



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ & ΑΓΩΓΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ - ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ
ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ - ΔΙΑΤΡΟΦΗ
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ



**Η επίδραση των ενδογενών μεταβολιτών των φαινολικών ενώσεων
στη συσσώρευση αιμοπεταλίων**

Διπλωματική Εργασία
Γκότση Αικατερίνη



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ & ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ - ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ
ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ - ΔΙΑΤΡΟΦΗ**

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Φραγκοπούλου Ελισάβετ

Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Φυσικών Προϊόντων

**Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας - Διατροφής, Χαροκόπειο
Πανεπιστήμιο**

Αντωνοπούλου Σμαραγδή

Καθηγήτρια Βιοχημείας με έμφαση στα λιποειδή

**Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας - Διατροφής, Χαροκόπειο
Πανεπιστήμιο**

Νομικός Τζώρτζης

Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας

**Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας - Διατροφής, Χαροκόπειο
Πανεπιστήμιο**

Η Αικατερίνη Γκότση δηλώνω υπεύθυνα ότι:

- 1)** Είμαι ο κάτοχος των πνευματικών δικαιωμάτων της πρωτότυπης αυτής εργασίας και από όσο γνωρίζω η εργασία μου δε συκοφαντεί πρόσωπα, ούτε προσβάλει τα πνευματικά δικαιώματα τρίτων.
- 2)** Αποδέχομαι ότι η ΒΚΠ μπορεί, χωρίς να αλλάξει το περιεχόμενο της εργασίας μου, να τη διαθέσει σε ηλεκτρονική μορφή μέσα από τη ψηφιακή Βιβλιοθήκη της, να την αντιγράψει σε οποιοδήποτε μέσο ή/και σε οποιοδήποτε μορφότυπο καθώς και να κρατά περισσότερα από ένα αντίγραφα για λόγους συντήρησης και ασφάλειας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η έρευνα αυτή εκπονήθηκε στο Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο στα πλαίσια της μεταπτυχιακής μου εργασίας υπό την επίβλεψη της Επίκουρης Καθηγήτριας Βιολογικής Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Ελισάβετ Φραγκοπούλου. Θα ήθελα λοιπόν να την ευχαριστήσω για την υποστήριξή της και τη καθοδήγησή της κατά τη διάρκεια εκπόνησης αυτής της εργασίας.

Επίσης ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Έλενα Χριστοδουλιά για την αμέριστη βοήθεια και την υποστήριξή της κατά τη διάρκεια των πειραματικών εργαστηρίων όπως επίσης και τις διδακτορικές φοιτήτριες Φιλιώ Πετσίνη και Μαρία Ντετοπούλου για τη καθοδήγησή τους στα εργαστηριακά πειράματα.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Θεία μου, Μαρία Κούρτη για την αμέριστη συμπαράσταση και υποστήριξή της.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου, Θοδωρή και Ντίνα, τον αδερφό μου Γιώργο και τους φίλους μου για την υποστήριξή τους όλα τα χρόνια των σπουδών μου.

Περιεχόμενα

Περίληψη στα Ελληνικά	9
Abstract	10
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	11
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	12
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	15
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	16
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ	18
ΑΙΜΟΣΤΑΣΗ ΚΑΙ ΘΡΟΜΒΩΣΗ	18
1. ΑΙΜΟΣΤΑΣΗ	18
1.1. Πρωτογενής αιμόσταση	19
1.1.1 Ενδοθήλιο	19
1.1.2 Αιμοπετάλια	21
1.1.3 Αγωνιστές Αιμοπεταλίων	23
1.1.3.1. ADP	23
1.1.3.2. PAF	24
1.1.3.3. TRAP	25
1.2. Δευτερογενής Αιμόσταση	25
1.2.1. Καταρράκτης πήξης του αίματος	25
1.2.2. Ενδογενής οδός	26
1.2.3. Εξωγενής οδός	27
1.2.4. Κοινή οδός	27
1.3. Κυτταρικό μοντέλο πήξης του αίματος	28
1.3.1. Φάση Έναρξης	28
1.3.2. Φάση ενίσχυσης	28
1.3.3. Φάση πολλαπλασιασμού	29

1.4. Αναστολείς του μηχανισμού πήξης του αίματος	29
1.5. Ινωδόλυση	30
1.6. Θρόμβωση	31
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ	33
2. ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ	33
2.1 Εισαγωγή	33
2.2. Κατάταξη Φαινολικών Ενώσεων	33
2.2.1 Φλαβονοειδή	34
2.2.1.1 Ανθοκυανίνες	34
2.2.1.2 Φλαβόνες:	34
2.2.1.3 Φλαβονόλες:	35
2.2.1.4 Φλαβανόλες:	35
2.2.1.5 Φλαβανόνες:	36
2.2.1.6 Ισοφλαβόνες:	36
2.2.1.7 Προανθοκυανιδίνες ή ταννίνες:	36
2.2.2. Μη φλαβονοειδή	37
2.2.2.1 Φαινολικά οξέα	37
2.2.2.2 Λιγνάνες:	37
2.2.2.3 Στυλβένια:	37
2.3 Βιολογικές Δράσεις Φαινολικών Ενώσεων	38
2.3.1.Αντιοξειδωτική Δράση	38
2.3.2 Αντιφλεγμονώδης δράση	39
2.3.3 Αντιαιμοπεταλιακή δράση	39
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ	40
ΡΕΣΒΕΡΑΤΡΟΛΗ ΚΑΙ ΤΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΤΗΣ	40

3.1 Εισαγωγή	40
3.2. Βιοδιαθεσιμότητα Ρεσβερατρόλης.....	42
3.2.1 Απορρόφηση	42
3.2.2 Μεταβολισμός.....	43
3.2.3 Βιοδιαθεσιμότητα	45
3.3.Βιολογικές Δράσεις Ρεσβερατρόλης –Αντιαιμοπεταλιακή δράση.....	47
3.4.Βιολογικές Δράσεις Μεταβολιτών Ρεσβερατρόλης –Αντιαιμοπεταλιακή δράση	49
Σκοπός της Διατριβής	51
Μεθοδολογία	53
4.1 Ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν και χημική σύνθεση τους	53
4.2.Παρασκευή της συγκέντρωσης των ενώσεων που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη πειραματική διαδικασία	53
4.2.1 Διαδικασία παρασκευής των διαλυμάτων.....	53
4.3 Απομόνωση πλάσματος πλούσιο σε αιμοπετάλια(PRP).....	54
4.3.1 Διαδικασία απομόνωσης PRP	54
4.3.2 Διαδικασία απομόνωσης PPP	54
4.4.Πειραματική Πορεία	55
4.4.1Μέτρηση αντιαιμοπεταλιακής δράσης των φαινολικών ενώσεων με τη χρήση συσσωρευματομέτρου	55
4.5 Πειραματική διαδικασία	56
4.6 Υπολογισμός Αντιαιμοπεταλιακής Δράσης Στο Συσσωρευματομέτρο.....	56
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	57
5.1 Ρεσβερατρόλη	57
5.1.1 ADP	57
5.1.2 PAF	58
5.1.3.TRAP	58

5.2 Συνθετικά παράγωγα Ρεσβερατρώλης	59
5.2.1. 3Μεθυλο- Ρεσβερατρώλη	60
5.2.1.1 ADP	60
5.2.1.2 PAF	61
5.2.1.3. TRAP	62
5.2.2. 4Μεθυλο- Ρεσβερατρώλη	65
5.2.2.1 ADP	65
5.2.2.2 PAF	66
5.2.2.3 TRAP	67
5.2.3. Δι-μέθυλο Ρεσβερατρώλη	69
5.2.3.1 ADP	69
5.2.3.2 PAF	70
5.2.3.3 TRAP	71
5.2.4. 3,4 Δι-Μέθυλο Ρεσβερατρώλη	73
5.2.4.1 ADP	73
5.2.4.2 PAF	75
5.2.4.3 TRAP	78
5.2.5 Τρι-Μέθυλο Ρεσβερατρώλη	79
5.2.5.1 ADP	79
5.2.5.2 PAF	80
5.2.5.3 TRAP	83
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	85
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	88

Περίληψη στα Ελληνικά

Η αιμόσταση, η δημιουργία δηλαδή θρόμβου είναι ένας σημαντικός μηχανισμός που προστατεύει τον οργανισμό από ακατάσχετη αιμορραγία μετά από τραυματισμό. Η διαταραχή της φυσιολογικής αιμόστασης σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για καρδιαγγειακά νοσήματα. Η αθηροσκλήρωση, που αποτελεί τον κοινό μηχανισμό των καρδιαγγειακών νοσημάτων, περιλαμβάνει και την αρτηριακή θρόμβωση. Η αναστολή της παθογενούς συσσώρευσης των αιμοπεταλίων που αποτελεί βασικό στάδιο της θρόμβωσης, και η πρόληψη της αθηροσκλήρωσης αποτελεί έναν από τους υψηλού ενδιαφέροντος επιστημονικούς στόχους. Μελέτες υποστηρίζουν ότι η ρεσβερατρόλη, ένα φαινολικό συστατικό, έχει ευεργετική επίδραση και στα καρδιαγγειακά νοσήματα. Παρόλα αυτά η δομή της ρεσβερατρόλης δεν της επιτρέπει να έχει μεγάλη βιοδιαθεσιμότητα. Για το λόγο αυτό οι επιστήμονες έστρεψαν το ενδιαφέρον τους στην μελέτη των παραγώγων της με σκοπό να αυξήσουν την βιοδιαθεσιμότητα της αλλά στη μελέτη των ενδογενών μεταβολιτών της.

Σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν η μελέτη *in vitro* της επίδρασης της ρεσβερατρόλης και των παραγώγων/μεταβολιτών της στην αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν εκτός από την ρεσβερατρόλη και τα μεθυλιωμένα παράγωγά της.

Δοκιμάστηκε η ικανότητα της ρεσβερατρόλης και των μεθυλιωμένων παραγώγων της να αναστέλουν την συσσώρευση των αιμοπεταλίων σε πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια από υγιείς εθελοντές έναντι 3 συσσωρευτικών παράγοντων (ADP, PAF, TRAP). Η συσσώρευση μετρήθηκε με την μέθοδο της συσσωρευματομετρίας οπτικής διαπερατότητας και η αναστολή υπολογίστηκε με βάση το ύψος συσσώρευσης και του εμβαδού κάτω από την καμπύλη (AUC).

Η ρεσβερατρόλη και τα περισσότερα παράγωγα έδειξαν αναστολή έναντι του PAF και του TRAP αλλά όχι κάποια αξιοσημείωτη αναστολή στο ADP. Από όλα τα παράγωγα η 3-μεθυλορεσβερατρόλη, η 4-μεθυλορεσβερατρόλη 3,4-διμεθυλορεσβερατρόλη φάνηκε να είναι πιο δραστικές από την ρεσβερατρόλη έναντι του TRAP και η 4-μεθυλορεσβερατρόλη φάνηκε να είναι η πιο δραστική. Η τριμέθυλορεσβερατρόλη φάνηκε να μην προκαλεί σημαντική αναστολή.

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι η μεθυλίωση μπορεί να επηρεάσει την ικανότητα της ρεσβερατρόλης να αναστέλει την συσσώρευση των αιμοπεταλίων καθώς και ότι είναι σημαντική η θέση στην οποία λαμβάνει χώρα η μεθυλίωση για την εκδήλωση της αντι-αιμοπεταλιακής δράσης.

Λέξεις κλειδιά: συσσώρευση αιμοπεταλίων, ρεσβερατρόλη, μεθυλιωμένα παράγωγα, θρόμβωση, μεταβολίτες

Abstract

Hemostasis, the creation of a thrombus is an important mechanism that protects the body from undue hemorrhage after an injury. The disorder of normal haemostasis is associated with an increased risk of cardiovascular disease. Atherosclerosis, which is the common mechanism of cardiovascular disease, also includes arterial thrombosis. The inhibition of pathogenic platelet aggregation, which is a major stage of thrombosis, and the prevention of atherosclerosis is one of the highly interesting scientific goals. Studies suggest that resveratrol, a phenolic component, has a beneficial effect on cardiovascular disease. However, the resveratrol structure does not allow it to have a high bioavailability. For this reason, scientists have turned their interest in the study of its derivatives in order to increase its bioavailability but to study its endogenous metabolites. The purpose of this study was to in vitro study the effect of resveratrol and its derivatives / metabolites on the inhibition of platelet aggregation. For this purpose other than resveratrol and its methylated derivatives have been used.

The ability of resveratrol and its methylated derivatives to inhibit platelet aggregation in platelet-rich plasma from healthy volunteers versus 3 cumulative agents (ADP, PAF, TRAP) was tested. Accumulation was measured by optical permeability aggregation and inhibition was calculated based on the accumulation height and area under the curve (AUC). Resveratrol and most derivatives showed inhibition against PAF and TRAP but no remarkable inhibition of ADP. Of all the derivatives, 3-methyl-resveratrol, 4-methyl-resveratrol, 3,4-dimethyl-resveratrol appeared to be more potent than resveratrol versus TRAP and 4-methylresveratrol seemed to be the most active. Trimethyl-resveratrol did not appear to cause significant inhibition.

In conclusion, it appears that methylation may affect the ability of resveratrol to inhibit platelet aggregation and that the site where methylation occurs for the onset of antiplatelet activity is important.

Keywords: Platelet aggregation, resveratrol, methylated derivatives, thrombosis, metabolites

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1 :Τα στάδια ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων και ο σχηματισμός θρόμβους **σ.23**

Εικόνα 1.2 : Καταρράκτης Πήξης του Αίματος **σ.26**

Εικόνα 2.1: Κύριες ομάδες πολυφαινολών με τις χαρακτηριστικές ενώσεις τους και οι πηγές τους στα τρόφιμα **σ.35**

Εικόνα 3.1 Δομή ρεσβερατρόλης **σ.41**

Εικόνα 3.2. cis/trans ισομερή της ρεσβερατρόλης **σ.42**

Εικόνα 3.3. Σχηματοποιημένος μεταβολισμός της ρεσβερατρόλης (RSV) του γλυκουρονιδίου της ρεσβερατρόλης (GLU-RSV) και σουλφονίδιο της ρεσβερατρόλης (SUL RSV) **σ.43**

Εικόνα 3.4:Χημική δομή των γλυκουρνιδίων της ρεσβερατρόλης **σ.44**

Εικόνα 3.5: Τρανς-Ρεσβερατρόλη και σχετικές δομές **σ.44**

Εικόνα 3.6: Ποσότητες τροφίμων και ποτών που πρέπει να καταναλώνονται για την επίτευξη θεραπευτικών δόσεων ρεσβερατρόλης **σ.46**

Εικόνα 3.7: Δράση της Ρεσβερατρόλης σε μοριακό επίπεδο **σ.49**

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1: Η επίδραση της ρεσβερατρώλης στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων έναντι του ADP. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % αναστολή α) του ύψους της καμπύλης συσσώρευσης (Amplitude) και β) της περιοχής κάτω από τη καμπύλη(AUC) απουσία ρεσβερατρώλης **σ.57**

Διάγραμμα 2: Η επίδραση της ρεσβερατρώλης στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων έναντι του PAF. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως επι τοις εκατό αναστολή του ύψους(Amplitude) της καμπύλης συσσώρευσης απουσία ρεσβερατρώλης **σ.58**

Διάγραμμα 3: Η επίδραση της ρεσβερατρώλης στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων έναντι του TRAP. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως επι τοις εκατό αναστολή α) του ύψους της καμπύλης συσσώρευσης (Amplitude) και β) της περιοχής κάτω από τη καμπύλη(AUC) απουσία ρεσβερατρώλης **σ.59**

Διάγραμμα 4: Η επίδραση της 3Μεθυλο- Ρεσβερατρώλης στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων έναντι του ADP. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % αναστολή α) του ύψους της καμπύλης συσσώρευσης και β) της περιοχής κάτω από τη καμπύλη απουσία ρεσβερατρώλης **σ.60**

Διάγραμμα 5: Η επίδραση της 3Μεθυλο- Ρεσβερατρώλης στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων έναντι του PAF. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως επι τοις εκατό αναστολή α) του ύψους της καμπύλης συσσώρευσης (Amplitude) και β) της περιοχής κάτω από τη καμπύλη(AUC) απουσία ρεσβερατρώλης **σ.61**

Διάγραμμα 6: Η επίδραση της 3Μεθυλο- Ρεσβερατρώλης στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων έναντι του TRAP. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % αναστολή α) του ύψους της καμπύλης συσσώρευσης (Amplitude) και β) της περιοχής κάτω από τη καμπύλη(AUC) απουσία ρεσβερατρώλης **σ.62**

Διάγραμμα 7: Τα σημεία που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό του IC50 με βάση το ύψος της συσσώρευσης και το εμβαδόν κάτω από τη καμπύλη **σ.64**

Διάγραμμα 8: Η επίδραση της 4Μεθυλο- Ρεσβερατρώλης στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων έναντι του ADP. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως επι τοις εκατό αναστολή α) του ύψους της καμπύλης συσσώρευσης (Amplitude) και β) της περιοχής κάτω από τη καμπύλη(AUC) απουσία ρεσβερατρώλης **σ.65**

Διάγραμμα 9: Η επίδραση της 4Μεθυλο- Ρεσβερατρώλης στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων έναντι του PAF. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως επι τοις εκατό αναστολή α) του ύψους της καμπύλης συσσώρευσης (Amplitude) και β) της περιοχής κάτω από τη καμπύλη(AUC) απουσία ρεσβερατρώλης **σ.66**

Διάγραμμα 10: Η επίδραση της 4Μεθυλο- Ρεσβερατρώλης στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων έναντι του TRAP. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως επι τοις εκατό αναστολή α) του ύψους της καμπύλης συσσώρευσης (Amplitude) και β) της περιοχής κάτω από τη καμπύλη(AUC) απουσία ρεσβερατρώλης **σ.67**

Διάγραμμα 11: Τα σημεία που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό του IC50 με βάση το ύψος της συσσώρευσης και το εμβαδόν κάτω από τη καμπύλη **σ.68**

Διάγραμμα 12: Η επίδραση της Δι-Μεθυλο- Ρεσβερατρώλης στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων έναντι του ADP. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % αναστολή α) του ύψους της καμπύλης συσσώρευσης (Amplitude) και β) της περιοχής κάτω από τη καμπύλη(AUC) απουσία ρεσβερατρώλης **σ.69**

Διάγραμμα 13: Η επίδραση της Δι-Μεθυλο- Ρεσβερατρώλης στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων έναντι του PAF. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % αναστολή α) του ύψους της καμπύλης συσσώρευσης (Amplitude) και β) της περιοχής κάτω από τη καμπύλη(AUC) απουσία ρεσβερατρώλης **σ.70**

Διάγραμμα 14: Τα σημεία που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό του IC50 με βάση το ύψος της συσσώρευσης και το εμβαδόν κάτω από τη καμπύλη **σ.71**

Διάγραμμα 15: Η επίδραση της Δι-Μεθυλο- Ρεσβερατρώλης στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων έναντι του TRAP. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % αναστολή α) του ύψους της καμπύλης συσσώρευσης (Amplitude) και β) της περιοχής κάτω από τη καμπύλη(AUC) απουσία ρεσβερατρώλης **σ.72**

Διάγραμμα 16: Τα σημεία που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό του IC50 με βάση το ύψος της συσσώρευσης και το εμβαδόν κάτω από τη καμπύλη **σ.73**

Διάγραμμα 17: Η επίδραση της 3.4 Δι-Μεθυλο- Ρεσβερατρώλης στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων έναντι του ADP. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % αναστολή α) του ύψους της καμπύλης συσσώρευσης (Amplitude) και β) της περιοχής κάτω από τη καμπύλη(AUC) απουσία ρεσβερατρώλης **σ.74**

Διάγραμμα 18: Τα σημεία που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό του IC50 με βάση το ύψος της συσσώρευσης και το εμβαδόν κάτω από τη καμπύλη **σ.75**

Διάγραμμα 19: Η επίδραση της 3.4 Δι-Μεθυλο- Ρεσβερατρώλης στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων έναντι του PAF. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % αναστολή α) του ύψους της καμπύλης συσσώρευσης (Amplitude) και β) της περιοχής κάτω από τη καμπύλη(AUC) απουσία ρεσβερατρώλης **σ.76**

Διάγραμμα 20: Τα σημεία που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό του IC50 με βάση το ύψος της συσσώρευσης και το εμβαδόν κάτω από τη καμπύλη **σ.77**

Διάγραμμα 21: Η επίδραση της 3.4 Δι-Μεθυλο- Ρεσβερατρόλης στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων έναντι του TRAP. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % αναστολή α) του ύψους της καμπύλης συσσώρευσης (Amplitude) και β) της περιοχής κάτω από τη καμπύλη(AUC) απουσία ρεσβερατρόλης **σ.78**

Διάγραμμα 22: Τα σημεία που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό του IC50 με βάση το ύψος της συσσώρευσης και το εμβαδόν κάτω από τη καμπύλη **σ.79**

Διάγραμμα 23: Η επίδραση της Τρι-Μεθυλο Ρεσβερατρόλης στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων έναντι του ADP. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % αναστολή α) του ύψους της καμπύλης συσσώρευσης (Amplitude) και β) της περιοχής κάτω από τη καμπύλη(AUC) απουσία ρεσβερατρόλης **σ.80**

Διάγραμμα 24: Η επίδραση της Τρι-Μεθυλο- Ρεσβερατρόλης στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων έναντι του PAF. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % αναστολή α) του ύψους της καμπύλης συσσώρευσης (Amplitude) και β) της περιοχής κάτω από τη καμπύλη(AUC) απουσία ρεσβερατρόλης **σ.81**

Διάγραμμα 25: Τα σημεία που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό του IC50 με το εμβαδόν κάτω από τη καμπύλη **σ.82**

Διάγραμμα 26: Η επίδραση της Τρι-Μεθυλο- Ρεσβερατρόλης στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων έναντι του TRAP. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % αναστολή α) του ύψους της καμπύλης συσσώρευσης (Amplitude) και β) της περιοχής κάτω από τη καμπύλη(AUC) απουσία ρεσβερατρόλης **σ.83**

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Η ρεσβερατρόλη και οι θέσεις μεθυλίωσής της **σ.60**

Πίνακας 2: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της συγκέντρωσης με βάση το IC50% των ουσιών που μελετήθηκαν στους τρεις συσσωρευτικούς παράγοντες με βάση το ύψος συσσώρευσης και το AUC **σ.84**

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

EDRF	endothelium derived releasing factor	
PGI		προστακυκλίνη
t-PA	tissue plasminogen activator	
PAI	Plasminogen activator inhibitor	
vWF	Von Willebrand	
PGI		προστακυκλίνη
NO	Nitrogen Oxide	μονοξείδιο του αζώτου
ADPάση		αδενοσική διφωσφατάση
PLA ₂		φωσφολιπάση A ₂
AMP	Adenosine Monophosphate	μονοφωσφορική αδενοσίνη
cAMP		κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη
ADP	Adenosine Diphosphate	διφωσφορική αδενοσίνη
VWF	Von Willebrand Factor	παράγοντας von Willebrand
PDGF	platelet-derived growth factor	
P4F		τέταρτος αιμοπεταλιακός παράγοντας
GP1Ib	<u>Glycoprotein IIb/IIIa</u>	
PAF	Platelet Activating Factor	παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων
LTs	<u>Leukotrienes</u>	λευκοτριένια
TNF-α	Tumor necrosis factor	Παράγοντας νέκρωσης όγκου
TRAP	Thrombin receptor-activating peptides	
PAR		Υποδοχέας πρωτεάσης
Gp1bα		γλυκοπρωτεΐνης Ibα
HK		Υψηλού Μοριακού Βάρους Κινηνογόνο
PK	Prokallikrein	προκαλλικρεΐνης
TAFI	Thrombin Activatable, Fibrinolysis Inhibitor	

TF	Tissue Factor	ιστικό παράγοντα
TFPI)	Tissue Factor Pathway Inhibitor	
TM	Thrombomodulin	θρομβομοντουλίνη
PC	Protein C	πρωτεΐνη C
APC	Activated Protein C	Ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C
tPA	tissue-type plasminogen activator	
uPA	urokinase-type plasminogen activator	
HMWK	high-molecular-weight kininogen	υψηλού μοριακού βάρους κινινογόνο
PAI		ενεργοποιητής του πλασμινογόνου
RSV	Resveratrol	ρεσβερατρόλη
GLU-RSV		γλυκουρονίδιο της ρεσβερατρόλης
SUL RSV		σουλφονίδιο της ρεσβερατρόλης
COX		κυκλοοξυγενάση
MR		Μέθυλο-ρεσβερατρόλη
DMR		Διμέθυλο-ρεσβερατρόλη
TMR		τριμέθυλορεσβερατρόλη

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

ΑΙΜΟΣΤΑΣΗ ΚΑΙ ΘΡΟΜΒΩΣΗ

1. ΑΙΜΟΣΤΑΣΗ

Ως αιμόσταση ορίζουμε τη βιοχημική και κυτταρική διαδικασία που λαμβάνει χώρα στον οργανισμό με σκοπό να διατηρηθεί η ρέουσα υγρή μορφή του αίματος, να περιοριστεί ή να σταματήσει η αιμορραγία μετά το τραυματισμό και να αποκατασταθεί η κυκλοφορία του αίματος κατά την επούλωση. Η φυσιολογική αιμόσταση περιλαμβάνει ρυθμιστικές διαδικασίες όπου διατηρούν το αίμα σε μια ρευστή κατάσταση, ενώ σε περίπτωση που υπάρξει κάποιος τραυματισμός στα αγγεία, σχηματίζεται άμεσα ένας αιμοστατικός θρόμβος. Στη διαδικασία αυτή παίρνουν μέρος το αγγειακό τοίχωμα, τα αιμοπετάλια και ο καταρράκτης πήξης του αίματος. Τα κύτταρα του ενδοθηλίου έχουν διττό ρόλο, είναι αυτά που ρυθμίζουν κατά βάση τη διαδικασία της αιμόστασης και της θρόμβωσης. Φυσιολογικά στα κύτταρα αυτά είναι ενεργοποιημένοι οι αντιπηκτικοί παράγοντες οι οποίοι καταστέλλουν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, τη διαδικασία πήξης του αίματος και επάγουν την ινωδόλυση. Από την άλλη σε περίπτωση τραυματισμού ή ενεργοποίησης τα κύτταρα αυτά αποκτούν προθρομβωτική δραστηριότητα. Όταν επέλθει τραυματισμός στο αγγείο γίνεται αγγειοσύσπαση και δημιουργείται ένα αιμοπεταλιακό πλέγμα το οποίο αρκεί για να σταματήσει την αιμορραγία όταν αυτή προέρχεται από τα τριχοειδή αγγεία(Πρωτογενής αιμόσταση).Σε αιμορραγία μεγαλύτερου διαμετρήματος ενεργοποιείται ο μηχανισμός πήξης του αίματος με σκοπό τη δημιουργία ινώδους για να μπορέσει να σταθεροποιηθεί ο θρόμβος-(Δευτερογενής αιμόσταση).Τέλος ακολουθεί η διαδικασία της ινωδόλυσης που οδηγεί στη λύση του ινώδους για την αποφυγή της δημιουργίας θρόμβου αυξημένου μεγέθους.

Με το τραυματισμό του αγγείου, μέσω του κεντρικού νευρικού συστήματος θα εκκριθούν ορμόνες όπως η επινεφρίνη, η σεροτονίνη και η νοραδρεναλίνη με σκοπό την ενεργοποίηση του μηχανισμού της συστολής του αγγείου. Τα αγγειακά κύτταρα συνθέτουν και εκκρίνουν ουσίες και με αυτό τον τρόπο ρυθμίζεται η

αιμόσταση¹. Όταν τραυματίζεται το ενδοθήλιο αποκαλύπτεται το υποενδοθήλιο στο οποίο εκκρίνεται κολλαγόνο. Το κολλαγόνο αποτελεί συστατικό της εξωκυττάριας μήτρας και είναι το πιο αθηρογόνο συστατικό καθώς επάγει την ενεργοποίηση και τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων.^{2,3} Στο ενδοθήλιο από την άλλη εκκρίνεται το οξείδιο του αζώτου (nitrous oxide, NO) ή αλλιώς ο EDRF (endothelium derived releasing factor) ουσία που προκαλεί αγγειοδιαστολή. Η προστακυκλίνη (PGI₂) παρεμποδίζει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και προκαλεί αγγειοδιαστολή. Στα επιθηλιακά κύτταρα βρίσκονται οι μιμητές της ηπαρίνης (heparin sulfates)⁷ που προσδίδουν σε αυτές αρνητικό φορτίο, εμποδίζοντας έτσι τη προσκόλληση των αιμοπεταλίων, ενώ παράλληλα σε συνεργασία με το μόριο της αντιθρομβίνης αναστέλλουν την ενδογενή οδό της πήξεως. Η θρομβομοντουλίνη (thrombomodulin) η οποία επίσης βρίσκεται στην επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων σε συνεργασία με τη θρομβίνη ενεργοποιεί τον αναστολέα της πήξεως Πρωτεΐνη C. Ο ιστικός ενεργοποιητής του πλασμινογόνου t-PA (tissue plasminogen activator). Το πλασμινογόνο ενεργοποιεί την αποδόμηση του ινώδους. Ο αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου PAI (Plasminogen activator inhibitor), που αναστέλλει τη δράση του t-PA. Ο παράγοντας Von Willebrand (vWF) που συμμετέχει στο μηχανισμό συσσώρευσης των αιμοπεταλίων και επιπλέον είναι πρωτεΐνη μεταφορέας του παράγοντα FVIII.

1.1. Πρωτογενής αιμόσταση

1.1.1 Ενδοθήλιο

Στην αιμόσταση παίρνουν μέρος τα αιμοπετάλια, τα κύτταρα του ενδοθηλίου και το υποενδοθήλιο. Το ενδοθήλιο αντιμετωπίζει τις απειλές της ακεραιότητας των αιμοφόρων αγγείων και της ομοιοστασίας των συστατικών του αίματος, οι οποίες μπορεί να προέρχονται από τα λιπίδια, τα ανοσοσυμπλέγματα, τους μικροοργανισμούς και τις τοξίνες που αυτοί παράγουν. Είναι ολοένα και πιο σαφές ότι το ενδοθήλιο παρέχει ισχυρούς αμυντικούς μηχανισμούς ενάντια σε αυτές τις απειλές εκφράζοντας μια σειρά μορίων⁴. Η κύρια λειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων είναι να παράγουν αγγειοπροστατευτικά και αντιθρομβωτικά μόρια. Μερικά μόρια εκφράζονται συστηματικά και άλλα

παράγονται ως απόκριση στα ερεθίσματα. Υπό φυσιολογικές συνθήκες τα κύτταρα του ενδοθηλίου παράγουν αγγειοδιασταλτικές ουσίες όπως η προστακυκλίνη (PGI) το μονοξείδιο του αζώτου(NO) και η αδενοσική διφωσφατάση(ADPαση) οι οποίες εμποδίζουν τη προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο τοίχωμα του ενδοθηλίου.

Το μονοξείδιο του αζώτου παράγεται από την L-αργινίνη και την L-κιτρουλίνη και εκκρίνεται στα λεία μυϊκά κύτταρα και στα αιμοπετάλια της κυκλοφορίας. Το μονοξείδιο του αζώτου (NO) διαχέεται και ενεργοποιεί την γουανιλική κυκλάση των λείων μυϊκών κυττάρων και αυξάνει την κυκλική μονοφωσφορική γουανοσίνη που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα. Η αύξηση της γουανιλικής κυκλάσης των αιμοπεταλίων έχει ως αποτέλεσμα να αναστέλλεται η προσκόλληση, η ενεργοποίηση και η συσσώρευσή των αιμοπεταλίων.⁵

Η προστακυκλίνη συντίθεται κυρίως στα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα και τα λεία μυϊκά κύτταρα.⁴ Όταν διεγείρεται από διάφορους φυσιολογικούς αγωνιστές, συμπεριλαμβανομένης της θρομβίνης, της ισταμίνης και της βραδυκινίνης, ενεργοποιείται η φωσφολιπάση A₂ (PLA₂) που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα των ενδοθηλιακών κυττάρων. Η ενεργοποιημένη PLA₂ καταλύει την απελευθέρωση του αραχιδονικού οξέος (AA) κυρίως από τη φωσφατιδυλοχολίνη. Το ελεύθερο AA χρησιμεύει ως υπόστρωμα για τη συνθάση της προσταγλανδίνης H (PGHS, επίσης γνωστή ως κυκλοοξυγονάση). Η προστακυκλίνη αποτελεί έναν ισχυρό αναστολέα των αιμοπεταλίων. Έχει την ικανότητα να αναστέλλει την έκκριση, την ενεργοποίηση αλλά και τη συσσώρευσή τους. Η προστακυκλίνη δρα ως αντιαιμοπεταλιακός παράγοντας καθώς επάγει τη χαλάρωση των λείων μυϊκών ινών, αποκλείει την αλληλεπίδραση των κυττάρων του αίματος με το ενδοθήλιο και μειώνει τη συσσώρευση λιπιδίων στα λεία μυϊκά κύτταρα. Η ικανότητά της να αναστέλλει τα αιμοπετάλια γίνεται μέσω σύνδεσής της στη γουανοσίνη ενός νουκλεοτιδικού υποδοχέα. Αυτή η πρόσδεση οδηγεί στην ενεργοποίηση της αδενολικής κυκλάσης και στην αύξηση των επιπέδων της κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης(cAMP) στα αιμοπετάλια με αποτέλεσμα την αναστολή της ενεργοποίησής τους. Αξίζει να σημειωθεί ότι δρα συνεργιστικά με το NO για την αναστολή συσσώρευσης των αιμοπεταλίων.⁶

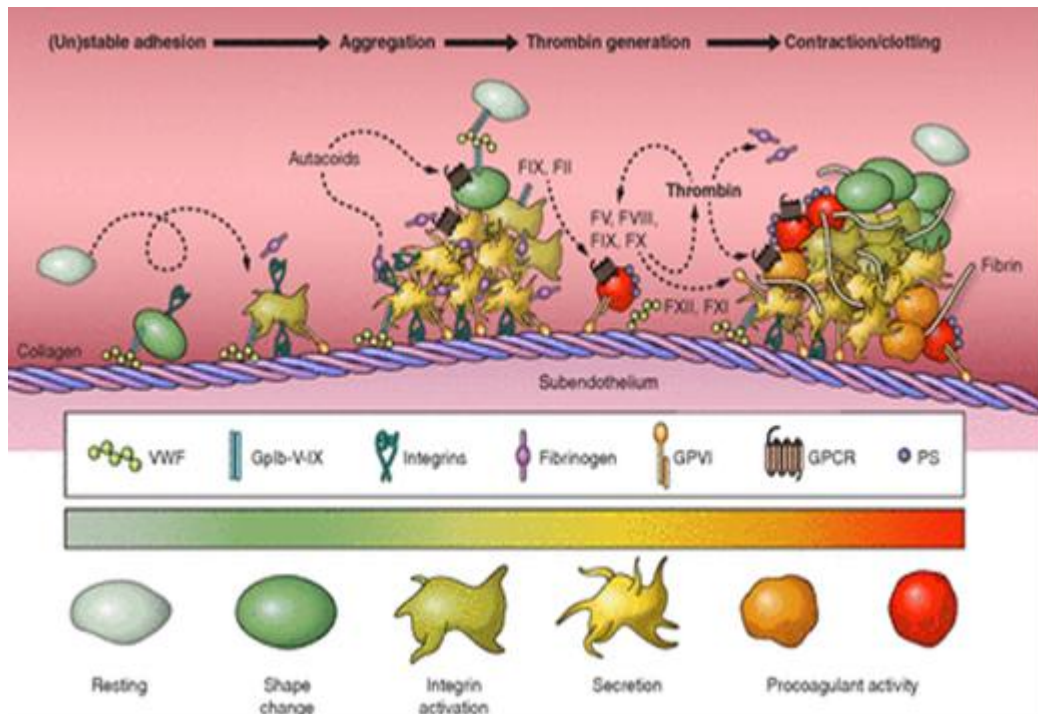
Τα κύτταρα του ενδοθηλίου εμποδίζουν την έναρξη του καταρράκτη πήξης του αίματος με το να εκφράζεται στην επιφάνειά τους η αδενοσική διφωσφατάση (ADPase).⁷ Το ADP (διφωσφορική αδενοσίνη) αποτελεί βασικό συσσωρευτικό παράγοντα των αιμοπεταλίων, απελευθερώνεται από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια και αποικοδομείται από την αδενοσική διφωσφατάση (ADPase) σε μονοφωσφορική αδενοσίνη (AMP), αυτό έχει ως αποτέλεσμα να περιορίζεται η συσσώρευση των αιμοπεταλίων.⁸

1.1.2. Αιμοπετάλια

Όπως προαναφέρθηκε όταν επέλθει τραυματισμός του αγγείου, η δημιουργία θρόμβου είναι απαραίτητη. Ξεκινάει λοιπόν η πρωτογενής αιμόσταση και η παραγωγή ενός εύθραστου αιμοπεταλιακού θρόμβου. Τα αιμοπετάλια, παίζουν βασικό ρόλο στην αιμόσταση και στη δημιουργία του θρόμβου, συνεπώς θα ήταν καλό να αναφερθούμε λίγο παραπάνω σε αυτά. Τα αιμοπετάλια είναι μικρά, απύρρηνα κύτταρα στα οποία περιέχονται πολλά οργανίδια και έχουν μια αρκετά ενεργή μεμβράνη. Επιπλέον περιέχουν δύο ειδών κοκκία, τα «α» κοκκία τα οποία περιέχουν το παράγοντα von Willebrand, τον platelet-derived growth factor (PDGF), τον τέταρτο αιμοπεταλιακό παράγοντα (P4F) και τη β-θρομβομοντουλίνη και τα «δ» κοκκία τα οποία περιέχουν ADP, ATP, ασβέστιο και σεροτονίνη.^(9,10) Η διαδικασία παραγωγής του αιμοπεταλιακού θρόμβου περιλαμβάνει τα εξής στάδια: τη προσκόλληση, την απελευθέρωση των κοκκίων των αιμοπεταλίων και τη συσσώρευσή τους. Τα αιμοπετάλια λοιπόν προσκολλώνται στην αγγειακή πληγή και πιο συγκεκριμένα στο κολλαγόνο που βρίσκεται στο υποενδοθήλιο και αποκαλύπτεται μετά τη τρώση του ενδοθηλίου. Τα αιμοπετάλια όταν έρθουν σε επαφή με το υποενδοθήλιο θα αναγνωρίσουν το παράγοντα von Willebrand (VWF), ο οποίος είναι ένα πολυμερές όπου έχει συσσωρευτική δράση. Ο παράγοντας αυτός εκκρίνεται από τα αιμοπετάλια και τα κύτταρα του ενδοθηλίου όταν αυτά ενεργοποιηθούν.¹¹ Ο VWF είναι ενωμένος με το κολλαγόνο και αναγνωρίζεται από τον υποδοχέα Gr1b που βρίσκεται στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων. Πιο συγκεκριμένα, η προσκόλληση των αιμοπεταλίων γίνεται μέσω

της αναγνώρισης του παράγοντα von Willebrand από μια γλυκοπρωτεΐνη υποδοχέα Ib/IX/V που βρίσκεται στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων¹² και του κολλαγόνου από την GPVI.^{13,14,15} Αυτή η διαδικασία μπορεί να οδηγήσει στην ενεργοποίηση των ιντεγκρινών όπου θα συμβάλλουν στη σταδιακή προσκόλληση των αιμοπεταλίων και στη συνέχεια τη συσσώρευσή τους με αποτέλεσμα τη δημιουργία θρόμβου.¹¹ Αμέσως μετά τη προσκόλλησή τους τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται και απελευθερώνουν τα κοκκία τους (αντίδραση απελευθέρωσης). Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων οδηγεί και στην αλλαγή του σχήματός τους. Η δισκοειδής τους μορφή θα χαθεί, θα γίνουν σφαιρικά και θα βγάλουν ψευδοπόδια. Η αλλαγή του σχήματος αυξάνει την επιφάνεια που είναι διαθέσιμη για αλληλεπίδραση με τους παράγοντες πήξης και ενισχύει τη περαιτέρω συσσώρευση των αιμοπεταλίων.— Επίσης συμβαίνουν και κάποιες πιο ανεπαίσθητες αλλαγές στην εμφάνιση των μεμβρανών του πλάσματος. Οι ανεπαίσθητες αλλαγές της μεμβράνης περιλαμβάνουν μια αύξηση της έκφρασης των αρνητικά φορτισμένων φωσfolιπιδίων, τα οποία παρέχουν θέσεις σύνδεσης και για το ασβέστιο και για τους παράγοντες πήξης. Τέλος η αλλαγή του σχήματος των αιμοπεταλίων οδηγεί στην αλλαγή της διαμόρφωσης των GPIIb / IIIa των αιμοπεταλίων που τους επιτρέπει να δεσμεύουν το ινωδογόνο. Επίσης το ασβέστιο και το ADP που απελευθερώνονται από τα δ κοκκία είναι ιδιαίτερα σημαντικά, καθώς το ασβέστιο που απαιτείται από διάφορους παράγοντες πήξης και το ADP, είναι ισχυροί ενεργοποιητές των αιμοπεταλίων. Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια συνθέτουν επίσης θρομβοξάνη A2 (TxA2), μια προσταγλαδίνη που ενεργοποιεί επιπλέον τα γειτονικά- αιμοπετάλια και επίσης παίζει έναν σημαντικό ρόλο στην συσσώρευση των αιμοπεταλίων.

Η συσσώρευση των αιμοπεταλίων έπεται την προσκόλλησης και της ενεργοποίησής τους. Οι παράγοντες που την διεγείρουν είναι σχεδόν οι ίδιοι με εκείνους που ενεργοποιούν τα αιμοπετάλια(π.χ. TxA2). Η συσσώρευση πραγματοποιείται μέσω της αλληλεπίδρασης του ινωδογόνου με τους GPIIb/IIIa υποδοχείς των κοντινών αιμοπεταλίων.⁽⁵⁾



(Εικόνα 1.1. Τα στάδια ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων και ο σχηματισμός)¹⁷

1.1.3.Αγωνιστές Αιμοπεταλίων

1.1.3.1.ADP

Το ADP είναι σημαντικός φυσιολογικός αλλά και παθολογικός αγωνιστής των αιμοπεταλίων. Όταν επέλθει κάποιος τραυματισμός στο αγγειακό τοίχωμα, από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια και τα κατεστραμμένα κύτταρα εκκρίνεται τοπικά ADP. Τότε το ADP δεσμεύεται στους υποδοχείς του, που βρίσκονται στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων με αποτέλεσμα την ενίσχυση της συσώρευσής τους.¹⁶ Το ADP είναι γνωστό πλέον ότι εμπλέκεται στην ενίσχυση ενεργοποίησης και συσώρευσης των αιμοπεταλίων από αδύναμους αγωνιστές, όπως η αδρεναλίνη και η σεροτονίνη αλλά και παρουσία ισχυρών αγωνιστών σε χαμηλές συγκεντρώσεις όπως κολλαγόνο, θρομβίνη και αραχιδονικό οξύ.

Οι υποδοχείς που βρίσκονται στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων είναι καθοριστικοί παράγοντες για τη λειτουργία τους. Τα αιμοπετάλια εκφράζουν τον P2Y1 και τον P2Y12 οι οποίοι ενεργοποιούνται από το ADP και τον P2X1 που ενεργοποιείται από το ATP. Οι υποδοχείς P2Y1 και P2Y12 συνδέονται με G-

πρωτεΐνες. Η ενεργοποίηση του P2Y1 υποδοχέα επάγει τη κινητοποίηση και την εισροή Ca^{2+} στο κύτταρο, με αποτέλεσμα την αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων αλλά και την αναστρέψιμη συσώρευσή τους. Από την άλλη πλευρά η ενεργοποίηση του υποδοχέα P2Y12 οδηγεί στην αναστολή της σταθερής αύξησης της συσώρευσης των αιμοπεταλίων. Για να μπορέσει να γίνει η συσώρευση των αιμοπεταλίων πρέπει να ενεργοποιηθούν και οι δύο υποδοχείς (P2Y1 και P2Y12) από το ADP. Ο υποδοχέας P2X1 είναι κανάλι ιόντων όπου προκαλεί μια αλλαγή στο σχήμα των αιμοπεταλίων αλλά παίζει μικρό ρόλο στη συσώρευσή τους.¹⁸

1.1.3.2.PAF

Ο παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF ή 1-O-αλκυλο- 2- ακετυλο- sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη) είναι μία φωσφολιπιδική ένωση που παράγεται ενδογενώς και είναι αρκετά ισχυρή καθώς δρα σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (10-5 έως 10^{-10} mol)¹⁹ Αυτό καθιστά τον PAF έναν βιολογικά δραστικό και ισχυρό φλεγμονώδη παράγοντα.²⁰ Ο PAF είναι ένα προφλεγμονώδες ауτακοειδές (παρακρινής ορμόνη) με πολλές επιδράσεις. Παίρνει μέρος σε πολλές διαδικασίες όπως για παράδειγμα αυτή της φλεγμονής και της αλλεργίας.²¹ Ο οποίος θεωρείται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην έναρξη και την εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης.²² Συναντάται σε πολλά είδη κυττάρων όπως για παράδειγμα τα ενδοθηλιακά, τα νεφρικά στα οποία και παράγεται ως επί το πλείστον. Η παραγωγή PAF σε ενδοθηλιακά κύτταρα ενεργοποιείται από θρομβίνη, αγγειοτενσίνη II, αντι-παράγοντα VIII και IL-1.²³ Ο PAF εκκρίνεται από τα βασεόφιλα προς απάντηση τους στην έκκριση της IgG και στα μαστοκύτταρα όταν αυτά αντιδρούν στην έκκριση της IgE. Η διέγερση των κυττάρων αυτών οδηγεί στην απελευθέρωση ισταμίνης και PAF με αποτέλεσμα την ενεργοποίησή τους. Από την άλλη ο PAF που απελευθερώνεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα θεωρείται ότι παίζει έναν αγγειοσυσταλτικό ρόλο μέσω της προαγωγής της προσκόλλησης των λευκοκυττάρων στην κυτταρική επιφάνεια, αν και μπορεί επίσης να δρα ως ένας ισχυρός αγγειοδιασταλτικός παράγοντας. Η μεταβλητότητα του ρόλου του επηρεάζεται εκτός από τη συγκέντρωσή του αλλά και από άλλους ανεξάρτητους παράγοντες της

κυκλοφορίας(π.χ. λευκοτριένια [LTs] και TNF-α) που μπορεί να υπάρχουν κατά τη διάρκεια μίας συγκεκριμένης αντίδρασης.

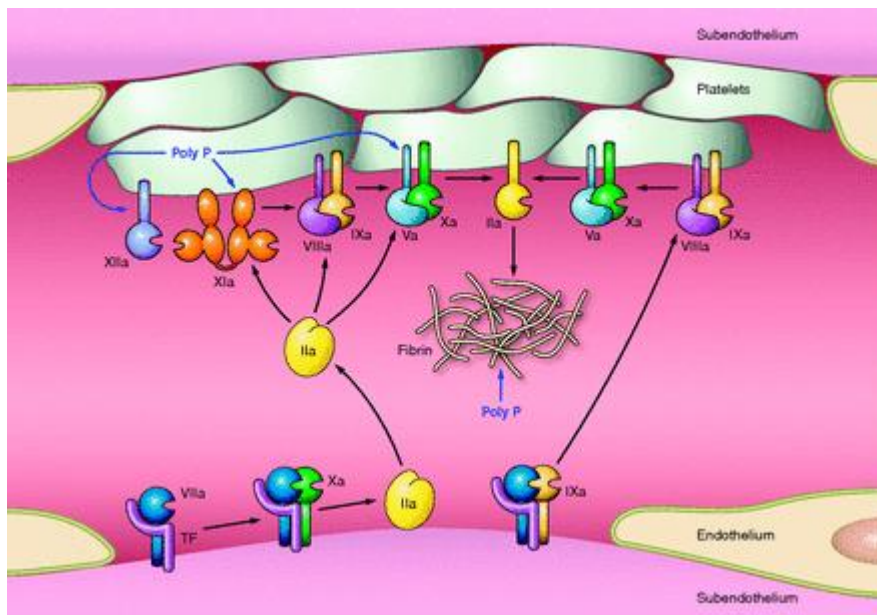
1.1.3.3. TRAP

Ο TRAP είναι ένα πεπτίδιο το οποίο ανταγωνίζεται και μιμείται τις δράσεις της θρομβίνης στα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα²⁴. Η θρομβίνη είναι η τελική πρωτεάση του καταρράκτη πήξης του αίματος και η δραστηριότητά της είναι ζωτικής σημασίας για το σχηματισμό σταθερών θρόμβων. Εκτός από τη διάσπαση του ινωδογόνου σε ινώδες, η θρομβίνη τροφοδοτεί και τη δική της παραγωγή ενεργοποιώντας τους συμπαράγοντες V και VIII, την πρωτεάση XI μέσω της διάσπασης του ενεργοποιημένου υποδοχέα πρωτεάσης (PAR)1. Αξίζει να σημειωθεί πως η διάσπαση του PAR-1 από τη θρομβίνη αυξάνεται περίπου 5 φορές παρουσία της γλυκοπρωτεΐνης Ibα (GpIbα), ενός μέρους του συμπλόκου του υποδοχέα GpIb-IX-V των αιμοπεταλίων, που έχει ταυτοποιηθεί ως ο υποδοχέας υψηλής συγγένειας για τη θρομβίνη στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων.²⁵

1.2. Δευτερογενής Αιμόσταση

1.2.1. Καταρράκτης πήξης του αίματος

Το σύστημα πήξης του αίματος αποτελείται από πρωτεΐνες του πλάσματος, κύτταρα του αίματος και συστατικά του αγγειακού ενδοθηλίου. Αυτά ενεργοποιούνται με σκοπό τη δημιουργία ενός πλέγματος ινώδους το οποίο χρησιμεύει για τη περαιτέρω στήριξη του αιμοπεταλιακού θρόμβου. Το κλασσικό μοντέλο αναφέρει αυτόν το μηχανισμό σαν καταρράκτη καθώς λαμβάνουν χώρα διαδοχικές αντιδράσεις οπότε έχουμε και διαδοχική ενεργοποίηση των παραγόντων πήξης μέσω δύο διαφορετικών μονοπατιών. Οι οδοί αυτοί είναι η οδός επαφής (ενδογενής οδός) και η οδός του ιστικού παράγοντα(εξωγενής οδός). Έχει τεκμηριωθεί ότι η εξωγενής οδός εμπλέκεται στην έναρξη, ενώ η ενδογενής οδός βοηθά στη διάδοση της πήξης του αίματος.²⁶ Και οι δύο οδοί όμως πιστεύεται ότι συμμετέχουν στη διαδικασία της θρόμβωσης. Μια αναδυόμενη θεωρία είναι ότι η οδός επαφής λειτουργεί σαν αμυντικός μηχανισμός του ξενιστή απέναντι στο παθογόνο.^{27,28}



Εικόνα 1.2.: Ο καταρράκτης πήξης του αίματος ¹⁷

1.2.2.Ενδογενής οδός

Στην ενδογενή οδό πήξης έχουμε ενεργοποίηση του παράγοντα XII, ο οποίος βρίσκεται στην κυτταρική μεμβράνη του ενδοθηλίου αλλά και του υποενδοθηλίου. Η διαδικασία αυτή για να προαχθεί απαιτεί επίσης τη παρουσία του μεγάλου μοριακού βάρους κινινογόνου [high-molecular-weight kininogen (HK)], της προκαλλικρεΐνης(PK) και του παράγοντα XI. Η επαφή του αίματος με την αλλοιωμένη επιφάνεια οδηγεί σε μια αλλαγή στη διαμόρφωση του παράγοντα XII, με αποτέλεσμα την παραγωγή μικρών ποσοτήτων του ενεργοποιημένου πλέον παράγοντα XII (FXIIa). Αυτό το ένζυμο στη συνέχεια καταλύει τη μετατροπή της προκαλλικρεΐνης σε καλλικρεΐνη. Η περαιτέρω αμοιβαία ενεργοποίηση του παράγοντα XII από την καλλικρεΐνη και της προκαλλικρεΐνης από τον FXIIa έχει σαν αποτέλεσμα ένα βρόχο θετικής ανάδρασης. Ο παράγοντας XIIa που δημιουργείται στη συνέχεια ενεργοποιεί το υπόστρωμά του, τον παράγοντα XI σε FXIa (Σχήμα 1). Η ενεργοποίηση του παράγοντα IX από τον XIa απαιτεί την παρουσία ιόντων ασβεστίου («παράγων IV'' / Ca^{++}). Ο ενεργοποιημένος παράγων IX συνδέεται με τον παράγοντα VIII (αντισταμοροφιλικό παράγοντα). Με τη μεσολάβηση ιόντων

ασβεστίου και ενός φωσφολιποειδούς, ο ενεργοποιημένος FIX ενεργοποιεί τον FX σε FXa. Η ενεργοποίηση αυτή πραγματοποιείται συνήθως, στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των αιμοπεταλίων που έχουν ενεργοποιηθεί, μπορεί όμως να γίνει και επάνω στο αγγειακό ενδοθήλιο.

1.2.3.Εξωγενής οδός

Η εξωγενής οδός ενεργοποιείται, όταν ο ιστικός παράγοντας (tissue factor-TF) εκτίθεται στην κυκλοφορία. Ο TF είναι μία γλυκοπρωτεΐνη, η οποία εκφράζεται σε διάφορα είδη κυττάρων, και κυρίως τα ενδοθηλιακά. Μετά από αγγειακή βλάβη ή φλεγμονώδη διέγερση, ο εκτεθειμένος στην επιφάνεια των κυττάρων TF, έρχεται σε επαφή με τον FVII, με τον οποίο εμφανίζει υψηλή συγγένεια και σχηματίζει πάνω στην επιφάνεια του κυττάρου ισχυρό σύμπλοκο με την ενεργοποιημένη μορφή του (σύμπλεγμα TF/ FVIIa). Το σύμπλοκο TF/FVIIa αυτό μέσω περιορισμένης πρωτεόλυσης ενεργοποιεί τον παράγοντα X σε Xa και τον παράγοντα IX σε IXa.

1.2.4.Κοινή οδός

Στην κοινή οδό ο παράγοντας Xa σχηματίζει σύμπλοκο με τον FVa, πάνω στην επιφάνεια του αιμοπεταλίου. Το σύμπλοκο αυτό σχηματίζεται παρουσία ασβεστίου και φωσφολιπιδίων και σκοπός του είναι να καταλύει τη μετατροπή μεγάλων ποσοτήτων προθρομβίνης, σε θρομβίνη. Αυτή η «εκρηκτική» παραγωγή θρομβίνης, είναι ικανή να αποσπάσει από το ινωδογόνο τα ινωδοπεπτίδια A και B και να ενεργοποιήσει τον παράγοντα FXIII (έχει ιδιότητες τρανσγλουταμινάσης). Τα παραγόμενα μονομερή του ινώδους, πολυμερίζονται, δημιουργούν έναν ασταθή θρόμβο, ο οποίος υπό την επίδραση του παράγοντα XIIIa, μετατρέπεται σε αδιάλυτο θρόμβο ινώδους. Ο ρόμβος αυτός προστατεύεται από την ινωδόλυση, από τον ενεργοποιημένο από τη θρομβίνη αναστολέα της ινωδόλυσης (Thrombin Activatable, Fibrinolysis Inhibitor-TAFI), ο οποίος δραστηριοποιείται σε υψηλές συγκεντρώσεις θρομβίνης. Η θρομβίνη είναι επίσης ένας ισχυρός ενεργοποιητής των αιμοπεταλίων, συμβάλλοντας περαιτέρω στον σχηματισμό ενός προστατευτικού αιμοστατικού πλέγματος (σε φυσιολογική αιμόσταση) ή ενός θρόμβου (σε παθολογική ενεργοποίηση του καταρράκτη πήξης).²⁸

1.3.Κυτταρικό μοντέλο πήξης του αίματος

Η πιο κλασσική διαίρεση μεταξύ ενδογενούς και εξωγενούς οδού εξακολουθεί να χρησιμοποιείται ευρέως παρ'όλο που ένα νέο κυτταρικό μοντέλο πήξης του αίματος κερδίζει την προσοχή. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, η πήξη μπορεί να χωριστεί σε τρεις ξεχωριστές φάσεις: τη φάση έναρξης, στην οποία παράγονται χαμηλές ποσότητες δραστικών θρομβωτικών παραγόντων, τη φάση ενίσχυσης, στην οποία ενισχύεται το επίπεδο των ενεργών παραγόντων πήξης και τη φάση πολλαπλασιασμού, στην οποία συνδέονται οι παράγοντες πήξης με τις μεμβράνες των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων και των θρόμβων ινώδους.

1.3.1. Φάση Έναρξης

Η φάση έναρξης, που κλασικά αναφέρεται ως η εξωγενής οδός πήξης, ξεκινά όταν διακόπτεται το αγγειακό σύστημα και υποενδοθηλιακά κύτταρα όπως κύτταρα των λείων μυϊκών ινών και των ινοβλαστών εκτίθενται στην κυκλοφορία του αίματος. Αυτά τα κύτταρα εκκρίνουν τον βασικό εκκινητή του καταρράκτη πήξης, και αυτός δεν είναι άλλος από τον ιστικό παράγοντα (TF), όπου δεσμεύεται στο παράγοντα VII. Ενεργώντας ως συμπαράγοντας για τον FVII, ο TF προάγει την πρωτεόλυση και την ενεργοποίηση του FVIIa. Το σύμπλεγμα TF / FVIIa με πρωτεόλυση ενεργοποιεί τον FIX σε FIXa και τον FX σε FXa. Αυτό επιτρέπει στον FXa να συνδέεται με τον συμπαράγοντα FVa για να σχηματίσουν ένα σύμπλοκο προθρομβινάσης σε κύτταρα που εκφράζουν τον TF, το οποίο χρησιμεύει για τη μετατροπή της προθρομβίνης (FII) σε θρομβίνη. Το FXa μπορεί να διαχωριστεί από αυτά τα κύτταρα που εκφράζουν TP για να σχηματίσουν σύμπλοκα προθρομβινάσης σε μακρινές κυτταρικές μεμβράνες.²⁰

1.3.2. Φάση ενίσχυσης

Οι βραδέως συσσωρευόμενες ποσότητες θρομβίνης θα ενεργοποιήσουν περαιτέρω τα αιμοπετάλια που έχουν προσκολληθεί στη θέση του τραυματισμού. Παράλληλα, η θρομβίνη θα μετατρέψει τον εκκρινόμενο από τα αιμοπετάλια FV σε FVa, ενισχύοντας έτσι τη δραστηριότητα της προθρομβινάσης. Επίσης μετατρέπει τον FVIII σε FVIIIa, με αποτέλεσμα αυτός να αποσυνδέεται από τον παράγοντα von Willebrand (vWF) με τον οποίο κυκλοφορεί ως σύμπλεγμα και να δρα ως

συμπαράγοντας στον FIXa στην επιφάνεια των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων για να υποστηρίξει την παραγωγή FXa. Επιπλέον, η θρομβίνη μετατρέπει τον FXI σε FXIa.

1.3.3.Φάση πολλαπλασιασμού

Τα αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια, στην επιφάνεια των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων, προσφέρουν το έδαφος για τον ενεργοποιημένο από τη θρομβίνη FIXa να σχηματίσει σύμπλεγμα με το συμπαράγοντά του FVIIIa (σύμπλεγμα τενάσης). Το σύμπλεγμα αυτό έχει τη δυνατότητα να μετατρέπει μεγαλύτερες ποσότητες FX σε FXa να ενεργοποιεί το σύμπλοκο προθρομβινάσης, και άρα να προωθεί τη δημιουργία μεγαλύτερων ποσοτήτων θρομβίνης. Ως τελικό βήμα, η ενεργοποιημένη από τη θρομβίνη τρανσγλουταμινάση FXIIIa του πλάσματος, καταλύει τον σχηματισμό ομοιοπολικών εγκάρσιων δεσμών μεταξύ παρακείμενων αλυσίδων ινώδους για να δώσει έναν ελαστικό, πολυμερισμένο θρόμβο ινώδους.^{20,28}

1.4. Αναστολείς του μηχανισμού πήξης του αίματος

Για την αποφυγή της ανεξέλεγκτης δημιουργίας του θρόμβου ο οργανισμός διαθέτει δύο ρυθμιστικούς μηχανισμούς περιορισμού και στη συνέχεια λύσης του θρόμβου. Ο πρώτος μηχανισμός είναι πιο άμεσος και αφορά τη παρουσία αναστολέων πρωτεάσης στο πλάσμα, όπως ο αναστολέας της οδού του ιστικού παράγοντα (Tissue Factor Pathway Inhibitor TFPI) ο οποίος θα συνδεθεί με τους παράγοντες X και VII και θα τους αδρανοποιήσει. Είναι ένας αναστολέας πρωτεάσης που υπάρχει σε χαμηλές συγκεντρώσεις στο πλάσμα. Το σύμπλοκο παράγοντας VIIa / ιστικός παράγοντας αναστέλλεται από τον TFPI παρουσία του παράγοντα Xa.^{29,30} Ο αναστολέας ιστικού παράγοντα όπου συντίθεται κυρίως στα κύτταρα του ενδοθηλίου και στο ήπαρ και η αντιθρομβίνη(AT), περιορίζουν τη δημιουργία του θρόμβου μόνο στη περιοχή της βλάβης.

Ο δεύτερος μηχανισμός είναι έμμεσος και αποτελείται από την πρωτεΐνη C (PC) και τον συμπαράγοντά της, την πρωτεΐνη S (PS). Η πρωτεΐνη S είναι μια εξαρτώμενη από τη βιταμίνη K γλυκοπρωτεΐνη η οποία ενισχύει την αναστολή του

παράγοντα Va από την ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C. Δεσμεύεται στην επιφάνεια του ενδοθηλίου και ενεργοποιεί τη πρωτεΐνη C και σχηματίζουν ένα σύμπλοκο. Συντίθεται στο ενδοθήλιο, στο ήπαρ και στα μεγακαρυοκύτταρα.^{31,32} Η οδός της PC ενεργοποιείται από το σύμπλεγμα θρομβίνης/ θρομβομοντουλίνης (TM) που βρίσκεται στο ενδοθήλιο. Η θρομβομοντουλίνη είναι μια ενσωματωμένη μεμβρανική πρωτεΐνη πάνω στην οποία προσδένεται η θρομβίνη. Το συγκεκριμένο μόριο δρα έμμεσα, συνδέεται με τη θρομβίνη τροποποιώντας έτσι τη δομή της με αποτέλεσμα να μη μπορεί να συνδεθεί το ινωδογόνο αλλά αντίθετα να συνδέεται και να ενεργοποιείται η πρωτεΐνη C.^{33,34,35} Η ενεργοποιημένη PC (APC) με την παρουσία του συμπαράγοντά της PS, είναι ικανή να απενεργοποιήσει τους Va και VIIIa αναστέλλοντας αποτελεσματικά το σύμπλεγμα της προθρομβινάσης και το σύμπλεγμα της τενάσης.

1.5.Ινωδόλυση

Από τη στιγμή που θα αρχίσει η διαδικασία πήξης του αίματος, ταυτόχρονα θα ξεκινήσει και η διαδικασία λύσης του θρόμβου(ινωδόλυση). Σε φυσιολογικές καταστάσεις τόσο η πήξη του αίματος όσο και η ινωδόλυση ρυθμίζονται με ακρίβεια με τη συμμετοχή ενεργοποιητών, αναστολέων, υποστρωμάτων, συμπαράγοντων και υποδοχέων.^{36,37,38,39}

Ο σκοπός του μηχανισμού της ινωδόλυσης είναι η διάλυση των θρόμβων αίματος κατά τη διάρκεια της διαδικασίας επούλωσης τραύματος και η πρόληψη θρόμβων αίματος σε υγιή αιμοφόρα αγγεία. Στο αίμα βρίσκονται τρεις πρωτεάσες σερίνης ως προένζυμα οι οποίες απαρτίζουν το σύστημα της ινωδόλυσης.⁴⁰ Η διαδικασία ξεκινά από τη στιγμή που θα ενεργοποιηθεί η πλασμίνη, η οποία ενεργοποιείται από το πλασμινογόνο, ένα ανενεργό προένζυμο. Το πλασμινογόνο προσδένεται σε οποιαδήποτε από τις δύο πρωτεάσες σερίνης, τον ενεργοποιητή του πλασμινογόνου tPA(tissue-type plasminogen activator) και uPA (urokinase-type plasminogen activator) και ενεργοποιείται. Η σύνθεση και η απελευθέρωση του tPA γίνεται από τα κύτταρα του ενδοθηλίου, ενώ από την άλλη ο uPA συντίθεται στο επιθήλιο του ουροποιητικού συστήματος, τα μακροφάγα και τα μονοκύτταρα. Στη κυκλοφορία οι πρωτεάσες αυτές έχουν χρόνο ημίσειας ζωής 4-8 λεπτά παρουσία

κάποιων ισχυρών αναστολέων όπως για παράδειγμα ο αναστολέας ενεργοποίησης του πλασμινογόνου(PAI-1).Το uPA έχει μικρότερη συγγένεια για το πλασμινογόνο και δεν απαιτεί για συμπαράγοντα τη φιβρίνη όπως συμβαίνει με τον tPA.Επίσης αξίζει να σημειωθεί ότι κάτω από φυσιολογικές συνθήκες ο uPA δρα κυρίως σε εξωαγγειακές θέσεις. Τόσο ο tPA όσο και ο uPA εκκαθαρίζονται από το ήπαρ μετά το σχηματισμό συμπλεγμάτων με λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας (LDL) - receptor-like protein.⁴¹ Ενεργοποιητές του πλασμινογόνου στο πλάσμα είναι και οι παράγοντες XI, XII, το υψηλού μοριακού βάρους κινινογόνο (HMWK) και η καλλικρεΐνη. Όταν ενεργοποιηθεί η πλασμίνη από το πλασμινογόνο θα δράσει απενεργοποιώντας τους παράγοντες V, VIII, XIII, θα διασπάσει το ινωδογόνο σε μονομερή D και E και τέλος θα διασπάσει το ινώδες παράγοντας μονομερή E και D διμερή.Ο αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου 1(PAI-1) που παράγεται στο ενδοθήλιο και στο ήπαρ αναστέλλει τον tPA και ο αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου 2(PAI-2) που παράγεται στον πλακούντα, αδρανοποιεί κυρίως την ουροκινάση και δευτερευόντως την tPA.Η άλφα-2-αντιπλασμίνη αναστέλλει τη πλασμίνη.⁴²

1.6. Θρόμβωση

Θρόμβωση λέγεται το φαινόμενο κατά το οποίο παρατηρείται πήξη του αίματος στις αρτηρίες ή στις φλέβες και δημιουργία θρόμβου που τις αποφράσει μερικώς ή ολικώς. Η παθογένεση της αρτηριακής θρόμβωσης περιλαμβάνει την αθηροσκλήρυνση, τη ρήξη της πλάκας και τη βλάβη του ενδοθηλίου που αποκαλύπτει και άρα φέρνει σε επαφή με το αίμα, το κολλαγόνο και τον ιστικό παράγοντα, με αποτέλεσμα τη δημιουργία αιμοπεταλιακού θρόμβου. Όσον αφορά τη παθογένεση της φλεβικής θρόμβωσης, εκεί ισχύει η τριάδα του Virchow κατά την οποία οι παράγοντες που βοηθούν στην ανάπτυξη της θρόμβωσης είναι η κατάσταση του αγγειακού ενδοθηλίου, η υπερπηκτικότητα του αίματος και η διαταραχή της ροής του.Το ενδοθήλιο παίζει σημαντικό ρόλο στη θρόμβωση καθώς οποιαδήποτε αγγειακή βλάβη μπορεί να οδηγήσει σε προσκόλληση των αιμοπεταλίων και ενεργοποίηση του μηχανισμού πήξης.Η υπερπηκτικότητα του αίματος σημαίνει ότι έχουμε μεταβολές στους αναστολείς πήξης του αίματος,

διαταραχές στα αιμοπετάλια(θρομβοκυττάρωση) αλλά διαταραχές και στον ινωδολυτικό μηχανισμό.Τέλος και η διαταραχή στη ροή του αίματος προδιαθέτει τη πήξη του αίματος.²⁸

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

2. ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

2.1 Εισαγωγή

Η θρόμβωση αποτελεί τη πρωταρχική αιτία εμφάνισης της στεφανιαίας νόσου. Τα τελευταία χρόνια αρχίζει και αναδύεται η σημαντικότητα της διατροφής στη διατήρηση της υγείας του οργανισμού. Μελέτες παρέμβασης και επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν μια αντίστροφη σχέση ανάμεσα στην κατανάλωση φυτικών τροφών και στους θανάτους που προέρχονται από καρδιακές παθήσεις. Οι φυτικές τροφές δεν είναι καρδιοπροστατευτικές μόνο εξαιτίας των βιταμινών, του νερού, των ανόργανων αλάτων και των ινών που περιέχουν αλλά και λόγω των δευτερογενών μεταβολιτών τους.⁴³

2.2. Κατάταξη Φαινολικών Ενώσεων

Οι φαινολικές ενώσεις είναι οργανικές ενώσεις που περιέχουν ένα ιόν υδροξυλίου συνδεδεμένο σε ένα αρωματικό δακτύλιο. Συνδέονται με άλλα μόρια όπως είναι οι πρωτεΐνες ή ακόμα συνηθέστερα τα σάκχαρα ή λιποειδή. Είναι πιο σπάνιο να τις συναντήσεις στην ελεύθερη μορφή τους καθώς είναι πιο τοξικές.⁴⁴ Αυτή η τοξικότητα που προκαλούν οι φαινολικές ενώσεις αποτελεί έναν μηχανισμό άμυνας των φυτών απέναντι στα διάφορα ζώα ή έντομα. Επίσης οι φαινολικές ενώσεις είναι απαραίτητες στο μεταβολισμό του κυττάρου αλλά και στη φυσιολογία του. Είναι σε θέση να προσδώσουν στο φυτό άρωμα, χρώμα, δομή και τέλος συμβάλλουν και στην ανάπτυξη και την αναπαραγωγή του φυτού.⁴⁵

Οι φαινολικές ενώσεις διακρίνονται σε δυο βασικές κατηγορίες ανάλογα με τη χημική τους δομή, τα флаβονοειδή και τα μη флаβονοειδή.

Τα флаβονοειδή σχηματίζουν έναν ανθρακικό σκελετό με 15 άτομα άνθρακα διατεταγμένα σε δύο αρωματικούς δακτυλίους που ενώνονται με μία γέφυρα τριών ανθράκων (C6-C3-C6).⁴⁶ Τα флаβονοειδή απαντώνται σε 7 βασικές κατηγορίες: τις ανθοκυανίνες, τις флаβόνες, τις флаβονόλες, флаβανόλες, τις флаβανόνες, τις

ισοφλαβόνες και τις προανθοκυανιδίνες.⁴⁷ Στη παρακάτω εικόνα συνοψίζονται οι κατηγορίες των φαινολικών ενώσεων, η δομή τους και η ύπαρξή τους στα τρόφιμα.

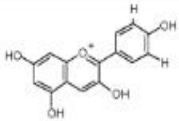
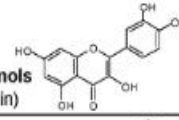
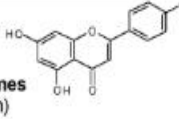
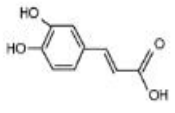
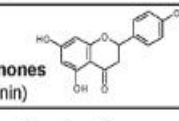
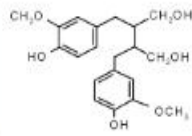
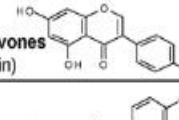
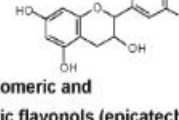
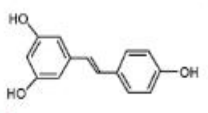
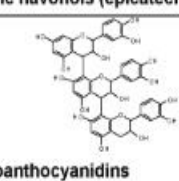
2.2.1 Φλαβονοειδή

2.2.1.1. Ανθοκυανίνες

Η ονομασία τους προέρχεται από την ελληνική λέξη ανθός και κυανός. Οι ανθοκυανίνες, οι οποίες αποτελούν μια κύρια ομάδα φλαβονοειδών, είναι υδατοδιαλυτές ουσίες οι οποίες προσδίδουν στα φυτά και στα φρούτα το χαρακτηριστικό κόκκινο-πορτοκαλί και μπλε-μωβ χρώμα τους.⁴⁹ Αποτελούνται από μια αγλυκόνη (ανθοκυανιδίνη), ένα σάκχαρο και σε πολλές περιπτώσεις μια ακυλομάδα.⁵⁰ Οι ανθοκυανίνες απαντώνται στη φύση στα βατόμουρα, τα σμέουρα τις φράουλες τα κόκκινα σταφύλια κ.α. Αξίζει να σημειωθεί ότι η απορρόφηση των ανθοκυανίνων εξαρτάται από τη χημική τους δομή, δηλαδή από το σάκχαρο που περιέχουν, την ακυλομάδα και την αγλυκόνη. Η απορρόφησή τους μπορεί να γίνει σε όλη την έκταση του γαστρεντερικού σωλήνα και οι μεταβολίτες τους φαίνεται να έχουν ευεργετικές ιδιότητες για τον ανθρώπινο οργανισμό.⁵¹

2.2.1.2. Φλαβόνες:

Οι φλαβόνες αποτελούνται κυρίως από γλυκοζίτες της απιγενίνης και της λουτεολίνης. Τις φλαβόνες τις βρίσκουμε στα αρωματικά φυτά όπως το σέλινο και ο μαϊντανός αλλά και στα δημητριακά όπως το σιτάρι. Το δέρμα των εσπεριδοειδών περιέχει μεγάλες ποσότητες πολυμεθοξυλιωμένων φλαβόνων όπου αποτελούν τα πιο υδρόφοβα φλαβονοειδή.

Flavonoids	Polyphenols	Non- Flavonoids
 1. Anthocyanins (Pelargonidin) e.g. cyanidin, pelargonidin, peonidin, delphinidin, malvidin Source: red, blue and purple berries, red and purple grapes, red wine, cherry, rhubarb		A) Hydrobenzoic acids: protocatechuic acid, gallic acid, p-hydroxybenzoic acid Source: blackberry, raspberry, strawberry, black current B) Hydroxycinnamic acids: caffeic acid, chlorogenic acid, coumaric acid, ferulic acid, sinapic acid Source: blueberry, kiwi, cherry, plum, apple, pear, peach, chicory, artichoke, potato, coffee
 2. Flavonols (Quercetin) e.g. quercetin, kaempferol, myricetin Source: red cabbage, yellow onion, curly pale, cherry, tomato, broccoli, blueberry, apricot, apple, Black grape, green and black tea		
 3. Flavones (apigenin) e.g. apigenin, luteolin Source: parsley, celery, thyme, hot pepper		 Phenolic acids (caffeic acid)
 4. Flavanones (Naringenin) e.g. hesperitin, naringenin, eriocictyol Source: Citrus fruits and juices e.g. grapes and oranges		e.g. secoisolariciresinol, matairesinol Source: linseed, lentils, garlic, asparagus, carrots, pears, prunes 
 5. Isoflavones (Genistein) e.g. daidzein, genistein, glycitein Source: Soybeans, soy foods, legumes		Lignans (secoisolariciresinol)
 6A. Monomeric and polymeric flavonols (epicatechin) monomeric (catechins) e.g. catechin, epicatechin, epigallocatechin, epigallocatechin gallate Source: green and black tea, chocolates, grapes, berries, apples Dimers and polymers: e.g. theaflavins, thearubigins Source: black teas		 Stilbenes (resveratrol) e.g. resveratrol Source: grapes, pomegranate, groundnut
 6B. Proanthocyanidins Source: chocolate, apples, berries, red grapes, Red wine		

Εικόνα 2.1: Κύριες ομάδες πολυφαινολών με τις χαρακτηριστικές ενώσεις τους και οι πηγές τους στα τρόφιμα.⁴⁸

2.2.1.3. Φλαβονόλες:

Οι φλαβονόλες (3-υδροξυφλαβονες) είναι μια υποκατηγορία των φλαβονοειδών. Οι πιο γνωστές φλαβονόλες είναι η κερκετίνη και η καμφερόλη. Υπάρχουν σχεδόν σε όλα τα τρόφιμα σε μικρές συγκεντρώσεις. Στα τρόφιμα απαντώνται με τη γλυκοζυλιωμένη τους μορφή και οι πλουσιότερες πηγές είναι τα κρεμμύδια, τα πράσα το μπρόκολο, το τσάι και το κόκκινο κρασί.⁵²

2.2.1.4. Φλαβανόλες:

Οι φλαβανόλες υπάρχουν τόσο στη μονομερή μορφή (κατεχίνες) όσο και σε μορφή πολυμερούς (προανθοκυανιδίνες). Η κατεχίνη και η επικατεχίνη είναι οι πιο

γνωστές φλαβονόλες. Οι κατεχίνες βρίσκονται σε πολλά είδη φρούτων αλλά οι πλουσιότερες πηγές είναι η σοκολάτα και το πράσινο τσάι. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι κατεχίνες είναι εξαιρετικά σταθερές σε μεγάλες θερμοκρασίες εφόσον βρίσκονται σε όξινο pH. Σε αντίθεση με τις άλλες κατηγορίες φλαβονοειδών, οι φλαβανόλες δεν είναι απαντώνται στη γλυκοζυλιωμένη τους μορφή στα τρόφιμα.⁵²

2.2.1.5. Φλαβανόνες:

Οι φλαβανόνες βρίσκονται κυρίως στα εσπεριδοειδή και η εσπεριδίνη που βρίσκεται στα πορτοκάλια είναι αυτή που καταναλώνεται ευρέως.⁴⁸

2.2.1.6. Ισοφλαβόνες:

Οι ισοφλαβόνες βρίσκονται κυρίως στη σόγια. Στις ισοφλαβόνες ανήκει η γενιστεΐνη και η νταϊτζεΐνη. Αυτή η ομάδα των φαινολικών ενώσεων έχει λάβει ιδιαίτερη προσοχή λόγω των οιστρογονομιμητικών ιδιοτήτων.⁴⁸ Η ικανότητά τους να δεσμεύονται στους υποδοχείς των οιστρογόνων, οδήγησε στο να ταξινομηθούν ως φυτοοιστρογόνα. Αυτό που τους προσδίδει αυτή τους την ιδιότητα είναι το ότι έχουν ομάδες υδροξυλίου στις θέσεις 7' και 4' σε θέση ανάλογη με εκείνη του μορίου της οιστραδιόλης.⁵²

2.2.1.7. Προανθοκυανιδίνες ή ταννίνες:

Οι προανθοκυανιδίνες, οι οποίες είναι επίσης γνωστές ως συμπυκνωμένες ταννίνες. Οι ταννίνες χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: τις υδρολυομένες και τις μη υδρολυομένες ή συμπυκνωμένες ταννίνες. Η χημική δομή των υδατοδιαλυτών τανινών είναι μια πολυϋδρική αλκοόλη όπως η γλυκόζη και ομάδες υδροξυλίου, οι οποίες εστεροποιούνται είτε εν μέρει είτε εξ ολοκλήρου με γαλλικό οξύ (γαλοταννίνες) ή εξαϋδροξυ-διφαι-νικό οξύ (ελλαγitanνίνες). Οι συμπυκνωμένες ταννίνες είναι πιο πολύπλοκες δομικά από ότι οι υδατοδιαλυτές ταννίνες. Πρόκειται κυρίως για τα πολυμερισμένα προϊόντα φλαβανο-3-ολών και φλαβανο-3,4-διολών, ή ενός συνδυασμού και των δύο.

Οι τανίνες έχουν βρεθεί σε μια ποικιλία από τρόφιμα όπως στο κριθάρι, στα ξερά φασόλια, στα μήλα, στις μπανάνες, στις φράουλες, στα σταφύλια αλλά και στο τσάι και είναι αυτές που προσδίδουν τη στιφή και πικρή γεύση στα τρόφιμα.^{52,53}

2.2.2. Μη φλαβονοειδή

2.2.2.1 Φαινολικά οξέα

Ο όρος αυτός περιγράφει γενικά τις φαινόλες που έχουν μια χαρακτηριστική ομάδα καρβοξυλικού οξέος.⁵⁴ Τα φαινολικά οξέα χωρίζονται επιπλέον σε: βενζοϊκό οξύ και κινναμικό οξύ και στα παράγωγά τους. Τα βενζοϊκά οξέα έχουν επτά άτομα άνθρακα (C6-C1) και είναι τα απλούστερα φαινολικά οξέα που απαντώνται στη φύση. Τα κινναμικά οξέα έχουν εννέα άτομα άνθρακα (C6-C3).⁵⁵ Τα φαινολικά οξέα εκτός από ένα μικρό μέρος που απαντάται στη φύση σαν «ελεύθερα οξέα», τα περισσότερα από αυτά συνδέονται με δεσμούς ακετάλης, αιθέρα ή εστέρα είτε με άλλες πολυφαινόλες είτε με δομικά συστατικά του φυτού.⁵⁶ Τα πιο συχνά υδροξυκινναμικά οξέα που συναντάμε στη φύση είναι το καφεϊκό οξύ και το φερουλικό οξύ. Το καφεϊκό οξύ βρίσκεται σε πολλά φρούτα όπως το μήλο, το δαμάσκηνο, τη ντομάτα και το σταφύλι. Το φερουλικό οξύ βρίσκεται σε πηγές τροφίμων όπως το πίτουρο βρώμης.⁵⁵

2.2.2.2 Λιγνάνες:

Είναι διφαινολικές ενώσεις που περιέχουν μια δομή 2,3-διβενζυλβουτανίου που σχηματίζεται από τον διμερισμό δύο υπολειμμάτων κινναμικού οξέος.⁵⁵ Οι λιγνάνες μεταβολίζονται σε εντεροδιόλη και εντερολακτόνη από την εντερική μικροχλωρίδα. Η πλουσιότερη διαιτητική πηγή είναι ο λιναρόσπορος, ο οποίος περιέχει σεκοϊσολاريρεσινόλη και χαμηλή συγκέντρωση ματαϊρεσινόλης.⁵²

2.2.2.3 Στυλβένια:

Τα στυλβένια στα φυτά δρουν ως αντιμυκητιακές φυτοαλεξίνες, ενώσεις που συνήθως συντίθενται μόνο ως αντίδραση σε λοίμωξη ή τραυματισμό. Το πιο γνωστό

στιλβένιο είναι η trans-ρεβερατρόλη (3,5,4-τριυδροξυστυλβένιο), η οποία υπάρχει κυρίως στα σταφύλια και στο κρασί.⁵⁵ Ιδιαίτερη αναφορά στη ρεσβερατρόλη, που αποτελεί και το υπο εξέταση φαινολικό συστατικό στην παρούσα εργασία θα γίνει στο κεφάλαιο 3.

2.3 Βιολογικές Δράσεις Φαινολικών Ενώσεων

Όταν αναφερόμαστε στον όρο φαινολικές ενώσεις, μιλάμε για ένα τεράστιο εύρος οργανικών ουσιών, που όπως προείπαμε είναι οργανικές ενώσεις που περιέχουν ένα ιόν υδροξυλίου συνδεδεμένο σε ένα αρωματικό δακτύλιο. Οι βιολογικές ιδιότητες των φαινολικών ενώσεων είναι πολλές. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν από τη βιομηχανία ως χρωστικές ουσίες ή στα αρώματα αλλά και σε σηματοδοτικά μόρια. Οι πολυφαινόλες προσλαμβάνονται μέσω της διατροφής και βρίσκονται σε όλα τα φυτά και αυτό τις καθιστά πολύ εύκολα προσβάσιμες. Τα τελευταία χρόνια έχει φανεί ότι οι φαινολικές ενώσεις εκτός από την αντιοξειδωτική τους δράση εμφανίζουν και άλλες βιολογικές δράσεις και δρουν ευεργετικά έναντι διαφόρων παθήσεων όπως ο καρκίνος, τα καρδιαγγειακά νοσήματα κ.α.⁵⁷

2.3.1 Αντιοξειδωτική Δράση

Από τις φαινολικές ενώσεις αυτές που παρατηρείται ότι έχουν αντιοξειδωτική δράση είναι τα φλαβονοειδή. Παρεμβαίνουν σε διάφορους μηχανισμούς όπως με το να αναστέλλουν ένζυμα ή δημιουργώντας χηλικά σύμπλοκα με παράγοντες που εμπλέκονται στη παραγωγή ελευθέρων ριζών. Έχουν επίσης τη δυνατότητα να ενισχύουν τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς του οργανισμού αλλά και να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες που έχουν παραχθεί.^{58,59} Αυτό που προσδίδει την αντιοξειδωτική δράση στα φλαβονοειδή είναι ο σχηματισμός Β δακτυλίου και η ύπαρξη του υδροξυλίου που είναι σημαντικός για την απομάκρυνση των ελευθέρων ριζών οξυγόνου και αζώτου (ROS, RNS) παρέχει ένα υδρογόνο και επομένως και ηλεκτρόνιο σε ρίζες υδροξυλίου, υπεροξυλίου και υπεροξυνιτριλίου, σταθεροποιώντας τις με αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας σχετικά σταθερής ρίζας φλαβονοειδών.⁶⁰

2.3.2 Αντιφλεγμονώδης δράση

Οι φαινολικές ενώσεις φαίνεται να επηρεάζουν θετικά και το ανοσοποιητικό σύστημα. Τα φλαβονοειδή φαίνεται ότι μπορούν να επηρεάσουν τους μηχανισμούς που εμπλέκονται στη φλεγμονώδη διαδικασία και πιο συγκεκριμένα τις κινάσες τυροσίνης και σερίνης-θρεονίνης.⁶¹ Τα φλαβονοειδή δρουν ανταγωνιστικά με το ATP και προσδένονται στις καταλυτικές θέσεις των ενζύμων και αναστέλλουν τη δράση τους. Τα ένζυμα αυτά ενεργοποιούν κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Τα φλαβονοειδή όπως η λουτεολίνη, η κερκετίνη και η απιγενίνη φαίνεται να αναστέλλουν τη συνθάση του νιτρικού οξειδίου, τη λιποοξυγενάση και τη κυκλοοξυγενάση ένζυμα τα οποία παράγουν νιτρικό οξύ, κυτοκίνες, χημειοκίνες.⁶² Επίσης φαίνεται ότι τα φαινολικά αναστέλλουν τα ένζυμα βιοσύνθεσης του RAF σε καλλιέργειες μονοκυττάρων τόσο σε βασικά επίπεδα όσο και σε κατάσταση φλεγμονής.⁶³

2.3.3 Αντ αιμοπεταλιακή δράση

Τα φλαβονοειδή αναστέλλουν την κυκλοοξυγονάση και μειώνουν την παραγωγή θρομβοξανθίνης A_2 . Οι πολυφαινόλες του κόκκινου κρασιού μειώνουν επίσης την παραγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου και αναστέλλουν την ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C και της πρωτεϊνικής κινάσης C.⁶⁴ Η κερκετίνη επίσης φαίνεται να μειώνει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων που οφείλεται από το κολλαγόνο.⁶⁵ Στη μείωση της παραγωγής θρομβοξανθίνης φαίνεται να μπορούν να συμβάλλουν και η απιγενίνη αλλά και η γενιστεΐνη.⁶⁶

Η κουρκουμίνη είναι βασικό συστατικό του κουρκουμά (*Curcuma longa*). Φαίνεται πως κι αυτή με τη σειρά της αναστέλλει την αιμοπεταλιακή συσσώρευση που προκαλείται από τον παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF) και το αραχιδονικό οξύ αναστέλλοντας τη TXA₂ και τη κινητοποίηση του Ca^{2+} . Και στη συγκεκριμένη περίπτωση η ευεργετική δράση της κουρκουμίνης έγκειται στην αύξηση της έκφρασης του PPAR- γ .⁶⁷

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

ΡΕΣΒΕΡΑΤΡΟΛΗ ΚΑΙ ΟΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ ΤΗΣ

3. 1 Εισαγωγή

Η ένωση ρεσβερατρόλη (resveratrol, RVT) είναι μια φυσική ουσία της κατηγορίας των φυτοαλεξινών (phytoalexins) με βασική δομή των στιλβενίων [Στιλβένιο: 1,2-διφαινυλο-αιθυλένιο]⁶⁸ Η ρεσβερατρόλη συντίθεται στα φυτά ως αμυντικός μηχανισμός για την αντιμετώπιση δυσμενών περιβαλλοντικών παραγόντων για το φυτό. Ενώσεις όπως η ρεσβερατρόλη στα φυτά, συμμετέχουν ενεργά στην αντιοξειδωτική άμυνά τους και στην πρόληψη εξωγενών βλαβών όπως η έλλειψη νερού, τα έντομα, οι μύκητες, η έκθεση σε τοξικές ουσίες ή λόγω συνθηκών π.χ. χαμηλές θερμοκρασίες έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία κ.λ.π (γι αυτό η ρεσβερατρόλη βρίσκεται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις σε σταφύλια ψυχρών περιοχών)⁶⁹

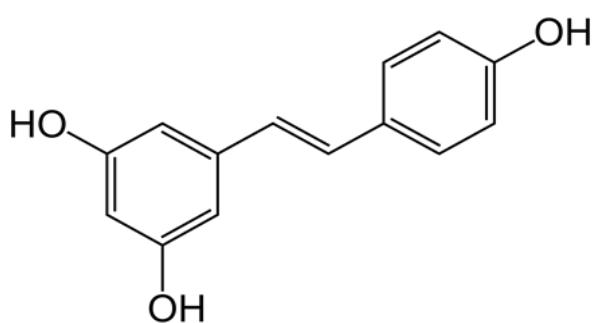
Με τον τρόπο αυτό τα φυτά προστατεύουν από οξειδωτικές βλάβες τα βασικά τους βιομόρια, όπως πρωτεΐνες, σάκχαρα, λιπίδια μεμβρανών των κυττάρων και το DNA των κυττάρων⁷⁰ Το στιλβένιο αυτό απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1939 από τις ρίζες του φυτού Ελλέβορος ο λευκός (Veratrum grandiflorum) και πιθανώς έλαβε το όνομά της από το γεγονός ότι είναι παράγωγο του βενζολο-1,3-διόλη ρεσορκινόλης και απομονώθηκε από τα είδη Veratrum Takaoaka. Ακολούθως, η ρεσβερατρόλη απομονώθηκε από αρκετά άλλα φυτά, και φρούτα.

Η RVT βρίσκεται κυρίως σε υψηλές συγκεντρώσεις στη φλούδα των σταφυλιών και ιδιαίτερα των κόκκινων σταφυλιών, στα φύλλα ευκαλύπτου και ελάτου, στους ξηρούς καρπούς, στα μούρα (mulberries, blueberries, cranberries, bilberries) και σε μικρότερες ποσότητες έχει βρεθεί σε 70 ακόμη φυτικά προϊόντα. Η ρεσβερατρόλη βρίσκεται σε μεγαλύτερα ποσοστά στους φλοιούς, τους σπόρους και τους μίσχους των σταφυλιών. Τα κόκκινα κρασιά περιέχουν αισθητά μεγαλύτερα ποσά ρεσβερατρόλης από ότι τα λευκά, διότι κατά την παραγωγή ερυθρού οίνου η ζύμωση γίνεται μαζί με τα στέμφυλα. Το κόκκινο κρασί φαίνεται να είναι η πλουσιότερη πηγή ρεσβερατρόλης. Μεταξύ των πολυφαινολών που υπάρχουν στο

το κρασί, ειδικά το κόκκινο κρασί, η ρεσβερατρόλη έχει τραβήξει σημαντικά προσοχή.

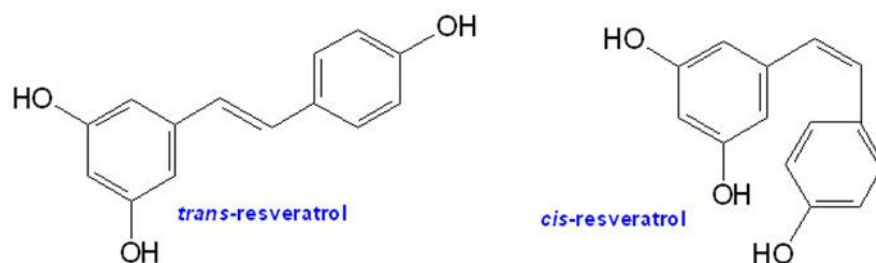
Η περιεκτικότητα στη φλούδα φρέσκων των κόκκινων σταφυλιών σε ρεσβερατρόλη είναι 50-100 $\mu\text{g/g}$, ενώ στο κόκκινο κρασί μπορεί να βρεθεί σε συγκεντρώσεις 1,5-3 mg/L . Η ρεσβερατρόλη, όπως και άλλες φυτο-αντιοξειδωτικές ουσίες, αποτελεί φυσικό συστατικό των φυτών με αντιβιοτική δράση για την προστασία από μύκητες και οξειδωτικές βλάβες. Το λευκό κρασί περιέχει ρεσβερατρόλη, αλλά σε μικρότερες ποσότητες, γιατί η ζύμωση του κρασιού διεξάγεται μετά την απομάκρυνση των φλοιών των σταφυλιών.⁷¹

Παρόλο που τα φυτά που περιέχουν ρεσβερατρόλη έχουν χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά στην παραδοσιακή ιατρική για πάνω από 2000 χρόνια ⁶³⁻, το ενδιαφέρον τον ερευνητών αυξήθηκε μετά το "Γαλλικό παράδοξο". Ο όρος δημιουργήθηκε το 1992 με βάση τα επιδημιολογικά δεδομένα από τους Γάλλους που είχαν χαμηλή συχνότητα εμφάνισης των καρδιακών παθήσεων παρά την κατανάλωση τροφίμων υψηλής περιεκτικότητας σε κορεσμένα λιπαρά.⁷² Η δομή της ρεσβερατρόλης είναι 3,5,4' τριυδροξυστυλβένιο. Η βασική της δομή συνίσταται από δύο φαινολικούς δακτυλίους συνδεδεμένους μεταξύ τους με ένα διπλό στυρόλιο δεσμό, ο οποίος σχηματίζει το 3,5,4-Τριυδροξυστυλβένιο (μοριακό βάρος 228,25 g / mol). ΣΧΗΜΑ 1 Αυτός ο διπλός δεσμός είναι υπεύθυνος για τις ισομετρικές cis- και trans-μορφές της ρεσβερατρόλης.



Εικόνα 3.1 Δομή ρεσβερατρόλης.⁷³

Η ρεσβερατρόλη παρουσιάζεται σε cis / trans ισομερή , τα οποία και τα δύο μπορεί να είναι γλυκοζυλιωμένα αλλά το trans ισομερές είναι το βιολογικώς ενεργό.⁷²



Εικόνα 3.2.: cis/trans ισομερή της ρεσβερατρόλης.⁷³

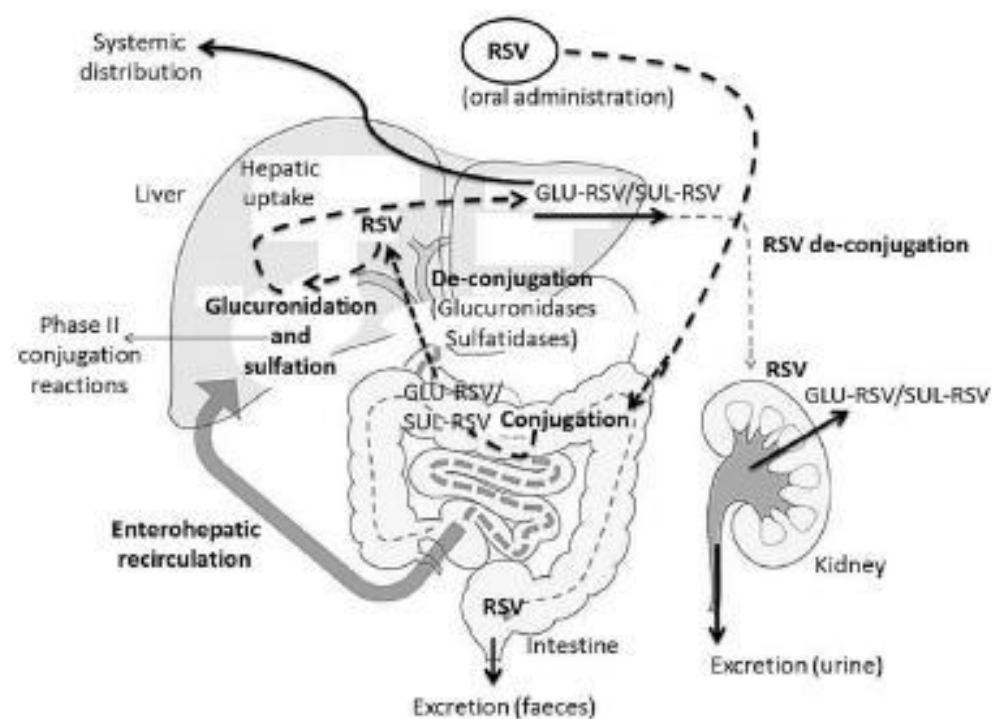
3.2. Βιοδιαθεσιμότητα Ρεσβερατρόλης

3.2.1 Απορρόφηση

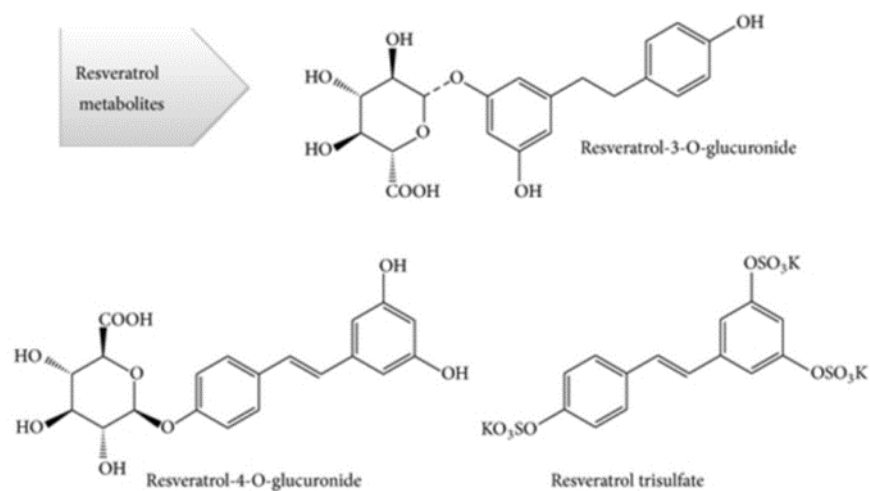
Η δομή της ρεσβερατρόλης είναι τέτοια που δεν της επιτρέπει να είναι εύκολα απορροφήσιμη και αυτό συμβαίνει διότι δεν είναι υδατοδιαλυτή (<0,05 mg / mL). Φαίνεται όμως πως με γλυκοζυλίωση ή ακετυλίωση γίνεται πιο εύκολα απορροφήσιμη στο γαστρεντερικό σωλήνα.⁷⁴ Η απορρόφηση της ρεσβερατρόλης γίνεται στο έντερο με ενεργή μεταφορά ή παθητική διάχυση, είτε μέσω σχηματισμού συμπλόκου με μεμβρανικούς υποδοχείς(π.χ. ιντεγκρίνες). Μετά την απορρόφηση της η ρεσβερατρόλη θα εξέλθει στη κυκλοφορία είτε ως γλυκουρονίδιο, είτε ως θειϊκό άλας είτε σε ελεύθερη μορφή. Η ελεύθερη μορφή της συνήθως συνδέεται με την αλβουμίνη ή με την LDL (λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας)⁷⁵ Λόγω της λιπόφιλης δομής της η ρεσβερατρόλη, αλληλεπιδρά πιο εύκολα με τα λιπαρά οξέα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός λιπόφιλου περιβάλλοντος το οποίο ευνοεί αρχικά τη σύνδεση της ρεσβερατρόλης αλλά και την απορρόφηση της από τα ηπατικά κύτταρα λόγω της υψηλής συγγένειας της με τις λιποπρωτεΐνες στο ήπαρ.

3.2.2 Μεταβολισμός

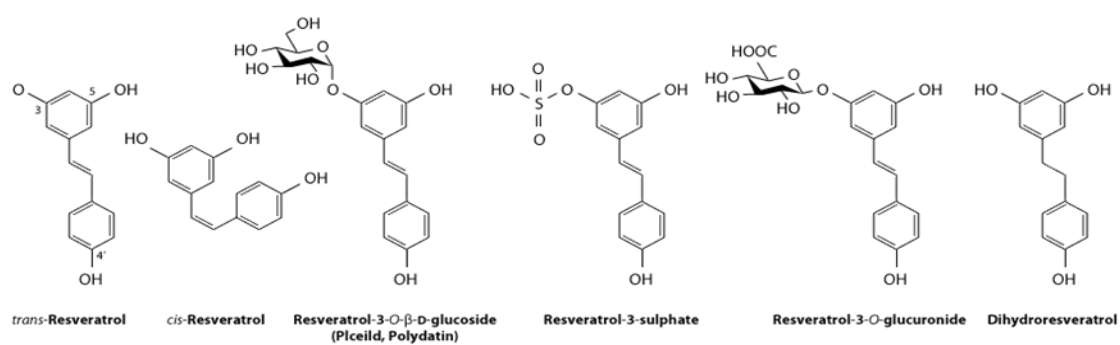
Μετά την απορρόφησή της ρεσβερατρόλης από τα ηπατοκύτταρα έπεται ο μεταβολισμός της, από τα ένζυμα της φάσης II με αποτέλεσμα τη παραγωγή θεικών και γλυκουρονικών μεταβολιτών. Υπάρχει εντεροηπατική μεταφορά στη χολή, πιθανώς λόγω κάποιων κύκλων ανακύκλωσης στο λεπτό έντερο. Εικόνα 3.3 Οι μεταβολίτες που έχουν αναγνωριστεί στο πλάσμα και στα ούρα των ανθρώπων είναι οι εξής: resveratrol-3-sulfate (Res-3-sulf, R3S), resveratrol-3,5-disulfate, resveratrol-3,4-disulfate (Res-disulfates, RDS), resveratrol-4-sulfate, resveratrol-3-glucuronide (Res-3-gluc, R3G) and resveratrol-4-glucuronide (Res-4-gluc, R4G).⁷⁶ Οι μεταβολίτες Cis έχουν ταυτοποιηθεί σε ανθρώπινα ούρα κυρίως ως θεική cis-ρεσβερατρόλη-4', cis-ρεσβερατρόλη-3-O-γλυκουρονίδιο και cis-ρεσβερατρόλη-4'-O-γλυκουρονίδιο.



Εικόνα 3.3. Σχηματοποιημένος μεταβολισμός της ρεσβερατρόλης (RSV) του γλυκουρονιδίου της ρεσβερατρόλης (GLU-RSV) και σουλφονίδιο της ρεσβερατρόλης (SUL RSV)⁷⁷



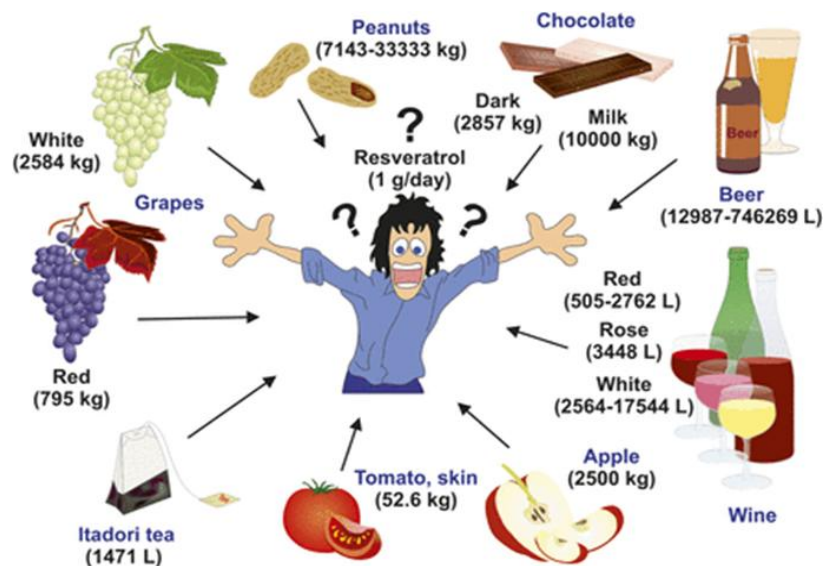
Εικόνα 3.4: Χημική δομή των γλυκουρονιδίων της ρεσβερατρόλης⁷⁸



Εικόνα 3.5: Τρανς-Ρεσβερατρόλη και σχετικές δομές⁷⁹

3.2.3 Βιοδιαθεσιμότητα

Ως βιοδιαθεσιμότητα ορίζουμε το κατά πόσο η θρεπτική ουσία που προσλαμβάνουμε μπορεί να αφομοιωθεί, απορροφηθεί και μεταβολιστεί μέσω των φυσιολογικών οδών.⁸⁰ Όπως προαναφέρθηκε εκτός από τις αγλυκάνες οι οποίες απορροφώνται στο λεπτό έντερο, οι υπόλοιπες φαινολικές ενώσεις είναι σε μορφή εστέρων και έτσι απορροφώνται διαφορετικά από τον οργανισμό. Για να μπορέσουν να απορροφηθούν πρέπει να υδρολυθούν από κάποια ένζυμα ή από την εντερική μικροχλωρίδα. Οι φαινολικές ενώσεις μεταβολίζονται στο ήπαρ από τα ένζυμα της φάσης II με αντιδράσεις σύζευξης. Τα προϊόντα των αντιδράσεων της φάσης I αποτελούν τα υποστρώματα για τις αντιδράσεις της φάσης II. Οι αντιδράσεις αυτές περιλαμβάνουν το σχηματισμό γλυκουρονικού οξέος, γλυκοζιτών, θειικού άλατος αλλά και σύζευξη με αμινοξέα.⁷⁶ Μόλις βγουν στη κυκλοφορία οι μεταβολίτες των πολυφαινολών δεσμεύονται με την αλβουμίνη.⁸¹ Παρόλο που η απορρόφηση της ρεσβερατρόλης είναι ικανοποιητική η βιοδιαθεσιμότητά της είναι χαμηλή. Παρόλα αυτά *in vitro* μελέτες αναφέρουν πως οι ευεργετικές επιδράσεις της ρεσβερατρόλης στα κύτταρα είναι αρκετά ικανοποιητικές ανεξάρτητα από το γεγονός ότι η κατανομή της στους ιστούς είναι χαμηλή. Μάλιστα έχει φανεί από ανεξάρτητες μελέτες, ότι η καθημερινή κατανάλωση ρεσβερατρόλης σε συγκεντρώσεις των 700-1000 mg / kg σωματικού βάρους είναι θεραπευτική και καλά ανεκτή χωρίς τοξικολογικές επιδράσεις και ότι οι συγκεντρώσεις <2g/d είναι ακίνδυνες για μικρό χρονικό διάστημα. Στη πράξη όμως είναι δύσκολο να φτάσεις στο 1g ρεσβερατρόλης μόνο από τα τρόφιμα. Στη παρακάτω εικόνα παρουσιάζεται η ποσότητα τροφίμων που πρέπει να καταναλωθεί για να προσλάβουμε 1g ρεσβερατρόλης.



Εικόνα 3.6: Ποσότητες τροφίμων και ποτών που πρέπει να καταναλώνονται για την επίτευξη θεραπευτικών δόσεων ρεσβερατρόλης.⁸²

Είναι προφανές λοιπόν ότι είναι ανέφικτο να καταναλώσουμε τόσο μεγάλη ποσότητα τροφίμων, οπότε οι επιστήμονες έστρεψαν τη προσοχή τους στους μεταβολίτες της. Στο ανθρώπινο πλάσμα η θεική ρεσβερατρόλη βρέθηκε να είναι ο κύριος μεταβολίτης κατά τη πρόσληψη ρεσβερατρόλης από το στόμα.⁸³ Αυτή η θείωση θεωρείται ότι αποτελεί τον κύριο περιοριστικό παράγοντα για τη βιοδιαθεσιμότητα της ένωσης. Τα θειικά επίσης βρέθηκαν να είναι οι κυρίαρχοι μεταβολίτες ρεσβερατρόλης σε καλλιέργεια καρκινικών κύτταρων Caco-2 ανθρώπου, αλλά ο σχηματισμός τους θα μπορούσε να ανασταλεί από την ίδια ρεσβερατρόλη⁸⁴

Η σουλφοτρανσφεράση 1A1 ευθύνεται για το σχηματισμό 3-O-θεικών ενώ οι μεταβολίτες αυτοί δείχνουν να έχουν μειωμένη αντικαρκινική δράση σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του μαστού σε σύγκριση με την ρεσβερατρόλη (Murias et al., 2008). Έχει φανεί ότι η μεθυλίωση της ρεσβερατρόλης προκαλεί αύξηση της βιοδιαθεσιμότητάς.⁸⁵ Για να αυξηθεί η δραστηριότητα, έχουν συντεθεί διάφορα ανάλογα ρεσβερατρόλης. Οι ερευνητές έχουν διερευνήσει τη σχέση δομής-δράσης αλλάζοντας τον αριθμό και τη θέση των ομάδων υδροξυλίου. Η αντικατάσταση της υδροξυλομάδας με μεθοξυλομάδα φαίνεται να αυξάνει την λιποφιλικότητα του μεταβολίτη και αυτό να οδηγεί σε πιο υψηλή βιοδιαθεσιμότητα. Το πτεροστιλβένιο

όπου είναι η 3,5, διμέθυλο ρεσβερατρόλη αποτελεί παράδειγμα υψηλής βιοδιαθεσιμότητας.⁸⁶

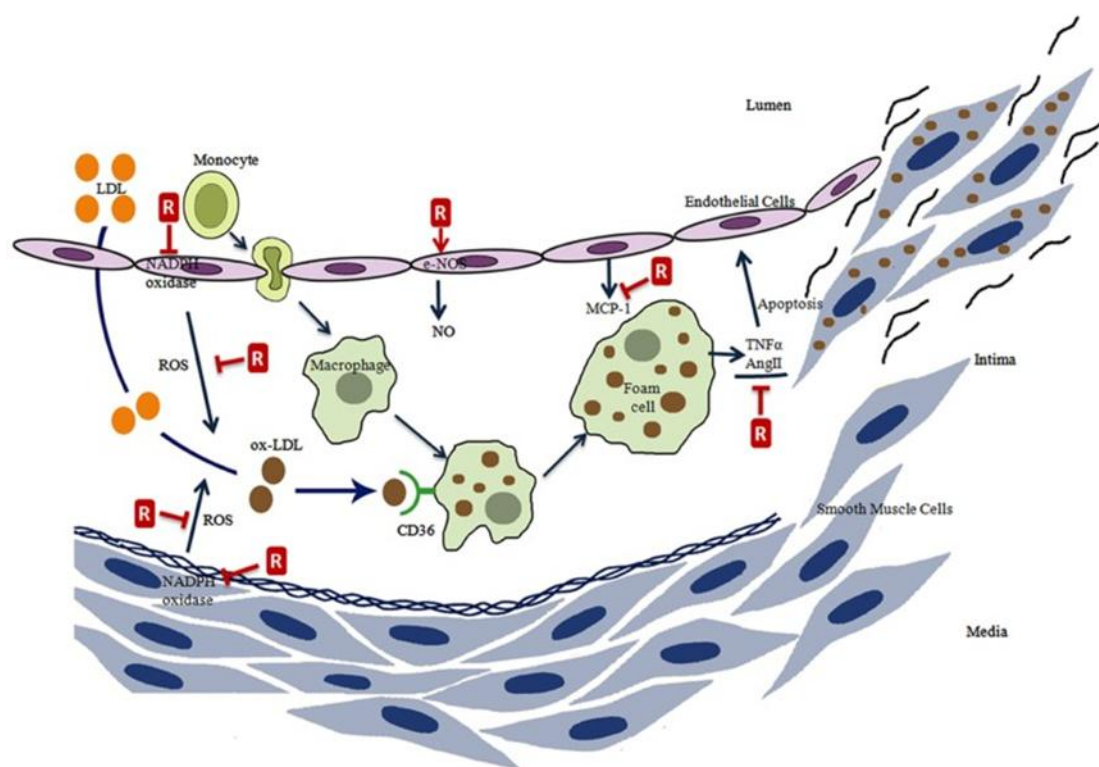
3.3. Βιολογικές δράσεις Ρεσβερατρόλης-Αντιαιμοπεταλιακή δράση

Η ρεσβερατρόλη φαίνεται να έχει αρκετές βιολογικές δράσεις. Έχει θετική επίδραση στην εμφάνιση καρδιαγγειακών και νευροεκφυλιστικών παθήσεων αλλά και στη πρόληψη κάποιων ειδών καρκίνου. Η αύξηση του αριθμού των ομάδων υδροξυλίου στους δακτυλίους της φαινόλης αποδείχθηκε ότι αναστέλλει την ανάπτυξη ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων. Επίσης, τα ανάλογα 3,3',4',5-τετραϋδροξυ-τρανστυλβένιο, 3,4,4',5-τετραϋδροξυ-τρανστυλβένιο και 3,3', 4,4', 5,5'- εξαϋδροξυ-trans-στυλβένιο έδειξαν σχεδόν 7000 φορές μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση σε σύγκριση με την ρεσβερατρόλη. Το εξαϋδροξυστυλβένιο, M8, ταυτοποιήθηκε ως το πλέον αποτελεσματικό ανάλογο σε διάφορες κυτταρικές σειρές όγκου επειδή φάνηκε να έχει αυξημένη αντιοξειδωτική και αντιμεταστατική δράση.⁸⁷ Η ενεργοποίηση και η συσσώρευση των αιμοπεταλίων αποτελεί παράγοντα της δημιουργίας αθηρωμάτωσης. Η ρεσβερατρόλη φαίνεται να αναστέλλει την έκκριση του ADP και του ATP των αιμοπεταλίων που επάγεται από τη θρομβίνη.⁸⁸ Η ρεσβερατρόλη φαίνεται επίσης να επεμβαίνει στην αύξηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου όπου είναι σημαντικό σηματοδοτικό μόριο για να ξεκινήσει η συσσώρευση των αιμοπεταλίων.⁸⁹ Ο παράγοντας πήξης αιμοπεταλίων(PAF) συμβάλλει κι αυτός στη συσσώρευσή των αιμοπεταλίων. Έρευνα έδειξε ότι και η ρεσβερατρόλη αναστέλλει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων που προκαλεί ο PAF σε αιμοπετάλια που προέρχονται από αίμα κουνελιών.⁹⁰

Η ρεσβερατρόλη φαίνεται να καταστέλλει τη δράση της κυκλοοξυγενάσης -1(COX-1) των αιμοπεταλίων η οποία καταλύει το σχηματισμό TxA2 η οποία είναι ένας ισχυρός αγγειοσυσταλτικός παράγοντας και επάγει τη συσσώρευση των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων. Δε φαίνεται να έχει όμως την ίδια δράση στην κυκλοοξυγενάση -2(COX-2) η οποία βρίσκεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα και επάγει τη σύνθεση της PGI2 όπου είναι ένας αντιθρομβωτικός ισχυρός αγγειοδιασταλτικός παράγοντας.^{91,92}

Το NO όταν αντιδρά με το ανιόν υπεροξειδίου (O_2^-) παράγει υπεροξυνιτρίδιο ($ONOO^-$) ένα εξαιρετικά δραστικό, βραχύβιο οξειδωτικό, το οποίο μπορεί να τροποποιεί διάφορους τύπους βιομορίων (DNA, λιπίδια και πρωτεΐνες) και μπορεί να προάγει την οξείδωση των ιστών και την κυτταρική τους βλάβη. Αποτελέσματα προηγούμενων ερευνών έδειξαν πως αναστέλλεται η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων (προσκόλληση, συσσώρευση και απελευθέρωση ουσιών) όταν εκτίθενται στο $ONOO^-$. Αυτό συμβαίνει διότι το $ONOO^-$ υπεροξειδώνει τα λιπίδια των μεμβρανών των αιμοπεταλίων, αντιδρά με τις θειόλες και επάγει τροποποιήσεις πρωτεϊνών όπως νίτρωση στη θέση της τυροσίνης. Φάνηκε λοιπόν ότι η ρεσβερατρόλη (0.1 mmol/l) προστατεύει τα κύτταρα ενάντια στην οξείδωση.⁹³

Μια άλλη μελέτη έδειξε πως χορήγηση ρεσβερατρόλης (4 mg/kg/ημέρα) σε κουνέλια που τρέφονταν με τρόφιμα υψηλής περιεκτικότητας σε χοληστερίνη προκάλεσε μείωση κατά 35% στο μέσο ρυθμό συσσώρευσης των αιμοπεταλίων που προκλήθηκε από ADP (PAR), το οποίο δεν φάνηκε να συμβαίνει στα ζώα που τρέφονταν με κανονική διατροφή. Σε άλλη *in vitro* μελέτη παρατηρήθηκε ότι 10-100 gr/lιτ ρεσβερατρόλης ανέστειλαν την συσσώρευση αιμοπεταλίων σε αίμα υγιών ατόμων στο οποίο προκλήθηκε συσσώρευση των αιμοπεταλίων με την προσθήκη 5 mg/ml κολλαγόνο, 0.33 units/ml θρομβίνης, και 4 μ M ADP. Σε *in vivo* μελέτη σε υπερχοληστεριναιμικά κουνέλια η συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων αναστάλη όταν τα κουνέλια έλαβαν ρεσβερατρόλη ενδογαστρικά (4 ml/kg/ημέρα). Η μείωση ήταν κατά 35% στο μέσο ρυθμό συσσώρευσης των αιμοπεταλίων που προκαλείται από ADP (PAR), σε σχέση με τα ζώα τα οποία είχαν κανονική διατροφή. Τέλος η ρεσβερατρόλη φαίνεται να αυξάνει την αντίσταση του αγγειακού οξειδωτικού στρες με την απομάκρυνση του H_2O_2 και την πρόληψη της απόπτωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων που προκαλείται από το οξειδωτικό στρες και προτάθηκε ότι τα αντιοξειδωτικά και αντι-αποπτωτικά αποτελέσματα της ρεσβερατρόλης είναι υπεύθυνα, τουλάχιστον εν μέρει, για τα καρδιοπροστατευτικά αποτελέσματα της.⁹⁴



Εικόνα 3.7.: Δράση της Ρεσβερατρόλης σε μοριακό επίπεδο⁸⁷

3.4. Βιολογικές Δράσεις Μεταβολιτών Ρεσβερατρόλης – Αντιαιμοπεταλιακή δράση

Τα τελευταία χρόνια εξετάζεται η υπόθεση ότι ενδεχομένως οι μεταβολίτες της ρεσβερατρόλης να είναι εκείνοι που της προσδίδουν τις ευεργετικές της ιδιότητες.

Μέχρι στιγμής δεν υπάρχουν αρκετές έρευνες που να έχουν μελετήσει εκτεταμένα τους μεταβολίτες της ρεσβερατρόλης *in vivo*. Σε μελέτες όμως που έχουν γίνει φαίνεται ότι οι μονοθεϊκοί μεταβολίτες της έχουν ίδια ή μεγαλύτερη ισχύ από τη ρεσβερατρόλη έναντι συγκεκριμένων μοριακών στόχων, όπως είναι η κυκλοοξυγενάση (COX), η αναγωγάση κινόνης 1 (NQO1) και ο μεταγραφικός NFκB.⁹⁵ Πιο συγκεκριμένα, το 4'-Ο-σουλφίδιο της ρεσβερατρόλης μπορεί να δεσμεύει τις θέσεις των ενζύμων της κυκλοοξυγενάσης (COX) και να παρεμποδίζει τη δραστηριότητά τους όπως και του NF-kB, με σχεδόν την ίδια αποτελεσματικότητα

όπως η ρεσβερατρόλη. Το 3-O-σουλφίδιο της ρεσβερατρόλης αναστέλλει την COX-1 και παρέχει προστασία απέναντι στη κυτταροτοξικότητα.

Η πικεατανόλη (piceatannol 3,5,3', 4'-τετραϋδροξυστυλβένιο) είναι μια πολυφαινόλη που βρίσκεται στα σταφύλια και άλλα φυτά και διαφέρει από την ρεσβερατρόλη μόνο ως προς τη μία πρόσθετη υδροξυλομάδα στην 3η θέση του βενζοϊκού δακτυλίου (σχήμα 1). Στον άνθρωπο, η πικεατανόλη παράγεται ως κύριος μεταβολίτης της ρεσβερατρόλης από τα CYP1B1 και CYP1A2. Μπορεί επίσης να βρεθεί ως προϊόν οξείδωσης της ρεσβερατρόλης σε υδατικά διαλύματα που υποβλήθηκαν σε ακτινοβολία γάμμα για να δημιουργήσουν HO[•]/O₂⁻ σε οξειδωτικές στρες *in vivo*. Εμφανίζει αντικαρκινικές ιδιότητες προκαλώντας εξωγενείς και ενδογενείς διαδρομές κυτταρικού θανάτου και αναστέλλοντας την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου. Τα σουλφιδικά παράγωγα της ρεσβερατρόλης φαίνεται να έχουν και χημειοπροστατευτική δράση έναντι του καρκίνου. Σε καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου, η 3-O-θειικό ρεσβερατρόλη, φαίνεται να αναστέλλει το πολλαπλασιασμό των κυττάρων διακόπτοντας τον κυτταρικό κύκλο. Συνολικά, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι οι θεικοί μεταβολίτες είναι λιγότερο δραστικοί από την ρεσβερατρόλη με εξαίρεση τη 3-θειική ρεσβερατρόλη. Γενικά, η δραστηριότητα των θεικών μεταβολιτών μειώνεται όσο αυξάνεται ο βαθμός θείωσης.

Μια άλλη ευεργετική επίδραση της ρεσβερατρόλης είναι ότι μειώνει την έκφραση και έκκριση της λεπτίνης και αυξάνει την έκφραση της αδιπονεκτίνης τόσο σε *in vitro* όσο και *in vivo* μελέτες. Εκτός από τη ρεσβερατρόλη και οι μεταβολίτες αυτής εμπλέκονται, σε μεγαλύτερο ή μικρότερο βαθμό, στην επίδραση κατά της παχυσαρκίας. Αξίζει να σημειωθεί ότι η ρεσβερατρόλη και οι μεταβολίτες της μείωσαν την έκφραση του CEBPβ, ενός γονιδίου που εμπλέκεται στη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων. Οι αδιποκίνες εκτός από τη ρύθμιση της πρόσληψης τροφής και της κατανομής του λίπους συμβάλλει και στη καλή λειτουργία της ινσουλίνης, έμμεσα λοιπόν η ρεσβερατρόλη και οι μεταβολίτες της επηρεάζουν και την ευαισθησία της ινσουλίνης.⁹⁶

Τέλος, όσον αφορά τους μεταβολίτες της ρεσβερατρόλης με γλυκουρονικό δεν έχει φανεί ότι έχουν κάποια βιολογική δράση. Ωστόσο, ακόμη και αν δεν έχουν

από μόνα τους βιολογική δράση, μπορούν παρ'όλα αυτά να αποτελέσουν in vivo αποθήκη ρεσβερατρόλης που μπορεί να κινητοποιηθεί με τη δράση της β-γλυκουρονιδάσης.⁷⁵

Σκοπός της Διατριβής

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να εξεταστεί η επίδραση των μεταβολιτών /μεθυλιωμένων παραγώγων της ρεσβερατρόλης στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων.

Μεθοδολογία

4.1 Ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν και χημική σύνθεση τους

Οι φαινολικές ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν είναι η ρεσβερατρόλη της οποίας χρησιμοποιήθηκαν 2 παράγωγα, ένα από τη φαρμακευτική σχολή Αθηνών και το άλλο από την εταιρεία Sigma, και τα μεθυλιωμένα παράγωγα της (3-Μέθυλο-Ρεσβερατρόλη, 4 Μεθυλο-Ρεσβερατρόλη, 3,4' Μέθυλο-Ρεσβερατρόλη, 3,5ΜέθυλοΡεσβερατρόλη και 3,4',5 Μέθυλο-Ρεσβερατρόλη). Η χημική σύνθεση των μεταβολιτών της ρεσβερατρόλης έγινε στο τμήμα φαρμακευτικής του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών σε συνεργασία με τον κύριο Ιωάννη Κωστάκη, Επίκουρο Καθηγητή του Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας.

4.2.Παρασκευή της συγκέντρωσης των ενώσεων που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη πειραματική διαδικασία

Όργανα που χρησιμοποιήθηκαν:

1. Αναλυτικός ζυγός ακριβείας
2. Σπάτουλα ζύγισης
3. Σωλήνες Eppendorf
4. Αναδευτήρας Vortex

Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν:

1. DMSO
2. Ρεσβερατρόλη και οι μεταβολίτες της.

4.2.1 Διαδικασία παρασκευής των διαλυμάτων

Στο πείραμα οι συγκεντρώσεις τις οποίες θέλαμε να μελετήσουμε κυμαίνονταν από 7 – 70 mM και όπου κρίθηκε απαραίτητο αραιώσαμε μέχρι 0.4 mM. Για να παρασκευάσουμε λοιπόν αυτά τα διαλύματα ζυγίσαμε τη κατάλληλη ποσότητα τις εκάστοτε φαινολικής ένωσης τη μεταφέραμε σε Eppendorf και στη συνέχεια προσθέσαμε τον διαλύτη που στη συγκεκριμένη περίπτωση ήταν το DMSO και αναδεύσαμε το διάλυμα στο vortex μέχρι να διαλυθεί τελείως. Τα διαλύματα

αυτά αποθηκεύονταν στη κατάψυξη και όταν έπρεπε να χρησιμοποιηθούν κατά τη διάρκεια του πειράματος σκεπάζονταν για να διατηρούνται σε σκιερό περιβάλλον λόγω του γεγονότος ότι είναι φωτοευαίσθητες.

4.3 Απομόνωση πλάσματος πλούσιο σε αιμοπετάλια(PRP)

Υλικά

1. πεταλούδα των 21g
2. Πλαστικοί σωλήνες των 15ml, 50 ml
3. Αυτόματος αναλυτής αίματος AutoHematology Analyzer BC-3000 plus, Mindray
4. Φυγόκεντρος 5810 R Eppendorf
5. Φωτόμετρο Novaspec II, Pharmacia Biotech

Αντιδραστήρια

1. Αντιπηκτικό διάλυμα κιτρικού οξέος 0,105 M

4.3.1 Διαδικασία απομόνωσης PRP

Για την απομόνωση του πλάσματος προετοιμάσαμε τέσσερις σωλήνες falcon των 15ml με 1,5ml αντιπηκτικό, το οποίο στη περίπτωση μας ήταν το κιτρικό με συγκέντρωση 0,105M και pH 7,4. Στη συνέχεια προστέθηκε το αίμα και φυγοκεντρήθηκε για 15' στις 1300 στροφές χωρίς επιβράδυνση ή επιτάχυνση.

4.3.2 Διαδικασία απομόνωσης PPP

Μετά τη φυγοκέντρωση του πλάσματος για PRP πήραμε από το υπερκείμενο με πιπέτα 100-1000 μ L ,περίπου το 1/3(περίπου 4 ml) και το μεταφέραμε σε ένα σωλήνα των 50 ml. Στη συνέχεια ξανατοποθετήσαμε τους δοκιμαστικούς σωλήνες στη φυγόκεντρο για 15' στις 3000 στροφές με επιβράδυνση. Έπειτα παραλάβαμε το υπερκείμενο το οποίο ήταν το πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια(PPP) και το μεταφέραμε σε δοκιμαστικό σωλήνα των 15 ml.

4.4.Πειραματική Πορεία

Στο πείραμα αυτό έλαβαν μέρος υγιείς εθελοντές που δεν είχαν λάβει φαρμακευτική αγωγή για διάστημα τουλάχιστον δύο εβδομάδων. Τη προηγούμενη ημέρα οι εθελοντές δεν είχαν καταναλώσει αλκοόλ και την ημέρα της αιμοληψίας ήταν σε δωδεκάωρη νηστεία. Την ημέρα της διεξαγωγής του πειράματος ελήφθησαν συνολικά 54 ml αίμα τα οποία τοποθετήθηκαν σε 4 σωλήνες των 15

λήψη του αίματος, το φυγοκεντρήσαμε για 14' στις 1300 στροφές χωρίς επιτάχυνση ή επιβράδυνση για να πάρουμε το πλάσμα που είναι πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP). Στη συνέχεια Ύστερα μεταφέραμε πλάσμα από το PPP και το PRP σε 2 κυψελίδες για να μετρήσουμε τη συγκέντρωση των αιμοπεταλίων στο φασματοφωτόμετρο στα 530 nm έτσι και θέλαμε να είναι γύρω στα 0.800. Εάν προέκυπτε μεγαλύτερη συγκέντρωση, τότε γινόταν αραίωση από το PPP.

4.4.1 Μέτρηση αντiaiμοπεταλιακής δράσης των φαινολικών ενώσεων με τη χρήση συσσωρευματομέτρου.

Υλικά

- 1.Συσσωρευματομέτρο (Aggregometer) Chronolog
- 2.Κυψελίδες συσσωρευματομέτρου, Chronolog
- 3.Μαγνητικοί αναδευτήρες για κυψελίδες
- 4.Πιπέτες 1-10μL, 10-100μL και 200-1000μL
- 5.Αναδευτήρας Vortex

Αντιδραστήρια

- 1.Διαλύματα PAF σε BSA, 10-4M, 10-5 M, 10-6M
- 2.Διαλύματα TRAP σε φυσιολογικό ορό (0.9% NaCl), 1mM, 0,1mM
- 3.Διαλύματα ADP σε φυσιολογικό ορό (0.9% NaCl), 5mM, 0,5mM, 0,05mM
- 4.BSA(2,5 mg/mL BSA σε φυσιολογικό ορό 0.9% NaCl)
- 5.Φυσιολογικός ορός 0,9% NaCl

4.5 Πειραματική διαδικασία

Στις ειδικές γυάλινες κυψελίδες τοποθετούνται 250 μL από το PRP και σε μια κυψελίδα τοποθετείται 1 ml PPP που χρησιμοποιείται ως control. Τα 250 μL επωάζονται για 15' και στη συνέχεια μεταφέρονται στις ειδικές θέσεις για να γίνει ο προσδιορισμός της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων. Αρχικά στις κυψελίδες τοποθετήθηκαν 2 μL DMSO όταν επρόκειτο να αποφασιστεί η συγκέντρωση που θα χρησιμοποιούνταν για τον εκάστοτε συσσωρευτικό παράγοντα και στη συνέχεια προστίθεντο μόνο στη 1^η κυψελίδα 2 μL DMSO η οποία χρησιμοποιούνταν σαν control και στις υπόλοιπες 3 κυψελίδες τοποθετούνταν 2 μL της εκάστοτε φαινολικής ουσίας που ήταν να μελετηθεί η αντισυσσωρευτική τους δράση. Τα δείγματα συνέχιζαν να επωάζονται για άλλα 5'. Στη συνέχεια προστίθεντο ο εκάστοτε συσσωρευτικός παράγοντας (PAF, ADP, TRAP) και σε χρονικό διάστημα 4'(PAF) ή 6'(ADP, TRAP) γινόταν καταγραφή της προκαλούμενης συσσώρευσης.

4.6 Υπολογισμός Αντ αιμοπεταλιακής Δράσης Στο Συσσωρευματομέτρο

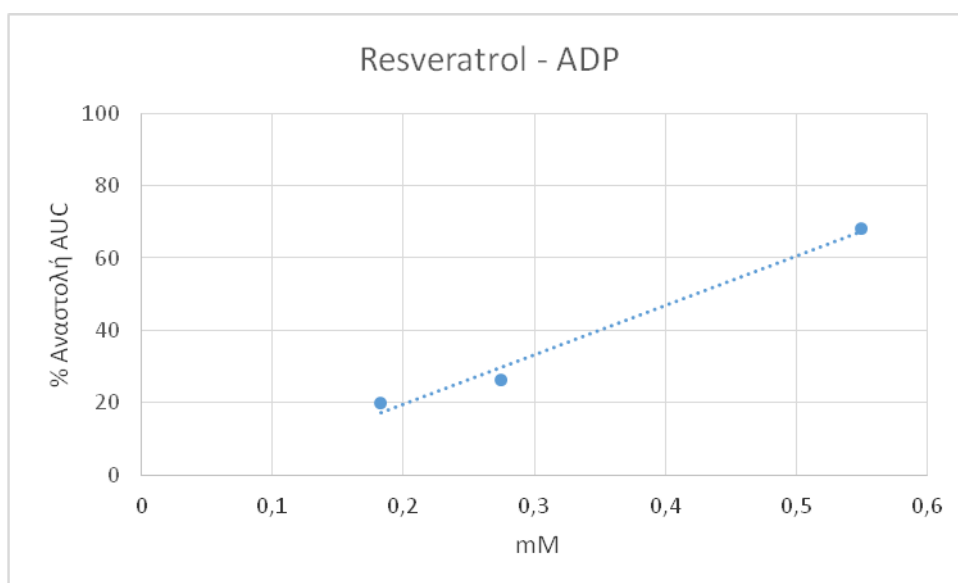
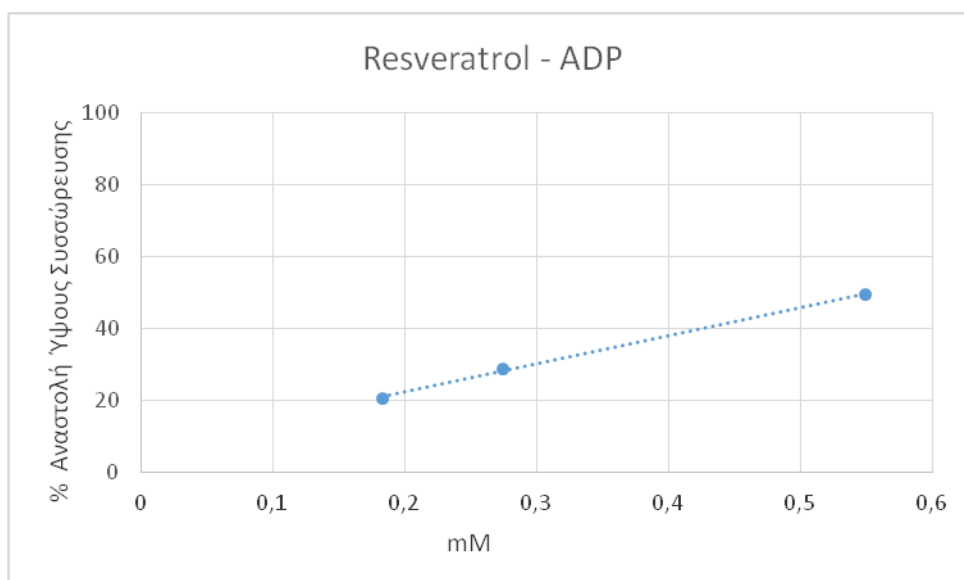
Ο υπολογισμός της αντ αιμοπεταλιακής δράσης έγινε με βάση το ύψος της συσσώρευσης (Amplitude) και της περιοχής κάτω από τη καμπύλη συσσώρευσης (Area Under the Curve – AUC). Η αντισυσσωρευτική δράση των φαινολικών έγινε με τον δείκτη IC₅₀ όπου μας δείχνει τη συγκέντρωση της φαινολικής ένωσης όπου προκαλεί 50% αναστολή της δράσης του αγωνιστή. Τα πειράματα έγιναν τουλάχιστον 2 φορές για κάθε ένωση.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1 Ρεσβερατρόλη

5.1.1 ADP

Η Ρεσβερατρόλη προκαλεί αναστολή και στους τρεις συσσωρευτικούς παράγοντες (ADP, PAF, TRAP). Ωστόσο στο PAF η ρεσβερατρόλη εμφάνισε τη μεγαλύτερη δραστικότητα καθώς το IC₅₀ είχε τη μικρότερη τιμή. Από τη παρακάτω γραφική παράσταση υπολογίστηκε το IC₅₀ 550 μ M με βάση το ύψος της συσσώρευσης του ADP και 420 μ M με βάση τη περιοχή κάτω από τη καμπύλη.

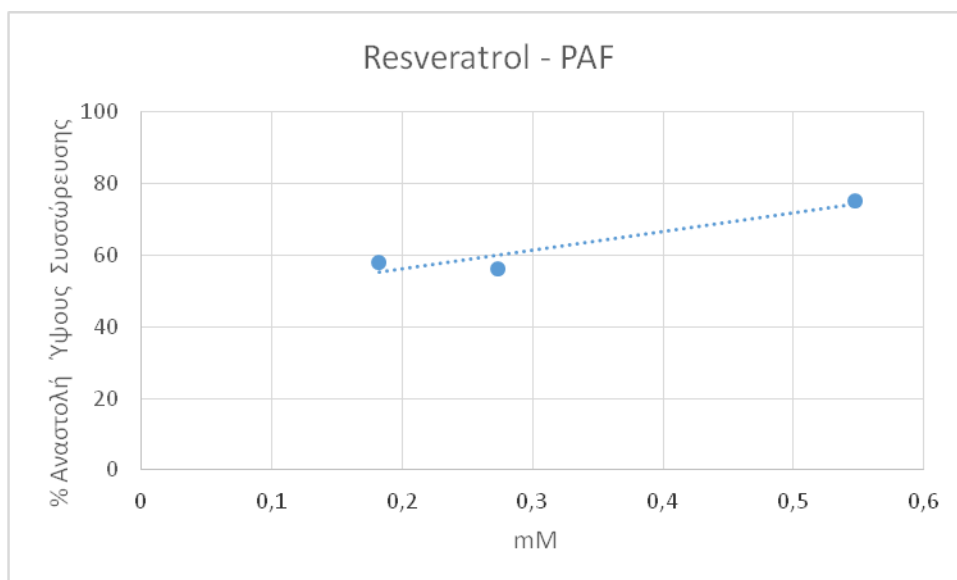


Διάγραμμα 1

Η επίδραση της ρεσβερατρόλης στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων έναντι του ADP. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % αναστολή α) του ύψους της καμπύλης συσσώρευσης (Amplitude) και β) της περιοχής κάτω από τη καμπύλη (AUC) απουσία ρεσβερατρόλης

5.1.2 PAF

Στο PAF το IC₅₀ υπολογίστηκε στα 80 μ M σε συγκεντρώσεις 0.05 – 0.55 mM με βάση το ύψος συσσώρευσής του. Στο PAF δεν υπολογίστηκε συγκέντρωση με βάση το AUC επειδή λόγω του γεγονότος ότι αφήναμε ένα χρονικό διάστημα (4 λεπτά) για να μπορέσουμε να δούμε αναστολή, στο διάστημα αυτό μεγάλωνε το εμβαδόν κάτω από τη καμπύλη, παρουσιάζοντας μια πλασματική αυξημένη αναστολή. (Διάγραμμα 2)

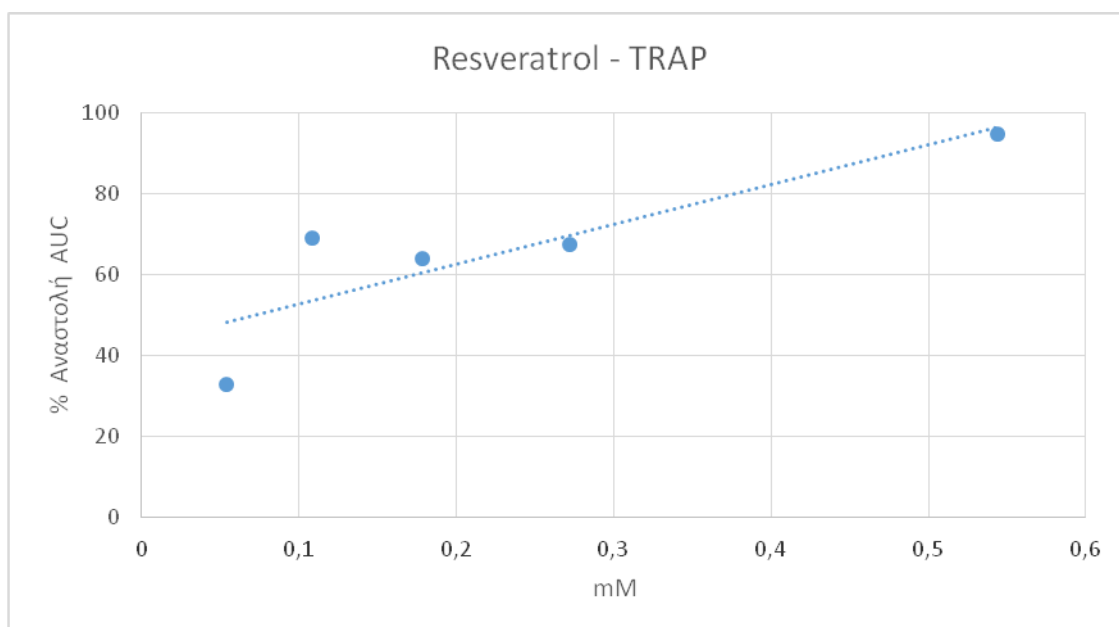
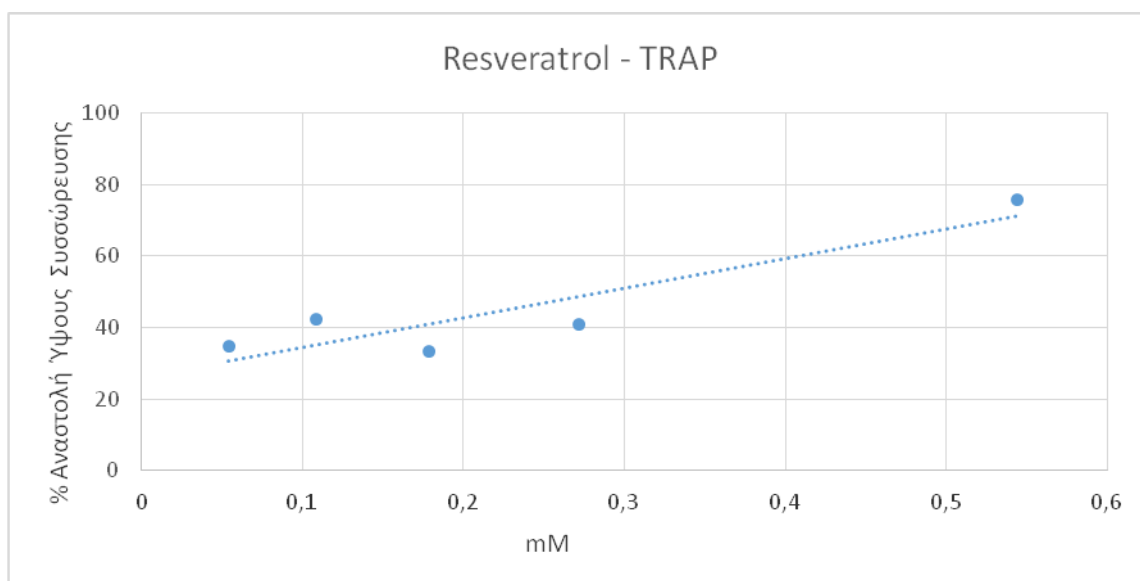


Διάγραμμα 2

Η επίδραση της ρεσβερατρόλης στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων έναντι του PAF. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως επί τοις εκατό αναστολή του ύψους (Amplitude) της καμπύλης συσσώρευσης απουσία ρεσβερατρόλης

5.1.3. TRAP

Στο TRAP το IC₅₀ είναι 288 μ M με βάση το ύψος συσσώρευσής του και 73 μ M με βάση το AUC. (Διάγραμμα 3)



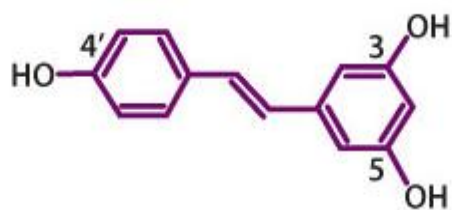
Διάγραμμα 3

Η επίδραση της ρεσβερατρόλης στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων έναντι του TRAP. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως επι τοις εκατό αναστολή α) του ύψους της καμπύλης συσσώρευσης (Amplitude) και β) της περιοχής κάτω από τη καμπύλη (AUC) απουσία ρεσβερατρόλης

5.2 Συνθετικά παράγωγα Ρεσβερατρόλης

Στο παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται η χημική δομή της ρεσβερατρόλης και οι θέσεις μεθυλίωσης των συνθετικών παραγώγων που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα.

Πίνακας 1: Η ρεσβερατρόλη και οι θέσεις μεθυλίωσής της



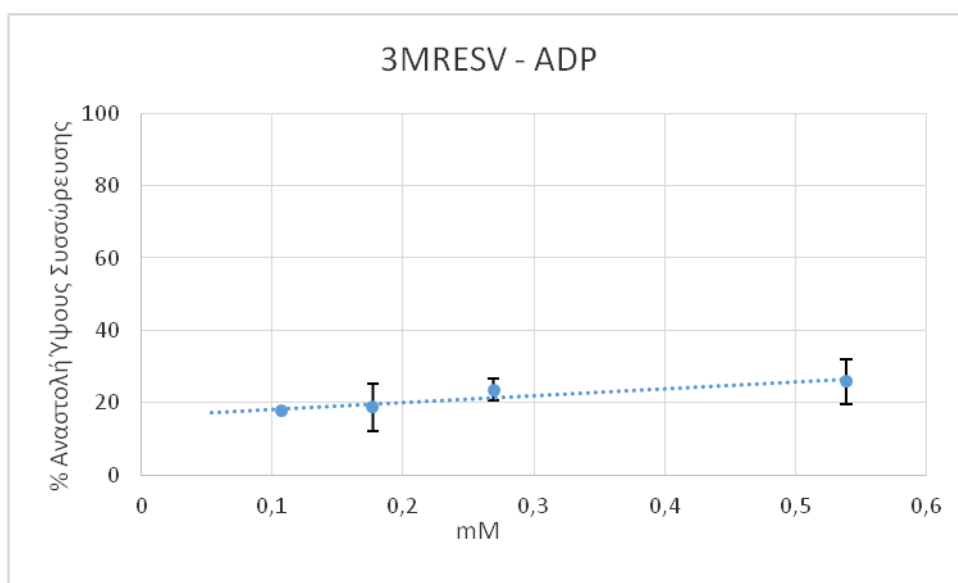
	3	5	4'
3MResv	OCH ₃	OH	OH
4MResv	OH	OH	OCH ₃
DMResv	OCH ₃	OCH ₃	OH
3,4 DMResv	OCH ₃	OH	OCH ₃
TMResv	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃

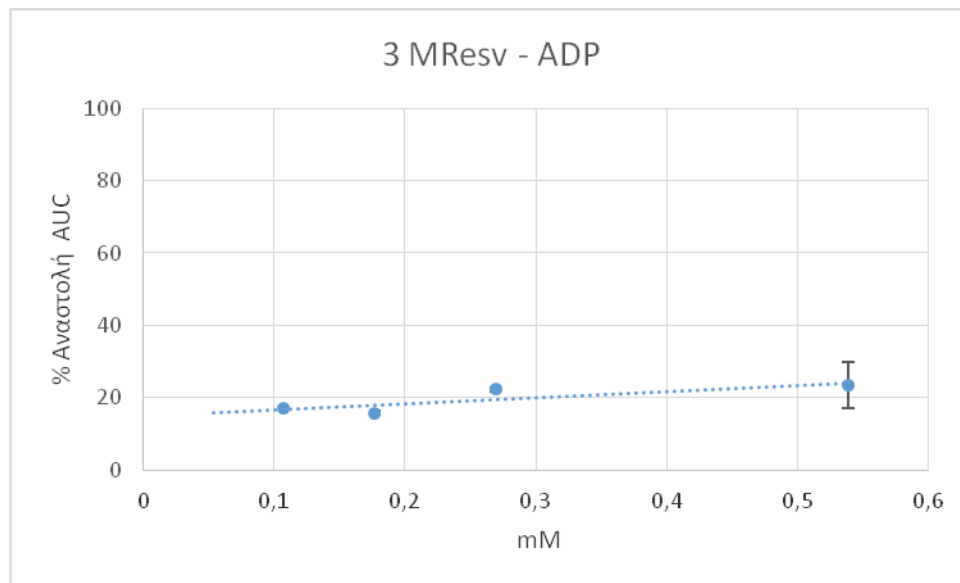
5.2.1. 3Μεθυλο- Ρεσβερατρόλη

5.2.1.1 ADP

Η 3Μεθυλο-Ρεσβερατρόλη έδειξε αναστολή στο PAF και το TRAP, αλλά όχι στον ADP. Στο TRAP έδειξε τη μεγαλύτερη δραστικότητα.

Στον ADP έδειξε μια αναστολή της τάξης του 25% στη μέγιστη συγκέντρωση 0.538 mM συνεπώς δε μπορέσαμε να υπολογίσουμε το IC₅₀. (Διάγραμμα 4)



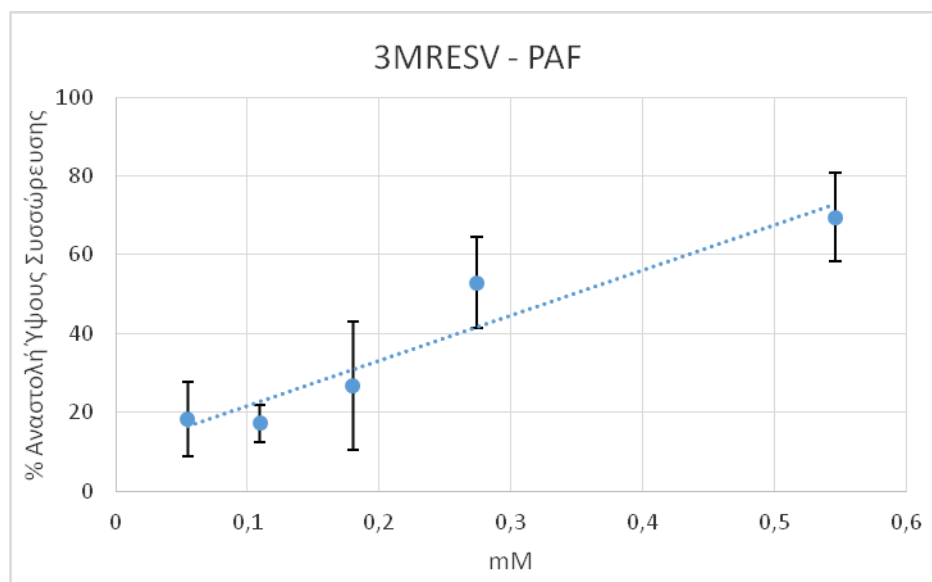


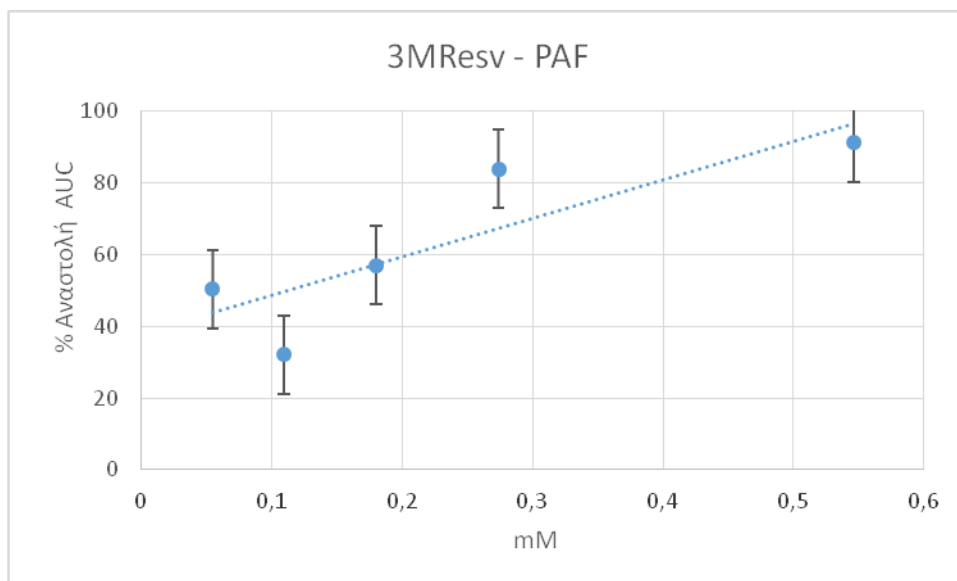
Διάγραμμα 4

Η επίδραση της 3Μεθυλο- Ρεσβερατρόλης στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων έναντι του ADP. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως %αναστολή α) του ύψους της καμπύλης συσσώρευσης και β) της περιοχής κάτω από τη καμπύλη απουσία ρεσβερατρόλης

5.2.1.2 PAF

Στο PAF ωστόσο παρατηρήθηκε αναστολή, η οποία είναι πάνω από 50%. Το IC50 με βάση το ύψος της καμπύλης είναι 346 μ M και με βάση το AUC είναι 113 μ M. (Διάγραμμα 5)



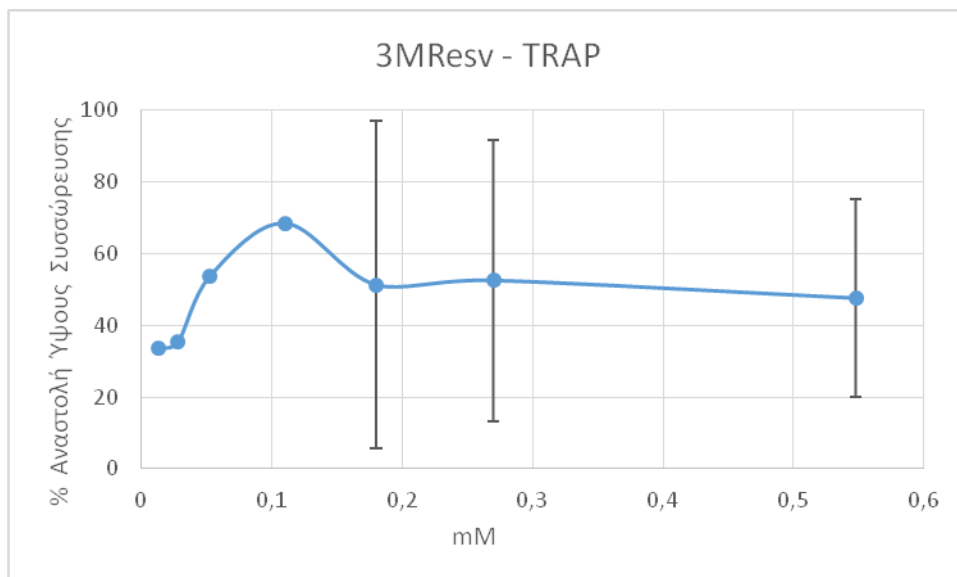


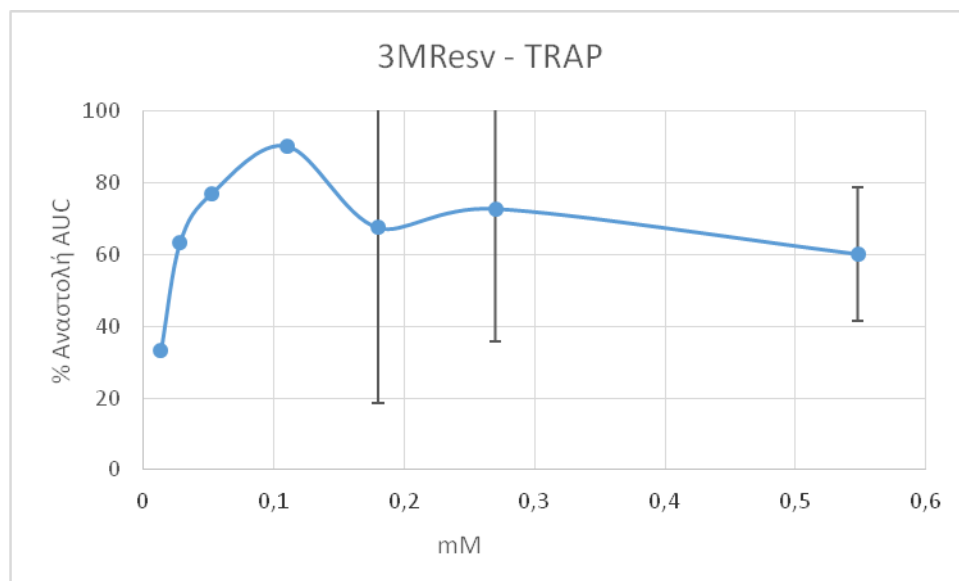
Διάγραμμα 5

Η επίδραση της 3Μεθυλο- Ρεσβερατρόλης στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων έναντι του PAF. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως επι τοις εκατό αναστολή α) του ύψους της καμπύλης συσσώρευσης (Amplitude) και β) της περιοχής κάτω από τη καμπύλη (AUC) απουσία ρεσβερατρόλης

5.2.1.3. TRAP

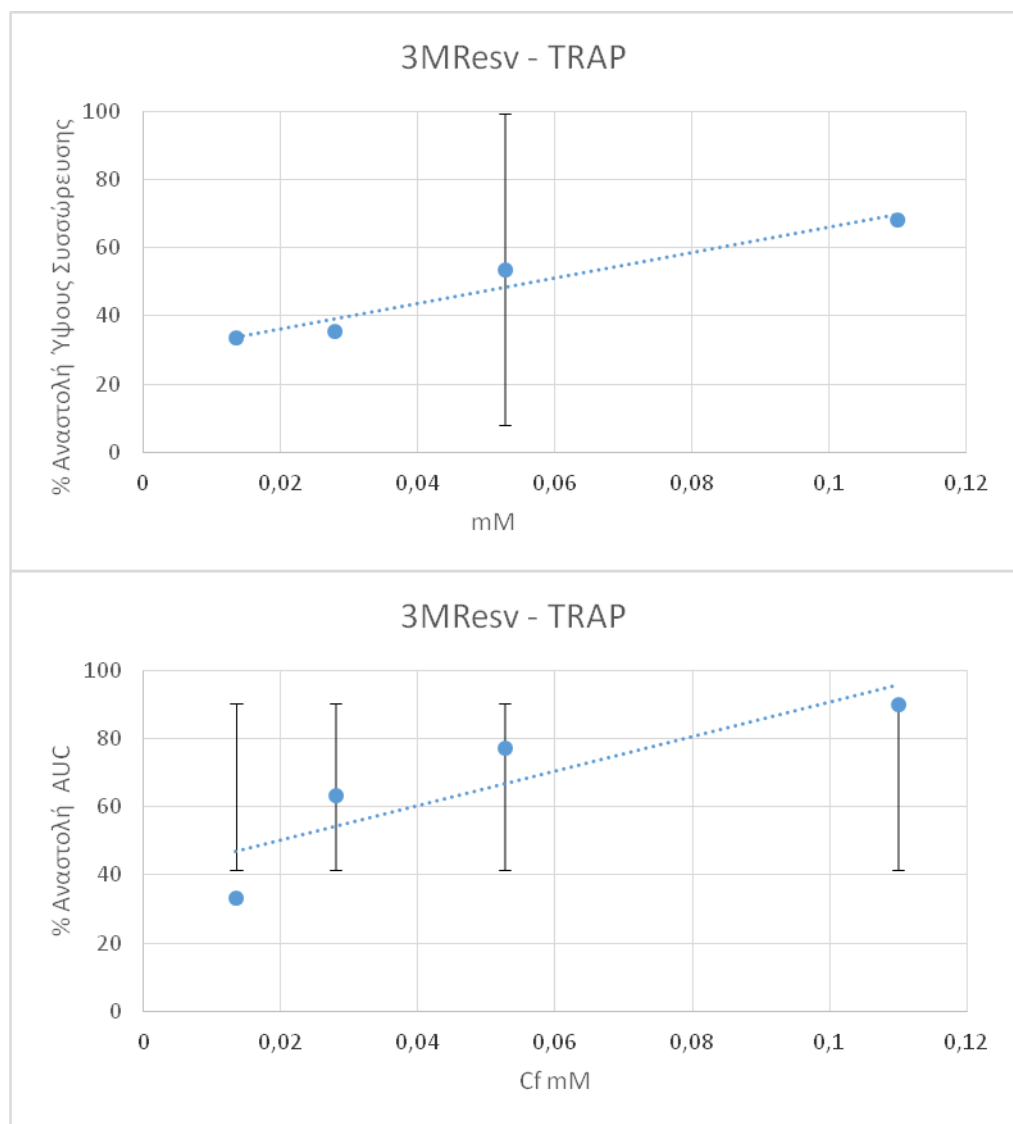
Τέλος στο TRAP εμφάνισε τη μεγαλύτερη δραστικότητα δίνοντας μας μια καμπύλη σε μορφή κώδωνα με τιμή IC₅₀ 73 μΜ με βάση το ύψος της καμπύλης και 19 μΜ με βάση το AUC. (Διάγραμμα 6)





Διάγραμμα 6

Η επίδραση της 3Μεθυλο- Ρεσβερατρόλης στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων έναντι του TRAP. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % αναστολή α) του ύψους της καμπύλης συσσώρευσης (Amplitude) και β) της περιοχής κάτω από τη καμπύλη (AUC) απουσία ρεσβερατρόλης



Διάγραμμα 7

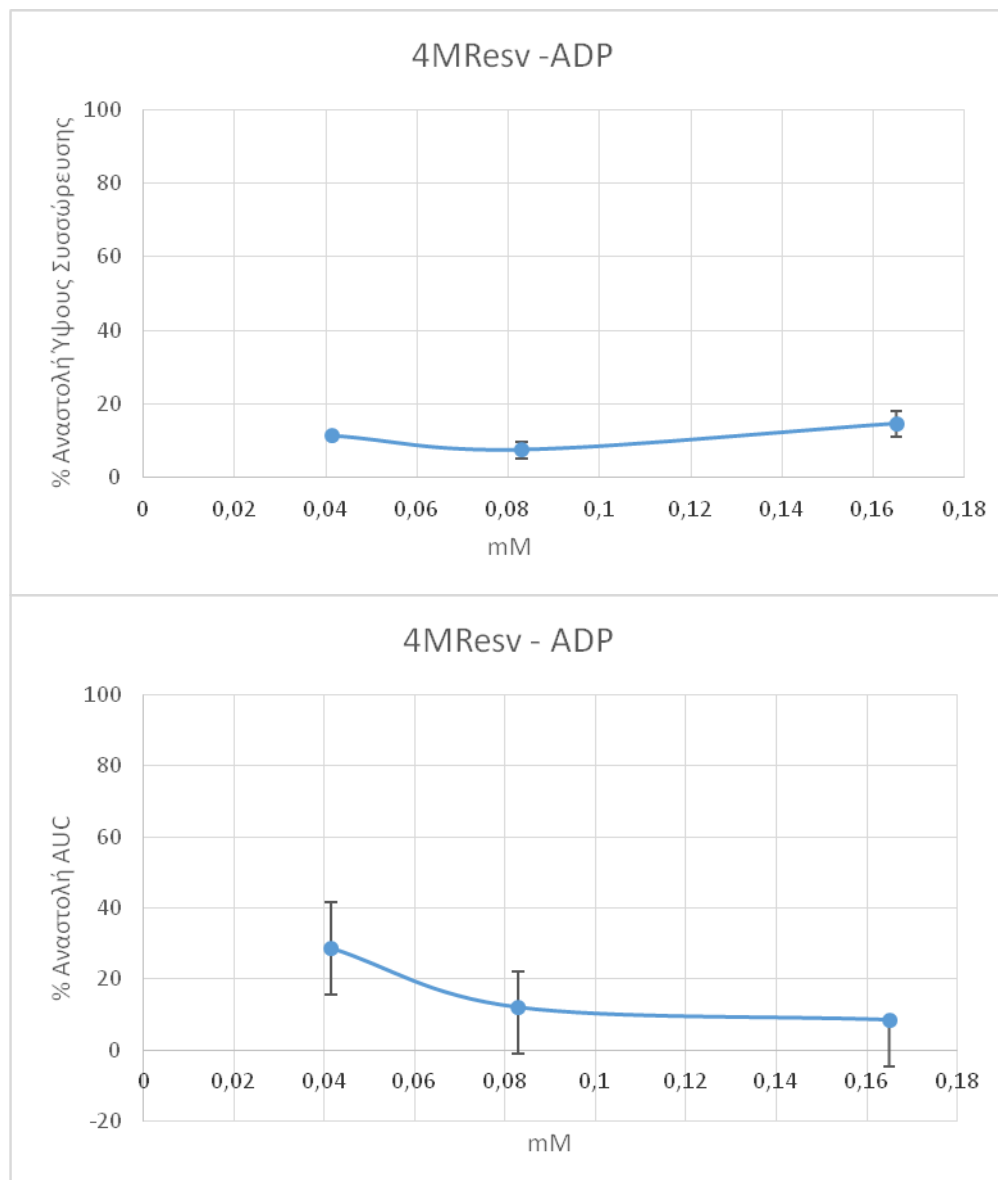
Τα σημεία που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό του IC50 με βάση το ύψος της συσσώρευσης και το εμβαδόν κάτω από τη καμπύλη

5.2.2. 4Μεθυλο- Ρεσβερατρόλη

5.2.2.1 ADP

Η 4Μεθυλο- Ρεσβερατρόλη δεν εμφάνισε κάποια αναστολή ούτε στο ADP ούτε και στο PAF ενώ στο TRAP φαίνεται να αναστέλλει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων.

Στο ADP υπήρξε μια αναστολή της τάξης του 14% στα 165 μ M, στη μεγαλύτερη συγκέντρωση που μελετήθηκε συνεπώς δεν υπολογίστηκε το IC50.(Διάγραμμα 7)

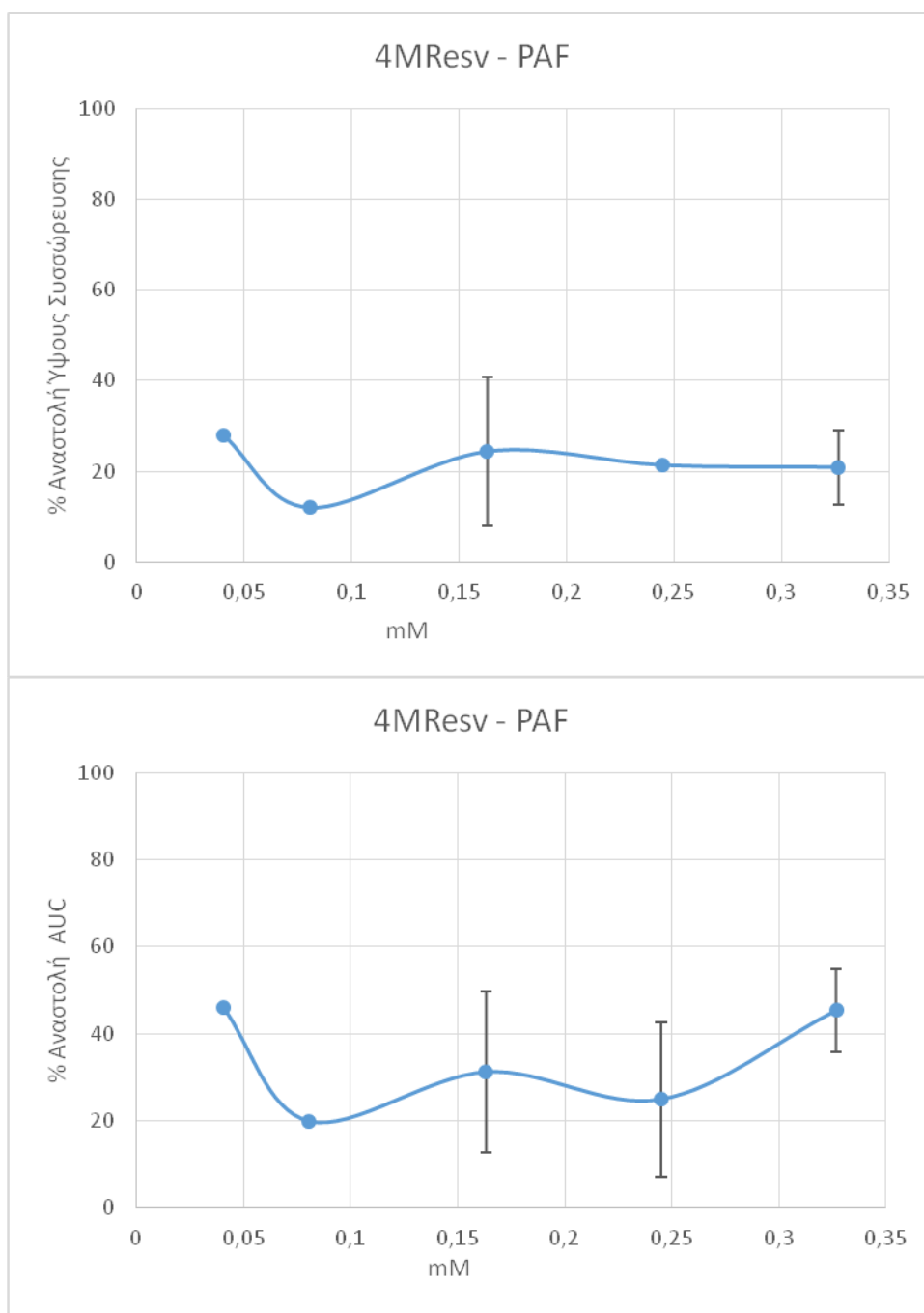


Διάγραμμα 8

Η επίδραση της 4Μεθυλο- Ρεσβερατρόλης στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων έναντι του ADP. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως επι τοις εκατό αναστολή α) του ύψους της καμπύλης συσσώρευσης (Amplitude) και β) της περιοχής κάτω από τη καμπύλη (AUC) απουσία ρεσβερατρόλης

5.2.2.2 PAF

Επίσης στο PAF η συσσώρευση ήταν αμελητέα της τάξης του 20%, οπότε δεν υπολογίστηκε ούτε στο συγκεκριμένο συσσωρευτικό παράγοντα το IC50.(Διάγραμμα 8)

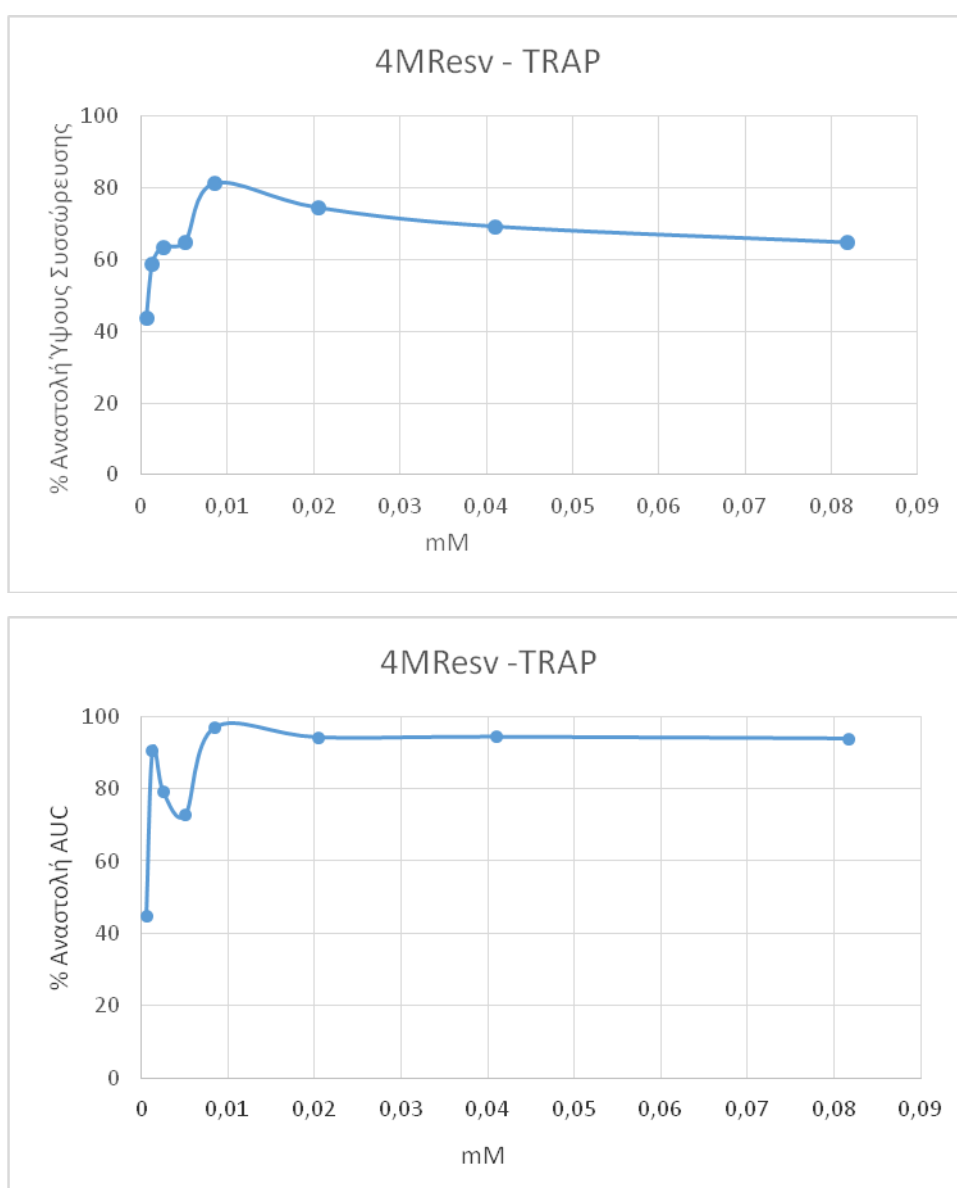


Διάγραμμα 9

Η επίδραση της 4Μεθυλο- Ρεσβερατρόλης στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων έναντι του PAF. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως επι τοις εκατό αναστολή α) του ύψους της καμπύλης συσσώρευσης (Amplitude) και β) της περιοχής κάτω από τη καμπύλη (AUC) απουσία ρεσβερατρόλης

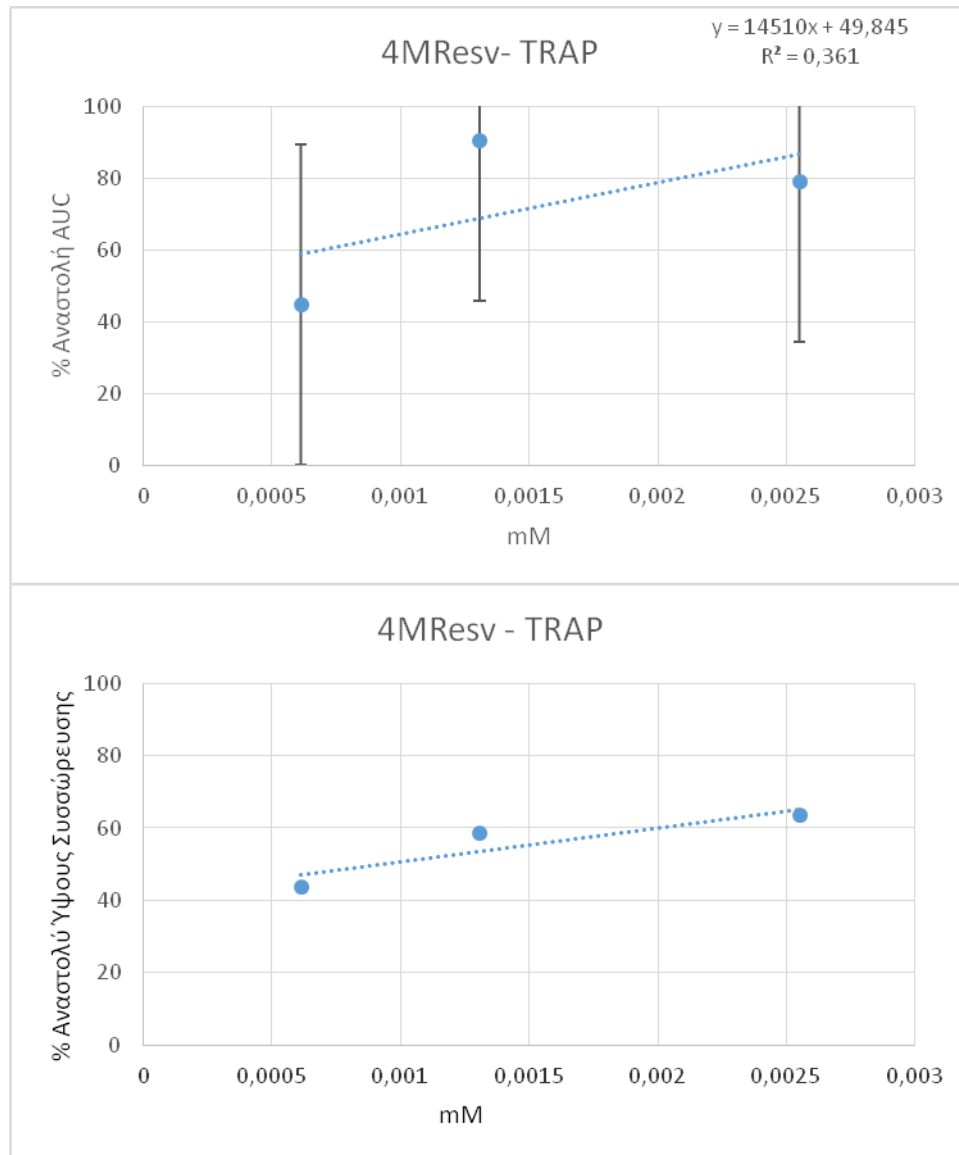
5.2.2.3 TRAP

Στο TRAP όμως, παρατηρήθηκε αναστολή και με βάση το ύψος της καμπύλης υπολογίστηκε το IC₅₀ 0.9 μ M ενώ με βάση τη περιοχή κάτω από τη καμπύλη το IC₅₀ ήταν 0.01 μ M. (Διάγραμμα 9)



Διάγραμμα 10

Η επίδραση της 4Μεθυλο- Ρεσβερατρόλης στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων έναντι του TRAP. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως επι τοις εκατό αναστολή α) του ύψους της καμπύλης συσσώρευσης (Amplitude) και β) της περιοχής κάτω από τη καμπύλη (AUC) απουσία ρεσβερατρόλης



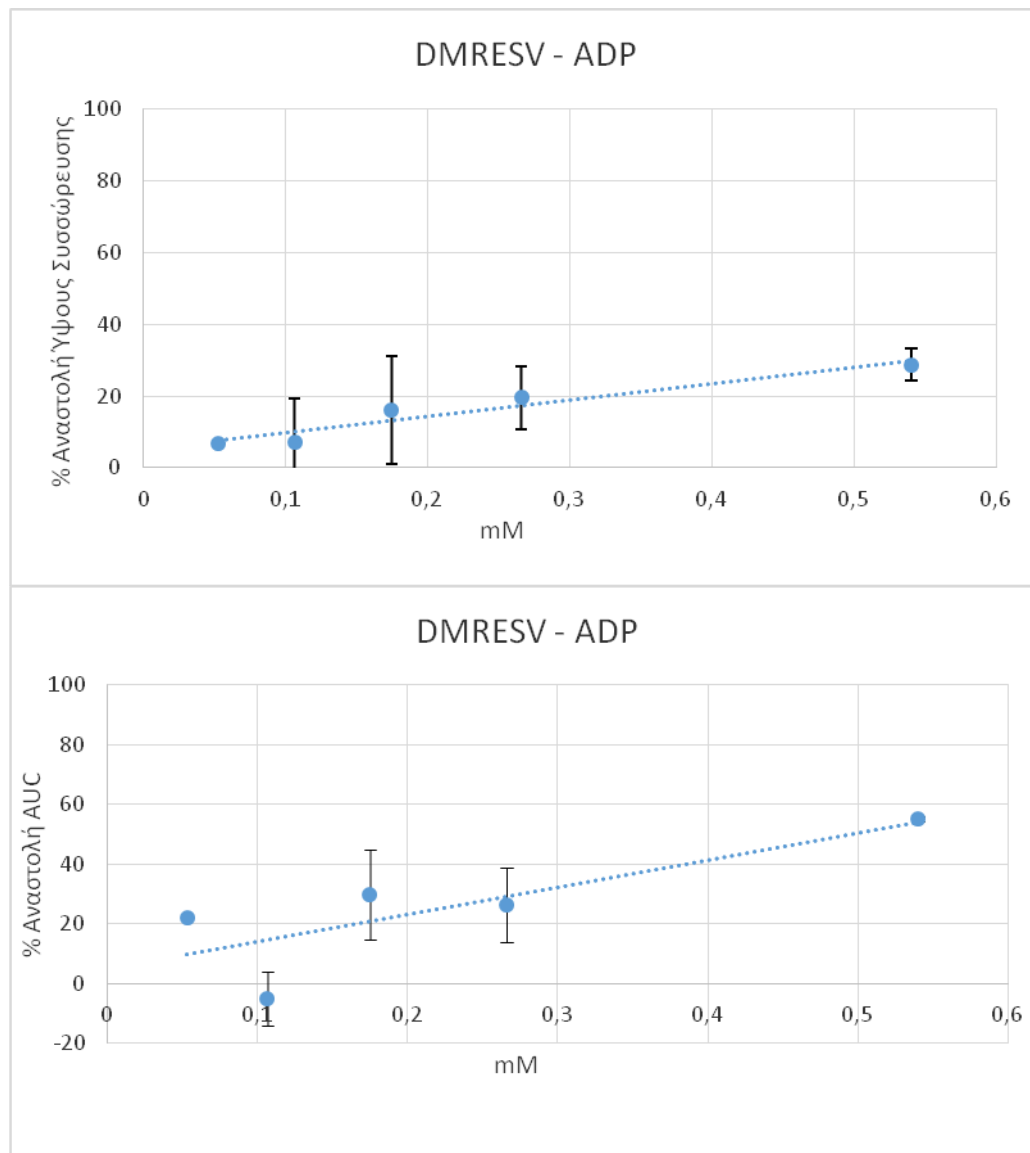
Διάγραμμα 11

Τα σημεία που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό του IC50 με βάση το ύψος της συσσώρευσης και το εμβαδόν κάτω από τη καμπύλη

5.2.3. Δι-μέθυλο Ρεσβερατρόλη

5.2.3.1 ADP

Η Δι-μέθυλο Ρεσβερατρόλη δε φαίνεται να προκαλεί κάποια αναστολή έναντι του ADP.(Διάγραμμα 12)

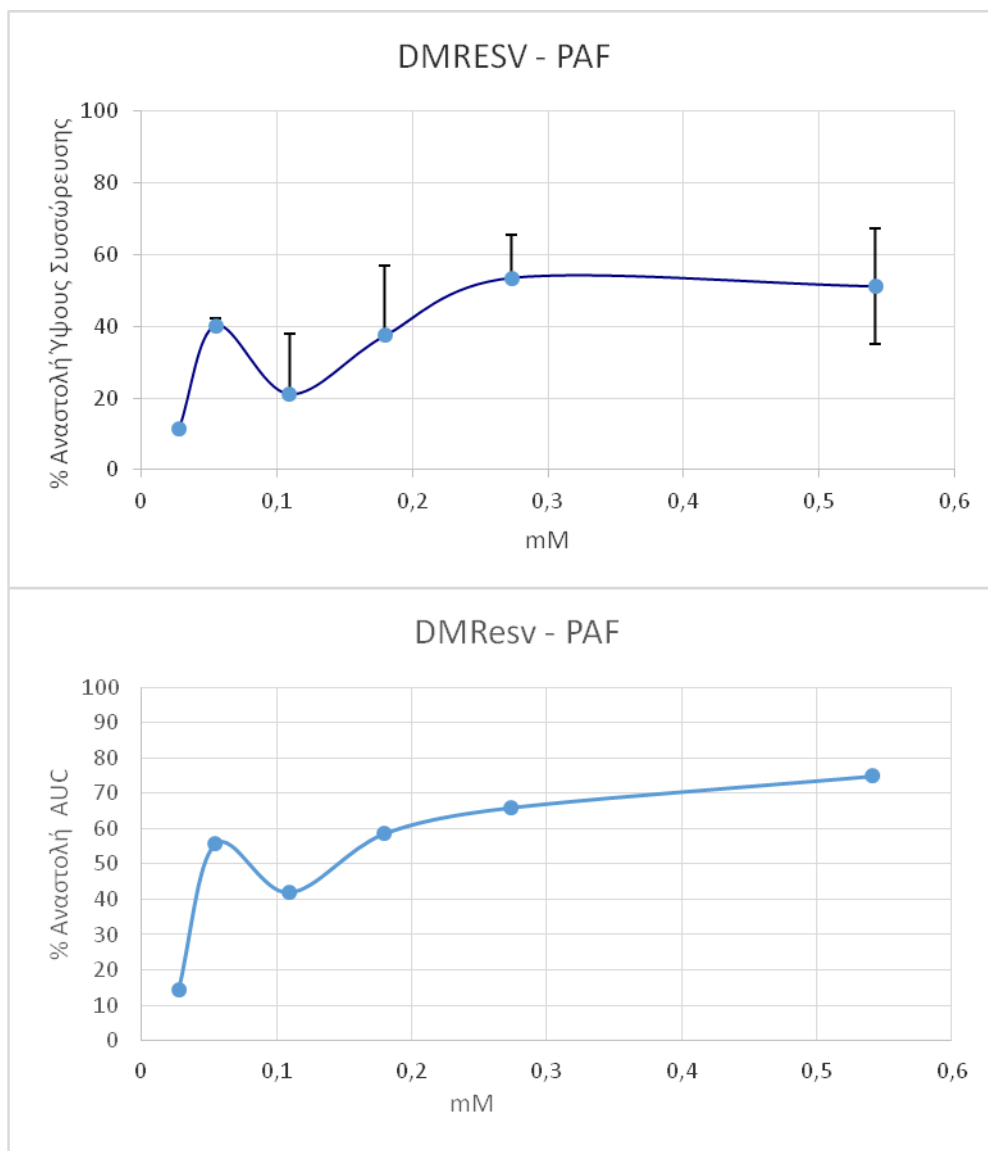


Διάγραμμα 12

Η επίδραση της Δι-Μεθυλο- Ρεσβερατρόλης στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων έναντι του ADP. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % αναστολή α) του ύψους της καμπύλης συσσώρευσης (Amplitude) και β) της περιοχής κάτω από τη καμπύλη(AUC) απουσία ρεσβερατρόλης

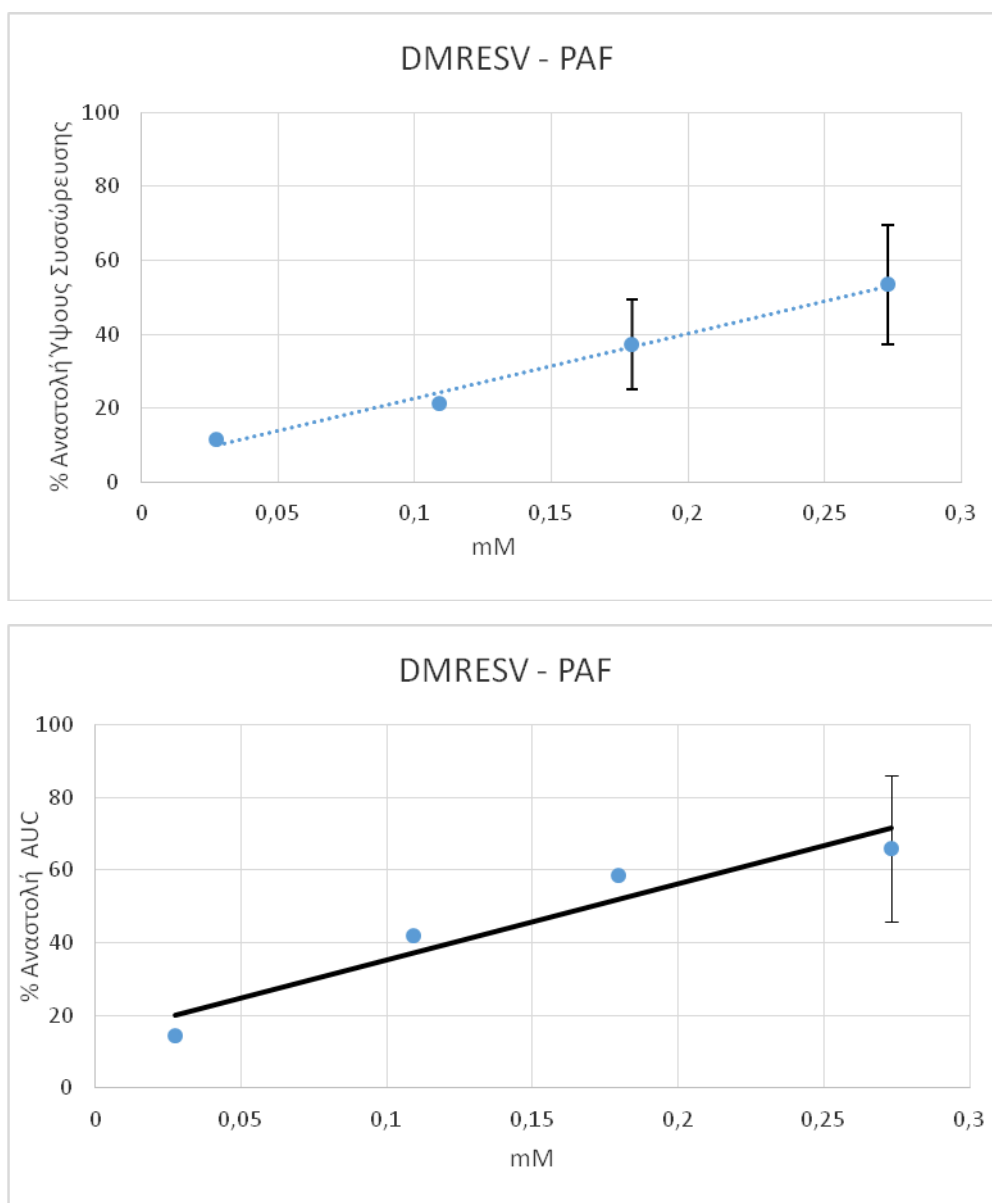
5.2.3.2 PAF

Στο PAF ωστόσο ανέστειλε τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων πάνω από 50% και το IC 50 σε σχέση με το ύψος της συσσώρευσης ήταν 256 μ M και σε σχέση με το AUC ήταν 170 μ M. Στο Διάγραμμα 12 παρουσιάζονται οι καμπύλες που μας δείχνουν την αναστολή που προκλήθηκε από τη Δι-Μεθυλο- Ρεσβερατρόλη και στο Διάγραμμα 13 τα σημεία που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό του IC50.



Διάγραμμα 13

Η επίδραση της Δι-Μεθυλο- Ρεσβερατρόλης στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων έναντι του PAF. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % αναστολή α) του ύψους της καμπύλης συσσώρευσης (Amplitude) και β) της περιοχής κάτω από τη καμπύλη (AUC) απουσία ρεσβερατρόλης

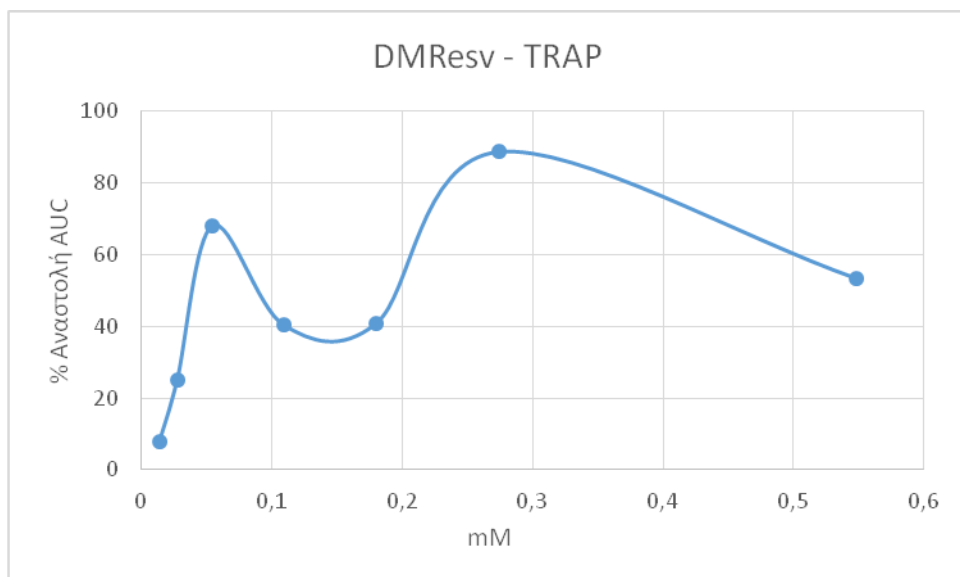
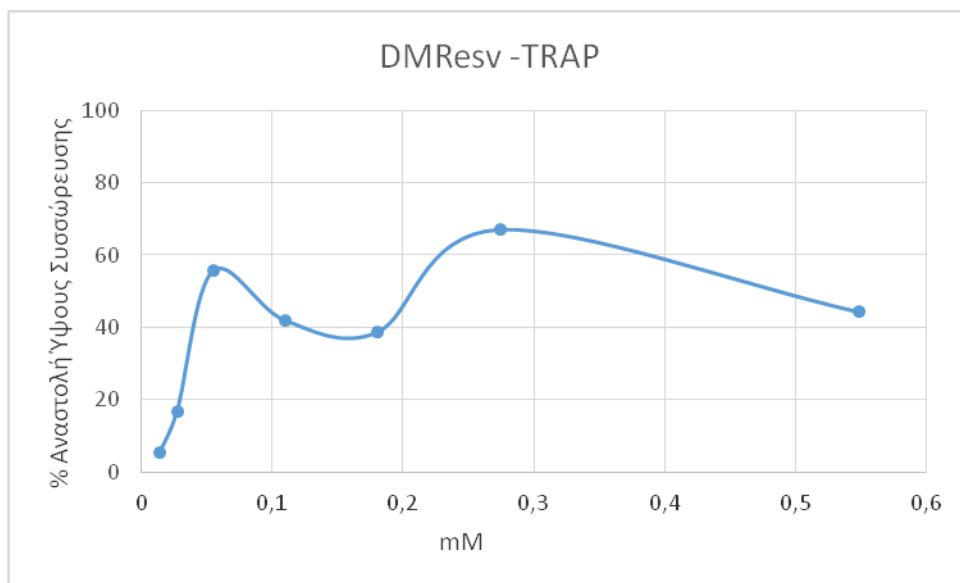


Διάγραμμα 14

Τα σημεία που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό του IC50 με βάση το ύψος της συσσώρευσης και το εμβαδόν κάτω από τη καμπύλη

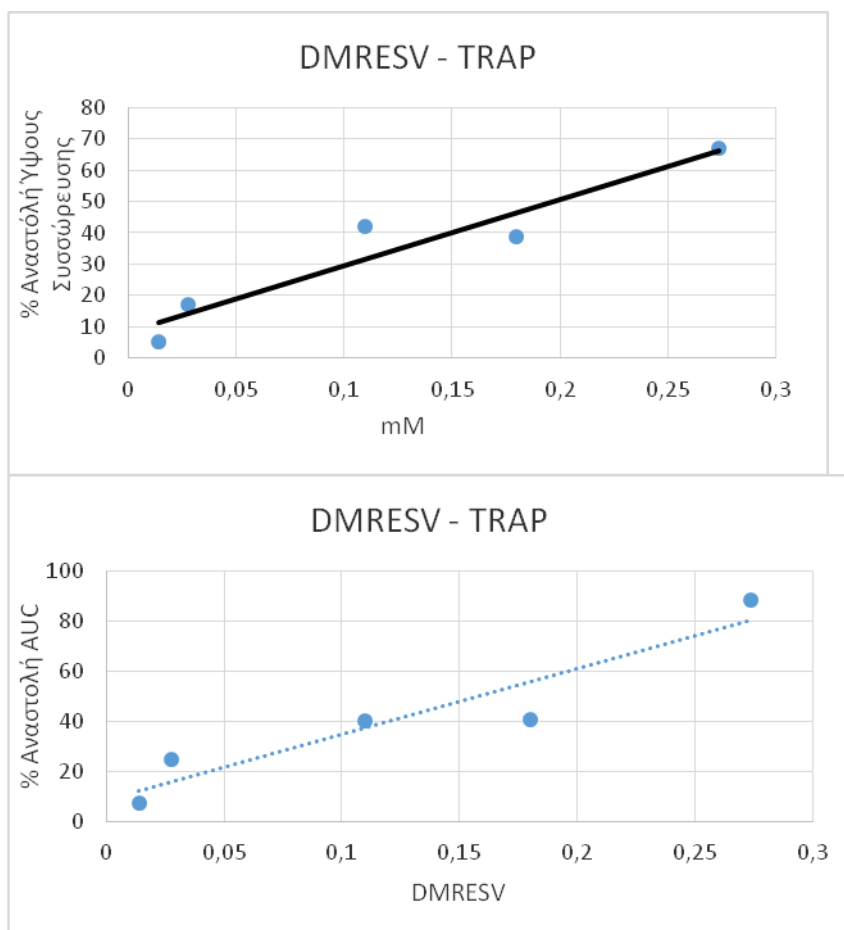
5.2.3.3 TRAP

Στο TRAP η Δι-Μέθυλο Ρεσβερατρόλη είχε τη μεγαλύτερη δραστικότητα με αναστολή της τάξης του 55% και το IC50 ήταν 197 μ M με βάση το ύψος της συσσώρευσης και 154 μ M με βάση το AUC. Στο Διάγραμμα 14 παρουσιάζονται οι καμπύλες που μας δείχνουν την αναστολή που προκλήθηκε από τη Δι-Μεθυλο- Ρεσβερατρόλη και στο Διάγραμμα 14 τα σημεία που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό του IC50.



Διάγραμμα 15

Η επίδραση της Δι-Μεθυλο- Ρεσβερατρόλης στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων έναντι του TRAP. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % αναστολή α) του ύψους της καμπύλης συσσώρευσης (Amplitude) και β) της περιοχής κάτω από τη καμπύλη (AUC) απουσία ρεσβερατρόλης



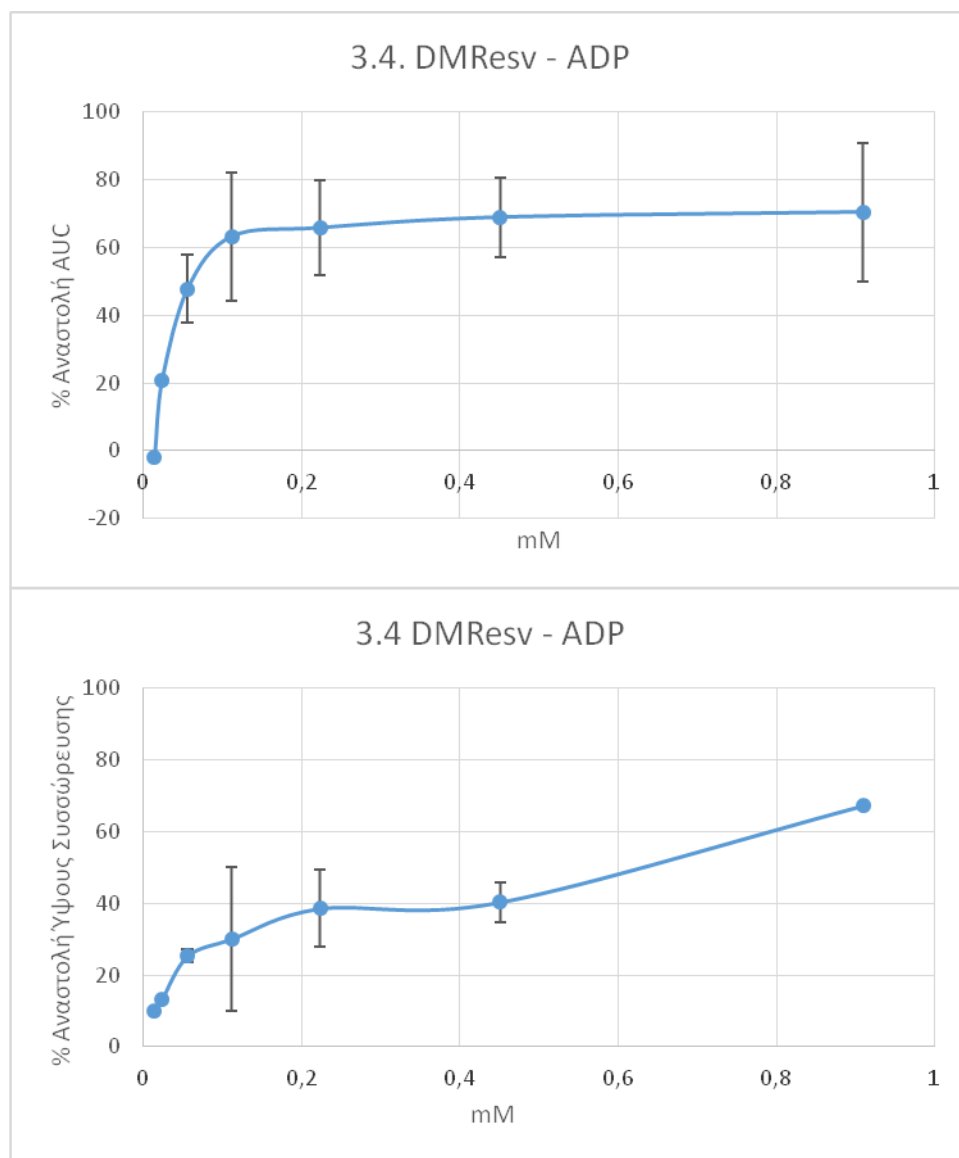
Διάγραμμα 16

Τα σημεία που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό του IC₅₀ με βάση το ύψος της συσσώρευσης και το εμβαδόν κάτω από τη καμπύλη

5.2.4. 3,4 Δι-Μέθυλο Ρεσβερατρόλη

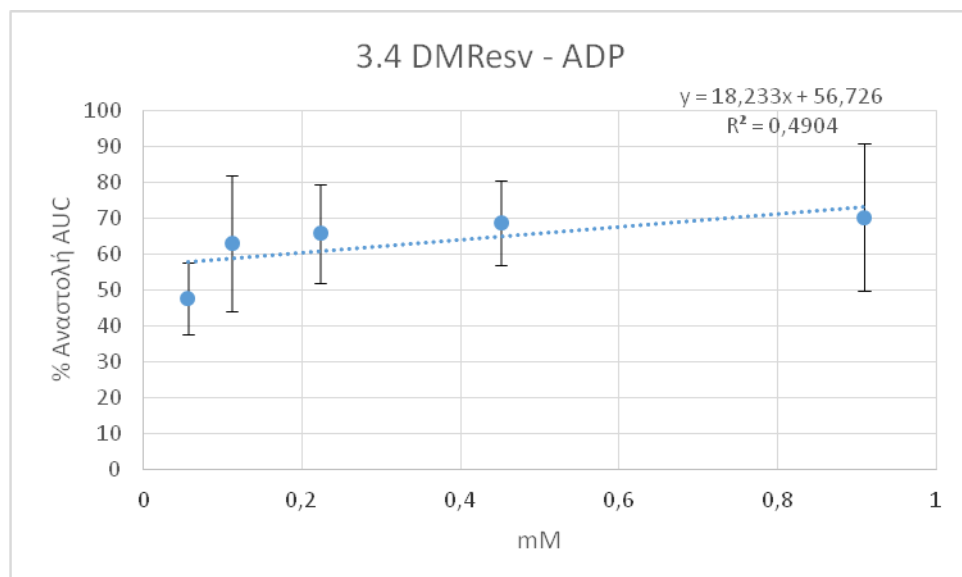
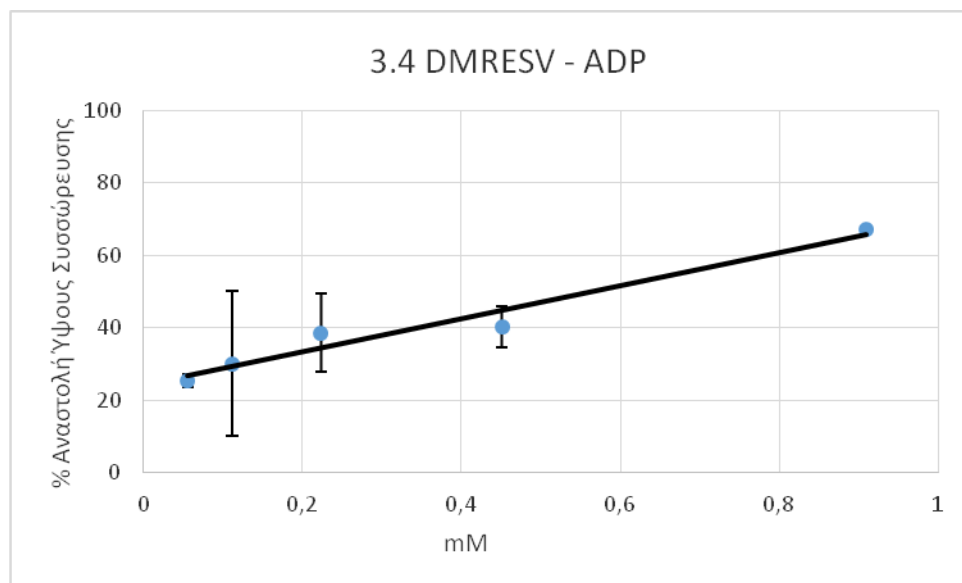
5.2.4.1 ADP

Στον ADP η 3,4 Δι-Μέθυλο Ρεσβερατρόλη φαίνεται να κάνει μια αναστολή της τάξης του 50% και είναι δοσοεξαρτώμενη. (Διάγραμμα 16) Το IC₅₀ με βάση το ύψος συσσώρευσης είναι 563 μM και με βάση το AUC είναι 125 μM. Τα σημεία που πήραμε για να υπολογίσουμε το IC₅₀ παρουσιάζονται στο διάγραμμα 17.



Διάγραμμα 17

Η επίδραση της 3.4 Δι-Μεθυλο- Ρεσβερατρώλης στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων έναντι του ADP. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % αναστολή α) του ύψους της καμπύλης συσσώρευσης (Amplitude) και β) της περιοχής κάτω από τη καμπύλη (AUC) απουσία ρεσβερατρώλης

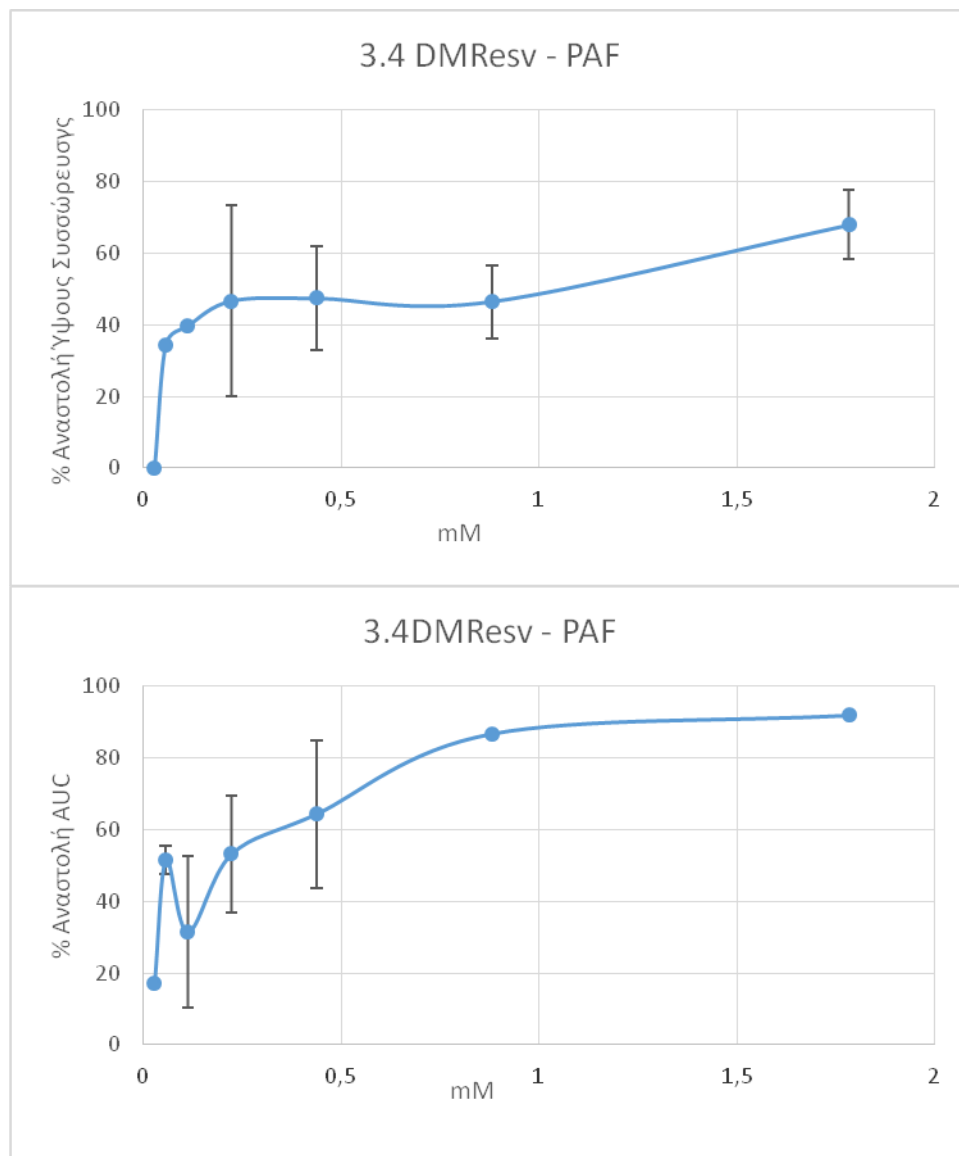


Διάγραμμα 18

Τα σημεία που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό του IC50 με βάση το ύψος της συσσώρευσης και το εμβαδόν κάτω από τη καμπύλη

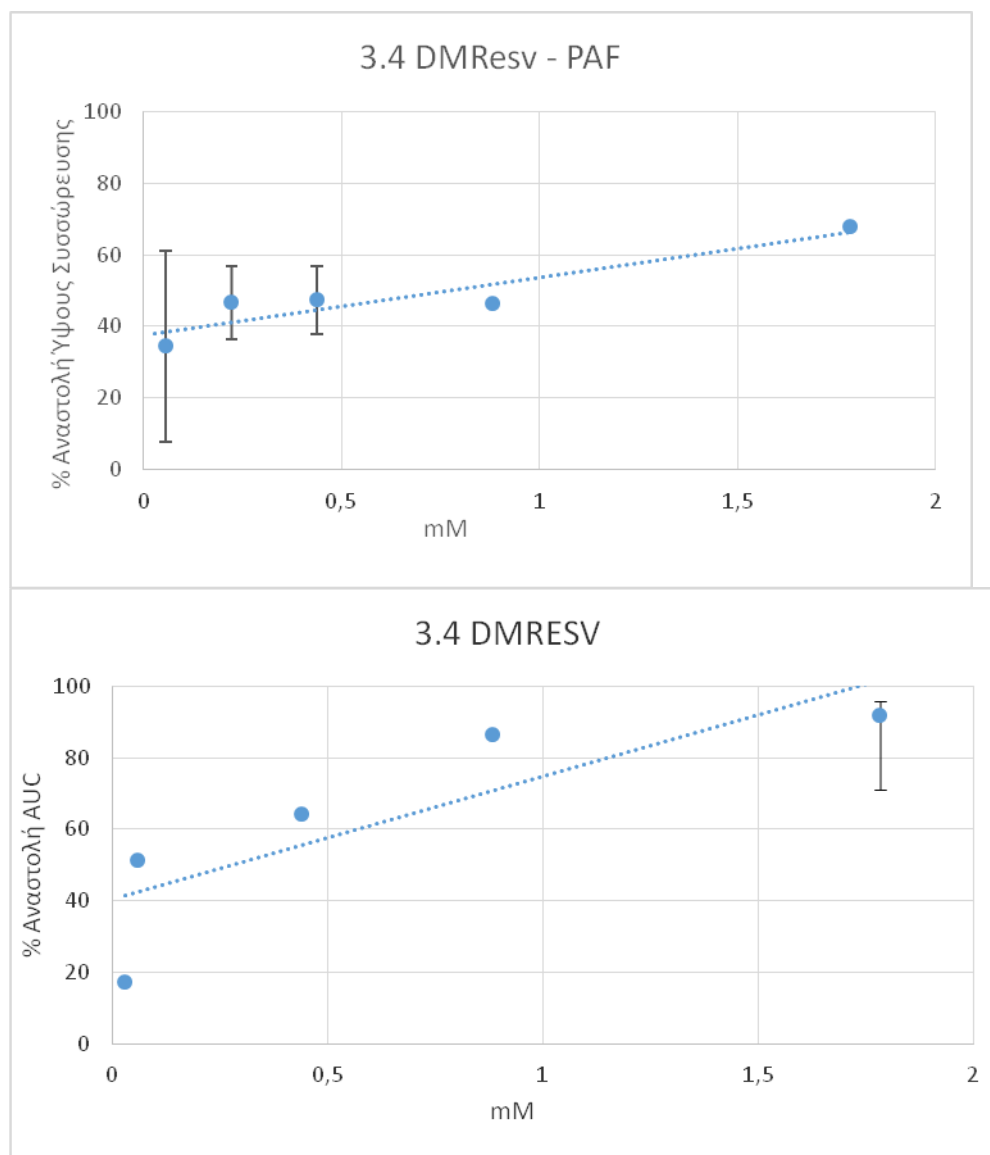
5.2.4.2 PAF

Στο PAF η 3,4 Δι-Μέθυλο Ρεσβερατρόλη φαίνεται να κάνει μια αναστολή της τάξης του 50%. (Διάγραμμα 18) Το IC50 με βάση το ύψος συσσώρευσης είναι 765 μ M και με βάση το AUC είναι 280 μ M. Τα σημεία που πήραμε για να υπολογίσουμε το IC50 παρουσιάζονται στο διάγραμμα 19.



Διάγραμμα 19

Η επίδραση της 3.4 Δι-Μεθυλο- Ρεσβερατρώλης στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων έναντι του PAF. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % αναστολή α) του ύψους της καμπύλης συσσώρευσης (Amplitude) και β) της περιοχής κάτω από τη καμπύλη (AUC) απουσία ρεσβερατρώλης

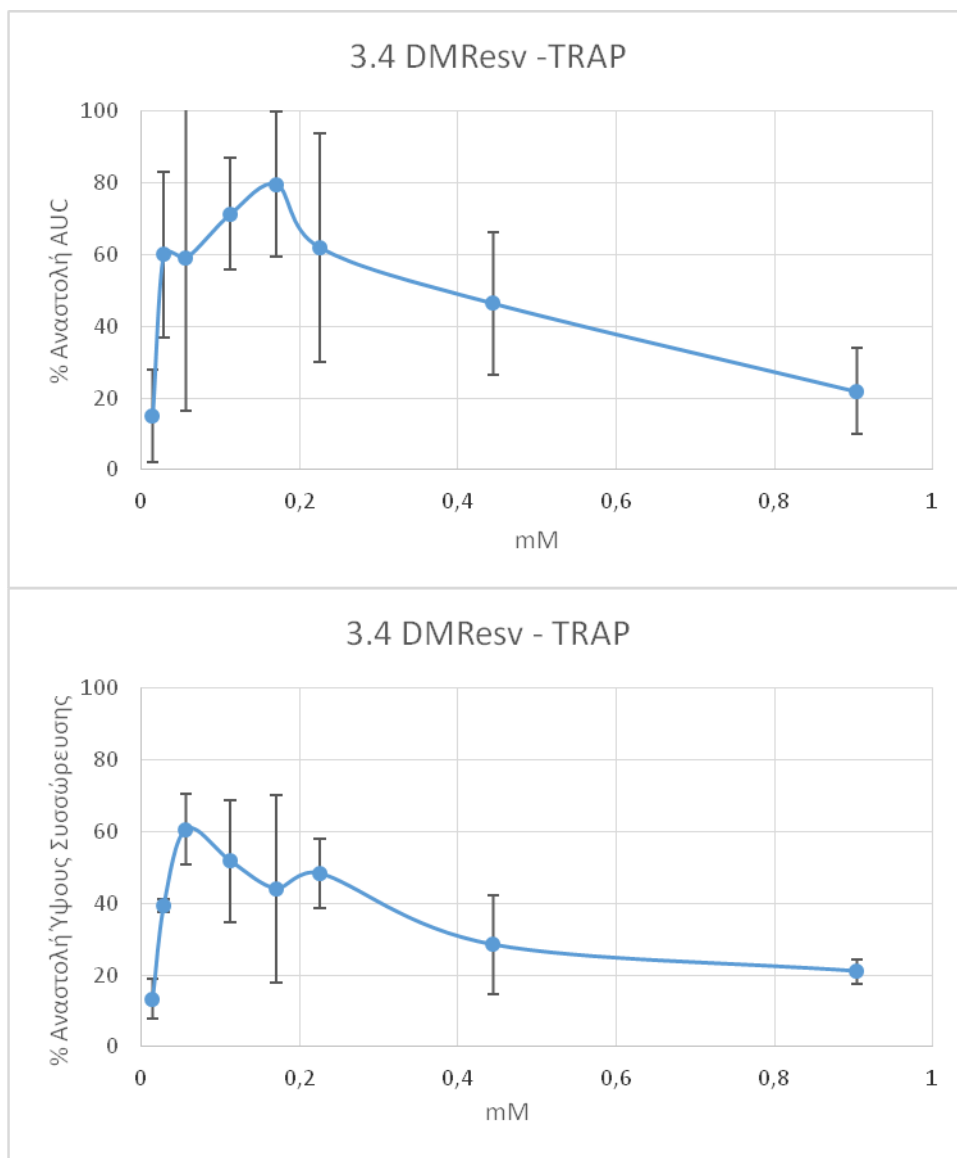


Διάγραμμα 20

Τα σημεία που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό του IC50 με βάση το ύψος της συσσώρευσης και το εμβαδόν κάτω από τη καμπύλη

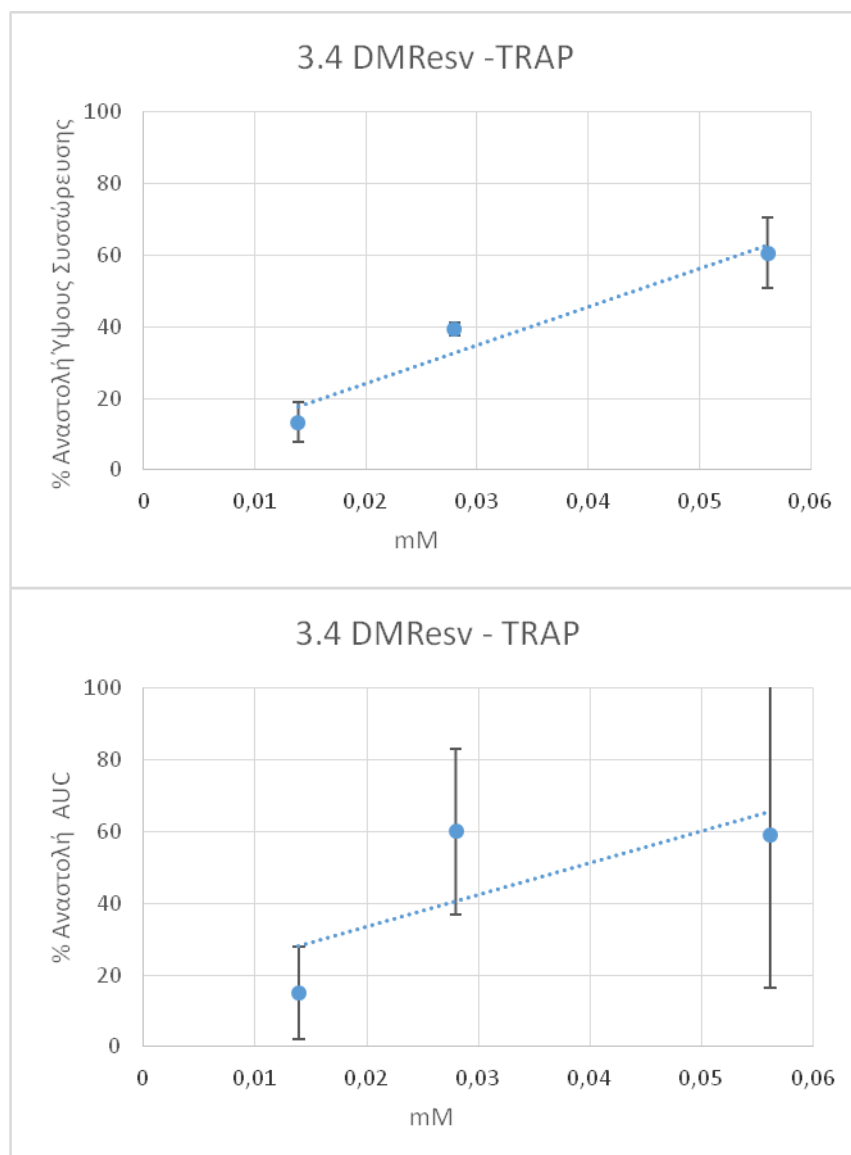
5.2.4.3 TRAP

Στο TRAP η 3.4 Δι-Μεθυλο- Ρεσβερατρόλη εμφάνισε τη μεγαλύτερη δραστικότητα. Η αναστολή που προκάλεσε ήταν πάνω από 50% και μάλιστα στις μικρότερες συγκεντρώσεις. (Διάγραμμα 20). Το IC₅₀ με βάση το ύψος συσσώρευσης είναι 44 μ M και με βάση το AUC είναι 38 μ M. Τα σημεία που πήραμε για να υπολογίσουμε το IC₅₀ παρουσιάζονται στο διάγραμμα 21.



Διάγραμμα 21

Η επίδραση της 3.4 Δι-Μεθυλο- Ρεσβερατρόλης στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων έναντι του TRAP. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % αναστολή α) του ύψους της καμπύλης συσσώρευσης (Amplitude) και β) της περιοχής κάτω από τη καμπύλη (AUC) απουσία ρεσβερατρόλης



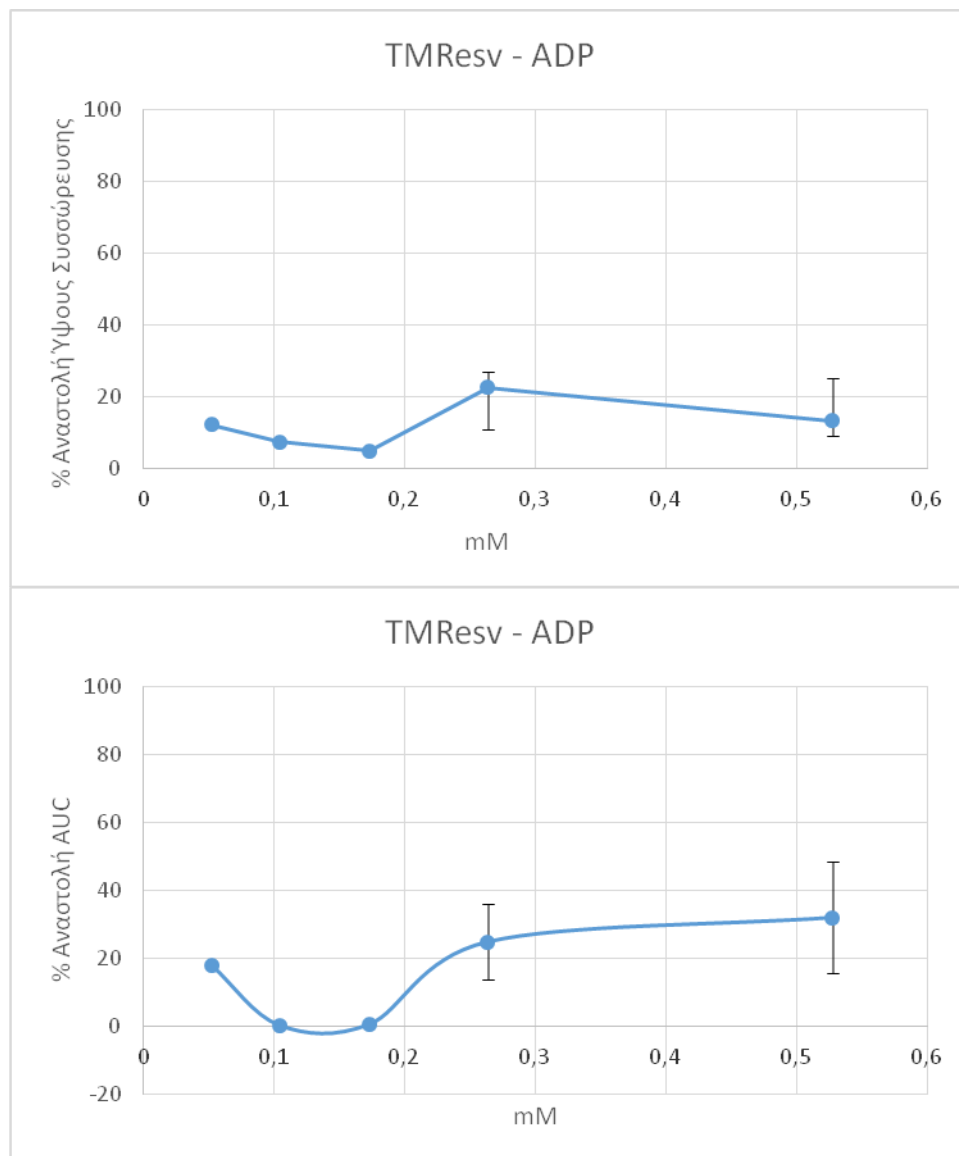
Διάγραμμα 22

Τα σημεία που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό του IC50 με βάση το ύψος της συσσώρευσης και το εμβαδόν κάτω από τη καμπύλη

5.2.5 Τρι-Μέθυλο Ρεσβερατρόλη

5.2.5.1 ADP

Η Τρι-Μέθυλο Ρεσβερατρόλη δεν έκανε κάποια μεγάλη αναστολή, ακόμα και στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ήταν περίπου στο 20% με βάση το ύψος της συσσώρευσης. (Διάγραμμα 22)

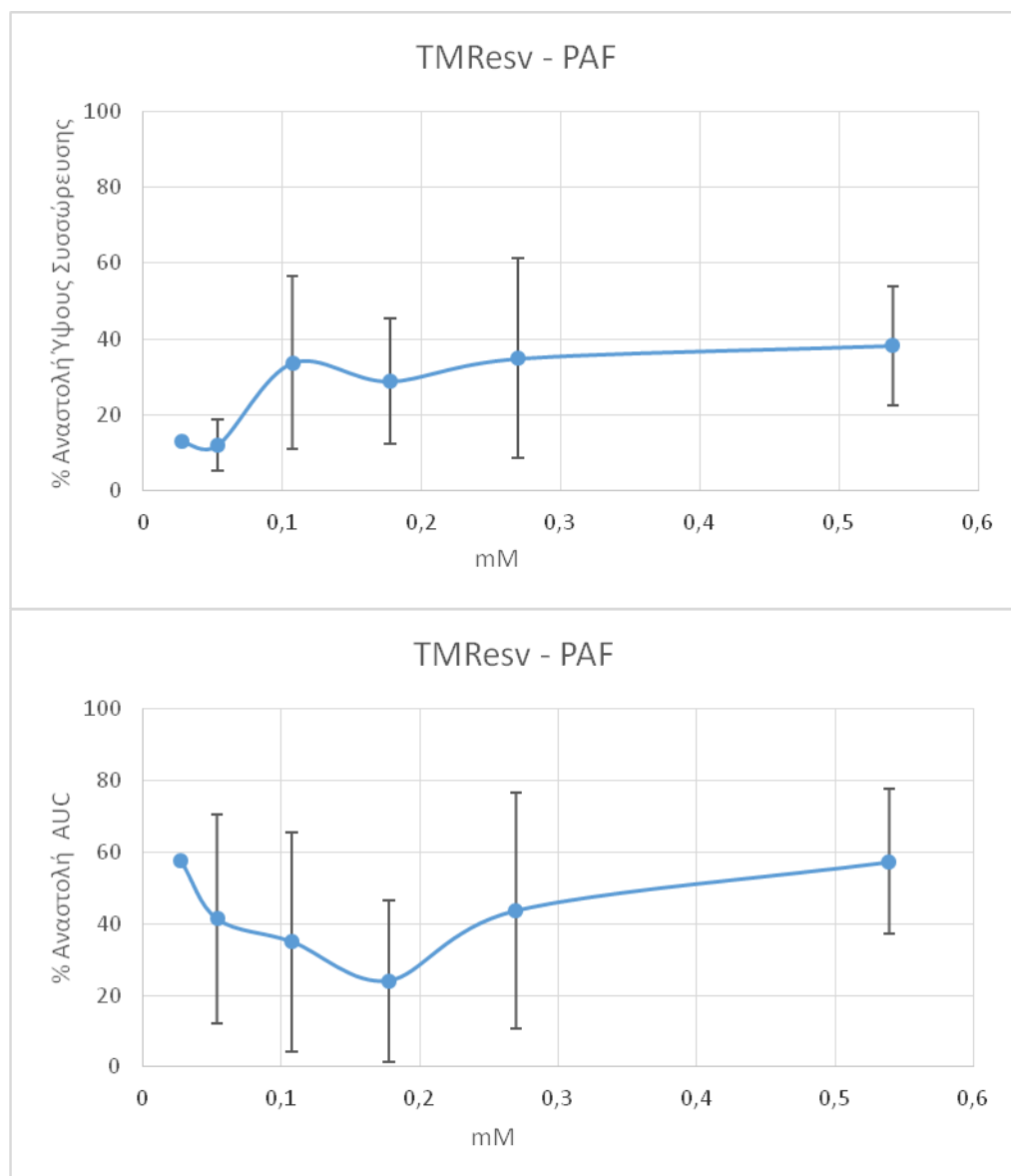


Διάγραμμα 23

Η επίδραση της Τρι-Μεθυλο Ρεσβερατρώλης στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων έναντι του ADP. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % αναστολή α) του ύψους της καμπύλης συσσώρευσης (Amplitude) και β) της περιοχής κάτω από τη καμπύλη (AUC) απουσία ρεσβερατρώλης

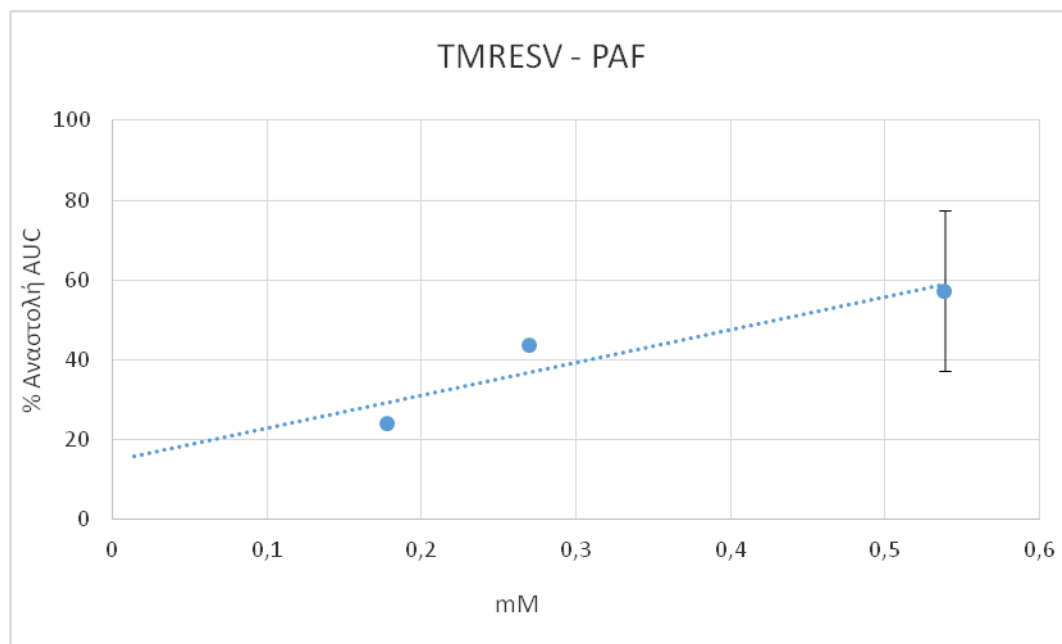
5.2.5.2 PAF

Στο PAF επίσης δεν έδειξε κάποια αναστολή, με βάση το ύψος της συσσώρευσης (Διάγραμμα 23), οπότε δεν υπολογίστηκε IC₅₀ αλλά με βάση το AUC το IC₅₀ είναι 429 μΜ. (Διάγραμμα 24)



Διάγραμμα 24

Η επίδραση της Τρι-Μεθυλο- Ρεσβερατρόλης στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων έναντι του PAF. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % αναστολή α) του ύψους της καμπύλης συσσώρευσης (Amplitude) και β) της περιοχής κάτω από τη καμπύλη (AUC) απουσία ρεσβερατρόλης

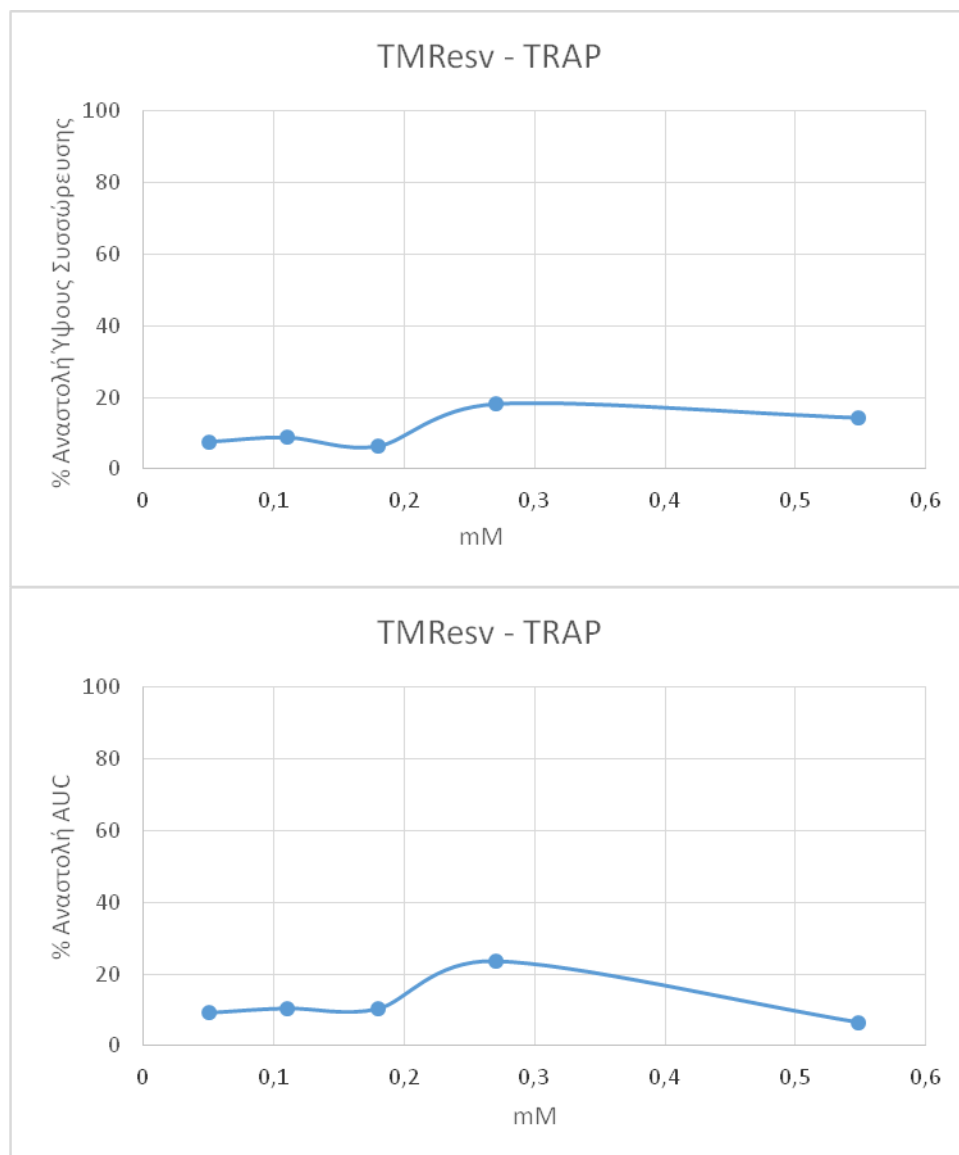


Διάγραμμα 25

Τα σημεία που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό του IC₅₀ με το εμβαδόν κάτω από τη καμπύλη

5.2.5.3 TRAP

Τέλος η αναστολή που προκάλεσε η Τρι-μέθυλο Ρεσβερατρόλη και στο TRAP ήταν αμελητέα, της τάξης του 20%(Διάγραμμα 25)



Διάγραμμα 26

Η επίδραση της Τρι-Μεθυλο- Ρεσβερατρόλης στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων έναντι του TRAP. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % αναστολή α) του ύψους της καμπύλης συσσώρευσης (Amplitude) και β) της περιοχής κάτω από τη καμπύλη(AUC) απουσία ρεσβερατρόλης

Πίνακας 2: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της συγκέντρωσης με βάση το IC50% των ουσιών που μελετήθηκαν στους τρεις συσσωρευτικούς παράγοντες με βάση το ύψος συσσώρευσης και το AUC

ΟΥΣΙΑ	ΣΥΣΣΩΡΕΥΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ					
	ADP		PAF	TRAP		
	Ύψος Συσσώρευσης (μM)	AUC (μM)	Ύψος Συσσώρευσης (μM)	AUC (μM)	Ύψος Συσσώρευσης (μM)	AUC (μM)
<i>Ρεσβερατρόλη</i>	550	420	80	-	288	173
<i>3-Μέθυλο Ρεσβερατρόλη</i>	I<50%	I<50%	346	113	73	19
<i>4-Μέθυλο Ρεσβερατρόλη</i>	I<50%	I<50%	I<50%	I<50%	9	10
<i>Δι-μέθυλο Ρεσβερατρόλη</i>	I<50%	I<50%	256	170	197	154
<i>3,4-Δι-Μέθυλο Ρεσβερατρόλη</i>	563	125	765	280	44	38
<i>Τρι-Μέθυλο Ρεσβερατρόλη</i>	I<50%	I<50%	I<50%	I<50%	I<50%	I<50%

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι καρδιακές παθήσεις αποτελούν μια από τις κυριότερες αιτίες νοσηρότητας και θανάτου στις ανεπτυγμένες χώρες. Έχει φανεί όμως ότι κάποιες αλλαγές στο τρόπο ζωής και στη διατροφή δρουν προστατευτικά. Η μεσογειακή διατροφή η οποία είναι πλούσια σε φρούτα, λαχανικά, στο ελαιόλαδο και το κρασί κερδίζει συνεχώς έδαφος όσον αφορά τη καρδιοπροστατευτική της δράση.

Η φαινολική ένωση ρεσβερατρόλη που βρίσκεται στο σταφύλι θεωρείται ότι είναι σημαντική όσον αφορά τη καρδιοπροστατευτική της δράση. Η ρεσβερατρόλη υπάρχει στα σταφύλια, στο κρασί, τα φιστίκια και σε άλλα φυτικά προϊόντα διατροφής. Είναι μια λιποδιαλυτή ένωση που εμφανίζεται σε δύο μορφές: τη trans και τη cis μορφή. Η παραγωγή της ρεσβερατρόλης γίνεται σε απάντηση κάποιων στρεσογόνων καταστάσεων που υπόκεινται τα φυτά όπως παραδείγματος χάριν της προσβολής από μύκητες ή της UV ακτινοβολίας.⁹⁷

Παρόλο που η απορρόφηση της ρεσβερατρόλης είναι ικανοποιητική η βιοδιαθεσιμότητά της είναι χαμηλή. Η χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα της ρεσβερατρόλης είναι ένας παράγοντας που μπορεί να μειώσει την αποτελεσματικότητά της. Για αυτό και οι επιστήμονες έστρεψαν το ενδιαφέρον τους στην σύνθεση και την μελέτη της δράσης των συνθετικών παραγώγων της. Έχει φανεί ότι η μεθυλίωση αυξάνει την λιποφιλικότητα του μορίου με αποτέλεσμα την αύξηση της δραστηριότητάς της. Παρόλο που έχει μελετηθεί εκτενώς η δράση της ρεσβερατρόλης και των παραγώγων της σε σχέση με διάφορα νοσήματα όπως διάφορες μορφές καρκίνου, διαβήτη, παχυσαρκία και καρδιαγγειακά νοσήματα, τα δεδομένα που αφορούν την αντιαιμοπεταλιακή δράση της ρεσβερατρόλης και των μεθυλιωμένων παραγώγων της είναι περιορισμένα.

Στην παρούσα ερευνητική εργασία μελετήθηκε η αντιαιμοπεταλιακή δράση της ρεσβερατρόλης και των συνθετικών μεθυλιωμένων παραγώγων της. Η αιμοπεταλιακή συσσώρευση προκλήθηκε με προσθήκη των συσσωρευτικών παραγόντων ADP, PAF και TRAP. Μελετήθηκε η δράση της ρεσβερατρόλης (RSV), της 3-μέθυλορεσβερατρόλης(3MR), της 4-μέθυλορεσβερατρόλης (4MR), της 3, 5 δι-

μεθυλορεσβερατρόλης (DMR), της 3,4 δι-μέθυλορεσβερατρόλης(3,4DMR), και της τριμέθυλορεσβερατρόλης (TMR), σε διάφορες συγκεντρώσεις.

Σε σχέση με τον συσσωρευτικό παράγοντα ADP η RSV έδειξε μια αναστολή της τάξης του 50% σε συγκέντρωση 550 μ M. Παρόμοια δράση και σε παρόμοια συγκέντρωση (563 μ M) με την RSV εμφάνισε και η 3,4DMR (50% αναστολή). Οι 3MR, DMR, TMR παρουσίασαν περίπου 25% αναστολή (το μισό της αναστολής που προκάλεσε η RSV) σε παρόμοιες συγκεντρώσεις. Η 4MR παρουσίασε την μικρότερη αναστολή (14%).

Σε σχέση με τον συσσωρευτικό παράγοντα PAF η RSV έδειξε μια αναστολή της τάξης του 50% σε συγκέντρωση 80 μ M ενώ οι 3MR, DMR, 3,4DMR παρουσίασαν περίπου 50% αναστολή σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Οι 4MR και TMR παρουσίασαν μεταξύ τους παρόμοια αναστολή, 20% και 30% αντίστοιχα στην μεγαλύτερη δυνατή συγκέντρωση.

Τέλος στο συσσωρευτικό παράγοντα TRAP η RSV εμφάνισε την χαμηλότερη αναστολή σε σχέση με το ADP και PAF. Από όλα τα παράγωγα η 3-μεθυλορεσβερατρόλη, η 4-μεθυλορεσβερατρόλη 3,4-διμεθυλορεσβερατρόλη φάνηκε να είναι πιο δραστικές από την ρεσβερατρόλη έναντι του TRAP και η 4-μεθυλορεσβερατρόλη φάνηκε να είναι η πιο δραστική. Τέλος η TMR εμφάνισε το μικρότερο ποσοστό στην μεγαλύτερη συγκέντρωση.

Η ρεσβερατρόλη είχε την μεγαλύτερη αντιαιμοπεταλιακή δράση έναντι του PAF και στο ADP στην μικρότερη συγκέντρωση. Η 3MR δεν έδειξε σημαντική αναστολή στο ADP ενώ η μεγαλύτερη αντιαιμοπεταλιακή δράση στην μικρότερη συγκέντρωση ήταν έναντι του TRAP. Η 4MR είχε σημαντική αναστολή έναντι του TRAP, ενώ στους άλλους συσσωρευτικούς παράγοντες η αναστολή ήταν αμελητέα. Η DMR παρουσιάζει την ίδια αναστολή στο PAF και TRAP και ασήμαντη έναντι του ADP. Η 3,4DMR εμφάνισε αναστολή και στους 3 συσσωρευτικούς παράγοντες με τη μεγαλύτερη αναστολή στη μικρότερη συγκέντρωση στο TRAP. Τέλος η TMR δεν εμφάνισε κάποια σημαντική αναστολή σε κανέναν από τους τρεις συσσωρευτικούς παράγοντες. Από το σύνολο των παρατηρούμενων ποσοστών αναστολής και σε συνδυασμό με τις χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις της ρεσβερατρόλης και των

παραγώγων της η ελάχιστη δραστικότητα παρατηρήθηκε στην τριμέθυλορεσβερατρόλη έναντι και των τριών συσσωρευτικών παραγόντων και η μεγαλύτερη στην 4 μέθυλορεσβερατρόλη έναντι του TRAP. Εκτός της TMR, τα υπόλοιπα παράγωγα της ρεσβερατρόλης εμφάνισαν μεγαλύτερη δραστικότητα έναντι του TRAP.

Όσον αφορά λοιπόν τη σχέση δομής δράσης, σε σχέση με το συγκεκριμένο πείραμα προέκυψαν τα εξής συμπεράσματα. Όταν η ρεσβερατρόλη μεθυλιωθεί και στις τρεις θέσεις της, δεν εμφανίζει κάποια δραστικότητα. Η μεθυλίωση σε μια θέση (είτε στη 3, είτε στη 4) ή σε δυο θέσεις (3-5 ή 3-4') φαίνεται να είναι πιο δραστική και κυρίως έναντι του TRAP.

Σε σχέση με τη βιβλιογραφία όσον αφορά τα μεθυλιωμένα παράγωγα τα δεδομένα είναι πολύ περιορισμένα. Δεν υπάρχουν άλλες έρευνες που να έχουν μελετήσει μεθυλιωμένα παράγωγα συνεπώς δε μπορούμε να συγκρίνουμε άμεσα τα αποτελέσματά μας.

Σε μια έρευνα που έγινε σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού έναντι του PAF φάνηκε ότι τα ακετυλιωμένα παράγωγα ρεσβερατρόλης και κυρίως τα ακετυλιωμένα σε 2 θέσεις ήταν περισσότερο δραστικά από τη ρεσβερατρόλη σε σχέση με τα μεθυλιωμένα που δεν έδειξαν κάποια δράση έναντι του PAF.⁹⁰ Σε άλλη μελέτη φάνηκε ότι το περοστιλβένιο(3,5 μέθυλο ρεσβερατρόλη) έδειξε την δραστικότητα σε σχέση με τη ρεσβερατρόλη έναντι του κολλαγόνου σε πλυμένα αιμοπετάλια.⁹⁸ Τέλος μελέτηθηκε και υβρίδιο ρεσβερατρόλης το οποίο επάγει τη σύνθεση του NO, όπου φάνηκε να προκαλεί μια αναστολή της σωσώρευσης των αιμοπεταλίων της τάξης του 50-70% σε PRP έναντι του ADP, αραχιδονικού και κολλαγόνου.⁹⁹

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι η μεθυλίωση μπορεί να επηρεάσει την ικανότητα της ρεσβερατρόλης να αναστέλει την συσσώρευση των αιμοπεταλίων καθώς και ότι είναι σημαντική η θέση στην οποία λαμβάνει χώρα η μεθυλίωση για την εκδήλωση της αντι-αιμοπεταλιακής δράσης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Γεώργιος Ηλιόπουλος, 1989, “Φυσιολογία και Φυσιοπαθολογία του αίματος και των αιμοποιητικών οργάνων”, ,Π.Χ.Πασχαλίδης
2. Kehrel B ,1995, “Platelet receptors for collagen”,Platelets,6:11-16
3. Alberio L,Dale GL,1998,”Flow cytometric analysis of platelet activation by different collagen types present in the vessel wall”.Br J Haematol, 102:1212-1218
4. Wu KK, Kulmacz RJ, Wang L-H, et al., 1992, “Molecular biology of prostacyclin biosynthesis. In Prostacyclin:New Prospectives for Basic Research and Novel Therapeutic Indications”, GM Rubanyi J Vane, pp 11–23. New York: Elsevier Science
5. Kumar V, Robbins S., Aster J.,2013, “Robbins Basic Pathology 9th Edition”,Philadelphia
6. Moncada S, Vane JR.,1979, “Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A2 and prostacyclin” , Pharmacol. Rev.30:293–331
7. Gemma Vilahur et al., 2013, “Antiplatelet properties of natural products”, Elsevier, Vascul Pharmacol. ,10.1016/j.vph.2013.08.002.
8. Marcus AJ, Safier LB, Haffar KA, et al., 1990,” Inhibition of platelet function by an aspirin-insensitive endothelial cell ADPase” , J. Clin. Invest.88:1690–96
9. Coppinger JA, Cagney G, Toomey S, et al., 2004, “Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions”, Blood;103:2096-2104
10. Gawaz M, Langer H, May AE.,2005, “Platelets in inflammation and atherogenesis”, J Clin Invest ,;115:3378-3384
11. Xiaohong Ruby Xu et.al. ,2016,”Platelets and platelet adhesion molecules:novel mechanisms of thrombosis and anti-thrombotic therapies”, The Author(s)Thrombosis Journal14(Suppl 1):29DOI 10.1186/s12959-016-0100-6)
12. Ruggeri,Z.M.,2002, “Platelets in atherothrombosis”, Nature. Med.,8:1227–1234

13. Massberg, S., et al., 2003, "A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo", J. Exp. Med., 197:41–49
14. Nieswandt, B., et al. , 2001, "Glycoprotein VI but not $\alpha 2\beta 1$ integrin is essential for platelet interaction with collagen". EMBO J., 20:2120–2130
15. Nieswandt, B., and Watson, , 2003, S.P. "Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor?", Blood., 102:449–461
16. Andrew L. Frelinger III, 2014, "Platelet Activation and Inhibition in Sickle cell disease (PAINS) study", Platelets, DOI: 10.3109/09537104.2013.770136
17. Versteeg Henri H., Johan W. M. Heemskerk, Marcel Levi, Pieter H. Reitsma, 2013, "New Fundamentals in Hemostasis", Physiological Reviews Published 1 January Vol. 93 no. 1, 327-358 DOI: 10.1152/physrev.00016.2011
18. Aslam M, Sedding D, Koshty A, Santoso S, Schulz R, Hamm C, Gündüz D. , 2013, "Nucleoside triphosphates inhibit ADP, collagen, and epinephrine-induced platelet aggregation: role of P2Y₁ and P2Y₁₂ receptors", Thromb Res. Nov;132(5):548-57. doi: 10.1016/j.thromres.2013.08.021.
19. Demopoulos CA, Pinckard RN, Hanahan DJ, 1979, "Platelet-activating factor, Evidence for 1-o-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine as the active component(a new class of lipid chemical mediators)", J Biol Chem Oct 10;254(19):9355-8 S
20. Preeti Singh, Ishwari Narayan Singh, Sambhu Charan Mondal, Lubhan Singh , Vipin Kumar Garg , 2013, "Platelet-activating factor (PAF)-antagonists of natural origin", Fitoterapia ;84:180-201. doi:10.1016/j.fitote.2012.11.002
21. Anna Reznichenko and Ron Korstanje , 2014, "The Role of Platelet-Activating Factor in Mesangial Pathophysiology" , The American Journal of Pathology, 185: 888 - 896; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.11.025>
22. C.A. Demopoulos, H.C. Karantonis and S. Antonopoulou, 2003, "Platelet activating factor-a molecular link between atherosclerosis theories", Eur.J.Lipid Sci.Technol., 150,705

23. Parwinder Gill, MD, Nina Lakhani Jindal, MD, Amanda Jagdis, MD, and Peter Vadas, MD, PhD, 2015, "Platelets in the immune response: Revisiting platelet-activating factor in anaphylaxis", American Academy of Allergy, Asthma & Immunology ://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2015.04.019
24. Regina Landesberg et al., 2005, "*Activation of platelet-rich plasma using thrombin receptor agonist peptide*", Oral and maxillofacial surgery, doi.org/10.1016/j.joms.2004.12.007
25. Bernhard C. Lechtenberg, Stefan M.V. Freund, and James A. Huntington, 2014, "*Gplba Interacts Exclusively with Exosite II of Thrombin*", J Mol Biol. Feb 20; 426(4): 881–893. doi: 10.1016/j.jmb.2013.11.027
26. Vallerinteavide Mavelli Girish¹ and R. Manjunatha Kini, 2016, "Exactin: A specific inhibitor of Factor X activation by extrinsic tenase complex from the venom of *Hemachatus haemachatus*", Scientific Reports.; 6: 32036. doi: 10.1038/srep32036
27. Stephanie A. Smith, Richard J. Travers, and James H. Morrissey, 2015, "*How it all starts: initiation of the clotting cascade*", Crit Rev Biochem Mol Biol.; 50(4): 326–336. doi: 10.3109/10409238.2015.1050550
28. Λουκόπουλος Δ., Μαριάννα Π., 2015. "*Μαθήματα αιματολογίας*". (ηλεκτρ. βιβλ.) Αθήνα: Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών
29. Rappaport SI, Rao LV., 1991, "*Initiation and regulation of tissue factor-dependent blood coagulation*". Arterioscler. Thromb. 12:1111–21
30. Girard TJ, Broze GJ Jr., "*Tissue factor pathway inhibitor*", 1993, Methods Enzymol. 222:195–209
31. Dahlback B., 1984, "*Interaction between vitamin K-dependent protein S and complement protein, C4b-binding protein*". Semin. Thromb. Haemost. 10:139–45
32. Fukudome K, Esmon CT., 1995, "*Molecular cloning and expression of murine and bovine endothelial cell protein C/activated protein C receptor (EPCR)*", J. Biol. Chem. 270:5571–76)
33. Esmon CT., 1993, "*Molecular events that control the protein C anticoagulant pathway*", Thromb. Haemost. 70:29–35

34. Thompson EA, Salem HH. ,1986, "*Inhibition of human thrombomodulin of factor Xa mediated cleavage of prothrombin*" , J. Clin.Invest.78:13–17
35. Preissner KT, Delvos U, Muller-BergausG. ,1987, "*Binding of thrombin to thrombomodulin accelerates inhibition of the enzyme by antithrombin III. Evidence for heparin-independent mechanism*", Biochemistry26:2521–28)
36. Esmon, C.T., Fukudome, K., Mather, T., Bode, W., Regan, L.M.,Stearns-Kurosawa, J. & Kurosawa, S. ,1999, "*Inflammation, sepsis,and coagulation*", Haematologica,84,254–259
37. Degen, J.L. ,2001, "*Genetic interactions between the coagulation and fibrinolytic systems*", Thrombosis and Haemostasis,86,130–137.
38. Hajjar, K.A. ,2003a, "*The endothelium in thrombosis and hemorrhage*.In:*Thrombosis and Hemorrhage*"(ed. by J. Loscalzo & A.I. Schaefer),pp. 206–219. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, USA.
39. Kolev, K. & Machovich, R. ,2003, "*Molecular and cellular modulation of fibrinolysis*", *Thrombosis and Haemostasis*,89,610–621
40. Andrew J. Gale , 2011, "*Current Understanding of Hemostasis*", Toxicol Pathol. 39(1): 273–280. doi:10.1177/0192623310389474
41. Bu G, Warshawsky I, Schwartz AL. ,1994, "*Cellular receptors for the plasminogen activators*", Blood;83(12):3427–36
42. Rau JC, Beaulieu LM, Huntington JA, Church FC.,2007, "*Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis*",J Thromb Haemost.; 5(Suppl 1):102–115. [PubMed: 17635716]
43. Subhendu Mukherjee, Jocelyn I. Dudley, Dipak K. Das, 2010, "*Dose-Dependensy of resveratrol in providing health benefits*",Dose-Response,8:478–500, DOI: 10.2203/dose-response.09-015.Mukherjee
44. Harborne, J. B. Bell EA, Charlwood BV, Archer B. ,1980, "*Plant phenolics*. In *Secondary plant products*" (ed.). Berlin: Springer-Verlag, 330-402
45. Tomás-Barberán, F. A., & Espín, J. C.,2001, "*Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables*",Journal of the Science of Food and Agriculture, 81(9), 853-876

46. R.A.Dixon,P.M.Dey,andC.J.Lamb ,1983, "*Phytoalexins: enzymology and molecular biology*", Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology ,vol.55,pp.1–136
47. Scalbert, A, & Williamson, G.,2000, "*Dietary intake and bioavailability of polyphenols*,Journal of nutrition", 130, 2073S-2085S
48. Manjeet S. et al., 2008, "*Challenges for Research on Polyphenols from Foods in Alzheimer's Disease: Bioavailability, Metabolism, and Cellular and Molecular Mechanisms*", J. Agric. Food Chem. 56,4855–4873 4855
49. American Society for Nutrition AdvNutr 2015;6:620–2; doi:10.3945/an.115.009233
50. Andersen OM, Jordheim M.,2013, "*Basic anthocyanin chemistry and dietary sources*".In: Wallace TC, Giusti MM, editors. Anthocyanins in health and disease. Boca Raton (FL): CRC Press;. p. 13–90
51. Jim Fang, 2014, "Bioavailability of anthocyanins", Drug Metabolism Review; 46(4): 508–520 DOI: 10.3109/03602532.2014.978080
52. Manach Claudine, et al.,2004, "*Polyphenols: food sources and bioavailability*". The American journal of clinical nutrition 79.5: 727-)747
53. King-Thom Chung , Tit Yee Wong , Cheng-I Wei , Yao-Wen Huang & Yuan Lin , 1998, "*Tannins and Human Health: A Review*",Critical Reviews in Food Science and Nutrition,38:6, 421-464, DOI: 10.1080/10408699891274273
54. Rebecca J. Robbins , 2003, "*Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology*", J. Agric. Food Chem. , , 51,2866–2887
55. Yang, C. S., Landau, J. M., Huang, M. T., & Newmark, H. L. ,2001, "*Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds*",Annual Review of Nutrition, 21,381-406
56. Andreasen, M. F.; Christensen, L. P.; Meyer, A. S.; Hansen, A., 2000, "*Content of phenolic acids and ferulic acid dehydrodimers in 17rye (Secale cerealeL.) varieties*" ,J. Agric. Food Chem.,48, 2837-2842.
57. B. Halliwell and J. M. C. Gutteridge, 1998, "*Free Radicals in Biology and Medicine*" ,Oxford University Press, Oxford, UK

58. A.Mishra, S. Kumar, and A. K. Pandey, 2013, "*Scientific validation of the medicinal efficacy of Tinospora cordifolia*",The ScientificWorld Journal ,ArticleID292934
59. G. Cao, E. Sofic, and R. L. Prior, 1997, "*Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships*",Free Radical Biology and Medicine, vol. 22, no. 5, pp. 749–760
60. Witztum JL, Steinberg D.,1991, "*Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis*", J. Clin. Invest., ,88 1785–92
61. M. J. Tunon, M. V. Garcia-Mediavilla, S. Sanchez-Campos, and J. Gonzalez-Gallego, 2009, "*Potential of flavonoids as antiinflammatory agents: modulation of pro-inflammatory gene expression and signal transduction pathways*" ,Current Drug Metabolism vol.10,no.3,pp.256–271
62. Xanthopoulou MN,Asimakopoulos D,Antonopoulou S, Demopoulos C.A.,Fragopoulou E., 2014, "Effect of Robola and Cabernet Sauvignon extracts on platelet activating factor enzymes activity on U937 cells",Food Chemistry, Dec 15:165:50-9
63. Vlachogianni IC,Fragopoulou E,Stamatakis GM,Kostakis IK,Antonopoulou S. ,2015, "*Platelet Activating Factor(PAF) biosynthesis is inhibited by phenolic compounds in U-937 cells under inflammatory conditions*",Prostaglandins Other Lipid Mediat
64. Pei-Ying Zhang,2015, "*Cardioprotection by Phytochemicals via Antiplatelet Effects and Metabolism Modulations*",Cell Biochem Biophys DOI 10.1007/s12013-015-0612-x
65. S. Mosawy,D. E. Jackson,O. L. Woodman,M. D. Linden, 2013, "*Treatment with quercetin and 3',4'-dihydroxyflavonol inhibits platelet function and reduces thrombus formation in vivo*", J Thromb Thrombolysis , , 36:50–57 DOI 10.1007/s11239-012-0827-2
66. Navarro-Núñez et al.,2008, "*Apigenin inhibits platelet adhesion and thrombus formation and synergizes with aspirin in the suppression of the arachidonic acid pathway*", Journal of agricultural and food chemistry 56.9: 2970-2976
67. Eduardo Fuentes, Francisco Fuentes & Ivan Palomo , 2013, "*Mechanism of the anti-platelet effect of natural bioactive compounds:Role of peroxisome*

- proliferator-activated receptors activation*”, Platelets, DOI: 10.3109/09537104.2013.849334
68. Bertelli A1, Giovannini L, Giannessi D, Migliori M, Bernini W, Fregoni M, 1995, “*Antiplatelet activity of synthetic and natural resveratrol in red wine*”, Int J Tissue React.;17(1):1-3.
 69. Feng L1, Jin J, Zhang LF, Yan T, Tao WYActa Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2006, “*Analysis of the resveratrol-binding protein using phage-displayed random peptide library*”, May;38(5):342-8.
 70. Bresciani L1, Calani L1, Bocchi L2, Delucchi F2, Savi M2, Ray S3, Brighenti F4, Stilli D5, Del Rio D6.,2014, “*Bioaccumulation of resveratrol metabolites in myocardial tissue is dose-time dependent and related to cardiac hemodynamics in diabetic rats*”, Nutr Metab Cardiovasc Dis. Apr;24(4):408-15. doi: 10.1016/j.numecd.2013.09.008. Epub 2013 Oct 23
 71. Ramprasath VR1, Jones PJ. ,2010, “*Anti-atherogenic effects of resveratrol*”, Eur J Clin Nutr. Jul;64(7):660-8. doi: 10.1038/ejcn.2010.77. Epub 2010 May 19
 72. Gambini J1, Inglés M2, Olaso G1, Lopez-Grueso R3, Bonet-Costa V1, Gimeno-Mallench L1, Mas-Bargues C1, Abdelaziz KM1, Gomez-Cabrera MC1, Vina J1, Borras C1, 2015, “*Properties of Resveratrol: In Vitro and In Vivo Studies about Metabolism, Bioavailability, and Biological Effects in Animal Models and Humans*”, Oxid Med Cell Longev. ;2015:837042. doi: 10.1155/2015/837042.
 73. Meishiang Jang et al. ,1996, “*Cancer Chemopreventive Activity*”, Science,
 74. Regev-Shoshani G, Shoseyov O, Bilkis I, Kerem Z.,2003, “*Glycosylation of resveratrol protects it from enzymic oxidation*”, Biochem J;374:157-63
 75. D.Delmas,V.Aires,E.Limagneetal.,2011,“*Transport, stability, and biological activity of resveratrol,*”, Annals of the New York Academy of Sciences,vol.1215,no.1,pp.48–59
 76. Jessica Walker, 2014,“*Resveratrol and its metabolites inhibit pro-inflammatory effects of lipopolysaccharides in U-937 macrophages in plasma-representative concentrations*”, The Royal Society of Chemistry
 77. Joana Ruivo,Cátia Francisco,Rita Oliveira,Ana Figueiras, 2015,“*The main potentialities of resveratrol for drug delivery systems*”, Braz. J. Pharm.

78. Gambini J, Inglés M, Olaso G, Lopez-Grueso R, Bonet-Costa V, Gimeno-Mallench L, Mas-Bargues C, Abdelaziz KM, Gomez-Cabrera MC, Vina J, Borrás C, 2015, "*Properties of Resveratrol: In Vitro and In Vivo Studies about Metabolism, Bioavailability, and Biological Effects in Animal Models and Humans*", *Oxid Med Cell Longev.*;2015:837042. doi: 10.1155/2015/837042
79. Baur, J. A. & Sinclair, D. A.,2006," *Resveratrol and the French Paradox*" ,*Nature Reviews Drug Discovery*
80. Srinivasan VS. ,2001, "*Bioavailability of nutrients: a practical approach to in vitro demonstration of the availability of nutrients in multivitamin-mineral combination products*". *J Nutr*;131:1349S-50S
81. Creina Stockley, Pierre-Louis Teissedre, Mladen Boban, Chiara Di Lorenzo and Patrizia Restani ,2011,"*Bioavailability of wine-derived phenolic compounds in humans: a review*," *Food & Function* DOI: 10.1039/c2fo10208k
82. Sabine Weiskirchen and Ralf Weiskirchen , 2016,"*Resveratrol: How Much Wine Do You Have to Drink to Stay Healthy?*" *Adv Nutr* ,;7:706–18; doi:10.3945/an.115.011627
83. Walle,T.,F.Hsieh,M.H.DeLegge, et al. 2004. "*High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans*", *Drug Metab. Dispos.*32:1377–1382
84. Maier-Salamon A, Hagenauer B, Wirth M, Gabor F, Szekeres T, Jäger W. ,2006, "*Increased transport of resveratrol across monolayers of the human intestinal Caco-2 cells is mediated by inhibition and saturation of metabolites*", *Pharm Res.* 2006 Sep;23(9):2107-15. Epub Aug 9.
85. Mikstacka R, Przybylska D, Rimando AM, Baer-Dubowska W.,2007, "*Inhibition of human recombinant cytochromes P450 CYP1A1 and CYP1B1 by trans-resveratrol methyl ethers*",*Mol Nutr Food Res*,51(5):517–524
86. Rimando AM, Suh N,2008, "*Biological/chemopreventive activity of stilbenes and their effect on colon cancer*", *Planta Med*,74(13):1635–1643

87. Betul Catalgol, Saime Batirel, Yavuz Taga, and Nesrin Kartal Ozer, 2012, "*Resveratrol: French Paradox Revisited*", *Frontiers in Pharmacology*. 3: 141.doi: 10.3389/fphar..00141 PMID: PMC3398412
88. Kaneider, N. C., Mosheimer, B., Reinisch, N., Patsch, J. R., Wiedermann, C. J., 2004, "*Inhibition of thrombin-induced signaling by resveratrol and quercetin: effects on adenosine nucleotide metabolism in endothelial cells and platelet-neutrophil interactions*", *Thromb. Res.* 114, 185–194
89. Dobrydneva Y, Williams RL, Blackmore PF., 1999, "*Trans resveratrol inhibits calcium influx in thrombin-stimulated human platelets*", *Br J Pharmacol*;128:149–157
90. Fragopoulou E. et al. ,2007, "*Biological Activity of Acetylated Phenolic Compounds*", *J. Agric. Food Chem.* 55,80-89
91. Pinto MC, Garcia-Barrado JA, Macias P. ,1999, "*Resveratrol is a potent inhibitor of the dioxygenase activity of lipoxygenase*", *J Agric Food Chem*;47:4842–4846
92. Szewczuk LM, Forti L, Stivala LA, Penning TM., 2004, "*Resveratrol is a peroxidase mediated inactivator of COX-1 but not COX-2: A mechanistic approach to the design of COX-1 selective agents*", *J Biol Chem*;12
93. B. Olas, P. Nowak, M. Ponczek and B. Wachowicz, 2006, "*Resveratrol, a Natural Phenolic Compound May Reduce Carbonylation Proteins Induced by Peroxynitrite in Blood Platelets*", *Gen. Physiol. Biophys.* (),25,215—222)
94. Sarfaraz Sadruddin, Rohit Arora, 2008, "*Resveratrol: Biologic and Therapeutic Implications*" ,le jacq, DOI: 10.1111/j.1559-4572.2008.00039.x
95. Ketan R. Pate et. Al., 2013, "*Sulfate Metabolites Provide an Intracellular Pool for Resveratrol Generation and Induce Autophagy with Senescence*", *ScienceTranslationalMedicine.org*, , Vol 5 Issue 205 205ra133
96. Itziar Eseberri et al., 2013, "*Resveratrol Metabolites Modify Adipokine Expression and Secretion in 3T3-L1 Pre-Adipocytes and Mature Adipocytes*", *PLoS One.*; 8(5): e63918

97. Romero-Pérez AI, Ibern-Gómez M, Lamuela-Raventós RM, de La Torre Boronat MC.,1999, "*Piceid, the major resveratrol derivative in grape juices*", J Agric Food Chem;47(4):1533–1536
98. Federica Messina et al, 2015, "*Effect of substituted stilbenes on platelet function*", fitoterapia,10.1016/j.fitote.2015.07.009.
99. Luiz Antonio Dutra, 2017, "*Synthesis, antiplatelet and antithrombotic activities of resveratrol derivatives with NO-donor properties*", Bioorg Med Chem Lett ,doi: 10.1016/j.bmcl.2017.04.007.