W.H., S. Sharp, K. Maxwell, and N.P. Innes, Biology and function of the reversible sulfation pathway catalysed by human sulfotransferases and sulfatases. Chemico-Biological Interactions, 1998. 109(1-3): p. 3-27.
136. Burchell, B., C.H. Brierley, and D. Rance, Specificity of human UDP-Glucuronosyltransferases and xenobiotic glucuronidation. Life Sciences, 1995. 57(20): p. 1819-1831.
137. Walle, T., E.A. Eaton, and U.K. Walle, Quercetin, a potent and specific inhibitor of the human P-form phenolsulfotransferase. Biochemical Pharmacology, 1995. 50(5): p. 731-734.
138. Burchell, B. and M.W.H. Coughtrie, Genetic and environmental factors associated with variation of human xenobiotic glucuronidation and sulfation. Environmental Health Perspectives, 1997. 105(SUPPL. 4): p. 739-747.
139. Bokkenheuser, V.D., C.H.L. Shackleton, and J. Winter, Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by strains of intestinal Bacteroides from humans. Biochemical Journal, 1987. 248(3): p. 953-956.
140. Schneider, H., A. Schwiertz, M.D. Collins, and M. Blaut, Anaerobic transformation of quercetin-3-glucoside by bacteria from the human intestinal tract. Archives of Microbiology, 1999. 171(2): p. 81-91.
141. Das, N.P. and L.A. Griffiths, Studies on flavonoid metabolism. Metabolism of (+)-[14C] catechin in the rat and guinea pig. Biochemical Journal, 1969. 115(4): p. 831-836.
142. Dangles, O., C. Dufour, C. Manach, C. Morand, and C. Remesy, Binding of flavonoids to plasma proteins, in Methods in Enzymology. 2001. p. 319-333.
143. Dufour, C. and O. Dangles, Flavonoid-serum albumin complexation: Determination of binding constants and binding sites by fluorescence spectroscopy. Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects, 2005. 1721(1-3): p. 164-173.
144. Dufour, C., M. Loonis, and O. Dangles, Inhibition of the peroxidation of linoleic acid by the flavonoid quercetin within their complex with human serum albumin. Free Radical Biology and Medicine, 2007. 43(2): p. 241-252.
145. Manach, C., G. Williamson, C. Morand, A. Scalbert, and C. Rémésy, Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. The American journal of clinical nutrition, 2005. 81(1 Suppl): p. 230S-242S.
146. Vitrac, X., A. Desmoulière, B. Brouillaud, S. Krisa, G. Deffieux, N. Barthe, J. Rosenbaum, and J.M. Mérillon, Distribution of [14C]-trans-resveratrol, a cancer chemopreventive polyphenol, in mouse tissues after oral administration. Life Sciences, 2003. 72(20): p. 2219-2233.
147. Aziz, A.A., C.A. Edwards, M.E.J. Lean, and A. Crozier, Absorption and excretion of conjugated flavonols, including quercetin-4'-O-β-glucoside and isorhamnetin-4'-O-β-glucoside by human volunteers after the consumption of onions. Free Radical Research, 1998. 29(3): p. 257-269.
148. Kivits, G.A.A., F.J.P. Van der Sman, and L.B.M. Tijburg, Analysis of catechins from green and black tea in humans: A specific and sensitive colorimetric assay of total catechins in biological fluids. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 1997. 48(6): p. 387-392.
149. Hollman, P.C.H., J.M.P. Van Trijp, M.N.C.P. Buysman, M.S. V.d. Gaag, M.J.B. Mengelers, J.H.M. De Vries, and M.B. Katan, Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. FEBS Letters, 1997. 418(1-2): p. 152-156.
150. Dangles, O., C. Dufour, C. Manach, C. Morand, and C. Remesy, Binding of flavonoids to plasma proteins, in *Bioflavonoids and Polyphenols*, L. Packer, Editor. 2000, Academic Press: Orlando, FL.
151. Van Het Hof, K.H., S.A. Wiseman, C.S. Yang, and L.B.M. Tijburg, Plasma and lipoprotein levels of tea catechins following repeated tea consumption. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1999. 220(4): p. 203-209.
152. Lu, L.J.W., J.J. Grady, M.V. Marshall, V.M.S. Ramanujam, and K.E. Anderson, Altered time course of urinary daidzein and genistein excretion during chronic soya diet in healthy male subjects. Nutrition and Cancer, 1995. 24(3): p. 311-323.
153. Khymenets, O., M. Fitó, S. Touriño, D. Muñoz-Aguayo, M. Pujadas, J.L. Torres, J. Joglar, M. Farré, M.I. Covas, and R. De La Torre, Antioxidant activities of hydroxytyrosol main metabolites do not contribute to beneficial health effects after olive oil ingestion. Drug Metabolism and Disposition, 2010. 38(9): p. 1417-1421.
154. Miró-Casas, E., M.I. Covas, M. Fitó, M. Farré-Albadalejo, J. Marrugat, and R. de la Torre, Tyrosol and hydroxytyrosol are absorbed from moderate and sustained doses of virgin olive oil in humans. European Journal of Clinical Nutrition, 2003. 57(1): p. 186-190.
155. Visioli, F., C. Galli, F. Bornet, A. Mattei, R. Patelli, G. Galli, and D. Caruso, Olive oil phenolics are dose-dependently absorbed in humans. FEBS Letters, 2000. 468(2-3): p. 159-160.

156. Tuck, K.L., M.P. Freeman, P.J. Hayball, G.L. Stretch, and I. Stupans, The in vivo fate of hydroxytyrosol and tyrosol, antioxidant phenolic constituents of olive oil, after intravenous and oral dosing of labeled compounds to rats. Journal of Nutrition, 2001. 131(7): p. 1993-1996.
157. Aumont, V., S. Krisa, E. Battaglia, P. Netter, T. Richard, J.M. Mérillon, J. Magdalou, and N. Sabolovic, Regioselective and stereospecific glucuronidation of trans- and cis-resveratrol in human. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2001. 393(2): p. 281-289.
158. Murias, M., M. Miksits, S. Aust, M. Spatzenegger, T. Thalhammer, T. Szekeres, and W. Jaeger, Metabolism of resveratrol in breast cancer cell lines: Impact of sulfotransferase 1A1 expression on cell growth inhibition. Cancer Letters, 2008. 261(2): p. 172-182.
159. Juan, M.E., M. Maijó, and J.M. Planas, Quantification of trans-resveratrol and its metabolites in rat plasma and tissues by HPLC. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2010. 51(2): p. 391-398.
160. Yu, C., Y. Geun Shin, A. Chow, Y. Li, J.W. Kosmeder, Y. Sup Lee, W.H. Hirschelman, J.M. Pezzuto, R.G. Mehta, and R.B. Van Breemen, Human, rat, and mouse metabolism of resveratrol. Pharmaceutical Research, 2002. 19(12): p. 1907-1914.
161. Meng, X., P. Maliakal, H. Lu, M.J. Lee, and C.S. Yang, Urinary and Plasma Levels of Resveratrol and Quercetin in Humans, Mice, and Rats after Ingestion of Pure Compounds and Grape Juice. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004. 52(4): p. 935-942.
162. Pirola, L. and S. Fröjdö, Resveratrol: One molecule, many targets. IUBMB Life, 2008. 60(5): p. 323-332.
163. Walle, T., F. Hsieh, M.H. DeLegge, J.E. Oatis Jr, and U.K. Walle, High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. Drug Metabolism and Disposition, 2004. 32(12): p. 1377-1382.
164. Wenzel, E. and V. Somoza, Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. Molecular Nutrition and Food Research, 2005. 49(5): p. 472-481.
165. Boocock, D.J., G.E.S. Faust, K.R. Patel, A.M. Schinas, V.A. Brown, M.P. Ducharme, T.D. Booth, J.A. Crowell, M. Perloff, A.J. Gescher, W.P. Steward, and D.E. Brenner, Phase I dose escalation pharmacokinetic study in healthy volunteers of resveratrol, a potential cancer chemopreventive agent. Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention, 2007. 16(6): p. 1246-1252.
166. Biagi, M. and A.A. Bertelli, Wine, alcohol and pills: What future for the French paradox? Life Sci, 2015. 131: p. 19-22.
167. Rotches-Ribalta, M., C. Andres-Lacueva, R. Estruch, E. Escribano, and M. Urpi-Sarda, Pharmacokinetics of resveratrol metabolic profile in healthy humans after moderate consumption of red wine and grape extract tablets. Pharmacol Res, 2012. 66(5): p. 375-82.
168. Kris-Etherton, P.M., K.D. Hecker, A. Bonanome, S.M. Coval, A.E. Binkoski, K.F. Hilpert, A.E. Griel, and T.D. Etherton, Bioactive compounds in foods: Their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. American Journal of Medicine, 2002. 113(9 SUPPL. 2): p. 71S-88S.
169. Rimm, E.B., P. Williams, K. Fosher, M. Criqui, and M.J. Stampfer, Moderate alcohol intake and lower risk of coronary heart disease: meta-analysis of effects on lipids and haemostatic factors. Bmj, 1999. 319(7224): p. 1523-8.
170. Dinnella, C., P. Minichino, A.M. D'Andrea, and E. Monteleone, Bioaccessibility and antioxidant activity stability of phenolic compounds from extra-virgin olive oils during in vitro digestion. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007. 55(21): p. 8423-8429.
171. Nakachi, K., S. Matsuyama, S. Miyake, M. Suganuma, and K. Imai, Preventive effects of drinking green tea on cancer and cardiovascular disease: Epidemiological evidence for multiple targeting prevention. BioFactors, 2000. 13(1-4): p. 49-54.
172. Hollman, P.C.H., E.J.M. Feskens, and M.B. Katan, Tea flavonols in cardiovascular disease and cancer epidemiology. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1999. 220(4): p. 198-202.
173. Yang, C.S., P. Maliakal, and X. Meng, Inhibition of carcinogenesis by tea, in Annual Review of Pharmacology and Toxicology. 2002. p. 25-54.
174. Arts, I.C. and P.C. Hollman, Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. The American journal of clinical nutrition, 2005. 81(1 Suppl): p. 317S-325S.
175. Aires, V. and D. Delmas, Common pathways in health benefit properties of RSV in cardiovascular diseases, cancers and degenerative pathologies. Curr Pharm Biotechnol, 2015. 16(3): p. 219-44.
176. Kalt, W., C.F. Forney, A. Martin, and R.L. Prior, Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999. 47(11): p. 4638-4644.
177. Wada, L. and B. Ou, Antioxidant activity and phenolic content of Oregon caneberries. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002. 50(12): p. 3495-3500.
178. Cao, G., E. Sofic, and R.L. Prior, Antioxidant Capacity of Tea and Common Vegetables. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1996. 44(11): p. 3426-3431.
179. Klopotek, Y., K. Otto, and V. Böhm, Processing strawberries to different products alters contents of vitamin C, total phenolics, total anthocyanins, and antioxidant capacity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. 53(14): p. 5640-5646.

180. Fernandez-Panchon, M.S., D. Villano, A.M. Troncoso, and M.C. Garcia-Parrilla, Antioxidant activity of phenolic compounds: From in vitro results to in vivo evidence. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2008. 48(7): p. 649-671.
181. Chen, Z.Y., P.T. Chan, K.Y. Ho, K.P. Fung, and J. Wang, Antioxidant activity of natural flavonoids is governed by number and location of their aromatic hydroxyl groups. Chemistry and Physics of Lipids, 1996. 79(2): p. 157-163.
182. Cao, G., E. Sofic, and R.L. Prior, Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relationships. Free Radical Biology and Medicine, 1997. 22(5): p. 749-760.
183. Villaño, D., M.S. Fernández-Pachón, A.M. Troncoso, and M.C. García-Parrilla, Comparison of antioxidant activity of wine phenolic compounds and metabolites in vitro. Analytica Chimica Acta, 2005. 538(1-2): p. 391-398.
184. Harborne, J.B. and C.A. Williams, Advances in flavonoid research since 1992. Phytochemistry, 2000. 55(6): p. 481-504.
185. Rice-Evans, C.A., N.J. Miller, and G. Paganga, Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radical Biology and Medicine, 1996. 20(7): p. 933-956.
186. Salah, N., N.J. Miller, G. Paganga, L. Tijburg, G.P. Bolwell, and C. Rice-Evans, Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1995. 322(2): p. 339-346.
187. Bors, W., W. Heller, C. Michel, and M. Saran, Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies. Methods in Enzymology, 1990. 186: p. 343-355.
188. Heijnen, C.G.M., G.R.M.M. Haenen, F.A.A. Van Acker, W.J.F. Van Der Vijgh, and A. Bast, Flavonoids as peroxynitrite scavengers: The role of the hydroxyl groups. Toxicology in Vitro, 2001. 15(1): p. 3-6.
189. Briante, R., F. Febbraio, and R. Nucci, Antioxidant Properties of Low Molecular Weight Phenols Present in the Mediterranean Diet. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003. 51(24): p. 6975-6981.
190. Rice-Evans, C.A., N.J. Miller, and G. Paganga, Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radic Biol Med, 1996. 20(7): p. 933-56.
191. Marrugat, J., M.I. Covas, M. Fitó, H. Schröder, E. Miró-Casas, E. Gimeno, M.C. López-Sabater, R. De La Torre, and M. Farré, Effects of differing phenolic content in dietary olive oil on lipids and LDL oxidation: A randomized controlled trial. European Journal of Nutrition, 2004. 43(3): p. 140-147.
192. Masella, R., C. Giovannini, R. Varì, R. Di Benedetto, E. Coni, R. Volpe, N. Fraone, and A. Bucci, Effects of dietary virgin olive oil phenols on low density lipoprotein oxidation in hyperlipidemic patients. Lipids, 2001. 36(11): p. 1195-1202.
193. Gimeno, E., M. Fitó, R.M. Lamuela-Raventós, A.I. Castellote, M. Covas, M. Farré, M.C. de la Torre-Boronat, and M.C. López-Sabater, Effect of ingestion of virgin olive oil on human low-density lipoprotein composition. European Journal of Clinical Nutrition, 2002. 56(2): p. 114-120.
194. Visioli, F., A. Poli, and C. Gall, Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. Medicinal Research Reviews, 2002. 22(1): p. 65-75.
195. De La Puerta, R., V.R. Gutierrez, and J.R.S. Hoult, Inhibition of leukocyte 5-lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil. Biochemical Pharmacology, 1999. 57(4): p. 445-449.
196. Bertelli, A.A.E., M. Migliori, V. Panichi, B. Longoni, N. Origlia, A. Ferretti, M.G. Cuttano, and L. Giovannini, Oxidative stress and inflammatory reaction modulation by white wine, in Annals of the New York Academy of Sciences. 2002. p. 295-301.
197. Owen, R.W., R. Haubner, G. Würtele, W.E. Hull, B. Spiegelhalder, and H. Bartsch, Olives and olive oil in cancer prevention. European Journal of Cancer Prevention, 2004. 13(4): p. 319-326.
198. Frankel, E.N., J.B. German, J.E. Kinsella, E. Parks, and J. Kanner, Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. The Lancet, 1993. 341(8843): p. 454-457.
199. Song, H.P., D.H. Kim, C. Jo, C.H. Lee, K.S. Kim, and M.W. Byun, Effect of gamma irradiation on the microbiological quality and antioxidant activity of fresh vegetable juice. Food Microbiology, 2006. 23(4): p. 372-378.
200. Gebczyński, P. and W. Kmiecik, Effects of traditional and modified technology, in the production of frozen cauliflower, on the contents of selected antioxidative compounds. Food Chemistry, 2006. 101(1): p. 229-235.
201. Tomaino, A., F. Cimino, V. Zimbalatti, V. Venuti, V. Sulfaro, A. De Pasquale, and A. Saija, Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. Food Chemistry, 2005. 89(4): p. 549-554.
202. Hunter, K.J. and J.M. Fletcher, The antioxidant activity and composition of fresh, frozen, jarred and canned vegetables. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2002. 3(4): p. 399-406.
203. Loru, D., A. Incani, M. Deiana, G. Corona, A. Atzeri, M.P. Melis, A. Rosa, and M.A. Dessì, Protective effect of hydroxytyrosol and tyrosol against oxidative stress in kidney cells. Toxicology and Industrial Health, 2009. 25(4-5): p. 301-310.
204. Ingles, M., J. Gambini, M.G. Miguel, V. Bonet-Costa, K.M. Abdelaziz, M. El Alami, J. Vina, and C. Borras, PTEN mediates the antioxidant effect of resveratrol at nutritionally relevant concentrations. Biomed Res Int, 2014. 2014: p. 580852.
205. De Pascual-Teresa, S., K.L. Johnston, M.S. DuPont, K.A. O'Leary, P.W. Needs, L.M. Morgan, M.N. Clifford, Y. Bao, and G. Williamson, Quercetin Metabolites Downregulate Cydooxygenase-2 Transcription in Human Lymphocytes Ex Vivo but Not in Vivo. Journal of Nutrition, 2004. 134(3): p. 552-557.

206. O'Leary, K.A., S. de Pascual-Teresa, P.W. Needs, Y.P. Bao, N.M. O'Brien, and G. Williamson, Effect of flavonoids and vitamin E on cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription. Mutat Res, 2004. 551(1-2): p. 245-54.
207. Sadik, C.D., H. Sies, and T. Schewe, Inhibition of 15-lipoxygenases by flavonoids: Structure-activity relations and mode of action. Biochemical Pharmacology, 2003. 65(5): p. 773-781.
208. Schewe, T., C. Sadik, L.O. Klotz, T. Yoshimoto, H. Kühn, and H. Sies, Polyphenols of cocoa: Inhibition of mammalian 15-lipoxygenase. Biological Chemistry, 2001. 382(12): p. 1687-1696.
209. Schewe, T., H. Kühn, and H. Sies, Flavonoids of cocoa inhibit recombinant human 5-lipoxygenase. Journal of Nutrition, 2002. 132(7): p. 1825-1829.
210. Covas, M.I., K. Nyyssönen, H.E. Poulsen, J. Kaikkonen, H.J.F. Zunft, H. Kiesewetter, A. Gaddi, R. De La Torre, J. Mursu, H. Bäumler, S. Nascetti, J.T. Salonen, M. Fitó, J. Virtanen, and J. Marrugat, The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors: A randomized trial. Annals of Internal Medicine, 2006. 145(5): p. 333-341.
211. Déprez, S., C. Brezillon, S. Rabot, C. Philippe, I. Mila, C. Lapierre, and A. Scalbert, Polymeric proanthocyanidins are catabolized by human colonic microflora into low-molecular-weight phenolic acids. Journal of Nutrition, 2000. 130(11): p. 2733-2738.
212. Pietta, P.G., P. Simonetti, C. Gardana, A. Brusamolino, P. Morazzoni, and E. Bombardelli, Catechin metabolites after intake of green tea infusions. BioFactors, 1998. 8(1-2): p. 111-118.
213. Boots, A.W., G.R.M.M. Haenen, and A. Bast, Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. European Journal of Pharmacology, 2008. 585(2-3): p. 325-337.
214. Pendurthi, U.R., J.T. Williams, and L.V.M. Rao, Resveratrol, a polyphenolic compound found in wine, inhibits tissue factor expression in vascular cells: A possible mechanism for the cardiovascular benefits associated with moderate consumption of wine. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 1999. 19(2): p. 419-426.
215. Ferrero, M.E., A.A.E. Bertelli, A. Fulgenzi, F. Pellegatta, M.M. Corsi, M. Bonfrate, F. Ferrara, R. De Caterina, L. Giovannini, and A. Bertelli, Activity in vitro of resveratrol on granulocyte and monocyte adhesion to endothelium. American Journal of Clinical Nutrition, 1998. 68(6): p. 1208-1214.
216. Uchida, Y., H. Yamazaki, S. Watanabe, K. Hayakawa, Y. Meng, N. Hiramatsu, A. Kasai, K. Yamauchi, J. Yao, and M. Kitamura, Enhancement of NF-κB activity by resveratrol in cytokine-exposed mesangial cells. Clinical and Experimental Immunology, 2005. 142(1): p. 76-83.
217. de Pascual-Teresa, S., D.A. Moreno, and C. García-Viguera, Flavanols and anthocyanins in cardiovascular health: A review of current evidence. International Journal of Molecular Sciences, 2010. 11(4): p. 1679-1703.
218. Nabavi, S.F., H. Li, M. Daglia, and S.M. Nabavi, Resveratrol and stroke: from chemistry to medicine. Curr Neurovasc Res, 2014. 11(4): p. 390-7.
219. Lee, J. and D.G. Lee, Novel antifungal mechanism of resveratrol: apoptosis inducer in Candida albicans. Curr Microbiol, 2015. 70(3): p. 383-9.
220. Ragione, F.D., V. Cucciolla, A. Borriello, V.D. Pietra, G. Pontoni, L. Racioppi, C. Manna, P. Galletti, and V. Zappia, Hydroxytyrosol, a natural molecule occurring in olive oil, induces cytochrome c-dependent apoptosis. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000. 278(3): p. 733-739.
221. Venkatesan, B., N. Ghosh-Choudhury, F. Das, L. Mahimainathan, A. Kamat, B.S. Kasinath, H.E. Abboud, and G.G. Choudhury, Resveratrol inhibits PDGF receptor mitogenic signaling in mesangial cells: Role of PTP1B. FASEB Journal, 2008. 22(10): p. 3469-3482.
222. Yanoshita, R., H.W. Chang, K.H. Son, I. Kudo, and Y. Samejima, Inhibition of lysoPAF acetyltransferase activity by flavonoids. Inflammation Research, 1996. 45(11): p. 546-549.
223. Sugatani, J., N. Fukazawa, K. Ujihara, K. Yoshinari, I. Abe, H. Noguchi, and M. Miwa, Tea polyphenols inhibit acetyl-CoA:1-alkyl-sn-glycero-3-phosphocholine acetyltransferase (a key enzyme in platelet-activating factor biosynthesis) and platelet-activating factor-induced platelet aggregation. International Archives of Allergy and Immunology, 2004. 134(1): p. 17-28.
224. Fragopoulou, E., T. Nomikos, H.C. Karantonis, C. Apostolakis, E. Pliakis, M. Samiotaki, G. Panayotou, and S. Antonopoulou, Biological activity of acetylated phenolic compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007. 55(1): p. 80-89.
225. Milde, J., E.F. Elstner, and J. Graßmann, Synergistic effects of phenolics and carotenoids on human low-density lipoprotein oxidation. Molecular Nutrition and Food Research, 2007. 51(8): p. 956-961.
226. Zhang, M.F. and Y.Q. Shen, Cardiovascular protection effect of salidroside and its aglycone tyrosol. Chinese Journal of New Drugs, 2012. 21(21): p. 2521-2525.
227. Xanthopoulou, M.N., D. Asimakopoulos, S. Antonopoulou, C.A. Demopoulos, and E. Fragopoulou, Effect of Robola and Cabernet Sauvignon extracts on platelet activating factor enzymes activity on U937 cells. Food Chemistry, 2014. 165: p. 50-59.
228. Balestrieri, C., F. Felice, S. Piacente, C. Pizza, P. Montoro, W. Oleszek, V. Visciano, and M.L. Balestrieri, Relative effects of phenolic constituents from Yucca schidigera Roezl. bark on Kaposi's sarcoma cell proliferation, migration, and PAF synthesis. Biochemical Pharmacology, 2006. 71(10): p. 1479-1487.
229. Kong, A.N.T., R. Yu, C. Chen, S. Mandlekar, and T. Primiano, Signal Transduction Events Elicited by Natural Products: Role of MAPK and Caspase Pathways in Homeostatic Response and Induction of Apoptosis. Archives of Pharmacal Research, 2000. 23(1): p. 1-16.

230. Spencer, J.P., C. Rice-Evans, and R.J. Williams, Modulation of pro-survival Akt/protein kinase B and ERK1/2 signaling cascades by quercetin and its in vivo metabolites underlie their action on neuronal viability. J Biol Chem, 2003. 278(37): p. 34783-93.
231. Wiseman, S., T. Mulder, and A. Rietveld, Tea flavonoids: Bioavailability in vivo and effects on cell signaling pathways in vitro. Antioxidants and Redox Signaling, 2001. 3(6): p. 1009-1021.
232. Monasterio, A., M.C. Urdaci, I.V. Pinchuk, N. Lopez-Moratalla, and J.J. Martinez-Irujo, Flavonoids induce apoptosis in human leukemia U937 cells through caspase- and caspase-calpain-dependent pathways. Nutr Cancer, 2004. 50(1): p. 90-100.
233. Way, T.D., M.C. Kao, and J.K. Lin, Degradation of HER2/neu by apigenin induces apoptosis through cytochrome c release and caspase-3 activation in HER2/neu-overexpressing breast cancer cells. FEBS Lett, 2005. 579(1): p. 145-52.
234. Fischer, P.M. and D.P. Lane, Inhibitors of cyclin-dependent kinases as anti-cancer therapeutics. Current Medicinal Chemistry, 2000. 7(12): p. 1213-1245.
235. Murphy, K.J., A.K. Chronopoulos, I. Singh, M.A. Francis, H. Moriarty, M.J. Pike, A.H. Turner, N.J. Mann, and A.J. Sinclair, Dietary flavanols and procyanidin oligomers from cocoa (Theobroma cacao) inhibit platelet function. Am J Clin Nutr, 2003. 77(6): p. 1466-73.
236. Rodrigue, C.M., F. Porteu, N. Navarro, E. Bruyneel, M. Bracke, P.H. Romeo, C. Gespach, and M.C. Garel, The cancer chemopreventive agent resveratrol induces tensin, a cell-matrix adhesion protein with signaling and antitumor activities. Oncogene, 2005. 24(20): p. 3274-3284.
237. Hsieh, T.C., Antiproliferative effects of resveratrol and the mediating role of resveratrol targeting protein NQO2 in androgen receptor-positive, hormone-non-responsive CWR22Rv1 cells. Anticancer Research, 2009. 29(8): p. 3011-3017.
238. Jang, M., L. Cai, G.O. Udeani, K.V. Slowing, C.F. Thomas, C.W.W. Beecher, H.H.S. Fong, N.R. Farnsworth, A.D. Kinghorn, R.G. Mehta, R.C. Moon, and J.M. Pezzuto, Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. Science, 1997. 275(5297): p. 218-220.
239. Wang, Y., K.W. Lee, F.L. Chan, S. Chen, and L.K. Leung, The red wine polyphenol resveratrol displays bilevel inhibition on aromatase in breast cancer cells. Toxicological Sciences, 2006. 92(1): p. 71-77.
240. Lambert, J.D., J. Hong, G.Y. Yang, J. Liao, and C.S. Yang, Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. The American journal of clinical nutrition, 2005. 81(1 Suppl): p. 284S-291S.
241. Naasani, I., F. Oh-hashi, T. Oh-hara, W.Y. Feng, J. Johnston, K. Chan, and T. Tsuruo, Blocking telomerase by dietary polyphenols is a major mechanism for limiting the growth of human cancer cells in vitro and in vivo. Cancer Research, 2003. 63(4): p. 824-830.
242. Freedman, J.E., C. Parker Iii, L. Li, J.A. Perlman, B. Frei, V. Ivanov, L.R. Deak, M.D. Iafrati, and J.D. Folts, Select flavonoids and whole juice from purple grapes inhibit platelet function and enhance nitric oxide release. Circulation, 2001. 103(23): p. 2792-2798.
243. Chung, M.I., K.H. Gan, C.N. Lin, F.N. Ko, and C.M. Teng, Antiplatelet effects and vasorelaxing action of some constituents of formosan plants. Journal of Natural Products, 1993. 56(6): p. 929-934.
244. Fragopoulou, E., T. Nomikos, S. Antonopoulou, C.A. Mitsopoulou, and C.A. Demopoulos, Separation of biologically active lipids from red wine. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000. 48(4): p. 1234-1238.
245. Goswami, S.K. and D.K. Das, Resveratrol and chemoprevention. Cancer Letters, 2009. 284(1): p. 1-6.
246. Hung, L.M., J.K. Chen, S.S. Huang, R.S. Lee, and M.J. Su, Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes. Cardiovascular Research, 2000. 47(3): p. 549-555.
247. Carter, L.G., J.A. D'Orazio, and K.J. Pearson, Resveratrol and cancer: focus on in vivo evidence. Endocr Relat Cancer, 2014. 21(3): p. R209-25.
248. Anthony, M.S., T.B. Clarkson, C.L. Hughes, Jr., T.M. Morgan, and G.L. Burke, Soybean isoflavones improve cardiovascular risk factors without affecting the reproductive system of peripubertal rhesus monkeys. J Nutr, 1996. 126(1): p. 43-50.
249. Yamakuchi, M., C. Bao, M. Ferlito, and C.J. Lowenstein, Epigallocatechin gallate inhibits endothelial exocytosis. Biological Chemistry, 2008. 389(7): p. 935-941.
250. Terra, X., G. Montagut, M. Bustos, N. Llopiz, A. Ardèvol, C. Bladé, J. Fernández-Larrea, G. Pujadas, J. Salvadó, L. Arola, and M. Blay, Grape-seed procyanidins prevent low-grade inflammation by modulating cytokine expression in rats fed a high-fat diet. Journal of Nutritional Biochemistry, 2009. 20(3): p. 210-218.
251. Tzeng, S.H., W.C. Ko, F.N. Ko, and C.M. Teng, Inhibition of platelet aggregation by some flavonoids. Thrombosis Research, 1991. 64(1): p. 91-100.
252. Conquer, J.A., G. Maiani, E. Azzini, A. Raguzzini, and B.J. Holub, Supplementation with quercetin markedly increases plasma quercetin concentration without effect on selected risk factors for heart disease in healthy subjects. Journal of Nutrition, 1998. 128(3): p. 593-597.
253. Oubiña, P., F.J. Sánchez-Muniz, S. Ródenas, and C. Cuesta, Eicosanoid production, thrombogenic ratio, and serum and LDL peroxides in normo- and hypercholesterolaemic post-menopausal women consuming two oleic acid-rich diets with different content of minor components. British Journal of Nutrition, 2001. 85(1): p. 41-47.
254. Farzaei, M.H., R. Rahimi, and M. Abdollahi, The role of dietary polyphenols in the management of inflammatory bowel disease. Curr Pharm Biotechnol, 2015. 16(3): p. 196-210.

255. Halliwell, B., Dietary polyphenols: Good, bad, or indifferent for your health? Cardiovascular Research, 2007. 73(2): p. 341-347.
256. Edwards, R.L., T. Lyon, S.E. Litwin, A. Rabovsky, J.D. Symons, and T. Jalili, Quercetin reduces blood pressure in hypertensive subjects. Journal of Nutrition, 2007. 137(11): p. 2405-2411.
257. Omenn, G.S., G.E. Goodman, M.D. Thornquist, J. Balmes, M.R. Cullen, A. Glass, J.P. Keogh, F.L. Meyskens Jr, B. Valanis, J.H. Williams Jr, S. Barnhart, M.G. Cherniack, C.A. Brodkin, and S. Hammar, Risk factors for lung cancer and for intervention effects in CARET, the beta-carotene and retinol efficacy trial. Journal of the National Cancer Institute, 1996. 88(21): p. 1550-1559.
258. Fisher, N.D.L., M. Hughes, M. Gerhard-Herman, and N.K. Hollenberg, Flavanol-rich cocoa induces nitric-oxide-dependent vasodilation in healthy humans. Journal of Hypertension, 2003. 21(12): p. 2281-2286.
259. Mursu, J., S. Voutilainen, T. Nurmi, T.P. Tuomainen, S. Kurl, and J.T. Salonen, Flavonoid intake and the risk of ischaemic stroke and CVD mortality in middle-aged Finnish men: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. Br J Nutr, 2008. 100(4): p. 890-5.
260. Hooper, L., P.A. Kroon, E.B. Rimm, J.S. Cohn, I. Harvey, K.A. Le Cornu, J.J. Ryder, W.L. Hall, and A. Cassidy, Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: A meta-analysis of randomized controlled trials. American Journal of Clinical Nutrition, 2008. 88(1): p. 38-50.
261. Penumathsa, S.V. and N. Maulik, Resveratrol: A promising agent in promoting cardioprotection against coronary heart disease. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 2009. 87(4): p. 275-286.
262. Bordeaux, B., L.R. Yanek, T.F. Moy, L.W. White, L.C. Becker, N. Faraday, and D.M. Becker, Casual chocolate consumption and inhibition of platelet function. Preventive cardiology, 2007. 10(4): p. 175-180.
263. Flammer, A.J., F. Hermann, I. Sudano, L. Spieker, M. Hermann, K.A. Cooper, M. Serafini, T.F. Lüscher, F. Ruschitzka, G. Noll, and R. Corti, Dark chocolate improves coronary vasomotion and reduces platelet reactivity. Circulation, 2007. 116(21): p. 2376-2382.
264. Heptinstall, S., J. May, S. Fox, C. Kwik-Uribe, and L. Zhao, Cocoa flavanols and platelet and leukocyte function: Recent in vitro and ex vivo studies in healthy adults. Journal of Cardiovascular Pharmacology, 2006. 47(SUPPL. 2): p. S197-S205.
265. Hermann, F., L.E. Spieker, F. Ruschitzka, I. Sudano, M. Hermann, C. Binggeli, T.F. Lüscher, W. Riesen, G. Noll, and R. Corti, Dark chocolate improves endothelial and platelet function. Heart, 2006. 92(1): p. 119-120.
266. Innes, A.J., G. Kennedy, M. McLaren, A.J. Bancroft, and J.J.F. Belch, Dark chocolate inhibits platelet aggregation in healthy volunteers. Platelets, 2003. 14(5): p. 325-327.
267. Polagruto, J.A., H.B. Gross, F. Kamangar, K. Kosuna, B. Sun, H. Fujii, C.L. Keen, and R.M. Hackman, Platelet reactivity in male smokers following the acute consumption of a flavanol-rich grapeseed extract. J Med Food, 2007. 10(4): p. 725-30.
268. Rein, D., T.G. Paglieroni, T. Wun, D.A. Pearson, H.H. Schmitz, R. Gosselin, and C.L. Keen, Cocoa inhibits platelet activation and function. American Journal of Clinical Nutrition, 2000. 72(1): p. 30-35.
269. Shenoy, S.F., C.L. Keen, S. Kalgaonkar, and J.A. Polagruto, Effects of grape seed extract consumption on platelet function in postmenopausal women. Thrombosis Research, 2007. 121(3): p. 431-432.
270. Wang-Polagruto, J.F., A.C. Villablanca, J.A. Polagruto, L. Lee, R.R. Holt, H.R. Schrader, J.L. Ensunsa, F.M. Steinberg, H.H. Schmitz, and C.L. Keen, Chronic consumption of flavanol-rich cocoa improves endothelial function and decreases vascular cell adhesion molecule in hypercholesterolemic postmenopausal women. Journal of Cardiovascular Pharmacology, 2006. 47(SUPPL. 2): p. S177-S186.
271. Simons, L.A., M. Von Konigsmark, J. Simons, and D.S. Celermajer, Phytoestrogens do not influence lipoprotein levels or endothelial function in healthy, postmenopausal women. American Journal of Cardiology, 2000. 85(11): p. 1297-1301.
272. Ostertag, L.M., N. O'Kennedy, P.A. Kroon, G.G. Duthie, and B. de Roos, Impact of dietary polyphenols on human platelet function - A critical review of controlled dietary intervention studies. Molecular Nutrition and Food Research, 2010. 54(1): p. 60-81.
273. Baba, S., M. Natsume, A. Yasuda, Y. Nakamura, T. Tamura, N. Osakabe, M. Kanegae, and K. Kondo, Plasma LDL and HDL cholesterol and oxidized LDL concentrations are altered in normo- and hypercholesterolemic humans after intake of different levels of cocoa powder. Journal of Nutrition, 2007. 137(6): p. 1436-1441.
274. Matsuyama, T., Y. Tanaka, I. Kamimaki, T. Nagao, and I. Tokimitsu, Catechin safely improved higher levels of fatness, blood pressure, and cholesterol in children. Obesity, 2008. 16(6): p. 1338-1348.
275. Brown, A.L., J. Lane, J. Coverly, J. Stocks, S. Jackson, A. Stephen, L. Bluck, A. Coward, and H. Hendrickx, Effects of dietary supplementation with the green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate on insulin resistance and associated metabolic risk factors: Randomized controlled trial. British Journal of Nutrition, 2009. 101(6): p. 886-894.
276. Novelle, M.G., D. Wahl, C. Dieguez, M. Bernier, and R. de Cabo, Resveratrol supplementation: Where are we now and where should we go? Ageing Res Rev, 2015. 21: p. 1-15.
277. Santos, A.C., F. Veiga, and A.J. Ribeiro, New delivery systems to improve the bioavailability of resveratrol. Expert Opin Drug Deliv, 2011. 8(8): p. 973-90.
278. Neves, A.R., M. Lucio, J.L. Lima, and S. Reis, Resveratrol in medicinal chemistry: a critical review of its pharmacokinetics, drug-delivery, and membrane interactions. Curr Med Chem, 2012. 19(11): p. 1663-81.

279. Kang, S.Y., J.K. Lee, O. Choi, C.Y. Kim, J.H. Jang, B.Y. Hwang, and Y.S. Hong, Biosynthesis of methylated resveratrol analogs through the construction of an artificial biosynthetic pathway in E. coli. BMC Biotechnol, 2014. 14: p. 67.
280. Chillemi, R., N. Cardullo, V. Greco, G. Malfa, B. Tomasello, and S. Sciuto, Synthesis of amphiphilic resveratrol lipoconjugates and evaluation of their anticancer activity towards neuroblastoma SH-SY5Y cell line. Eur J Med Chem, 2015. 96: p. 467-81.
281. Basini, G., C. Tringali, L. Baioni, S. Bussolati, C. Spatafora, and F. Grasselli, Biological effects on granulosa cells of hydroxylated and methylated resveratrol analogues. Molecular Nutrition and Food Research, 2010. 54(SUPPL. 2): p. S236-S243.
282. Chao, J., H. Li, K.W. Cheng, M.S. Yu, R.C.C. Chang, and M. Wang, Protective effects of pinostilbene, a resveratrol methylated derivative, against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells. Journal of Nutritional Biochemistry, 2010. 21(6): p. 482-489.
283. Calamini, B., K. Ratia, M.G. Malkowski, M. Cuendet, J.M. Pezzuto, B.D. Santarsiero, and A.D. Mesecar, Pleiotropic mechanisms facilitated by resveratrol and its metabolites. Biochemical Journal, 2010. 429(2): p. 273-282.
284. Wang, L.X., A. Heredia, H. Song, Z. Zhang, B. Yu, C. Davis, and R. Redfield, Resveratrol glucuronides as the metabolites of resveratrol in humans: Characterization, synthesis, and anti-HIV activity. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2004. 93(10): p. 2448-2457.
285. Day, A.J., Y. Bao, M.R.A. Morgan, and G. Williamson, Conjugation position of quercetin glucuronides and effect on biological activity. Free Radical Biology and Medicine, 2000. 29(12): p. 1234-1243.
286. Polycarpou, E., L.B. Meira, S. Carrington, E. Tyrrell, H. Modjtahedi, and M.A. Carew, Resveratrol 3-O-D-glucuronide and resveratrol 4'-O-D-glucuronide inhibit colon cancer cell growth: evidence for a role of A3 adenosine receptors, cyclin D1 depletion, and G1 cell cycle arrest. Mol Nutr Food Res, 2013. 57(10): p. 1708-17.
287. Aires, V., E. Limagne, A.K. Cotte, N. Latruffe, F. Ghiringhelli, and D. Delmas, Resveratrol metabolites inhibit human metastatic colon cancer cells progression and synergize with chemotherapeutic drugs to induce cell death. Mol Nutr Food Res, 2013. 57(7): p. 1170-81.
288. Miksits, M., K. Wlcek, M. Svoboda, O. Kunert, E. Haslinger, T. Thalhammer, T. Szekeres, and W. Jäger, Antitumor activity of resveratrol and its sulfated metabolites against human breast cancer cells. Planta Medica, 2009. 75(11): p. 1227-1230.
289. Hoshino, J., E.J. Park, T.P. Kondratyuk, L. Marler, J.M. Pezzuto, R.B. Van Breemen, S. Mo, Y. Li, and M. Cushman, Selective synthesis and biological evaluation of sulfate-conjugated resveratrol metabolites. Journal of Medicinal Chemistry, 2010. 53(13): p. 5033-5043.
290. Gauliard, B., D. Grieve, R. Wilson, A. Crozier, C. Jenkins, W.D. Mullen, and M. Lean, The effects of dietary phenolic compounds on cytokine and antioxidant production by A549 cells. Journal of Medicinal Food, 2008. 11(2): p. 382-384.
291. Ling, S.K., M.M. Pisar, and S. Man, Platelet-activating factor (PAF) receptor binding antagonist activity of the methanol extracts and isolated flavonoids from Chromolaena odorata (L.) King and Robinson. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2007. 30(6): p. 1150-1152.
292. Yoshizumi, M., K. Tsuchiya, Y. Suzaki, K. Kirima, M. Kyaw, J.H. Moon, J. Terao, and T. Tamaki, Quercetin glucuronide prevents VSMC hypertrophy by angiotensin II via the inhibition of JNK and AP-1 signaling pathway. Biochem Biophys Res Commun, 2002. 293(5): p. 1458-65.
293. Loke, W.M., J.M. Proudfoot, S. Stewart, A.J. McKinley, P.W. Needs, P.A. Kroon, J.M. Hodgson, and K.D. Croft, Metabolic transformation has a profound effect on anti-inflammatory activity of flavonoids such as quercetin: lack of association between antioxidant and lipoxygenase inhibitory activity. Biochem Pharmacol, 2008. 75(5): p. 1045-53.
294. Miyazawa, T., M. Yamamoto, and Y. Maeda, Microwave-accelerated selective acylation of (hydroxyalkyl)phenols using acid chlorides. Synthetic Communications, 2009. 39(6): p. 1092-1099.
295. Bhawal, B.M., S.P. Khanapure, and E.R. Biehl, Transesterification of methyl arylacetates wtih lithium alkoxides. Synthesis, 1991(2): p. 112-114.
296. Hall, L.H., M.A. Patrick, and J.H. Maguire, Hypolipidemic activity in rodents of phenobarbital and related derivatives. Archiv der Pharmazie, 1990. 323(9): p. 579-586.
297. Nadkarni, D.H., S. Murugesan, and S.E. Velu, Total synthesis of zyzzyanones A-D. Tetrahedron, 2013. 69(20): p. 4105-4113.
298. Okano, K., K.I. Okuyama, T. Fukuyama, and H. Tokuyama, Mild debenzylation of aryl benzyl ether with BCl3 in the presence of pentamethylbenzene as a non-lewis-basic cation scavenger. Synlett, 2008(13): p. 1977-1980.
299. Hung, C.Y., Y.C. Tsai, and K.Y. Li, Phenolic antioxidants isolated from the flowers of Osmanthus fragrans. Molecules, 2012. 17(9): p. 10724-10737.
300. Pilgrim, W. and P.V. Murphy, SnCl(4)- and TiCl(4)-catalyzed anomerization of acylated O- and S-glycosides: analysis of factors that lead to higher alpha:beta anomer ratios and reaction rates. J Org Chem, 2010. 75(20): p. 6747-55.
301. Abdullah, N.H., L.S. Kiong, and I.A. Noorbatcha, QSAR study of flavonoids as Platelet-Activating Factor (PAF) receptor binding antagonists. Advances in Environmental Biology, 2014. 8(3 SPEC. ISSUE): p. 797-802.

302. Acerson, M.J., K.M. Fabick, Y. Wong, C. Blake, E.D. Lephart, and M.B. Andrus, A new synthesis of 4'-resveratrol esters and evaluation of the potential for anti-depressant activity. Bioorg Med Chem Lett, 2013. 23(10): p. 2941-4.
303. Andrus, M.B. and J. Liu, Synthesis of polyhydroxylated ester analogs of the stilbene resveratrol using decarbonylative Heck couplings. Tetrahedron Letters, 2006. 47(32): p. 5811-5814.
304. Andrus, M.B., J. Liu, E.L. Meredith, and E. Nartey, Synthesis of resveratrol using a direct decarbonylative Heck approach from resorcylic acid. Tetrahedron Letters, 2003. 44(26): p. 4819-4822.
305. Learmonth, D.A., A concise synthesis of the 3-O-beta-D- and 4'-O-beta-D-glucuronide conjugates of trans-resveratrol. Bioconjug Chem, 2003. 14(1): p. 262-7.
306. Gomez-Zorita, S., A. Fernandez-Quintela, A. Lasa, L. Aguirre, A.M. Rimando, and M.P. Portillo, Pterostilbene, a dimethyl ether derivative of resveratrol, reduces fat accumulation in rats fed an obesogenic diet. J Agric Food Chem, 2014. 62(33): p. 8371-8.
307. Jungong, C.S. and A.V. Novikov, PRACTICAL PREPARATION OF RESVERATROL 3-O-beta-D-GLUCURONIDE. Synth Commun, 2012. 42(24): p. 3589-3597.
308. Demopoulos, C.A., N.K. Andrikopoulos, and S. Antonopoulou, A simple and precise method for the routine determination of platelet- activating factor in blood and urine. Lipids, 1994. 29(4): p. 305-309.
309. Demopoulos, C.A., R.N. Pinckard, and D.J. Hanahan, Platelet-activating factor. Evidence for 1-0-alkyl-2-acetyl-sn-glyceryl-3-phosphorylcholine as the active component (a new class of lipid chemical mediators). J. Biol. Chem, 1979. 254(19): p. 9355-9358.
310. Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem, 1976. 72(1-2): p. 248-254.
311. Snyder, F., Metabolism of platelet activating factor and related ether lipids: enzymatic pathways, subcellular sites, regulation, and membrane processing. Prog Clin Biol Res, 1988. 282: p. 57-72.
312. Pinckard, R.N. and J.C. Ludwig, Determination of PAF-2-acetylhydrolase activity. Feder. Proc, 1986. 45: p. 856.
313. Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods, 1983. 65(1-2): p. 55-63.
314. Schnitzer, E., I. Pinchuk, A. Bor, M. Fainaru, A.M. Samuni, and D. Lichtenberg, Lipid oxidation in unfractionated serum and plasma. Chem Phys Lipids, 1998. 92(2): p. 151-70.
315. Molyneux, P., The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin J Sci Technol, 2004. 26(2): p. 211-219.
316. Choi, C.W., S.C. Kim, S.S. Hwang, B.K. Choi, H.J. Ahn, M.Y. Lee, S.H. Park, and S.K. Kim, Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. Plant Science, 2002. 163(6): p. 1161-1168.
317. Axelrod B, C.T., Laakso S., Lipoxygenase from soybeans. Methods Enzymol. , 1981. 71: p. 441–451.
318. Ainsworth, E.A. and K.M. Gillespie, Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. Nature Protocols, 2007. 2(4): p. 875-7.
319. Delmas, D., V. Aires, E. Limagne, P. Dutartre, F. Mazué, F. Ghiringhelli, and N. Latruffe, Transport, stability, and biological activity of resveratrol. Annals of the New York Academy of Sciences, 2011. 1215: p. 48-59.
320. Chen, Z.Y., P.T. Chan, K.Y. Ho, K.P. Fung, and J. Wang, Antioxidant activity of natural flavonoids is governed by number and location of their aromatic hydroxyl groups. Chem Phys Lipids, 1996. 79(2): p. 157-63.
321. Ko, R.K., G.O. Kim, C.G. Hyun, D.S. Jung, and N.H. Lee, Compounds with tyrosinase inhibition, elastase inhibition and DPPH radical scavenging activities from the branches of Distylium racemosum Sieb. et Zucc. Phytother Res, 2011. 25(10): p. 1451-6.
322. Malheiro, R., A. Sousa, S. Casal, A. Bento, and J.A. Pereira, Cultivar effect on the phenolic composition and antioxidant potential of stoned table olives. Food Chem Toxicol, 2011. 49(2): p. 450-7.
323. Torres, P., A. Poveda, J. Jimenez-Barbero, A. Ballesteros, and F.J. Plou, Regioselective lipase-catalyzed synthesis of 3-o-acyl derivatives of resveratrol and study of their antioxidant properties. J Agric Food Chem, 2010. 58(2): p. 807-13.
324. Stojanovic, S., H. Sprinz, and O. Brede, Efficiency and mechanism of the antioxidant action of trans-resveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation. Arch Biochem Biophys, 2001. 391(1): p. 79-89.
325. Ozgova, S., J. Hermanek, and I. Gut, Different antioxidant effects of polyphenols on lipid peroxidation and hydroxyl radicals in the NADPH-, Fe-ascorbate- and Fe-microsomal systems. Biochem Pharmacol, 2003. 66(7): p. 1127-37.
326. Rezaei-Sadabady, R., N. Zarghami, A. Barzegar, A. Eidi, A. Akbarzadeh, and M. Rezaei-Tavirani, Studies of the Relationship between Structure and Antioxidant Activity in Interesting Systems, Including Tyrosol, Hydroxytyrosol Derivatives Indicated by Quantum Chemical Calculations. Scientific Research, 2013. 2(3): p. 13-18.
327. Franconi, F., R. Coinu, S. Carta, P.P. Urgeghe, F. Ieri, N. Mulinacci, and A. Romani, Antioxidant effect of two virgin olive oils depends on the concentration and composition of minor polar compounds. J Agric Food Chem, 2006. 54(8): p. 3121-5.
328. Covas, M.I., M. Fito, R.M. Lamuela-Raventos, N. Sebastia, C. de la Torre-Boronat, and J. Marrugat, Virgin olive oil phenolic compounds: binding to human low density lipoprotein (LDL) and effect on LDL oxidation. Int J Clin Pharmacol Res, 2000. 20(3-4): p. 49-54.

329. Dietrich-Muszalska, A. and B. Olas, Inhibitory effects of polyphenol compounds on lipid peroxidation caused by antipsychotics (haloperidol and amisulpride) in human plasma in vitro. World J Biol Psychiatry, 2010. 11(2 Pt 2): p. 276-81.
330. Kamiyama, M., Y. Kishimoto, M. Tani, K. Andoh, K. Utsunomiya, and K. Kondo, Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by Nagano purple grape (Vitis viniferaxVitis labrusca). J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 2009. 55(6): p. 471-8.
331. Yamamoto, S., Mammalian lipoxygenases: molecular structures and functions. Biochim Biophys Acta, 1992. 1128(2-3): p. 117-31.
332. Lopez-Nicolas, J.M., M. Perez-Gilabert, and F. Garcia-Carmona, Effect of protonation and aggregation state of (E)-resveratrol on its hydroperoxidation by lipoxygenase. J Agric Food Chem, 2009. 57(11): p. 4630-5.
333. Ha do, T., H. Kim, P.T. Thuong, T.M. Ngoc, I. Lee, N.D. Hung, and K. Bae, Antioxidant and lipoxygenase inhibitory activity of oligostilbenes from the leaf and stem of Vitis amurensis. J Ethnopharmacol, 2009. 125(2): p. 304-9.
334. Pinto Mdel, C., J.A. Garcia-Barrado, and P. Macias, Oxidation of resveratrol catalyzed by soybean lipoxygenase. J Agric Food Chem, 2003. 51(6): p. 1653-7.
335. Shibata, T., K. Nagayama, R. Tanaka, K. Yamaguchi, and T. Nakamura, Inhibitory effects of brown algal phlorotannins on secretory phospholipase A2s, lipoxygenases and cyclooxygenases. Journal of Applied Phycology, 2003. 15(1): p. 61-66.
336. de la Puerta, R., V. Ruiz Gutierrez, and J.R. Hoult, Inhibition of leukocyte 5-lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil. Biochem Pharmacol, 1999. 57(4): p. 445-9.
337. Lapenna, D., G. Ciofani, S.D. Pierdomenico, M. Neri, C. Cuccurullo, M.A. Giamberardino, and F. Cuccurullo, Inhibitory activity of salicylic acid on lipoxygenase-dependent lipid peroxidation. Biochim Biophys Acta, 2009. 1790(1): p. 25-30.
338. Pontiki, E., D. Hadjipavlou-Litina, K. Litinas, and G. Geromichalos, Novel cinnamic acid derivatives as antioxidant and anticancer agents: design, synthesis and modeling studies. Molecules, 2014. 19(7): p. 9655-74.
339. Assadieskandar, A., M. Amini, M. Salehi, H. Sadeghian, M. Alimardani, A. Sakhteman, H. Nadri, and A. Shafiee, Synthesis and SAR study of 4,5-diaryl-1H-imidazole-2(3H)-thione derivatives, as potent 15-lipoxygenase inhibitors. Bioorg Med Chem, 2012. 20(24): p. 7160-6.
340. Day, A.J., Y. Bao, M.R. Morgan, and G. Williamson, Conjugation position of quercetin glucuronides and effect on biological activity. Free Radic Biol Med, 2000. 29(12): p. 1234-43.
341. Walker, J., K. Schueller, L.M. Schaefer, M. Pignitter, L. Esefelder, and V. Somoza, Resveratrol and its metabolites inhibit pro-inflammatory effects of lipopolysaccharides in U-937 macrophages in plasma-representative concentrations. Food and Function, 2014. 5(1): p. 74-84.
342. Hayakawa, K., K. Arai, and E.H. Lo, Role of ERK MAP kinase and CRM1 in IL-1β-stimulated release of HMGB1 from cortical astrocytes. GLIA, 2010. 58(8): p. 1007-1015.
343. Howard, K.M., M. Abdel-Al, M. Ditmyer, and N. Patel, Lipopolysaccharide and platelet-activating factor stimulate expression of platelet-activating factor acetylhydrolase via distinct signaling pathways. Inflamm. Res, 2011. 60(8): p. 735-744.
344. Zhang, Y. and X. Yao, Role of c-Jun N-terminal kinase and p38/activation protein-1 in interleukin-1beta-mediated type I collagen synthesis in rat hepatic stellate cells. Apmis, 2012. 120(2): p. 101-7.
345. Lu, J., G. Huang, Z. Wang, S. Zhuang, L. Xu, B. Song, Y. Xiong, and S. Guan, Tyrosol exhibits negative regulatory effects on LPS response and endotoxemia. Food and Chemical Toxicology, 2013. 62: p. 172-178.
346. Moreno, J.J., Effect of olive oil minor components on oxidative stress and arachidonic acid mobilization and metabolism by macrophages RAW 264.7. Free Radical Biology and Medicine, 2003. 35(9): p. 1073-1081.
347. Kong, A.N.T., R. Yu, V. Hebbar, C. Chen, E. Owuor, R. Hu, R. Ee, and S. Mandlekar, Signal transduction events elicited by cancer prevention compounds. Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2001. 480-481: p. 231-241.
348. Li, W., J. Ma, Q. Ma, B. Li, L. Han, J. Liu, Q. Xu, W. Duan, S. Yu, F. Wang, and E. Wu, Resveratrol inhibits the epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer cells via suppression of the PI-3K/Akt/NF-κB pathway. Current Medicinal Chemistry, 2013. 20(33): p. 4185-4194.
349. Liu, L., H. Gu, H. Liu, Y. Jiao, K. Li, Y. Zhao, L. An, and J. Yang, Protective effect of resveratrol against IL-1β-induced inflammatory response on human osteoarthritic chondrocytes partly via the TLR4/MyD88/NF-κB signaling pathway: An "in vitro study". International Journal of Molecular Sciences, 2014. 15(4): p. 6925-6940.
350. Busch, F., A. Mobasheri, P. Shayan, C. Lueders, R. Stahlmann, and M. Shakibaei, Resveratrol modulates interleukin-1β-induced phosphatidylinositol 3-kinase and nuclear factor κb signaling pathways in human tenocytes. Journal of Biological Chemistry, 2012. 287(45): p. 38050-38063.
351. Ge, J., Y. Liu, Q. Li, X. Guo, L. Gu, Z.G. Ma, and Y.P. Zhu, Resveratrol induces apoptosis and autophagy in T-cell acute lymphoblastic leukemia cells by inhibiting Akt/mTOR and activating p38-MAPK. Biomedical and Environmental Sciences, 2013. 26(11): p. 902-911.
352. Gualdoni, G.A., J.J. Kovarik, J. Hofer, F. Dose, M. Pignitter, D. Doberer, P. Steinberger, V. Somoza, M. Wolzt, and G.J. Zlabinger, Resveratrol enhances TNF-alpha production in human monocytes upon bacterial stimulation. Biochim Biophys Acta, 2014. 1840(1): p. 95-105.

353. Cardile, V., R. Chillemi, L. Lombardo, S. Sciuto, C. Spatafora, and C. Tringali, Antiproliferative activity of methylated analogues of E- and Z-resveratrol. Z Naturforsch C, 2007. 62(3-4): p. 189-95.
354. Wen, X. and T. Walle, Methylated flavonoids have greatly improved intestinal absorption and metabolic stability. Drug Metab Dispos, 2006. 34(10): p. 1786-92.
355. Cichocki, M., J. Paluszczak, H. Szaefer, A. Piechowiak, A.M. Rimando, and W. Baer-Dubowska, Pterostilbene is equally potent as resveratrol in inhibiting 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate activated NFkappaB, AP-1, COX-2, and iNOS in mouse epidermis. Mol Nutr Food Res, 2008. 52 Suppl 1: p. S62-70.
356. Riche, D.M., C.L. McEwen, K.D. Riche, J.J. Sherman, M.R. Wofford, D. Deschamp, and M. Griswold, Analysis of safety from a human clinical trial with pterostilbene. J Toxicol, 2013. 2013: p. 463595.
357. Visioli, F., C. Galli, F. Bornet, A. Mattei, R. Patelli, G. Galli, and D. Caruso, Olive oil phenolics are dose-dependently absorbed in humans. FEBS Lett, 2000. 468(2-3): p. 159-60.
358. Khymenets, O., M. Fito, S. Tourino, D. Munoz-Aguayo, M. Pujadas, J.L. Torres, J. Joglar, M. Farre, M.I. Covas, and R. de la Torre, Antioxidant activities of hydroxytyrosol main metabolites do not contribute to beneficial health effects after olive oil ingestion. Drug Metab Dispos, 2010. 38(9): p. 1417-21.
359. Radko, Y., K.B. Christensen, and L.P. Christensen, Semi-preparative isolation of dihydroresveratrol-3-O-beta-d-glucuronide and four resveratrol conjugates from human urine after oral intake of a resveratrol-containing dietary supplement. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2013. 930: p. 54-61.
360. Schueller, K., M. Pignitter, and V. Somoza, Sulfated and Glucuronated trans-Resveratrol Metabolites Regulate Chemokines and Sirtuin-1 Expression in U-937 Macrophages. J Agric Food Chem, 2015. 63(29): p. 6535-45.
361. Walker, J., K. Schueller, L.M. Schaefer, M. Pignitter, L. Esefelder, and V. Somoza, Resveratrol and its metabolites inhibit pro-inflammatory effects of lipopolysaccharides in U-937 macrophages in plasma-representative concentrations. Food Funct, 2014. 5(1): p. 74-84.
362. Ladurner, A., D. Schachner, K. Schueller, M. Pignitter, E.H. Heiss, V. Somoza, and V.M. Dirsch, Impact of trans-resveratrol-sulfates and -glucuronides on endothelial nitric oxide synthase activity, nitric oxide release and intracellular reactive oxygen species. Molecules, 2014. 19(10): p. 16724-36.