ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ:

ΣΥΝΘΕΣΗ, ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΑΚΕΤΥΛΙΩΜΕΝΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ.

ΑΠΟΣΤΟΛΑΚΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΑΜ 20158

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ***ΑΝΤΩΝΟΠΟΥΛΟΥ ΣΜΑΡΑΓΔΗ***

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:
ΑΝΤΩΝΟΠΟΥΛΟΥ ΣΜΑΡΑΓΔΗ
ΝΟΜΙΚΟΣ ΤΖΩΡΤΖΗΣ
ΚΑΡΑΝΤΩΝΗΣ ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	**1**
1.ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ	**2**
1.1 Εισαγωγή	**2**
1.2 Δομή – κατηγορίες φαινολικών ενώσεων	**2**
1.2.1 Φαινολικά οξέα	**3**
1.2.2 Φλαβονοειδή	**3**
1.2.3 Λιγνάνια	**5**
1.2.4 Στιλβένια	**5**
1.3 Ύπαρξη στα τρόφιμα	**6**
1.4 Βιολογικές δράσεις	**9**
1.4.1 Αντικαρκινική δράση	**9**
1.4.2 Αντιοξειδωτική δράση	**10**
1.4.3 Αγγειοδιασταλτική δράση	**11**
1.4.4 Αντιφλεγμονώδη δράση	**12**
1.4.5 Αντιθρομβωτική δράση	**13**
1.4.6 Ορμονική δράση	**13**
1.4.7 Αντιαλλεργική δράση	**13**
1.4.8 Αντιβακτηριακή δράση	**14**
1.5 Ακετυλιωμένα παράγωγα φαινολικών ενώσεων	**14**
2. ΤΥΡΟΣΟΛΗ	**16**
2.1 Δομή	**16**
2.2 Πηγές	**16**
2.3 Βιοδιαθεσιμότητα – Μεταβολισμός	**17**
2.4 Βιολογικές δράσεις	**18**
3. ΑΚΕΤΥΛΙΩΜΕΝΗ ΤΥΡΟΣΟΛΗ	**20**
3.1 Δομή	**20**
3.2 Πηγές	**20**

3.3 Βιοδιαθεσιμότητα – Μεταβολισμός 21
3.4 Βιολογικές δράσεις 21

4. *trans*-ΡΕΣΒΕΡΑΤΡΟΛΗ 22
4.1 Δομή 22
4.2 Πηγές 22
4.3 Βιοδιαθεσιμότητα – Μεταβολισμός 23
4.4 Βιολογικές δράσεις 24

5. ΑΚΕΤΥΛΙΩΜΕΝΗ *trans*-ΡΕΣΒΕΡΑΤΡΟΛΗ 27
5.1 Δομή 27
5.2 Πηγές 27
5.3 Βιοδιαθεσιμότητα – Μεταβολισμός 28
5.4 Βιολογικές δράσεις 28

6. ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ (PAF) 30
6.1 Εισαγωγή 30
6.2 Δομή 30
6.3 Βιολογικές δράσεις 31

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 34

7. ΣΚΟΠΟΣ 35

8. ΜΕΘΟΔΟΙ 36
8.1 Ακετυλίωση φαινολικών 36
8.2 Διαχωρισμός ακετυλιωμένων φαινολικών ενώσεων με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) 37
8.3 Ήπια αλκαλική υδρόλυση ακετυλιωμένων φαινολικών παραγώγων 38
8.4 Ποσοτικός προσδιορισμός φαινολικών 39

8.5 Βιολογική δοκιμασία συσσώρευσης σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού **40**

8.6 Ενζυμική υδρόλυση ακετυλομάδων φαινολικών **44**

9. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ **46**

9.1 Πειραματική πορεία **46**

9.2 Ακετυλίωση φαινολικών ενώσεων **48**

9.2.1 Ακετυλίωση *trans*-ρεσβερατρόλης **48**

9.2.2 Ακετυλίωση τυροσόλης **48**

9.3 Διαχωρισμός ακετυλιωμένων παραγώγων φαινολικών ενώσεων **49**

9.3.1 Διαχωρισμός ακετυλιωμένων παραγώγων *trans*-ρεσβερατρόλης **49**

9.3.2 Διαχωρισμός ακετυλιωμένων παραγώγων τυροσόλης **51**

9.4 Ποσοτικός προσδιορισμός φαινολικών **53**

9.4.1 Ποσοτικός προσδιορισμός φαινολικών στα ακετυλιωμένα παράγωγα της *trans*-ρεσβερατρόλης **53**

9.4.2 Ποσοτικός προσδιορισμός φαινολικών στα ακετυλιωμένα παράγωγα της τυροσόλης **56**

9.5 Μελέτη βιολογικής δραστικότητας φαινολικών ενώσεων και ακετυλιωμένων παραγώγων τους **57**

9.5.1 Βιολογική δραστικότητα *trans*-ρεσβερατρόλης και ακετυλιωμένων παραγώγων της **58**

9.5.2 Βιολογική δραστικότητα τυροσόλης και ακετυλιωμένων παραγώγων της **64**

9.6 Ενζυμική κατεργασία του ακετυλιωμένου κλάσματος Τ4 της τυροσόλης με PAF-ακετυλοϋδρολάση (AH) ορού **71**

10. ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ **72**

11. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ **77**

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

1.1 Εισαγωγή

Από την δεκαετία του ’80, ερευνητές και βιομηχανίες τροφίμων επιδεικνύουν αυξημένο ενδιαφέρον για τις φαινολικές ενώσεις. Ο βασικός λόγος γι’ αυτό το μεγάλο ενδιαφέρον είναι η αναγνώριση των αντιοξειδωτικών ικανοτήτων τους, η μεγάλη αφθονία τους στα τρόφιμα[1] και ο πιθανός ρόλος τους στην πρόληψη ποικίλλων ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες, όπως ο καρκίνος, τα καρδιοαγγειακά νοσήματα και οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες[2].

1.2 Δομή – κατηγορίες φαινολικών ενώσεων

Μέχρι σήμερα έχουν πιστοποιηθεί αρκετές χιλιάδες φαινολικών ενώσεων, τις οποίες συναντάμε σε ανώτερα φυτά καθώς επίσης και αρκετές εκατοντάδες φαινολικών ενώσεων που ανευρίσκονται σε εδώδιμα φυτά.

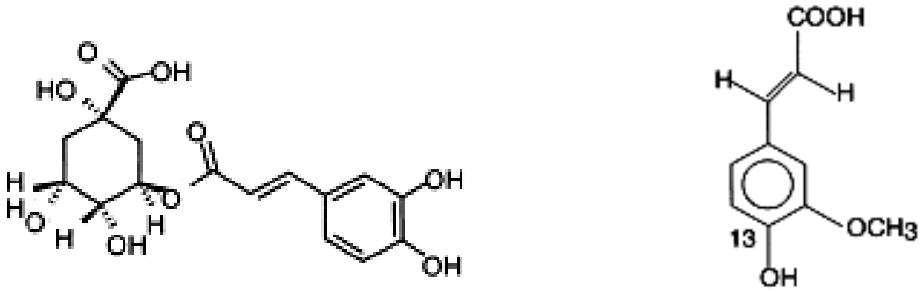
Οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν δευτερεύοντες μεταβολίτες των φυτών και αποτελούν τμήμα των αμυντικών μηχανισμών τους έναντι στην υπεριώδη ακτινοβολία, αυξημένη θερμοκρασία και τους παθογόνους μικροοργανισμούς.

Η δομή αυτών των μορίων ποικίλει και έτσι μπορούμε να συναντήσουμε απλές φαινολικές ενώσεις όπως φαινολικά οξέα με έναν ανθρακικό σκελετό 6 ατόμων άνθρακα, μέχρι σύνθετες φαινολικές ενώσεις αποτελούμενες από πολυμερισμένα μόρια όπως είναι οι ταννίνες.

Οι φαινολικές ενώσεις είναι παράγωγα του βενζολίου με ένα ή περισσότερα υδροξύλια στον φαινολικό δακτύλιο και ανάλογα με τη δομή του ανθρακικού σκελετού κατατάσσονται στα φαινολικά οξέα, στα φλαβονοειδή, στα στιλβένια και στα λιγνάνια[3].

1.2.1 Φαινολικά οξέα

Τα φαινολικά οξέα αποτελούν την 2η πιο διαδεδομένη κατηγορία των φαινολικών ενώσεων, τα οποία ανευρίσκονται σχεδόν σε όλα τα φυτικά τρόφιμα. Τα φαινολικά οξέα διακρίνονται σε 2 κατηγορίες: παράγωγα του βενζοϊκού οξέος και παράγωγα του κιναμμωμικού οξέος. Το πιο αντιπροσωπευτικό φαινολικό οξύ είναι το καφεϊκό οξύ, το οποίο βρίσκεται με την εστεροποιημένη του μορφή στα τρόφιμα (χλωρογενικό οξύ). Ευρέως διαδεδομένα φαινολικά οξέα είναι και το κουμαρικό οξύ, το φερουλικό οξύ, το γαλλικό οξύ, το βανιλικό οξύ και το σιναπικό οξύ.

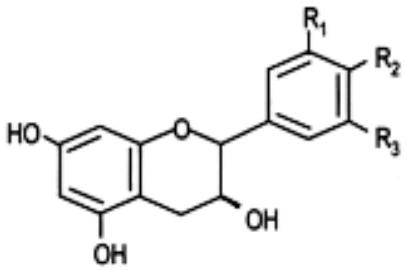


(α) (β)

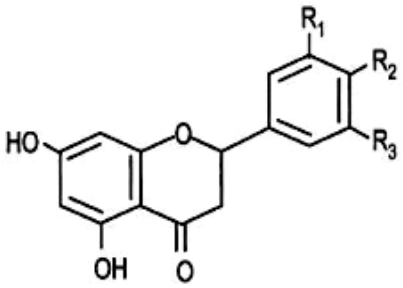
Σχήμα 1: *Δομή χλωρογενικού (α) και φερουλικού* οξέος *(β)*

1.2.2 Φλαβονοειδή

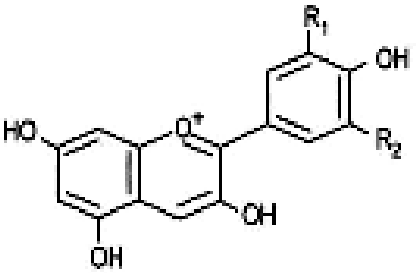
Τα φλαβονοειδή αποτελούν τη μεγαλύτερη τάξη των φαινολικών ενώσεων. Αντιπροσωπεύουν μια υποκατηγορία πολυφαινολών με δομή C6-C3-C6. Ανάλογα με τον βαθμό οξείδωσης του O_2 του ετεροκυκλικού δακτυλίου, χωρίζονται στις παρακάτω υποκατηγορίες: φλαβόνες, ισοφλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβανόλες, φλαβανόνες, ανθοκυανίνες και προανθοκυανιδίνες.



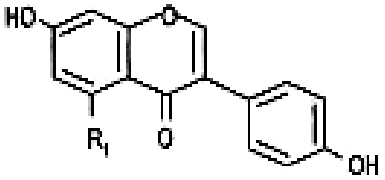
Φλαβανόλη



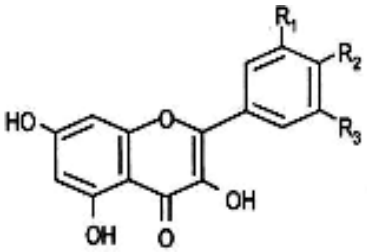
Φλαβανόνη



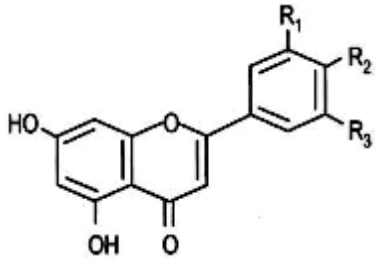
Ανθοκυανιδίνες



Ισοφλαβόνη



Φλαβονόλη

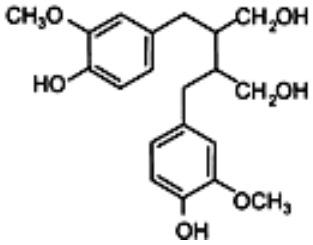


Φλαβόνη

Σχήμα 2: *Χαρακτηριστικές δομές των υποκατηγοριών των φλαβονοειδών*

1.2.3 Λιγνάνια

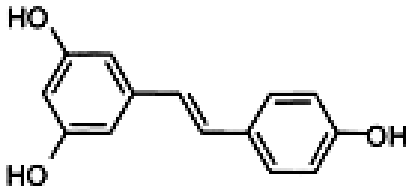
Τα λιγνάνια ενώ έχουν απομονωθεί από ανθρώπινο πλάσμα όσο και από ανθρώπινα ούρα, στα τρόφιμα τα συναντάμε σε μικρά ποσοστά. Στο παχύ έντερο μεταβολίζονται σε διάφορες ουσίες που είναι γνωστές για την δράση τους ως αγωνιστές αλλά και ανταγωνιστές των οιστρογόνων.



Σχήμα 3: *Χαρακτηριστική δομή λιγνανίου που συναντάμε στον λιναρόσπορο*

1.2.4 Στιλβένια

Τα στιλβένια απαντώνται σε μικρές ποσότητες στο καθημερινό διαιτολόγιο του ανθρώπου. Το ποιο κοινό είναι η *trans*-ρεσβερατρόλη, η οποία έχει απομονωθεί από το κρασί και το φλοιό των κόκκινων ποικιλιών σταφυλιού και έχει πλήθος βιολογικών ιδιοτήτων.



Σχήμα 4: *Δομή trans- ρεσβερατρόλης*

1.3 Ύπαρξη στα τρόφιμα

Τα **φαινολικά οξέα** απαντούν συχνά στα τρόφιμα, μιας και αποτελούν την 2η πιο διαδεδομένη κατηγορία των φαινολικών ενώσεων. Αυτά που συναντάμε πιο συχνά είναι τα παράγωγα του βενζοϊκού οξέος καθώς επίσης και του κιναμμωμικού οξέος. Παράγωγα του βενζοϊκού οξέος (γαλλικό οξύ) συναντάμε στα κόκκινα φρούτα, στα ραπανάκια, στα κρεμμύδια καθώς και στο τσάι, οπού μπορούν να ανευρίσκονται σε αρκετές δεκάδες mg/kg βάρους. Παράγωγα του κιναμμωμικού οξέος συναντάμε πιο συχνά στα τρόφιμα και συγκεκριμένα το καφεϊκό οξύ αλλά και τους εστέρες του, όπως το χλωρογενικό οξύ, το οποίο ανευρίσκεται σε πολλά φρούτα αλλά και στον καφέ (1 φλιτζάνι στιγμιαίου καφέ περιέχει 70-350 mg χλωρογενικού οξέος)[4]. Τα είδη των φρούτων που περιέχουν την μεγαλύτερη ποσότητα από τα παράγωγα του κιναμμωμικού οξέος (κουμαρικό, καφεϊκό, φερουλικό και σιναπικό οξύ) είναι τα βατόμουρα, δαμάσκηνα, ακτινίδια, μήλα και κεράσια τα οποία περιέχουν 0,5-2,0 g παράγωγων του κιναμμωμικού οξέος/kg βάρους[5]. Επίσης, μεγαλύτερες ποσότητες φαινολικών οξέων περιέχουν τα ώριμα φρούτα από ότι τα άγουρα. Συγκεκριμένα, κατά την διάρκεια της ωρίμανσης ενώ μειώνεται η συγκέντρωση σε φαινολικά οξέα, εντούτοις αυξάνεται η συνολική ποσότητα καθώς αυξάνεται το μέγεθος των φρούτων. Το φερουλικό οξύ είναι το πιο συχνό φαινολικό οξύ που συναντάμε στους σπόρους των δημητριακών και συγκεκριμένα η ποσότητα του φερουλικού οξέος στον κόκκου του σιταριού είναι 0,8-2,0 g/kg ξηρού βάρους, το οποίο μπορεί να συνεισφέρει μέχρι και στο 90% της συνολικής ημερήσιας καταναλισκόμενης ποσότητας φαινολικών ενώσεων[6].

Οι **φλαβονόλες** αποτελούν τα πιο διαδεδομένα φλαβονοειδή στα τρόφιμα και οι κύριοι αντιπρόσωποι τους είναι οι κατεχίνες, οι γαλλοκατεχίνες και οι καμφερόλες. Οι κυριότερες πηγές των φλαβονολών είναι τα κρεμμύδια, τα λάχανα, τα πράσα, τα μπρόκολα και τα βατόμουρα (μέχρι 1,2 g/kg βάρους). Το κόκκινο κρασί και το τσάι περιέχουν επίσης φλαβονόλες (μέχρι 45 mg/L). Τα φρούτα επίσης περιέχουν από 5 μέχρι 10 είδη γλυκοζιτών των φλαβονολών[5]. Αυτές οι φλαβονόλες συσσωρεύονται στην επιφάνεια των

εξωτερικών ιστών (φλοιός, φύλλα) καθώς η βιοσύνθεση τους διεγείρεται από το φως. Επίσης παρατηρούνται αξιοπρόσεκτες διαφορές στην συγκέντρωση φλαβονολών μεταξύ φρούτων που προέρχονται από το ίδιο δέντρο, αλλά ακόμα και μεταξύ των διαφόρων πλευρών του ίδιου του φρούτου, λόγω διαφορετικής έκθεσης στο ηλιακό φως[7]. Παρομοίως, στα φυλλώδη λαχανικά, όπως τα μαρούλια και τα λάχανα, η συγκέντρωση σε γλυκοζίτες φλαβονολών είναι 10 φορές μεγαλύτερη στα εξωτερικά σκουρόχρωμα φύλλα από ότι στα ανοιχτόχρωμα φύλλα του εσωτερικού[8].

Οι **φλαβόνες** είναι λιγότερο συχνές από ότι οι φλαβονόλες. Κύριοι εκπρόσωποι των φλαβονών είναι η λουτεολίνη και η απιγενίνη, τις οποίες τις συναντάμε στο σέλινο, στο μαϊντανό και στο πιπέρι (κοκκινοπίπερο). Τα δημητριακά περιέχουν και C-γλυκοζίτες των φλαβονών[9]. Ο φλοιός του κίτρου περιέχει μεγάλες ποσότητες από τανγκερίνη, νοβιλετίνη και σινενσετίνη (μέχρι 6,5 g/L βασικού ελαίου του κίτρου)[1].

Στο καθημερινό διαιτολόγιο του ανθρώπου, οι **φλαβανόνες** βρίσκονται στις τομάτες, στα αρωματικά φυτά (όπως η μέντα), αλλά και στα εσπεριδοειδή (όπως τα πορτοκάλια, τα λεμόνια και τα γκρέιπ φρουτ). Ένα ποτήρι χυμό από πορτοκάλι περιέχει 200-600 mg εσπεριδίνης[10].

Οι **ισοφλαβόνες** είναι τα φλαβονοειδή με δομικές ομοιότητες που προσεγγίζουν τα οιστρογόνα, αν και δεν είναι στεροειδή. Οι ισοφλαβόνες βρίσκονται σχεδόν αποκλειστικά στα όσπρια, στη σόγια (και τα επεξεργασμένα παράγωγά της) και στους ξηρούς καρπούς. Η σόγια περιέχει περίπου 1 mg γκενιστεΐνης, ντεζντεΐνης και γλυκιτεΐνης σε αναλογία 1:1:0.2[11].

Τις **φλαβανόλες** τις συναντάμε τόσο στην μονομερή μορφή τους (κατεχίνες), όσο και στην πολυμερή μορφή τους (προανθοκυανιδίνες). Οι κατεχίνες βρίσκονται σε πολλά φρούτα όπως κεράσια, σταφύλια, βερίκοκα, αχλάδια και μήλα. Επίσης τις συναντάμε στο κόκκινο κρασί (270 mg/L) αλλά θα πρέπει να επισημανθεί ότι το πράσινο τσάι (100-800 mg/200mL) και η σοκολάτα (460-610 mg/50g) είναι οι πλουσιότερες πηγές[12]. Στο μαύρο τσάι η περιεκτικότητα σε φλαβανόλες μειώνεται στο μισό εξαιτίας της οξείδωσης κατά την ζύμωση (60-500 mg/200mL). Η κατεχίνη και η επικατεχίνη είναι οι κυριότερες φλαβανόλες που βρίσκονται στα φρούτα, ενώ η γαλλοκατεχίνη και η επιγαλλοκατεχίνη βρίσκονται στα όσπρια, στις ρόγες των σταφυλιών και ιδιαίτερα στο τσάι. Επίσης οι επικατεχίνες του τσαγιού είναι ιδιαίτερα σταθερές

κατά την έκθεση τους στην θέρμανση για pH όξινο, καθώς μόνο το 15% των επικατεχινών διασπώνται μετά από 7 ώρες βρασμού σε pH 5[13].

Οι **προανθοκυανιδίνες** μπορεί να είναι διμερή, ολιγομερή ή και πολυμερή των κατεχινών. Στο χυμό των μήλων ο μέσος βαθμός πολυμερισμού κυμαίνεται από 4 μέχρι 11[14]. Η στυπτικότητα των τροφίμων οφείλεται στην ανάπτυξη πολύπλοκων συμπλεγμάτων με τις πρωτεΐνες του σάλιου. Βρίσκονται κυρίως σε φρούτα όπως σταφύλια, ροδάκινα, μήλα, αχλάδια και μούρα, αλλά και στο κρασί, το τσάι, τη μπύρα και τη σοκολάτα[15].

Οι **ανθοκυανιδίνες** αποτελούν χρωστικές οι οποίες βρίσκονται στην επιφάνεια των φρούτων και των λουλουδιών και οι οποίες προσδίδουν το κόκκινο, ροζ, μπλε ή και ερυθροκυανό χρώμα[16]. Στο διαιτολόγιο του ανθρώπου οι ανθοκυανιδίνες βρίσκονται πιο συχνά στα φρούτα, αλλά και στο κόκκινο κρασί, στα δημητριακά και στα φυλλώδη λαχανικά. Η κυανιδίνη είναι η κυριότερη ανθοκυανιδίνη που βρίσκουμε στα τρόφιμα. Επίσης το περιεχόμενο των φρούτων σε ανθοκυανιδίνες ποικίλει από 0,15 mg/g (φράουλες), μέχρι και 4,5 mg/g (κεράσια).

Τα μοναδικά τρόφιμα τα οποία περιέχουν σημαντικές ποσότητες από **λιγνάνια** είναι ο λιναρόσπορος καθώς και το λάδι του. Μερικά δημητριακά, φρούτα και λαχανικά περιέχουν ίχνη από λιγνάνια. Στο παχύ έντερο μεταβολίζονται σε διάφορες ουσίες, ενώ είναι και γνωστές για την δράση τους ως αγωνιστές αλλά και ανταγωνιστές οιστρογόνων.

Τα **στιλβένια** απαντούν σε μικρές ποσότητες στο καθημερινό διαιτολόγιο του ανθρώπου. Ένα από αυτά είναι η *trans*-ρεσβερατρόλη η οποία έχει αξιοπρόσεκτες βιολογικές δράσεις και βρίσκεται στο κρασί, [σε μικρή όμως περιεκτικότητα (0,3-0,7 mg/L στο κόκκινο κρασί)][17-19], αλλά και στον φλοιό των κόκκινων σταφυλιών (1,5-7,3 μg/g)[18].

Στον πίνακα 1 φαίνεται η περιεκτικότητα ορισμένων τροφίμων σε φαινολικές ενώσεις[5]:

Πίνακας 1 *Περιεκτικότητα ορισμένων τροφίμων σε φαινολικές ενώσεις*

ΤΡΟΦΙΜΑ (gr)	ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΟΞΕΑ (mg)	ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ (mg)	ΛΙΓΝΑΝΕΣ (mg)	ΣΤΙΛΒΕΝΙΑ (mg)
Μήλο (100 g)	5-60	2-12	-	-
Κεράσια (100 g)	72-460	140-1800	-	-
Σταφύλια (100 g)	-	30-750	-	-
Μπρόκολο (100 g)	-	4-10	-	-
Πατάτες (100 g)	10-19	-	-	-
Σοκολάτα (100 g)	-	46-60	-	-
Κόκκινο κρασί (100 mL)	6,4-9,6	48-68	-	0,24-12
Καφές (100 mL)	35-175	-	-	-
Πράσινο τσάι (100 mL)	-	10-80	-	-
Λιναρόσπορος (100 g)	-	-	0,03-0,7	-

1.4 Βιολογικές δράσεις

1.4.1 Αντικαρκινική δράση

Διάφορα πειραματικά μοντέλα αποδεικνύουν ότι ένας μεγάλος αριθμός φλαβονοειδών έχει αντικαρκινική δράση[20]. Τα μόρια αυτά φαίνεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορους μηχανισμούς που εμπλέκονται στην παθογένεση του καρκίνου. Τα φλαβονοειδή έχουν σημαντική επίδραση στην βιοδραστικότητα των καρκινογόνων ουσιών.

Τα φλαβονοειδή: κερκετίνη, καμφερόλη και απιγενίνη, έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν το ενζυμικό σύστημα του κυτοχρώματος P_{450}, τα οποία παίζουν πρωτεύοντα ρόλο στην ενεργοποίηση πολλών καρκινογόνων παραγόντων[21]. Τόσο η κερκετίνη όσο και η ναρινγκενίνη συμμετέχουν στην αναστολή του ενζύμου $3A_4$ το οποίο είναι το σημαντικότερο P_{450} ένζυμο που απαντά στο ήπαρ και μεταβολίζει ένα μεγάλο αριθμό καρκινογόνων ουσιών[22].

Μελέτες δείχνουν ότι η χρόνια φλεγμονή σχετίζεται με την αιτιολογία πολλών ειδών καρκίνου. Αναστολείς του ενζύμου της κυκλοξυγονάσης όπως ορισμένα φλαβονοειδή (κερκετινή, κατεχίνες, κυανιδίνη) θεωρούνται κύριοι προστατευτικοί παράγοντες έναντι του καρκίνου του παχέως εντέρου[22] .

"In vitro" πειράματα έδειξαν ότι η γκενιστεΐνη και η κερκετίνη αναστέλλουν την κινάση της τυροσίνης, η οποία παίρνει μέρος στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό[23].

Ακόμα πειραματικά μοντέλα απέδειξαν ότι η απιγενίνη και η λουτεόλη, προωθούν την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων[24].

Τέλος θα πρέπει να επισημανθεί το γεγονός ότι η παραπάνω δράσεις των φλαβονοειδών επιτεύχθηκαν σε πολλαπλάσιες συγκεντρώσεις από αυτές που προσλαμβάνει κάποιος από το καθημερινό του διαιτολόγιο[25].

1.4.2 Αντιοξειδωτική δράση

Οι πιο πολλές ευεργετικές ιδιότητες των φλαβονοειδών αποδίδονται στην αντιοξειδωτική τους ικανότητα. Επομένως μπορούν να προστατεύουν τα κυτταρικά συστατικά από την οξείδωση, να δεσμεύουν ή να καταστρέφουν τις ελεύθερες ρίζες και να συμμετέχουν στην αναγέννηση άλλων αντιοξειδωτικών, όπως οι βιταμίνες C, E και β -καροτένιο[26].

Για την αντιοξειδωτική δράση των φλαβονοειδών πιστεύεται ότι ο μεταβολισμός τους πρέπει να έχει αξιοσημείωτη επίδραση στην δραστικότητά τους.

Η χημική δομή των φλαβονοειδών επηρεάζει την αντιοξειδωτική τους ικανότητα. Ενώσεις με δύο γειτονικά υδροξύλια στον αρωματικό δακτύλιο είναι καλύτεροι εκκαθαριστές ελευθέρων ριζών από ότι ενώσεις με ένα μόνο αρωματικό υδροξύλιο[27].

Με δεδομένη την ικανότητά τους να αναστέλλουν την οξείδωση της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (LDL), στα φλαβονοειδή έχουν αποδοθεί καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες[28].

Επίσης άλλο ένα συνδετικό στοιχείο μεταξύ των φλαβονοειδών και της ικανότητας τους να εμποδίζουν την οξείδωση της LDL χοληστερόλης είναι και το λεγόμενο "Γαλλικό παράδοξο", σύμφωνα με το οποίο ο πληθυσμός της

Γαλλίας καταναλώνει περισσότερα κορεσμένα λίπη και χοληστερόλη, καπνίζει περισσότερο, έχει υψηλότερα επίπεδα χοληστερόλης στο αίμα και υψηλότερη αρτηριακή πίεση από τους Αμερικάνους, αλλά ταυτοχρόνως έχει κατά 30% λιγότερα καρδιοαγγειακά επεισόδια, λόγω της μεγάλης κατανάλωσης φαινολικών αντιοξειδωτικών που ανευρίσκονται στο κόκκινο κρασί[29].

Ακόμα ορισμένες μελέτες έχουν δείξει ότι ο ρόλος μιας δίαιτας πλούσιας σε φλαβονοειδή είναι πολύ σημαντικός. Αυξημένη πρόσληψη σε πολυφαινόλες είχε σαν αποτέλεσμα την μείωση της θνησιμότητας από Στεφανιαία Νόσο καθώς και την μείωση της συχνότητας εμφάνισης εμφράγματος του μυοκαρδίου σε ηλικιωμένους άντρες[30], ενώ μειώθηκε και ο κίνδυνος εμφάνισης Στεφανιαίας Νόσου σε μεταεμμηνοπαυσιακές γυναίκες κατά 38%[31].

Η έρευνα του Zuthpen έδειξε μια αντιστρόφως ανάλογη σχέση μεταξύ της κατανάλωσης κατεχίνης του τσαγιού και της εμφάνισης ισχαιμικής καρδιοπάθειας[32], τα αποτελέσματα της οποίας χρησιμοποιήθηκαν στην “Μελέτη των Επτά Χωρών”.

Ο προστατευτικός ρόλος των διαφόρων φλαβονοειδών σε κάποια βιολογικά συστήματα, έχει αποδοθεί στην ικανότητά τους να ενεργοποιούν τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, να απενεργοποιούν μέταλλα υπεύθυνα για την πρόκληση οξείδωσης και να εμποδίζουν την δράση οξειδωτικών ενζύμων.

1.4.3 Αγγειοδιασταλτική δράση

Μεγάλο ενδιαφέρον για τα πλεονεκτήματα των φλαβονοειδών για την προστασία έναντι της Στεφανιαίας Νόσου αποδεικνύονται και από έναν μεγάλο αριθμό μελετών, οι οποίες εξετάζουν άλλες πιθανές δράσεις των φλαβονοειδών (εκτός της αναστολής οξείδωσης της LDL χοληστερόλης και της αναστολής συσσώρευσης αιμοπεταλίων), οι οποίες μπορούν να δράσουν προστατευτικά για την λειτουργία της καρδιάς.

Φαίνεται ότι τα φλαβονοειδή προκαλούν αγγειοδιαστολή αλλά με έναν μηχανισμό μη πλήρως κατανοητό. Εξαιτίας του υγειούς ενδοθηλίου που είναι απαραίτητο για την επίδραση των φλαβονοειδών στην αγγειοδιαστολή,

πιστεύεται ότι το οξείδιο του αζώτου παίζει έναν καθοριστικό ρόλο στην βιολογική δράση των φλαβονοειδών[33].

Προσφάτως βρέθηκε ότι η διοκλίνη, ένα φλαβονοειδές που απομονώθηκε από την *Dioclea grandiflora*, επηρεάζει θετικώς τα αγγεία προκαλώντας αγγειοδιαστολή. Αυτό το αποτέλεσμα συνδέθηκε με την παραγωγή της κυκλικής μονοφωσφορικής γουανοσίνης (cGMP) που αναστελλόταν από τον μεθυλεστέρα της N-νιτρο-L-αργινίνης[34]. Επίσης και σε μια άλλη μελέτη παρατηρήθηκαν παρόμοια αποτελέσματα με προανθοκυανιδες που αποστάχθηκαν από λευκάγκαθα *crataegus oxyacantha*[35].

Επίσης φλαβονοειδή που βρέθηκαν σε κυανέρυθρο χυμό γκρέιπ φρουτ, βελτιώνουν την ενδοθηλιακή λειτουργία σε ασθενής με Στεφανιαία Νόσο[36]. Ακόμα φάνηκε ότι οι πολυφαινόλες του κρασιού ρυθμίζουν την παραγωγή NO από το ενδοθήλιο, προκαλώντας με αυτόν τον τρόπο αγγειοδιαστολή[37].

1.4.4 Αντιφλεγμονώδη δράση

Οι αντιφλεγμονώδεις δράσεις των φλαβονοειδών έχουν μελετηθεί τόσο *"in vitro"* όσο και *"in vivo".* Μελέτες δείχνουν ότι τα φλαβονοειδή μεταβολίζουν το αραχιδονικό οξύ των αιμοπεταλίων, καθώς επίσης και ότι η κερκετίνη και η μυρεκετίνη αναστέλλουν την λιποξυγονάση και την κυκλοξυγονάση σε υψηλές πάντα όμως συγκεντρώσεις.

Η ικανότητα των φλαβονοειδών στο να επηρεάζουν την δράση των ουδετεροφίλων λευκοκυττάρων αποτελεί άλλο ένα παράδειγμα αντιφλεγμονώδους δράσης. Συγκεκριμένα η κερκετίνη έχει την ικανότητα να αναστέλλει την δράση τόσο των ουδετεροφίλων λευκοκυττάρων μέσω της φωσφολιπάσης A_2[38], όσο και της οξειδάσης του φωσφορικού νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (NADPH) [39].

Επίσης η κερκετίνη αναστέλλει την παραγωγή αραχιδονικού οξέος από τα ουδετερόφιλα ύστερα από ανοσολογική διέγερση.

1.4.5 Αντιθρομβωτική δράση

Πολλές έρευνες έχουν δείξει την ικανότητα των φλαβονοείδων του κρασιού να αναστέλλουν την συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Έτσι μειώνεται η σύνθεση προθρομβοτικών παραγόντων, η έκφραση των μορίων προσκόλλησης και η δράση των ιστικών παραγόντων[40].

1.4.6 Ορμονική δράση

Μελέτες αναφέρουν ότι τόσο η γκενιστεΐνη όσο και η ντεϊζντεΐνη, έχουν καλύτερη προσκόλληση στους β -υποδοχείς των οιστρογόνων, από ότι στους α-υποδοχείς, ένα στοιχείο το οποίο θεωρείται θετικό στην πρόληψη της οστεοπόρωσης, αφού ο σχηματισμός των οστών ενεργοποιείται μόνο μέσω των β-υποδοχέων των οιστρογόνων[41].

Επίσης πειραματικές μελέτες έδειξαν τόσο *"in vitro"* όσο και "*in vivo"* ότι η ιπριφλαβόνη (παράγωγο των ισοφλαβονών), αναστέλλει την επαναπορρόφηση των οστεοκλαστών[42].

Επομένως φαίνεται ότι τα φλαβονοειδή παίζουν έναν σημαντικό ρόλο στην πρόληψη της οστεοπόρωσης.

1.4.7 Αντιαλλεργική δράση

Στα φλαβονοειδή τους έχει αποδοθεί και ο όρος αντιαλλεργικά. Η ικανότητα αυτή των φλαβονοειδών οφείλεται στην έκκριση της ισταμίνης[43]. Έτσι τα φλαβονοειδή προκαλούν αναστολή της δράσης των ενζύμων που αυξάνουν την έκκριση ισταμίνης τόσο από τα μαστοκύτταρα όσο και από τα βασεόφιλα. Τα ένζυμα αυτά είναι η φωσφοδιεστεράση του cAMP και η ασβεστιοεξαρτώμενη φωσφατάση της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATPάση).

1.4.8 Αντιβακτηριακή δράση

Μελέτες "*in vitro*" επιδεικνύουν ότι κάποια φλαβονοειδή ενδέχεται να έχουν αντιβακτηριακή δράση. Η υδροξυτυροσόλη και η ελευροπαΐνη φάνηκαν ότι είχαν αντιμικροβιακή δράση έναντι πρότυπων βακτηριακών στελεχών[44].

Η υδροξυτυροσόλη μάλιστα είχε καλύτερη αντιμικροβιακή δράση από την ελευροπαΐνη (προκαλούσε την ίδια αναστολή αλλά σε μικρότερες συγκεντρώσεις. Αν και οι δύο ενώσεις είχαν δομή Ο-διφαινόλης, η οποία είναι υπεύθυνη για την αντιμικροβιακή δράση των μορίων αυτών, η μείωση της τοξικότητας της ελευροπαΐνη οφείλεται στο ότι ο γλυκοζιτικός δεσμός εμποδίζει την ένωση να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη και να φτάσει στον στόχο.

1.5 Ακετυλιωμένα παράγωγα φαινολικών ενώσεων

Τα τελευταία χρόνια, έχει προκαλέσει πολλά ερωτηματικά ο ρόλος των ακετυλιωμένων παραγώγων σε διάφορα τρόφιμα, ενώ δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως εάν η ακετυλίωση αποτελεί έναν ενδογενή μηχανισμό ρύθμισης της δραστικότητας. Πρόσφατα φάνηκε ότι υπάρχουν ενδείξεις για πιθανή ενζυμική μεταφορά ακετυλομάδων από ένα ακετυλιωμένο συστατικό (κυρίως τις ακετοξυ-4-μεθυλοκουμαρίνες) σε ενζυμικές πρωτεΐνες (τρανφεράση-S-γλουταθειόνης του κυτόχρωματος P_{450}, NADPH ρεδουκτάσης του -C-κυτοχρώματος), οδηγώντας κατά αυτόν τον τρόπο σε διαφοροποίηση των καταλυτικών τους ιδιοτήτων[45].

Επίσης έχει φανεί ότι οι ακετυλομάδες που βρίσκονται κοντά στο ετεροάτομο του οξυγόνου (C7&C8), είχαν καλύτερη προσκόλληση στο μόριο της τρανσακετυλάσης.

Οι βιοχημικές ιδιότητες των ακετυλιωμένων φλαβονοειδών, όπως η αντιστρεπτή ενεργοποίηση της NADPH ρεδουκτάσης του C κυτοχρώματος και της καταλυόμενης στα μικροσώματα αφλατοξίνης B1, σχετίζονται με την προσκόλλησή τους με την τρανσακετυλάση.

Επίσης τελευταίως ανακαλύφθηκε ένα ακετυλιωμένο φλαβονοειδες και μάλιστα μια φλαβόνη που απομονώθηκε από την *“Veronica thymoides, subsp. Pseudocinerea”*[46].

Με βάση τα παραπάνω, μπορούμε να υποθέσουμε ότι η ακετυλίωση ίσως αποτελεί έναν ενδογενή μηχανισμό μεταβολισμού των φαινολικών ενώσεων που αναπόφευκτα οδηγεί και σε αλλαγές στις βιολογικές τους δράσεις.

2.ΤΥΡΟΣΟΛΗ

2.1 Δομή

Όπως όλες οι φαινολικές ενώσεις έτσι και η τυροσόλη (4-υδρόξυ-φαινυλαιθανόλη) αποτελεί παράγωγο του βενζολίου. Ο φαινολικός δακτύλιος της τυροσόλης έχει ένα υδροξύλιο, ενώ το συνολικό μόριο της τυροσόλης έχει δύο υδροξύλια. Η δομή της τυροσόλης φαίνεται στο σχήμα 5.

Σχήμα 5: *Δομή τυροσόλης*

2.2 Πηγές

Η τυροσόλη βρίσκεται σε 2 παραδοσιακά τρόφιμα της Μεσογειακής Διατροφής: το κρασί (σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στο λευκό από ότι στο κόκκινο) και το ελαιόλαδο[47]. Το περιεχόμενο του έξτρα παρθένου ελαιολάδου σε τυροσόλη ανέρχεται σε 0,5-0,7 μg/kg[48]. Επίσης η τυροσόλη βρέθηκε και σε μικρές ποσότητες στην μπύρα και στο βερμούτ[47].

2.3 Βιοδιαθεσιμότητα- Μεταβολισμός

Η τυροσόλη απορροφάται από τον εντερικό αυλό σχετικά εύκολα συγκρινόμενη με μεγαλύτερου μοριακού βάρους πολυφαινόλες. Η δομή του μορίου της τυροσόλης παίζει έναν σημαντικό ρόλο στην απορρόφηση. Οι πιο σημαντικοί δομικοί παράγοντες για την τυροσόλη είναι η γλυκοζυλίωση και η εστεροποίηση[49].

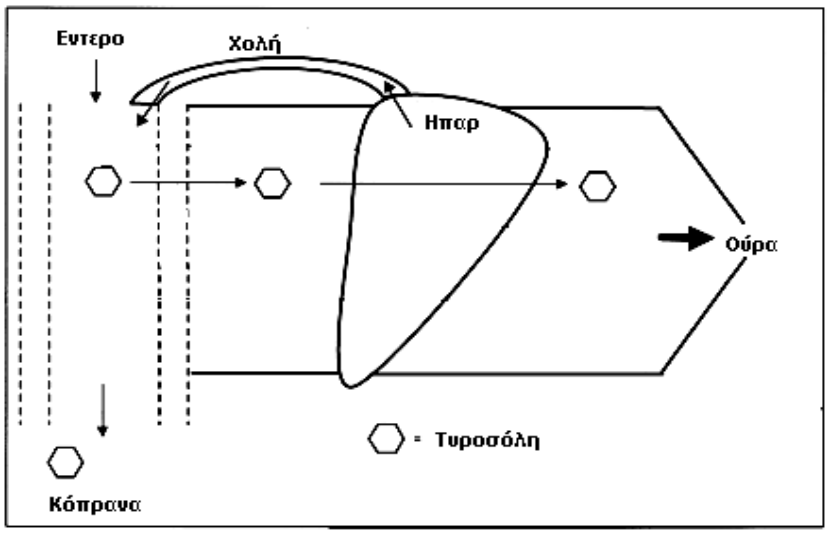
Η τυροσόλη μετά την λήψη της από το στόμα απεκκρίνεται κατά το μεγαλύτερο ποσοστό στα ούρα, ενώ μια μικρή ποσότητα απεκκρίνεται και από την χολή. Μελέτη έδειξε ότι 24 ώρες μετά την κατανάλωση μιας συγκεκριμένης ποσότητας ελαιολάδου (50mL) παρατηρήθηκε μια αύξηση της ποσότητας της τυροσόλης σε δείγματα ούρων της τάξης του 500%[50]. Στον άνθρωπο η μέγιστη αύξηση της τυροσόλης στο πλάσμα παρατηρήθηκε 0-4 ώρες μετά την λήψη και μειώθηκε στις φυσιολογικές τιμές μετά από 8-12ωρες. Η διατήρηση μιας υψηλής συγκέντρωσης στο πλάσμα προϋποθέτει μια επαναλαμβανόμενη λήψη από πολυφαινόλες[51].

Η τυροσόλη μεταβολίζεται κατά το μεγαλύτερο ποσοστό από τους ιστούς, από την στιγμή που απορροφάται στο λεπτό έντερο, ενώ ένα πολύ μικρό ποσοστό μεταβολίζεται μέσω της χολής στην εντερική μικροχλωρίδα[52]. Η τυροσόλη είναι συζευγμένη κατά 90% με Ο-γλυκουρονίδες και Ο-μεθυλαιθέρες[53]. Η σύζευξη με Ο-γλυκουρονίδες γίνεται στον εντερικό αυλό και στο ήπαρ. Ένα ακόμα πιθανό μεταβολικό στάδιο της τυροσόλης είναι η μεθυλίωση, η οποία κατά κύριο λόγω συμβαίνει στο ήπαρ[54].

Το εναπομείναν μέρος της τυροσόλης που δεν ανιχνεύτηκε στα ούρα είναι πιθανός να έχει μεταβολιστεί από την μικροχλωρίδα του εντέρου. Επίσης τόσο τα γλυκοζυλιωμένα όσο και τα μη γλυκοζυλιωμένα μόρια που προέρχονται από την έκκριση της χολής μπορούν να υδρολυθούν στο παχύ έντερο και να απορροφηθούν[55].

Τα συζευγμένα μόρια της τυροσόλης αλλά και όλον των πολυφαινολών μπορεί να έχουν βιολογική δραστικότητα μετά την αποσύζευξή τους σε κυτταρικό επίπεδο. Στην διεθνή βιβλιογραφία δεν έχουν δημοσιευτεί μελέτες βιολογικής δραστικότητας τόσο των συζευγμένων μορίων όσο και των μεταβολιτών του παχέως εντέρου.

Στο σχήμα 6 φαίνεται η πορεία της τυροσόλης στον ανθρώπινο οργανισμό.



Σχήμα 6: *Πορεία της τυροσόλης στον ανθρώπινο οργανισμό*

2.4 Βιολογικές δράσεις

Πρόσφατες μελέτες *"in vitro"* σε πλάσμα κουνελιών έδειξαν ότι η τυροσόλη αλλά και οι άλλες πολυφαινόλες που υπάρχουν στο παρθένο ελαιόλαδο, όπως η υδροξυτυτοσόλη και η ελευροπαΐνη μπορούν να εμποδίσουν την οξείδωση της LDL χοληστερόλης, δηλαδή το αρχικό στάδιο του σχηματισμού των αθηρωματικών πλακών, οι οποίες προκαλούν την εμφάνιση Στεφανιαίας Νόσου[56].

Επίσης μελέτη *"in vitro"*, αλλά αυτή την φορά σε ανθρώπινα κύτταρα έδειξε ότι η τυροσόλη εμποδίζει σε σημαντικό βαθμό την οξείδωση της LDL χοληστερόλης, η οποία προκαλεί βλάβη στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του παχέως εντέρου[57]. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε ότι παράγοντες που προκαλούν οξειδωτικό στρες όπως η οξειδωμένη LDL χοληστερόλη παρουσιάζουν μια κυτταροτοξική βλάβη σε καρκινικά κύτταρα του παχέως εντέρου, ενώ η τυροσόλη παρουσιάζει μια προστατευτική δράση τόσο στην απόπτωση των καρκινικών αυτών κυττάρων, όσο και στην κυτταροτοξική αυτή βλάβη, δρώντας προληπτικά. Η τυροσόλη φάνηκε να δρα

ενδοκυτταρικά, προκαλώντας τροποποίηση του δυναμικού οξειδοαναγωγής της οξειδωμένης LDL χοληστερόλης.

Μελέτες έχουν δείξει ότι η τυροσόλη συγκρινόμενη με άλλες φαινολικές ενώσεις που υπάρχουν στο ελαιόλαδο, όπως η υδροξυτυροσόλη και η ελευροπαΐνη έχει μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα έναντι $OH^{\cdot}$[58]. Επίσης η υδροξυτυροσόλη του ελαιολάδου αναστέλλει την λιποοξυγενάση του αραχιδονικού οξέος[59], ενώ ταυτοχρόνως προκαλεί αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων[60], στοιχεία που ενισχύουν την προστατευτική δράση της Μεσογειακής Διατροφής στην εμφάνιση καρδιοπαθειών και καρκίνου. Μελέτη *"in vitro"* έδειξε ότι η υδροξυτυροσόλη και η ελευροπαΐνη δρουν αντιμικροβιακά έναντι πρότυπων βακτηριακών στελεχών[61]. Επίσης η υδροξυτυροσόλη φάνηκε να είχε καλύτερη αντιμικροβιακή δράση έναντι της ελευροπαΐνης. Αν και οι δύο ενώσεις είχαν δομή Ο-διφαινόλης, η οποία είναι υπεύθυνη για την αντιμικροβιακή δράση των μορίων αυτών, η μείωση της τοξικότητας της ελευροπαΐνης οφείλεται στο ότι ο γλυκοζυτικός δεσμός εμποδίζει την ένωση να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη και να φτάσει στο σημείο στόχο.

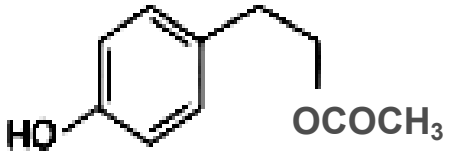
Επίσης μια άλλη μελέτη "*in vitro"* έδειξε ότι μετά από μια κατανάλωση τροφίμων που περιέχουν τυροσόλη και συγκεκριμένα ελαιόλαδο, παρατηρήθηκε αναστολή της φλεγμονώδους δράσης ορισμένων κυτταροκινών (ιντερλευκίνη-1 και ιντερλευκίνη-6)[62].

Ακόμα έχει γίνει μια μελέτη[63] σε ανθρώπους, σύμφωνα με την οποία φαίνεται ότι μέτρια κατανάλωση φαινολικών ενώσεων του ελαιολάδου συμβάλλει στην αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού κατά την μεταγευματική περίοδο.

3. ΑΚΕΤΥΛΙΩΜΕΝΗ ΤΥΡΟΣΟΛΗ

3.1 Δομή

Πρόσφατες μελέτες[64-66] έδειξαν την ύπαρξη ακετυλιωμένου παράγωγου, το οποίο με την βοήθεια της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) με ανιχνευτή υπεριώδους, φασματοφωτόμετρου και φθορισμόμετρου προσδιορίστηκε η πιθανή δομή, η οποία φαίνεται στο σχήμα 7. Στις παραπάνω μελέτες γίνεται λόγος μόνο για μονοακετυλιωμένη τυροσόλη, ενώ στην διεθνή βιβλιογραφία δεν αναφέρεται καθόλου η ύπαρξη διακετυλιωμένης τυροσόλης τόσο σε φυσικές πηγές, όσο και σε συνθετικές παρασκευές.



Σχήμα 7: *Δομή της μονοακετυλιωμένης τυροσόλης*

3.2 Πηγές

Το πιο αντιπροσωπευτικό φαινολικό σύμπλοκο που βρέθηκε στο “χυμό” των επιτραπέζιων ελιών μετά την κατεργασία τους με άλμη είναι ένα ακετυλιωμένο παράγωγο της τυροσόλης[69-70]. Επίσης σε πρόσφατη μελέτη[58] ανιχνεύτηκε ένα νέο παράγωγο της τυροσόλης, αυτή τη φορά σε υπολείμματα του ελαιοκάρπου. Ενώ σε μια άλλη μελέτη[72] ανιχνεύτηκαν πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις ακετυλιωμένης τυροσόλης σε πράσινες επιτραπέζιες ελιές που

δεν ήταν ακόμα έτοιμες για συγκομιδή. Ακόμα κατά την παραγωγική διαδικασία του ελαιολάδου έχει ανιχνευτεί ακετυλιωμένη τυροσόλη σε συγκεντρώσεις της τάξης των 100-400 μmol/L[65]. Επίσης έχει απομονωθεί ακετυλιωμένη τυροσόλη από τον *"Enterobacter cloacae"*[67]. Αυτό το βακτήριο χρησιμοποιήθηκε για να παρατείνει για μεγάλο χρονικό διάστημα την αποθήκευση των πατατών μετά την συγκομιδή τους[68].

3.3 Βιοδιαθεσιμότητα- Μεταβολισμός

Η μόνη αναφορά για την απορρόφηση του ακετυλιωμένου παραγώγου τυροσόλης παρουσιάζεται από μια μελέτη κατά την οποία ανιχνεύτηκε ακετυλιωμένη τυροσόλη σε ένα μικρό ποσοστό στις πράσινες επιτραπέζιες ελιές και αναφέρεται ότι κατά την διάρκεια της ωρίμανσης των πράσινων ελιών το ποσοστό του κλάσματος της ακετυλιωμένης τυροσόλης αυξάνεται, συνεχίζοντας με μια πτωτική πορεία μέχρι την λήξη της αποθήκευσης τους[72].

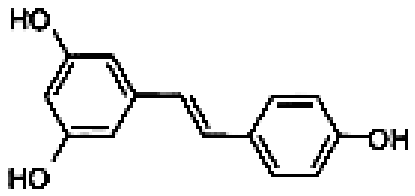
3.4 Βιολογικές δράσεις

Σε πρόσφατη μελέτη[71] συγκρίθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα τόσο της ακετυλιωμένης τυροσόλης, όσο και της ακετυλιωμένης υδροξυτυροσόλης, με τις υπόλοιπες φαινολικές ενώσεις του ελαιολάδου όπως η υδροξυτυροσόλη, η τυροσόλη, η ελευροπαΐνη και η α-τοκοφερόλη και βρέθηκαν να είναι καλύτεροι εκκαθαριστές ελευθέρων ριζών από την τυροσόλη, την υδροξυτυροσόλη και την ελευροπαΐνη.

4. *trans*-ΡΕΣΒΕΡΑΤΡΟΛΗ

4.1 Δομή

Όπως όλες οι φαινολικές ενώσεις έτσι και η *trans*-ρεσβερατρόλη (3,4΄,5-τριυδρόξυ *trans*-στιλβένη) αποτελεί παράγωγο του βενζολίου. Στην δομή της *trans*-ρεσβερατρόλης συναντάμε δύο φαινολικούς δακτυλίους, ο πρώτος δακτύλιος έχει δύο υδροξύλια, ενώ ο δεύτερος έχει ένα υδροξύλιο. Επομένως το συνολικό μόριο της *trans*-ρεσβερατρόλης έχει τρία υδροξύλια. Η δομή της *trans*-ρεσβερατρόλης φαίνεται στο σχήμα 8.



Σχήμα 8: *Δομή trans-ρεσβερατρόλης*

4.2 Πηγές

Αρχικά η ρεσβερατρόλη εντοπίστηκε στις ρίζες του φυτού *"Polygonum cuspidatum",* το οποίο χρησιμοποιούταν για πολλά χρόνια στην παραδοσιακή ανατολική ιατρική. Οι Langcake - Pryce, για πρώτη φορά το 1976 εντόπισαν ίχνη ρεσβερατρόλης και σε τρόφιμα και μάλιστα σε ρόγες σταφυλιών (γένος *Vitis vinifera*)[73].

Σήμερα η *trans*-ρεσβερατρολή έχει ανιχνευτεί σε μεγάλες συγκεντρώσεις στις ρόγες των σταφυλιών (1,5-7,3 μg/g)[74], στο κρασί και ιδιαίτερα στο κόκκινο σε συγκεντρώσεις της τάξης 550-6020 μg/100mL, στο τσάι (974 μg/100mL)[75]

καθώς επίσης και στα μούρα, αλλά και σε ορισμένους ξηρούς καρπούς όπως τα φιστίκια (200 ng/g)[76]. Επίσης η *trans*-ρεσβερατρόλη έχει βρεθεί σε μικρές συγκεντρώσεις στα όσπρια αλλά και στον ανανά[77].

4.3 Βιοδιαθεσιμότητα- Μεταβολισμός

Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι η *trans*-ρεσβερατρόλη απορροφάται από τον εντερικό αυλό ύστερα από την πρόσληψη της από το στόμα. Απόδειξη της απορρόφησης της *trans*-ρεσβερατρόλης αποτελεί το γεγονός οτι σε μια μελέτη του Bertelli[78] παρατηρήθηκε αύξηση της αντιοξειδωτικής δράσης του πλάσματος του ανθρώπου μετά την λήψη δίαιτας πλούσια σε *trans*-ρεσβερατρόλη.

Σε μελέτη *"in vivo"* παρατηρήθηκε ότι μετά την λήψη 4mL κόκκινου κρασιού το οποίο περιείχε *trans*-ρεσβερατρόλη σε συγκέντρωση 6,5 mg/L, παρατηρήθηκε αύξηση της ποσότητας της *trans*-ρεσβερατρόλη στην κυκλοφορία του αίματος, στην καρδία, στο ήπαρ, στους νεφρούς και τέλος στα ούρα[79]. Επίσης παρατηρήθηκε μια ταχεία απορρόφηση και μέγιστη αύξηση στο ήπαρ σε χρόνο 30 λεπτών, ενώ στο πλάσμα σε χρόνο 60 λεπτών. Κατά τον Bertelli[78], η διατήρηση μιας υψηλής συγκέντρωσης στο πλάσμα προϋποθέτει μια επαναλαμβανόμενη λήψη *trans*-ρεσβερατρόλης καθημερινά.

Από την στιγμή που έγινε η απορρόφηση της *trans*-ρεσβερατρόλης, ακολουθεί σύνδεση με γλυκουρονικές, σουλφουρονικές και μεθυλομάδες στον εντερικό βλεννογόνο και στους εσωτερικούς ιστούς. Μη συζευγμένα φαινολικά μόρια δεν συναντάμε στο πλάσμα. Αυτές οι αντιδράσεις σύζευξης εμποδίζουν την πιθανή τοξικότητα των ελεύθερων μορίων.

Η *trans*-ρεσβερατρόλη μεταβολίζεται κατά το μεγαλύτερο μέρος της στους ιστούς, μετά την απορρόφηση από το λεπτό έντερο και κατά ένα μικρό μέρος μέσω της χολής στην εντερική μικροχλωρίδα. Η *trans*-ρεσβερατρόλη είναι συζευγμένη με Ο-γλυκουρονίδια, θεϊκούς εστέρες και Ο-μεθυλαιθέρες. Η σύζευξη γίνεται στον εντερικό αυλό. Αυτές οι συζευγμένες ενώσεις κατόπιν φθάνουν στο συκώτι, όπου μεταβολίζονται περαιτέρω. Στην πραγματικότητα η *trans*-ρεσβερατρόλη, άλλα και όλες οι πολυφαινόλες μεταβολίζονται

(γλυκοζυλίωση ή σουλφούρωση) και δεν υπάρχουν ελεύθερες αγλυκόνες στο πλάσμα[80]. Σε *"in vivo"* μελέτη σε κουνέλια βρέθηκε ότι μόνο η γλυκοζυλιωμένη *trans*-ρεσβερατρόλη περνάει στην κυκλοφορία του αίματος, σε σύγκριση με την μη γλυκοζυλιωμένη[80].

Επίσης σε μια μελέτη *"in vivo"* πάλι σε κουνέλια φάνηκε ότι ενώ τους γινόταν καθημερινή χορήγηση *trans*-ρεσβερατρόλης για διάστημα 28 ημερών εντούτοις δεν παρατηρήθηκε ίχνος τοξικότητας[81].

Τα συζευγμένα μόρια της *trans*-ρεσβερατρόλης μπορεί να έχουν βιολογική δραστικότητα μετά την αποσύζευξη τους σε κυτταρικό επίπεδο. Οι περισσότερες έρευνες για την βιολογική δραστικότητα της *trans*-ρεσβερατρόλης έχουν γίνει με την αρχική δομή του μορίου. Φαίνεται ότι το αρχικό μόριο μπορεί να αλληλεπιδρά με υποδοχείς και να αναστέλλει την δράση ενζύμων. Όμως πολλές μικροβιακές δράσεις μπορεί να οφείλονται και στους μικροβιακούς μεταβολίτες.

Οι βιολογικές δραστικότητες τόσο των συζευγμένων μορίων όσο και των μεταβολιτών του παχέως εντέρου δεν έχουν μελετηθεί. Εντούτοις, η μελέτη τους κρίνεται απαραίτητη για να αξιολογηθούν καλύτερα οι θετικές επιπτώσεις στην υγεία από την πρόσληψη *trans*-ρεσβερατρόλης αλλά και γενικότερα όλων των πολυφαινολών.

4.4 Βιολογικές δράσεις

Μελέτη[82] *"in vivo"* σε κουνέλια έδειξε ότι η *trans*-ρεσβερατρόλη μπορεί να εμποδίσει την οξείδωση της LDL χοληστερόλης, δηλαδή το αρχικό στάδιο της αρτηριοσκλήρωσης, ενώ μια άλλη μελέτη[83] πάλι σε κουνέλια έδειξε ότι η *trans*–ρεσβερατρόλη μπορεί να εμποδίσει την οξείδωση των μεμβρανικών λιποειδών. Μια άλλη μελέτη[84] *"in vivo"* σε κουνέλια έδειξε ότι η *trans*-ρεσβερατρόλη μπορεί να τροποποιήσει τον μεταβολισμό των εικοσανοειδών, αναστέλλοντας την σύνθεση τους, αλλά και να εμποδίσει την δράση της θρομβίνης και του ADP, επηρεάζοντας αρνητικά την συσσώρευση αιμοπεταλίων[85]. Σε *"in vivo"* μοντέλο κουνελιών[86] η *trans*-ρεσβερατρόλη

παρουσίασε σημαντική αντιφλεγμονώδη δράση με το να αναστέλλει το ένζυμο της κυκλοοξυγενάσης (COX_2). Η χρόνια φλεγμονή παίζει σημαντικό ρόλο στην αιτιολογία πολλών μορφών καρκίνου και οι αναστολείς του ενζύμου της κυκλοοξυγενάσης (COX_2) θεωρούνται σημαντικοί προστατευτικοί παράγοντες έναντι του καρκίνου του παχέως εντέρου. Επίσης σε μια άλλη μελέτη *"in vivo"* σε κουνέλια η *trans*-ρεσβερατρόλη παρουσίασε μια προστατευτική δράση εμποδίζοντας τα πρώτα στάδια της δημιουργίας καρκινικών όγκων στους πνεύμονες[87].

Μελέτη *"in vitro"* σε ανθρώπινα κύτταρα έδειξε ότι η *trans*-ρεσβερατρόλη είναι αποτελεσματική έναντι της χημειοθεραπείας. Συγκεκριμένα βρέθηκε ότι η *trans*-ρεσβερατρόλη προκαλεί απόπτωση στα ανθρώπινα λευχαιμικά κύτταρα[88]. Η μεσολάβηση της *trans*-ρεσβερατρόλης στο θάνατο των καρκινικών κυττάρων συνδέεται με το CD_{95}, γνωστός και ως μεσολαβητής της απόπτωσης. Επίσης μια άλλη μελέτη με καθαρά μόρια *trans*-ρεσβερατρόλης σε ανθρώπινα κύτταρα έδειξε ότι η *trans*-ρεσβερατρόλη μπορεί να εμποδίσει την οξείδωση της LDL χοληστερόλης[89]. Ακόμα παρατηρήθηκε μια αύξηση της HDL χοληστερόλης σε *"in vitro"* μελέτη[90] ανθρώπινων κυττάρων μετά την κατανάλωση κόκκινου κρασιού.

Μελέτη *"in vitro"* σε κύτταρα κουνελιών έδειξε ότι η *trans*-ρεσβερατρόλη εμποδίζει την σύνδεση της [^{3}H] οιστραδιόλης στους υποδοχείς των οιστρογόνων τύπου Ι. Αυτή η ικανότητα της *trans*-ρεσβερατρόλης να ανταγωνίζεται την σύνδεση με τα οιστρογόνα της δίνει την δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί στην θεραπεία ενάντια στον καρκίνο των πνευμόνων[91]. Πιστεύεται ότι έχει κυρίαρχο ρόλο ενάντια στον καρκίνο του προστάτη[92-93], δρώντας α) ως αναστολέας σε κάθε βήμα της καρκινογένεσης, β) ως εκκαθαριστής των ανδρογόνων καρκινικών κυττάρων του προστάτη μέσω των υποδοχέων των ανταγωνιστών των ανδρογόνων. Μελέτη[94-102] *"in vitro"* σε κύτταρα κουνελιών έδειξε ότι η *trans*-ρεσβερατρόλη [εκτός της ανασταλτικής της δράσης έναντι της θρομβίνης και της διφωσφορικής αδενοσίνης (ADP)[103]], ασκεί μια δοσοεξαρτώμενη αναστολή του Παράγοντα Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων (PAF) με τιμή IC_{50} $1x10^{-4}$M. Άλλες μελέτες *"in vitro"* έχουν δείξει ότι η *trans*-ρεσβερατρόλη παρουσίαζε μια ανασταλτική δράση στην συσσώρευση των αιμοπεταλίων και μάλιστα σε διάφορα στάδια μειώνοντας την συγκόλληση των αιμοπεταλίων στο κολλαγόνο τύπου Ι και

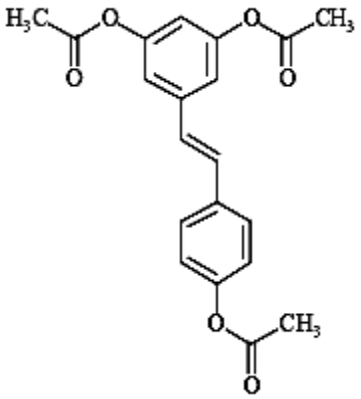
στην γλοβουλίνη και αναστέλλοντας την σύνθεση των εικοσανοειδών[104] . Επίσης το μονοπάτι του αραχιδονικού οξέος φαίνεται να παίζει ρόλο στην ανασταλτική δράση της *trans*-ρεσβερατρόλης έναντι της συγκόλλησης των αμοπεταλίων[104].

Άλλοι μελετητές παρατήρησαν κύτταρα κουνελιών ότι με την αύξηση της κατανάλωσης τροφίμων που περιείχαν *trans*-ρεσβερατρόλη, παρατηρήθηκε μια σημαντική μείωση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης της Apo–B. Συγκεκριμένα ο βαθμός έκκρισης της χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων μειώθηκε, προκαλώντας μείωση της παραγωγής τόσο της πολύ χαμηλής πυκνότητας χοληστερόλης (VLDL), όσο και της LDL χοληστερόλης[105]. Ενώ άλλες μελέτες οι οποίες διενεργήθηκαν με επιθηλιακά κύτταρα κουνελιών έδειξαν ότι *trans*-ρεσβερατρόλη προκαλεί αναστολή της H^+/K^+ATPάσης, η οποία γνωρίζουμε ότι αποτελεί τον πρώτο στόχο στην θεραπεία του πεπτικού έλκους[106] ενώ τόσο η α-βινιφερίνη, όσο και η *trans*-ρεσβερατρόλη, εμποδίζουν την οξειδωτική δράση της τυροσίνης[107] Γνωρίζουμε ότι τυροσίνη καταλύει με σταθερό ρυθμό την βιοσύνθεση της μελανίνης, η οποία ενοχοποιείται για τις τοπικές βλάβες στο χρώμα του δέρματος.

5. ΑΚΕΤΥΛΙΩΜΕΝΗ trans-ΡΕΣΒΕΡΑΤΡΟΛΗ

5.1 Δομή

Μια πολύ πρόσφατη μελέτη[108] ανίχνευσε ένα νέο ακετυλιωμένο παράγωγο, το οποίο με την βοήθεια της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) με ανιχνευτή υπεριώδους ορατού, φασματοφωτόμετρου και φθορισμόμετρου προσδιορίστηκε η πιθανή δομή του και αναγνωρίστηκε ως τριακέτυλο-ρεσβερατρόλη (RTA), η οποία φαίνεται στο σχήμα 9.



Σχήμα 9: *Δομή της τριακέτυλο-ρεσβερατρόλης (RTA)*

5.2 Πηγές

Στην μελέτη κατά την οποία ανιχνεύτηκε η τριακέτυλο-ρεσβερατρόλη (RTA), ως πηγής αναφέρεται η βινεατρόλη, ένα σύμπλεγμα πολυφαινολών που προέρχεται από βλαστούς αμπελιού[108]. Επίσης σε μια άλλη μελέτη στην οποία ανιχνεύτηκε πάλι η τριακέτυλο-ρεσβερατρόλη (RTA), αλλά αυτή την

φορά προήλθε από συνθετική *trans*-ρεσβερατρόλη παρουσία της *Candida antarctica* λιπάσης[109].

5.3 Βιοδιαθεσιμότητα- Μεταβολισμός

Σε καμία από τις προαναφερόμενες μελέτες, αλλά και στην διεθνή βιβλιογραφία δεν γίνεται αναφορά για την απορρόφηση και τον μεταβολισμό των ακετυλιωμένων παραγώγων της *trans*-ρεσβερατρόλης.

5.4 Βιολογικές δράσεις

Μελέτη *"in vitro"* σε ανθρώπινα κύτταρα έδειξε ότι το ακετυλιωμένο παράγωγο της *trans*-ρεσβερατρόλης και συγκεκριμένα η τριακετυλο-ρεσβερατρόλη (RTA), μπορεί να επιφέρει απόπτωση στα Β-λευχαιμικά κύτταρα[108], ενώ ταυτοχρόνως μπορεί να εμποδίσει την ενδογενή παραγωγή νιτρικού οξέος (NO). Συγκεκριμένα αποδείχτηκε ότι η τριακετυλο-ρεσβερατρόλη (RTA) εμποδίζει την ανάπτυξη, αλλά και προάγει την απόπτωση πολλών λευχαιμικών κυττάρων της μυελώδους μοίρας (Τ και Β κύτταρα)[110], μέσω της αναστολής της έκφρασης του iNOS[111], (inducible NO synthase) και της παραγωγής νιτρικού οξέος (NO)[112]. Ακόμα φάνηκε ότι θεραπεία με τριακετυλο-ρεσβερατρόλη (RTA), επιφέρει μια δόσο-εξαρτώμενη αναστολή στον πολλαπλασιασμό των λευχαιμικών κυττάρων[113]

Επίσης έχουν απομονωθεί κάποια επιμέρους ακετυλιωμένα παράγωγα της ρεσβερατρόλης σε *"in vitro"* μελέτη[114] κυττάροτοξικότητας έναντι της ανθρώπινης καρκινικής σειράς. Συγκεκριμένα τα ακετυλιωμένα παράγωγα έδειξαν μια σημαντικά αυξανόμενη κυτταροτοξική δράση συγκρινόμενα με τα αντίστοιχα διμερή της ρεσβερατρόλης. Σε πρόσφατη μελέτη *"in vitro"* σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη, φάνηκε ότι το ακετυλιωμένο παράγωγο και συγκεκριμένα η τριακετυλο-ρεσβερατρόλη (RTA), έχει μια δράση επαγωγική

στην απόπτωση των καρκινικών κυττάρων του προστάτη, με αποτέλεσμα να εμφανίζει μια ισχυρή τοξικότητα έναντι των καρκινικών αυτών κυττάρων[109].

Επίσης τα ακετυλιωμένα παράγωγα της ρεσβερατρόλης σε σύγκριση της δραστικότητας τους με τα μη ακετυλιωμένα φάνηκε ότι η ακετυλίωση των διμερών της ρεσβερατρόλης επιφέρει μια αύξηση της δραστικότητας, αλλά και της εξειδίκευσης[114] συγκρινόμενη με την *trans*-ρεσβερατρόλη. Στην μελέτη με τα καρκινικά κύτταρα του προστάτη[109] φάνηκε ότι το κλάσμα που απομονώθηκε παρουσίασε βιολογική δραστικότητα όμοια ή ακόμα και καλύτερη από της *trans*–ρεσβερατρόλη. Επίσης η αύξηση του λιπόφιλου χαρακτήρα που προκαλεί η ακετυλίωση, φαίνεται να παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην μεταφορά αλλά και στην κυτταρική διείσδυση.

6.ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ (PAF)[115,116,117]

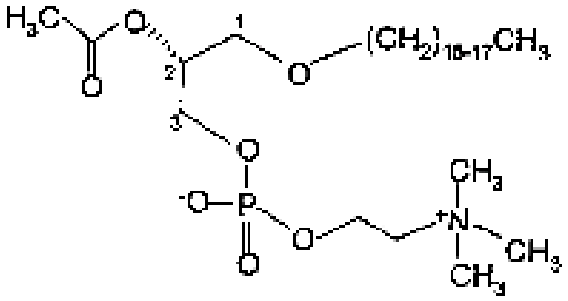
6.1 Εισαγωγή

Η ανακάλυψη του Παράγοντα Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων το 1979 άνοιξε νέες κατευθύνσεις στην έρευνα των λιποειδών. Και αυτό γιατί ο PAF είναι το πρώτο βιολογικά δραστικό φωσφολιποειδές το οποίο βρέθηκε στην φύση και παραμένει μέχρι σήμερα ένας από τους δραστικότερους χημικούς μεσολαβητές. Επομένως θεωρείται πλήρως αποδεκτός και ο χαρακτηρισμός ο οποίος έχει αποδοθεί στον PAF ως ένας αρχέγονος - καθολικός κυτταρικός βιολογικός ρυθμιστής, ο οποίος ανήκει σε μια οικογένεια μορίων με ανάλογη δράση και στην οποία είναι το πρώτο και το δραστικότερο μόριο που ανακαλύφθηκε.

6.2 Δομή

Ο PAF (1979) αποτελεί το πιο σημαντικό εκπρόσωπο των γλυκεριναιθερικών λιποειδών και έχει ταυτοποιηθεί ως 1-Ο-άλκυλο-2-ακέτυλο-sn-γλύκερο-3-φωσφοχολίνη. Στην πρώτη θέση του γλυκερινικού σκελετού συνδέεται με αιθερικό δεσμό μια λιπαρή αλυσίδα που περιλαμβάνει συνήθως 16 ή 18 άτομα άνθρακα και είναι κορεσμένη ή ακόρεστη με έναν ή δύο διπλούς δεσμούς. Στην δεύτερη θέση βρίσκεται εστεροποιημένο ένα οξικό οξύ και τέλος στην τρίτη θέση υπάρχει μια ομάδα φωσφορυλοχολίνης.

Η δομή του PAF παρουσιάζεται στο σχήμα 10:



Σχήμα 10: *Δομή του Παράγοντα Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων*

6.3 Βιολογικές δράσεις

Ο PAF είναι ο ισχυρότερος μέχρι σήμερα γνωστός φλεγμονώδης και αλλεργιογόνος παράγοντας και γενικότερα εμπλέκεται σε παρά πολλές παθοφυσιολογικές καταστάσεις, διαδραματίζοντας πρωτεύοντα ρόλο.

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

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

- Να εκκριθεί από τα κύτταρα και να δράσει είτε αυτοκρινώς πάνω στα κύτταρα από τα οποία παράχθηκε, είτε παρακρινώς ενεργοποιώντας γειτονικά κύτταρα του ίδιου ή διαφορετικού είδους, είται συνδετοκρινώς ενεργοποιώντας απομακρυσμένα κύτταρα του ίδιου ή διαφορετικού είδους μόρια. Αυτός ο τρόπος δράσης του PAF είναι ιδιαίτερα

σημαντικός κατά την ενεργοποίηση και προσκόλληση των ουδετερόφιλων στα ενδοθηλιακά κύτταρα σε καταστάσεις φλεγμονής.

- Να παραμείνει στα κύτταρα και να δράσει ως ενδοκυτταρικός μεσολαβητής.

Οι κυριότερες δράσεις του PAF τόσο "*in vitro*" όσο και "*in vivo*" φαίνονται στους πίνακες 2 και 3 :

Πίνακας 2 *"In vitro" δράσεις του PAF*

Είδος κυττάρου/ιστού	**Δράσεις**
Αιμοπετάλια	Αλλαγή σχήματος, συσσώρευση, έκκριση εικοσανοειδών
Ουδετερόφιλα	Αποκοκκίωση, συσσώρευση, χημειοταξία, αύξηση προσκολλητικής ικανότητας
Λεμφοκύτταρα	Βλαστική τροποποίηση, καταστολή παραγωγής IL-2
Νευρώνες	Ενεργοποίηση του κύκλου της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης
Σπερματοζωάρια	Αύξηση κινητικότητα
Πρωτόζωα	Σύνθεση εικοσανοειδών, αύξηση γλυκογονόλυσης
Ήπαρ	Αύξηση γλυκογονόλυσης, μεταβατική αύξηση στην πίεση της πυλαίας φλέβας
Πνεύμονες	Μείωση της επιφάνειας των τριχοειδών
Καρδιά	Μείωση της συσταλτικής ικανότητας της κοιλίας
Λεπτό έντερο	Σύσπαση, ισχαιμική νέκρωση

Πίνακας 3 *"In vivo"* δ*ράσεις του PAF*

Παθολογική κατάσταση	**Δράση PAF**
Καρδιαγγειακό σύστημα	Αρνητική ινότροπη δράση, μείωση του κατά λεπτό˙ όγκου αίματος, συμμετοχή στην παθογένεια της αρτηριοσκλήρυνσης
Πεπτικό σύστημα	Βλάβη γαστρικού βλεννογόνου, ισχαιμική νέκρωση εντέρου
Αναπαραγωγικό σύστημα	Συμμετοχή στην κινητοποίηση του σπέρματος και στην ωορρηξία
Εγκεφαλική λειτουργία	Συμμετοχή στο LTP, ανάδρομος μεσολαβητής
Ανοσολογικό σύστημα	Συμμετοχή στην κυτταρική απόκριση

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

7. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν η σύνθεση, ο διαχωρισμός και η μελέτη της βιολογικής δραστικότητας των ακετυλιωμένων παραγώγων δύο από τις πιο διαδεδομένες φαινολικές ενώσεις της Μεσογειακής Διατροφής, της τυροσόλης και της *trans*-ρεσβερατρόλης.

8. ΜΕΘΟΔΟΙ

8.1 Ακετυλίωση φαινολικών[117]

Όργανα

- Θερμοστατούμενο Υδρόλουτρο.

Αντιδραστήρια

- Οργανικοί διαλύτες (χλωροφόρμιο, αιθανόλη, οξικός ανυδρίτης) αναλυτικής καθαρότητας.
- Πρότυπες φαινολικές ενώσεις (τυροσόλη και *trans*-ρεσβερατρόλη).

Αρχή μεθόδου

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

Αναλυτική πορεία

Από το δείγμα της προς ακετυλίωση φαινολικής ένωσης (1-3 mg) εξατμίζεται ο διαλύτης σε ρεύμα αζώτου και στο βιδωτό σωληνάκι όπου βρίσκεται προστίθενται 3 mL οξικού ανυδρίτη. Μετά από παραμονή του σωλήνα σε υδατόλουτρο 60 ^{o}C για 45 λεπτά, ο οξικός ανυδρίτης εξατμίζεται σε ρεύμα αζώτου και το προϊόν της αντίδρασης αναδιαλύεται σε 3 mL αιθανόλη.

8.2 Διαχωρισμός ακετυλιωμένων φαινολικών ενώσεων με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Όργανα

- Υγρός χρωματογράφος Hewlett- Packard series 1100, με 100 μL βρόγχο τοποθέτησης δείγματος.
- Καταγραφέας – ολοκληρωτής : Hewlett- Packard, HP -3396A
- Μικροσύριγγα ακριβείας 100 μL.
- Στήλη ανάστροφης φάσης : Zobax Eclipse XDB- C8, 4.5 mm IDx 15 cm, 5 μ, Agilent Technologies.

Αντιδραστήρια

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

Αναλυτική πορεία

Η στήλη πριν χρησιμοποιηθεί, καθαρίζεται με κατάλληλους οργανικούς διαλύτες ανάλογα με το υλικό πλήρωσής της. Ακολουθεί η σταθεροποίηση της με τον πρώτο διαλύτη έκλουσης και στην συνέχεια η τοποθέτηση του δείγματος.

Η έκλουση του δείγματος γίνεται, είτε με σταθερή, είτε με μεταβαλλόμενη σύσταση διαλυτών. Η έκλουση των διαχωριστικών ουσιών ελεγχόταν με την μεταβολή της οπτικής απορρόφησης στα 256 nm και η παραλαβή τους γινόταν σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Σε περίπτωση μη μεταβολής της οπτικής απορρόφησης, λαμβανόταν κλάσματα κατά τακτά χρονικά διαστήματα.

8.3 Ήπια αλκαλική υδρόλυση ακετυλιωμένων φαινολικών ενώσεων[118]

Όργανα

- Θερμοστατούμενο Υδρόλουτρο.

Αντιδραστήρια

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

Αρχή μεθόδου

Παρουσία αλκαλικού περιβάλλοντος υπό θέρμανση διασπώνται εκλεκτικά οι εστερικοί δεσμοί των φαινολικών ενώσεων.

Αναλυτική πορεία

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

8.4 Ποσοτικός προσδιορισμός φαινολικών[119]

Όργανα

- Φωτόμετρο Pharmacia Biotech / Novaspec II.

Αντιδραστήρια

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

Αρχή μεθόδου

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

Αναλυτική πορεία

Το προς εξέταση δείγμα εξατμίζεται μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου. Στην συνέχεια προστίθενται διαδοχικά 3,5 mL νερό, 0,1mL Folin-Ciocalteu και αναδεύουμε ισχυρά. Μετά από παραμονή 3 λεπτά προστίθενται 0,4 mL Na_2CO_3 35% και το όλο μίγμα αφού αναδευτεί εντόνως, αφήνεται για μια ώρα και φωτομετρείται στα 725 nm. Παράλληλα γίνεται τυφλός προσδιορισμός καθώς και προσδιορισμός στα πρότυπα διαλύματα φαινολικών ενώσεων (*trans*-ρεσβερατρόλη και τυροσόλη) που περιέχουν από 1 έως 60 μg, οπότε

και κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη αναφοράς, βάση της οποίας προσδιορίζεται η συγκέντρωση σε φαινολικά του άγνωστου δείγματος.

8.5 Βιολογική δοκιμασία συσσώρευσης σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού[120]

Όργανα

- Συσσωρευματόμετρο (CHRONO – LOG).
- PHμετρο (CHEMTRIX Type 60A).
- Φωτόμετρο Pharmacia Biotech/ Novaspec II.
- Υδρόλουτρο 37°C.
- Φυγόκεντρος Sorval.

Αντιδραστήρια

- Διάλυμα 10x Tyrodes stock : Σε 1 L περιέχονται 80 g NaCl, 1,95 g KCl, 2,13g $MgCl_26H_2O$, 10 g γλυκόζη.
- Διάλυμα 100x$CaCl_2$ stock : Ποσότητα 1,911 g $CaCl_2$ σε 100 mL H_2O.
- Διάλυμα 0,2 M EGTA stock : Ποσότητα 0,76 g EGTA/10 mL H_2O. Ρυθμίζεται το pH του διαλύματος στα 7,5 με 5 M NaOH.
- Διάλυμα ζελατίνας 10 % σε νερό.
- Ρυθμιστικά διαλύματα για ρύθμιση pHμετρου.
- Διαλύματα Tyrodes – Gelatin pH 6,5 (Tg pH 6,5),Tyrodes – Gelatin - EGTA pH 6,5 (Tg pH 6,5): Σε 80 mL νερό προστίθενται 10 mL Tyrodes stock. Χρησιμοποιώντας μαγνητικό αναδευτήρα κατά την διάρκεια της προσθήκης, προστίθενται 2,5 mL ζελατίνης 10 % (λιωμένης στο σημείο βρασμού). Κατόπιν προστίθενται 5 mL διαλύματος $NaHCO_3$ (0,203 g $NaHCO_3$ σε 10mL H_2O) που πρέπει

να χρησιμοποιείται αμέσως μετά την προσθήκη του H_2O στο $NaHCO_3$. Συμπληρώνεται ο όγκος στα 100 mL με νερό και χωρίζεται σε 2 μέρη των 50 mL. Στο ένα προστίθενται 25 μL 0,2 M EGTA. Ρυθμίζεται το pH και των 2 κλασμάτων στο 6,46 με 1 N HCl. Αμέσως γεμίζονται σωλήνες των 16 mL μέχρι επάνω (χωρίς φυσαλίδες αέρα) και σκεπάζονται με parafilm. Οι σωλήνες φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου.

- Διάλυμα Tyrodes και ασβεστίου pH 7,2 (Tg - Ca pH 7,2) : Σε 5 10x Tyrodes stock προστίθενται 40 mL νερό. Χρησιμοποιώντας μαγνητικό αναδευτήρα προστίθενται 1,25 mL 10 % ζελατίνη. Στη συνέχεια προστίθενται 0,5 mL 100x$CaCl_2$ stock. Κατόπιν προστίθενται 2,5 mL διαλύματος $NaHCO_3$ (παρασκευάζεται όπως παραπάνω). Συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τα 50 mL με νερό και ρυθμίζεται το pH στο 7,16 με 1 N HCl. Διατηρείται στους 37^oC σε ερμητικά κλειστούς σωλήνες.
- Αντιδραστήριο ACD : Σε 1000 mL H_2O περιέχονται 13,65 g κιτρικού οξέος, 25 g κιτρικού νατρίου και 20 g δεξτρόζης.
- Αλβουμίνη βοδινού ορού (BSA) stock : Ποσότητα 100 mg BSA ελεύθερης λιπαρών οξέων (Sigma)/mL φυσιολογικού ορού. Φυλάσσεται στους 20 ^oC.
- Διάλυμα BSA 2,5 mg/mL φυσιολογικού ορού: Από 10 mL φυσιολογικού ορού αφαιρούνται 250 μL και προστίθενται 250 μL BSA stock.
- Διάλυμα θρομβίνης σε φυσιολογικό ορό.
- Ficoll – Paque (Pharmacia).
- Υλικό σιλικοναρίσματος (Serva).
- BN 52021: Διαλυτοποιείται σε 0,3 % DMSO, συγκέντρωση 0,1 mM.

Αναλυτική πορεία

1) <u>Απομόνωση πλυμένων αιμοπεταλίων από αίμα κουνελιού.</u>

Σε πλαστικούς σωλήνες των 50 mL τίθενται 7 mL ACD. Το αίμα συλλέγεται από την κεντρική αρτηρία του κουνελιού και ο σωλήνας γεμίζεται

με αίμα μέχρι τα 50 mL. Αναμιγνύεται ήπια με αναστροφή. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στους 24°C στα 500g (1850 rpm). Κατά την διάρκεια της φυγοκέντρησης μεταφέρονται 2 mL Ficoll – Paque σε πλαστικούς σωλήνες των 14 mL. Αναρροφώνται τα 2/3 του υπερκείμενου πλάσματος (πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια, PRP) με πλαστικό σιφώνιο των 20 mL και μεταφέρονται σε άλλο πλαστικό σωλήνα των 50 mL. Τοποθετείται το πλάσμα πάνω στο στρώμα του Ficoll, με μέγιστο ποσό πλάσματος τα 8-9 mL για κάθε 2 mL Ficoll, χρησιμοποιώντας πλαστικά σιφώνια και μεταφέροντας ίσους όγκους πλάσματος σε 2 ή 3 σωλήνες, ανάλογα με το συνολικό όγκο του πλάσματος. Σκεπάζεται με parafilm. Οι σωλήνες φυγοκεντρούνται για 20 λεπτά στους 24°C στα 750 g (2700rpm), οπότε τα αιμοπετάλια εμφανίζονται σαν ταινία μεταξύ της στοιβάδας του πλάσματος και του στρώματος του Ficoll. Το υπερκείμενο πλάσμα (φτωχό σε αιμοπετάλια) αναρροφάται και απορρίπτεται με πλαστική σύριγγα των 20 mL. Το στρώμα των αιμοπεταλίων διαπερνάται με σιλικοναρισμένη πιπέτα Pasteur. Αναρροφάται το Ficoll και στην συνέχεια απορρίπτεται .

Α) Αν υπάρχουν 2 σωλήνες:

Προστίθενται 7 mL Tg EGTA pH 6,5 σε κάθε σωλήνα. Το διάλυμα αφήνεται να τρέξει ήπια στα τοιχώματα του σωλήνα και χωρίς ανάμιξη αποχύνεται το αιώρημα σε άλλο πλαστικό σωλήνα των 14 mL, αφήνοντας έτσι τα ερυθρά αιμοσφαίρια στον αρχικό σωλήνα.

Β) Αν υπάρχουν 3 σωλήνες:

Προστίθενται 4 mL Tg EGTA pH 6,5 σε κάθε σωλήνα. Το διάλυμα αφήνεται να τρέξει ήπια στα τοιχώματα του σωλήνα και χωρίς ανάμειξη αποχύνεται το αιώρημα σε άλλο πλαστικό σωλήνα των 14 mL του οποίου το περιεχόμενο χωρίζεται σε 2 ίσα μέρη που μεταφέρονται σε 2 ξεχωριστούς σωλήνες και προστίθενται περίπου 3 mL Tg EGTA pH 6,5.

Το περιεχόμενο του κάθε σωλήνα μεταφέρεται σε 2 mL Ficoll (8 mL αιμοπεταλίων σε κάθε σωλήνα) και καλύπτεται με parafilm. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15 min στους 24°C στα 800 g (2900 rpm). Το υπερκείμενο ρυθμιστικό διάλυμα απορροφάται και απορρίπτεται. Στην συνέχεια

διαπερνάται το στρώμα των αιμοπεταλίων με σιλικοναρισμένη πιπέτα Pasteur, αναρροφάται το Ficoll και απορρίπτεται.

Προστίθενται ίσοι όγκοι (8 mL) Tg pH 6,5 σε κάθε σωλήνα αφήνοντας το διάλυμα να τρέξει ήπια στα τοιχώματα του σωλήνα και χωρίς ανάμιξη μεταφέρεται το αιώρημα σε καθαρό πλαστικό σωλήνα των 14 mL, ενώ καλύπτεται με parafilm. Ακολουθεί νέα φυγοκέντρηση για 15 min στους 24°C στα 800 g (2900 rpm).

Το υπερκείμενο ρυθμιστικό διάλυμα απορροφάται και απορρίπτεται με πιπέτα Pasteur, αφαιρώντας και την τελευταία σταγόνα από τα τοιχώματα του δοχείου. Στην συνέχεια προστίθενται με αυτόματη πιπέτα 0,8 mL Tg pH 6,5 σε κάθε συσσωμάτωμα αιμοπεταλίων αναδιασπείρωντας τα κύτταρα με μεγάλη προσοχή (όσο πιο ήπια γίνεται). Το περιεχόμενο από τα 3 σωληνάκια ενώνεται σε ένα πλαστικό σωλήνα.

Ετοιμάζεται αιώρημα αιμοπεταλίων σε Tg pH 6,5 που να περιέχει 1,25 x 10^8 κύτταρα/mL. Από το πυκνό διάλυμα αιμοπεταλίων παίρνω 10 λ και 990 λ Tg pH 6,5 και φωτομετρείται στα 530 nm. Ο αριθμός των κυττάρων στα 10 λ δίνεται: Αριθμός κυττάρων/10λ = A x 1,25 x 10^8, όπου A η απορρόφηση. Με βάση την πρότυπη καμπύλη της οπτικής απορρόφησης σε συνάρτηση με τον αριθμό των αιμοπεταλίων, υπολογίζεται ο αριθμός των αιμοπεταλίων και ετοιμάζεται το επιθυμητό εναιώρημα[121].

2) <u>Πειράματα απευαισθητοποίησης σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού.</u>

Με κάποια συγκέντρωση PAF προκαλείται αντιστρεπτή συσσώρευση αιμοπεταλίων και όταν τα αιμοπετάλια επανέλθουν στην αρχική τους κατάσταση προστίθεται στην κυψελίδα η ίδια συγκέντρωση PAF.

Παρατηρείται ότι η δεύτερη προσθήκη του συσσωρευτικού παράγοντα προκαλεί μικρότερη συσσώρευση από την αρχική, λόγω απευαισθητοποίησης των αιμοπεταλίων.

Στα πειράματα διασταυρούμενης απευαισθητοποίησης, επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία με την προσθήκη δύο διαφορετικών συσσωρευτικών παραγόντων.

3) <u>Πειράματα αναστολής της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού.</u>

Στη σειρά αυτών των πειραμάτων πριν από την προσθήκη του συσσωρευτικού παράγοντα προστίθενται διάφορες ποσότητες του εξεταζόμενου (για αναστολή) δείγματος, το οποίο το έχουμε συμπυκνώσει κατά μια τάξη μεγέθους (10x). Ακολουθεί επώαση για 1 λεπτό και στην συνέχεια προστίθεται PAF για κάθε συγκέντρωση δείγματος. Σχεδιάζεται η καμπύλη της επί της εκατό αναστολής, συναρτήσει της συγκέντρωσης και σαν τιμή IC_{50} ορίζεται εκείνη η συγκέντρωση του δείγματος που προκαλεί 50% αναστολή της συσσώρευσης.

8.6 Ενζυμική υδρόλυση ακετυλομάδων φαινολικών

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris (τρις-(υδροξυμεθυλο)-αμινομεθάνιο)-HCl (50 mM-pH 7,4): Διαλύονται 0,605 g Tris σε νερό, ρυθμίζεται το pH με HCl 1 M στο 7,4 και συμπληρώνεται ο όγκος με νερό έως τα 100 mL.
- Διάλυμα εργασίας βόειας αλβουμίνης ορού (BSA) 2,5 mg/mL φυσιολογικού ορού.
- PAF συγκέντρωσης $5x10^{-10}$ M σε διάλυμα εργασίας βόειας αλβουμίνης ορού (BSA) 2,5 mg/mL φυσιολογικού ορού.
- PAF-ακετυλοϋδρολάση ανθρώπινου ορού.
- Θερμοστατούμενο υδρόλουτρο $37^{o}C$.
- Ειδικοί πλαστικοί σωλήνες φυγοκέντρου των 0,5 mL (eppendorf).

Αρχή μεθόδου

Η ακετυλοϋδρολάση υδρολύει το οξικό οξύ από το σκελετό των φαινολικών παραγώγων.

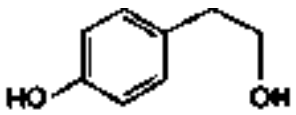
Αναλυτική πορεία

Σε ειδικό δοκιμαστικό σωλήνα φυγοκέντρου (eppendorf) προθερμασμένο στους 37°C, προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα Tris[τρις-(υδροξυμεθυλο)-αμινομεθάνιο] -HCl (50 mM-pH 7,4), το προς εξέταση δείγμα διαλυμένο σε διάλυμα εργασίας BSA σε κατάλληλη ποσότητα και τέλος κατάλληλη ποσότητα ενζύμου ακετυλοϋδρολάσης ορού. Το μείγμα επωάζεται στους 37°C και σε διάφορες χρονικές στιγμές παραλαμβάνονται ίσες ποσότητες αυτού και ελέγχονται για την βιολογική τους δραστικότητα ως προς την πρόκληση συσσώρευσης πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού.

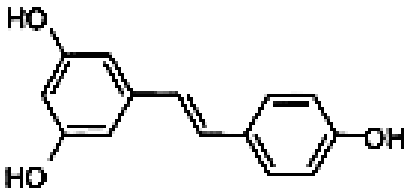
9. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

9.1 Πειραματική πορεία

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, για την πραγματοποίηση της συγκεκριμένης μελέτης, επιλέχθηκαν δύο από τις πιο διαδεδομένες φαινολικές ενώσεις της Μεσογειακής Διατροφής: η *trans*-ρεσβερατρόλη με τρία υδροξύλια, που αποτελεί την κύρια φαινολική ένωση του κρασιού και η τυροσόλη με δύο υδροξύλια, που αποτελεί την κύρια φαινολική ένωση του ελαιολάδου. Η δομή των ενώσεων αυτών φαίνεται στο σχήμα 11.



Τυροσόλη



***trans*-ρεσβερατρόλη**

Σχήμα 11: *Δομές τυροσόλης (2-(4-υδροξυφαίνυλο)αιθανόλη) [2-(4-hydroxyphenyl)ethanol] και trans-ρεσβερατρόλης (3,4΄,5-τριυδρόξυ-trans-στιλβένιο) [3,4΄,5-trihydroxy-trans-stilbene]*

Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η ικανότητα της αρχικής φαινολικής ένωσης να προκαλεί συσσώρευση ή αναστολή συσσώρευσης (επαγώμενη από τον PAF) πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού, που στην συνέχεια θα αναφέρεται ως βιολογική διαδικασία.

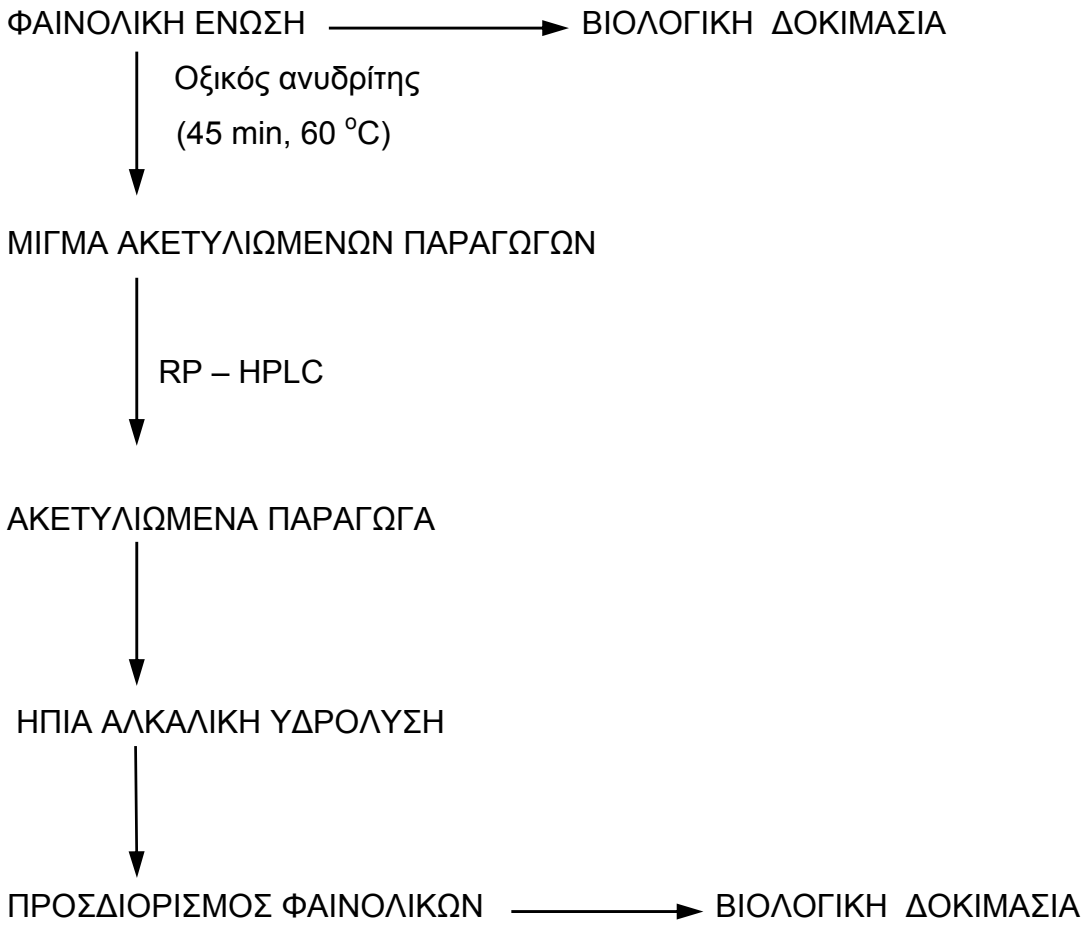
Στην συνέχεια η φαινολική ένωση ακετυλιώθηκε στις βέλτιστες συνθήκες (45 min στους 60 ^{o}C) όπως αυτές είχαν προσδιοριστεί από προηγούμενες μελέτες[116].

Ένα μέρος του ακετυλιωμένου μίγματος μελετήθηκε ως προς την βιολογική του δραστικότητα, ενώ το υπόλοιπο διαχωρίστηκε με HPLC σε στήλη ανάστροφης φάσης C8.

Στα επιμέρους ακετυλιωμένα παράγωγα, τα οποία λήφθηκαν από την HPLC, έγιναν χημικοί προσδιορισμοί (προσδιορισμός φαινολικών) μετά από ήπια αλκαλική υδρόλυση.

Τέλος, έγινε μελέτη της βιολογικής τους δραστικότητας, δηλαδή της ικανότητας τους να προκαλούν συσσώρευση ή να αναστέλλουν την επαγώμενη από τον PAF συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού.

Η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 12: *Διαγραμματική πορεία μελέτης*

9.2 Ακετυλίωση φαινολικών ενώσεων

9.2.1 Ακετυλίωση *trans*-ρεσβερατρόλης

Αρχικά ζυγίστηκαν 3000 μg πρότυπης *trans*-ρεσβερατρόλης, τα οποία αναδιαλύθηκαν σε αιθανόλη, έτσι ώστε να προκύψει πρότυπο διάλυμα *trans*-ρεσβερατρόλης 1 mg/mL. Από την παραπάνω ποσότητα φυλάχθηκαν 300 λ, συγκέντρωσης 1 mg/mL, για βιολογική δοκιμασία (ικανότητα συσσώρευσης ή αναστολή συσσώρευσης επαγώμενης από τον PAF). Στην συνέχεια η υπόλοιπη ποσότητα δηλαδή 2700 λ και συγκέντρωσης 1 mg/mL ακετυλιώθηκε στις βέλτιστες συνθήκες, 45 min στους 60°C όπως αυτές είχαν προσδιοριστεί από προηγούμενες μελέτες[116].

9.2.2 Ακετυλίωση τυροσόλης

Αρχικά ζυγίστηκαν 4000 μg πρότυπης τυροσόλης, τα οποία αναδιαλύθηκαν σε αιθανόλη, έτσι ώστε να προκύψει πρότυπο διάλυμα τυροσόλης 1 mg/mL. Ποσότητα 2000 μg συγκέντρωσης 1 mg/mL της πρότυπης ένωσης παρασκευάστηκαν για να υποβλήθουν σε βιολογική δοκιμασία (ικανότητα συσσώρευσης ή αναστολή συσσώρευσης επαγώμενης από τον PAF). Στην συνέχεια τα 4000 μg της πρότυπης τυροσόλης ακετυλιώθηκαν στις βέλτιστες συνθήκες, 45 min στους 60°C όπως αυτές είχαν προσδιοριστεί από προηγούμενες μελέτες[116].

9.3 Διαχωρισμός ακετυλιωμένων παραγώγων φαινολικών ενώσεων

9.3.1 Διαχωρισμός ακετυλιωμένων παραγώγων *trans*-ρεσβερατρόλης

Το μίγμα των ακετυλιωμένων παραγώγων της *trans*-ρεσβερατρόλης διαχωρίστηκε στα επί μέρους ακετυλιωμένα κλάσματα με HPLC σε στήλη ανάστροφης φάσης C8. Δοκιμάστηκαν αρκετά συστήματα έκλουσης, ώστε να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες διαχωρισμού. Έτσι καταλήξαμε σε σύστημα έκλουσης που φαινεται στον πινακα 4. Η ροή της κινητής φάσης ήταν 1 mL/min και η ανίχνευση έγινε με ανιχνευτή υπεριώδους (UV) στα 256 nm.

Με το βαθμιδωτό αυτό σύστημα έκλουσης επιτυγχάνεται πλήρης διαχωρισμός των ενώσεων σε χρόνο 35 min, ενώ απαιτείται χρόνος 10 min επιπλέον για την επαναφορά του συστήματος της κινητής φάσης στην αρχική του σύσταση προκειμένου να ξεκινήσει ο επόμενος διαχωρισμός.

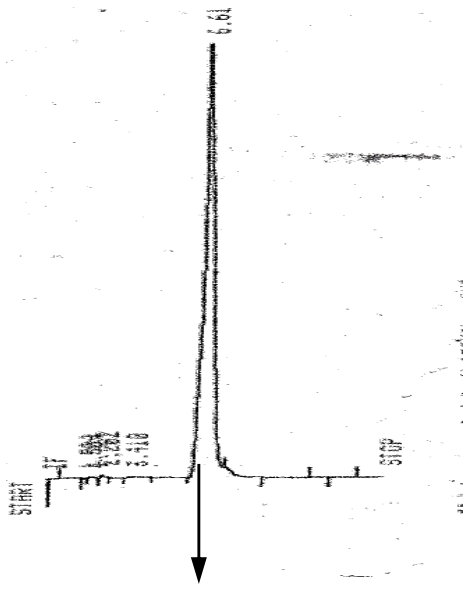
Πίνακας 4 *Σύσταση κινητής φάσης για τον διαχωρισμό ακετυλιωμένων κλασμάτων trans-ρεσβερατρόλης με HPLC*

ΧΡΟΝΟΣ (min)	***ΜΕΘΑΝΟΛΗ : ΝΕΡΟ (v/v)***
0.0	40:60
30.0	60:40
35.0	60:40

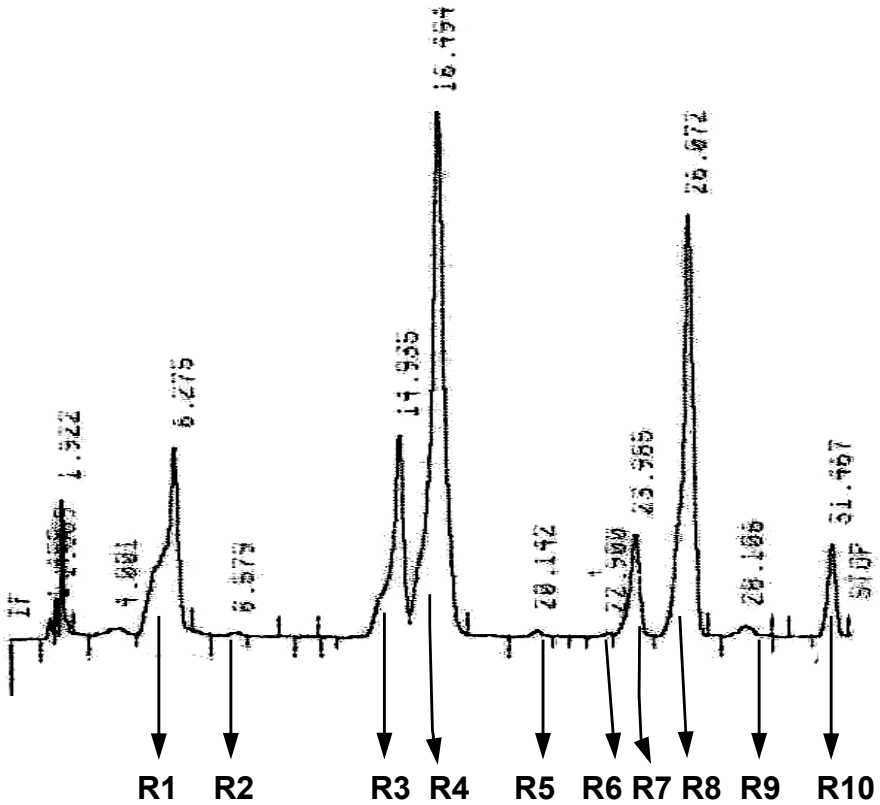
Ο διαχωρισμός και η απομόνωση των επιμέρους κλασμάτων που προέκυψαν μετά την ακετυλίωση της πρότυπης *trans*-ρεσβερατρόλης πραγματοποιήθηκε σε 150 διαδοχικούς διαχωρισμούς των 18 μL.

Από τον διαχωρισμό προέκυψαν δέκα κλάσματα, τα οποία συλλέχθηκαν σε ξεχωριστούς δοκιμαστικούς σωλήνες και ονομάστηκαν R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9 και R10, αντίστοιχα.

Χαρακτηριστικά χρωματογραφήματα από το διαχωρισμό των ακετυλιωμένων παραγώγων της *trans*-ρεσβερατρόλης, αλλά και της πρότυπης *trans*-ρεσβερατρόλης, φαίνονται στο σχήμα 13.



R1 *(1)*



R1 R2 R3 R4 R5 R6 R7 R8 R9 R10

(2)

Σχήμα 13: *Χαρακτηριστικά HPLC χρωματογραφήματα trans-ρεσβερατρόλης πριν (1) και μετά (2) από ακετυλίωση με οξικό ανυδρλιτη στους 60°C για 45 min,σε στήλη ανάστροφης φάσης Zobax Eclipse XDB-C8, 4.5mm IDx15cm, 5μ, Agilent Technologies, ανίχνευση στα 256 nm και κινητή φάση που φαίνεται στον πινακα 4*

Μετά τον πλήρη διαχωρισμό του μείγματος των ακετυλιωμένων παραγώγων, τα κλάσματα που αντιστοιχούσαν στις ίδιες χρωματογραφικές περιοχές ενώθηκαν, συμπυκνώθηκαν σε περιστρεφόμενη συσκευή εξάτμισης υπό ελαττωμένη πίεση και ακολούθως μεταφέρθηκαν σε βιδωτούς δοκιμαστικούς σωλήνες όπου και εξατμίστηκαν έως ξηρού σε ρεύμα αερίου N_2 και αναδιαλύθηκαν στα 2 mL με απόλυτη αιθανόλη.

9.3.2 Διαχωρισμός ακετυλιωμένων παραγώγων τυροσόλης

Το μίγμα των ακετυλιωμένων παραγώγων της τυροσόλης διαχωρίστηκε στα επί μέρους ακετυλιωμένα κλάσματα με HPLC σε στήλη ανάστροφης φάσης C8. Δοκιμάστηκαν αρκετά συστήματα έκλουσης, ώστε να βρεθούν οι καταλληλότερες συνθήκες διαχωρισμού.

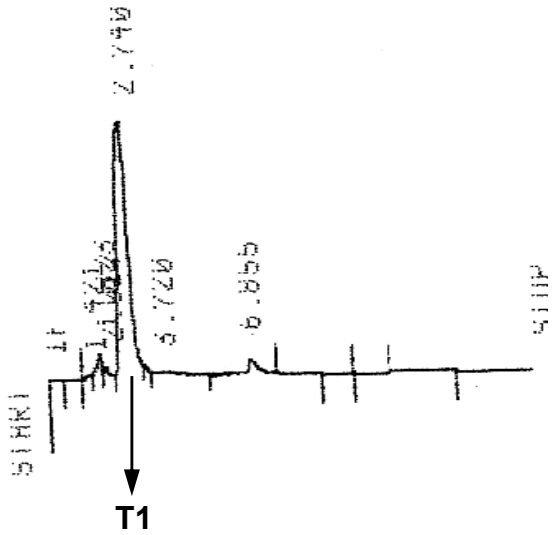
Ο διαχωρισμός έγινε με χρήση ισοκρατικού συστήματος έκλουσης διαλυτών ως κινητή φάση με αναλογία διαλυτών έκλουσης Μεθανόλη / Νερό 60:40 (v/v) και ροή 1 mL/min. Η ανίχνευση έγινε με ανιχνευτή υπεριώδους (UV) στα 256 nm.

Με το ισοκρατικό αυτό σύστημα έκλουσης επιτυγχάνεται πλήρης διαχωρισμός των ενώσεων σε χρόνο 15min, ενώ στα 20min το σύστημα είναι έτοιμο για τον επόμενο διαχωρισμό.

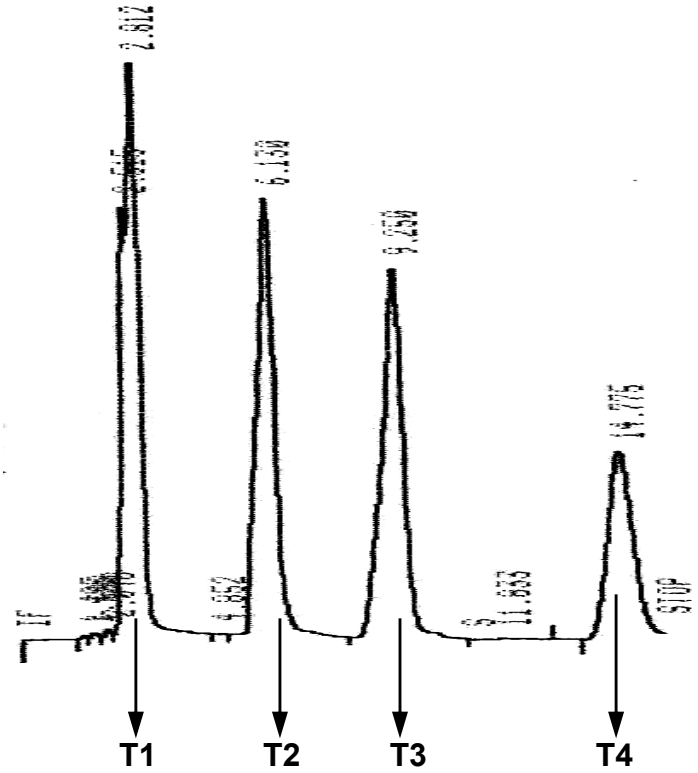
Ο διαχωρισμός και η απομόνωση των επιμέρους κλασμάτων που προέκυψαν μετά την ακετυλίωση της πρότυπης τυροσόλης πραγματοποιήθηκε σε 130 διαδοχικούς διαχωρισμούς των 25 μL.

Από τον διαχωρισμό προέκυψαν τέσσερα ακετυλιωμένα κλάσματα, τα οποία συλλέχθηκαν σε ξεχωριστά σωληνάκια και ονομάστηκαν T1, T2, T3 και T4 αντίστοιχα.

Χαρακτηριστικά χρωματογραφήματα από το διαχωρισμό των ακετυλιωμένων παραγώγων της τυροσόλης, αλλά και της πρότυπης τυροσόλης, φαίνονται στο σχήμα 14.



(1)



(2)

Σχήμα 14: *Χαρακτηριστικά HPLC χρωματογραφήματα τυροσόλης πριν (1) και μετά (2) από ακετυλίωση με οξικό ανυδρλιτη στους 60°C για 45 min,σε στήλη ανάστροφης φάσης Zobax Eclipse XDB-C8, 4.5mm IDx15cm, 5μ, Agilent Technologies και ανίχνευση στα 256 nm*

Μετά τον πλήρη διαχωρισμό του μείγματος των ακετυλιωμένων παραγώγων, τα κλάσματα που αντιστοιχούσαν στις ίδιες χρωματογραφικές περιοχές ενώθηκαν, συμπυκνώθηκαν σε περιστρεφόμενη συσκευή εξάτμισης υπό ελαττωμένη πίεση και ακολούθως μεταφέρθηκαν σε βιδωτούς δοκιμαστικούς σωλήνες όπου και εξατμίστηκαν έως ξηρού σε ρεύμα αερίου N_2 και αναδιαλύθηκαν στα 2 mL με απόλυτη αιθανόλη.

9.4 Ποσοτικός προσδιορισμός φαινολικών

Προκειμένου να γίνει προσδιορισμός φαινολικών στα ακετυλιωμένα παράγωγα ήταν αναγκαία η κατεργασία τους με ήπια αλκαλική υδρόλυση προκειμένου να υδρολυθούν οι οξικές ομάδες και να ελευθερωθούν όλα τα φαινολικά υδροξύλια τα οποία είναι αναγκαία για τον επιτυχή προσδιορισμό με την μέθοδο Folin-Ciocalteu.

9.4.1 Ποσοτικός προσδιορισμός φαινολικών στα ακετυλιωμένα παραγώγα της *trans*-ρεσβερατρόλης

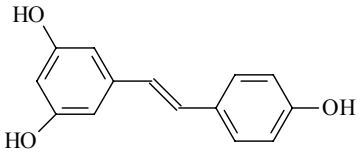
Μετά την ήπια αλκαλική υδρόλυση ακολούθησε προσδιορισμός φαινολικών με την μέθοδο Folin-Ciocalteu σε ποσότητες που κυμαίνονταν από 200 έως 500 μL από το κάθε δείγμα των 2000 μL.

Στο πίνακα 5 φαίνεται η συγκέντρωση, η συνολική ποσότητα και το ποσοστο φαινολικών (σε ισοδύναμα *trans*-ρεσβερατρόλης) των ακετυλιωμένων κλασμάτων *trans*-ρεσβερατρόλης μετά από ήπια αλκαλική υδρόλυση.

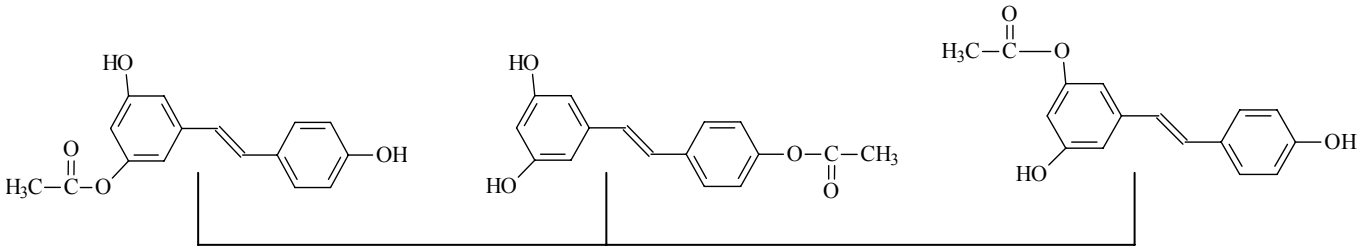
Πίνακας 5 *Συγκέντρωση, συνολική ποσότητα και ποσοστο φαινολικών (σε ισοδύναμα trans-ρεσβερατρόλης) των ακετυλιωμένων κλασμάτων της trans-ρεσβερατρόλης. Η αρχική ποσότητα της ρεσβερατρόλης που ακετυλιωθηκε ήταν 2700 μg*

Κλάσμα	***Συγκέντρωση φαινολικών (10^{-4} M)***	***Συνολική ποσότητα φαινολικών (μmol)***	**Ποσοστό % αρχικής ποσότητας φαινολικών**
***trans*-ρεσβερατρόλη**	44,0	11,80	-
R1	9,4	1,88	15
R2	-	-	-
R3	5,3	1,05	8,9
R4	1,4	2,85	24,1
R5	-	-	-
R6	-	-	-
R7	2,5	0,50	4,2
R8	7,5	1,49	12,6
R9	-	-	-
R10	4,1	0,82	6,9
Ποσοστό % Ανάκτησης			71,5

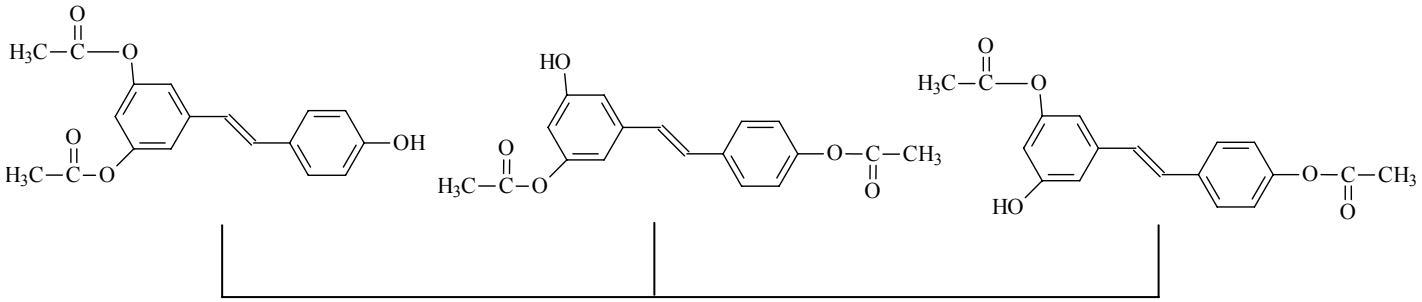
Με βάση τα παραπάνω μπορουμε να υποθέσουμε τις δομές των κλασμάτων R1,R3,R4,R5,R7,R8,R9 και R10. Οι πιθανές δομές των κλασμάτων αυτών φαινονται στα παρακάτω σχήματα.



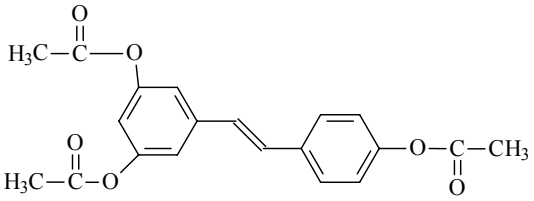
trans-ρεσβερατρόλη R1



Μονοακετυλιωμένα (R3, R4 και R5)



Διακετυλιωμένα (R7, R8 και R9)



Τριακετυλιωμένο R10

Σχήμα 15: *Πιθανή δομή κλασμάτων R1,R3,R4,R5,R7,R8,R9 και R10*

9.4.2 Ποσοτικός προσδιορισμός φαινολικών στα ακετυλιωμένα παραγώγα της τυροσόλης

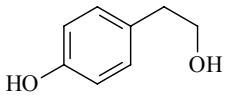
Μετά την ήπια αλκαλική υδρόλυση ακολούθησε προσδιορισμός φαινολικών με την μέθοδο Folin-Ciocalteu σε ποσότητα 100 μL από το κάθε δείγμα των 2000 μL.

Στο πίνακα 6 φαίνεται η συγκέντρωση, η συνολική ποσότητα και το ποσοστό φαινολικών (σε ισοδύναμα τυροσόλης) των ακετυλιωμένων κλασμάτων τυροσόλης μετά από ήπια αλκαλική υδρόλυση.

Πίνακας 6 *Συγκέντρωση, συνολική ποσότητα και ποσοστο φαινολικών (σε ισοδύναμα τυροσόλης) των ακετυλιωμένων κλασμάτων της τυροσόλης. Η αρχική ποσότητα της τυροσόλης που ακετυλιωθηκε ήταν 4000 μg*

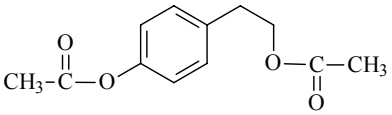
Κλάσμα	***Συγκέντρωση φαινολικών (10^{-4}M)***	***Συνολική ποσότητα φαινολικών (μmol)***	**Ποσοστό % αρχικής ποσότητας φαινολικών**
Τυροσόλη	72,0	28,90	-
Τ1	8,1	3,22	11,1
Τ2	7,7	3,08	10,6
Τ3	6,9	2,75	9,5
Τ4	4,0	1,60	5,5
Ποσοστό % Ανάκτησης			36,7

Με βάση τα παραπάνω μπορούμε να υποθέσουμε τις δομές των κλασμάτων Τ1, Τ2, Τ3 και Τ4. Οι πιθανές δομές των κλασμάτων αυτών φαίνονται στα παρακάτω σχήματα.



Τυροσόλη Τ1

Μονοακετυλιωμένα (Τ2 και Τ3)



Διακετυλιωμένο Τ4

Σχήμα 16: *Πιθανή δομή κλασμάτων Τ1, Τ2, Τ3 και Τ4*

9.5 Μελέτη βιολογικής δραστικότητας φαινολικών ενώσεων και ακετυλιωμένων παραγώγων τους

Οι πρότυπες ενώσεις τόσο της *trans*-ρεσβερατρόλης, όσο και της τυροσόλης, το μείγμα των ακετυλιωμένων παραγώγων, καθώς και τα επιμέρους διαχωρισμένα κλάσματά τους μετά από ακετυλίωση, υποβλήθηκαν σε βιολογική δοκιμασία. Συγκεκριμένα εξετάστηκε η ικανότητα των διαφόρων ενώσεων να προκαλούν συσσώρευση σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού ή να αναστέλλουν την συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού, την επαγώμενη από τον PAF.

Η ικανότητα αναστολής, σε όσα κλάσματα ανιχνεύτηκε, εκφράστηκε ως η συγκέντρωση φαινολικών κάθε κλάσματος που απαιτείται για να ανασταλεί η συσσώρευση που επάγεται από τον PAF (IC_{50}) κατά 50%.

Σε όσα κλάσματα δεν ανιχνεύτηκαν φαινολικά στις ποσότητες που έγινε δοκιμασία, λόγω περιορισμένης ποσότητας, το IC_{50} εκφράστηκε σε λ διαλύματος BSA που αντιστοιχεί σε ορισμένο % ποσοστό του αρχικού δείγματος.

9.5.1 Βιολογική δραστικότητα *trans*-ρεσβερατρόλης και ακετυλιωμένων παραγώγων της

trans-ρεσβερατρόλη

Από το πρότυπο διάλυμα της *trans*-ρεσβερατρόλης λήφθηκαν 10 λ από την αρχική ποσότητα τα οποία εξατμίστηκαν έως ξηρού σε ρεύμα N_2 και αναδιαλύθηκαν σε 100 λ BSA. Από το διάλυμα αυτό λήφθηκαν 7 λ (τελική συγκέντρωση στην κυψελίδα 11,7 μM), τα οποία προκάλεσαν μια αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων κατά 22%. Τα 10 λ (τελική συγκέντρωση στην κυψελίδα 16,5 μM) προκάλεσαν μια αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων κατά 66%. Από τις ανωτέρω τιμές υπολογίζεται ότι το IC_{50} της *trans*-ρεσβερατρόλης είναι 14,8 μM, που αντιστοιχεί στην ποσότητα που αναστέλλει κατά 50% την συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων που προκαλείται από τον PAF τελικής συγκέντρωσης $1x10^{-10}$ M.

Κλάσμα R1

Από το κλάσμα R1 λήφθηκαν 50 λ από την αρχική ποσότητα τα οποία εξατμίστηκαν έως ξηρού σε ρεύμα N_2 και αναδιαλύθηκαν σε 100 λ BSA. Από το διάλυμα αυτό λήφθηκε 1 λ (τελική συγκέντρωση στην κυψελίδα 17,7 μM), το οποίο προκάλεσε μια αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων κατά 10%. Ποσότητα 1,5 λ (τελική συγκέντρωση στην κυψελίδα 26,1 μM) προκάλεσε μια αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων κατά 20%. Τα 2 λ (τελική συγκέντρωση στην κυψελίδα 36,5 μM) προκάλεσαν μια αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων κατά 58%. Τα 3 λ (τελική συγκέντρωση στην κυψελίδα 49,4 μM) προκάλεσαν μια αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων κατά 47%. Από τις ανωτέρω τιμές υπολογίζεται ότι το IC_{50} της

trans-ρεσβερατρόλης είναι 34,3 μM, που αντιστοιχεί στην ποσότητα που αναστέλλει κατά 50% την συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων που προκαλείται από τον PAF τελικής συγκέντρωσης $1x10^{-10}$ M.

Κλάσμα R3

Από το κλάσμα R3 λήφθηκαν 50 λ από την αρχική ποσότητα τα οποία εξατμίστηκαν έως ξηρού σε ρεύμα N_2 και αναδιαλύθηκαν σε 100 λ BSA. Από το δείγμα αυτό ποσότητα ίση με 1 λ (τελική συγκέντρωση στην κυψελίδα 10,0 μM) προκάλεσε 16% αναστολή της συσσώρευσης την προκαλούμενη από τον PAF τελικής συγκέντρωσης $1x10^{-10}$ M. Ποσότητα ίση με 3 λ (τελική συγκέντρωση στην κυψελίδα 30,0 μM) προκάλεσε 49% αναστολή. Από τις ανωτέρω τιμές υπολογίζεται ότι το IC_{50} του R3 είναι 31,3 μM, που αντιστοιχεί στην ποσότητα που αναστέλλει κατά 50% την συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων που προκαλείται από τον PAF τελικής συγκέντρωσης $1x10^{-10}$M. Σε μεγαλύτερη ποσότητα ίση με 5 λ (που αντιστοιχούν σε τελική συγκέντρωση στην κυψελίδα 50,9 μM) παρατηρήθηκε μια μικρού μεγέθους αντιστρεπτή συσσώρευση ύψους 1,0 cm, ενώ με την προσθήκη 5 λ PAF τελικής συγκέντρωσης $1x10^{-10}$ M στο ίδιο δείγμα έδειξε αναστολή του κατά 38%.

Κλάσμα R4

Από το κλάσμα R4 λήφθηκαν 50 λ από την αρχική ποσότητα τα οποία εξατμίστηκαν έως ξηρού σε ρεύμα N_2 και αναδιαλύθηκαν σε 200 λ BSA. Από το διάλυμα αυτό λήφθηκαν 2 λ (τελική συγκέντρωση στην κυψελίδα 27,9 μM), τα οποία προκάλεσαν μια αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων κατά 50%, τιμή που αντιστοιχεί στην ποσότητα που αναστέλλει κατά 50% (IC_{50}) την συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων που προκαλείται από τον PAF τελικής συγκέντρωσης $1x10^{-10}$ M. Σε μεγαλύτερη ποσότητα ίση με 4 λ (που αντιστοιχούν σε τελική συγκέντρωση στην κυψελίδα 58,1 μM) παρατηρήθηκε μια μικρού μεγέθους αντιστρεπτή συσσώρευση ύψους 2,4 cm, ενώ με την προσθήκη 4 λ PAF τελικής συγκέντρωσης $1x10^{-10}$M στο ίδιο δείγμα έδειξε αναστολή του κατά 45%. Σε ακόμα μεγαλύτερη ποσότητα ίση με 20 λ (που αντιστοιχούν σε τελική συγκέντρωση στην κυψελίδα 262,5 μM) παρατηρήθηκε μια αντιστρεπτή συσσώρευση ύψους 3,4 cm, ενώ με την

προσθήκη 2 λ PAF τελικής συγκέντρωσης $1x10^{-10}$ M στο ίδιο δείγμα έδειξε αναστολή του κατά 91%.

Κλάσμα R5

Από το κλάσμα R5 λήφθηκαν 50 λ από την αρχική ποσότητα τα οποία εξατμίστηκαν έως ξηρού σε ρεύμα N_2 και αναδιαλύθηκαν σε 100 λ BSA. Από το δείγμα αυτό ποσότητα ίση με 1 λ προκάλεσε 4% αναστολή της συσσώρευσης την προκαλούμενη από τον PAF τελικής συγκέντρωσης $1x10^{-10}$ M. Τα 3 λ προκάλεσαν 33% αναστολή της συσσώρευσης την προκαλούμενη από τον PAF τελικής συγκέντρωσης $1x10^{-10}$ M. Τα 4 λ προκάλεσαν 76% αναστολή της συσσώρευσης την προκαλούμενη από τον PAF τελικής συγκέντρωσης $1x10^{-10}$ M. Από τις ανωτέρω τιμές υπολογίζεται το IC_{50}, ίσο με 3,2 λ διαλύματος BSA που αντιστοιχεί στο 0,8% της αρχικής ποσότητας.

Κλάσμα R6

Από το κλάσμα R6 λήφθηκαν 50 λ από την αρχική ποσότητα τα οποία εξατμίστηκαν έως ξηρού σε ρεύμα N_2 και αναδιαλύθηκαν σε 100 λ BSA. Από το δείγμα αυτό ποσότητα ίση με 4 λ προκάλεσε 22% αναστολή της συσσώρευσης την προκαλούμενη από τον PAF τελικής συγκέντρωσης $1x10^{-10}$ M. Από την ανωτέρω τιμή υπολογίζεται το IC_{50}, ίσο με 9,0 λ διαλύματος BSA που αντιστοιχεί στο 2,3% της αρχικής ποσότητας. Σε μεγαλύτερη ποσότητα ίση με 5 λ παρατηρήθηκε μια μικρού μεγέθους αντιστρεπτή συσσώρευση ύψους 0,8 cm, ενώ με την προσθήκη 4 λ PAF τελικής συγκέντρωσης $1x10^{-10}$ M στο ίδιο δείγμα έδειξε αναστολή του κατά 56%.

Κλάσμα R7

Από το κλάσμα R7 λήφθηκαν 50 λ από την αρχική ποσότητα τα οποία εξατμίστηκαν έως ξηρού σε ρεύμα N_2 και αναδιαλύθηκαν σε 100 λ BSA. Από το δείγμα αυτό ποσότητα ίση με 1 λ (τελική συγκέντρωση στην κυψελίδα 4,73 μM) προκάλεσε 6% αναστολή της συσσώρευσης την προκαλούμενη από τον PAF τελικής συγκέντρωσης $1x10^{-10}$ M. Ποσότητα ίση με 2 λ (τελική συγκέντρωση στην κυψελίδα 9,1 μM) προκάλεσε 75% αναστολή. Σε

μεγαλύτερη ποσότητα ίση με 10 λ (που αντιστοιχούν σε τελική συγκέντρωση στην κυψελίδα 47,3 μM) παρατηρήθηκε μια 100% αναστολή της συσσώρευσης την προκαλούμενη από τον PAF τελικής συγκέντρωσης $1x10^{-10}$ M. Από τις ανωτέρω τιμές υπολογίζεται ότι το IC_{50} του R7 είναι 7,5 μM, που αντιστοιχεί στην ποσότητα που αναστέλλει κατά 50% την συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων που προκαλείται από τον PAF τελικής συγκέντρωσης $1x10^{-10}$ M.

Κλάσμα R8

Από το κλάσμα R8 λήφθηκαν 50 λ από την αρχική ποσότητα τα οποία εξατμίστηκαν έως ξηρού σε ρεύμα N_2 και αναδιαλύθηκαν σε 100 λ BSA. Από το δείγμα αυτό ποσότητα ίση με 1 λ (τελική συγκέντρωση στην κυψελίδα 14,2 μM) προκάλεσε 35% αναστολή της συσσώρευσης την προκαλούμενη από τον PAF τελικής συγκέντρωσης $1x10^{-10}$ M. Ποσότητα ίση με 2,5 λ (τελική συγκέντρωση στην κυψελίδα 36,2 μM) προκάλεσε 69% αναστολή. Τα 5 λ (τελική συγκέντρωση στην κυψελίδα 72,3 μM) προκάλεσαν μια αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων κατά 85%. Από τις ανωτέρω τιμές υπολογίζεται ότι το IC_{50} του R8 είναι 23,8 μM, που αντιστοιχεί στην ποσότητα που αναστέλλει κατά 50% την συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων που προκαλείται από τον PAF τελικής συγκέντρωσης $1x10^{-10}$ M. Σε μεγαλύτερη ποσότητα ίση με 10 λ (που αντιστοιχούν σε τελική συγκέντρωση στην κυψελίδα 142,0 μM) παρατηρήθηκε μια μικρού μεγέθους αντιστρεπτή συσσώρευση ύψους 1,1 cm, ενώ με την προσθήκη 4 λ PAF τελικής συγκέντρωσης $1x10^{-10}$ M στο ίδιο δείγμα έδειξε αναστολή του κατά 94%.

Κλάσμα R9

Από το κλάσμα R9 λήφθηκαν 50 λ από την αρχική ποσότητα τα οποία εξατμίστηκαν έως ξηρού σε ρεύμα N_2 και αναδιαλύθηκαν σε 100 λ BSA. Από το δείγμα αυτό ποσότητα ίση με 1 λ προκάλεσε 15% αναστολή της συσσώρευσης την προκαλούμενη από τον PAF τελικής συγκέντρωσης $1x10^{-10}$ M. Τα 1,75 λ προκάλεσαν 32% αναστολή της συσσώρευσης την προκαλούμενη από τον PAF τελικής συγκέντρωσης $1x10^{-10}$ M. Ποσότητα ίση με 2 λ προκάλεσαν 63% αναστολή της συσσώρευσης την προκαλούμενη από τον PAF τελικής συγκέντρωσης $1x10^{-10}$ M. Σε μεγαλύτερη ποσότητα ίση με 4 λ

παρατηρήθηκε μια 92% αναστολή της συσσώρευσης την προκαλούμενη από τον PAF τελικής συγκέντρωσης $1x10^{-10}$ M. Από τις ανωτέρω τιμές υπολογίζεται το IC_{50}, ίσο με 2,0 λ διαλύματος BSA που αντιστοιχεί στο 0,5% της αρχικής ποσότητας.

Κλάσμα R10

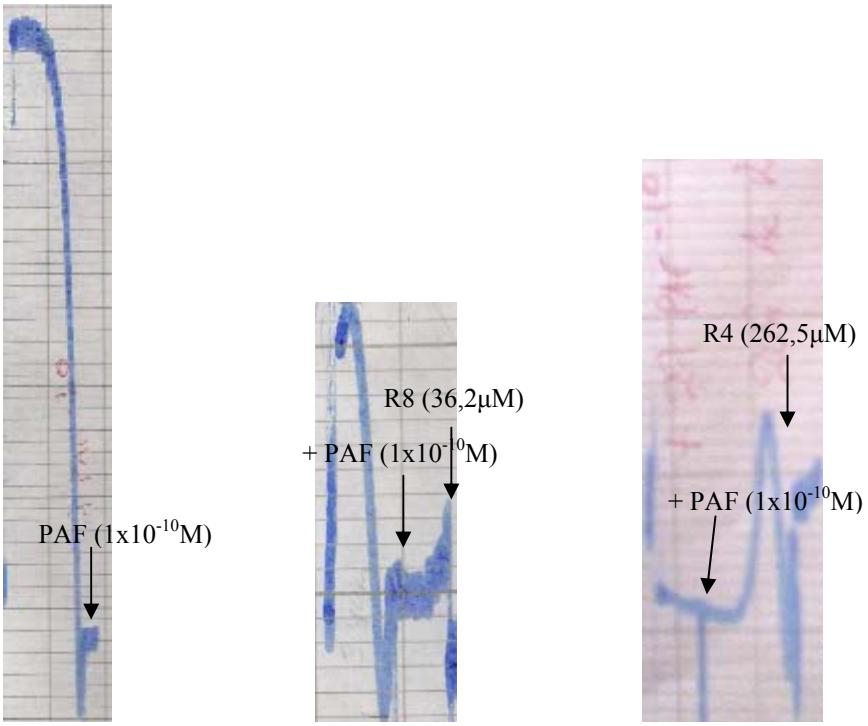
Από το κλάσμα R10 λήφθηκαν 50 λ από την αρχική ποσότητα τα οποία εξατμίστηκαν έως ξηρού σε ρεύμα N_2 και αναδιαλύθηκαν σε 100 λ BSA. Από το δείγμα αυτό ποσότητα ίση με 4 λ (τελική συγκέντρωση στην κυψελίδα 31,8 μM) προκάλεσε 45% αναστολή της συσσώρευσης την προκαλούμενη από τον PAF τελικής συγκέντρωσης $1x10^{-10}$ M. Σε μεγαλύτερες ποσότητες των 7 λ (τελική συγκέντρωση στην κυψελίδα 55,0 μM) αλλά και των 15 λ (τελική συγκέντρωση στην κυψελίδα 114,3 μM) προκάλεσαν 100% αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων. Από τις ανωτέρω τιμές υπολογίζεται ότι το IC_{50} του R10 είναι 35,3 μM, που αντιστοιχεί στην ποσότητα που αναστέλλει κατά 50% την συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων που προκαλείται από τον PAF τελικής συγκέντρωσης $1x10^{-10}$ M.

Τα αποτελέσματα όλων των δειγμάτων των επιμέρους κλασμάτων, άλλα και της πρότυπης ένωσης φαίνονται στον πίνακα 7.

Πίνακας 7 *Βιολογική δραστικότητα ακετυλιωμένων παραγώγων trans-ρεσβερατρόλης*

		Αναστολή	***Συσσώρευση***	
Δείγμα / Κλάσμα	***Είδος δράσης***	***IC_{50}***	***Συγκέντρωση κλάσματος (μM)***	***Ύψος (cm)***
***trans-* ρεσβερατρόλη**	Αναστολή	14,8 μM	-	-
R1	Αναστολή	34,3 μM	-	-
R3	Αναστολή	31,3 μM		-
R4	Αναστολή / Συσσώρευση	27,9 μM	262,5 58,1	3,4 2,4
R5	Αναστολή	3,2 λ	-	-
R6	Αναστολή	9,0 λ	-	-
R7	Αναστολή	7,5 μM	-	-
R8	Αναστολή	23,8 μM	-	-
R9	Αναστολή	2,0 λ	-	-
R10	Αναστολή	35,3 μM	-	-

Στο σχήμα 17 παρουσιάζονται τρία χαρακτηριστικά γραφήματα, που δείχνουν μια συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων επαγώμενη από PAF, τελικής συγκέντρωσης $1x10^{-10}$ M, μια αναστολή της συσσώρευσης πλυμένων αιμοπεταλίων προκαλούμενη από PAF $1x10^{-10}$ M του κλάσματος R8 ποσότητας 2,5 λ σε τελική συγκέντρωση 36,2 μM και μια συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων προκαλούμενη από το κλάσμα R4 ποσότητας 20 λ σε τελική συγκέντρωση 262,5 μM, καθώς και η ακολουθούμενη αναστολή του PAF $1x10^{-10}$ M κατά 91%.



Α) Β) Γ)

Σχήμα 17: *Χαρακτηριστικά γραφήματα που δείχνουν: Συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων PAF 1x10^{-10} M (Α), αναστολή της συσσώρευσης πλυμένων αιμοπεταλίων προκαλούμενη από PAF 1x10^{-10} M μετά από επώαση του εναιωρήματος αιμοπεταλίων με R8 2,5 λ τελικής συγκέντρωσης 36,2 μM (Β) και μια συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων προκαλούμενη από το κλάσμα R4 ποσότητας 20 λ σε τελική συγκέντρωση 262,5 μM, καθώς και η ακολουθούμενη απευαισθητοποίηση του PAF 1x10^{-10} M κατά 91% (Γ)*

9.5.2 Βιολογική δραστικότητα τυροσόλης και ακετυλιωμένων παραγώγων της

Τυροσόλη

Από το πρότυπο διάλυμα της τυροσόλης λήφθηκαν 2000 λ από την αρχική ποσότητα τα οποία εξατμίστηκαν έως ξηρού σε ρεύμα N_2 και αναδιαλύθηκαν σε 100 λ BSA. Από το διάλυμα αυτό λήφθηκαν 10 λ (τελική

συγκέντρωση στην κυψελίδα 5,4 mM), τα οποία προκάλεσαν μια αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων κατά 6,25%. Τα 20 λ (τελική συγκέντρωση στην κυψελίδα 10,5 mM) προκάλεσαν μια αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων κατά 27%. Τα 25 λ (τελική συγκέντρωση στην κυψελίδα 12,9 mM) προκάλεσαν μια αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων κατά 53%. Ενώ τα 30 λ τελική συγκέντρωση στην κυψελίδα 15,2 mM) προκάλεσαν μια αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων κατά 56%. Από τις ανωτέρω τιμές υπολογίζεται ότι το IC_{50} της τυροσόλης είναι 14,2 mM, που αντιστοιχεί στην ποσότητα που αναστέλλει κατά 50% την συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων που προκαλείται από τον PAF τελικής συγκέντρωσης $1x10^{-10}$ M.

Κλάσμα Τ1

Από το κλάσμα Τ1 λήφθηκαν 50 λ από την αρχική ποσότητα τα οποία εξατμίστηκαν έως ξηρού σε ρεύμα N_2 και αναδιαλύθηκαν σε 100 λ BSA. Από το διάλυμα αυτό λήφθηκαν 15 λ (τελική συγκέντρωση στην κυψελίδα 22,4 μM), το οποίο προκάλεσε μια αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων κατά 10%. Τα 30 λ (τελική συγκέντρωση στην κυψελίδα 42,5 μM) προκάλεσαν μια αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων κατά 13%. Τα 45 λ (τελική συγκέντρωση στην κυψελίδα 54,5 μM) προκάλεσαν μια αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων κατά 45%. Από τις ανωτέρω τιμές υπολογίζεται ότι το IC_{50} του κλάσματος Τ1 είναι 56,3 μM, που αντιστοιχεί στην ποσότητα που αναστέλλει κατά 50% την συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων που προκαλείται από τον PAFτελικής συγκέντρωσης $1x10^{-10}$ M.

Κλάσμα Τ2

Από το κλάσμα Τ2 λήφθηκαν 50 λ από την αρχική ποσότητα τα οποία εξατμίστηκαν έως ξηρού σε ρεύμα N_2 και αναδιαλύθηκαν σε 100 λ BSA. Από το διάλυμα αυτό λήφθηκαν 25 λ (τελική συγκέντρωση στην κυψελίδα 34,4 μM), το οποίο προκάλεσε μια αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων κατά 21%. Τα 30 λ (τελική συγκέντρωση στην κυψελίδα 40,6 μM) προκάλεσαν μια αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων κατά 52%. Από τις ανωτέρω τιμές υπολογίζεται ότι το IC_{50} του κλάμσατος Τ2 είναι 40,4 μM, που αντιστοιχεί στην ποσότητα που αναστέλλει κατά 50% την

συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων που προκαλείται από τον PAFτελικής συγκέντρωσης $1x10^{-10}$ M.

Κλάσμα Τ3

Από το κλάσμα Τ3 λήφθηκαν αρχικά 50 λ από την αρχική ποσότητα τα οποία εξατμίστηκαν έως ξηρού σε ρεύμα N_2 και αναδιαλύθηκαν σε 100λ BSA. Από το διάλυμα αυτό λήφθηκαν 15 λ (τελική συγκέντρωση στην κυψελίδα 19,1 μM), το οποίο προκάλεσε μια μικρού μεγέθους αντιστρεπτή συσσώρευση ύψους 0,8 cm, ενώ με την προσθήκη 4 λ PAF τελικής συγκέντρωσης $1x10^{-10}$ M στο ίδιο δείγμα έδειξε αναστολή του κατά 25%. Σε μεγαλύτερη ποσότητα ίση με 30 λ (που αντιστοιχούν σε τελική συγκέντρωση στην κυψελίδα 36,2 μM) παρατηρήθηκε μια μικρού μεγέθους αντιστρεπτή συσσώρευση ύψους 1,0 cm, ενώ με την προσθήκη 4 λ PAF τελικής συγκέντρωσης $1x10^{-10}$ M στο ίδιο δείγμα έδειξε αναστολή του κατά 81%. Από τις ανωτέρω τιμές υπολογίζεται ότι το IC_{50} του κλάμσατος Τ3 είναι 26,7 μM, που αντιστοιχεί στην ποσότητα που αναστέλλει κατά 50% την συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων που προκαλείται από τον PAF τελικής συγκέντρωσης $1x10^{-10}$ M. Ακολούθως από το αρχικό κλάσμα λήφθηκαν άλλα 500 λ τα οποία εξατμίστηκαν έως ξηρού σε ρεύμα N_2 και αναδιαλύθηκαν σε 50 λ BSA. Από το διάλυμα αυτό λήφθηκαν 5 λ (τελική συγκέντρωση στην κυψελίδα 132,1 μM), τα οποία προκάλεσαν μια μικρού μεγέθους μη αντιστρεπτή συσσώρευση ύψους 0,9 cm, ενώ με την προσθήκη 5 λ PAF τελικής συγκέντρωσης $1x10^{-10}$ M στο ίδιο δείγμα έδειξε αναστολή του κατά 98%.

Κλάσμα Τ4

Από το κλάσμα Τ4 λήφθηκαν αρχικά 50 λ από την αρχική ποσότητα τα οποία εξατμίστηκαν έως ξηρού σε ρεύμα N_2 και αναδιαλύθηκαν σε 100 λ BSA. Από το διάλυμα αυτό λήφθηκαν 10 λ (τελική συγκέντρωση στην κυψελίδα 7,5 μM), το οποίο προκάλεσε μια αντιστρεπτή συσσώρευση ύψους 2,4 cm, ενώ με την προσθήκη 4 λ PAF τελικής συγκέντρωσης $1x10^{-10}$ M στο ίδιο δείγμα έδειξε αναστολή του κατά 25%. Σε μεγαλύτερη ποσότητα ίση με 15 λ (που αντιστοιχούν σε τελική συγκέντρωση στην κυψελίδα 11,1 μM) παρατηρήθηκε μια μικρού μεγέθους αντιστρεπτή συσσώρευση ύψους 1,0 cm,

ενώ με την προσθήκη 4 λ PAF τελικής συγκέντρωσης $1x10^{-10}$ M στο ίδιο δείγμα έδειξε αναστολή του κατά 67%. Από τις ανωτέρω τιμές υπολογίζεται ότι το IC_{50} του κλάμσατος T4 είναι 9,64 μM, που αντιστοιχεί στην ποσότητα που αναστέλλει κατά 50% την συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων που προκαλείται από τον PAFτελικής συγκέντρωσης $1x10^{-10}$ M. Σε μεγαλύτερη ποσότητα ίση με 30 λ (που αντιστοιχούν σε τελική συγκέντρωση στην κυψελίδα 21,1 μM) παρατηρήθηκε μια αντιστρεπτή συσσώρευση ύψους 9,6 cm, ενώ με την προσθήκη 4 λ PAF τελικής συγκέντρωσης $1x10^{-10}$ M στο ίδιο δείγμα έδειξε απευαισθητοποίησή του κατά 72%. Ακολούθως από το αρχικό κλάσμα λήφθηκαν άλλα 200 λ τα οποία εξατμίστηκαν έως ξηρού σε ρεύμα N_2 και αναδιαλύθηκαν σε 50 λ BSA. Από το διάλυμα αυτό λήφθηκαν 7 λ (τελική συγκέντρωση στην κυψελίδα 42,7 μM), το οποίο προκάλεσε μια αντιστρεπτή συσσώρευση ύψους 8,0 cm, ενώ με την προσθήκη 5 λ PAF τελικής συγκέντρωσης $1x10^{-10}$ M στο ίδιο δείγμα έδειξε απευαισθητοποίησή του κατά 74%.

Τα αποτελέσματα όλων των δειγμάτων των επιμέρους κλασμάτων του μείγματος, άλλα και της πρότυπης ένωσης φαίνονται στον πίνακα 8.

Πίνακας 8 *Βιολογική δραστικότητα ακετυλιωμένων παραγώγων trans-ρεσβερατρόλης*

		Αναστολή	***Συσσώρευση***		
Δείγμα / Κλάσμα	***Είδος δράσης***	***IC_{50}***	***Συγκέντρωση κλάσματος (μM)***	***Ύψος (cm)***	***%Απευαισθητοποίησης του PAF $1x10^{-10}$M***
Τυροσόλη	Αναστολή	14,2 mM	-	-	-
T1	Αναστολή	56,3 μM	-	-	-
T2	Αναστολή	40,4 μM	-	-	-
T3	Αναστολή	26,7 μM	-	-	-
T4	Συσσώρευση	-	7,5 11,1 21,1 42,7	2,4 1,0 9,6 8,0	72,0

Όσον αφορά το κλάσμα Τ4 που προκάλε συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού μελετήθηκε εάν αναστέλλεται αυτή η δράση του από το BN 52021, που είναι ένας ισχυρός ειδικός αναστολέας του PAF. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 9.

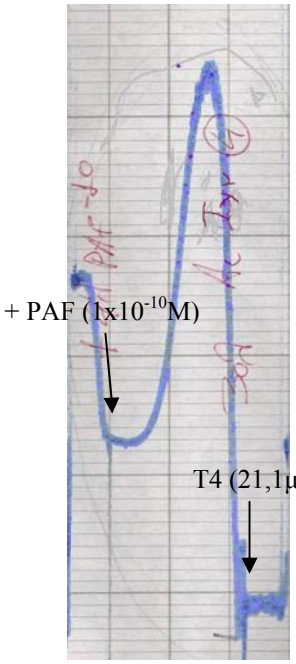
Πίνακας 9 *Επίδραση του BN 52021 στην συσσωρευτική δράση των: PAF (τελικής συγκέντρωσης 1x10^{-10} M) και Τ4 (τελικής συγκέντρωσης 42,7 μM)*

Κλάσμα	**Συσσώρευση (cm)**	**Αναστολή από BN 52021**	**% Αναστολής από BN 52021**
PAF	9,6	ΝΑΙ	100
Τ4	8,0	ΝΑΙ	97

Η συσσώρευση που προκαλείται από το κλάσμα Τ4 φάνηκε να αναστέλλεται από το BN 52021, συστατικό του φυτού Ginkgo Biloga, που θεωρείται ισχυρός ειδικός αναστολέας του PAF, υποδηλώνοντας ότι το κλάσμα αυτό επάγει την δράση του μέσω του υποδοχέα του PAF.

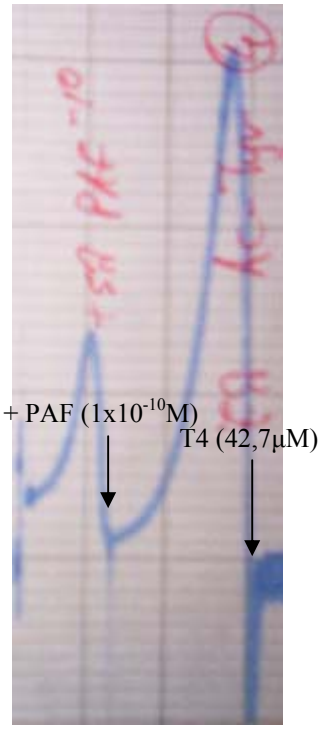
Στο σχήμα 18 παρουσιάζονται δύο χαρακτηριστικά γραφήματα, που δείχνουν μια συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων επαγώμενη από PAF 1x10^{-10} M ύψους 10,6 cm και μια συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων προκαλούμενη από το κλάσμα Τ4 ποσότητας 30 λ σε τελική συγκέντρωση 21,1 μM, καθώς και η ακολουθούμενη απευαισθητοποίηση του PAF 1x10^{-10} M κατά 72%, ενώ στο σχήμα 19 παρουσιάζονται αλλά δυο χαρακτηριστικά γραφήματα, που δείχνουν μια συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων προκαλούμενη από το κλάσμα Τ4 ποσότητας 7 λ σε τελική συγκέντρωση 42,7 μM, καθώς και η ακολουθούμενη απευαισθητοποίηση του PAF 1x10^{-10} M κατά 74% και την ίδια συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων προκαλούμενη από το κλάσμα Τ4 ποσότητας 7 λ, η οποία όμως αναστέλλεται από 4 λ BN 52021.

A)

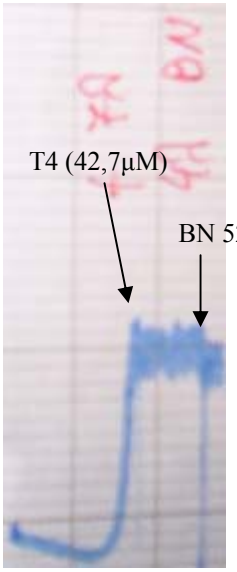


B)

Σχήμα 18: *Χαρακτηριστικά γραφήματα που δείχνουν μια συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων PAF $1x10^{-10}$ M (A) και μια συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων προκαλούμενη από το κλάσμα T4 ποσότητας 30 λ σε τελική συγκέντρωση 21,1 μM, καθώς και η ακολουθούμενη απευαισθητοποίηση του PAF $1x10^{-10}$ M κατά 72% (B)*



A)



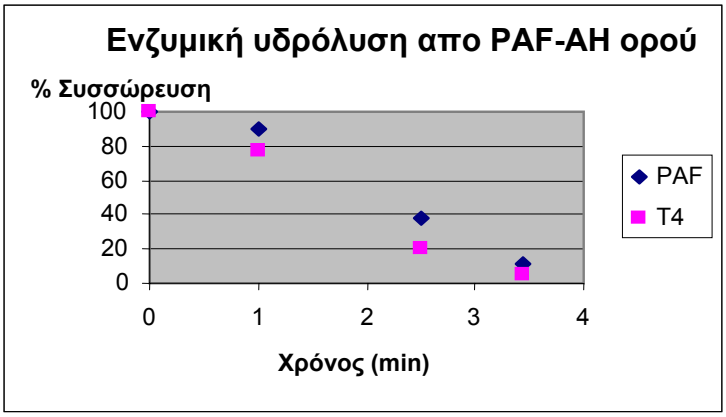
B)

Σχήμα 19: *Χαρακτηριστικά γραφήματα που δείχνουν μια συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων προκαλούμενη από το κλάσμα Τ4 ποσότητας 7 λ σε τελική συγκέντρωση 42,7 μΜ, καθώς και* την *ίδια συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων προκαλούμενη από το κλάσμα Τ4 ποσότητας 7 λ, η οποία όμως αναστέλλεται από 4 λ BN 52021(Β)*

9.6 Ενζυμική κατεργασία του ακετυλιωμένου κλάσματος Τ4 της τυροσόλης με PAF-ακετυλοϋδρολάση (ΑΗ) ορού

Τα αποτελέσματα της ενζυμικής δοκιμασίας με PAF-AH ορού φαίνονται στο διάγραμμά 1. Από τα αποτελέσματα αυτά γίνεται φανερό ότι το ακετυλιωμένο παράγωγο Τ4 της τυροσόλης αποτελεί υπόστρωμα του ενζύμου της PAF-AH, ενώ η ταχύτητα αποικοδόμησης της ένωσης αυτής ομοιάζει με αυτή του PAF.

Στον πίνακα 10 παρουσιάζουμε τα % ποσοστά συσσώρευσης τόσο για τον PAF1x10^{-10} M, όσο και για το κλάσμα Τ4 (τελική συγκέντρωση στην κυψελίδα 114 μM), στους αντίστοιχους χρόνους.



Διάγραμμα 1

Χρόνος (min)	PAF	T4
	% Συσσώρευσης	
0	100	100
1	90	77
2,5	38	20
3,45	12	5

Πίνακας 10

10.ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Πολλές επιδημιολογικές μελέτες έχουν πιστοποιήσει τις ευεργετικές δράσεις της Μεσογειακής Διατροφής, ενώ βρέθηκε τελικά πως πολλά μικροσυστατικά της Διατροφής αυτής έχουν αντιοξειδωτική, αντιθρομβωτική και αντιφλεγμονώδη δράση και συμβάλουν στην ιδιαίτερα χαμηλή συχνότητα καρδιοπαθειών και καρκίνου.

Πολλές από τις ευεργετικές δράσεις της Μεσογειακής Διατροφής έχουν αποδοθεί στις φαινολικές ενώσεις και μάλιστα στη *trans*-ρεσβερατρόλη και στην τυροσόλη, τις οποίες τις συναντάμε στα δύο πιο διαδεδομένα τρόφιμα της Διατροφής αυτής, το κόκκινο κρασί και το ελαιόλαδο. Συγκεκριμένα, από "*in vitro"* και *"in vivo"* μελέτες έχει βρεθεί ότι τόσο η *trans*-ρεσβερατρόλη, όσο και η τυροσόλη είναι : α) ισχυρά αντιοξειδωτικά και αναστέλλουν την οξείδωση της LDL[56,82], β) παρουσιάζουν αντικαρκινική δράση συμβάλλοντας στην απόπτωση των καρκινικών κυττάρων[58,88]. Πολύ σημαντική επίσης είναι η δράση της *trans*-ρεσβερατρόλης, η οποία αναστέλλει την συσσώρευση αιμοπεταλίων που επάγεται από διάφορους συσσωρευτικούς παράγοντες (αραχιδονικό οξύ, ADP, PAF)[103], ενώ παρουσιάζει και ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση, αφού αναστέλλει την δράση του PAF (ισχυρός φλεγμονώδης παράγοντας λιποειδικής φύσης που θεωρείται ότι κατέχει κυρίαρχο ρόλο στην πρόκληση της αθηρογένεσης)[99].

Από την άλλη πλευρά η ύπαρξη ακετυλιωμένων[96-98] φαινολικών στα παραδοσιακά τρόφιμα της Μεσογειακής Διατροφής (ελαιόλαδο, κρασί) με ισχυρές βιολογικές δράσεις, μιας και μπορούν να αναστείλουν "*in vitro"* την συσσώρευση αιμοπεταλίων καθώς και τον σχηματισμό θρομβωτικών παραγόντων, επισημαίνει τον πιθανή συσχετισμό ακετυλομάδων και βιολογικής δράσης. Τα παραπάνω φαίνονται να ενισχύονται από πειράματα μεταβολισμού, όπου έχουν ανακαλύψει την ύπαρξη ενζύμου (τρανσακετυλάση) στον ανθρώπινο οργανισμό που μπορεί να μεταφέρει ακετυλομάδες από ένα μόριο στο άλλο, γεγονός που αποδεικνύει ότι η ακετυλίωση κάποιων μορίων είναι σημαντική και μπορεί να συμβαίνει και ενδογενώς στον οργανισμό, με αποτέλεσμα την δημιουργία ενός καλύτερου

υλικού με πολύ καλύτερες φαρμακολογικές ιδιότητες. Επίσης πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι τα ακετυλιωμένα κλάσματα που απομονώνονται έχουν αυξημένη βιολογική δραστικότητα[71,109], αλλά και εξειδίκευση[114].

Με βάση τα παραπάνω, σκοπός της μελέτης αυτής ήταν να μελετήσει την ικανότητα των ολικών προϊόντων της ακετυλίωσης στο να επάγουν "*in vitro*" την συσσώρευση που προκαλείται από τον PAF και να κάνει έναν πιθανή συσχετισμό ανάμεσα στην δομή και την βιολογική τους δραστικότητα. Για τις ανάγκες της μελέτης αυτής επιλέχθηκαν δύο χαρακτηριστικές ενώσεις της Μεσογειακής Διατροφής με διαφορετικό αριθμό υδροξυλίων η κάθε μια. Η ρεσβερατρόλη (τρία υδροξύλια), η οποία βρίσκεται συνήθως στο κόκκινο κρασί και η τυροσόλη (δύο υδροξύλια), η οποία βρίσκεται συνήθως στο ελαιόλαδο.

Η ακετυλίωση των παραπάνω ενώσεων έγινε στις βέλτιστες συνθήκες, που είχαν προσδιοριστεί από προηγούμενες μελέτες που είχαν βρεθεί στο εργαστήριο μας. Οι συνθήκες αυτές μας επέτρεψαν να πάρουμε το μίγμα των ακετυλιωμένων παραγώγων σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα με μία μόνο αντίδραση. Στην συνέχεια το μίγμα των ακετυλιωμένων παραγώγων διαχωρίστηκε με HPLC σε στήλη ανάστροφης φάσης στα επιμέρους ακετυλιωμένα κλάσματα. Τόσο στην πρότυπη ένωση, όσο και στα επιμέρους ακετυλιωμένα παράγωγα της κάθε μιας έγιναν χημικοί προσδιορισμοί αλλά και βιολογική δοκιμασία, δηλαδή η ικανότητα του κάθε κλάσματος να προκαλεί συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού ή αναστολή της συσσώρευσης αιμοπεταλίων κουνελιού επαγώμενη από τον PAF. Επιλέξαμε τον Παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων και όχι κάποιον άλλο παράγοντα αθηρογένεσης, όπως την θρομβίνη ή το ADP, διότι ο PAF αποτελεί ένα καλό και εύκολο μοντέλο μελέτης, καθώς επίσης και ότι τα αιμοπετάλια μπορούν να δράσουν ανασταλτικά και σε άλλα μόρια, όπως για παράδειγμα τα ενδοεπιθυλιακά κύτταρα. Επίσης είναι πολύ πιθανό να αναστέλλονται οι δράσεις και σε άλλα κύτταρα του οργανισμού.

Τα αποτελέσματα των παραπάνω πειραμάτων συνοψίζονται ως εξής:

Γνωρίζοντας την δομή τόσο της τυροσόλης (ένας φαινολικός δακτύλιος και συνολικά δύο υδροξύλια), όσο και της *trans*-ρεσβερατρόλης (δύο φαινολικοί δακτύλιοι και συνολικά τρία υδροξύλια) αναμένουμε στο χρωματογράφημα της τυροσόλης να εμφανιστούν τρία ακετυλιωμένα

παράγωγα (δύο μονοακετυλιωμένα και ένα διακετυλιωμένο) και πιθανότατα και η τυροσόλη , όπως και τελικά συνέβη, ενώ για την *trans*-ρεσβερατρόλη αναμένουμε στο αντίστοιχο χρωματογράφημα να εμφανιστούν εφτά ακετυλιωμένα παράγωγα (τρία μονοακετυλιωμένα, τρία διακετυλιωμένα και ένα τριακετυλιωμένο) και πιθανότατα και η *trans*-ρεσβερατρόλη, κάτι το οποίο και παρατηρήθηκε.

Για να ήταν αξιόπιστος ο προσδιορισμός φαινολικών με την μέθοδο Folin-Ciocalteu σε κάθε ακετυλιωμένο κλάσμα θα πρέπει να έχει προηγηθεί ήπια αλκαλική υδρόλυση του κλάσματος με σκοπό να διασπαστούν εκλεκτικά οι εστερικοί δεσμοί των φαινολικών ενώσεων. Στην συνέχεια στον ποσοτικό προσδιορισμό των ακετυλιωμένων παραγώγων των φαινολικών ενώσεων, πραγματοποιήθηκε παράλληλα τυφλός προσδιορισμός καθώς και προσδιορισμός στα πρότυπα διαλύματα φαινολικών ενώσεων (*trans*-ρεσβερατρόλη και τυροσόλη) που περιείχαν από 1 έως 60 μg, οπότε και κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη αναφοράς, βάση της οποίας προσδιορίζεται η συγκέντρωση σε φαινολικά του άγνωστου δείγματος. Παρατηρήθηκε μια αντιστοιχία ποσοστού φαινολικών με το αντίστοιχο ύψος του κλάσματος από το χρωματογράφημα, κάτι το οποίο ήταν λογικό και αναμενόμενο. Τα κλάσματα R5, R6 και R9 δεν έδειξαν κάποιο αποτέλεσμα διότι η αντίστοιχη ποσότητά τους δεν επαρκούσε στα όρια ανίχνευσης της μεθόδου. Από τους αντίστοιχους πίνακες των αποτελεσμάτων παρατηρούμε ότι το ποσοστό ανακτήσεως της *trans*-ρεσβερατρόλης είναι πολύ καλό λαμβάνοντας υπ'οψιν τόσο το πειραματικό σφάλμα, όσο και την 'ταλαιπωρία' του δείγματος ύστερα από τους 130 διαδοχικούς διαχωρισμούς, ενώ το ποσοστό ανάκτησης της τυροσόλης είναι μικρότερο και μπορεί αυτό να ερμηνευτεί παρατηρώντας ότι στις ίδιες συνθήκες η τυροσόλη ακετυλιώνεται πολύ λιγότερο από την *trans*-ρεσβερατρόλη.

Από τις βιβλιογραφικές αναφορές[94-102] που επισημαίνουν ότι η *trans*-ρεσβερατρόλη ασκεί μια δοσοεξαρτώμενη αναστολή του Παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων, στα αποτελέσματα του βιολογικού πειράματος θα περιμέναμε ότι η πρότυπη *trans*-ρεσβερατρόλη θα προκαλούσε μια αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, όπως και τελικά παρατηρήθηκε.

Περαιτέρω διαχωρισμός και μελέτη των ακετυλιωμένων κλασμάτων της *trans*-ρεσβερατρόλης, έδειξε ότι ήταν εξίσου καλοί αναστολείς όσο και η πρότυπη ένωση με βάση το αντίστοιχο IC_{50}, ενώ το κλάσμα R7 ήταν ακόμα καλύτερος αναστολέας από την πρότυπη ένωση. Τα κλάσματα που δεν είχαν δείξει κάποιο αποτέλεσμα από τον προσδιορισμό των φαινολικών, αποδείχτηκαν καλύτεροι αναστολείς της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων. Ακόμα μόνο το κλάσμα R4 προκάλεσε συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού και μάλιστα σε μεγάλες συγκεντρώσεις, ενώ σε μικρές συγκεντρώσεις παρατηρήθηκαν ανασταλτικές δράσεις, παρόμοιες με την πρότυπη ένωση.

Μελέτη των ακετυλιωμένων κλασμάτων της τυροσόλης, έδειξε ότι ήταν καλύτεροι αναστολείς από την πρότυπη ένωση με βάση το αντίστοιχο IC_{50}.

Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η ακετυλίωση και των δύο υδροξυλίων του μορίου της τυροσόλης, αλλάζει την βιολογική δραστικότητα του μορίου, αφού τα υπόλοιπα ακετυλιωμένα κλάσματα προκάλεσαν αναστολή της επαγώμενης από τον PAF συσσώρευσης, ενώ μόνο το κλάσμα T4 προκάλεσε συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού, το οποίο πιθανόν να είναι το διακετυλιωμένο κλάσμα. Επίσης η συσσώρευση που προκαλείται από το κλάσμα T4 φάνηκε να αναστέλλεται από το BN 52021, συστατικό του φυτού Ginkgo Biloga, που θεωρείται ισχυρός ειδικός αναστολέας του PAF, υποδηλώνοντας ότι το κλάσμα αυτό επάγει την δράση του μέσω του υποδοχέα του PAF. Ακόμα το ακετυλιωμένο παράγωγο T4 της τυροσόλης αποτελεί υπόστρωμα του ενζύμου της PAF-AH, ενώ η ταχύτητα αποικοδόμησης της ένωσης αυτής ομοιάζει με αυτή του PAF. Ακόμα από τις τιμές των συγκεντρώσεων παρατηρούμε ότι το κλάσμα T4 είναι περίπου 1000000 φορές λιγότερο δραστικό από τον PAF, που σημαίνει ότι τελικά δρα ανασταλτικά.

Συγκρίνοντας την δραστικότητα των ακετυλιωμένων κλασμάτων της *trans*-ρεσβερατρόλης και της τυροσόλης ως προς τις συγκεντρώσεις τους και πιο συγκεκριμένα των δραστικότερων κλασμάτων της *trans*-ρεσβερατρόλης και της τυροσόλης που είναι τα κλάσματα R7 και T3 αντίστοιχα, παρατηρούμε ότι το κλάσμα R7 είναι περίπου 4 φορές πιο δραστικό. Επομένως το κλάσμα T3 για να προκαλέσει το ίδιο αποτέλεσμα χρειάζεται 4πλάσια ποσότητα σε σχέση με το αντίστοιχο ακετυλιωμένο παράγωγο της *trans*-ρεσβερατρόλης

(R7). Επίσης παρατηρώντας και τις άλλες τιμές των συγκεντρώσεων παρατηρούμε ότι γενικά τα ακετυλιωμένα κλάσματα της *trans*-ρεσβερατρόλης έχουν μεγαλύτερη δραστικότητα από ότι τα ακετυλιωμένα κλάσματα της τυροσόλης. Το ίδιο παρατηρείται στις πρότυπες ενώσεις και συγκεκριμένα παρουσιάζεται η *trans*-ρεσβερατρόλη να είναι περίπου 1000 φορές πιο δραστική από την τυροσόλη.

Με βάση τα παραπάνω, μπορούμε να πούμε πως η μελέτη της δομής και της βιολογικής δραστικότητας της *trans*-ρεσβερατρόλης, της τυροσόλης αλλά και των ακετυλιωμένων παραγώγων τους είναι πολύ σημαντική. Η ύπαρξη ακετυλομάδων στο μόριο τους διαφοροποιεί τόσο το μέγεθος όσο και το είδος της βιολογικής τους δραστικότητας. Η σπουδαιότητα των ενώσεων αυτών προκύπτει αφενός από την ύπαρξη ακετυλιωμένων ενώσεων στα τρόφιμα της Μεσογειακής Δίαιτας και αφετέρου από την ύπαρξη μεταβολικών πορειών στον ανθρώπινο οργανισμό (γλυκοζυλίωση, μεθυλίωση, ακετυλίωση). Εντούτοις ακόμα και μέχρι σήμερα δεν γνωρίζουμε πλήρως τους μηχανισμούς δράσης αυτών των δύο φαινολικών ενώσεων και των μεταβολιτών τους σε κυτταρικό επίπεδο. Είναι επομένως πιθανό η τροποποίηση της βιολογικής δράσης των φαινολικών μορίων με την προσθήκη ακετυλομάδων στο μόριο τους, να μπορεί να αποτελέσει έναν ενδογενή μηχανισμό ρύθμισης της βιολογικής τους δραστικότητας.

11. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Shahidi F, Naczk M. (*1995). "***Food phenolics, sources, chemistry, effects, application".*** *Lancester, PA: Technomic Publishing Co Inc,.*
2. Middleton E, Kandaswami C, Theoharides T C. **The effects of plant flavonoids on mammalian cell: implications for inflammation, heart disease, and cancer.** *Pharmacol Rev 2000; 52:673-751.*
3. Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C and Jimenez L. **Polythenols: food sources and bioavailability.** *Am J Clin Nutr 2004 ;(5)79:727-747.*
4. Clifford M N. **Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden.** *J Sci Food Agric 1999; 79:362-372.*
5. Macheix J J, Fleuriet A, Billot J. (1990). "**Fruit phenolics".** *Boca Raton, FL: CRC Press.*
6. Sosulski F, Krygier K, Hogge L. **Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids.** *J Agric Food Chem 1982; 30:337-40.*
7. Price S F, Breen P J, Valladao M, Watson BT. **Cluster sun exposure and quercetin in Pinot noir grapes and wine.** *Am J Enot Vitic 1995; 46:187-94.*
8. Hettmann K. **Flavonols and flavones in food plants: a review.** *J Food Technol 1976; 11: 433-448.*
9. King G C. **Pnenolic compounds of commercial wheat germ.** *J Food Sci 1962; 27:446-454.*
10. Tomas-Barberan F A, Clifford M N. **Flavanones, chalconones and dihydrochalcones – nature, occurrence and dietary burden.** *J Sci Food Agric 2000; 80; 1073-1080.*
11. Coward L, Smith M, Kirk M, Barnes S. **Chemical modification f isoflavones in soyfoods during cooking and processing.** *Am J Clin Nutr 1998; 68(suppl.) 1486S-1491S.*
12. Lakenbrink C, Lapczynski S, Mailwald B, Engelhardt U H. **Flavonoids and other polyphenols in consumer brews of tea and other caffeinated beverages.** *J Agric Food Chem 2000; 48:2848-2852.*

13. Zhu Q Y, Zhang A Q, Tsang D, Huang Y, Chen Z U. **Stability of green tea catechins.** *J Agric Food Chem 1997; 45:4624-4628.*
14. Guyot S, Marnet N, Larada D, Sanoner P, Drilleau J F. **Reversed - phase HPLC following thiolysis for quantitative estimation and characterization of the four main classes of phenolic compounds in different tissue zones of a French cider apple variety.** *J Agric Food Chem 1998; 46:1698-1705.*
15. Santos-Buelga C, Scalbert A. **Proanthocyanidins and tannin – like compounds: nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health.** *J Sci Food Agric 2000; 80:1094-1117.*
16. Mazza G, Maniati E. (*1993).* "**Anthocyanins in fruits, vegetables and grains".** *Boca Raton, FL: CRC Press.*
17. Bertelli A, Bertelli E, Gozzini A, Giovannini L. (*1998)* **Plasma and tissue resveratrol concentrations and pharmacological activity.** *Drugs Exp Clin Res 24:133-138.*
18. Bhat K P, Pezzuto JM. **Cancer chemopreventive activity of resveratrol.** *Ann NY Acad Sci 2002; 957:210-229.*
19. Vitrac X, Moni J P, Vercauteren J, Deffieux G, Merillon J M. **Direct liquid chromatography analysis of resveratrol derivatives and flavanonols in wines with absorbance and fluorescence detection.** *Anal Chim Acta 2002; 458:103-110.*
20. Martin M J, Marhvenda E, Perez-Guerrevo C, Franco J M. **Pharmacology.** *1994; 49:144-150.*
21. Lautraite S, Musonda AC, Doehemer J, Edwards G O, Chipman J K. **Flavonoids inhibit genetic toxicity produced by carcinogens in cells expressing CYP1A2 and CYP1A1.** *Mutagenesis 2002; 17:45-53.*
22. Raso G M, Meli R, Carlo G, Pacilio M, Di carlo R. **Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase – 2 expression by flavonoids in macrophage J774A.** *Life Sci 2001; 68:921*-931.
23. Akiyama T, Ishida J, Nikagawa H, Iton S, Shibug A M, Fukamo Y. **A specific inhibitor of tyrosine specific protein kinases.** *J Biol Chem 1987; 262:5590-5595.*

24. Plaumann B, Fritsche M, Rimpler H, Bradner G, Hess R D. **Flavonoids activate wild-type p53.** *Oncogene 1996; 13:1605-1614.*
25. Yang C S, Landou J M, Huang M T, Newmark H L. **Inhibition of carcinogenesis by dietary polythenolic compounds.** *Ann Rev Nutr 2001; 21:381-406.*
26. Jialal I, Scaccini C. **Antioxidants and atherosclerosis.** *Curr Opin Lipidol 1992; 3:324-328.*
27. Kim D H, Jung E A, Sohng I S, Hang A, Kim T H. **Intenstinal bacterial metabolism of flavonoids and its relation to some biological activities.** *Arch Pharmacol Res 1998; 21:17.*
28. Kondo K, Hirano R, Matsumoto A, Igarashi O, Hakura H. **Inhibition of LDL oxidation by cacoa.** *Lancet 1996; 348:1514-1518.*
29. Maxwell S, Cruiskshank A, Thorpe G. **Red wine and antioxidant activity in serum.** *Lancet 1994; 344:193-194.*
30. Hertog G L, Feskeus J M, Hollman C H, Katan M B, Kromhput D. **Dietary antioxidants flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study.** *Lancet 1993; 342:1007-1011.*
31. Yochum L, Kushi L H, Meyer K, Folsom A R. **Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women**. *Am J epidemiol 1999; 149:943-949.*
32. Arts I C, Holmann P C, Feskeus E J. **Catechin intake might explain the inverse relation between tea consumption and ischaemic heart disease**: **the Zutphen elderly study.** *Am J Clin Nutr 2001; 74:227-232.*
33. Fitzpatrick D F, Hirschfield S L, Coffey R G. **Endothelium dependent vasorelaxing activity of wine and others grape products.** *Am J Physiol 1993; 265:774-778.*
34. Lemos V S, Freitas M R, Muller B, Lino Y D, Cortes S F. **Dioclein, a new nitric- oxide – and endothelium – dependent vasodilator flavonoid.** *Eur J Pharmacol 1999; 386:41-46.*
35. Kim S H, Kang K W, Kim K W. **Procyanidins in crataegus extract evoke endothelium – dependent vasorelaxation in rat aorta.** *Life Sci 2000; 67:121-131.*

36. Stein J H, Keevil J G, Wiebe D A, Aeschlimann S, Folts J D. **Purple grape juice improves endothelial function and reduces the susceptibility of LDLcholesterol to oxidation in patients with coronary artery disease.** *Circulation 1999; 100:1050-1055.*
37. Wollin S D, Jones P J H. **Alcohol, red wine and cardiovascular disease.** *J Nutr 2001; 131:1401-1404.*
38. Lee T P, Matteliano M L, Middleton E. **Effect of quercetin on human polymorphonuclear leukocyte lysosomal enzyme release and phospolipid metabolism.** *Life Sci 1982; 31:2765.*
39. Tauber A I, Fay J R, Marletta M. **Flavonoid inhibition of human neutrophil NADPH –oxidase.** *Biochem Pharmacol 1984; 33:1367-1369.*
40. Rotonclo S, De Gaetano G. **Protection from cardiovascular disease by wine and its derived products. Epidemiological evidence and biological mechanisms.** *World Rev Nutr Diet 2000; 87:90-113.*
41. Kuiper G G, Lemmen J G, Calsson B, Corton J C, Safe S H. **Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta.** *Endocrinology 1998; 61:71-76.*
42. Albanese C V, Codd A, Argentino L, Zamboni- Zalione A, Macintyrel. **Biochem. Biophnys.** *Res Comm 1994; 15:930-6.*
43. Berg P A, Daniel P T. (*1988). "***Plant flavonoids in Biology and Medicine II. Progress in clinical and biological research".** *New York; 280:157-171.*
44. Bisignano G, Tomaino A, Lo Cascio R, Crisafi G, Uccella N, Aqija A. **On the in vitro antimicrobial activity of olevropein and hydroxytyresol.** *J. Pharm Pharmacol 1999; 31:971-974.*
45. Singh I, Kohli E, Raj H, Gyanda K, Jainsapan, Tyagi Y, Rastogi R, Olsehl, Parmar V. **Mechanism of biochemical action of substituted 4 – methylbenzopyran- 2 – ones. Part 9: comparison of Axetoxy 4-methylocoumarins and other polythenolic acetates reveal the specifity to acetoxy drug:protein *trans*acetylase for puran carbonylgroup in proximity to the oxygen heteroatom.** *Bioorganic & medicinal chemistry 2002; 10:4103-4111.*

46. Albach D C, Grayer R J, Jensen S R, Veitch NC. **Acylated flavone glycosides from Veronica.** *Phytochemistry, 2003; 64:1295-1301.*
47. Covas MI, Miro-Casas E, Fito M, Farre-Albadalejo M, Gimeno E, Marrugat J, DeLaTorreR. **Bioavailability of tyrosol, an antioxidant phenolic compound present in wine and olive oil, in humans.** *Lipids and Cardiovascular Epidemiology Uni Barcelona, Municipal Institute of Medical Research.*
48. Valadanidis A, Nisiotou C, Papageorgiou Y, Kremli I, Satravelas N, Zinieris N, Zygoulaki H. **Comparison of the Radical Scavenging Potential of Polar andLipidic Fractions of Olive Oil and Other Vegetable Oils underNormal Conditions and after Thermal Treatment** *J Agric Food Chem 2004; 52: 2358-2365.*
49. Caruso D, Berra B, Giavarini F, Cortesi N, Fedeli E, Galli G. **Effect of virgin olive oil compounds on in vitro oxidation of human low density lipoproteins.** *Nutr Metab Cardiovasc Dis 1999; 9:102-107.*
50. Casas E, Albadalejo M, Covas Planells M, Colomer M, Raventós R, Fornel R. **Tyrosol Bioavailability in Humans after Ingestion of Virgin Olive Oil** *Clinic* Chemist *2001;47:341-343.*
51. Van de Hof K H, Wiseman S A, Yang C S, Tijburg L B. **Plasma and lipoprotein levels of tea catechins following repeated tea consumption.** *Pro Sci Exp Biol Med 1999; 220:203.*
52. Hollman, Rice-Evans, C A, Packer L, Eds (*1998). "***Absorption, metabolism, and bioavailability of flavonoids. Flavonoids in Health and Disease"** *Marcel Dekker, NY: 483-522*.
53. Visioli F, Galli C, Bornet F, Matte A, Patelli R, Galli G, Caruso D. **Olive oil phenolics are dose-dependently absorbed in humans.** *FEBS Lett* 2000; *468:159-160*.
54. Scheline R R. (1978). "**Metabolic reactions of plant xenobiotics. Anonymous, Eds. Mammalian Metabolism of Plant Xenobiotics"** Academic Press London, UK*: 1-60.*
55. Scheline R R. (*1991). "***CRC handbook of mammalian metabolism of plant compounds."** *CRC Press: 514.*

56. Wiseman S A, Mathot J N, de Fouw N J, Tijburg L B. *(1996).* **"Dietary non-tocopherol antioxidants present in extra virgin olive oil increase the resistance of low density lipoproteins to oxidation in rabbits".** *Atherosclerosis; 120:15–23.*
57. Giovannini C, Straface E, Modesti D, Coni E, Cantafora M. **Tyrosol, the Major Olive Oil Biophenol, Protects Against Oxidized-LDL-Induced Injury in Caco-2 Cells**. *Journal of Nutrition* 1999; 129:1269-1277.
58. Brenes M, Garcı´a A, Rios J, Garrido A.**Phenolic compounds in Spanish olive oils.** *J Agric Food Chem, 1999; 47: 3535-3540.*
59. Petroni A, Blasevich M, Salami M, Galli C, Papini N. **Inhibition of leukocyte leukotriene B4 production by an olive oil – derived phenol identified by mass- spectrometry.** *Thrombosis Res 1997; 87:315-322.*
60. Petroni A, Blasevich M, Salami M, Galli C, Servilli M. **A phenolic antioxidant extracted from olive oil inhibits platelet aggregation and arachidonic acid metabolism in vitro.** *World Rev Nutr Diet 1994; 75:169-172.*
61. Bisignano G, Tomaino A, Lo Cascio R, Crisafi G, Uccella N, Aqija A. **On the in vitro antimicrobial activity of olevropein and hydroxytyresol.** *J Pharm Pharmacol1999; 31:971-974.*
62. Visioli F, Poli A, Galli C, **Antioxidant and Other Biological Activities of Phenols from Olives and Olive Oil**. *Medicinal Research Reviews, 2002 (22); 1: 65-75.*
63. Weinbrenner T, Fito M, Farre Albaladejo M, Saez G T, Rijken P, Tormos C, Coolen S, De La Torre R, Covas MI. **Bioavailability of phenolic compounds from olive oil and oxidative/antioxidant status at postprandial state in healthy humans.** *Drugs Exp Clin Res 2004;30(5-6):207-12.*
64. Mateos R, Espertero L, Trujillo M, Rios J. **Determination of phenols, flavones and lignans in virgin oilive oils by solid- phase extraction and high- performance liquid chromatograthy with diode array ultraviolet detection**. *J Agric Food Chem 2001; 49: 2185-2192.*

65. Christoforidou S, Dais P, Tseng L, Spraul M **Separation and Identification of Phenolic Compounds in Olive Oil by Coupling High-Performance Liquid Chromatography with Postcolumn Solid-Phase Extraction to Nuclear MagneticResonance Spectroscopy (LC-SPE-NMR)** *J. Agric. Food Chem. 2005, 53, 4667-4679.*
66. Gordon M, Palva-Martins F, Almeida M. **Antioxidant activityof hydroxytyrosol acetate compared with that of other olive oilpolyphenols.** *J. Agric. Food Chem*. 2001, *49*, 2480-2485.
67. Slininger P, Schisler D, Burkhead K, Bothast R **Postharvest Biological Control of Potato Sprouting by Fusarium Dry Rot Suppressive Bacteria.** *Biocont Scien Tech 2003, Vol. 13, No. 5, 477-494.*
68. Chisler D, Burkhead K, Slininger J, Bothast J. (1998) **Selection, characterization, anduse of microbial antagonists for the control of Fusarium dry rot of potatoes, in Plant-MicrobeInteractions and Biological Control** *(BOLAND, G.J. & KUYKENDALL, L.D., Eds.). Marcel Dekker, Inc., NY, pp. 199_ 221.*
69. Camurati F, Lanzani A, Arpino A, Ruffo C, Fedeli E. **Wastewaters from the olive-processing in the production of oliveoils. Technologiesandeconomical aspects in the recovery ofbyproducts.***RiV. Ital. Sostanze Grasse 1984, 61, 283-292.*
70. Romero C, Brenes M, Yousfi K, Garcı´a P, Garcı´a A, Garrido A. **Effect of cultivar and processing method on the contents of polyphenols in table olives.** *J Agric Food Chem, 2004; 52: 479-484.*
71. Brenes M, Garcı´a A, Rios J, Garrido A **Phenolic compounds in Spanish olive oils.** *J Agric Food Chem, 1999; 47: 3535-3540.*
72. Romero N, Brenes M, Garciaa P, Garciaa A, Garrido A. **Polyphenol Changes during Fermentation of Naturally Black Olives.** *J Agric Food Chem 2004; 52:1973-1979.*
73. Langcake P, Pruce R J, *Physiol Plant Pathol 1976; 9:77-86.*
74. Creasy L L, Coffee M. **Phytoalexin production potential of grape berries.** *J Am Soc Horti Sci 1988; 113: 230-234.*
75. Burns J, Yokota T, Ashihara H, Lean J. **Plant Foods and Herbal Sources of Resveratrol** J. *Agric Food Chem 2002;50: 3337-3340.*

76. Milner J A, McDonald S S, Anderson D E, & Greenwald P. **Molecular targets for nutrients involved with cancer prevention.** *Nutr Cancer 2001; 41: 1–16.*
77. Gusman J, Malonne H & Atassi G. **A reappraisal of the potential chemopreventive and chemotherapeutic properties of resveratrol.** *Carcinogenesis 2001; 22: 1111–1117.*
78. Bertelli A, Giovannini L, Stradi A, Bertelli J, Tillement J *Tiss Reac 1996; 18: 67-71.*
79. http://www.mdidea.com/products/herbextract/resveratrol/data.html
80. Kuhnle G, Spencer J, Chowrimootoo G, Schroeter H, Debnam E S, Srai S K S, Rice-EvansC A, Hahn U. **Resveratrol is absorbed in the small intestine as resveratrolglucuronide**. *Biochem Biophys Res Commun 2000; 272: 212-217.*
81. Juan M E, Vinardell M P, & Planas J M. **The daily oral administration of high doses of *trans*-resveratrol to rats for 28 days is not harmful.** *J Nutr 2002; 132: 257–260.*
82. Day A P, Kemp H J, Bolton C, Hartog M, Stansbie D. **Effect of concentrated red grape juice consumption on serum antioxidant capacity and low-density lipoprotein oxidation**. *Ann Nutr Metab 1997; 41: 353-357.*
83. Blond J P, Denis M P, Bezard J*. Sci Aliment 1995;15: 347-358.*
84. German J B. **Differential effects of small and largemolecular weight wine phytochemicals on endothelialcell eicosanoid release.** *J Agric Food 1998; 46:1900-1905.*
85. Orsini F, Pelizzoni F, Verotta L, Aburjai T, Rogers C B. **Isolation, synthesis, and antiplatelet aggregationactivity of resveratrol 3-*O*-beta-D-glucopyranoside andrelated compounds.** *J Nat Prod 1997; 60:1082-1087.*
86. Jang M, Cai L, Udeani G O, Slowing K V, Thomas C F, Beecher C W, Fong H H, Farnsworth N R, Kinghorn A D, Mehta R G, Moon R C & Pezzuto J M. **Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a naturalproduct derived from grapes.** *Science 1997;275: 218–220.*

87. Bhat K P, Lantvit D, Christov K, Mehta R G. **Estrogenic and antiestrogenic properties of resveratrol inmammary tumor models.** *Cancer Res. 2001;61:7456 -7463.*
88. Clement M V, Hirpara J L, Chawdhury S H, Pervaiz S, **Blood** *1998;92: 996-1002.*
89. Frankel E N, Waterhouse A L, Kinsella J E. **Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol.** *Lancet 1993; 341: 1103-1104*.
90. Goldberg D M, Garovic-Kocic V, Diamandis E P, Pace-Asciak C. **R. Wine: does the colour count?** *Clin Chim Acta1996; 246: 183-193.*
91. Soleas G J, Diamandis E P, Goldberg D M. **Resveratrol: a molecule whose time has come and gone?** *Clin Biochem 1997; 30:91-113.*
92. Gusman J, Malonne H. & Atassi, G. **A reappraisal of the potential chemopreventive and chemotherapeutic properties of resveratrol.** *Carcinogenesis 2001;22: 1111–1117.*
93. Williams R L, Elliott M, Perry R, Greaves B. **The estrogenic activity of the polyphenolic resveratrol, benefits of moderate consumption of red wine.** *Polyphen Communic 96, Bordeaux France 1996; P210: 489-490.*
94. Karantonis H C, Antonopoulou S, Demopoulos C A. **Antithrombotic lipid minor constituents from vegetables oils. Comparison between olive oils and others.** *J Agric Food Chem 2002; 50:1150-1160.*
95. Koussissis S G, Semidalas C E, Antonopoulou S, Demopoulos C A, Kapoulas V M, Kalyvas V. **Paf antagonists in foods :Isolation and identification of PAF in virgin oils.** *Rev Fr Corp Gras 1993; 40:323-327.*
96. Fragopoulou E, Antonopoulou S, Demopoulos CA. **Biologically active lipids with antiatherogenic properties from wine and must.** *J Agric Food Chem 2002; 50:2684-2694.*
97. Fragopoulou E, Nomikos T, Tsantila N, Mitropoulou A, Zabetakis I, Demopoulos C A. **Biological activity of total lipids from red and white wine/ must.** *J Agric Food Chem 2001; 49:5186-5193.*

98. Fragopoulou E, Nomikos T, Antonopoulou S, Mitsopoulou A, Demopoulos C A. **Separation of biologically active lipids from red wine.** *J Agric Food Chem 2000; 48:1234-38.*
99. Panayiotou A, Samartzis D, Nomikos T, Fragopoulou E, Karantonis H C, Demopoulos C A, Zabetakis I. **Lipid fractions with aggregatory and antiaggregatory activity toward platelets in fresh and fried cod (Gadus morhua):correlation with platelet – activating factor and atherogenesis.** *J Agric Food Chem 2000; 48:6372-6379.*
100. Rementzis J, Antonopoulou S, Argyropoulos C A, Demopoulos C A. **Biologically active lipids from S. scombrus.** *Adv Exp Med Biol 1996; 416:65-72.*
101. Rementzis J, Antonopoulou S, Demopoulos C A. **Identification and study of gangliosides from Scomber scombus.** *J Agric Food Chem 1997; 4:611-615.*
102. Koussissis S G, Semidalas C E, Hadzistavrou C, Kalyvas V, Antonopoulou S, Demopoulos C A. **PAF antagonists in foods :Isolation and identification of PAF in honey and wax.** *Rev Fr Corp Gras 1994; 41:127-132.*
103. Subbaramaiah K, Chung W J, Michaluart P, Telang N, Tanabe T, Inoue H, Meishiang J, Pezzuto J M. **Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 *trans*criptionand activity in phorbol ester-treated human mammary epithelia cells**. *J Biol Chem 1998; 273:21875-21882.*
104. ÇZbikowska H M, Olas B, Wachowicz B, Krajewski T. **Response of blood platelets to resveratrol.** *Platelets 1999; 10: 251–256.*
105. Goldberg D M, Hahn S E. Parke J G. **Clin Chem Acta** *1995; 237: 155-187.*
106. Clement M V, Hirpara J L, Chawdhury S, HPervaiz S*,* **Blood** *1998;92: 996-1002.*
107. Kang B S, Shin N H, Lee S H, Min K R, Kim Y. **Med Sci Res***1998; 26: 235-237.*
108. Roman V, Billard C, Kern C, Ferry-Dumazet H, Izard JC, MohammadR**. Analysis of resveratrol-induced apoptosis in human B-cell chronic leukemia.** *Br J Haematol 2002; 117:1–10.*

109. Cardilea V, Lombardoa L, Spataforab C, Tringalib C. **Chemoenzymatic synthesis and cell-growthinhibition activity of resveratrol analogues.** *Bioorganic Chemistry 2005 ;33: 22–33*
110. Ferry-Dumazet H, Garnier O, Mamani-Matsuda M, Dupouy M, Vercauteren J, Belloc F. ***Trans*resveratrol inhibits the growth and induces the apoptosis of both normal and leukemic hematopoietic cells**. *Carcinogenesis 2002; 23:1327–1333.*

111. Chan M Y, Mattiacci J A, Hwang H S, Shah A, Fong D. **Synergy between ethanol and grape polyphenols, quercetin, and resveratrol,in the inhibition of the inducible nitric oxide synthase pathway.***Biochem Pharmacol 2000;60:1539–1548.*
112. Wadworth T L, Koop D R. **Effects of the wine polyphenolics quercetinand resveratrol on pro-inflammatory cytokine expression in RAW264.7 macrophages.** *Biochem Pharmacol 1999; 57:941–949.*
113. Quiney C, Dauzonne D, Kern C, Fourneron J D, Izard J C, Mohammad R, Kolb J, Billard C. **Flavones and polyphenols inhibit the NO pathway during apoptosis of leukemia B-cells** *Leukemia Research 2004; 28 ; 851–861.*
114. Ohyama M, Tanaka T, Ito T, Iinuma M, Bastow K, Lee K. **Antitumor agents 200. Cytotoxicity of naturally occurring resveratrol oligomers and their acetate derivatives.** *Bioorganic & Medicinal Letters 1999; 9:3057-3060.*
115. Demopoulos CA, Karantonis HC, Antonopoulou S. **Platelet activating factor - a molecular link between athersclerosis theories.** *Eur J Lipid Sci Technol 2003; 105:705-716.*
116. Antonopoulou S, Semidalas C E, Koussissis S G, Demopoulos C A. **Platelet – Activating Factor (PAF) antagonists in foods. A study of lipids, with PAF or anti – PAF like- activity, in cow's milk and yogurt.** *J Agric Food Chem 1996; 44:3047-3051.*
117. Demopoulos C A, Pinckard R N, Hanahan D J, **Platelet-Activating Factor. Evidence for 1-0-Akyl-2-acetyl-sn-glyceryl-3-phosphorylcholine as the active component (a new class of lipid chemical mediators).** *J Biol Chem 1979; 254:9355-9358.*

118. Kapoulas V M. **Methods in enzymology,** *XIV, 518.*
119. Singleton V L, Joseph A, Rossi J R, Am J Enol, *Vitric, 144-158.*
120. Stephen M, Prescot M, Thomas M, McIntyre M D, Guy A, Zimmerman M D, Diana M, Stefforini M D. *Japanese Circulation Journal; 1996:60-3:137-141.*
121. Wells M A. *1996.*