



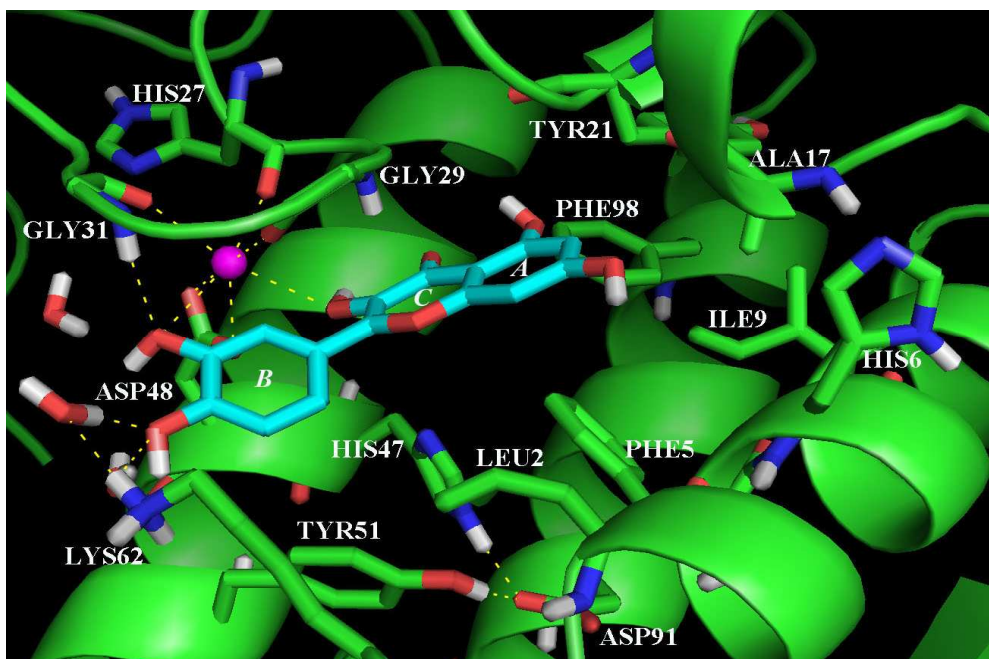
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Agricultural University of Athens

ΓΕΝΙΚΟ ΤΜΗΜΑ-ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΘΕΤΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΣΤΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑ-ΚΛΑΔΟΣ ΙΙΙ
«ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ: ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥΣ



ΜΑΡΟΥΛΑ Γ.-Ι. ΚΟΚΟΤΟΥ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2009

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Κ. ΓΕΩΡΓΙΟΥ



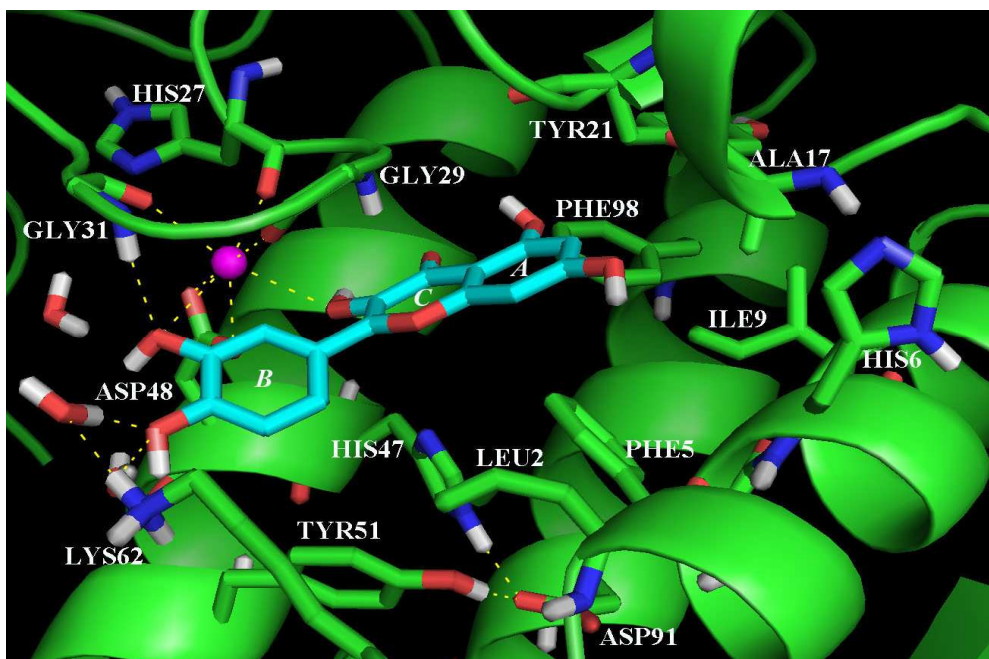
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Agricultural University of Athens

ΓΕΝΙΚΟ ΤΜΗΜΑ-ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΘΕΤΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΣΤΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑ-ΚΛΑΔΟΣ ΙΙΙ
«ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ: ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥΣ



ΜΑΡΟΥΛΑ Γ.-Ι. ΚΟΚΟΤΟΥ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2009

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Κ. ΓΕΩΡΓΙΟΥ

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ:
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥΣ**

ΜΑΡΟΥΛΑ Γ.-Ι. ΚΟΚΟΤΟΥ

Εξεταστική επιτροπή

Κ. Γεωργίου, Καθηγητής (επιβλέπων)

Μ. Πολυσιού, Καθηγητής

Η. Κουλαδούρος, Καθηγητής

Σ. Χαρουτουνιάν, Καθηγητής

Κ. Μπεθάνης, Επίκουρος Καθηγητής

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η φύση αποτελεί μια πλούσια πηγή βιοδραστικών μορίων που παρουσιάζουν διάφορες δράσεις. Τα βιοδραστικά μόρια μπορεί να απομονώνονται απευθείας από τις φυσικές πηγές ως καθарές ενώσεις. Πολλές φορές όμως, τα φυσικά προϊόντα αποτελούν πηγή έμπνευσης για την ανακάλυψη άλλων μορίων που μπορεί να βρίσκουν χρήση ως φάρμακα, αλλά και ως καλλυντικά και αρώματα.

Ανάμεσα στις φυσικές πηγές, το φασκόμηλο παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως πηγή δευτερογενών μεταβολιτών και για αυτό το λόγο επιλέχθηκε στην παρούσα διατριβή, για τη μελέτη της απομόνωσης των πολικών συστατικών του. Από το αιθανολικό εκχύλισμα φασκόμηλου του εμπορίου απομονώθηκε κλάσμα που μελετήθηκε με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου και άνθρακα και συγκρίθηκε με τα αντίστοιχα φάσματα ροζμαρινικού και χλωρογενικού οξέος. Το κλάσμα αυτό φαίνεται να περιέχει παράγωγο του ροζμαρινικού οξέος συζευγμένο με δύο σακχαρικές μονάδες.

Το φασκόμηλο έχει αναφερθεί επίσης, ότι παρουσιάζει πλήθος δράσεων, όπως αντισηπτική, σπασμολυτική, αντιδιαβητική, αντικαρκινική, αντιμικροβιακή κλπ. Πολλές από τις ιδιότητες του φασκόμηλου οφείλονται στις φαινολικές ενώσεις και ειδικότερα στα φλαβονοειδή που περιέχει.

Οι φωσφολιπάσες A_2 είναι μια υπεροικογένεια ενζύμων που χαρακτηρίζονται από την ικανότητά τους να υδρολύουν τον εστερικό δεσμό στην *sn*-2 θέση των φωσφολιπιδίων απελευθερώνοντας ελεύθερα λιπαρά οξέα, συμπεριλαμβανομένου του αραχιδονικού οξέος, και λυσοφωσφολιπίδια. Στη συνέχεια το αραχιδονικό οξύ μετατρέπεται προς εικοσανοειδή, ενώ τα λυσοφωσφολιπίδια προς τον παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων. Όλες αυτές οι ενώσεις συμμετέχουν στη φλεγμονή και επομένως αναστολείς της φωσφολιπάσης A_2 μπορούν να αποτελέσουν νέα μέσα για την καταπολέμηση φλεγμονωδών ασθενειών. Ανάμεσα στις διάφορες φωσφολιπάσες A_2 , αυξημένο ενδιαφέρον υπάρχει για την εκκριτική φωσφολιπάση A_2 (GIIA sPLA₂) και ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια για την αναστολή της GIIA sPLA₂ από φυσικά προϊόντα. Έχει δειχθεί ότι το φλαβονοειδές κερκετίνη αναστέλλει τη GIIA sPLA₂.

Στη παρούσα διατριβή μελετήσαμε με τη βοήθεια μοριακής μοντελοποίησης τον τρόπο αλληλεπίδρασης διάφορων φαινολικών ενώσεων με την εκκριτική GIIA sPLA₂. Η κερκετίνη και τρεις ενώσεις παραπλήσιας δομής, η λουτεολίνη, η γκενκβανίνη και η απιγενίνη επιλέχθηκαν αρχικά για αυτή τη μελέτη. Η μοριακή πρόσδεση (Molecular Docking) έγινε με τη χρήση του προγράμματος GOLD v 4.1 CCDC. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η κερκετίνη και η λουτεολίνη προσδένονται με τον ίδιο τρόπο, ενώ η γκενκβανίνη και η απιγενίνη με διαφορετικό. Το 5'-OH της κερκετίνης και της λουτεολίνης παίζει σημαντικό ρόλο για την καλύτερη πρόσδεση τους στο ενεργό κέντρο του ενζύμου.

Μελετήθηκαν επίσης δυο φαινολικές ενώσεις που είναι γνωστό ότι παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδη δράση, η ουμπελλιφερόνη (7-υδροξυκουμαρίνη) και η ελευροπαΐνη. Η ουμπελλιφερόνη παρουσιάζει φτωχά αποτελέσματα πρόσδεσης. Αντίθετα, η ελευροπαΐνη παρουσιάζει αποτελέσματα καλύτερα από αυτά της κερκετίνης, υποδεικνύοντας ότι η δράση της ελευροπαΐνης μπορεί να οφείλεται και στη δυνατότητα αναστολής της φωσφολιπάσης A_2 .

Επιστημονική περιοχή: Χημεία

Λέξεις κλειδιά: αναστολείς της PLA₂, φλαβονοειδή, μοριακή μοντελοποίηση, ροζμαρινικό οξύ.

BIOACTIVE MOLECULES: ISOLATION & STUDY

ABSTRACT

Nature is a rich source of bioactive molecules exhibiting various activities. Bioactive molecules may be isolated directly from natural sources as pure compounds. However, many times natural products are the source of inspiration for the discovery of other molecules that may find applications as drugs, cosmetics or fragrances.

Within the various natural sources, sage presents a special interest as source of secondary metabolites, thus it has been chosen for the isolation of its polar components. After ethanolic extraction of common sage, bought from the local market, and column chromatography purification a fragment was isolated. Comparison of the NMR spectra of this fragment with the spectroscopic data of rosmarinic acid and chlorogenic acid showed that the isolated compound is a rosmarinic acid derivative coupled with two sugar moieties.

Sage has also been reported to exhibit various activities, such as antiseptic, spasmolytic, antidiabetic, anticancer, antimicrobial etc. Most of these properties may be attributed to the phenolic compounds and in particular to flavonoids.

Phospholipases A_2 is a superfamily of enzymes which is characterized by its ability to hydrolyze the ester bond at the *sn*-2 position of phospholipids releasing free fatty acids, including arachidonic acid, and lysophospholipids. Arachidonic acid may be converted to eicosanoids, while lysophospholipids to platelet activated factor. All these compounds are involved in inflammation and thus inhibitors of phospholipase A_2 may be new agents for the treatment of inflammation.

Within the phospholipases A_2 superfamily, there is an increased interest for the secreted phospholipase A_2 (GIIA sPLA₂) and especially during the last years, for the inhibition of GIIA sPLA₂ by natural products. It has been reported that the flavonoid quercetin inhibits GIIA sPLA₂.

In the present thesis, we studied the interactions of various phenolic compounds with the GIIA sPLA₂ by molecular modeling. Quercetin and three structurally related compounds, namely luteolin, genkwanin and apigenin were initially chosen to be studied. Molecular docking studies were carried out using the program GOLD v 4.1 CCDC. The results showed that quercetin and luteolin bind in a similar way, while genkwanin and apigenin presented a different binding mode. The 5'-OH of quercetin and luteolin plays an important role for their better binding in the active site of the enzyme.

In addition, two phenolic compounds presenting anti-inflammatory activity, namely umbelliferone and oleuropain, were studied. Umbelliferone presented low binding results. On the contrary, oleuropain presents better results than those of quercetin indicating that the activity of oleuropain may be attributed to its ability to inhibit phospholipase A_2 .

Scientific area: Chemistry

Key words: PLA₂ inhibitors, flavonoids, molecular modeling, rosmarinic acid

Στους γονείς μου

Στον Χριστόφορο

Στο Δημήτρη

Το παρόν μεταπτυχιακό δίπλωμα ειδίκευσης εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών από τον Ιούλιο 2009 έως και τον Οκτώβριο 2009, στα πλαίσια του προγράμματος του Γενικού Τμήματος «Θετικές Επιστήμες στη Γεωπονία» κλάδος ΙΙΙ «Μελέτη και αξιοποίηση φυσικών προϊόντων», υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Κ. Γεωργίου, προς τον οποίο θα ήθελα να εκφράσω τις βαθύτατες ευχαριστίες μου.

Ευχαριστώ ιδιαίτερος τον Αναπληρωτή Καθηγητή του Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Θ. Μαυρομούστακο για την συμβολή του στη μελέτη μοριακής πρόσδεσης.

Ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω και ως προς την πενταμελή εξεταστική επιτροπή, τον κ. Κ. Γεωργίου, τον κ. Μ. Πολυσίου, τον κ. Σ. Χαρουτουνιάν, τον κ. Η. Κουλαδούρο και τον κ. Κ. Μπεθάνη.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Χημείας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών για την φιλική συμπαράσταση και τη συνεργασία τους.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον υποψήφιο διδάκτορα του Πανεπιστημίου Αθηνών Βαρνάβα Μούχλη για τη διαρκή και πολύτιμη βοήθεια του στις μελέτες μοριακής πρόσδεσης.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τη συμφοιτήτρια και φίλη μου Φ.Σύμπουρα για την θαυμάσια συνεργασία που είχαμε.

Ευχαριστώ ολόψυχα την οικογένεια μου, τους γονείς μου, τον αδερφό μου και τον Δημήτρη Λημιό για την ηθική συμπαράσταση τους.

Συντομογραφίες

PLA₂ : Phospholipase A₂ = φωσφολιπάση A₂

cPLA₂ : Cytosolic PLA₂ = κυτοσολική Φωσφολιπάση A₂

sPLA₂ : Secretory PLA₂ = εκκριτική Φωσφολιπάση A₂

iPLA₂ : Ca²⁺ independent PLA₂ = Ανεξάρτητη ασβεστίου Φωσφολιπάση A₂

GOLD = Genetic Optimisation for Ligand Docking

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ
ABSTRACT

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ	
ΑΡΩΜΑΤΙΚΑ ΦΥΤΑ	1
1.1 ΓΕΝΙΚΑ ΠΕΡΙ ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΦΥΤΩΝ	1
1.2 ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ	2
1.3 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ	2
1.4 ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ	7
• 1.4.1 ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΔΡΑΣΗ	7
• 1.4.2 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ	8
• 1.4.3 ΑΓΓΕΙΟΔΙΑΣΤΑΛΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ	8
• 1.4.4 ΑΝΤΙΦΛΕΓΝΟΝΩΔΗ ΔΡΑΣΗ	9
• 1.4.5 ΑΝΤΙΘΡΟΜΒΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ	9
• 1.4.6 ΟΡΜΟΝΙΚΗ ΔΡΑΣΗ	9
• 1.4.7 ΑΝΤΙΑΛΛΕΡΓΙΚΗ ΔΡΑΣΗ	10
• 1.4.8 ΑΝΤΙΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ	10
1.5 ΦΑΣΚΟΜΗΛΟ	10
• 1.5.1 ΓΕΝΙΚΑ	10
• 1.5.2 ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΕΞΑΠΛΩΣΗ ΣΤΟΝ ΕΛΛΑΔΙΚΟ ΧΩΡΟ	12
• 1.5.3 ΧΡΗΣΗ ΚΑΙ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ	12
• 1.5.4 ΠΑΡΕΝΕΡΓΕΙΕΣ	14
• 1.5.5 ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΟΥ ΦΑΣΚΟΜΗΛΟΥ	14
• 1.5.6 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΟΥ ΦΑΣΚΟΜΗΛΟΥ	16
• 1.5.7 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΑΝΑΛΥΣΗ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΟΥ ΦΑΣΚΟΜΗΛΟΥ	17
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ	
ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΕΣ A₂ ΚΑΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΟΥΣ	20
2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	20
2.2 ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΩΝ ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΩΝ A ₂	22
2.3 ΕΚΚΡΙΤΙΚΕΣ ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΕΣ A ₂	22
2.4 ΚΥΤΟΣΟΛΙΚΕΣ ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΕΣ A ₂	23
2.5 ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΕΣ A ₂ ΑΝΕΞΑΡΤΗΤΕΣ Ca ²⁺	24

2.6 ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΕΣ A ₂ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗ	25
2.7 ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ ΕΚΚΡΙΤΙΚΗΣ ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΕΣ A ₂	25
2.8 ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ ΚΥΤΟΣΟΛΙΚΗΣ ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΕΣ A ₂	27
2.9 ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΑΝΕΞΑΡΤΗΤΕΣ Ca ²⁺ ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΕΣ A ₂	30
2.10 ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΕΣ A ₂ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΕΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗ	31
2.11 ΦΥΣΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΩΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ ΕΚΚΡΙΤΙΚΗΣ ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΕΣ A ₂	31

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ

3.1 ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗΣ	34
3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥ	34
3.3 ΚΒΑΝΤΟΜΗΧΑΝΙΚΗ	35
3.4 ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ	35
3.5 ΕΛΑΧΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ	42
3.6 ΜΟΡΙΑΚΗ ΠΡΟΣΔΕΣΗ	44
3.6.1 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΣΥΝΤΕΛΟΥΝ ΣΤΗ ΕΛΑΤΤΩΣΗ ΤΗΣ ΑΥΘΟΡΜΗΤΗΣ ΣΥΜΠΛΕΞΗΣ	44
3.6.2 ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ RMSD	46

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 ΕΠΙΛΟΓΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΓΙΑ <i>in silico</i> ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΗΣ ΓΙΑ sPLA ₂	49
4.2 ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΓΙΑ sPLA ₂	51
4.3 ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ	53
4.4 ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΟΥ GOLD	54
4.5 TEST ΤΟΥ GOLD	56
4.6 ΜΕΛΕΤΗ ΚΕΡΚΕΤΙΝΗΣ, ΛΟΥΤΕΟΛΙΝΗΣ, ΓΚΕΝΚΒΑΝΙΝΗΣ ΚΑΙ ΑΠΙΓΕΝΙΝΗΣ	57
4.7 ΜΕΛΕΤΗ ΟΥΜΠΕΛΛΙΦΕΡΟΝΗΣ ΚΑΙ ΕΛΕΥΡΟΠΑΪΝΗΣ	70
4.8 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ	89
• 4.8.1 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΦΑΣΚΟΜΗΛΟΥ	89
• 4.8.2 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ- ΦΑΣΜΑ ¹ H NMR ΡΟΖΜΑΡΙΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ	90

• 4.8.3 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ- ΦΑΣΜΑ ^1H NMR ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ K_1	90
• 4.8.4 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ- ΦΑΣΜΑ ^{13}C NMR ΡΟΖΜΑΡΙΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ	95
• 4.8.5 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ- ΦΑΣΜΑ ^{13}C NMR ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ K_1	95
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	99
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	100

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

ΑΡΩΜΑΤΙΚΑ ΦΥΤΑ

1.1 Γενικά περί αρωματικών φυτών

Τα αρωματικά φυτά και τα βότανα είχαν μια ιδιαίτερη θέση στις παραδόσεις πολλών αρχαίων λαών [1]. Θεωρήθηκαν η έκφραση της γενναιοδωρίας της μητέρας Φύσης καθώς και η έκφραση της ομορφιάς. Τα φυτά μας προσφέρουν τροφή, οξυγόνο, άρωμα, ομορφιά. Πολλά από αυτά, όπως απέδειξε η πείρα αιώνων, διαθέτουν δραστικές θεραπευτικές ιδιότητες. Έτσι, εδώ και χιλιάδες χρόνια, ποικιλίες βοτάνων έχουν χρησιμοποιηθεί από τους ανθρώπους για θεραπευτικούς λόγους. Οι κλασσικοί Έλληνες συγγραφείς και γιατροί της αρχαιότητας, όπως ο Ιπποκράτης, ο Αριστοτέλης, ο Διοσκουρίδης, ο Γαληνός έγραψαν διάφορα συγγράμματα για τις θεραπευτικές ιδιότητες και τον τρόπο χρήσης των φυτών, βασισμένοι στις λαϊκές παραδόσεις του καιρού τους. Αυτή η αναγνώριση της θεραπευτικής αξίας των φυτών δεν απαντάται μονάχα στους Έλληνες. Οι Κινέζοι, οι Σουμέριοι, οι Βαβυλώνιοι, οι Αιγύπτιοι αναγνώριζαν επίσης την αξία τους.

Σημαντική ήταν και η συμβολή του Παράκελσου σ' αυτό το θέμα. Αυτός ο μεγάλος αλχημιστής και γιατρός πρέσβευε τη χρήση του μεγάλου φαρμακείου της φύσης και υποστήριζε ότι η μορφή των φυτών είναι ενδεικτική των ασθενειών που θεραπεύουν.

Σήμερα, τα φάρμακα προέρχονται σε ένα σημαντικό ποσοστό από φυσικές πηγές. Τα περισσότερα είναι καθαρές ουσίες που απομονώθηκαν και ελέγχθηκαν επιστημονικά και χρησιμοποιούνται είτε ως έχουν, είτε μετά από κατάλληλη χημική μετατροπή. Το ίδιο γίνεται στα καλλυντικά και στα αρώματα.

Τα αρωματικά φυτά, όπως το δενδρολίβανο, το φασκόμηλο, το θυμάρι και η λεβάντα που ευδοκιμούν στην περιοχή της Μεσογείου και καλλιεργούνται σε πολλές περιοχές του κόσμου, καθώς επίσης η μέλισσα και η μέντα, χρησιμοποιούνται ως αφέψημα και καρύκευμα και σύμφωνα με τη λαϊκή παράδοση για την προστασία από την κούραση, την αδυναμία, την κατάθλιψη, για την ενίσχυση της μνήμης, για τη

βελτίωση του κυκλοφορικού και για την ενδυνάμωση των εύθραστων αιμοφόρων αγγείων.

Οι ερευνητές έχουν βρεί ότι αυτά τα φυτά είναι πηγή προϊόντων με υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα, αντιφλεγμονώδη, ηπατο και καρδιοπροστατευτική δράση λόγω της περιεκτικότητάς τους σε φαινολικές ενώσεις [2-5].

1.2 Φαινολικές ενώσεις

Οι φαινολικές ενώσεις είναι προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού και χαρακτηρίζουν το είδος που τα παράγει. Ο ρόλος τους δεν είναι εξακριβωμένος σε όλες τις περιπτώσεις [6].

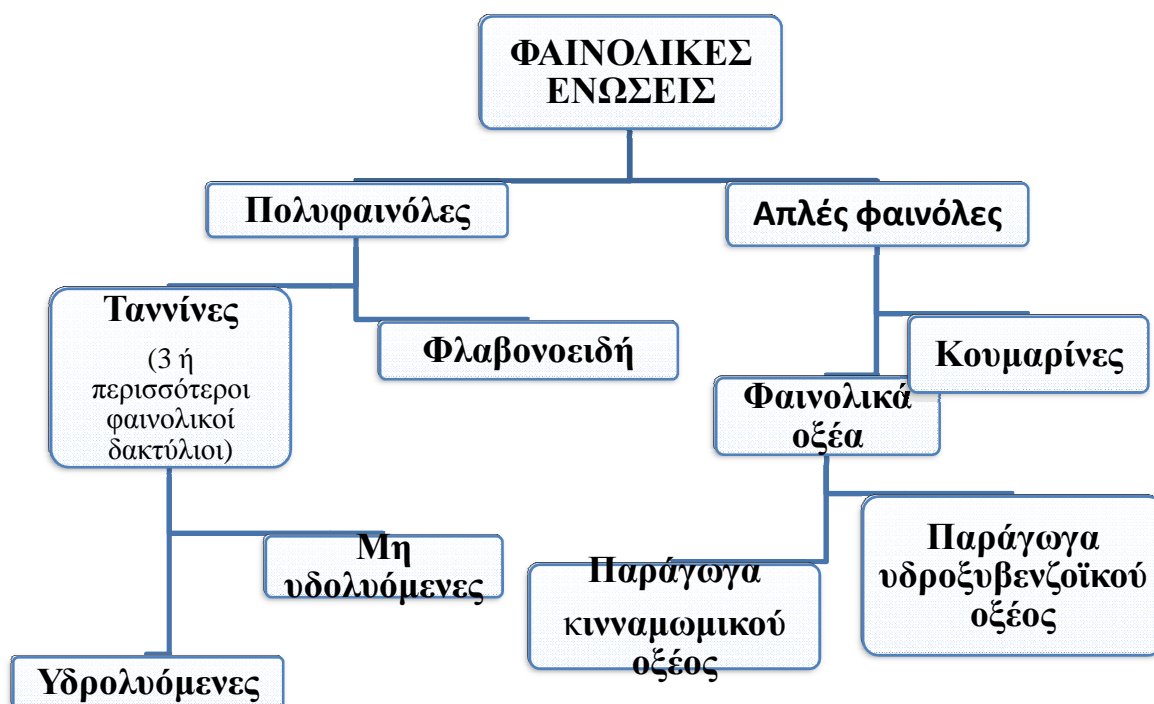
Από την δεκαετία του '80, οι ερευνητές και οι βιομηχανίες τροφίμων έδειξαν αυξημένο ενδιαφέρον για αυτές, κυρίως για τη μεγάλη αφθονία τους στα τρόφιμα, την αντιοξειδωτική τους ικανότητα και τον πιθανό ρόλο τους στην πρόληψη πολλών ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες, όπως ο καρκίνος, τα καρδιαγγειακά νοσήματα και οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες. Υπάρχουν επιδημιολογικές μελέτες που δείχνουν, ότι η κατανάλωση φρούτων και λαχανικών μειώνει τον κίνδυνο από τις προαναφερθείσες ασθένειες [7-9].

Τα φυτά συνθέτουν τις φαινολικές ενώσεις τόσο κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής τους ανάπτυξης, όσο και κατά τη διάρκεια που βρίσκονται υπό στρες, όπως όταν προσβάλλονται από έντομα, έχουν πληγωθεί ή έχουν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία [10]. Η βιοσύνθεσή τους προέρχεται από το σικιμικό οξύ. Στα φυτά μπορούν να συμβάλλουν στη θρέψη τους, την προσέλκυση εντόμων με σκοπό τη γονιμοποίηση, στο χρώμα τους και στην προστασία τους από την υπεριώδη ακτινοβολία [11]. Το επίπεδο των φαινολικών ενώσεων στα φυτά εξαρτάται από την τεχνική που εφαρμόζεται στην καλλιέργεια, τις συνθήκες ανάπτυξης και ωρίμανσης καθώς και από τις συνθήκες χειρισμού τους μετά από τη συγκομιδή [12].

1.3 Ταξινόμηση των φαινολικών ενώσεων

Οι φαινολικές ενώσεις περιέχουν ένα τουλάχιστον αρωματικό δακτύλιο, υποκατεστημένο με μία ή περισσότερες υδροξυλομάδες, που ονομάζεται φαινολικός

δακτύλιος. Ταξινομούνται δε, σύμφωνα με τον αριθμό των περιεχόμενων φαινολικών δακτυλίων σε υποκατηγορίες σύμφωνα με το Σχήμα 1.1., σε πολυφαινόλες και απλές φαινόλες [6]. Οι πολυφαινόλες χωρίζονται σε ταννίνες που περιέχουν τρεις ή περισσότερους φαινολικούς δακτυλίους και διακρίνονται σε υδρολυόμενες και μη υδρολυόμενες και σε φλαβονοειδή.

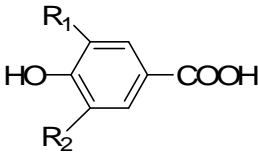


Σχήμα 1.1. Κατηγορίες φαινολικών ενώσεων.

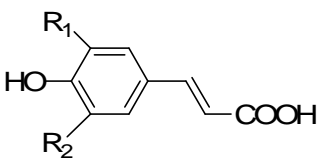
Οι απλές φαινόλες χωρίζονται σε φαινολικά οξέα και κουμαρίνες. Τα φαινολικά οξέα που είναι περισσότερο διαδεδομένα διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: α) τα παράγωγα του π-υδροξυ-βενζοϊκού οξέος (Σχήμα 1.2.) και β) τα παράγωγα του κινναμωμικού οξέος (Σχήμα 1.3.).

Το πιο αντιπροσωπευτικό φαινολικό οξύ είναι το καφεϊκό οξύ, το οποίο βρίσκεται στα τρόφιμα, σε πολλά φρούτα, αλλά και στον καφέ [13]. Ευρέως όμως απαντάται και το κουμαρικό οξύ, το φερουλικό οξύ, το γαλλικό οξύ, το βανιλικό οξύ και το σιναπικό οξύ. Το φερουλικό οξύ βρίσκεται στους σπόρους των δημητριακών, το γαλλικό οξύ στα κόκκινα φρούτα, στα ραπανάκια, στα κρεμμύδια καθώς και στο τσάι. Τα είδη των φρούτων που περιέχουν την μεγαλύτερη ποσότητα από τα

φαινολικά οξέα κουμαρικό, καφεϊκό, φερουλικό και σιναπικό οξύ, είναι τα βατόμουρα, δαμάσκηνα, ακτινίδια, μήλα και κεράσια [14]. Τα ώριμα φρούτα περιέχουν μεγαλύτερες ποσότητες φαινολικών οξέων από ό,τι τα άγουρα.

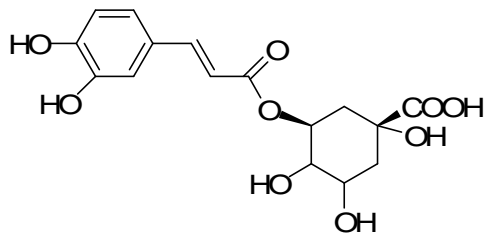
	R₁	R₂	ονομασία
	H	H	π-υδροξυβενζοϊκό οξύ
	OH	H	πρωτοκατεχικό οξύ
	OH	OH	γαλλικό οξύ
	OCH ₃	H	βανιλλικό οξύ
	OCH ₃	OCH ₃	συριγγικό οξύ

Σχήμα 1.2. π-Υδροξυβενζοϊκό οξύ και παράγωγά του.

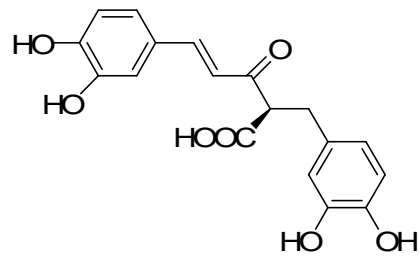
	R₁	R₂	ονομασία
	H	H	π-κουμαρικό οξύ
	OH	H	καφεϊκό οξύ
	OCH ₃	H	φερουλικό οξύ
	OCH ₃	OCH ₃	σιναπικό οξύ

Σχήμα 1.3. Παράγωγα του κινναμωμικού οξέος.

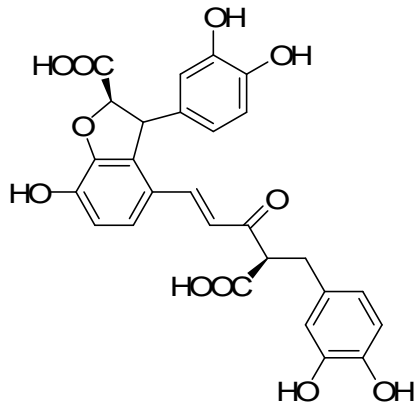
Οι απλές φαινόλες και τα φαινολικά οξέα δεν απαντώνται συνήθως ελεύθερα στα φυτά, αλλά υπό μορφή αλάτων, εστέρων ή γλυκοζιτών. Οξινή υδρόλυση των φυτικών ιστών ελευθερώνει τα φαινολικά οξέα που βρίσκονται ως άλατα, εστέρες ή γλυκοζίτες, ενώ η αλκαλική υδρόλυση τα ελευθερώνει από τα φλαβονοειδή. Στο Σχήμα 1.4. δίνονται μερικοί χαρακτηριστικοί εστέρες του καφεϊκού οξέος που απαντώνται σε αρωματικά φυτά, όπως το χλωρογενικό, το ροζμαρινικό, το λιθοσπερμικό και το σαλβιανολικό οξύ. Τα υδροξυκινναμωμικά οξέα επιδρούν στην ομαλή αύξηση και ενισχύουν την ανθεκτικότητα των φυτών από τις ασθένειες. Από αυτά το ροζμαρινικό, το καφεϊκό, το φερουλικό απαντώνται σε αρωματικά φυτά, φρούτα και δημητριακά.



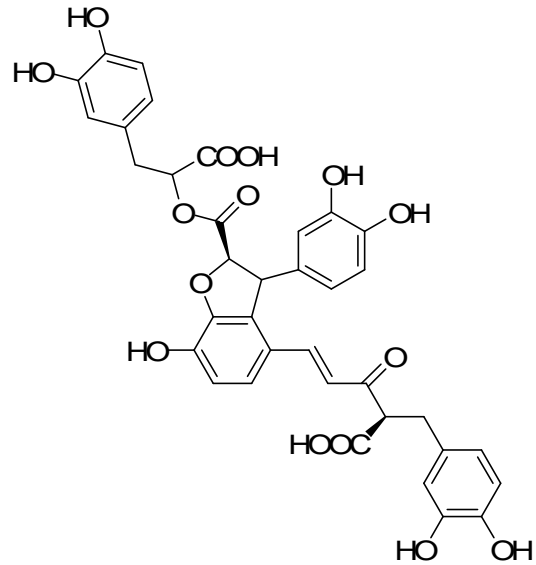
Χλωρογενικό οξύ



Ροζμαρινικό οξύ



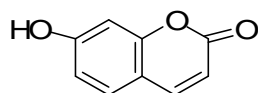
Λιθοσπερμικό οξύ



Σαλβιανολικό οξύ Β

Σχήμα 1.4. Εστέρες του καφεϊκού οξέος.

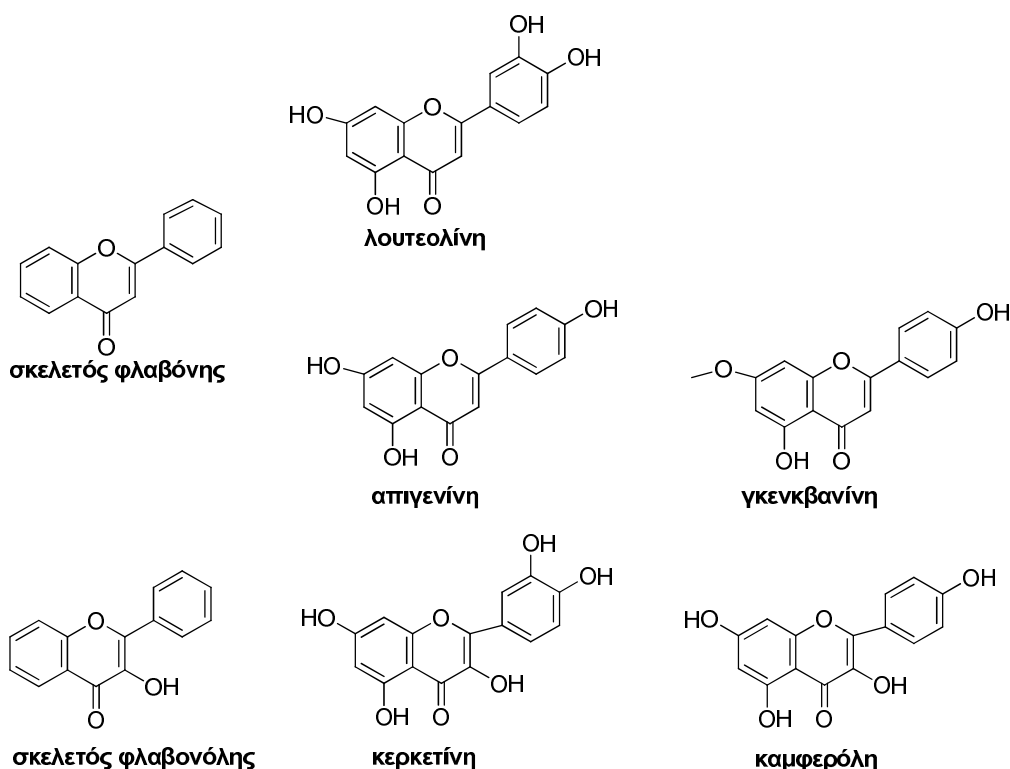
Οι κουμαρίνες είναι προϊόντα λακτονοποίησης των υδροξυκιναμωμικών οξέων και βρίσκονται συνήθως υπό μορφή γλυκοζιτών. Η ουμπελλιφερόνη (7-υδροξυκουμαρίνη) που φαίνεται στο Σχήμα 1.5., χρησιμοποιείται ως παράγοντας απορρόφησης των υπεριωδών ακτίνων σε πολλά αντιηλιακά σκευάσματα.



Σχήμα 1.5. Δομή της 7-υδροξυκουμαρίνης (ουμπελλιφερόνη).

Τα φλαβονοειδή αποτελούν τη μεγαλύτερη τάξη των φαινολικών ενώσεων, κυρίως χρωστικών των φυτών, που προσδίδουν όμως και χαρακτηριστική γεύση και άρωμα. Ανήκουν στις πολυφαινόλες και χωρίζονται σε παράγωγα φλαβόνης και σε ανθοκυανίνες. Οι περισσότερες φλαβόνες είναι κίτρινες στερεές ουσίες, διαλυτές στο νερό. Οι ανθοκυανίνες είναι επίσης υδατοδιαλυτές, έχουν όμως επαμφοτερίζοντα χαρακτήρα. Δηλαδή, σε όξινο περιβάλλον ($\text{pH} < 3$) έχουν χρώμα κόκκινο, σε αλκαλικό ($\text{pH} > 11$) μπλέ και σε ουδέτερο βιολετί [6].

Στη φύση βρίσκονται δέκα περίπου διαφορετικές τάξεις παραγώγων της φλαβόνης. Απαντούν στα φυτά ως μίγματα ενώσεων από την ίδια ή διαφορετικές τάξεις ενώσεων και συχνά ενωμένα με σάκχαρα ως O- ή C-γλυκοζίτες. Οι περισσότερο διαδεδομένες τάξεις είναι οι φλαβόνες, οι φλαβονόλες, οι φλαβανόνες, οι χαλκόνες και οι ισοφλαβόνες. Στο Σχήμα 1.6. φαίνεται ο βασικός σκελετός των φλαβονών και των φλαβονολών καθώς και αντιπροσωπευτικά τους παραδείγματα. Η λουτεολίνη, η απιγενίνη και η γκενκβανίνη ανήκουν στις φλαβόνες, ενώ η κερκετίνη και η καμφερόλη στις φλαβονόλες [6].



Σχήμα 1.6. Βασικός σκελετός φλαβόνης και φλαβονόλης. Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα φλαβονών και φλαβονολών.

Οι κυριότερες πηγές των φλαβονολών είναι τα κρεμμύδια, τα λάχανα, τα πράσα, τα μπρόκολα, τα βατόμουρα, το κόκκινο κρασί, το τσάι και τα φρούτα. Οι φλαβονόλες συσσωρεύονται στην επιφάνεια των εξωτερικών ιστών (φλοιός, φύλλα) καθώς η βιοσύνθεση τους διεγείρεται από το φως [15]. 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. 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 [16].

Οι φλαβόνες είναι λιγότερο συχνά απαντώμενες από ότι οι φλαβονόλες και ευρίσκονται συνήθως ως C-γλυκοζίτες.

1.4 Βιολογικές δράσεις φλαβονοειδών

1.4.1 Αντικαρκινική δράση.

Διάφορα πειραματικά μοντέλα έχουν αποδείξει ότι ένας μεγάλος αριθμός φλαβονοειδών δείχνουν αντικαρκινική δράση, σε πολλαπλάσιες βέβαια συγκεντρώσεις από αυτές που προσλαμβάνει κανείς με το καθημερινό του διαιτολόγιο [17]. Τα φλαβονοειδή: κερκετίνη, καμφερόλη και απιγενίνη, έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν το ενζυμικό σύστημα του κυτοχρώματος P450, το οποίο παίζει πρωτεύοντα ρόλο στην ενεργοποίηση πολλών καρκινογόνων παραγόντων [18].

Μελέτες δείχνουν επίσης, ότι η χρόνια φλεγμονή σχετίζεται με την αιτιολογία πολλών ειδών καρκίνου. Αναστολείς του ενζύμου της κυκλοξυγονάσης όπως ορισμένα φλαβονοειδή (κερκετίνη, κατεχίνες, κυανιδίνη) θεωρούνται κύριοι προστατευτικοί παράγοντες έναντι του καρκίνου του παχέως εντέρου [19].

“*In vitro*” πειράματα έδειξαν ότι η γκενιστεΐνη και η κερκετίνη αναστέλλουν την κινάση της τυροσίνης, η οποία παίρνει μέρος στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ενώ η απιγενίνη και η λουτεολίνη βοηθούν στην απόπτωση [20, 21].

1.4.2 Αντιοξειδωτική δράση

Οι πιο πολλές ευεργητικές ιδιότητες των φλαβονοειδών αποδίδονται στην αντιοξειδωτική τους ικανότητα, την ικανότητα δηλαδή 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 [22]. 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 [23].

Με δεδομένη την ικανότητά τους να αναστέλλουν την οξείδωση της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (LDL), στα φλαβονοειδή έχουν αποδοθεί καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες [24]. Ένα συνδετικό στοιχείο μεταξύ των φλαβονοειδών και της ικανότητάς 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 καρδιαγγειακά επεισόδια, λόγω της μεγάλης κατανάλωσης φαινολικών αντιοξειδωτικών που ανευρίσκονται στο κόκκινο κρασί [25].

Μελέτες έχουν δείξει ότι ο ρόλος μιας δίαιτας πλούσιας σε φλαβονοειδή είναι πολύ σημαντικός, καθώς αυξημένη πρόσληψη πολυφαινολών έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της θνησιμότητας από στεφανιαία νόσο, τη μείωση της συχνότητας εμφάνισης εμφράγματος του μυοκαρδίου σε ηλικιωμένους άντρες [26] και μείωση του κινδύνου εμφάνισης στεφανιαίας νόσου σε μεταεμμηνοπαυσιακές γυναίκες κατά 38% [27].

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 τη δράση οξειδωτικών ενζύμων.

1.4.3 Αγγειοδιασταλτική δράση

Από έναν μεγάλο αριθμό μελετών φαίνεται ότι οι φαινολικές ενώσεις έχουν προστατευτικό ρόλο έναντι της στεφανιαίας νόσου. Εκτός από την αναστολή της

οξειδωσης της LDL και της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, τα φαινολικά συστατικά αναστέλουν παράγοντες ενδοθηλικής δυσλειτουργίας και συμβάλουν στην βελτίωση της ελαστικότητας των αρτηριών με την αύξηση της παρουσίας του μονοξειδίου του αζώτου. Το φλαβονοειδές επιγαλλοκατεχίνη που βρίσκεται στο τσάι ενεργοποιεί την σύνθεση του μονοξειδίου του αζώτου [28].

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 [29], όσο και της οξειδάσης του φωσφορικού νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτιδίου (NADPH) [30].

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 φαινολικών ενώσεων να αναστέλλουν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Έτσι μειώνεται η σύνθεση προθρομβωτικών παραγόντων, η έκφραση των μορίων προσκόλλησης και η δράση των ιστικών παραγόντων [31].

1.4.6 Ορμονική δράση

Μελέτες αναφέρουν ότι τόσο η γκενιστεΐνη όσο η απιγενίνη και η ναρινγκενίνη, προσδένονται στους β-υποδοχείς των οιστρογόνων καλλίτερα από ό,τι στους α-υποδοχείς, στοιχείο το οποίο θεωρείται θετικό στην πρόληψη της οστεοπόρωσης [32].

Επίσης, πειραματικές μελέτες έδειξαν τόσο “*in vitro*” όσο και “*in vivo*” ότι η ιπριφλαβόνη (παράγωγο των ισοφλαβονών), αναστέλλει την επαναπορρόφηση των

οστεοκλαστών [33]. Επομένως φαίνεται ότι τα φλαβονοειδή παίζουν έναν σημαντικό ρόλο στην πρόληψη και της οστεοπόρωσης.

1.4.7 Αντιαλλεργική δράση

Στα φλαβονοειδή έχει αποδοθεί και αντιαλλεργική δράση, γιατί προκαλούν αναστολή της δράσης των ενζύμων που αυξάνουν την έκκριση ισταμίνης τόσο από τα μαστοκύτταρα όσο και από τα βασεόφιλα [34]. Τα ένζυμα αυτά είναι η φωσφοδιεστεράση του cAMP και η ασβεστιοεξαρτώμενη φωσφατάση της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ΑΤΡάση).

1.4.8 Αντιβακτηριακή δράση

Μελέτες “*in vitro*” αποδεικνύουν ότι φλαβονοειδή που περιέχονται σε αιθανολικά εκχυλίσματα φύλλων από φυτά της Βραζιλίας έχουν αντιβακτηριακή δράση τόσο κατά των θετικών όσο και κατά των αρνητικών κατα Gram βακτηρίων [35].

1.5 Το Φασκόμηλο

1.5.1 Γενικά

Το φασκόμηλο ή φασκομηλιά είναι φυτό δικοτυλίδο που ανήκει στην οικογένεια των χειλανθών (*Labiatae*) και απαντάται στη λεκάνη της Μεσογείου, στη ΝΑ Αφρική, στη Νότια και Κεντρική Αμερική [36]. Στη Βαλκανική χερσόνησο, απαντάται κατά μήκος της Αδριατικής ζώνης, στη Βουλγαρία και τα Σκόπια. Στη χώρα μας είναι αυτοφυές σε πολλές περιοχές. Είναι πολυετής ή μονοετής πόα φρυγανώδης ή θαμνώδης κατά το πλείστον αρωματική, που φύεται σε χέρσα, ξηρά και πετρώδη εδάφη. Τα φύλλα της είναι λογχοειδή ή επιμήκη, ρυτιδωμένα, παχιά, οδοντωτά με λευκοπράσινο χρώμα. Τα κατώτερα φύλλα φέρουν αρκετά ανεπτυγμένο ποδίσκο, ενώ τα ανώτερα δεν έχουν ποδίσκο και είναι οξύληκτα. Τα άνθη φύονται ανά 3-6 και ανθίζουν από τον Μάιο μέχρι τον Ιούνιο. Πολλοί τη θεωρούν ίδια με το τσάι του βουνού, αλλά η γεύση και οι ιδιότητές της διαφέρουν. Η φασκομηλιά καλλιεργείται ως φυτό φαρμακευτικό και διατροφικό, ενώ ποικιλίες της με

ποικιλόχρωμα άνθη ως καλλωπιστικό. Οι φυλλοφόροι βλαστοί (Εικόνα 1.1.) συλλέγονται από τον Μάιο και μετά αποξηραίνονται.

Η επιστημονική της ονομασία είναι *Salvia*. Το όνομα προέρχεται από το λατινικό ρήμα *salvare* που σημαίνει σώζω ζωές, γιατί οι Λατίνοι τη θεωρούσαν ιερό φυτό, φυτό της αθανασίας και τη χρησιμοποιούσαν σε τελετές [37]. Πίστευαν ότι δεν πεθάνει ένας άνθρωπος που έχει στο κήπο του φασκόμηλιά, γιατί αυτή μπορεί να θεραπεύσει τα πάντα. Οι Έλληνες, επίσης τη θεωρούσαν ιερό βότανο αφιερωμένο στο Δία και τη χρησιμοποιούσαν στα δαγκώματα των φιδιών, αλλά και ως τονωτικό του μυαλού και του σώματος.



Εικόνα 1.1. Φυλλοφόροι βλαστοί.

Οι Κινέζοι την ονόμαζαν ελληνικό βραστάρι και την εκτιμούσαν τόσο πολύ ως βότανο, ώστε στην ακμή του εμπορίου του κινέζικου τσαγιού με την Δύση, αντάλλασσαν 2 δέσμες κινέζικο τσάι με μια δέσμη φασκόμηλο. Η χρήση του φασκόμηλου ήταν γνωστή στους Ιάπωνες, αλλά και στους ιθαγενείς Ινδιάνους της Αμερικής. Για τη δράση του φασκόμηλου, συναντάμε επίσης αναφορές από τα τέλη του 16ου αιώνα. Από τότε ο βοτανολόγος John Gerard υποστήριζε ότι το φασκόμηλο είναι καλό για το κεφάλι και ότι επιταχύνει τη λειτουργία του νευρικού συστήματος και της μνήμης. Αναφέρεται ότι στη μεγάλη επιδημία πανούκλας που ξέσπασε στην Τουλούζη το 1630, οι κλέφτες που λεηλατούσαν τα πτώματα χωρίς να κολλήσουν, οφειλόταν σε αλοιφή που έφτιαχναν από φασκόμηλο, θυμάρι, λεβάντα και δενδρολίβανο [37].



Εικόνα 1.2. Άγρια και ήμερη φασκομηλιά.

1.5.2 Γεωγραφική εξάπλωση και είδη στον Ελλαδικό χώρο

Στη χώρα μας έχουν εντοπισθεί 23 είδη της *Salvia*. Σημαντικότερα από αυτά είναι: η *Salvia glutinosa*, *Salvia horminum*, *Salvia pomifera*, γνωστή ως πικρή φασκομηλιά (Cretan sage), *Salvia sclarea* (Clary sage), γνωστή με τα ονόματα αγιάννης, γοργόγιαννης, *Salvia triloba ή fruticosa*, κοινώς γνωστή ως αλισφακιά (Greek sage), *Salvia officinalis*, η κοινή φασκομηλιά (Dalmatian sage).

1.5.3 Χρήση και ιδιότητες

Στην περιοχή της Ανατολικής Μεσογείου, παρασκευάζεται από τα φύλλα αφέψημα, το γνωστό φασκόμηλο, που χρησιμοποιείται ως καρύκευμα σε διάφορα εδέσματα κυρίως κρεατικά και ζωμούς [38], καθώς και για τον αρωματισμό του ξυδιού, μέσα στο οποίο τοποθετούνται ανθισμένα κλαδάκια του φυτού. Η φασκομηλιά θεωρείται ως άριστο μελισσοτροφικό φυτό, παρέχοντας εκλεκτής ποιότητας μέλι (Εικόνα 1.3.). Ως καλλυντικό συνιστάται για λιπαρά δέρματα, ως μάσκα για βαθύ καθαρισμό του προσώπου και ως αμύλουτρο. Είναι ευεργετικό στα μαλλιά. Είναι καλό φάρμακο κατά της ατονίας του στομάχου και των εντέρων, αλλά και απολυμαντικό και αποχρεμπτικό σε περίπτωση κρυολογημάτων. Θεωρείται αντιοξειδωτικό, τονωτικό της μνήμης, καταπολεμά τη νωθρότητα και ελπιδοφόρο στη θεραπεία του Alzheimer [39]. Επίσης θεωρείται σπασμολυτικό και αντισηπτικό [40], αιμοστατικό [41], αντιδιαβητικό [42], αντικαρκινικό [43], αντιμικροβιακό [44], αντιμυκητιακό [45,46], αντικό [47], κατά της χοληστερίνης [48], αναστολέας της παγκρεατικής λιπάσης [49].



Εικόνα 1.3. Μέλισσα που απολαμβάνει τους καρπούς του φασκόμηλου.

Στην Κορέα εκχύλισμα της ρίζας της *S. miltiorrhiza* χρησιμοποιείται πολύ συχνά για τη θεραπεία διαφόρων αλλεργιών, αναστέλλει την παραγωγή της ιντερλευκίνης-12 και της ιντερφερόνης- γ δρώντας ευεργετικά στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος [50, 51].

Στην Κίνα υδατικό εκχύλισμα του φυτού αυτού χρησιμοποιείται για πλύσεις του δέρματος και λέγεται ότι θεραπεύει αποστήματα και δοθιήνες. Συνιστάται σε περιπτώσεις φλεγμονής του στόματος και του φάρυγγα. Στο εμπόριο κυκλοφορούν οδοντόπαστες με εκχύλισμα φασκόμηλου (Εικόνα 1.4.).



Εικόνα 1.4. Προϊόντα με βάση το φασκόμηλο στην αγορά.(π.χ. αποσμητικό, κρέμα προσώπου, οδοντόπαστα, είδη περιποίησης σώματος και σαμπουάν)

1.5.4 Παρενέργειες

Έχουν παρατηρηθεί σπάνιες περιπτώσεις δηλητηρίασης από κατάχρηση μεγάλων ποσοτήτων, που οφείλονται στη περιεχόμενη θουγιόνη και καμφορά. Δεν πρέπει να λαμβάνεται καθόλου από επιληπτικά άτομα, γιατί μπορεί να πυροδοτήσει κρίσεις επιληψίας. Επίσης, κατά την περίοδο εγκυμοσύνης απαγορεύεται η χρήση του γιατί προκαλούνται αποβολές. Χαρακτηριστικά συμπτώματα της δηλητηρίασης από φασκόμηλο είναι τοπικοί ερεθισμοί του δέρματος, έντονοι και παρατεταμένης διάρκειας σπασμοί, ακαμψία των άνω άκρων, εκφυλισμός του ήπατος και των νεφρών κ. ά.

Εντούτοις, πρόσφατα στοιχεία δείχνουν ότι ενδεχομένως υπάρχουν σοβαρές αλληλεπιδράσεις μεταξύ μερικών κοινών βοτανών και ευρέως χρησιμοποιούμενων συμβατικών φαρμακευτικών σκευασμάτων, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία των καρδιαγγειακών παθήσεων. Μελέτες παρέχουν αξιόπιστα στοιχεία για αλληλεπίδραση του αντιπηκτικού φαρμάκου βαρφαρίνη και της *S. Miltiorrhiza*, η οποία αυξάνει την αντιπηκτική δράση της βαρφαρίνης και αυξάνεται ο κίνδυνος αιμορραγίας [52]. Επομένως η χρήση των βοτάνων πρέπει να γίνεται με προσοχή από ασθενείς που πάσχουν από καρδιαγγειακές παθήσεις.

1.5.5 Συστατικά του φασκόμηλου.

Το φασκόμηλο ως αρωματικό φυτό εξετάζεται κυρίως για το αιθέριο του έλαιο [46, 53, 54]. Υπάρχουν πολλές αναφορές στη βιβλιογραφία που δίνουν τη χημική του σύσταση, από διάφορα είδη *Salvia*, όταν παραλαμβάνεται με υδραπόσταξη ή απόσταξη με ατμό. Στην πιο πρόσφατη, ανχνεύονται με χρήση της αέριας χρωματογραφίας ή με συνδυασμό αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας 123 συστατικά. Μεταξύ αυτών το α-και β-πινένιο που περιέχονται στο μεγαλύτερο ποσοστό (30 και 14 % αντίστοιχα), ενώ το α- και β- θουγένιο, η ευκαλυπτόλη, η λιναλεόλη, η καμφορά, η βορνεόλη, το α-και β-καρυοφυλλένιο σε πολύ μικρότερα ποσοστά [48].

Εκτενής μελέτη έχει γίνει και στα φαινολικά συστατικά του [48, 55-62]. Σε αυτά περιλαμβάνονται:

1) το καφεϊκό οξύ και τα παράγωγά του, όπως πχ το ροζμαρινικό οξύ, το χλωρογενικό οξύ, το σαλβιανολικό οξύ Α και Β και οι μεθυλεστέρες τους, καθώς και το λιθοσπερμικό οξύ (Σχήμα 1.4). Γλυκοζίτες του *cis* και *trans* κουμαρικού οξέος

2) διάφορα φλαβονοειδή, ελεύθερα ή γλυκοζιδιωμένα, όπως:

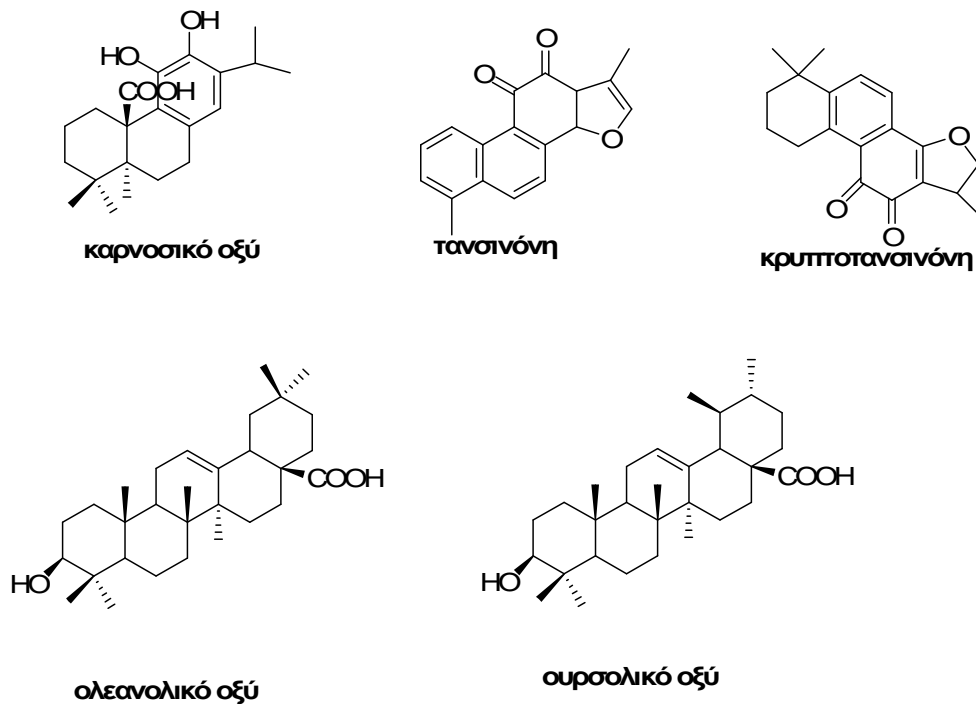
α) 7-O-β- γλυκοζίτες και 3'-O-β- γλυκοζίτες της λουτεολίνης και 6,8-δι-C-γλυκοζίτες της απιγενίνης,

β) μεθυλιωμένα παράγωγα όπως η γκενκβανίνη, ο 7,4'-διμεθυλαιθέρας της απιγενίνης, ο 7-μεθυλαιθέρας της λουτεολίνης και η σαλβιγκενίνη.

3) διτερπένια στα οποία οφείλεται η ελαφριά πικρή γεύση του αφεψημάτος όπως η καρνοσόλη, το καρνοσολικό οξύ και ο μεθυλεστέρας του, η ροζμαδιάλη, η ροζμανόλη, η επιροζμανόλη, η τανσινόνη και η κρυπτοτανσινόνη [63]. Τα περιεχόμενα τριτερπένια έχουν τη δομή του ουρσολικού οξέος και του ολεανολικού οξέος [64].

Στο Σχήμα 1.7. δίνονται μερικά από τα τερπένια που απαντώνται στο φασκόμηλο.

Αν κάποιος, ήθελε να εξετάσει τα περιεχόμενα συστατικά από φαρμακευτική άποψη, θα τα χωρίζε σε δυο μεγάλες ομάδες, στα πολικά και στα μη πολικά συστατικά. Τα μη πολικά θα περιελάμβαναν τις τερπενικές ενώσεις, όπως τις τανσινόνες και τις κρυπτοτανσινόνες, ενώ τα πολικά συστατικά κυρίως τα φαινολικά οξέα. Οι περισσότεροι ερευνητές επικεντρώνονται στα υδατοδιαλυτά φαινολικά οξέα, επειδή το φυτό χρησιμοποιείται για την παρασκευή αφεψημάτων.



Σχήμα 1.7. Τερπένια από είδη Salvia.

1.5.6 Εκχύλιση φαινολικών συστατικών του φασκόμηλου

Η διαλυτότητα των φαινολικών ενώσεων καθορίζεται από τη χημική τους δομή και την πολικότητα του διαλύτη που χρησιμοποιείται και είναι συνήθως δύσκολο να αναπτυχθεί μια πορεία εκχύλισης κατάλληλη για όλες τις φαινολικές ενώσεις που υπάρχουν στο φυτό. Υπάρχουν δύο κύριες μέθοδοι: η εκχύλιση α) με οργανικό διαλύτη [65] και β) με υπερκρίσιμο υγρό διοξειδίου του άνθρακα [66]. Το μη πολικό διοξείδιο του άνθρακα εκχυλίζει μόνο τα λιπόφιλα συστατικά, εκτός αν ασκηθεί υψηλή πίεση [67].

Οι οργανικοί διαλύτες που έχουν χρησιμοποιηθεί σε εργαστηριακή κλίμακα είναι η ακετόνη, το εξάνιο, η μεθανόλη ή η αιθανόλη [68,69]. Μίγμα ακετόνης και νερού είναι καλός διαλύτης για τα πολικά συστατικά [55]. Μίγματα αιθανόλης-νερού φαίνεται να είναι το καλλίτερο σύστημα για την εκχύλιση, τόσο γιατί μπορούν να εκχυλιστούν διαφορετικής πολικότητας ενώσεις, όσο και γιατί είναι συμβατό με την κατανάλωση φαγητού.

Για την εκχύλιση του ροζμαρινικού οξέος και των συστατικών κερνοσικού τύπου (όπως η κερνοσόλη, το κερνοσικό οξύ και ο μεθυλεστέρας του κερνοσικού), οι βέλτιστες συνθήκες μετά την κωνιοποίηση του φυτικού δείγματος, φαίνεται να είναι η χρήση αλκοολικού διαλύματος 69% σε νερό, σε αναλογία διαλύτη-φυτού 6:1 (v/w) και θερμοκρασία 40 °C για 1 ώρα [60].

Όμως και το βραστό νερό έχει χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση των γλυκοζιτών των φλαβονοειδών, ιδιαίτερα όταν αποσκοπείται η απομόνωση των γλυκοζιτικά ενωμένων φλαβονοειδών. Τότε η πορεία απομόνωσης συνδυάζεται με την τεχνική SPE. Χρησιμοποιείται για την SPE μικροστήλη C18 και διαλύτης έκλουσης μεθανόλη [58]. Επίσης, βραστό νερό επί 2 ώρες χρησιμοποιείται για την απομόνωση του σαλβιανολικού οξέος [61].

Όταν το εκχύλισμα του φυτικού ιστού σε μεθανόλη, συνοδεύεται από όξινη υδρόλυση παρουσία υδροχλωρικού οξέος 6M, λαμβάνεται μίγμα προϊόντων όπου τόσο οι γλυκοζιτικοί δεσμοί όσο και οι εστερικοί που υπήρχαν αρχικά στα μόρια έχουν τροποποιηθεί [62].

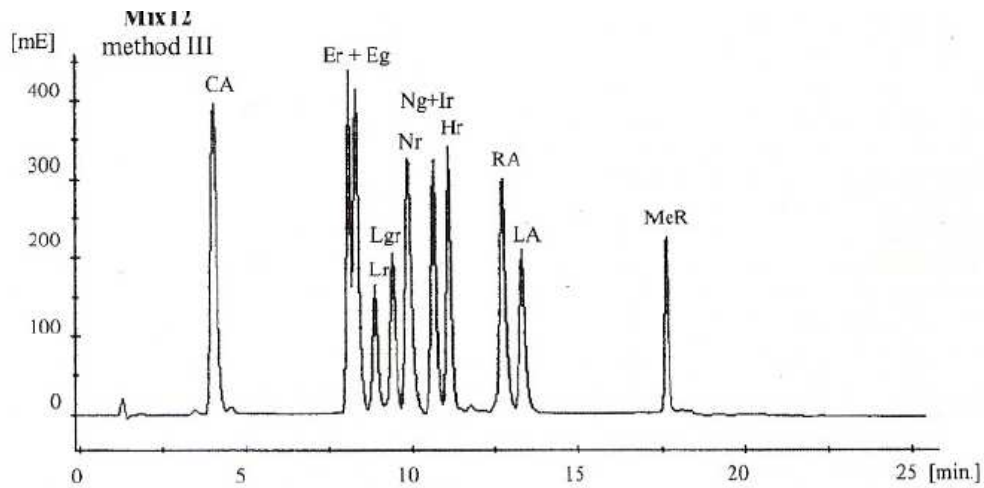
1.5.7 Μέθοδοι ποιοτικής και ποσοτικής ανάλυσης φαινολικών συστατικών του φασκόμηλου

Ενας μεγάλος αριθμός άρθρων ανασκόπησης υπάρχουν στη βιβλιογραφία για την ανάλυση των φαινολικών συστατικών ανάλογα με τη φύση του υλικού και το σκοπό της μελέτης, αν δηλαδή θέλουν να προσδιορίσουν το ολικό φαινολικό περιεχόμενο ή θέλουν να στοχεύσουν μια ειδική ομάδα φαινολικών. Η προσδιοριζόμενη ως περιεχόμενη ποσότητα φαινολικών επηρεάζεται από τη μέθοδο της εκχύλισης, το μέγεθος του φυτικού υλικού, το χρόνο και τις συνθήκες αποθήκευσης, αλλά και τη μέθοδο ανάλυσης που επιλέγεται, τα πρότυπα που χρησιμοποιούνται και την παρουσία ουσιών που αλληλεπιδρούν. Οι πιο συνηθισμένες μέθοδοι ανάλυσης είναι φασματοσκοπικές και χρωματογραφικές.

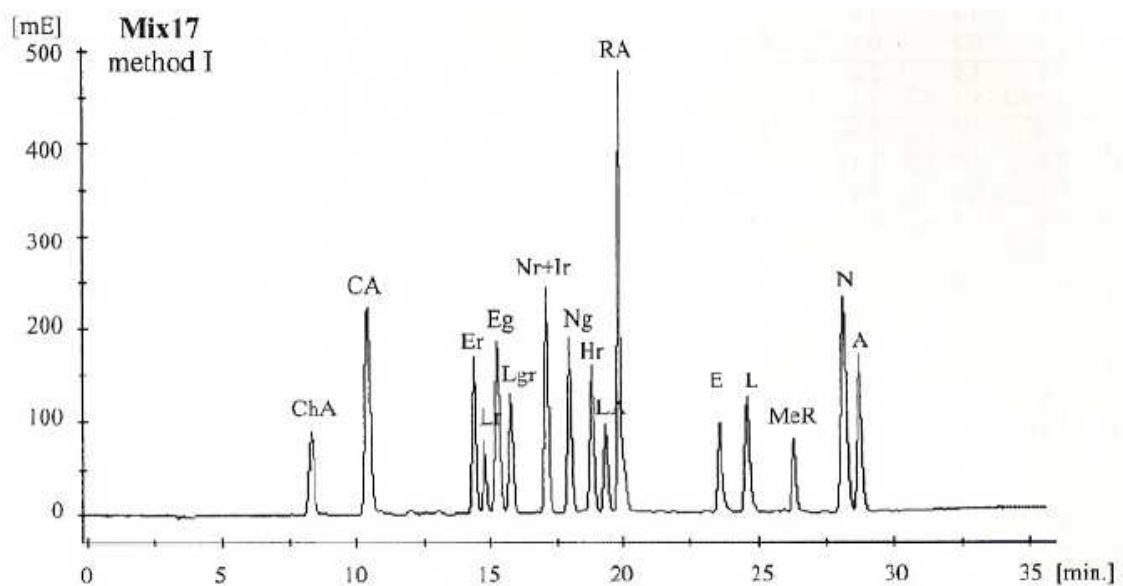
Η ανάλυση με χρωματογραφία HPLC και ανιχνευτή UV είναι και η πιο διαδεδομένη μέθοδος προσδιορισμού, γιατί είναι πολύ ευαίσθητη και εξειδικευμένη, με όριο ανίχνευσης της τάξης των ng. Απαιτείται όμως βαθμονόμηση του οργάνου με πρότυπα διαλύματα, ανιχνεύεται περιορισμένος αριθμός πολυφαινολών και συνήθως χρειάζεται μεγάλη διάρκεια ανάλυσης.

Για τη μελέτη του υδατικού μίγματος προτύπων φαινολικών ενώσεων, όπως το καφεϊκό οξύ, το ροζμαρινικό οξύ, το λιθοσπερμικό οξύ και των γλυκοζιτών της λουτεολίνης και της ναριγκενίνης, στη βιβλιογραφία εφαρμόζεται η χρωματογραφία HPLC με ανιχνευτή UV χρησιμοποιώντας δυο διαφορετικές στήλες, τη Chromolith Performance RP 18e και τη Beta-Basic-18. Στην Chromolith Performance RP 18e στήλη, με προστήλη από το ίδιο πληρωτικό υλικό, σε μήκος κύματος 280 nm, τα υδατοδιαλυτά φαινολικά συστατικά εκλύονται με βαθμιδωτή έκλυση, χρησιμοποιώντας 0.2% μυρμηκικό οξύ σε ακετονιτρίλιο–0.2% μυρμηκικό οξύ σε νερό και το χρωματογράφημα τους φαίνεται στο Σχήμα 1.8. [58]. Στην Beta-Basic-18, το ίδιο μίγμα προτύπων ουσιών εκλύονται με βαθμιδωτή έκλυση, χρησιμοποιώντας 5% μυρμηκικό οξύ σε ακετονιτρίλιο–5% μυρμηκικό οξύ σε νερό και το αντίστοιχο χρωματογράφημα δίνεται στο Σχήμα 1.9..

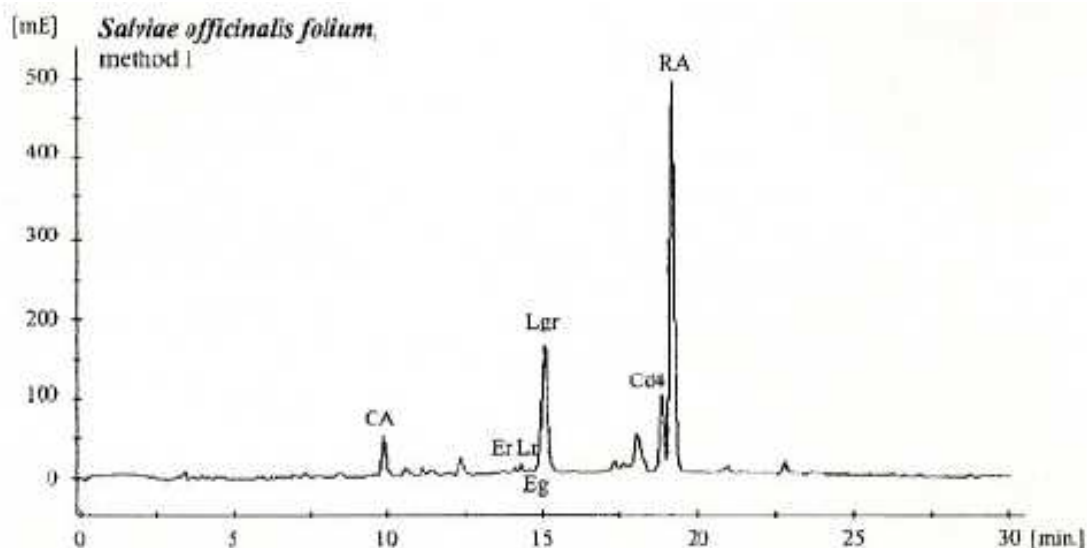
Σύγκριση των δυο χρωματογραφημάτων των Σχημάτων 1.8. και 1.9. δείχνει ότι τα φλαβονοειδή χωρίζονται καλλίτερα στη στήλη Beta-Basic-18. Στο Σχήμα 1.10. δίνεται το χρωματογράφημα υδατικού εκχυλίσματος φασκόμηλου χρησιμοποιώντας τη στήλη Beta-Basic-18 στις ίδιες συνθήκες έκλυσης που αναφέρθηκαν παραπάνω [58].



Σχήμα 1.8. Χρωματογράφημα HPLC μίγματος υδατοδιαλυτών προτύπων φαινολικών ενώσεων σε στήλη Chromolith Performance RP-18. CA: καφεϊκό οξύ, Lr: 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, Lgr: γλουκορονίδιο της λουτεολίνης, Ng: 7-O-γλυκοζίτης της ναριγκενίνης, LA: λιθοσπερμικό οξύ, RA: ροζμαρινικό οξύ, MeR: ροζμαρινικός μεθυλεστέρας [58].



Σχήμα 1.9. Χρωματογράφημα HPLC μίγματος υδατοδιαλυτών προτύπων φαινολικών ενώσεων σε στήλη Beta-Basic-18. CA: καφεϊκό οξύ, Lr: 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, Lgr: γλουκορονίδιο της λουτεολίνης, Ng: 7-O-γλυκοζίτης της ναριγκενίνης, LA: λιθοσπερμικό οξύ, RA: ροζμαρινικό οξύ, L: λουτεολίνη, MeR: ροζμαρινικός μεθυλεστέρας, N: ναριγενίνη, A: απιγενίνη [58].



Σχήμα 1.10. Χρωματογράφημα HPLC υδατικού εκχυλίσματος φασκόμηλου σε στήλη Beta-Basic-18. CA: καφεϊκό οξύ, Lr: 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, Lgr: γλουκορονίδιο της λουτεολίνης, RA: ροζμαρινικό οξύ [58].

Η μέθοδος της HPLC σε στήλη Superspher RP-18 και προστήλη Lichrocart σε συνδυασμό με ανιχνευτή DAD (Diode Array Detector) και γραμμική βαθμιδωτή έκλυση με διαλύτη νερό (pH=2.5) - ακετονιτρίλιο χρησιμοποιείται στην ανάλυση του ροζμαρινικού οξέος και του καρνοσικού οξέος [60].

Με HPLC και ανιχνευτή DAD αναφέρεται και η μελέτη εκχυλίσματος φασκόμηλου, που χρησιμοποιεί αιθανόλη ή και ακετόνη ως εκχυλιστικό υγρό σε συσκευή Soxhlet για 6 ώρες. Σε αυτή την αναφορά χρησιμοποιείται στήλη Nucleosil 100-5 C18, σε συνθήκες βαθμιδωτής έκλυσης με διαλύτη 1% μυρμηκικό οξύ σε νερό – ακετονιτρίλιο [70].

Με HPLC και ανιχνευτή DAD αναφέρεται και η μελέτη της όξινης υδρόλυσης μεθανολικού εκχυλίσματος φασκόμηλου, σε στήλη Sherisorb ODS2 C18 με βαθμιδωτή έκλυση, χρησιμοποιώντας διαλύτη νερό (pH=2.7) - μεθανόλη [62].

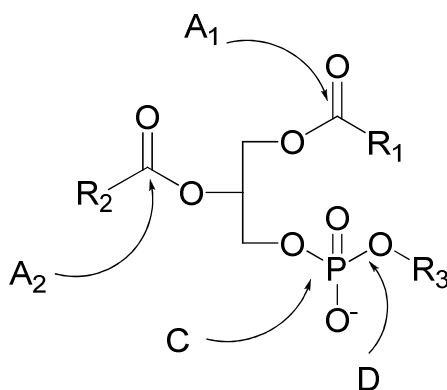
Πρόσφατα αναφέρεται ο καθαρισμός σε μεγάλη κλίμακα του σαλβιανολικού οξέος B, με τη βοήθεια χρωματογραφίας counter-current [61] σε ένα διφασικό σύστημα που περιέχει εξάνιο-οξεϊκό αιθυλεστέρα-μεθανόλη-οξεϊκό οξύ- νερό (1:5:1.5:0.009596:5, v/v). Και στην ίδια αναφορά χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας ψεκασμού ηλεκτρονίων (LC-ESI MS).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΕΣ A₂ ΚΑΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΟΥΣ

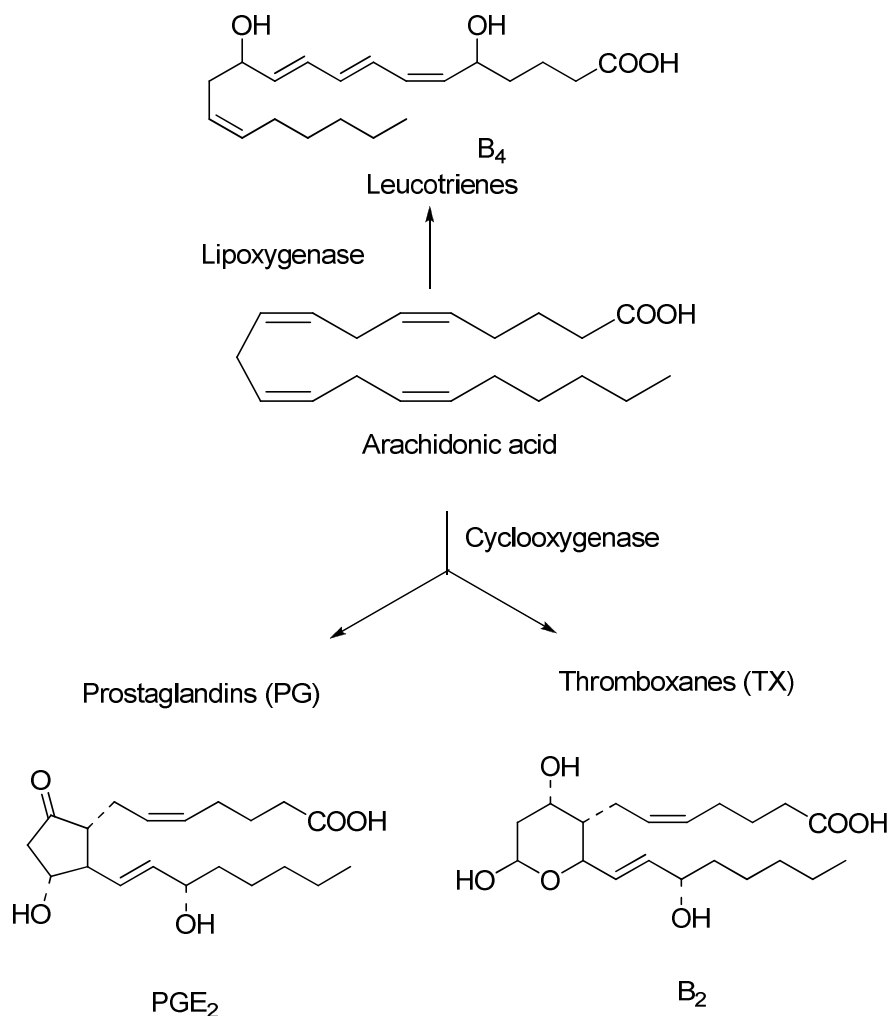
2.1 Εισαγωγή

Οι φωσφολιπάσες είναι ένζυμα τα οποία καταλύουν την υδρόλυση των μεμβρανικών φωσφολιπιδίων. Οι φωσφολιπάσες A₁ και A₂ καταλύουν την υδρόλυση εστερικών δεσμών, ενώ οι φωσφολιπάσες C και D καταλύουν την υδρόλυση φωσφοεστερικών δεσμών. Στο Σχήμα 2.1. υποδεικνύονται τα σημεία δράσης των φωσφολιπασών.



Σχήμα 2.1. Σημεία δράσης των φωσφολιπασών.

Οι φωσφολιπάσες A₂ (PLA₂) είναι εστεράσες που αποτελούν μία από τις μεγαλύτερες οικογένειες των λιπολυτικών ενζύμων. Ως φωσφολιπάσες A₂ χαρακτηρίζονται τα ένζυμα που έχουν την ικανότητα να καταλύουν την υδρόλυση του εστερικού δεσμού στην *sn*-2 θέση των γλυκεροφωσφολιπιδίων των κυτταρικών μεμβρανών απελευθερώνοντας ελεύθερα λιπαρά οξέα και λυσοφωσφολιπίδια [71,72]. *In vivo*, στην *sn*-2 θέση των φωσφολιπιδίων συχνά περιέχονται πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και ιδιαίτερα αραχιδονικό οξύ το οποίο μπορεί να μεταβολιστεί με τη δράση διαφόρων ενζύμων προς διάφορα εικοσανοειδή [73], όπως προσταγλανδίνες, λευκοτριένια κλπ. Από την άλλη πλευρά, τα λυσοφωσφολιπίδια παρουσιάζουν από μόνα τους βιοδραστικότητα συμμετέχοντας σε διάφορες βιολογικές πορείες [74], ενώ μπορούν να μετατραπούν προς τον παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF).



Σχήμα 2.2. Εικοσανοειδή που παράγονται από το αραχιδονικό οξύ.

Η υπεροξειδάση των φωσφολιπιδίων A₂ σήμερα αποτελείται από δεκαπέντε ομάδες και πολλές υποομάδες. Οι διάφορες PLA₂ ταξινομούνται στις ομάδες ανάλογα με την πρωτοταγή αλληλουχία, τη δομή και το καταλυτικό μηχανισμό [71,75]. Ανάλογα με το μηχανισμό της καταλυτικής δράσης οι PLA₂ μπορούν να διακριθούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες : α) τις φωσφολιπάσες A₂ που χρησιμοποιούν την ιστιδίνη ως καταλυτικό αμινοξύ και β) τις φωσφολιπάσες A₂ που χρησιμοποιούν την σερίνη ως καταλυτικό αμινοξύ. Σύμφωνα με μία άλλη κατηγοροποίηση έχουμε τέσσερις τάξεις PLA₂ : α) τις εκκριτικές φωσφολιπάσες A₂ (sPLA₂), β) τις κυτοσολικές φωσφολιπάσες A₂ (cPLA₂), γ) τις ανεξάρτητες Ca²⁺ φωσφολιπάσες A₂ (iPLA₂) και δ) τις φωσφολιπάσες A₂ που σχετίζονται με την λιποπρωτεΐνη (LpPLA₂). Κάθε μία από τις παραπάνω τάξεις PLA₂ εμπλέκεται σε διάφορες βιολογικές πορείες και παίζει διαφορετικό ρόλο σε διαφορετικά κύτταρα.

2.2 Σημασία των αναστολέων των φωσφολιπασών A₂

Τα λιπολυτικά ένζυμα, δηλαδή τα ένζυμα που καταλύουν την υδρόλυση των λιπιδίων, παίζουν βασικούς ρόλους σχεδόν σε όλα τα κύτταρα και τους οργανισμούς παράγοντας μία ποικιλία βιοδραστικών λιπιδίων [76]. Ισχυροί και εκλεκτικοί αναστολείς των λιπολυτικών ενζύμων αποτελούν ιδιαίτερα χρήσιμα εργαλεία για τη διερεύνηση των φυσιολογικών ρόλων αυτών των ενζύμων, αλλά και των μεταβολικών οδών στις οποίες εμπλέκονται [77]. Ειδικότερα, οι αναστολείς των PLA₂ μπορούν να ρυθμίσουν την παραγωγή αραχιδονικού οξέος και μεταβολιτών του αραχιδονικού οξέος, αλλά και των λυσοφωσφολιπιδίων και του PAF. Όλες αυτές όμως οι ενώσεις εμπλέκονται στην φλεγμονή. Επομένως, οι αναστολείς των PLA₂ μπορούν να αποτελέσουν νέα μέσα για την καταπολέμηση διαφόρων φλεγμονωδών ασθενειών που θα παρουσιάζουν νέο μηχανισμό δράσης.

Από το 1990 και μετά, διάφορες φαρμακευτικές εταιρείες αλλά και ακαδημαϊκά εργαστήρια ασχολούνται με την ανακάλυψη αναστολέων της PLA₂ και οι προσπάθειες αυτές συνοψίζονται σε μία σειρά άρθρων ανασκοπήσεως [78-82].

2.3 Εκκριτικές φωσφολιπάσες A₂

Οι εκκριτικές φωσφολιπάσες A₂ ήταν ο πρώτος τύπος φωσφολιπασών που ανακαλύφθηκαν. Από το τέλος το 19^{ου} αιώνα, ήταν γνωστό ότι η PLA₂ αποτελούσε κύριο συστατικό του δηλητηρίου του φιδιού, ενώ αργότερα ανακαλύφθηκε ότι η PLA₂ αποτελούσε συστατικό του παγκρεατικού υγρού. Οι sPLA₂ που προέρχονται από διάφορες πηγές ανήκουν στις ομάδες IA, IB, IIA, IIB, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, IX, X, XIA, XIB, XII, XIII, XIV.[72,75] Η GIIA PLA₂ βρέθηκε σε μεγάλες συγκεντρώσεις στο αρθρικό υγρό ασθενών που υπέφεραν από ρευματοειδή αρθρίτιδα [83]. Έτσι, το αρχικό ενδιαφέρον εστιάστηκε στην GIIA PLA₂ αναγνωρίζοντας ότι αυτή παίζει σπουδαίο ρόλο στην φλεγμονή.

Οι sPLA₂ είναι μικρές εκκριτικές πρωτεΐνες (14-18 kDa) που συνήθως περιέχουν 5-8 δισουλφιδικούς δεσμούς και απαιτούν την παρουσία Ca²⁺ για την καταλυτική υδρόλυση των φωσφολιπιδίων. Δεν παρουσιάζουν εξειδίκευση για ειδικά λιπαρά οξέα στην sn-2 θέση του φωσφολιπιδικού υποστρώματος. Για τον καταλυτικό

μηχανισμό χρησιμοποιούν στο ενεργό τους κέντρο μια ιστιδίνη και ένα ασπαραγινικό οξύ. Πολλές από τις sPLA₂ παρουσιάζουν το φαινόμενο της μεσεπιφανειακής ενεργοποίησης (interfacial activation), που σημαίνει ότι η δραστηριότητα αυξάνεται όταν το υπόστρωμα αποτελείται από λιπιδικά συσσωματώματα σε σχέση με την μονομερική μορφή [84].

Η βιοχημεία και η φυσιολογία των εκκριτικών φωσφολιπασών A₂ έχει παρουσιαστεί σε δύο πρόσφατα άρθρα ανασκόπησης [85, 86]. Διάφορες in vitro μελέτες έχουν δείξει την ικανότητα της GV και της GX sPLA₂, όπως και σε μικρότερο βαθμό της GIIA sPLA₂, να παράγει αραχιδονικό οξύ που μπορεί να μετατραπεί σε εικοσανοειδή σε διάφορα φλεγμονώδη κύτταρα (π.χ. μακροφάγα) [85]. Σε μερικές περιπτώσεις, η δραστηριότητα sPLA₂ φαίνεται να εξαρτάται ή να συνδέεται με την δραστηριότητα της GIVA cPLA₂. Υπάρχουν σημαντικότερες αποδείξεις ότι τουλάχιστον τρεις sPLA₂, η GIIA, η GV και η GX, παρουσιάζουν ποικίλες προαθηρογενείς ιδιότητες στα φλεβικά τοιχώματα [87, 88]. Οι διάφορες sPLA₂ παρουσιάζουν διαφορετική κατανομή στους ανθρώπινους ιστούς, υποδεικνύοντας έτσι διαφορετικούς ρόλους στην παθοφυσιολογία [89]. Σε ένα πρόσφατο άρθρο παρουσιάζεται ξεκάθαρα ότι η GX sPLA₂ εμπλέκεται στη φλεγμονή υποδεικνύοντας ότι αυτό το ένζυμο αποτελεί ένα νέο θεραπευτικό στόχο για την καταπολέμηση του άσθματος [90].

2.4 Κυτοσολικές φωσφολιπάσες A₂

Οι κυτοσολικές φωσφολιπάσες A₂ είναι μεγάλες πρωτεΐνες με ποικίλο μέγεθος (61-114 kDa) οι οποίες δεν έχουν δισουλφιδικά δίκτυα παρόμοια με εκείνα των εκκριτικών PLA₂. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι ομάδες IVA, IVB, IVC, IVD, IVE και IVF. Το πρώτο κυτοσολικό ένζυμο GIVA απομονώθηκε από ανθρώπινα αιμοπετάλια το 1986 [91] και κλωνοποιήθηκε το 1991 [92, 93]. Το περισσότερο καλά χαρακτηρισμένο ένζυμο αυτής της κατηγορίας είναι η GIVA cPLA₂, η οποία παρουσιάζει προτίμηση για την υδρόλυση του αραχιδονικού οξέος στην sn-2 θέση των φωσφολιπιδίων.

Οι ιδιότητες της ομάδος GIVA PLA₂ έχουν συνοψιστεί σε άρθρο ανασκόπησης [94]. Η δομή της GIVA PLA₂ αποτελείται από μία C2 περιοχή πρόσδεσης λιπιδίου που εξαρτάται από Ca²⁺ και την καταλυτική περιοχή α/β

υδρολάσης [95]. Η καταλυτική περιοχή αποτελείται από την περιοχή α/β υδρολάσης που συναντάται σε πολλές διαφορετικές λιπάσες, όπως επίσης και από μια περιοχή «σκέπασμα», η οποία σκεπάζει το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Η πρόσδεση Ca^{2+} σε αυτό το ένζυμο δεν απαιτείται για την κατάλυση, όπως συμβαίνει στα ένζυμα sPLA₂, αλλά είναι απαραίτητη για τη μεταφορά του ενζύμου στην επιφάνεια της μεμβράνης. Το ένζυμο χρησιμοποιεί μια ασυνήθιστη καταλυτική διάδα Ser-Asp η οποία βρίσκεται σε ένα βαθύ τούνελ στο κέντρο ενός υδροφοβικού χωνίου. Ο καταλυτικός μηχανισμός της GIVA PLA₂ περιλαμβάνει το σχηματισμό ενός σερίνο-άκυλο ενδιάμεσου χρησιμοποιώντας τη σερίνη-228 ως πυρηνόφιλο [96, 97].

Η GIVA PLA₂ σήμερα γενικά θεωρείται ως το κεντρικό ένζυμο το οποίο παράγει ποικίλους λιπιδικούς μεσολαβητές, συμπεριλαμβανομένων των εικοσανοειδών, που είναι υπεύθυνο για τον πόνο και την φλεγμονή. Παίζει δηλαδή, κυρίαρχο ρόλο στις φλεγμονώδεις ασθένειες. Αυτό έχει αποδειχθεί και με την χρήση γενετικά τροποποιημένων ποντικών που στερούνται της GIVA PLA₂. Τέτοιου είδους πειραματόζωα παρουσιάζουν εξαιρετική μείωση σε αλλεργική αντίδραση, σε καταστροφή από οξύ τραυματισμό του πνεύμονος και σε μετισταμικό τραυματισμό εγκεφάλου [98-100].

Η αναγνώριση της μεγάλης σημασίας της GIVA PLA₂ στη φλεγμονή έχει καταστήσει αυτό το ένζυμο πολύ ελκυστικό στόχο για την ανακάλυψη νέων φαρμάκων. Πολλά διαφορετικά εργαστήρια, είτε σε φαρμακευτικές βιομηχανίες είτε σε πανεπιστημιακά ερευνητικά κέντρα, εργάζονται πυρετωδώς για την ανάπτυξη νέων αναστολέων και τη μελέτη τους σε ποικίλες *in vitro* και *in vivo* δοκιμασίες.

2.5 Φωσφολιπάσες A₂ ανεξάρτητες Ca^{2+}

Η GVIA PLA₂ είναι στην πραγματικότητα μια ομάδα κυτοσολικών ενζύμων που το μεγεθός τους ποικίλει (85 έως 88 kDa) [101]. Σε αυτή την κατηγορία περιλαμβάνονται έξι διαφορετικοί τύποι, οι GVIA, GVIB, GVIC, GVID, GVIE και GVIF. Το πρώτο μέλος αυτής της οικογένειας, η GVIA PLA₂, απομονώθηκε το 1994 από μακροφάγα [102] και είναι το καλύτερα χαρακτηρισμένο ένζυμο αυτής της κατηγορίας.

Η GVIA iPLA₂ είναι ένα ένζυμο που περιέχει ένα κλασσικό μοτίβο λιπασών, Gly-Thr-Ser*-Thr-Gly, όπου η καταλυτική σερίνη έχει επιβεβαιωθεί με

μεταλλαξιογέννεση (site-directed mutagenesis). Αν και παρουσιάζει τον ίδιο καταλυτικό μηχανισμό με τη GIVA cPLA₂, δεν παρουσιάζει εξειδίκευση για αραχιδονικό οξύ στην sn-2 θέση του υποστρώματος.

Πρόσφατα άρθρα ανασκόπησης συζητούν το ρόλο της GVIA PLA₂ στη μεταγωγή σημάτων και σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, όπως για παράδειγμα στο καρκίνο και στην ισχαιμία [103-106]. Η GIVA iPLA₂ είχε αρχικά προταθεί ως ένζυμο που παίζει ρόλο στην ομοιόσταση και στο βασικό μεταβολισμό εντός του κυττάρου. Όμως, ένας αριθμός μελετών υποδεικνύει ότι η GIVA iPLA₂ παίζει επίσης σπουδαίο ρόλο σε διάφορα κύτταρα, ο οποίος ρόλος μπορεί να διαφέρει από κύτταρο σε κύτταρο.

2.6 Φωσφολιπάση A₂ που σχετίζεται με λιποπρωτεΐνη

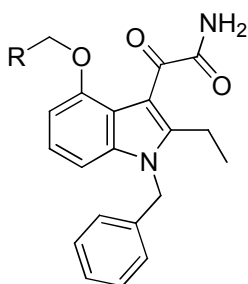
Η φωσφολιπάση A₂ που σχετίζεται με λιποπρωτεΐνη (LpPLA₂) είναι επίσης γνωστή ως ακετυλοϋδρολάση του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF-AH) ή ως ομάδα VIIA σύμφωνα με την ονοματολογία του Dennis. [1,2] Ονομάζεται έτσι λόγω της ιδιότητας της να υδρολύει την ακέτυλο ομάδα από την sn-2 θέση του PAF, όπως επίσης και λόγω της σχέσης της με λιποπρωτεΐνες. Αυτό το ένζυμο μπορεί επίσης να υδρολύει οξειδωμένα λιπίδια μήκους έως 9 ανθρακοατόμων από την sn-2 θέση. Η LpPLA₂ είναι ένα εκκριτικό ένζυμο το οποίο υδρολύει υποστρώματα στην υδατική φάση σε αντίθεση με όλες τις άλλες PLA₂.

Η βιολογία της LpPLA₂ και η σχέση της με τις καρδιαγγειακές παθήσεις συζητάται σε ένα πολύ πρόσφατο άρθρο ανασκόπησης [107]. Η LpPLA₂ έχει ως καταλυτική τριάδα Ser-His-Asp, η οποία συμμετέχει στον καταλυτικό μηχανισμό [108], και δεν απαιτεί Ca²⁺ για την δράση της. Κλωνοποιήθηκε από ανθρώπινο πλάσμα το 1995 και αρχικά φάνηκε να έχει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες *in vivo* [109]. Όμως, οι πιο πρόσφατες μελέτες έχουν υποδείξει ότι τα επίπεδα της LpPLA₂ αποτελούν δείκτη για την εκδήλωση καρδιαγγειακών παθήσεων [110].

2.7 Αναστολείς της εκκριτικής φωσφολιπάσης A₂

Οι πρώτες έρευνες για την ανακάλυψη αναστολέων PLA₂ εστίαστηκαν στους αναστολείς της εκκριτικής PLA₂. Οι φαρμακευτικές εταιρίες Eli Lilly και Shionogi

εργάστηκαν εκτεταμένα σε αυτό τον τομέα και ανακάλυψαν τον ισχυρό αναστολέα που βασίζεται σε ινδόλιο varespladib [111] (Σχήμα 2.3., **1**). Ο αναστολέας αυτός εισήχθη σε κλινικές δοκιμές κατά της σηψαιμίας. Στο τέλος της φάσης I, το varespladib βρέθηκε να είναι ασφαλές σε ασθενείς με σηψαιμία. [112,113] Όμως, στην φάση II δεν φάνηκε αποτελεσματικό και οι κλινικές δοκιμές τερματίστηκαν.



- 1** R = COOH (A-001, Varespladib)
2 R = COOCH₃ (A-002)

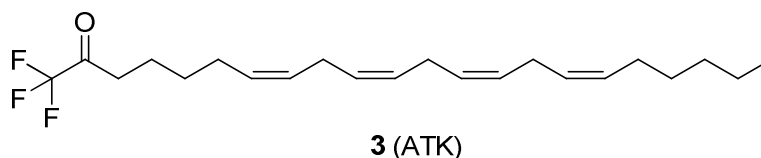
Σχήμα 2.3. Αναστολείς που βασίζονται σε ινδόλιο.

Εν το μεταξύ, βρέθηκε ότι οι ομάδες ΙΙΑ, V και X sPLA₂ υπερεκφράζονταν στις αθηροσκληρωτικές βλάβες πειραματοζώων και ανθρώπων. Κάθε μία από τις τρεις sPLA₂ συνεισφέρουν διαφορετικά στην αθηρογένεση και η GIIA sPLA₂ φαίνεται ότι παίζει τον σπουδαιότερο ρόλο [114]. Η εταιρία Anthera Pharmaceuticals έδειξε ότι ο αναστολέας της sPLA₂ varespladib όπως και ενώσεις παρόμοιας δομής (Σχήμα 2.3.) μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την καταπολέμηση καρδιαγγειακών παθήσεων [115]. Η ένωση **2** είναι ο μεθυλεστέρας του varespladib, ο οποίος ουσιαστικά δρά ως προφάρμακο το οποίο υδρολύεται *in vivo* για να απελευθερώσει το varespladib. Η χορήγηση τέτοιων αναστολέων sPLA₂ βρέθηκε να μειώνει τα επίπεδα χοληστερίνης, το σχηματισμό της αθηροσκληρωτικής πλάκας και του αορτικού ανευρίσματος. Επίσης, όταν αυτοί οι αναστολείς της sPLA₂ χορηγήθηκαν μαζί με στατίνες και βρέθηκε ότι δρουν με συνεργιστικό τρόπο [115]. Αν και οι υπάρχουσες επιδημιολογικές μελέτες για τον ρόλο της sPLA₂ στην αθηροσκλήρωση δεν είναι τόσο εκτεταμένες όσο οι μελέτες για την LpPLA₂, και οι δύο τύποι PLA₂ αποτελούν στόχους για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων για την θεραπεία καρδιαγγειακών παθήσεων [116].

Ο Gelb και οι συνεργάτες του μελέτησαν ποικίλους αναστολείς για την εκλεκτικότητα τους έναντι GI, GII, GV, GX και GXII sPLA₂ που προέρχονταν από άνθρωπο και από ποντικό [117]. Έτσι, ανακάλυψαν έναν ισχυρό και εκλεκτικό αναστολέα της GX sPLA₂ που βασίζεται σε ινδόλιο, ειδικό αναστολέα για GIIA sPLA₂, καθώς και ένα υποκατεστημένο 6,7-βενζοϊνδόλιο που αναστέλλει σχεδόν όλες τις sPLA₂ σε συγκεντρώσεις nM [118].

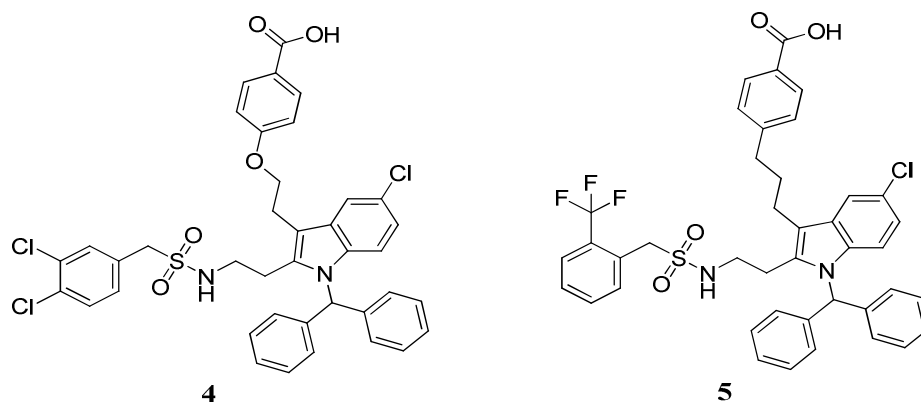
2.8 Αναστολείς της κυτοσολικής φωσφολιπάσης A₂

Ο πρώτος αναστολέας της GIVA cPLA₂ ήταν ένα ανάλογο του αραχιδονικού οξέος (Σχήμα 2.4., **3**), όπου το καρβοξύλιο είχε αντικατασταθεί από την ομάδα τριφθορομέθυλοκετόνης [119].



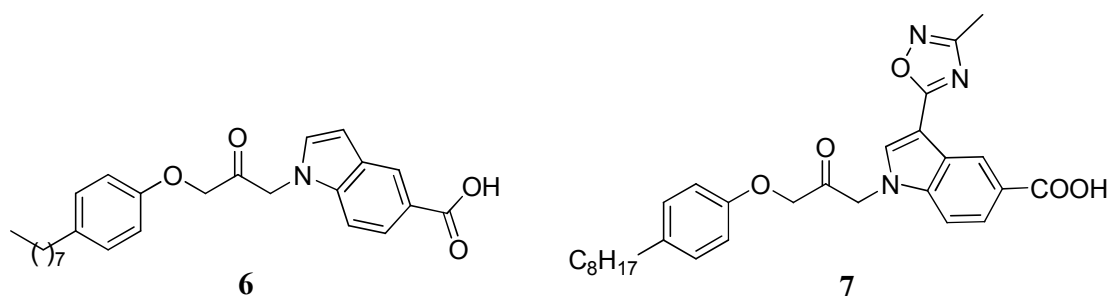
Σχήμα 2.4. Δομή της αραχιδονύλο τριφθορομέθυλο κατόνης.

Η φαρμακευτική εταιρία Wyeth έχει ένα μακροχρόνιο πρόγραμμα για την ανακάλυψη νέων αναστολέων cPLA₂ και τη μελέτη των εφαρμογών τους ως νέα φάρμακα για την καταπολέμηση φλεγμονοδών ασθενειών [120-124]. Παράδειγμα τέτοιων ενώσεων αποτελούν οι ενώσεις **4** και **5** (Σχήμα 2.5.). Οι αναστολείς αυτοί βασίζονται σε ένα δακτύλιο ινδολίου ο οποίος είναι υποκατεστημένος από μία βενζυδρύλο ομάδα. Επιπλέον, αυτά τα παράγωγα φέρουν υποκαταστάτες που συμπεριλαμβάνουν ένα ελεύθερο καρβοξύλιο και μια σουλφοναμίδική ομάδα. Οι αναστολείς αυτοί έχουν μελετηθεί κατά διαφόρων φλεγμονοδών ενδείξεων και μερικοί από αυτούς βρίσκονται σε φάση I κλινικών δοκιμών.



Σχήμα 2.5. Αναστολείς της GIIA cPLA₂ που βασίζονται σε ινδόλιο.

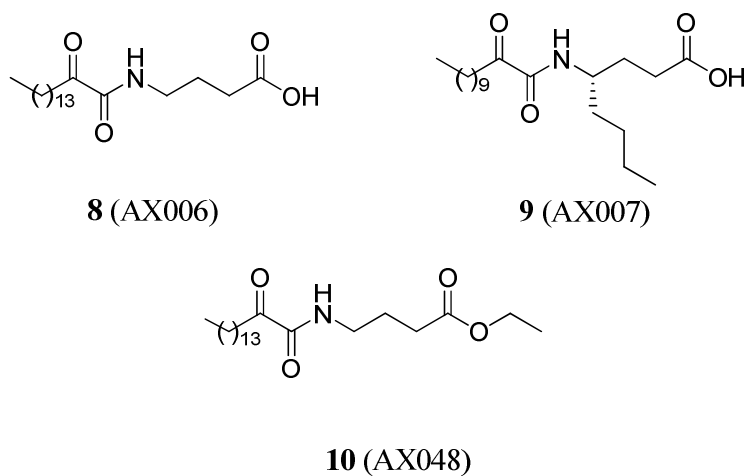
Η ομάδα του Lehr έχει παρουσιάσει ισχυρούς αναστολείς της sPLA₂ με δομές που βασίζονται στον σκελετό προπαν-2-όνης [125, 126], παραδείγματα τέτοιων αναστολέων είναι οι ενώσεις **6** και **7** (Σχήμα 2.6.).



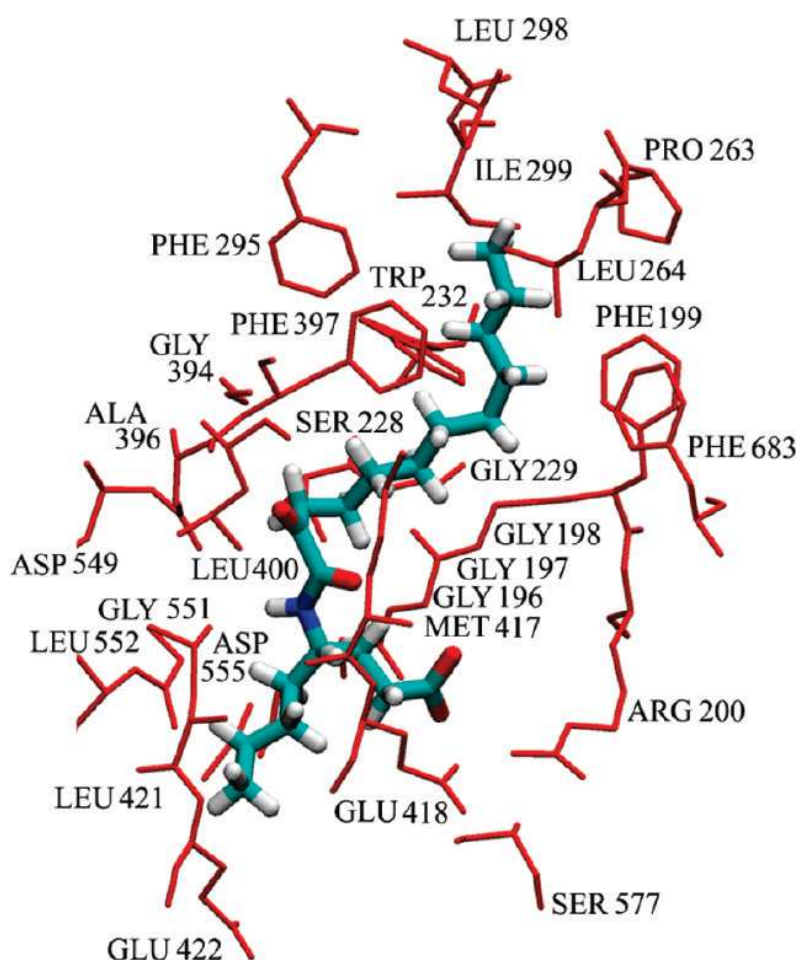
Σχήμα 2.6. Αναστολείς της GIVA cPLA₂ που βασίζονται σε προπαν-2-όνη.

Μια σημαντική κατηγορία αναστολέων της GIVA cPLA₂ είναι οι 2-οξοαμιδικοί αναστολείς που βασίζονται σε μη φυσικά αμινοξέα [127-133]. 2-Οξοαμίδια που φέρουν ελεύθερο καρβοξύλιο, όπως οι ενώσεις **8** και **9** (Σχήμα 2.7.) είναι ισχυροί και εκλεκτικοί αναστολείς της GIVA cPLA₂, που παρουσιάζουν ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση, ίση ή και μεγαλύτερη του φαρμάκου αναφοράς ίνδομεθακίνη [130]. Το 2-οξοαμιδικό παράγωγο **10** που βασίζεται στον αιθυλεστέρα γ-αμινοβουτυρικού οξέος αναστέλει όχι μόνο την GIVA cPLA₂, αλλά και την GVIA iPLA₂. Ο αναστολέας αυτός έχει μελετηθεί σε πειραματόζωα και έχει δείξει ισχυρή δράση κατά της υπεραλγείας, ενώ συγχρόνως βρέθηκε ικανός να μπλοκάρει την απελευθέρωση προσταγλανδίνης PGE₂ στο νοτιαίο μυελό [128]. Σε πολύ πρόσφατη

εργασία παρουσιάζεται το μοντέλο αλληλεπίδρασης του αναστολέα AX007 με το ενεργό κέντρο της GIVA cPLA₂ (Σχήμα 2.8.) [133].

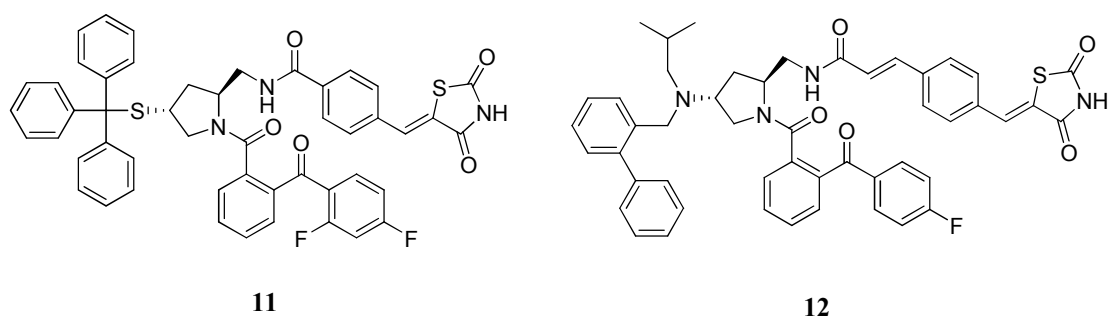


Σχήμα 2.7. 2-Οξοαμιδικοί αναστολείς της GIVA cPLA₂



Σχήμα 2.8. Μοντέλο αλληλεπίδρασης του αναστολέα AX007 με το ενεργό κέντρο της GIVA cPLA₂.

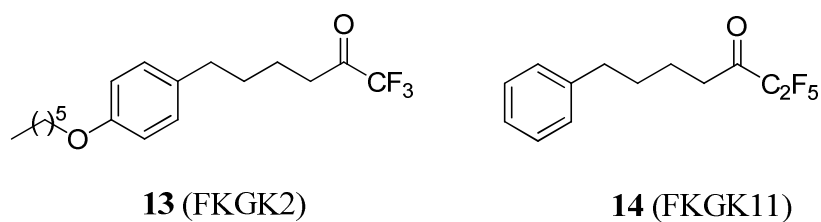
Η φαρμακευτική εταιρία Shionogi έχει αναπτύξει αναστολείς πολύπλοκης δομής που βασίζονται σε δακτύλιο πυρρολιδίνης και περιέχουν διάφορους υποκαταστάτες συμπεριλαμβανομένου του δακτυλίου θειαζολιδινεδιόνης [134-136]. Οι ενώσεις **11** και **12** (Σχήμα 2.9.) αποτελούν ισχυρότατους αναστολείς της GIVA cPLA₂.



Σχήμα 2.9. Αναστολείς της GIVA cPLA₂ που βασίζονται σε πυρρολιδίνη.

2.9 Αναστολείς της ανεξάρτητης Ca²⁺ φωσφολιπάσης A₂

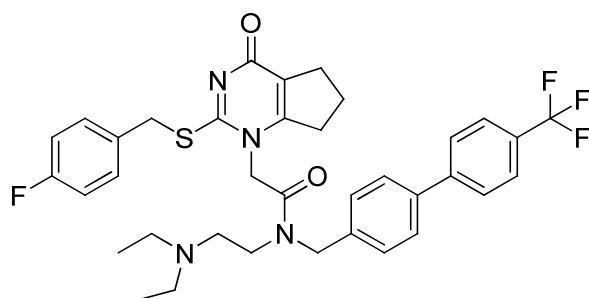
Η αραχιδονυλοτριφθορομέθυλο κετόνη, που αρχικά είχε αναπτυχθεί ως αναστολέας της GIVA cPLA₂, βρέθηκε ότι αναστέλλει και την ανεξάρτητη Ca²⁺ φωσφολιπάση A₂. Στην προσπάθεια εύρεσης εκλεκτικών αναστολέων της GVIA iPLA₂, σχεδιάστηκε και συνθέθηκε μια σειρά πολυφθόρο κετονών και μελετήθηκε η δράση αυτών των ενώσεων έναντι PLA₂ [137]. Βρέθηκε, ότι η ένωση **13** αναστέλλει ισχυρά τόσο την GVIA iPLA₂ όσο και την GIVA cPLA₂. Όμως, η ένωση **14** αποτελεί ισχυρό και εκλεκτικό αναστολέα της GVIA iPLA₂. Και οι δύο αυτοί αναστολείς αποτελούν χρησιμότερα εργαλεία για την κατανόηση του ρόλου των διαφόρων PLA₂ τόσο σε κυτταρικές μελέτες όσο και σε μελέτες με πειραματόζωα [138,139]. Ειδικότερα, ο αναστολέας **14** παρουσιάζει θεραπευτική δράση κατά της πειραματικής αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας (EAE), υποδεικνύοντας ότι η GVIA iPLA₂ αποτελεί νέο στόχο για την ανάπτυξη θεραπείας κατά της σκλήρυνσης πλάκας [139].



Σχήμα 2.10. Φθοροκετονικοί αναστολείς της GVIA iPLA₂.

2.10 Αναστολείς της φωσφολιπάσης A₂ που σχετίζεται με τη λιποπρωτεΐνη

Το 2000 η φαρμακευτική εταιρία Smithkline Beecham παρουσίασε μια σειρά από πυριμιδιν-4-όνες που αναστέλλουν την LpPLA₂ και μπορούν να δράσουν ως μέσα για την καταπολέμηση της αθηροσκλήρυνσης [140]. Ανάμεσα σε αυτές τις ενώσεις ο αναστολέας darapladib (ένωση 15, Σχήμα 2.11.) επιλέχθηκε για κλινικές δοκιμές. Η δράση του darapladib στη μείωση της δραστηριότητας της LpPLA₂ του πλάσματος και στη μεταβολή καρδιαγγειακών βιοδεικτών μελετήθηκε σε διάφορες ομάδες ασθενών υποδεικνύοντας την ευεργετική επίδραση του αναστολέα της LpPLA₂ σε καρδιαγγειακές παθήσεις [141].



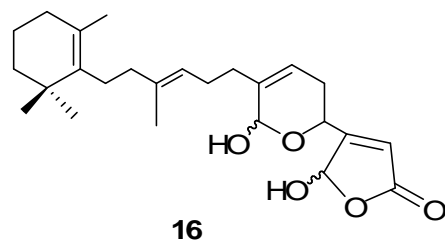
15 (SB 480848, Darapladib)

Σχήμα 2.11. Δομή του αναστολέα darapladib.

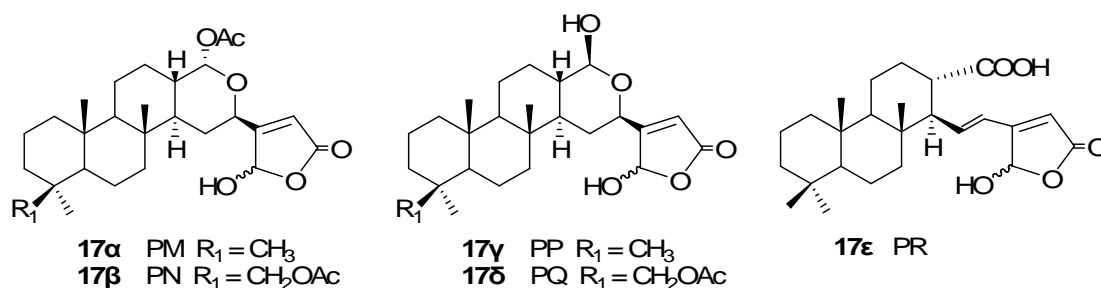
2.11 Φυσικά προϊόντα ως αναστολείς της εκκριντικής φωσφολιπάσης A₂

Ο πρώτος αναστολέας που αναφέρθηκε στη βιβλιογραφία το 1980 για κάποιο τύπο PLA₂, ήταν ένα φυσικό προϊόν θαλάσσιας προέλευσης, το μονοαλίδιο [142]. Η ένωση αυτή (**16**, Σχήμα 2.12.) ανήκει στα σεστετερόνια, περιέχει το δακτύλιο γ-

υδροξυβουτενολιδίου, παρουσιάζει ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση και απετέλεσε ένωση αναφοράς για βιοδραστικά φυσικά προϊόντα. Από τότε, έχουν απομονωθεί διάφορα άλλα μόρια με σχετική δομή, όπως το σεκο-μανοαλίδιο [143], λουφαριελλολίδια [144], λουφαριελλίνες [145], λουφολίδιο [146], κακοσπογγκιονολίδια [147] και πρόσφατα τα πετροσασπονγκιολίδια M-R [148] που παρουσιάζουν μη αντιστρεπτή αναστολή της sPLA₂. Ανάμεσα σε αυτές τις ενώσεις το πετροσασπονγκιολίδιο M (PM, **17**, Σχήμα 2.12.) αναστέλλει την PLA₂ από δηλητήριο μέλισσας με τιμή IC₅₀ 0.6 μM, ισχυρότερα δηλαδή από το μανοαλίδιο που παρουσιάζει κάτω από τις ίδιες συνθήκες IC₅₀ 7.5 μM [148]. Η μοριακή βάση της αναστολής της sPLA₂ από το πετροσασπονγκιολίδιο M έχει μελετηθεί και έχει βρεθεί ότι συμβαίνει αντίδραση ανάμεσα στην sPLA₂ και το δακτύλιο γ-υδροξυβουτενολιδίου [149]. Η μελέτη για το μηχανισμό αναστολής της PLA₂ από τα πετροσασπονγκιολίδια M-R (Σχήμα 2.13.) συνεχίστηκε [150] και βρέθηκε ο τρόπος πρόσδεσης του πετροσασπονγκιολιδίου M με την ανθρώπινη GIIA sPLA₂ [151]. Έχει, επίσης μελετηθεί η αλληλεπίδραση του πετροσασπονγκιολιδίου R με την PLA₂ από δηλητήριο μέλισσας [152].

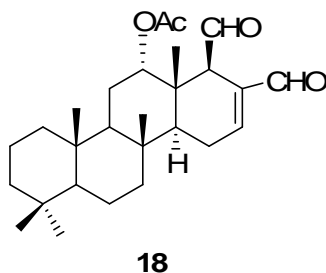


Σχήμα 2.12. Χημική δομή του μανοαλιδίου (**16**).



Σχήμα 2.13. Χημική δομή των πετροσασπονγκιολιδίων M-R (**17α-ε**).

Ένα άλλο θαλάσσιο προϊόν που έχει βρεθεί να αναστέλλει την GIIA και GIII sPLA₂ με ισχύ τουλάχιστον συγκρίσιμη προς αυτή του μανοαλιδίου και του πετροσασπονγκιολιδίου M είναι το σκαλαραντιάλ [153] (**18**, Σχήμα 2.14.). Το σκαλαραντιάλ είναι σεσσετερπένιο που περιέχει σύστημα 1,4-διαλδεύδης, έχει απομονωθεί από τον σπόνγκο *Cacospongia mollior* και έχει δείξει αντιφλεγμονώδη δράση [154].



Σχήμα 2.14 Χημική δομή του σκαλαραντιάλ (**18**).

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει αυξημένο ενδιαφέρον για την αναστολή της PLA₂ από φαινολικές ενώσεις. Αρχικά, δείχθηκε ότι η κερκετίνη μπορεί να αναστέλλει την PLA₂ σε κλίμακα μM [155]. Πρόσφατα έγινε προσπάθεια να μελετηθεί ο μηχανισμός αναστολής της ανθρώπινης εκκριτικής PLA₂ από ορισμένα φλαβονοειδή με μοριακή μοντελοποίηση [156]. Ειδικότερα, μελετήθηκε η κερκετίνη και η ναριγενίνη και η πιθανότητα σχεδιασμού νέων φαρμάκων βασισμένων σε αυτά τα φυσικά προϊόντα. Επίσης, έχει ανακοινωθεί η σύνθεση διφλαβονοειδών και η επίδραση τους σε PLA₂ [157,158].

Πολύ πρόσφατα ανακοινώθηκε η μελέτη μοριακής μοντελοποίησης της αναστολής της PLA₂ από πολυυδροξυ- φαινολικές ενώσεις [159]. Η 7-υδροξυκουμαρίνη βρέθηκε ότι αναστέλλει τη δράση της sPLA₂ που απομονώθηκε από δηλητήριο *Crotalus durissus collilineatur* [160]. Τέλος, το ολεανολικό οξύ αναφέρθηκε ότι αναστέλλει την sPLA₂ και παρουσιάζει αντιφλεγμονώδη δράση [161].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ

3.1 Βασικές αρχές μοριακής μοντελοποίησης

Για να βρεθεί η σταθερότερη ενεργειακά διαμόρφωση μιας ένωσης όταν είναι γνωστή η χημική δομή της, σχεδιάζεται η τρισδιάστατη δομή της και ελαχιστοποιείται η ενέργεια κάνοντας χρήση μοριακή μηχανικής ή κβαντικής μηχανικής. Οι ενδιαφέρουσες πληροφορίες που λαμβάνονται σε μία ελαχιστοποιημένη χημική δομή περιλαμβάνουν :

- * Το μήκος των δεσμών των ατόμων
- * Τη γωνία των δεσμών των ατόμων
- * Τις διέδρες γωνίες
- * Τις μη δεσμικές αλληλεπιδράσεις

3.2 Μέθοδοι υπολογισμού

Για την κατανόηση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των μορίων είναι αναγκαίος ο προσδιορισμός της τρισδιάστατης δομής τους. Η ακριβής προσομοίωση της τρισδιάστατης δομής των μορίων απαιτεί τον υπολογισμό της ενέργειας του συστήματος και υπάρχουν δύο διαφορετικές πορείες για τον υπολογισμό της ενέργειας ενός μορίου. Η πρώτη πορεία γίνεται με τη βοήθεια της **κβαντικής μηχανικής**. Στη θεώρηση αυτή οι πυρήνες των ατόμων του μορίου διευθετούνται στο χώρο και τα αντίστοιχα ηλεκτρόνια διασκορπίζονται σε όλο το σύστημα. Η ηλεκτρονιακή πυκνότητα υπολογίζεται με επίλυση της εξίσωσης Schrödinger. Η δεύτερη πορεία γίνεται με το μαθηματικό μοντέλο που είναι γνωστό ως **μοριακή μηχανική**. Στο μαθηματικό μοντέλο αυτό αγνοούνται τα ηλεκτρόνια και υπολογίζεται η ενέργεια του συστήματος μόνο από τις θέσεις των πυρήνων. Στην συνέχεια είναι δυνατό να υπολογιστεί ο ηλεκτρονιακός παράγοντας από την δυναμική ενέργεια [162].

3.3 Κβαντομηχανική (Quantum Mechanics)

Οι κβαντομηχανικοί υπολογισμοί είναι κατάλληλοι για τον υπολογισμό :

- Της διπολικής ροπής.
- Των ενεργειών των μοριακών τροχιακών και των συντελεστών τους.
- Των ατομικών φορτίων που υπολογίζονται από τους συντελεστές των μοριακών τροχιακών.
- Της ενέργειας διάσπασης των δεσμών.

Χαρακτηρίζονται από μεγάλη ακρίβεια και απαιτούν μεγάλη χρονική διάρκεια να διεκπεραιωθούν.

3.4 Μοριακή Μηχανική (Molecular Mechanics)

Η Μοριακή Μηχανική εξελίχθηκε λόγω της ανάγκης να περιγραφούν οι μοριακές δομές και οι ιδιότητες τους καθώς και πολυπλοκότερα και μεγάλου μοριακού βάρους συστήματα ώστε να ελαττωθεί σημαντικά ο υπολογιστικός χρόνος. Η δυνατότητα εφαρμογής της μεθόδου εστιάζεται σε :

- Μόρια που αποτελούνται από πολλά άτομα.
- Οργανικές ουσίες π.χ ολιγονουκλεοτίδια, πεπτίδια και σακχαρίτες (ακόμα και οργανομεταλλικές ουσίες).
- Μόρια σε περιβάλλον υδάτινο, οργανικό ή και ακόμη σε περιβάλλον που προσομοιώνει το βιολογικό (π.χ. φωσφολιπιδικές διπλοστιβάδες).
- Θερμοδυναμικές και κινητικές ιδιότητες.

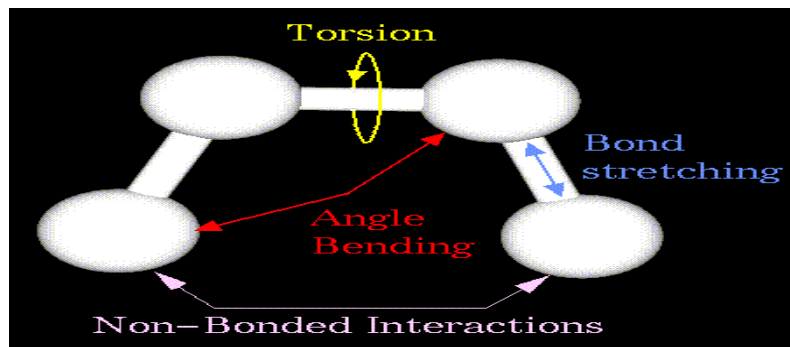
Οι βασικές αρχές της Μοριακής Μηχανικής συνοψίζονται ως εξής :

- Οι πυρήνες και τα ηλεκτρόνια μαζί θεωρούνται ως σφαιρικά σωματίδια με συγκεκριμένη θεωρητική ακτίνα και ενέργεια.
- Οι αλληλεπιδράσεις των ατόμων μεταξύ τους βασίζονται στην κλασική φυσική περί ελατηρίων (νόμος Hooke).
- Οι αλληλεπιδράσεις είναι προκαθορισμένες για συγκεκριμένα άτομα.

- Οι αλληλεπιδράσεις καθορίζουν τη χωρική διάταξη και κατ' επέκταση την ενέργεια του συστήματος.

Σημειώνεται ότι οι αρχές αυτές προσπαθούν να ερμηνεύσουν τις μοριακές αλληλεπιδράσεις με ένα προσιτό και πρακτικό τρόπο και πως διαφέρουν πλήρως από τις αρχές της Κβαντικής Μηχανικής η οποία είναι εξαιρετικά δύσκολο έως αδύνατο να εφαρμοσθεί σε ένα τέτοιο ευρύ πεδίο.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στη Μοριακή Μηχανική θεωρούνται τα άτομα ως σφαίρες διαφορετικού μεγέθους και τους δεσμούς ως ελατήρια. Έτσι, από την κλασική μηχανική δίνεται η δυνατότητα να περιγραφεί η τάση (stretch), η κάμψη (bend) και η περιστροφή (twist) του δεσμού (Σχήμα 3.1.).



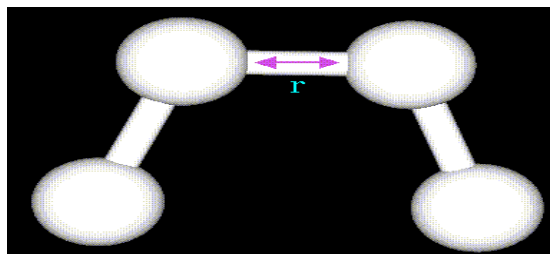
Σχήμα 3.1. Η τάση (stretch), η κάμψη (bend) και η περιστροφή (twist) ενός δεσμού.

Οι μη δεσμικές αλληλεπιδράσεις (Non-Bonded Interactions) είναι αλληλεπιδράσεις δυνάμεων van der Waals, καθώς επίσης στερεοχημικές και ηλεκτροστατικές παρεμποδίσεις. Η εφαρμογή της Μοριακής Μηχανικής συνίσταται στην πρόβλεψη της ενέργεια που συνδέεται με μία δεδομένη διαμόρφωση του μορίου. Η ενέργεια αυτή δεν έχει καμία ουσιαστική σημασία ως απόλυτη τιμή, παρά μόνο ως διαφορά ενέργειας δύο ή περισσότερων δομών μεταξύ τους. Μια απλή μοριακή ενεργειακή εξίσωση δίνεται από την εξίσωση:

$$\text{ΕΝΕΡΓΕΙΑ} = \text{ΔΕΣΜΙΚΗ} + \text{ΜΗ ΔΕΣΜΙΚΗ} + \text{ΚΑΜΨΗΣ} + \text{ΠΕΡΙΣΤΡΟΦΗΣ}$$

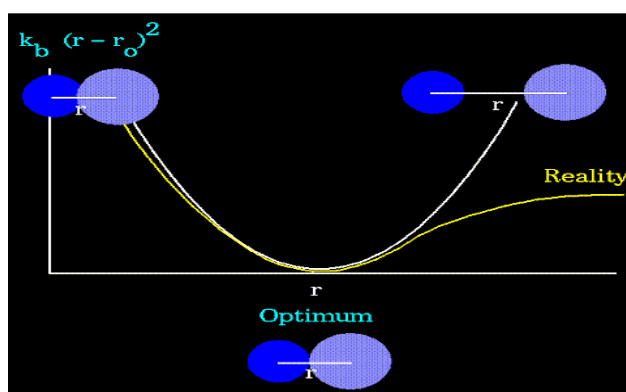
ΕΝΕΡΓΕΙΑ ΛΟΓΩ ΔΕΣΜΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ (ΤΑΣΕΩΣ ΔΕΣΜΟΥ)

$$E = \sum_{\text{bonds}} k_b (r - r_o)^2$$



Σχήμα 3.2.

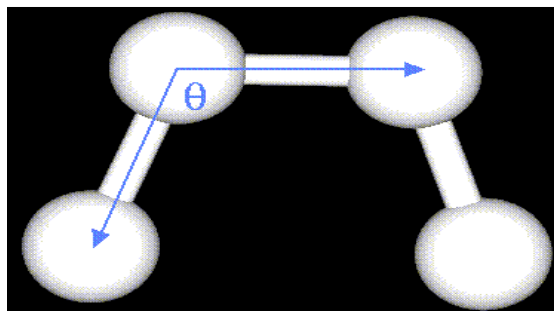
Η παραγωγή της εξίσωσης της ενέργειας λόγω δεσμικών αλληλεπιδράσεων είναι βασισμένη στο νόμο του Hooke (Σχήμα 3.2.) και σχετίζεται με τη δυνατότητα των ατόμων που συμμετέχουν σε ένα δεσμό να πλησιάσουν ή να απομακρυνθούν κατα μήκος του δεσμού τους. Η παράμετρος k_b (Σχήμα 3.2.) εκφράζει την ακαμψία των δεσμών, ενώ το r_o καθορίζει το μήκος ισορροπίας του. Οι παράμετροι k_b και r_o ορίζονται με βάση το είδος των ατόμων που συμμετέχουν στον δεσμό (π.χ. C-C, C-H, O-C, κτλ.). Αυτή η εξίσωση υπολογίζει την ενέργεια με βάση τη δονητική κατάσταση για συγκεκριμένο μήκος δεσμού ισορροπίας και έχει σχήμα παραβολής (Σχήμα 3.3.).



Σχήμα 3.3.

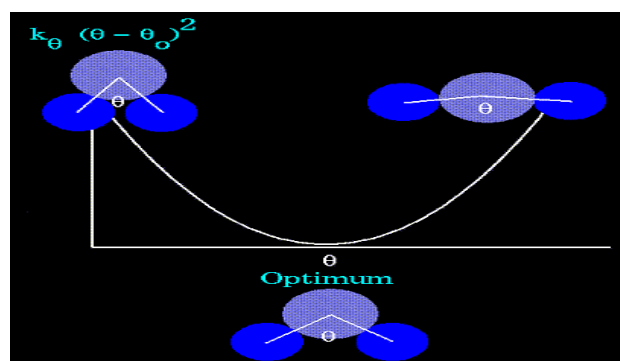
ΕΝΕΡΓΕΙΑ ΚΑΜΨΗΣ

$$E = \sum_{\text{angles}} k_{\theta} (\theta - \theta_0)^2$$



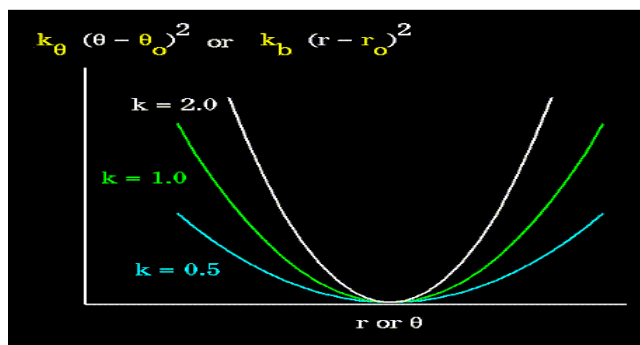
Σχήμα 3.4.

Η ενεργειακή εξίσωση κάμψης είναι επίσης βασισμένη στο νόμο του Hooke. (Σχήμα 3.4.) και σχετίζεται με την κάμψη των δεσμών και τη γωνία που σχηματίζουν μεταξύ τους. Η παράμετρος k_{θ} (Σχήμα 3.4.) εκφράζει την ακαμψία της γωνίας, ενώ η θ_0 καθορίζει τη γωνία ισορροπίας. Με τη χρήση της εξίσωσης αυτής υπολογίζεται η ενέργεια που συνδέεται με τη δονητική κατάσταση της εκάστοτε γωνίας ισορροπίας και παριστάται ως παραβολή (Σχήμα 3.5.). Οι παράμετροι της γωνίας κάμψης ορίζονται για κάθε δεσμική τριάδα ατόμων (π.χ.C-C-C, C-O-C, C-C-H, κτλ.).



Σχήμα 3.5.

Οι παράμετροι k_θ και k_b στις εξισώσεις που δίνουν την ενέργεια λόγω δεσμικών αλληλεπιδράσεων και ενέργεια κάμψης επιδρούν στην διεύρυνση ή στην αύξηση της κλίσης της παραβολής. Όσο μεγαλύτερη είναι η αριθμητική τιμή της k , τόσο μεγαλύτερη ενέργεια απαιτείται για την απομάκρυνση μιας γωνίας ή ενός δεσμού από τη θέση ισορροπίας του. Έτσι, για διαφορετικές τιμές της σταθεράς k (Σχήμα 3.6) παρατηρείται μεταβολή στην κλίση της παραβολής.

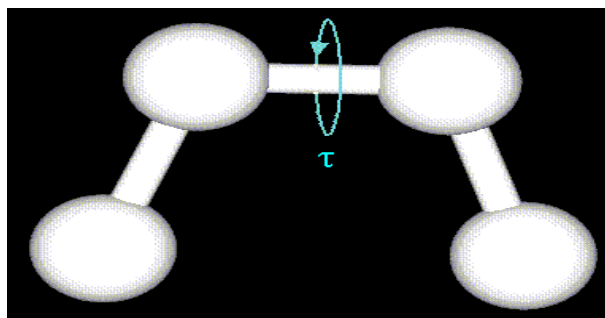


Σχήμα 3.6.

ΕΝΕΡΓΕΙΑ ΠΕΡΙΣΤΡΟΦΗΣ

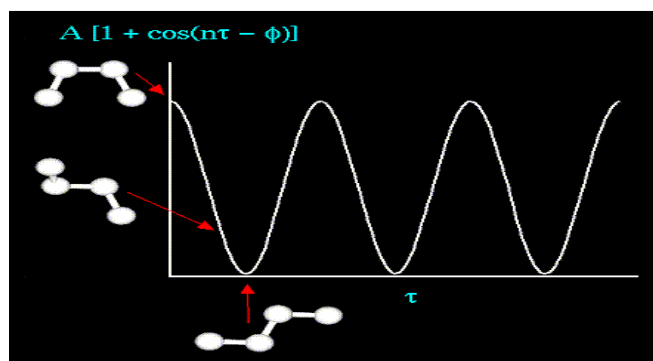
$$E = \sum A [1 + \cos(n\tau - \phi)]$$

torsions



Σχήμα 3.7.

Η ενέργεια περιστροφής ενός δεσμού (Σχήμα 3.7.) διαμορφώνεται από μια απλή περιοδική κίνηση, όπως παριστάνεται στο παρακάτω Σχήμα 3.8. :



Σχήμα 3.8.

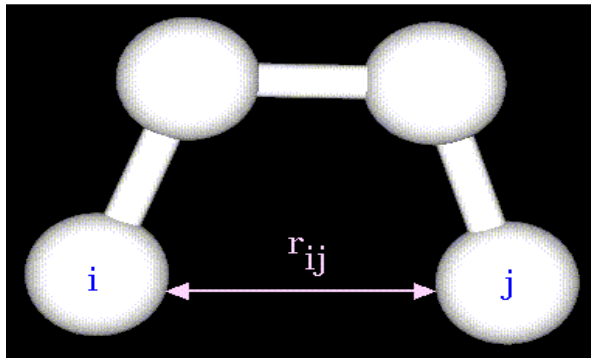
Η ενέργεια περιστροφής στη Μοριακή Μηχανική χρησιμοποιείται για να διορθώσει τους υπόλοιπους ενεργειακούς όρους, παρά για να αντιπροσωπεύσει κάτι από μόνη της. Η ενέργεια περιστροφής αντιπροσωπεύει το ποσό ενέργειας που πρέπει να προστεθεί ή να αφαιρεθεί από τις Ενέργειες Δεσμού, Κάμψης και Μη Δεσμικής, έτσι ώστε η συνολική ενέργεια να συμφωνεί με τα πειραματικά δεδομένα ή τον αυστηρό κβαντικό υπολογισμό για μια πρότυπη διεδρη γωνία (π.χ. το αιθάνιο να χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο για οποιοδήποτε δεσμό H-C-C-H).

ΕΝΕΡΓΕΙΑ ΛΟΓΩ ΜΗ ΔΕΣΜΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ

Η μη δεσμική ενέργεια αναφέρεται στη ενέργεια όλων των πιθανών αλληλεπιδράσεων μη συνδεδεμένων ατόμων i και j (Σχήμα 3.9.) :

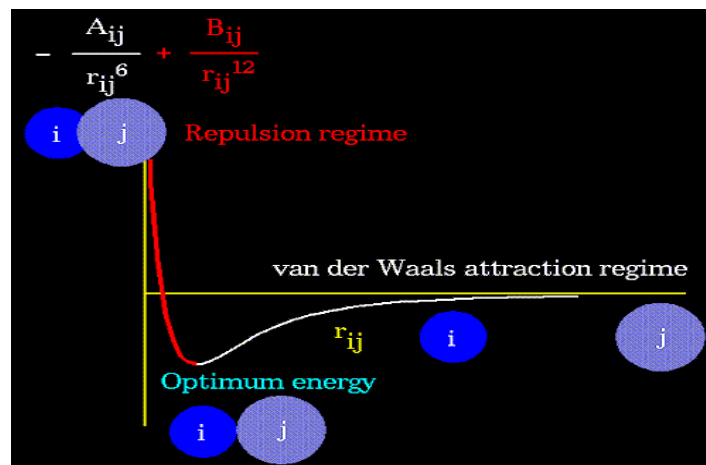
$$E = \sum_i \sum_j \frac{-A_{ij}}{r_{ij}^6} + \frac{B_{ij}}{r_{ij}^{12}} + \sum_i \sum_j \frac{q_i q_j}{r_{ij}}$$

van der Waals term
Electrostatic term



Σχήμα 3.9.

Η μη δεσμική ενέργεια οφείλεται σε στερεοχημική απόθηση των ατόμων του μορίου, έλξεις λόγω δυνάμεων van der Waals, οι οποίες είναι στιγμιαίες και εξασθενούν ταχύτατα καθώς επίσης και ηλεκτροστατικής φύσεως αλληλεπιδράσεις. Απόθηση παρουσιάζεται όταν η απόσταση των ατόμων είναι μικρότερη από το άθροισμα των επί μέρους van der Waals ακτίνων τους (Σχήμα 3.10.). Η απόσταση ακτίνας van der Waals για τον κάθε άνθρακα που απαρτίζει το δεσμό άνθρακα-άνθρακα είναι περίπου 1.7Å. Το άθροισμα των δύο ακτίνων είναι 1.7Å+1.7Å = 3.4Å. Η βέλτιστη απόσταση έλξης θεωρείται 4Å όπως υπολογίζεται με τη χρήση του λογισμικού GOLD.



Σχήμα 3.10.

Η παράμετρος A προσδιορίζεται είτε πολαρογραφικά είτε κβαντομηχανικά, ενώ η B από κρυσταλλογραφικά στοιχεία.

3.5 Ελαχιστοποίηση της ενέργειας

Η ελαχιστοποίηση της ενέργειας ενός συστήματος κρίνεται απαραίτητη καθώς με αυτό τον τρόπο λαμβάνεται η καλύτερη δυνατή γεωμετρία του συστήματος αλλά και υπολογίζεται η ολική ενέργεια του με βάση τις παραμέτρους του εκάστοτε πεδίου δυνάμεων (force field).

Η δυναμική ενέργεια είναι πάντα συνάρτηση των συντεταγμένων των ατόμων ενός μορίου. Η εύρεση εκείνου του συνδυασμού διάταξης των ατόμων, που δίνει την μικρότερη τιμή στην ενέργεια αποτελεί το αντικείμενο χρήσης των υπολογισμών. Τα αποτελέσματα των υπολογισμών είναι η λήψη στερεοδομής όπου τα άτομα διατάσσονται ώστε να ελαχιστοποιούνται οι απώσεις μεταξύ τους. Αυτό γίνεται με τη χρήση μαθηματικών μοντέλων που μπορούν να βρουν γρήγορα την ελάχιστη τιμή μιας πολυδιάστατης συνάρτησης. Σε μια διαμόρφωση χαμηλής τιμής ενέργειας τα άτομα βρίσκονται σε θέση τέτοια όπου η πρώτη παράγωγος της συνάρτησης της

ενέργειας $g = \left(\frac{\partial E}{\partial x_1}, \frac{\partial E}{\partial x_2}, \dots, \frac{\partial E}{\partial x_N} \right)$ τείνει να μηδενιστεί, όπου x_1, x_2, x_N είναι οι

συντεταγμένες των N ατόμων του μορίου. Τα μαθηματικά αυτά μοντέλα αναζητούν το συνδυασμό εκείνο όπου η κλίση της εξίσωσης ενέργειας μειώνεται. Στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί αρκετοί τέτοιοι αλγόριθμοι όπως : α) SD (Steepest Descent) β) CG (Polak-Ribiere Conjugate Gradient) γ) FMNR (Full-matrix Newton-Raphson minimization), δ) TNCG (Truncated-Newton Conjugate Gradient) κτλ. Οι αλγόριθμοι αυτοί διαφέρουν μεταξύ τους στον αριθμό ατόμων που μπορούν να διαχειριστούν και στην πορεία που ακολουθούν για την εύρεση ενός ελαχίστου.

Υπάρχουν μέθοδοι που χρησιμοποιούν την πρώτη παράγωγο, όπως η μέθοδος συζευγμένων βαθμιδωτών μεταβολών (conjugate gradients TNCG) όπου η διάκριση μεταξύ τοπικού και ολικού ελαχίστου είναι καλύτερη. Όμως έχει το μειονέκτημα ότι απαιτεί περισσότερο χρόνο και μνήμη του υπολογιστικού μέσου σε σχέση με τη μέθοδο των απότομων μεταβολών (steepest descents SD) ή του αλγόριθμου συζυγούς

βαθμιδωτού πεδίου Powell. Με την εφαρμογή αυτών των μεθόδων επιτυγχάνεται η προσέγγιση του πλησιέστερου τοπικού ελάχιστου. Στη μέθοδο Newton-Raphson ή την τροποποιημένη της μορφή, εφαρμόζονται αλγόριθμοι δεύτερης παραγώγου. Το πλεονέκτημα των αλγορίθμων αυτών είναι ότι οδηγούν ευκολότερα σε τοπικό ελάχιστο, όταν το όριο ενεργειακά βρίσκεται κοντά σε τοπικό ελάχιστο. Έχουν όμως το μειονέκτημα ότι είναι χρονοβόροι. Ο συνδυασμός των προαναφερθέντων αλγορίθμων οδηγεί σε τοπικό ελάχιστο και όχι στο απόλυτο ελάχιστο. Η συνάρτηση της ενέργειας για ένα μόριο μπορεί να έχει περισσότερα του ενός ελάχιστα. Όπως παριστάνεται στο Σχήμα 3.11., εάν ένα μόριο έχει ενεργειακές τιμές A ή Γ, η ελαχιστοποίηση της ενέργειας με τη χρήση των προαναφερθέντων αλγορίθμων θα οδηγήσει σε μία δομή με ενέργεια B που είναι το πλησιέστερο τοπικό ελάχιστο. Το απόλυτο ελάχιστο όμως είναι το E. Εάν λοιπόν προσεγγιστεί το B, πρέπει να ξεπεραστεί το φράγμα ενέργειας Δ για να επιτευχθεί η μετάβαση στο σημείο E.

Οι υπολογισμοί μοριακής μηχανικής εκτελούνται σε συνθήκες κενού (διηλεκτρική σταθερά $\epsilon = 1$) ή εάν τα μόρια έχουν φορτία ή είναι δίπολα σε διηλεκτρική σταθερά που προσομοιάζει συγκεκριμένο διαλύτη (π.χ. $\epsilon = 48$ για DMSO).

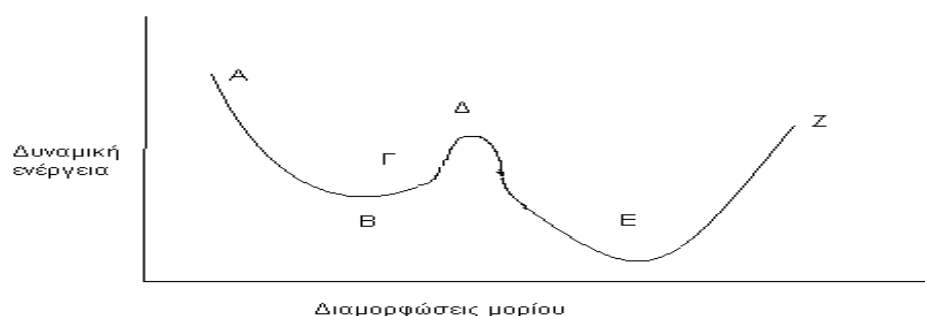
Γίνεται επίσης χρήση μορίων διαλύτη γύρω από το υπό μελέτη μόριο. Τα μόρια αυτά όμως επιβραδύνουν αρκετά τους υπολογισμούς. Για να αποφύγουμε τον μεγάλο αριθμό μορίων διαλύτη έχουν προταθεί στη βιβλιογραφία ορισμένα μοντέλα «Συνεχούς Διαλύτη». Στα μοντέλα αυτά δημιουργείται ένα πλέγμα γύρω από το σύστημα, όπου κάθε σημείο του έχει συγκεκριμένες ιδιότητες που προσομοιάζουν την παρουσία του διαλύτη.

Η συνάρτηση της ενέργειας για ένα μόριο μπορεί να έχει περισσότερα του ενός ελάχιστα. Αυτό εξαρτάται από τους βαθμούς ελευθερίας που παρουσιάζει το μόριο, δηλαδή από την ευκαμψία του. Ως βαθμός ελευθερίας σε ένα σύστημα ορίζεται οποιοδήποτε δομικό χαρακτηριστικό του που μπορεί να μεταβληθεί. Οι βαθμοί ελευθερίας οι οποίοι επηρεάζουν σημαντικά την ενέργεια του μορίου είναι κυρίως οι διέδρες γωνίες. Ανάλογα με την τιμή της διέδρης γωνίας, δηλαδή τη διαμόρφωση γύρω από ένα απλό δεσμό μπορεί να υπάρχουν και διαφορετικά ενεργειακά ελάχιστα.

Ένα μόριο με n απλούς δεσμούς έχει n βαθμούς ελευθερίας δηλαδή ένα διαμορφωσιακό χώρο n διαστάσεων. Σε ένα τέτοιο μόριο οι δομές ελάχιστης

ενέργειας είναι συνδυασμοί των τιμών διέδρων γωνιών. Η δυσκολία του προσδιορισμού των ενεργειακών ελαχίστων δηλαδή της διερεύνησης του διαμορφωσιακού χώρου, είναι φανερό ότι εξαρτάται από τον αριθμό των διέδρων γωνιών.

Ο προσδιορισμός της διαμόρφωσης ενός μορίου είναι πολύ σημαντικός. Σκοπός της εξερεύνησης του διαμορφωσιακού χώρου ενός μορίου είναι η εύρεση και η αξιολόγηση όλων των πιθανών ενεργειακά ευνοούμενων διαμορφώσεων του. Η εξερεύνηση του διαμορφωσιακού χώρου ενός μορίου είναι απαραίτητη καθώς είναι πιθανό για ένα μόριο σε θερμοκρασία περιβάλλοντος να υφίσταται σε παραπάνω από μία διαμορφώσεις σε ισορροπία.



Σχήμα 3.11. Ενεργειακές μεταβάσεις στο διαμορφωσιακό χώρο.

3.6 Μοριακή πρόσδεση

Η μοριακή πρόσδεση (Molecular Docking) ορίζεται ως η πρόβλεψη της δομής ενός συμπλόκου, που προκύπτει από την πρόσδεση ενός μορίου προσδέτη σε ένα μεγαλύτερο μόριο υποδοχέα [163].

Η κινητήρια δύναμη που ωθεί την πρόσδεση των μορίων στον υποδοχέα, είναι οι στερεοηλεκτρονικές τους ιδιότητες. Οι διάφορες διαμοριακές αλληλεπιδράσεις που παρατηρούνται όταν τα μόρια προσεγγίζουν τον υποδοχέα, είναι πολύ σημαντικές, γιατί στοχεύουν στη θεωρητική μελέτη και στο σχεδιασμό νέων φαρμακευτικών προϊόντων, όταν είναι γνωστή η μοριακή βάση μιας ασθένειας.

3.6.1 Παράγοντες που συντελούν στην ελάττωση της αυθόρμητης σύμπλεξης

Εκτός από τις ελκτικές δυνάμεις που συντελούν στην συνολική ενέργεια της αλληλεπίδρασης υποδοχέα-μόριο υπάρχουν και διεργασίες, οι οποίες ελαττώνουν το αυθόρμητο της αλληλεπίδρασης αυτής. Οι διεργασίες αυτές μπορεί να είναι εντροπικές ή ενθαλπικές. Συγκεκριμένα, μερικές βασίζονται στην μείωση της εντροπίας ($\Delta S < 0$), που οφείλεται στην απώλεια της ελεύθερης περιστροφής, της μεταφοράς και της διαμόρφωσης που συνοδεύουν τον υποδοχέα και το μόριο που θα προσδεθεί σε αυτόν, ενώ άλλες βασίζονται στην αύξηση της ενθαλπίας ($\Delta H > 0$), όπως οι διεργασίες που εμπλέκονται στην επίτευξη της διαμόρφωσης με υψηλότερη συγγένεια πρόσδεσης ή στη διάσπαση των δεσμών μεταξύ των μορίων του διαλύτη και των πολικών τμημάτων του μορίου που θα ενωθεί.

Ο σχηματισμός οποιουδήποτε συμπλέγματος μορίου-υποδοχέα ακολουθείται από την αντικατάσταση των τριών βαθμών ελευθερίας περιστροφής και των τριών βαθμών ελευθερίας μεταφοράς του μορίου με τους έξι βαθμούς ελευθερίας δόνησης του συμπλέγματος.

Σε περίπτωση άκαπτων μορίων, δεν υπάρχει απώλεια εντροπίας λόγω διαμορφωτικών περιορισμών κατά την πρόσδεση, άρα η σύμπλεξη είναι πιο αυθόρμητη ($\Delta G < 0$).

Οι διαμορφώσεις του υποδοχέα ή του μορίου κατά την πρόσδεση μπορεί να είναι :

- I. Υψηλής ενέργειας
- II. Χαμηλής ενέργειας (τοπικό ελάχιστο)
- III. Χαμηλότερης ενέργειας (ολικό ελάχιστο)

Στις δύο πρώτες περιπτώσεις θα παρατηρηθεί ελάττωση στο αυθόρμητο της ικανότητας σύμπλεξης σε σχέση με την τελευταία περίπτωση, που ο παράγοντας της διαμόρφωσης δε συνεισφέρει στο αυθόρμητο της σύμπλεξης υποδοχέα-μορίου. Τα παραπάνω συνοψίζονται στον Πίνακα 3.1.

Πίνακας 3.1. Περιπτώσεις ελάττωσης του βαθμού αυθόρμητης σύμπλεξης υποδοχέα-μορίου.

$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$	
Ενθαλπικοί παράγοντες που οδηγούν	Εντοπικοί παράγοντες που οδηγούν

στην $\Delta H < 0$	στη $T\Delta S < 0$
<ul style="list-style-type: none"> * Τα μόρια συμπλέκονται με διαμορφώσεις υψηλής ενέργειας * Διάσπαση δεσμού διαλύτη ή τμήμα του μορίου 	<ul style="list-style-type: none"> * Περιστροφικοί περιορισμοί διαλύτη ή των μορίων που συμπλέκονται * Μεταφορικοί περιορισμοί διαλύτη ή των μορίων που συμπλέκονται * Διαμορφωτική περιορισμοί διαλύτη ή των μορίων που συμπλέκονται

3.6.2 Παράγοντας RMSD (Root mean square deviation)

Ο παράγοντας RMSD είναι η τετραγωνική ρίζα της τυπικής απόκλισης και χρησιμοποιείται ως μέτρο σύγκρισης μεταξύ δύο διαμορφώσεων. Η τιμή της προκύπτει από τον παρακάτω τύπο. Θεωρείται ότι επιτυγχάνει η μέγιστη υπέρθεση όταν η τιμή της RMSD λάβει τη μικρότερη τιμή.

$$\text{RMSD} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j|)^2}$$

Όπου N: ο αριθμός των ατόμων που συγκρίνονται σε κάθε μόριο

\mathbf{r}_i και \mathbf{r}_j : οι θέσεις των ατόμων των μορίων που συγκρίνονται.

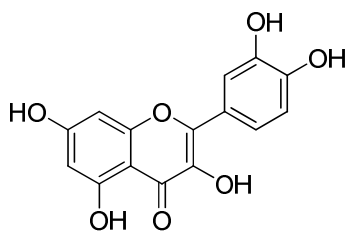
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Τα αρωματικά φυτά αποτελούν πλούσια πηγή φυσικών προϊόντων με ποικίλες ιδιότητες. Σήμερα, ένα μεγάλο μέρος των φαρμάκων, αλλά και των καλυντικών και των αρωμάτων, προέρχονται από φυσικές πηγές. Τα περισσότερα από αυτά είναι καθαρές ενώσεις που απομονώνονται από φυσικά πηγές και χρησιμοποιούνται είτε ως έχουν, είτε μετά από κατάλληλες χημικές τροποποιήσεις. Το φασκόμηλο είναι φυτό δικοτυλίδο που ανήκει στην οικογένεια των χειλανθών και απαντάται σε διάφορες περιοχές της Μεσογείου. Στη χώρα μας είναι αυτοφυές σε πολλές περιοχές. Το φασκόμηλο καλλιεργείται ως φυτό φαρμακευτικό και διατροφικό. Από αρχαιοτάτων χρόνων είχε αναγνωριστεί η θεραπευτική του αξία. Οι μελέτες έχουν δείξει ότι παρουσιάζει πλήθος δράσεων, όπως αντισηπτική, σπασμολυτική, αντιδιαβητική, αντικαρκινική, αντιμικροβιακή, κ.λ.π. Πολλές από τις ιδιότητες του φασκόμηλου οφείλονται στις φαινολικές ενώσεις που περιέχει.

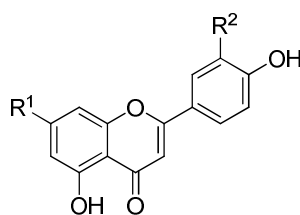
Αν και ο πρώτος αναστολέας της φωσφολιπάσης A_2 που αναφέρθηκε στη βιβλιογραφία το 1980 ήταν ένα φυσικό προϊόν θαλάσσιας προέλευσης, το μανοαλίδιο, στη συνέχεια το ενδιαφέρον των ερευνητών εστιάστηκε στο σχεδιασμό και τη μελέτη συνθετικών ενώσεων. Όμως τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον επανήλθε στα φυσικά προϊόντα και στη δυνατότητα τους να αναστέλλουν την φωσφολιπάση A_2 . Επειδή η φωσφολιπάση A_2 καθορίζει την παραγωγή αραχιδονικού οξέος, οι αναστολείς της παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως νέα μέσα για την θεραπεία φλεγμονωδών παθήσεων παρουσιάζοντας ένα νέο μηχανισμό δράσης. Η ανακάλυψη ότι φαινολικές ενώσεις, όπως η κερκετίνη, αναστέλλουν τη φωσφολιπάση A_2 , μας ώθησε στην ιδέα να διερευνήσουμε αν φαινολικές ενώσεις που υπάρχουν στο φασκόμηλο μπορούν να αλληλεπιδρούν με τη φωσφολιπάση A_2 .

Σκοπός της διατριβής ήταν α) η απομόνωση πολικών συσατικών από το αιθανολικό εκχύλισμα φασκόμηλου και η μελέτη τους με φασματοσκοπικές μεθόδους. Σύγκριση, των φασμάτων 1H και ^{13}C NMR προτύπων ουσιών, όπως το ροζμαρινικό και το γλωρογενικό οξύ με τα κλάσματα απομόνωσης του φασκόμηλου και β) μελέτη με χρήση υπολογιστικής χημείας του τρόπου αλληλεπίδρασης διαφόρων φαινολικών ενώσεων με την εκκριτική φωσφολιπάση A_2 (GPII sPLA₂). Πιο συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν να μελετηθούν η κερκετίνη, που είναι αναστολέας της

sPLA₂ , και τρεις ενώσεις παραπλήσιας δομής, η λουτεολίνη, η γκενκβανίνη και η απιγενίνη.

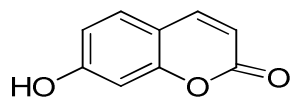


Κερκετίνη

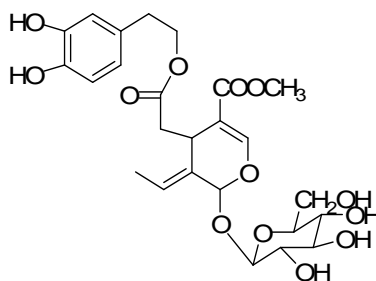


Λουτεολίνη $R^1=OH, R^2=OH$
 Γκενκβανίνη $R^1=OCH_3, R^2=H$
 Απιγενίνη $R^1=H, R^2=H$

Επιπλέον, επιλέξαμε να μελετήσουμε την 7-υδροξυκουμαρίνη και την ελευροπαΐνη. Οι φαινολικές αυτές ενώσεις είναι γνωστό ότι παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδη δράση. Ιδιαίτερα, η ελευροπαΐνη έχει μελετηθεί εκτεταμένα για τις διάφορες δράσεις που παρουσιάζει, όχι όμως για πιθανή δράση ως αναστολέας της φωσφολιπάσης A₂.



7-Υδροξυκουμαρίνη



Ελευροπαΐνη

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ

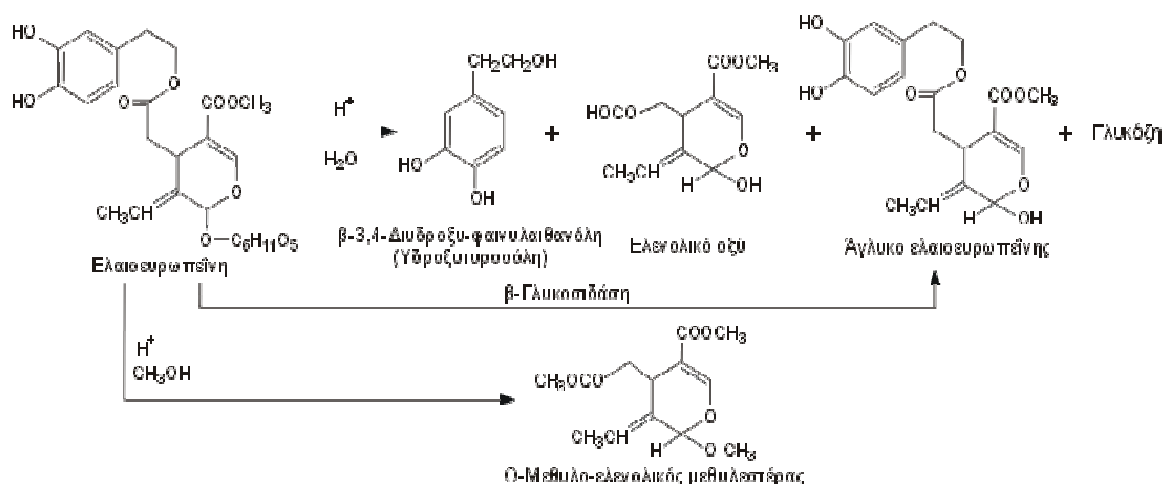
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Επιλογή φυσικών προϊόντων για *in silico* μελέτη της αναστολής της φωσφολιπάσης GIIA sPLA₂

Ένα από τα πλέον γνωστά флаβονοειδή, η κερκετίνη, έχει βρεθεί ότι αναστέλλει την sPLA₂ σε συγκεντρώσεις μΜ (micromolar) [155]. Το 2007 έχει δημοσιευτεί η μελέτη του μηχανισμού της αναστολής της sPLA₂ από флаβονοειδή, όπως η κερκετίνη, η καμφερόλη και η γκαλανγκίνη [156]. Στόχος μας στην παρούσα μελέτη ήταν να χρησιμοποιήσουμε συγκεκριμένο πρόγραμμα μοριακής πρόσδεσης και να συγκρίνουμε την πρόσδεση της κερκετίνης στην sPLA₂, με την πρόσδεση των флаβονοειδών λουτεολίνη, γκενκβανίνη και απιγενίνη, που έχουν δομές παραπλήσιες με την κερκετίνη, ώστε να κατανοήσουμε τις δομικές απαιτήσεις που πρέπει να έχει ένα флаβονοειδές για να αλληλεπιδρά επιτυχώς με την sPLA₂.

Πολύ πρόσφατα, αναφέρθηκε ότι η κουμαρίνη ουμπελλιφερόνη (7-υδροξυκουμαρίνη) μπορεί να αναστείλλει τη δράση της εκκριτικής φωσφολιπάσης A₂ από δηλητήριο του *Crotalus durissus collilineatus* [160]. Αποφασίσαμε λοιπόν να διερευνήσουμε *in silico*, αν η ουμπελλιφερόνη μπορεί να αλληλεπιδράσει καλά με την εκκριτική φωσφολιπάση GIIA sPLA₂.

Τέλος, επιλέξαμε να μελετήσουμε την ελευροπαΐνη, μία ένωση που παρουσιάζει ποικίλες δράσεις, αλλά μέχρι σήμερα δεν έχει μελετηθεί η πιθανότητα να δρά ως αναστολέας της sPLA₂. Η ελευροπαΐνη είναι ένας σεκοΐριδοειδής γλυκοζίτης (secoiridoid glucoside) χαρακτηριστικός των ολεασών (Oleaceae) και αποτελεί το κύριο πολυφαινολικό συστατικό της ελιάς (*Olea europaea*) (Σχήμα 4.1). Ως ξεχωριστή ουσία ανιχνεύθηκε το 1908 στο ελαιόλαδο από τους Bourquelot και Vintilesco, που της έδωσαν και το χαρακτηριστικό της όνομα [164]. Πολύ αργότερα, το 1960, οι Panizzi, Scarpati και Oriente υπέδειξαν με ενζυμική υδρόλυση με τη βοήθεια β-γλυκοζιδάσης, ότι το μόριο της ουσίας αυτής είναι ένας εστέρας της 3,4-διυδροξυ-φαινυλαιθανόλης (υδροξυτυροσόλη) με το ελενολικό οξύ (elenolic acid) που επιπλέον περιέχει γλυκοζιτικά ενωμένο ένα μόριο γλυκόζης [165].



Σχήμα 4.1. Η ελευροπαΐνη και οι αντιδράσεις για την επιβεβαίωση της δομής της.

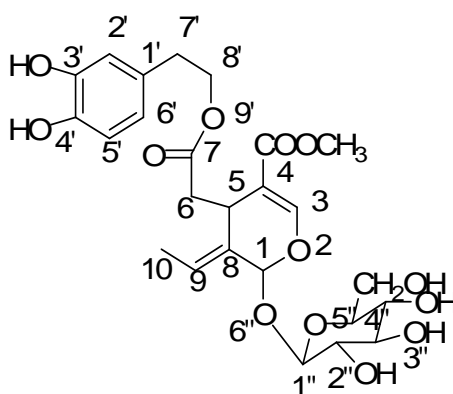
Η ελευροπαΐνη βρίσκεται και στα φύλλα της ελιάς και στον ελαιόκαρπο. Η περιεκτικότητα σε ελευροπαΐνη είναι μεγαλύτερη στους ανώριμους ελαιόκαρπους και σε αυτή οφείλεται κυρίως η έντονα πικρή γεύση τους. Έχει βρεθεί ότι η περιεκτικότητα σε ελευροπαΐνη είναι μέγιστη τον Αύγουστο και σχεδόν μηδενική τον χειμώνα, γιατί υφίσταται μετατροπές κατά την διάρκεια της ωρίμανσης [166,167].

Το 1973, οι Walter, Fleming και Etchells σε μια μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των ενώσεων που προκύπτουν με χημική υδρόλυση της ελευροπαΐνης, επιβεβαίωσαν τον χημικό τύπο της (Σχήμα 4.1.) [168]. Στην ίδια εργασία περιέγραψαν και τη μέθοδο απομόνωσής της από τις ελιές. Χρησιμοποίησαν την τεχνική της εκχύλισης κατ'αντιρροή (counter-current extraction) και απομόνωσαν 7,2 g σχεδόν καθαρής ουσίας από 500 g καρπών από την ποικιλία Manzanillo.

Ιστορικά τα φύλλα της ελιάς έχουν χρησιμοποιηθεί από διάφορους λαούς ως φάρμακο κατά του πυρετού και της ελονοσίας. Υπάρχουν πολλές αναφορές που δείχνουν ότι το εκχύλισμα των φύλλων της ελιάς μειώνει την πίεση του αίματος [169], αυξάνει τη ροή στις αρτηρίες [170], ανακουφίζει από τις αρρυθμίες και προλαμβάνει το έντερο από τους μυϊκούς σπασμούς. Η ίδια η ελευροπαΐνη έχει αντιμικροβιακή δράση κατά των ιών, ρετροϊών, βακτηρίων, ζυμών, μυκήτων και άλλων παρασίτων [171-173].

Προστατεύει τα κύτταρα και τον οργανισμό μέσω της απόκρισης των μακροφάγων [174] και παρεμποδίζει την συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων [175]. Έχει αντιφλεγμονώδη δράση και παρεμποδίζει την παραγωγή των εικοσανοειδών [175]. Επίσης, μειώνει την οξείδωση της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (LDL) και μειώνει τα επίπεδα της χοληστερόλης [176].

Η ελευροπαΐνη και τα επιμέρους συστατικά της παίζουν σημαντικό ρόλο και στα φυτά, γιατί με τη δράση τους (κυρίως αντιοξειδωτική, αλλά και λόγω της πικρής γεύσης) προστατεύουν με διάφορους μηχανισμούς τις ελιές από παθογόνους μύκητες και από τα κεντρίσματα εντόμων.

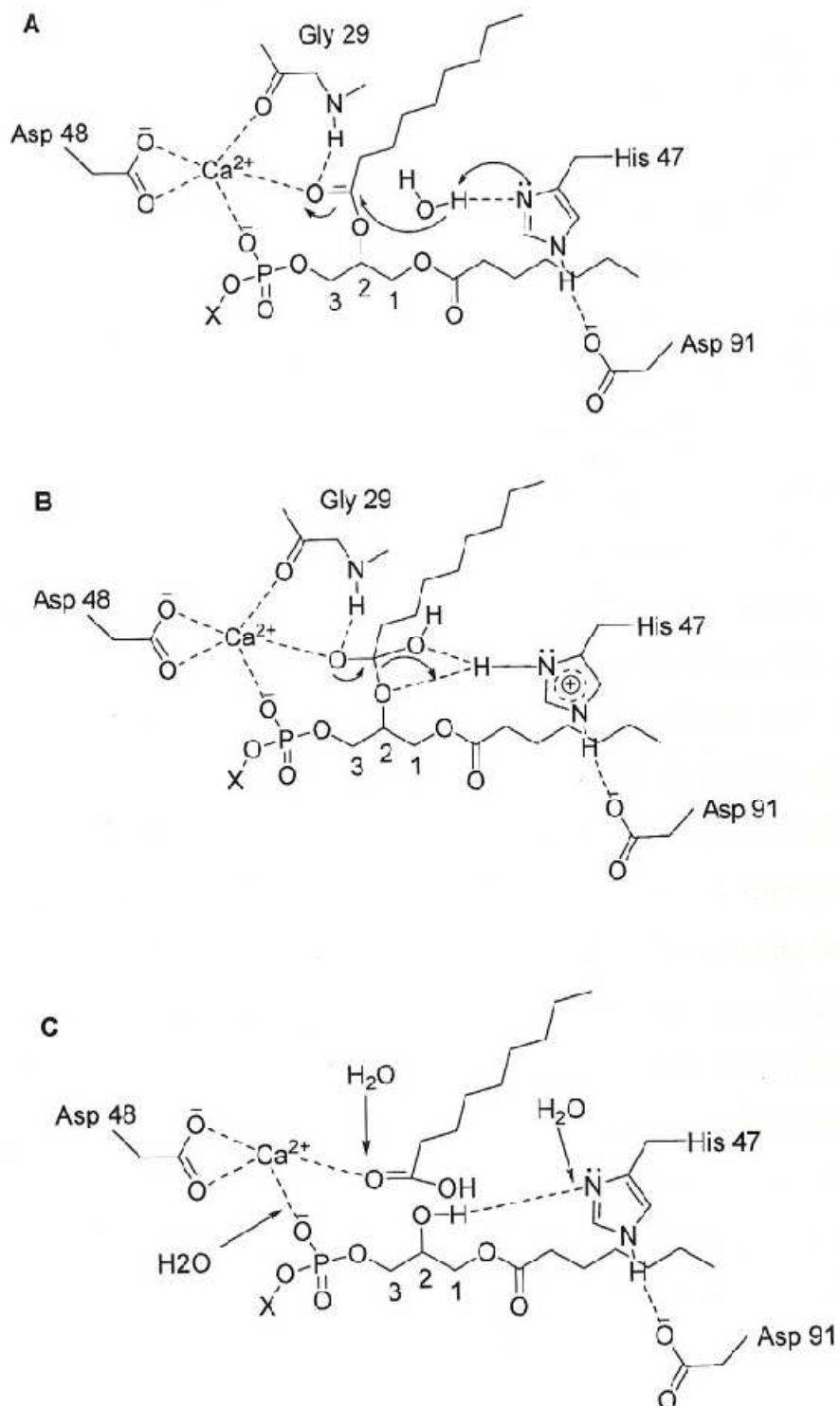


Σχήμα 4.2. Δομή και αρίθμηση ελευροπαΐνης.

4.2 Καταλυτικός μηχανισμός δράσης της GIIA sPLA₂

Σε αυτό το σημείο, κρίνουμε σκόπιμο να παρουσιάσουμε τον καταλυτικό μηχανισμό δράσης της υδρόλυσης των φωσφολιπιδίων από την sPLA₂ (Σχήμα 4.3). Προτείνεται ότι η His47 που αποτελεί τμήμα του ενεργού κέντρου, αποσπά ένα υδρογόνο από ένα μόριο νερού που εντοπίζεται στην κοιλότητα του ενεργού κέντρου. (Σχήμα 4.3 A). Από ένα μόριο νερού παράγεται το πυρηνόφιλο, ανιόν υδροξυλίου το οποίο προσβάλλει το καρβονύλιο. Το υδρογόνο που αποσπάται από την His47 απέχει μόνο 2.6Å από το οξυγόνο της *sn*-2 θέσης και βοηθά στη διάσπαση του τετραεδρικού ενδιάμεσου ως εξής: το θετικό φορτίο που αποκτά το ένζυμο από την διάσπαση του πρωτονίου σταθεροποιείται από ένα εκτεταμένο δίκτυο δεσμών υδρογόνου που

περιλαμβάνει την His47 και το Asp91 (Σχήμα 4.3, B) [177]. Το φορτίο αυτό μπορεί εύκολα να ανακληθεί για γίνει η πρωτονίωση του αλκοξειδίου.



Σχήμα 4.3. Καταλυτικός μηχανισμός δράσης της GIIA sPLA₂.

Το κατιόν ασβεστίου είναι απαραίτητο τόσο για τη σταθεροποίηση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο, όσο και για την υδρόλυση του. Σταθεροποιείται από τα πέντε άτομα οξυγόνου των αμινοξέων His47, Gly29, Gly31, Asp48 και από δύο άτομα οξυγόνου που προέρχονται από δύο μόρια νερού. Το σύμπλεγμα του ασβεστίου με τα επτά άτομα οξυγόνου παρουσιάζει γεωμετρία πενταγωνικής διπυραμίδας. Το κατιόν ασβεστίου ενοποιεί την κατάλυση και τη σταθεροποίηση του υποστρώματος παρέχοντας δύο θέσεις πρόσδεσης, μία ισημερινή για το τετραεδρικό ενδιάμεσο και μία αξονική για το οξυγόνο της φωσφορικής ομάδας της *sn-3* θέσης του φωσφολιπιδίου. Σταθεροποιητικό ρόλο διαδραματίζει και η Gly29 με το σχηματισμό ενός δεσμού υδρογόνου του αζώτου του αμιδίου της, με το οξυγόνο του τετραεδρικού ενδιάμεσου. Σταθεροποιητικής φύσης είναι και ο δεσμός υδρογόνου της Gly31 με το οξυγόνο της φωσφορικής ομάδας της *sn-3* θέσης του φωσφολιπιδίου.

Όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία, στο μηχανισμό δράσης εμπλέκονται τρία μόρια νερού τα οποία βοηθούν στην απομάκρυνση των προϊόντων της ενζυμικής υδρόλυσης (Σχήμα 4.3, C) [177-179].

4.3 Υπολογιστικά προγράμματα και μέθοδοι

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε η μοριακή πρόσδεση μιας σειράς φυσικών προϊόντων στο ενεργό κέντρο της φωσφολιπάσης A₂ GIIA sPLA₂. Σκοπός ήταν να ελεγχθεί ο τρόπος της αλληλεπίδρασης των μορίων αυτών με το ένζυμο. Για την προσομοίωση της πρόσδεσης μικρών μορίων προσδετών στο ενεργό κέντρο των υποδοχέων ενζύμων ή πρωτεϊνών, έχουν αναπτυχθεί πολλά υπολογιστικά προγράμματα μοριακής πρόσδεσης. Για το σχεδιασμό των τρισδιάστατων δομών των προσδετών χρησιμοποιήθηκε το πακέτο μοριακής μοντελοποίησης SYBYL 8.0 της εταιρίας TRIPOS. Η ελαχιστοποίηση της ενέργειας τους έγινε με χρήση του αλγόριθμου POWELL με βαθμίδα ελαχιστοποίησης ενέργειας 0.01 kcal mol⁻¹Å⁻¹. Το πρόγραμμα μοριακής πρόσδεσης που χρησιμοποιήθηκε είναι το GOLD v 4.1 (Genetic Optimisation for Ligand Docking) [180].

Ως υποδοχέας στους υπολογισμούς μοριακής πρόσδεσης χρησιμοποιήθηκε το αρχείο PDB 1D:1DB4 που βρίσκετε καταχωρημένο στην τράπεζα δεδομένων

(Protein Data Base). Το αρχείο αυτό αφορά την κρυσταλλογραφική μελέτη της GIIA sPLA₂ συγκρυσταλλωμένης με ένα παράγωγο ινδολίου στο ενεργό της κέντρο.

Για τους ευέλικτους προσδέτες χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος υψηλής θερμοκρασίας ανόπτησης (Annealing method) με σκοπό να γίνει η μελέτη του διαμορφωτικού χώρου του προσδέτη. Για το σκοπό αυτό κάθε προσδέτης θερμάνθηκε στους 2000K για 2000fs και στη συνέχεια η θερμοκρασία του μειώθηκε σταδιακά στους 0K για 10000fs. Η διαδικασία επαναλήφθηκε 100 φορές για κάθε προσδέτη. Οι εκατό διαφορετικές διαμορφώσεις που προέκυψαν για κάθε προσδέτη ελαχιστοποιήθηκαν ενεργειακά με τον αλγόριθμο POWELL με χρήση κατωφλίου ταυτοσημότητας (gradient) $0.01 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-1}$. Για τους υπολογισμούς χρησιμοποιήθηκε το πεδίο δυνάμεων Tripos. Οι υπολογισμοί επιτεύχθηκαν με το SYBYL 8.0.

Η μοριακή πρόσδεση (Molecular Docking) έγινε με τη χρήση του προγράμματος GOLD v 4.1 CCDC. Έγινε έλεγχος των αμινοξέων, του Ca²⁺ και της δυάδας His/Asp που παίζει καταλυτικό ρόλο στο σημείο πρόσδεσης. Τα πέντε μόρια νερού κοντά στο ενεργό κέντρο του ενζύμου τα ενεργοποιήθηκαν με το “Toggle” και τα υδρογόνα του νερού τα υποβλήθηκαν σε περιστροφή “Spin”. Η γεωμετρία του Ca²⁺ προσομοιώθηκε με το GOLD σε οκταεδρική δομή.

4.4 Βασικές αρχές του GOLD [180]

Το GOLD (Genetic Optimisation for Ligand Docking) είναι ένας γενετικός αλγόριθμος μοριακής πρόσδεσης που χρησιμοποιείται για την πρόσδεση μικρών μορίων (ligands) στο ενεργό κέντρο των υποδοχέων (ενζύμων ή πρωτεϊνών). Οι γενετικοί αλγόριθμοι (genetic algorithms) κάνουν χρήση της εξελικτικής λογικής του Δαρβίνου. Αρχικά, δηλαδή επιλέγεται με τυχαιότητα ένας πληθυσμός δυνατών λύσεων. Αξιολογείται όσο αφορά την ικανότητα πρόσδεσης του και επιλέγεται ένας νέος πληθυσμός που διασταυρώνεται με τον προηγούμενο και μεταλλάσσεται. Δημιουργείται με τον τρόπο αυτό μια νέα γενεα λύσεων. Αξιολογείται το αποτέλεσμα και η διαδικασία αυτή συνεχίζεται με τη δημιουργία νέων γενεών. Ο γενετικός αλγόριθμος τερματίζεται όταν δεν παρατηρείται σημαντική βελτίωση ή μετά από καθορισμένο αριθμό γενεών.

Η υλοποίηση του GOLD επιτυγχάνεται με τη χρήση αρχείων εισόδου για του υπολογισμούς μοριακής πρόσδεσης. Τα αρχεία εισόδου για τους προσδέτες συνήθως σχεδιάζονται σε άλλα πακέτα μοριακής μοντελοποίησης αφού το ίδιο στερείται σχεδιαστικού. Το πακέτο μοριακής μοντελοποίησης SYBYL 8.0 είναι συμβατό με το GOLD. Το αρχείο εισόδου του υποδοχέα συνήθως είναι σε PDB μορφή και λαμβάνεται κατευθείαν από την τράπεζα δεδομένων πρωτεϊνών.

Είναι πολύ δύσκολο να προβλεφθεί πως ένα μικρό μόριο θα προσδεθεί στην πρωτεΐνη και κανένα πρόγραμμα δεν μπορεί να εγγυηθεί την επιτυχία της πρόσδεσης. Το καλύτερο είναι αρχικά να ελεγχθεί πόσο ακριβές και αξιόπιστο είναι το πρόγραμμα. Γι' αυτό το λόγο το λογισμικό GOLD δοκιμάστηκε για την ικανότητα του να προβλέπει την πρόσδεση αναστολέων σε πολλούς γνωστούς υποδοχείς όπου υπήρχαν δεδομένα κρυσταλλογραφικά και τα αποτελέσματα είχαν ικανοποιητική επιτυχία (70-80%).

Η εφαρμογή του λογισμικού GOLD δίνει πλήρη ευελιξία στον προσδέτη και μερική ευελιξία στον υποδοχέα. Η εξίσωση υπολογισμού ενέργειας μοριακής πρόσδεσης GOLDscore χρησιμοποιήθηκε για την κατάταξη των αποτελεσμάτων μοριακής πρόσδεσης. Τα αποτελέσματα αυτά εκφράζονται ως τρισδιάστατες απεικονίσεις οι οποίες περιέχουν πληροφορίες για τον προσανατολισμό του προσδέτη και τις αλληλεπιδράσεις με το πρόσδεμα (πόζες).

Στο λογισμικό GOLD εφαρμόζονται δύο μεθοδολογίες πρόσδεσης, το GOLDScore και το CHEMScore. Στην περίπτωση μας εφαρμόστηκε μόνο η μεθοδολογία GOLDScore γιατί έδωσε επιτυχή αποτελέσματα. Η ικανότητα προσαρμογής προσδέσης στη μεθοδολογία GOLDScore εκφράζεται με ένα αριθμό που καλείται GOLDScore Fitness. Μεγαλύτερος αριθμός εκφράζει ισχυρότερη ικανότητα προσαρμογής του προσδέτη στο πρόσδεμα.

Το GOLDScore Fitness είναι σύνθεση τεσσάρων τιμών :

- * Ενέργεια δεσμών υδρογόνου προσδέτη – υποδοχέα.
- * Ενέργεια van derWaals αλληλεπιδράσεων προσδέτη – υποδοχέα.
- * Εσωτερική ενέργεια van der Waals αλληλεπιδράσεων προσδέτη.
- * Ενέργεια στροφής προσδέτη.

Μερικές φορές εμφανίζεται και η πέμπτη παράμετρος

- * Ενέργεια ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου του προσδέτη.

Για μεγαλύτερη ακρίβεια στην προσομοίωση μοριακής πρόσδεσης χρησιμοποιήθηκαν παράμετροι που να επιτρέπουν την εκτενή έρευνα πιθανών λύσεων. Οι παράμετροι που δόθηκαν είναι : GOLD GA:100 πρόσδεσης με 100.000GA δομές ανά πρόσδεση και στον αλγόριθμο δεν επιτρεπόταν να τερματίσει γρηγορότερα σε περίπτωση που πόζες με μικρή διαφορά RMSD επαναλαμβανόταν.

Αφού έγινε η κατάταξη των δομών με το GOLDScore, μελετήθηκε η κάθε δομή. Ειδικότερα, μελετήθηκαν τεσσάρα είδη δυνάμεων που σταθεροποιούν το σύμπλοκο υποδοχέα-προσδέτη:

- Οι αλληλεπιδράσεις με το κατιόν ασβεστίου με όριο 3 Å.
- Οι δεσμοί υδρογόνου με όριο 2.5 Å απόστασης υδρογόνου ετεροατόμου και 3.5Å απόστασης ετεροατόμου-ετεροατόμου.
- Οι αρωματικές αλληλεπιδράσεις (π-π stacking) με όριο απόστασης μεταξύ των κεντροειδών των δακτυλίων 4.5-7 Å.
- Οι van der Waals αλληλεπιδράσεις με όριο 4 Å.

Στη συνέχεια έγινε μέτρηση της γωνίας των κάθετων διανυσμάτων που διέρχονται από τα κεντροειδή των αρωματικών δακτυλίων που συμμετέχουν σε αρωματικές (π-π) αλληλεπιδράσεις. Η συνηθέστερη γωνία των αλληλεπιδράσεων των αρωματικών δακτυλίων είναι 30°-90°, δημιουργώντας μία «κεκαμένη-T» ή «άκρη-επιφάνεια» (“tilted-T” ή “edge-to-face”) διαμόρφωση στους δακτυλίους που αλληλεπιδρούν. Αν η γωνία είναι < 30° τότε η στοίβαξη των π-π αρωματικών αλληλεπιδράσεων είναι παράλληλη (π-π parallel stacking) [181].

Το PYMOL χρησιμοποιήθηκε για την επεξεργασία των εικόνων από το GOLD.

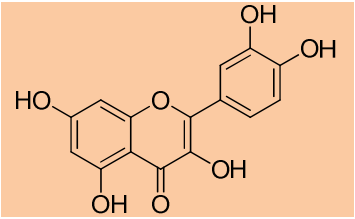
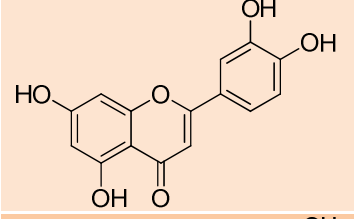
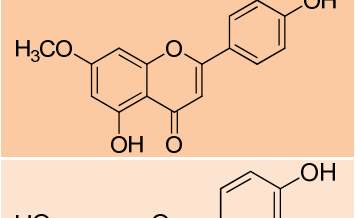
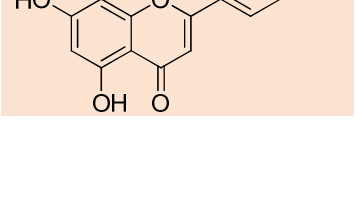
4.5 Test του GOLD

Αρχικά έγινε δοκιμή του λογισμικού GOLD μελετώντας την πρόσδεση της κερκετίνης για να δούμε ότι επαναλαμβάνει τα αποτελέσματα που γνωρίζουμε για την κερκετίνη από την κρυσταλλογραφία. Διαπιστώσαμε ότι εφαρμόζοντας το GOLD τα επαληθεύει, οπότε στη συνέχεια προχωρήσαμε στη μελέτη μιας σειράς φυσικών προϊόντων.

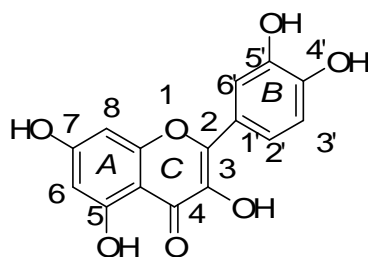
4.6 Μελέτη κερκετίνης, λουτεολίνης, γκενκβανίνης και απιγενίνης

Τα φυσικά προϊόντα κερκετίνη, λουτεολίνη, απιγκενίνη και γκενκβανίνη έχουν παρεμφερείς χημικές δομές όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.1. Διαφέρουν στον αριθμό και τη θέση των υδροξυλομάδων στο μόριο, ενώ στην γκενκβανίνη η υδροξυλομάδα στη θέση 7 είναι προστατευμένη. Παρατηρήθηκε να αλληλεπιδρούν παρόμοια στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Μεγαλύτερη τιμή του GOLDScore Fitness υποδηλώνει ευνοϊκότερη πρόσδεση του μορίου στο ενεργό κέντρο. Το Gsc HBond αναφέρεται στην ενέργεια λόγω δεσμών υδρογόνου και το Gsc Vdw στην ενέργεια λόγω van der Waals αλληλεπιδράσεων. Η κερκετίνη παρουσιάζει την ευνοϊκότερη πρόσδεση στο ενεργό κέντρο της GIIA sPLA₂ με GOLDScore Fitness 55.53. Οι σημαντικότερες αλληλεπιδράσεις των μορίων συζητώνται αναλυτικά παρακάτω.

Πίνακας 4.1 Δομές και ενέργειες ενώσεων.

ΦΥΣΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ	ΔΟΜΗ ΜΟΡΙΟΥ	Gsc. Fit.	Gsc. HBond	Gsc.Vdw
ΚΕΡΚΕΤΙΝΗ		55.53	22.01	36.85
ΛΟΥΤΕΟΛΙΝΗ		40.81	14.63	35.85
ΓΚΕΝΒΑΝΙΝΗ		38.79	3.75	40.55
ΑΠΙΓΕΝΙΝΗ		36.23	3.90	37.40

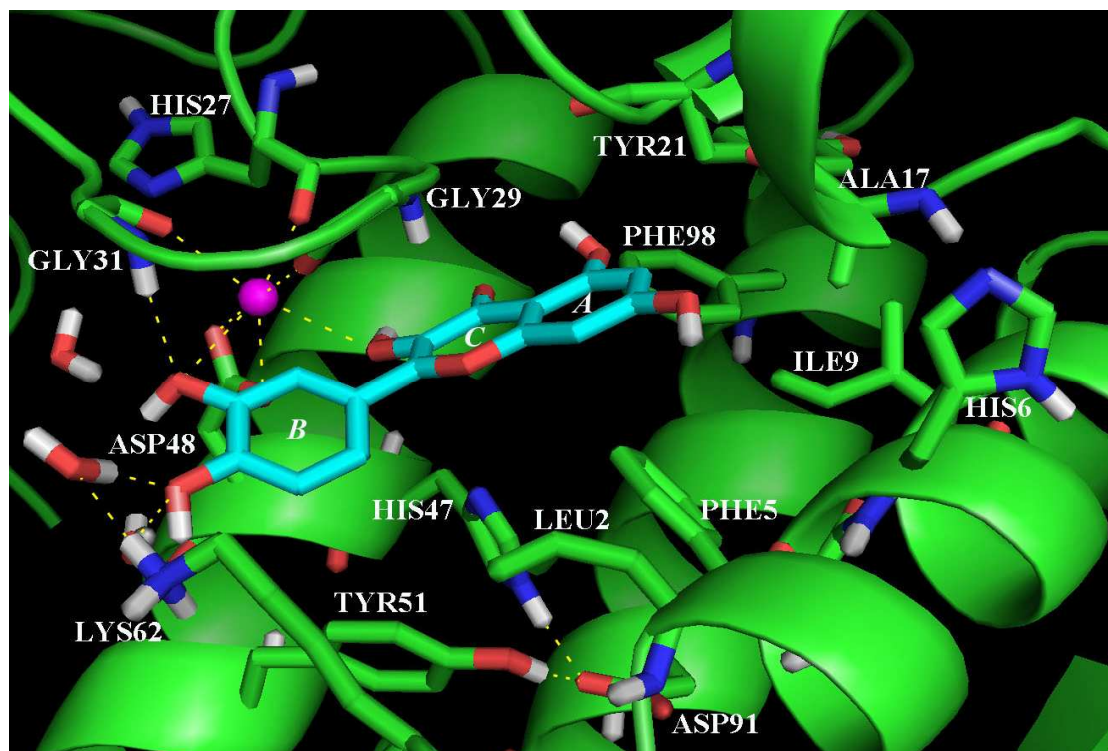
* Αλληλεπιδράσεις κερκετίνης



Σχήμα 4.4. Δομή και αρίθμηση της κερκετίνης.

Στο Σχήμα 4.4 παριστάνεται η δομή και η αρίθμηση των δακτυλίων του μορίου της κερκετίνης.

Στην Εικόνα 4.1 παρουσιάζεται ο τρόπος αλληλεπίδρασης της κερκετίνης με το ενεργό κέντρο της GIIA sPLA₂. Η κερκετίνη παρουσιάζει τις εξής αλληλεπιδράσεις με το ενεργό κέντρο της GIIA sPLA₂:



Εικόνα 4.1. Τρόπος αλληλεπίδρασης της κερκετίνης με το ενεργό κέντρο της GIIA sPLA₂.

(i) Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις: α) μεταξύ της υδροξυλομάδας του 3-OH του δακτυλίου C με το Ca^{2+} ($\text{H-O} \dots \text{Ca}^{2+}$ 2.86 Å) και β) του 5'-OH του δακτυλίου B με το Ca^{2+} ($\text{H-O} \dots \text{Ca}^{2+}$ 2.94 Å)

(ii) Δεσμοί υδρογόνου: α) 5'-OH του δακτυλίου B με Gly31 ($\text{O} \dots \text{H-N}$ 2.40 Å και $\text{O} \dots \text{N}$ 3.40 Å) , β) 4'-OH του δακτυλίου B με την Lys62 ($\text{O} \dots \text{H-N}$ 2.70 Å και $\text{O} \dots \text{N}$ 3.30 Å) γ) 4'-OH του δακτυλίου B με την Lys62 μέσω ενός μορίου νερού ($\text{O} \dots \text{H-O} \dots \text{H-N}$ 1.80 Å, 1.90 Å και $\text{O} \dots \text{O} \dots \text{N}$ 2.80 Å, 2.90 Å)

(iii) π-π Αλληλεπιδράσεις των αρωματικών δακτυλίων A και B της κερκετίνης με τα αμινοξέα Phe5, His47, Tyr51 και Phe98. Αναλυτικότερα φαίνεται ότι ο δακτύλιος A της κερκετίνης αλληλεπιδρά με την Phe5, Phe98 και την His47, ενώ ο δακτύλιος B με την Tyr51 και την His47.

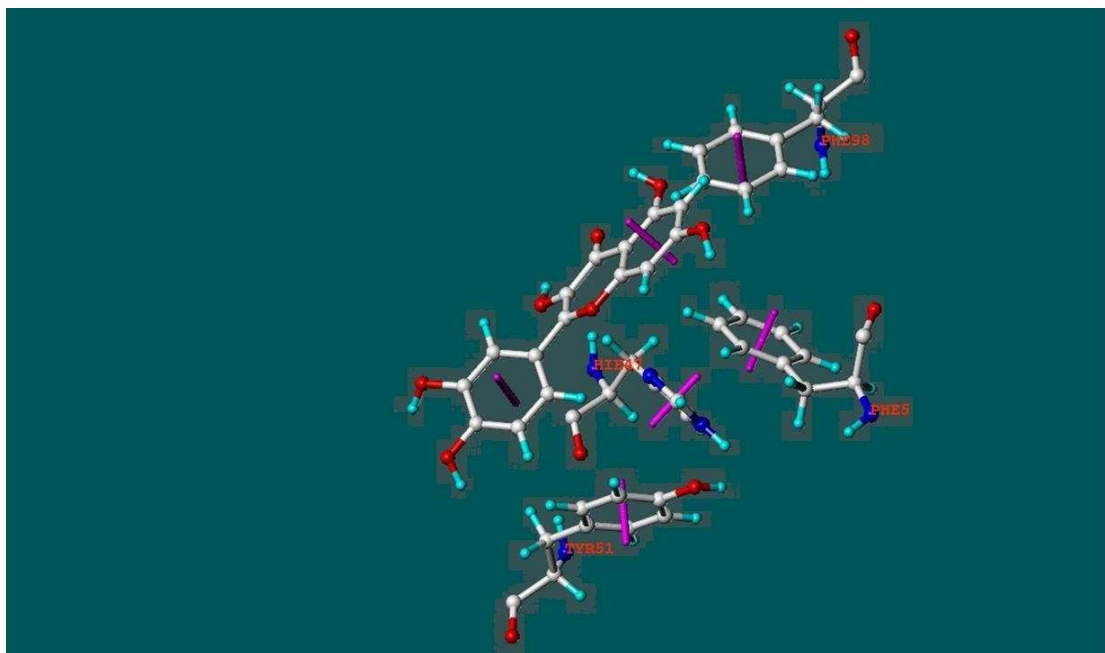
Οι αλληλεπιδράσεις συνοψίζονται στον Πίνακα 4.2.

Πίνακας 4.2. Αλληλεπιδράσεις κερκετίνης

Αλληλεπίδραση	Απόσταση Å
5'-H-O... Ca^{2+}	2.94
3-H-O... Ca^{2+}	2.86
Gly31-5'-OH O...H-N O...N	2.40 3.40
4'-OH- H ₂ O- Lys62 O...H-O...H-N O...O...N	1.80 , 1.90 2.80 , 2.90
4'-OH -Lys62 O...H-N O...N	2.70 3.30
Αλληλεπίδραση	Απόσταση σε Å Γωνία σε μοίρες
A- PHE5	4.87 , θ= 22
A- PHE98	6.37 , θ= 46
B-TYR51	5.59 , θ= 58
A-HIS47	6.75 , θ= 40
B- HIS47	6.49 , θ= 31

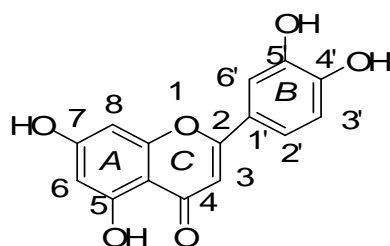
Στη Εικόνα 4.2. παριστάνονται τα κάθετα διανύσματα που διέρχονται από τα κεντροειδή των αρωματικών αλληλεπιδράσεων που συμμετέχουν σε αρωματικές (π-

π) αλληλεπιδράσεις. Για τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε το πακέτο μοριακής μοντελοποίησης SYBYL 8.0.



Εικόνα 4.2. Τα κάθετα διανύσματα που διέρχονται από τα κεντροειδή των αρωματικών δακτυλίων που συμμετέχουν σε αρωματικές (π-π) αλληλεπιδράσεις της κερκετίνης όπως μετρήθηκαν με το SYBYL 8.0.

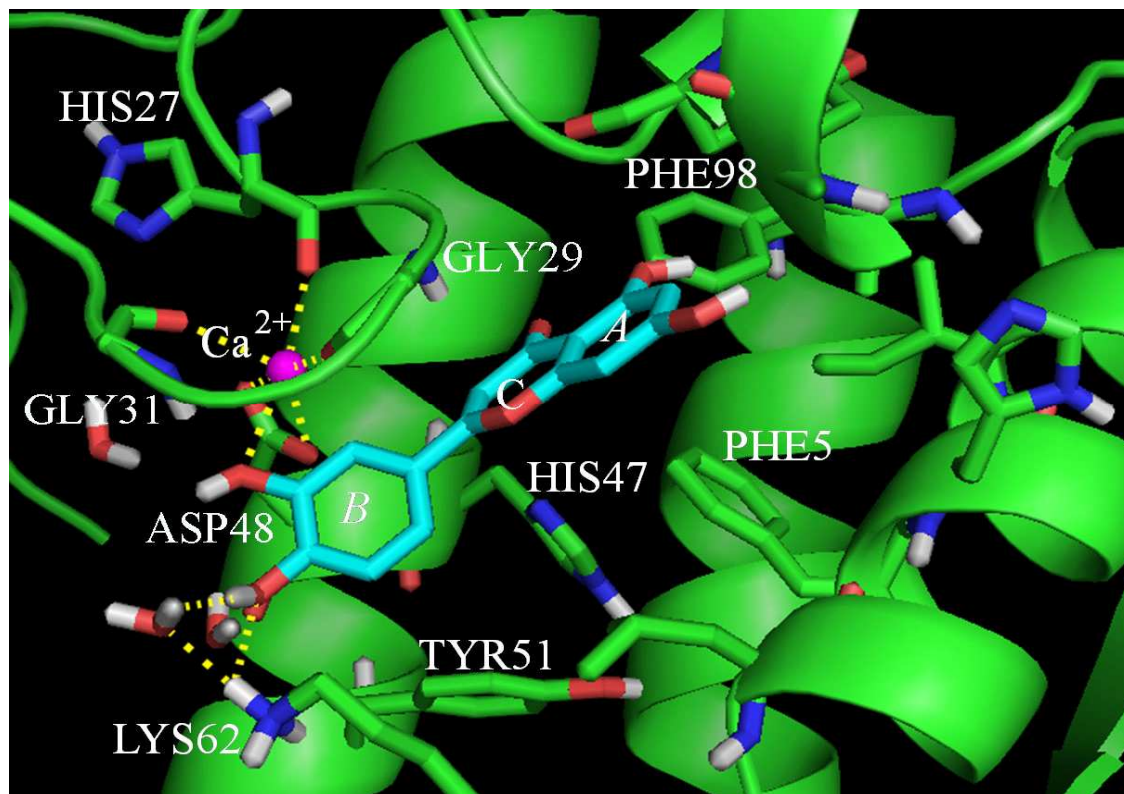
* Αλληλεπιδράσεις Λουτεολίνης



Σχήμα 4.5. Δομή και αρίθμηση της λουτεολίνης.

Στο Σχήμα 4.5. παριστάνεται η δομή και η αρίθμηση των δακτυλίων του μορίου της λουτεολίνης.

Στην Εικόνα 4.3. φαίνεται ο τρόπος αλληλεπίδρασης της λουτεολίνης με το ενεργό κέντρο της GIIA sPLA₂. Η λουτεολίνη παρουσιάζει τις εξής αλληλεπιδράσεις με το ενεργό κέντρο της GIIA sPLA₂:



Εικόνα 4.3. Τρόπος αλληλεπίδρασης της λουτεολίνης με το ενεργό κέντρο της GIIA sPLA₂.

(i) Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις του 5'-OH του δακτυλίου B με το Ca²⁺ (H-O... Ca²⁺ 2.60 Å).

(ii) Ο δεσμός υδρογόνου του α) 4'-OH του δακτυλίου B με την Lys62 (O...H-N 2.90 Å και O...N 3.50 Å) και β) 4'-OH του δακτυλίου B με την Lys62 μέσω ενός μορίου νερού (O...H-O...H-N 2.25 Å, 1.90 Å και O...O...N 3.17 Å, 2.90 Å).

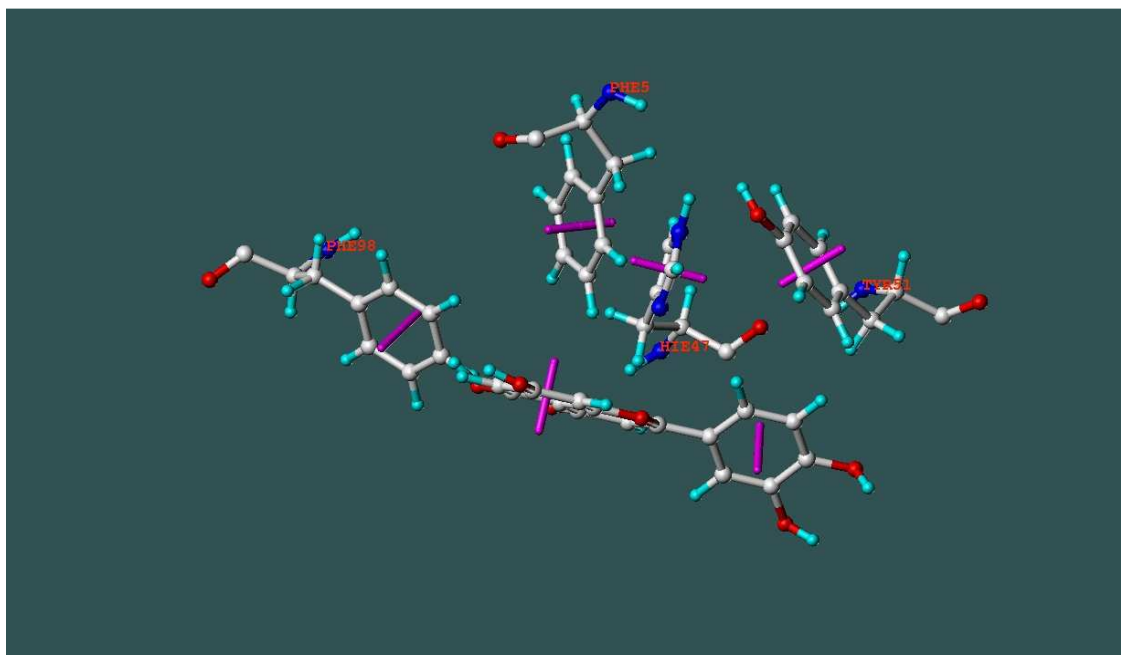
(iii) π-π Αλληλεπιδράσεις των αρωματικών δακτυλίων A και B, και συγκεκριμένα με Phe5, His47, Tyr51 και Phe98. Αναλυτικότερα, ο δακτύλιος A της λουτεολίνης αλληλεπιδρά με την Phe5 και Phe98, ενώ ο δακτύλιος B με την Tyr51 και His 47.

Οι αλληλεπιδράσεις παριστάνονται στον πίνακα 4.3.

Πίνακας 4.3. Αλληλεπιδράσεις λουτεολίνης.

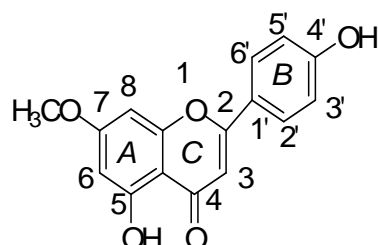
Αλληλεπίδραση	Απόσταση Å
5'-H-O... Ca ²⁺	2.60
4'-OH- H ₂ O- Lys62	
O...H-O...H-N	2.25 , 1.90
O...O...N	3.17 , 2.90
4'-OH-Lys62	
O...H-N	2.90
O...N	3.50
Αλληλεπίδραση	Απόσταση σε Å Γωνία σε μοίρες
A- PHE5	5.20 , θ = 69
A- PHE98	6.69 , θ = 51
B- TYR51	5.60 , θ = 52
B- HIS47	6.40 , θ = 21

Στη Εικόνα 4.4. παριστάνονται τα κάθετα διανύσματα που διέρχονται από τα κεντροειδή των αρωματικών αλληλεπιδράσεων και συμμετέχουν σε αρωματικές (π-π) αλληλεπιδράσεις. Για τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε το πακέτο μοριακής μοντελοποίησης SYBYL 8.0.



Εικόνα 4.4. Τα κάθετα διανύσματα που διέρχονται από τα κεντροειδή των αρωματικών δακτυλίων και συμμετέχουν σε αρωματικές (π-π) αλληλεπιδράσεις της λουτεολίνης όπως μετρήθηκαν με το SYBYL 8.0

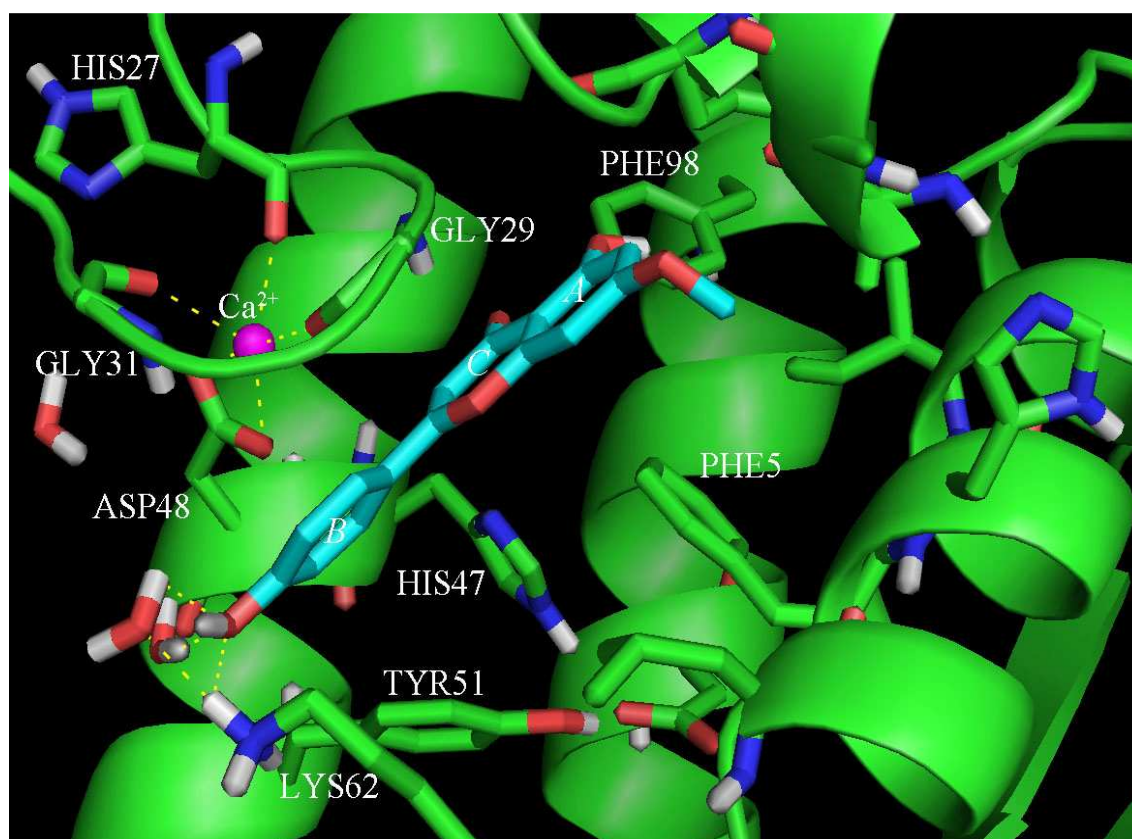
* Αλληλεπιδράσεις Γκενκβανίνης



Σχήμα 4.6. Δομή και αρίθμηση γκενκβανίνης.

Στο Σχήμα 4.6. παριστάνεται η δομή και η αρίθμηση των δακτυλίων του μορίου της γκενκβανίνης.

Στην Εικόνα 4.5. φαίνεται ο τρόπος αλληλεπίδρασης της γκενκβανίνης στο ενεργό κέντρο της GIIA sPLA₂. Η γκενκβανίνη παρουσιάζει τις εξής αλληλεπιδράσεις με το ενεργό κέντρο της GIIA sPLA₂:



Εικόνα 4.5. Τρόπος αλληλεπίδρασης της γκενκβανίνης με το ενεργό κέντρο GIIA sPLA₂.

(i) Οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με το κατιόν ασβεστίου δεν υπάρχουν μέσα στα όρια που μπορούμε να αποδεχτούμε π.χ το 4' HO...Ca²⁺ 5.56 Å.

(ii) Ο δεσμός υδρογόνου του α)4'-OH του δακτυλίου B με την Lys62 μέσω ενός μορίου νερού (O...H-O...H-N 2.20 Å, 1.90 Å και O...O...N 3.10 Å, 2.90 Å) και β) 4'-OH του δακτυλίου B με ένα μόριο νερού (O...H-O 2.00 Å και O...O 2.90 Å).

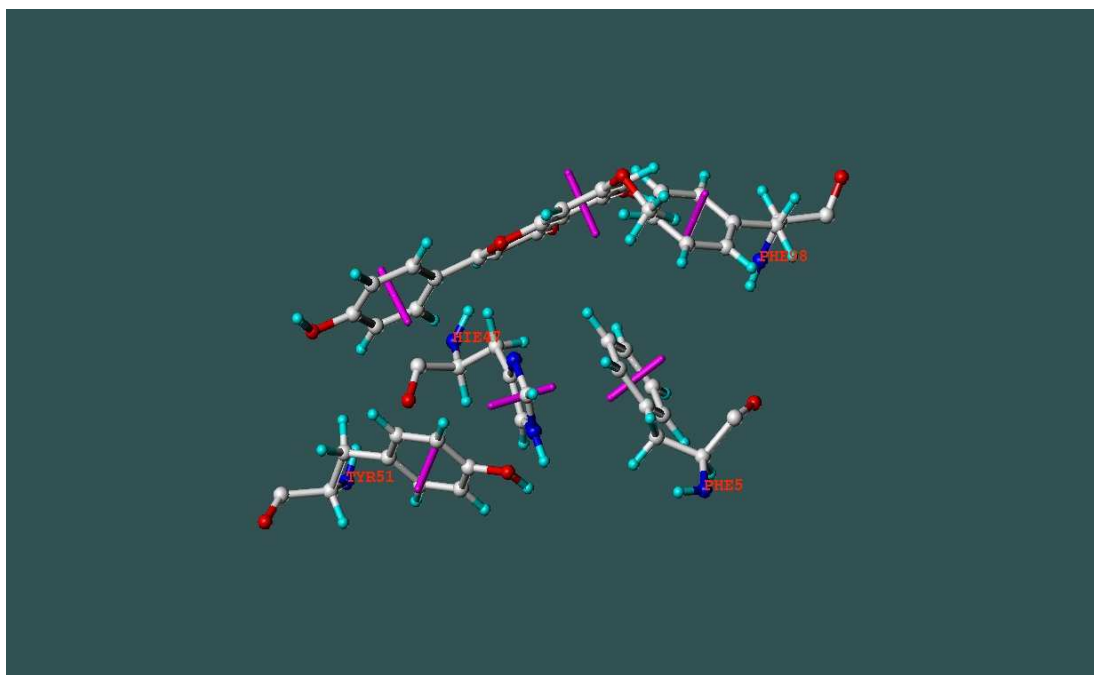
(iii) π-π Αλληλεπιδράσεις των αρωματικών δακτυλίων A και B με Phe5, His47, Tyr51 και Phe98. Αναλυτικότερα ο δακτύλιος A αλληλεπιδρά με Phe5 και Phe98 και ο δακτύλιος B με Tyr51 και His 47.

Οι αλληλεπιδράσεις συνοψίζονται στον Πίνακα 4.4.

Πίνακας 4.4. Αλληλεπιδράσεις γκενκβανίνης.

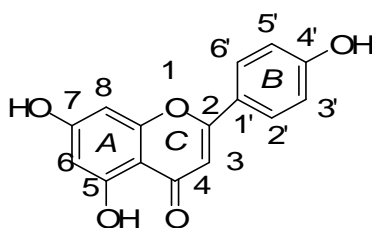
Αλληλεπίδραση	Απόσταση Å
H ₂ O με 4'-OH...O	3.58
4'-O...O	2.95
4'-OH- H ₂ O- Lys62	
O...H-O...H-N	2.20 , 1.90
O...O...N	3.10 , 2.90
4'-OH-H ₂ O	
O...H-O	2.00
O...O	2.90
Αλληλεπίδραση	Απόσταση σε Å Γωνίες σε μοίρες
A- PHE5	5.65 , θ= 90
A- PHE98	6.72 , θ= 59
B- TYR51	5.18 , θ= 61
B- HIS47	6.10 , θ= 90

Στη Εικόνα 4.6. παριστάνονται τα κάθετα διανύσματα που διέρχονται από τα κεντροειδή των αρωματικών αλληλεπιδράσεων και συμμετέχουν σε αρωματικές (π-π) αλληλεπιδράσεις. Για τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε το πακέτο μοριακής μοντελοποίησης SYBYL 8.0.



Εικόνα 4.6. Τα κάθετα διανύσματα που διέρχονται από τα κεντροειδή των αρωματικών δακτυλίων και συμμετέχουν σε αρωματικές (π-π) αλληλεπιδράσεις της γκενβανίνης όπως μετρήθηκαν με το SYBYL 8.0.

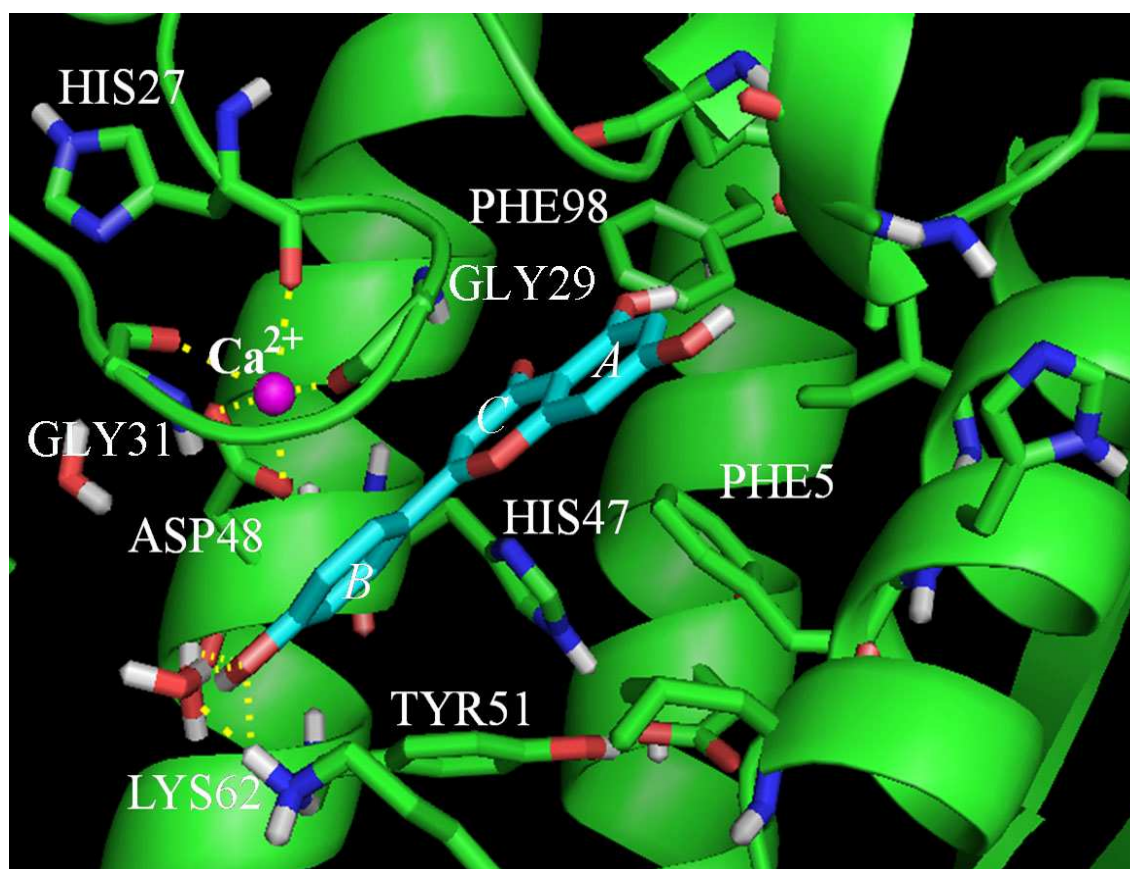
* Αλληλεπιδράσεις Απιγενίνης



Σχήμα 4.7. Δομή και αρίθμηση της απιγενίνης.

Στο Σχήμα 4.7. παριστάνεται η δομή και η αρίθμηση των δακτυλίων του μορίου της απιγενίνης.

Στην Εικόνα 4.7. παριστάνεται ο τρόπος αλληλεπίδρασης της απιγενίνης στο ενεργό κέντρο της GIIA sPLA₂. Η απιγενίνη παρουσιάζει τις εξής αλληλεπιδράσεις με το ενεργό κέντρο της GIIA sPLA₂:



Εικόνα 4.7. Τρόπος αλληλεπίδρασης της απιγενίνης με το ενεργό κέντρο GIIA sPLA₂.

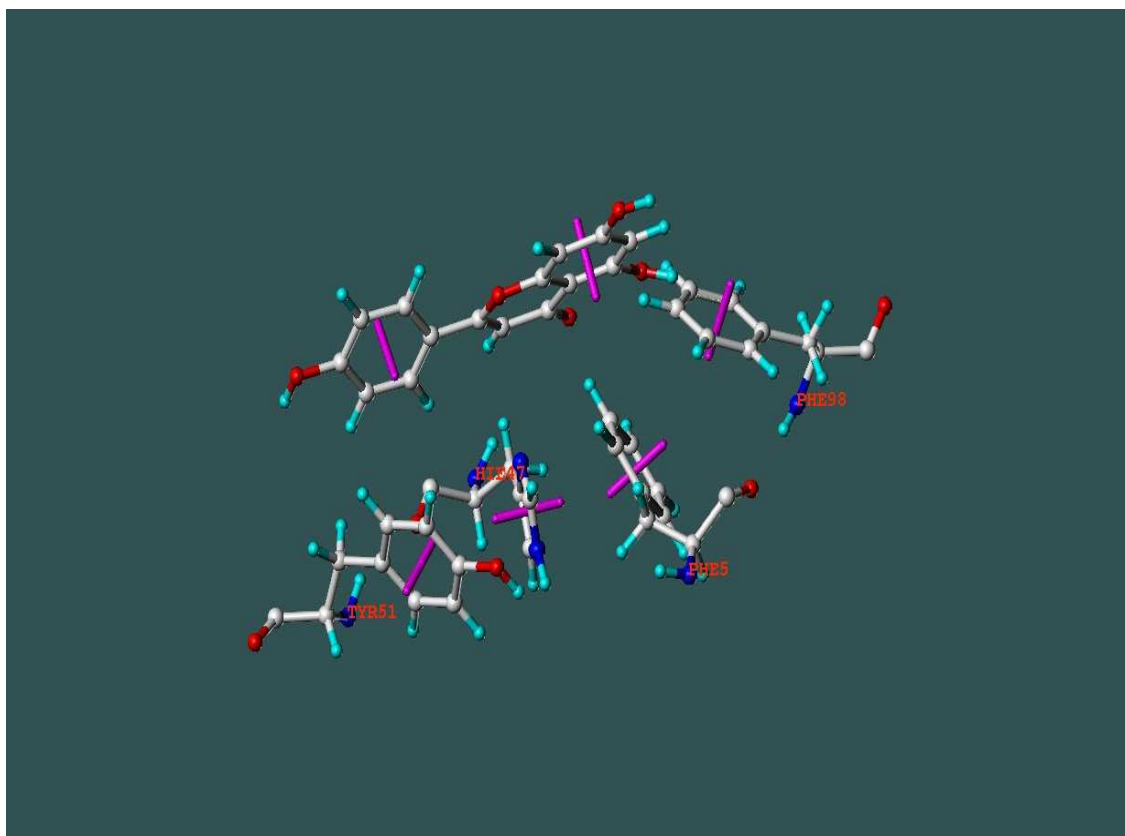
- (i) Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με το κατιόν ασβεστίου δεν υπάρχουν.
- (ii) Ο δεσμός υδρογόνου του α) 4'-OH του δακτυλίου B με την Lys62 μέσω ενός μορίου νερού (O...H-O...H-N 2.20 Å, 1.90 Å και O...O...N 3.10 Å, 2.90 Å) και β) 4'-OH του δακτυλίου B με ένα μόριο νερού (O...H-O 2.00 Å και O...O 3.00 Å).
- (iii) π-π αλληλεπιδράσεις των αρωματικών δακτυλίων A και B με Phe5, His47, Tyr51 και Phe98. Αναλυτικότερα ο δακτύλιος A της απιγενίνης με τη Phe5, Phe98 και His47 και ο B δακτύλιος με Tyr51 και His47.

Οι αλληλεπιδράσεις συνοψίζονται στον Πίνακα 4.5.

Πίνακας 4.5. Αλληλεπιδράσεις απιγενίνης.

Αλληλεπίδραση	Απόσταση σε Å
H ₂ O με 4'-OH...O	2.02
4'-O...O	2.96
H ₂ O με 4' OH...O	3.29
O...O	3.92
4'-OH- H ₂ O- Lys62	
O...H-O...H-N	2.20 , 1.90
O...O...N	3.10 , 2.90
4'-OH-H ₂ O	
O...H-O	2.00
O...O	3.00
Αλληλεπίδραση	Απόσταση σε Å Γωνίες σε μοίρες
A- PHE5	5.27 Å, θ= 73°
A- PHE98	6.75 Å, θ= 58°
B-TYR51	5.27 Å, θ= 56°
A-HIS47	6.96 Å, θ= 69°
B- HIS47	6.21 Å, θ= 87°

Στη Εικόνα 4.8. παριστάνονται τα κάθετα διανύσματα που διέρχονται από τα κεντροειδή των αρωματικών αλληλεπιδράσεων που συμμετέχουν σε αρωματικές (π-π) αλληλεπιδράσεις. Για τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε το πακέτο μοριακής μοντελοποίησης SYBYL 8.0.

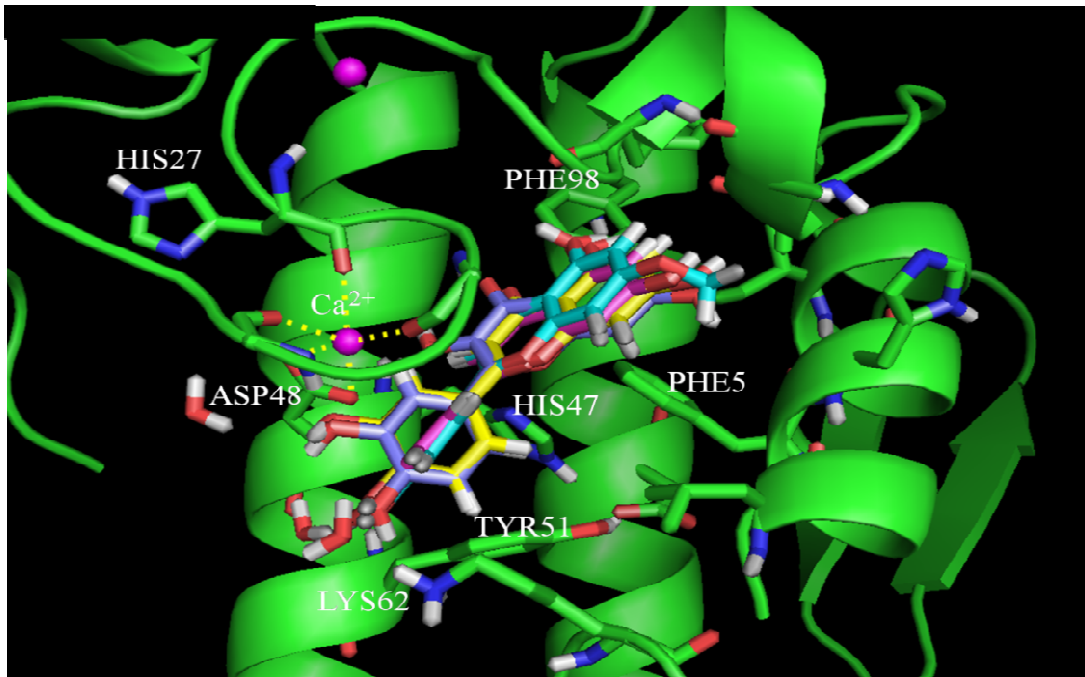


Εικόνα 4.8. Τα κάθετα διανύσματα που διέρχονται από τα κεντροειδή των αρωματικών δακτυλίων που συμμετέχουν σε αρωματικές (π - π) αλληλεπιδράσεις της απιγενίνης όπως μετρήθηκαν με το SYBYL 8.0.

Συμπερασματικά, εμφανίζεται ότι υπάρχουν ομοιότητες μεταξύ των ενώσεων κερκετίνη, λουτεολίνη, γκενκβανίνη και απιγενίνη που μελετήθηκαν. Συγκεκριμένα,

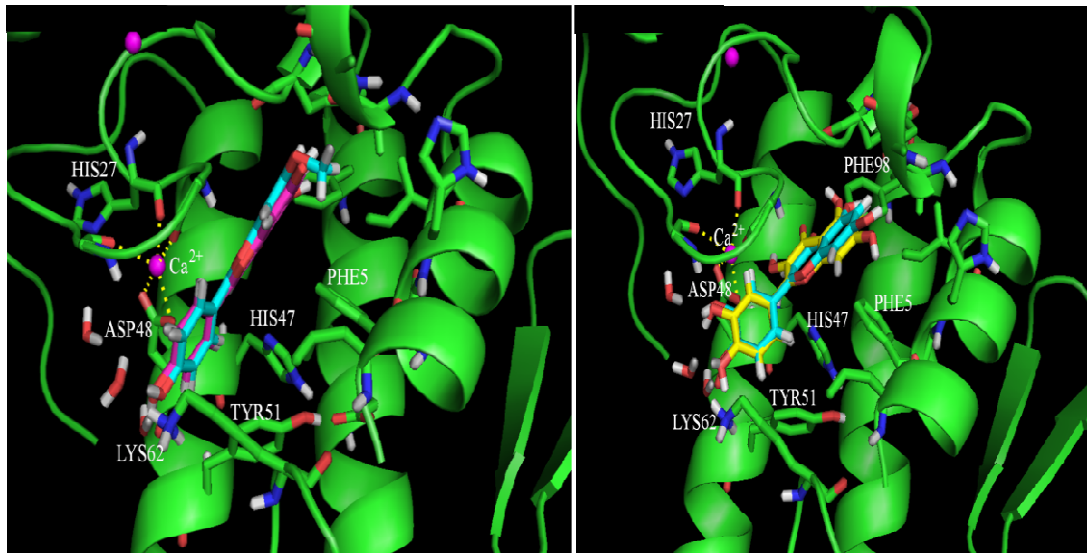
1. Το 5'-OH είναι απαραίτητο για τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με το κατιόν ασβεστίου.
2. Το 4'-OH και το 3-OH είναι απαραίτητα για τους δεσμούς υδρογόνου που αναπτύσσονται μέσω ενός μορίου νερού με τη Lys62.
3. Ο δακτύλιος A είναι απαραίτητος για την ανάπτυξη π - π stacking με Phe5, Phe98 και His47 και ο δακτύλιος B με την Tyr51 και His47.

Οι ομοιότητες και οι διαφορές τους παρουσιάζονται στις παρακάτω εικόνες υπέρθεσης. Στην Εικόνα 4.9. μπορούμε να δούμε τις ομοιότητες και τις διαφορές των κερκετίνη (με μωβ-μπλέ), λουτεολίνη (με κίτρινο), γκενκβανίνη (με γαλάζιο) και απιγενίνη (με ροζ).



Εικόνα 4.9. Ομοιότητες και διαφορές των κερκετίνη (με μωβ-μπλέ), λουτεολίνη (με κίτρινο), γκενκβανίνη (με γαλάζιο) και απιγενίνη (με ροζ).

Από αυτή την εικόνα συμπεραίνεται ότι μπορούμε να χωρίσουμε τις ενώσεις σε δύο κατηγορίες ανάλογα με τον τρόπο πρόσδεσης τους. Δηλαδή η κερκετίνη και η λουτεολίνη προσδέονται με τον ίδιο τρόπο, όπως και η γκενκβανίνη με την απιγενίνη όπως βλέπουμε στις παρακάτω εικόνες. Η διαφορά των δύο κατηγοριών αποδίδεται στον δακτύλιο Β του μορίου τους καθώς η κερκετίνη και η λουτεολίνη, όπως και η γκενκβανίνη και η απιγενίνη, έχουν αντίστοιχα ίδια δομή στο δακτύλιο Β και διαφέρουν στο 5'-OH. Γι' αυτό άλλωστε παρουσιάζουν και παρόμοιες αλληλεπιδράσεις. Ουσιαστικά το 5'-OH έχει σημαντικό ρόλο γιατί λόγω αυτού ο δακτύλιος υιοθετεί αυτή τη διαμόρφωση του, ενώ το 4'-OH της απιγενίνης και της γκενκβανίνης αλληλεπιδρά με το νερό και έτσι ο δακτύλιος υιοθετεί την άλλη διαμόρφωση. Στην Εικόνα 4.10. φαίνονται: Α) η γκενκβανίνη (με γαλάζιο) και η απιγενίνη (με ροζ), Β) η κερκετίνη (με κίτρινο) και η λουτεολίνη (με γαλάζιο). Η καλύτερη πρόσδεση της κερκετίνης με το ένζυμο, σε σχέση με τη λουτεολίνη, αποδίδεται στην ύπαρξη του 3-OH, το οποίο στην κερκετίνη αλληλεπιδρά με το Ca^{2+} .



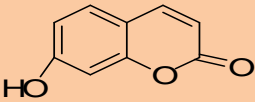
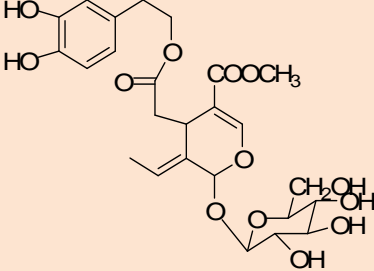
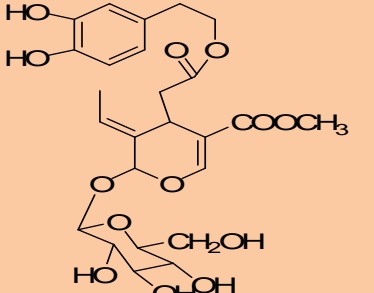
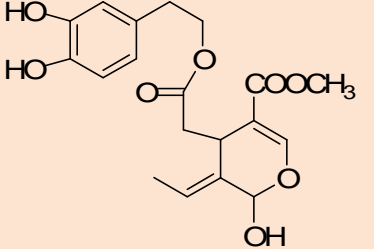
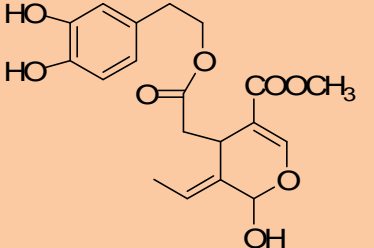
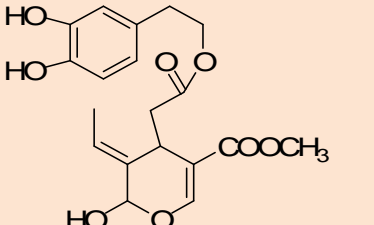
Εικόνα 4.10. Α) Η γκενκβανίνη (με γαλάζιο) και η απιγενίνη (με ροζ). Β) η κερκετίνη (με κίτρινο) και η λουτεολίνη (με γαλάζιο).

4.7 Μελέτη ουμπελλιφερόνης και ελευροπαΐνης

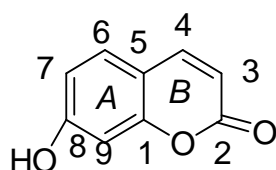
Το παρόν τμήμα της μελέτης αφορά σε δύο ενώσεις που είναι γνωστό ότι παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδη δράση: στην 7-υδροξυκουμαρίνη και στην ελευροπαΐνη. Στον Πίνακα 4.6. συνοψίζονται οι δομές των φυσικών προϊόντων που επιλέχθηκαν και οι αντίστοιχες ενέργειες πρόσδεσης τους στο ενεργό κέντρο της GIIA sPLA₂.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιούνται αποτελέσματα για τη δομή της ελευροπαΐνης που έχουν εξαχθεί κατά την πτυχιακή εργασία [182] η οποία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φαρμακευτικής Χημείας του Τμήματος Φαρμακευτικής, το έτος 2007 υπό την καθοδήγηση του Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Εμμανουήλ Μικρού. Στην πτυχιακή εργασία είχε μελετηθεί η διαμορφωτική ανάλυση της ελευροπαΐνης με φασματοσκοπία NMR και υπολογισμούς μοριακών προσομοιώσεων. Είχε διερευνηθεί ο διαμορφωτικός χώρος με τη μέθοδο Monte Carlo και είχε γίνει σύγκριση των θεωρητικών μοντέλων με τα πειραματικά φασματοσκοπικά δεδομένα. Είχε προταθεί η ύπαρξη 2 δομών του μορίου της ελευροπαΐνης σε ισορροπία. Στις δομές αυτές έπαιξε ρόλο η διεδρη γωνία των C7-C6-C5-C4 που αντιστοιχεί είτε σε 60° είτε σε 180°.

Πίνακας 4.6. Μοριακές δομές και οι τιμές του GOLDscore Fitness, GOLDscore HBond και GOLDscore van der Waals των ενώσεων:

α.α.	Όνομα	Δομή	Gsc. Fit.	Gsc. HBond	Gsc Vdw
5	7-Υδροξυκουμαρίνη		29.52	10.15	25.51
6	Ελευροπαΐνη 60°		75.51	15.28	46.76
7	Ελευροπαΐνη 180°		72.48	6.39	51.78
8	Ελευροπαΐνη χωρίς το τμήμα του σακχάρου (θ = 87°)		54.25	20.00	41.20
9	Ελευροπαΐνη 60° χωρίς το τμήμα του σακχάρου		45.59	20.14	36.60
10	Ελευροπαΐνη 180° χωρίς το τμήμα του σακχάρου		46.67	15.37	44.23

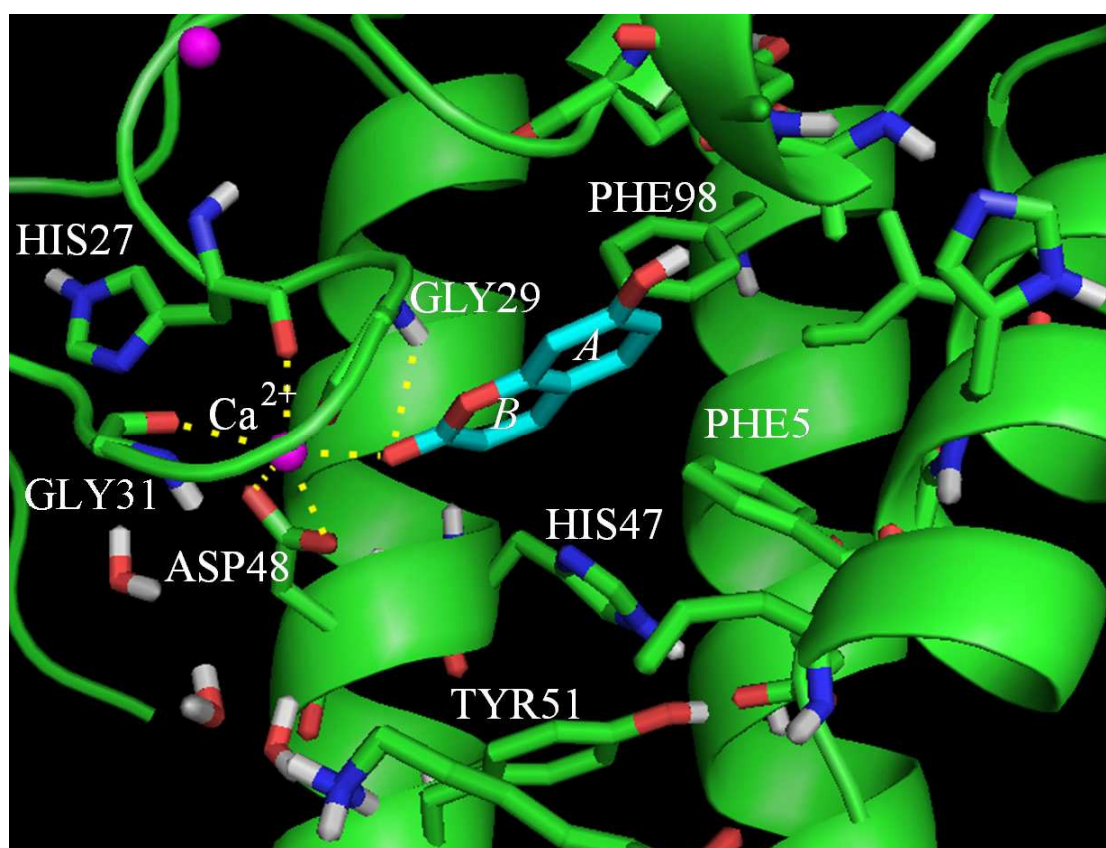
* Αλληλεπιδράσεις 7-υδροξυκουμαρίνης



Σχήμα 4.8. Δομή και αρίθμηση της 7-υδροξυκουμαρίνης.

Στο Σχήμα 4.8. παριστάνεται η δομή και η αρίθμηση των δακτυλίων του μορίου της 7-υδροξυκουμαρίνης.

Στην Εικόνα 4.11. παριστάνεται ο τρόπος αλληλεπίδρασης της 7-υδροξυκουμαρίνης στο ενεργό κέντρο της GIIA sPLA₂. Η 7-υδροξυκουμαρίνη παρουσιάζει τις εξής αλληλεπιδράσεις με το ενεργό κέντρο της GIIA sPLA₂:



Εικόνα 4.11. Τρόπος αλληλεπίδρασης της 7-υδροξυκουμαρίνης με το ενεργό κέντρο GIIA sPLA₂.

(i) Ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση του ατόμου του οξυγόνου-2 της καρβονυλομάδας του δακτυλίου B με το Ca^{2+} ($\text{O}\dots\text{Ca}^{2+}$ 2.20 Å).

(ii) Ο δεσμός υδρογόνου του ατόμου του οξυγόνου-2 της καρβονυλομάδας του δακτυλίου B με τη Gly29 ($\text{O}\dots\text{H-N}$ 1.75 Å και $\text{O}\dots\text{N}$ 2.71 Å).

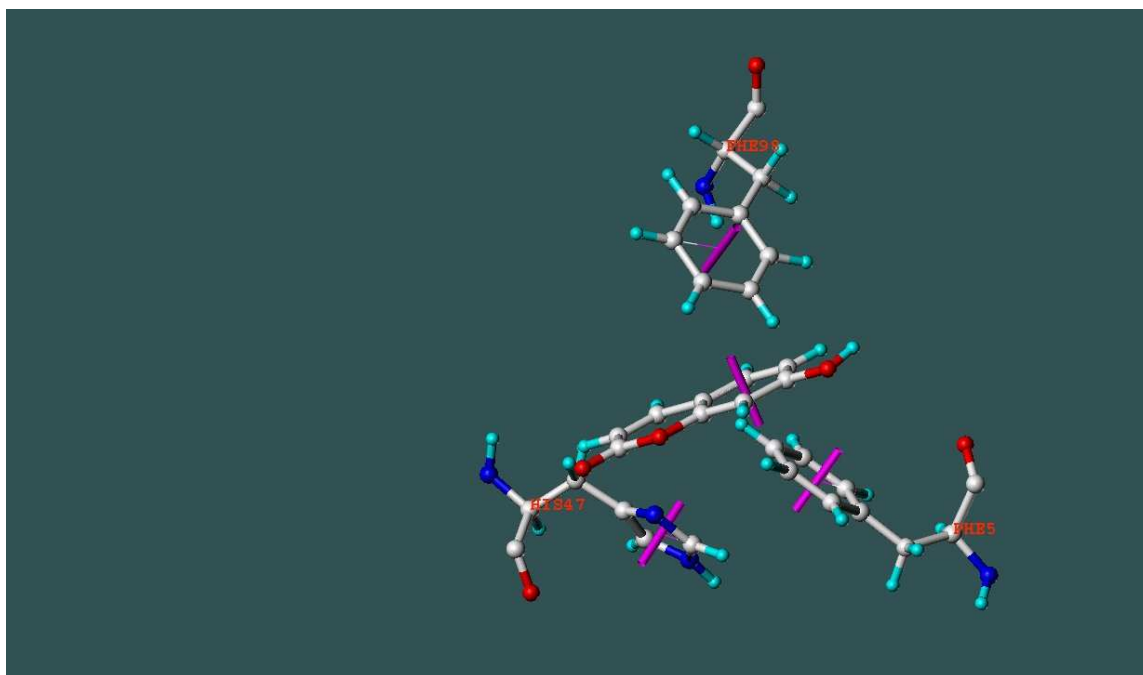
(iii) π-π Αλληλεπιδράσεις του αρωματικού δακτυλίου A με Phe5, His47 και Phe98.

Οι μετρούμενες αποστάσεις και γωνίες συνοψίζονται στον Πίνακα 4.7.

Πίνακας 4.7. Αλληλεπιδράσεις της 7-υδροξυκουμαρίνης

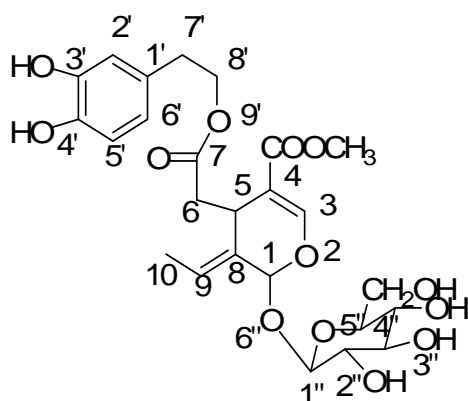
Αλληλεπίδραση	Απόσταση σε Å
$\text{Ca}^{2+} \dots \text{O}=\text{C}$	2.20
Gly29 – O=C	
O...N-H	1.75
O...O	2.71
Αλληλεπίδραση	Απόσταση σε Å Γωνίες σε μοίρες
A- PHE5	4.72 , $\theta= 51$
A- PHE98	5.63 , $\theta= 66$
A-HIS47	6.17 , $\theta= 46$

Στη Εικόνα 4.12 παριστάνονται τα κάθετα διανύσματα που διέρχονται από τα κεντροειδή των αρωματικών αλληλεπιδράσεων που συμμετέχουν σε αρωματικές (π-π) αλληλεπιδράσεις. Για τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε το πακέτο μοριακής μοντελοποίησης SYBYL 8.0.



Εικόνα 4.12. Τα κάθετα διανύσματα που διέρχονται από τα κεντροειδή των αρωματικών δακτυλίων που συμμετέχουν σε αρωματικές (π-π) αλληλεπιδράσεις της 7-υδροξυκουμαρίνης όπως μετρήθηκαν με το SYBYL 8.0.

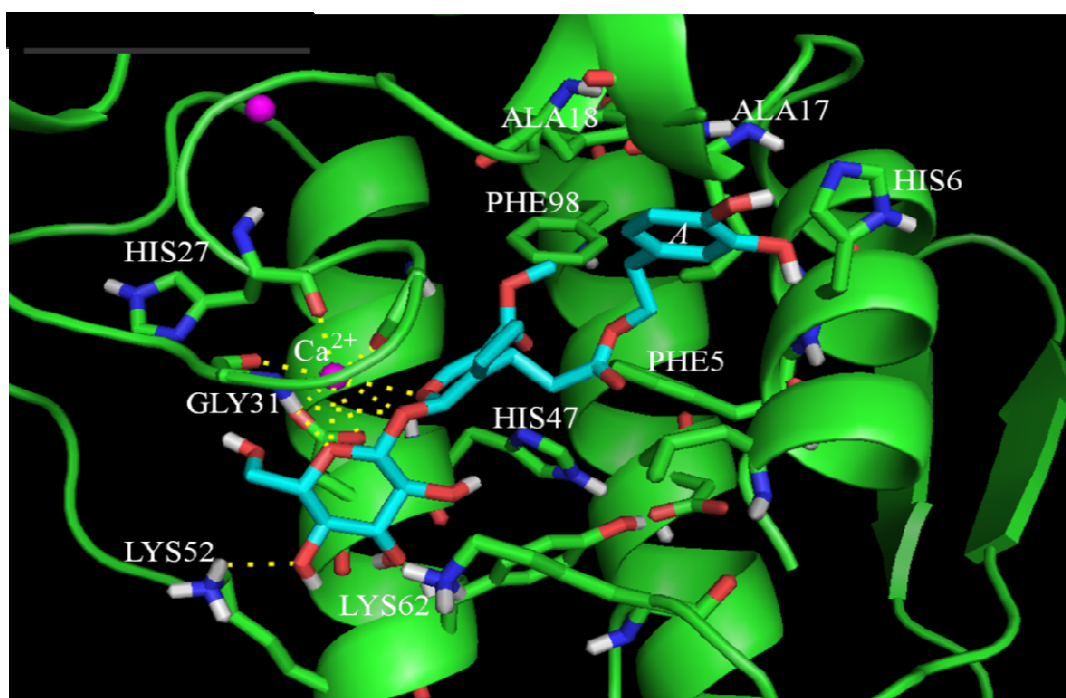
* Αλληλεπιδράσεις ελευροπαΐνης 60°



Σχήμα 4.9. Δομή και αρίθμηση ελευροπαΐνης.

Στο Σχήμα 4.9. παριστάνεται η δομή και η αρίθμηση των δακτυλίων του μορίου της ελευροπαΐνης.

Στην Εικόνα 4.13. φαίνεται ο τρόπος αλληλεπίδρασης της ελευροπαΐνης με το ενεργό κέντρο της GIIA sPLA₂. Το πρόγραμμα GOLD κατά την υπέρθεση τροποποιήθηκε η γωνία που αρχικά εμείς ορίσαμε. Δηλαδή ενώ ορίσαμε γωνία 60°, το πρόγραμμα τροποποίησε την γωνία στις 132° για να καταφέρει να την τοποθετήσει στο ενεργό κέντρο της GIIA sPLA₂:



Εικόνα 4.13. Τρόπος αλληλεπίδραση της ελευροπαΐνης 60° στο ενεργό κέντρο της GIIA sPLA₂.

Οι αλληλεπιδράσεις που παρατηρήθηκαν είναι:

(i) α) Ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση του O-5'' του δακτυλίου του σακχάρου με το Ca²⁺ (O...Ca²⁺ 2.69 Å) και β) ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση του O-6'' του γλυκοζιτικού δεσμού με το Ca²⁺ (O...Ca²⁺ 3,14 Å), τιμή που αποτελεί όριο αποδοχής και γ) ηλεκτροστατική αλληλεπιδράση του O-2 με το Ca²⁺ (O...Ca²⁺ 2.67 Å).

(ii) Ο δεσμός υδρογόνου: α) του O-5'' του γλυκοζίτη με την Gly31 (O...H-N 2.34 Å και O...N 3.32 Å), β) του O-6'' με την Gly31 (O...H-N 3.17 Å και O...N 3.89 Å) και γ) του O-2'' με την Lys52 (O...H-N 2.90 Å και O...N 2.32 Å).

(iii) π-π Αλληλεπιδράσεις του αρωματικού δακτυλίου με την His47.

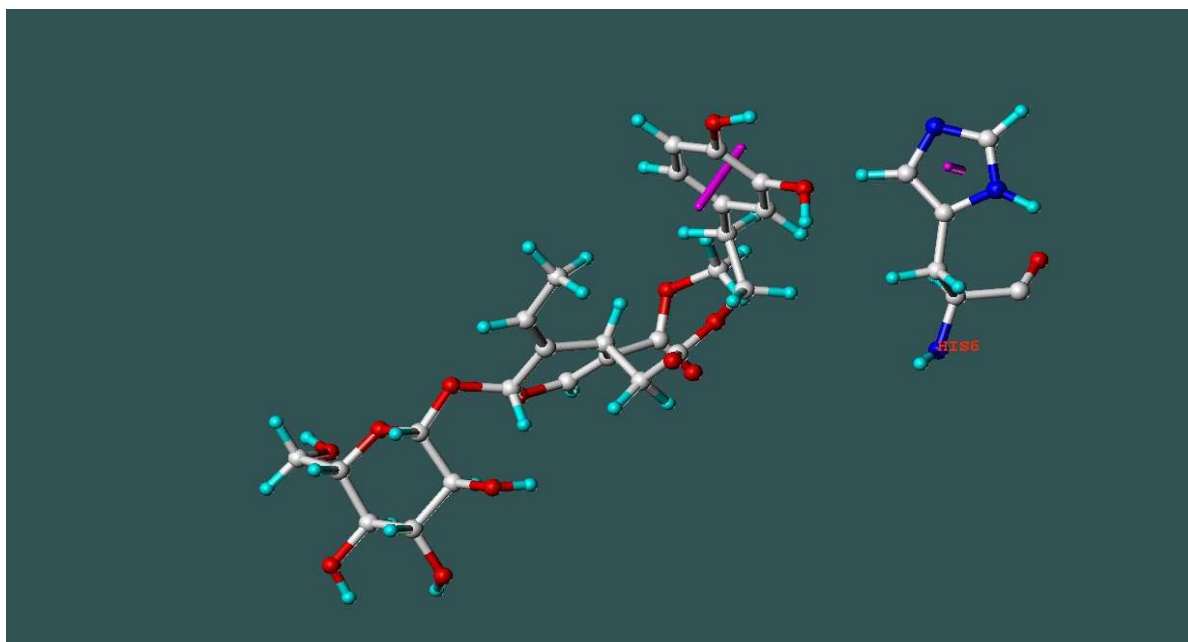
(iv) van der Waals αλληλεπιδράσεις του αρωματικού δακτυλίου με την Ala17.

Αναλυτικότερα παριστάνονται οι αποστάσεις και οι γωνίες στον παρακάτω Πίνακα.

Πίνακας 4.8. Αλληλεπιδράσεις ελευροπαΐνης

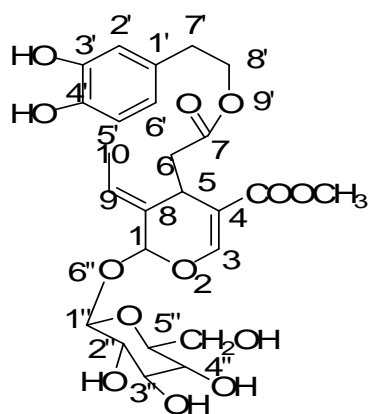
Αλληλεπίδραση	Απόσταση σε Å
5''-O...Ca ²⁺	2.69
6''-O...Ca ²⁺	3.14
2-O...Ca ²⁺	2.67
Gly31- O-5'' O...H-N O...N 3.32 Å	2.34 3.32
Gly31- O6'' O...H-N O...N	3.17 3.89
Lys52- OH-2'' O...H-N O...N	2.90 2.32
Δακτύλιος A – Ala 17	4.91
Αλληλεπίδραση	Απόσταση σε Å Γωνίες σε μοίρες
A-HIS6	5.63 , θ= 65

Στην Εικόνα 4.14. παριστάνονται τα κάθετα διανύσματα που διέρχονται από τα κεντροειδή του αρωματικού δακτυλίου που συμμετέχουν σε αρωματικές αλληλεπιδράσεις (π-π). Για τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε το πακέτο μοριακής μοντελοποίησης SYBYL 8.0.



Εικόνα 4.14. Τα κάθετα διανύσματα που διέρχονται από τα κεντροειδή των αρωματικών δακτυλίων που συμμετέχουν σε αρωματικές αλληλεπιδράσεις της ελευροπαΐνης όπως μετρήθηκε με το SYBYL 8.0.

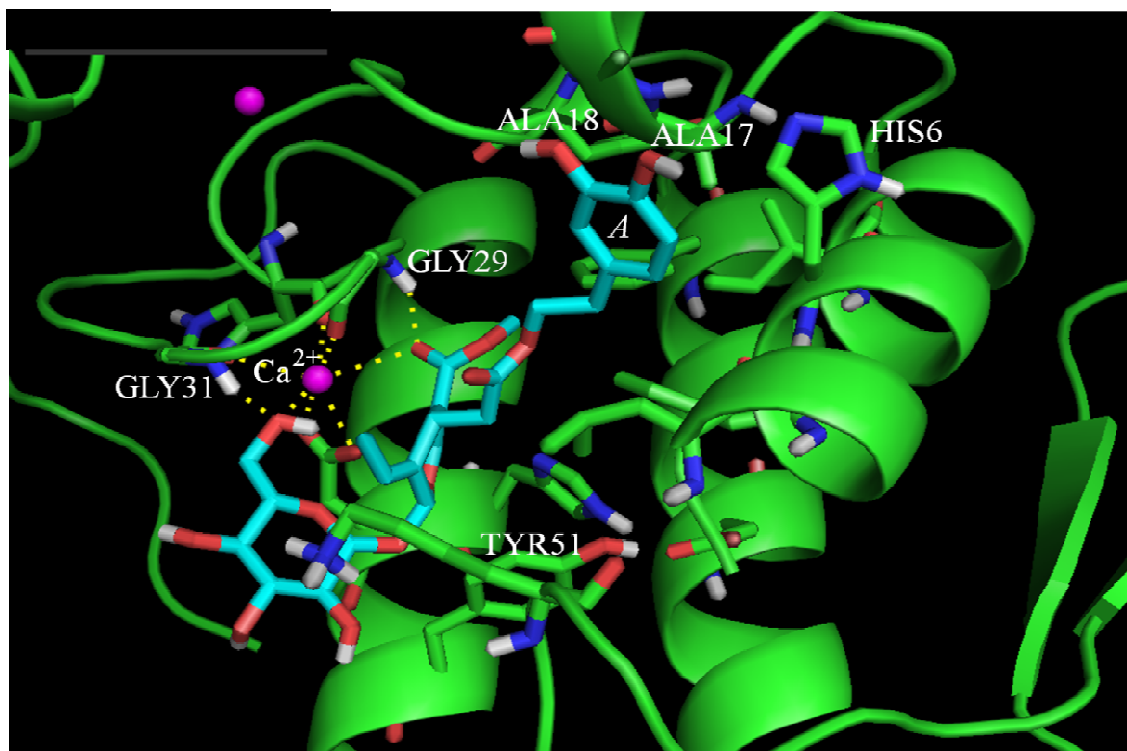
* Αλληλεπιδράσεις ελευροπαΐνης 180°



Σχήμα 4.10. Δομή και αρίθμηση ελευροπαΐνης 180°.

Στο Σχήμα 4.10. παριστάνεται η δομή και η αρίθμηση των δακτυλίων του μορίου της ελευροπαΐνης.

Στην Εικόνα 4.15. παριστάνεται ο τρόπος αλληλεπίδρασης της ελευροπαΐνης με το ενεργό κέντρο της GIIA sPLA₂. Το πρόγραμμα GOLD που χρησιμοποιήσαμε κατά την πρόσδεση τροποποίησε τη γωνία από 180° σε 118°.



Εικόνα 4.15. Τρόπος αλληλεπίδρασης της ελευροπαΐνης 180 στο ενεργό κέντρο της GIIA sPLA₂.

Οι αλληλεπιδράσεις που παρατηρήθηκαν είναι:

(i) Ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση: α) του CO OCH₃ της εστερικής ομάδας με το Ca²⁺ (O...Ca²⁺ 3.22 Å) και β) του CH₂OH με το Ca²⁺ (O...Ca²⁺ 2.13 Å).

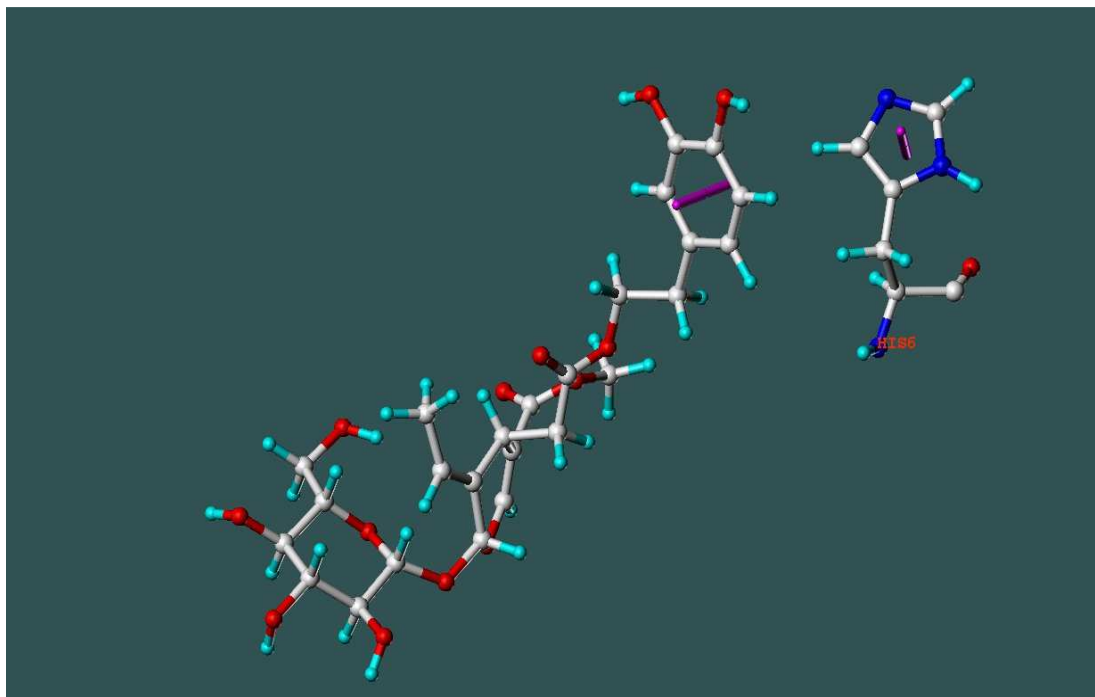
(ii) Ο δεσμός υδρογόνου: α) του CH₂OH με την Gly31 (O...H-N 2.00 Å και O...N 2.84 Å) και β) του CH₂OH με την Gly29 (O...H-N 2.33 Å).

(iii) π-π Αλληλεπιδράσεις του αρωματικού δακτυλίου με την His6. Αναλυτικότερα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 4.9. Αλληλεπιδράσεις ελευροπαΐνης

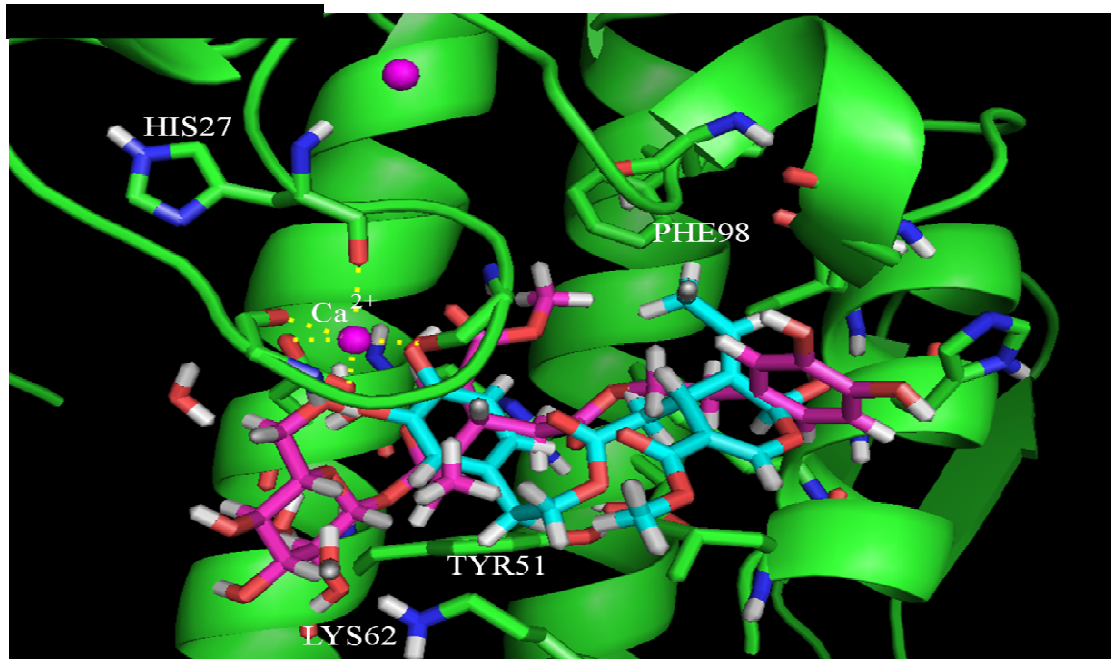
Αλληλεπίδραση	Απόσταση σε Å
(CO OCH ₃)-O...Ca ²⁺	3.22
(CH ₂ OH)-O...Ca ²⁺	2.13
Gly31- CH ₂ OH	
O...H-N	2.00
O...N	2.84
Gly29(H)- CO OCH ₃	2.33
Αλληλεπίδραση	Απόσταση σε Å
A-HIS6	5.33 Å, θ=22°

Στην Εικόνα 4.16. παριστάνονται τα κάθετα διανύσματα που διέρχονται από τα κεντροειδή του αρωματικού δακτυλίου που συμμετέχουν σε αρωματικές αλληλεπιδράσεις (π-π). Για τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε το πακέτο μοριακής μοντελοποίησης SYBYL 8.0.



Εικόνα 4.16. Τα κάθετα διανύσματα που διέρχονται από τα κεντροειδή των αρωματικών δακτυλίων που συμμετέχουν σε αρωματικές αλληλεπιδράσεις της ελευροπαΐνης όπως μετρήθηκε με το SYBYL 8.0.

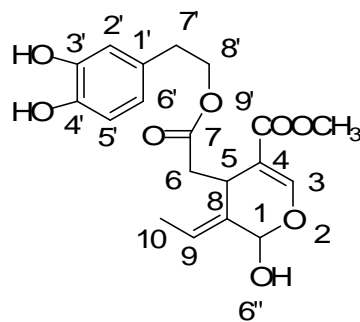
Με όλα όσα αναφέραμε παραπάνω είναι φανερό ότι η τιμή της diedρης γωνίας επηρεάζει τον τρόπο πρόσδεσης στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Αυτό μπορεί να διαπιστωθεί στην παρακάτω Εικόνα 4.17 υπέρθεσης των δομών. Το Ca^{2+} συμπλέκεται με τα οξυγόνα του σακχάρου και του γλυκοζίτη όταν η γωνία είναι 132° . Όταν όμως η γωνία είναι 118° , το εστερικό καρβονύλιο και η υδροξυμεθυλομάδα του σακχάρου συμπλέκονται με το Ca^{2+} .



Εικόνα 4.17. Η ελευροπαΐνη 60° (με γαλάζιο) και η ελευροπαΐνη 180° (με ροζ).

Και οι δύο δομές παρουσιάζουν υψηλή βαθμονόμηση πρόσδεσης GOLDscore Fitness. Παρατηρώντας ότι το σάκχαρο της ελευροπαΐνης δεν προσαρμόζεται ικανοποιητικά στο ενεργό κέντρο του ενζύμου αποφασίσθηκε να μελετηθεί το άγλυκο τμήμα του μορίου μόνο του.

* Αλληλεπιδράσεις ελευροπαΐνης χωρίς το τμήμα του σακχάρου

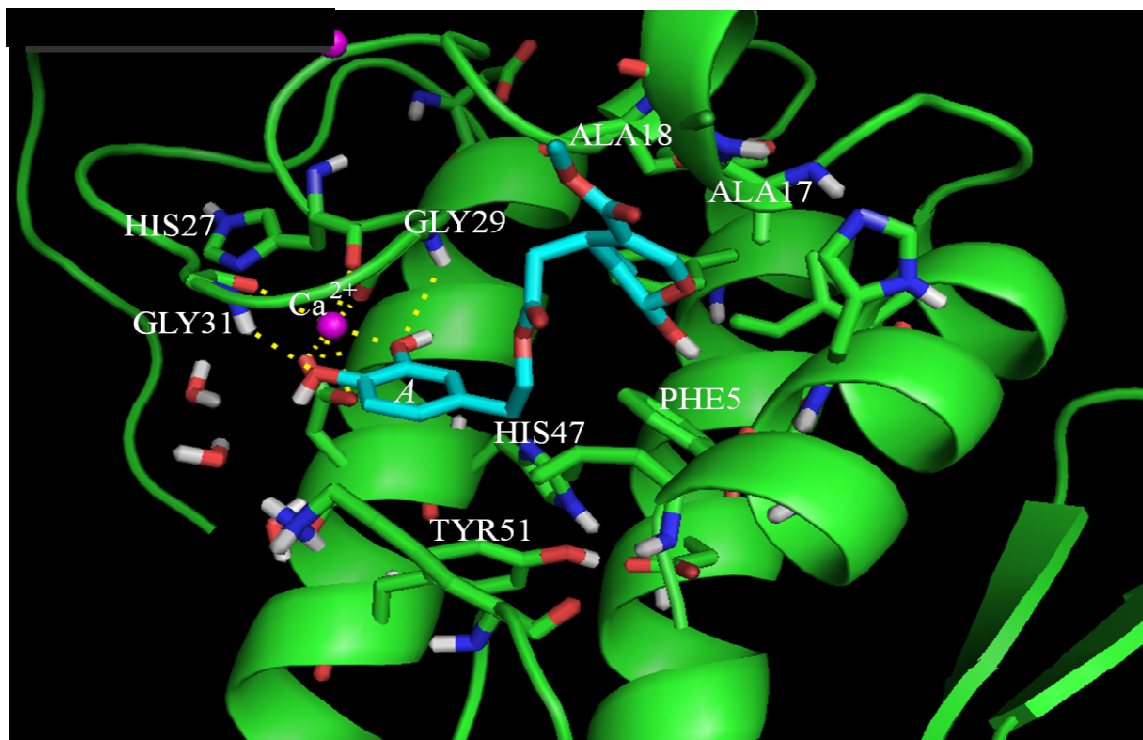


Σχήμα 4.11. Δομή και αρίθμηση ελευροπαΐνης άγλυκο.

Στο Σχήμα 4.11. παριστάνεται η δομή και η αρίθμηση των δακτυλίων του μορίου της ελευροπαΐνης.

Στην Εικόνα 4.18. παριστάνεται ο τρόπος αλληλεπίδρασης της ελευροπαΐνης με το ενεργό κέντρο της GIIA sPLA₂.

Στην συγκεκριμένη περίπτωση δεν ορίστηκε η διεδρη γωνία που μας ενδιαφέρει (7-6-5-4. Το μόριο κατά την πρόσδεση λαμβάνει τιμή $\theta = 87^\circ$.



Εικόνα 4.18. Τρόπος αλληλεπίδρασης της ελευροπαΐνης στο ενεργό κέντρο της GIIA sPLA₂.

Από τη μελέτη του άγλυκου της ελευροπαΐνης παρατηρήθηκε:

(i) Ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση: α) του 3'-OH με το Ca²⁺ (O...Ca²⁺ 1.98 Å) και β) του 4'-OH με το Ca²⁺ (O...Ca²⁺ 2.05 Å).

(ii) Ο δεσμός υδρογόνου: α) του 3'-OH με την Gly31 (O...H-N 2.60 Å και O...N 3.91 Å) και β) του 4'-OH με την Gly29 (O...H-N 3.15 Å).

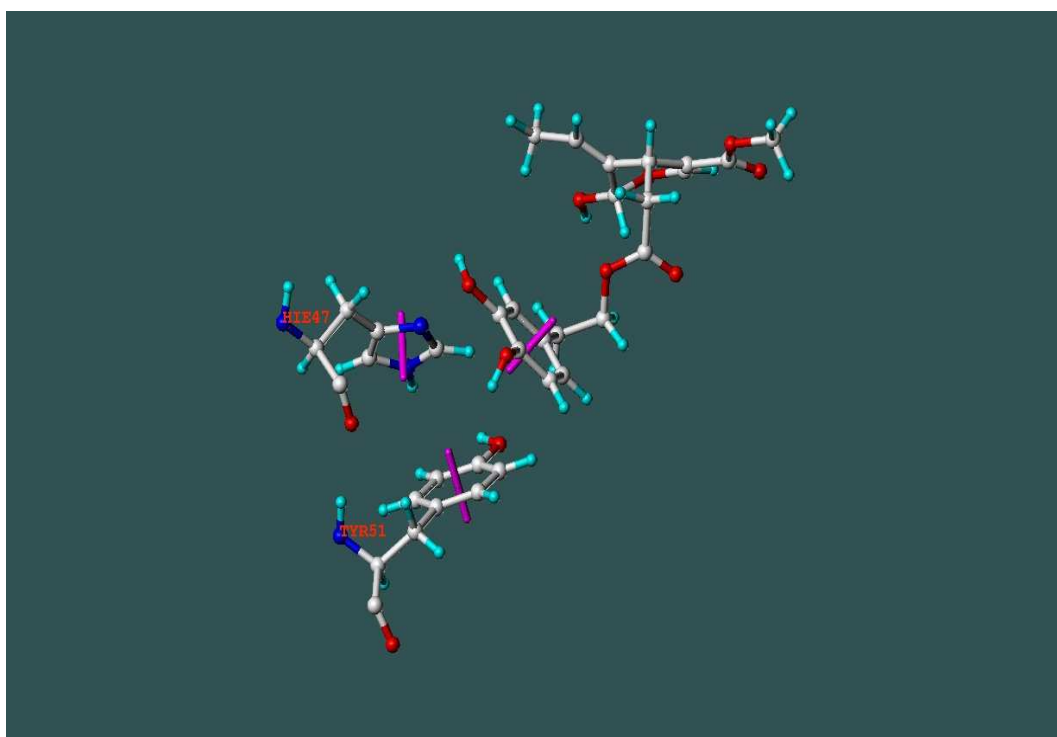
(iii) π-π αλληλεπιδράσεις του αρωματικού δακτυλίου με την His47 και την Tyr51.

Αναλυτικότερα παριστάνονται στον παρακάτω Πίνακα οι αποστάσεις και οι γωνίες που μετρήθηκαν.

Πίνακας 4.10 Αλληλεπιδράσεις ελευροπαΐνης άγλυκο.

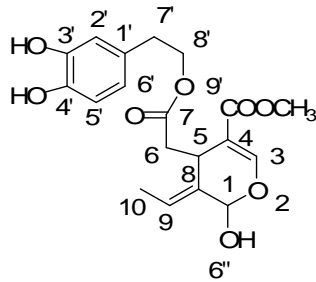
Αλληλεπίδραση	Απόσταση σε Å
3'-O...Ca ²⁺	1.98
4'-O...Ca ²⁺	2.05
Gly31 -OH (3')	
O...H-N	2.60
O...N	3.91
Gly29(H) -OH (4')	3.15
Αλληλεπίδραση	Απόσταση σε Å Γωνίες σε μοίρες
A-HIS47	5.41 , θ=3
A-TYR51	5.75 , θ=81

Στην Εικόνα 4.19. παριστάνονται τα κάθετα διανύσματα που διέρχονται από τα κεντροειδή του αρωματικού δακτυλίου που συμμετέχουν σε αρωματικές αλληλεπιδράσεις (π-π). Για τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε το πακέτο μοριακής μοντελοποίησης SYBYL 8.0.



Εικόνα 4.19. Τα κάθετα διανύσματα που διέρχονται από τα κεντροειδή των αρωματικών δακτυλίων που συμμετέχουν σε αρωματικές αλληλεπιδράσεις της ελευροπαΐνης όπως μετρήθηκε με το SYBYL 8.0.

* Αλληλεπιδράσεις ελευροπαΐνης 60° χωρίς το τμήμα του σακχάρου

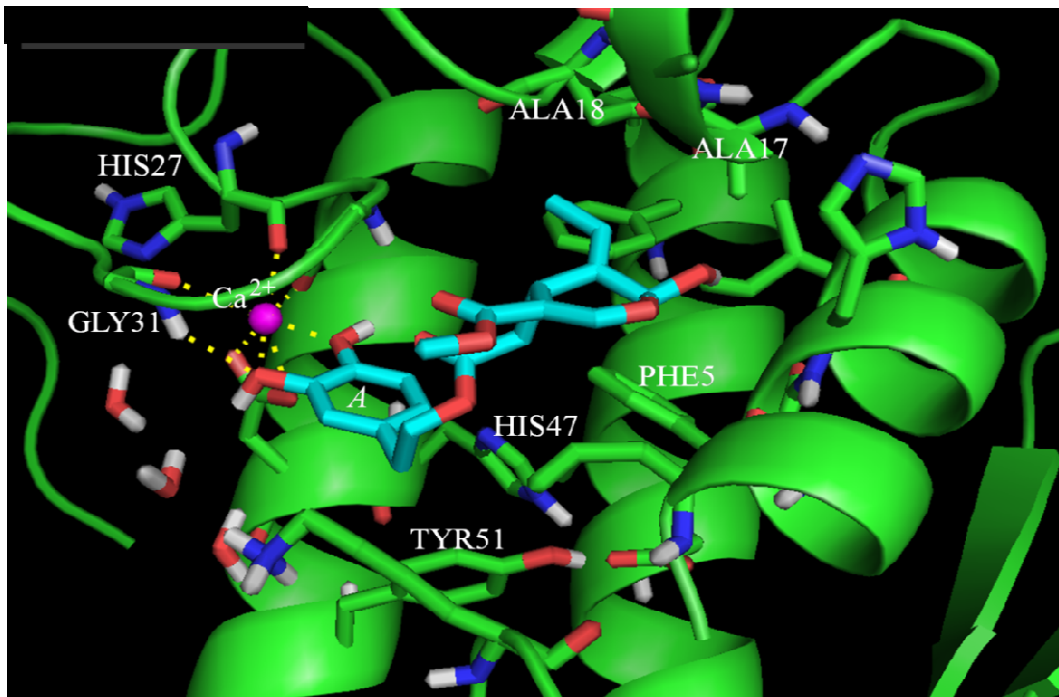


Σχήμα 4.12. Δομή και αρίθμηση ελευροπαΐνης 60° άγλυκο.

Στο Σχήμα 4.12. φαίνεται η δομή και η αρίθμηση των δακτυλίων του μορίου της ελευροπαΐνης.

Στην Εικόνα 4.20. φαίνεται ο τρόπος αλληλεπίδρασης της ελευροπαΐνης με το ενεργό κέντρο της GIIA sPLA₂.

Το πρόγραμμα GOLD διατηρεί την δίεδρη γωνία που μας ενδιαφέρει (7-6-5-4) σε γωνία $\theta = 60^\circ$, όπως ακριβώς αρχικά την ορίσαμε.



Εικόνα 4.20. Τρόπος αλληλεπίδρασης της ελευροπαΐνης 60° χωρίς το μόριο του σακχάρου στο ενεργό κέντρο της GIIA sPLA₂.

Από τη μελέτη παρατηρήθηκαν:

(i) Ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση: α) του 3'-OH με το Ca^{2+} ($\text{O}\dots\text{Ca}^{2+}$ 2.08 Å) και β) του 4'-OH με το Ca^{2+} ($\text{O}\dots\text{Ca}^{2+}$ 2.00 Å).

(ii) Ο δεσμός υδρογόνου του 3'-OH με την Gly31 ($\text{O}\dots\text{H-N}$ 2.60 Å και $\text{O}\dots\text{N}$ 3.48 Å).

(iii) π-π Αλληλεπιδράσεις του αρωματικού δακτυλίου με την His47 και Tyr51.

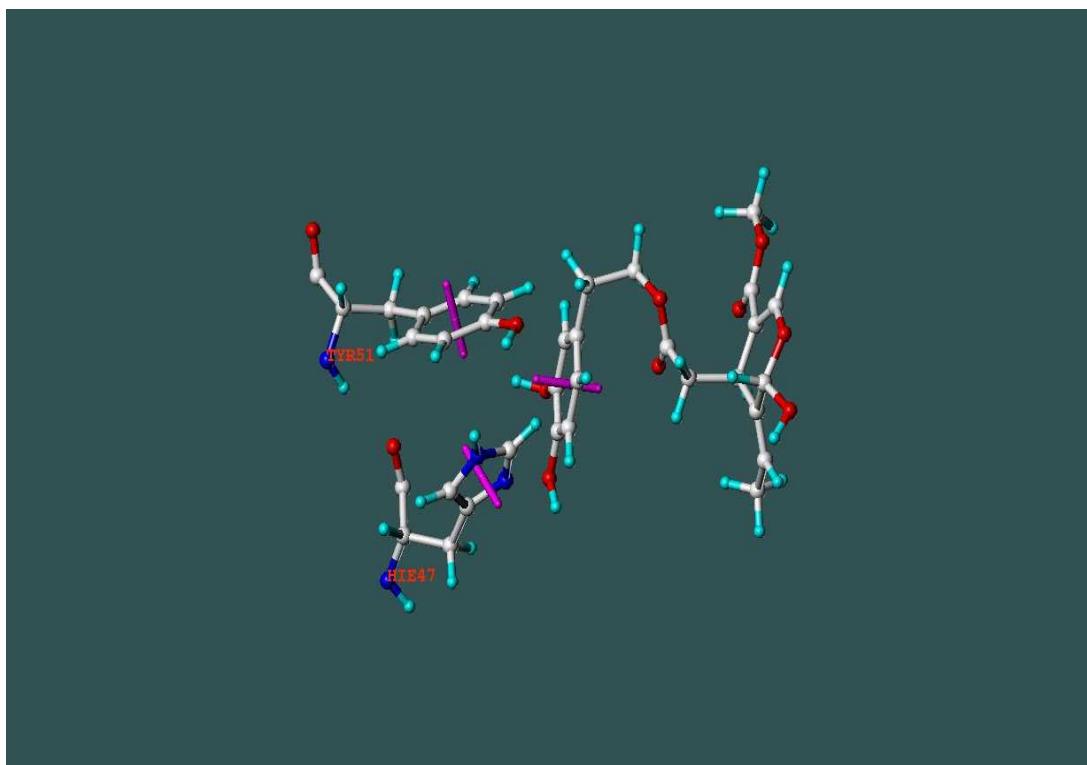
(iv) Αλληλεπιδράσεις van der Waals του C=C(8) με την Ala17.

Αναλυτικότερα φαίνονται στον παρακάτω Πίνακα οι αποστάσεις και οι γωνίες που μετρήθηκαν.

Πίνακας 4.11. Αλληλεπιδράσεις ελευροπαΐνης 60° χωρίς το μόριο του σακχάρου.

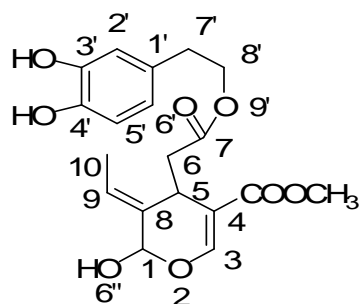
Αλληλεπίδραση	Απόσταση σε Å
3'-O...Ca ²⁺	2.08
4'-O...Ca ²⁺	2.00
Gly31 –OH-3' O...H-N	2.60
O...N	3.48
C=C (8) – C Ala 17	3.79
Αλληλεπίδραση	Απόσταση σε Å Γωνίες σε μοίρες
A-HIS47	5.66 , θ=13
A-TYR51	5.42 , θ=71

Στην Εικόνα 4.21. παριστάνονται τα κάθετα διανύσματα που διέρχονται από τα κεντροειδή του αρωματικού δακτυλίου που συμμετέχουν σε αρωματικές αλληλεπιδράσεις (π-π). Για τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε το πακέτο μοριακής μοντελοποίησης SYBYL 8.0.



Εικόνα 4.21. Τα κάθετα διανύσματα που διέρχονται από τα κεντροειδή των αρωματικών δακτυλίων που συμμετέχουν σε αρωματικές αλληλεπιδράσεις της ελευροπαΐνης όπως μετρήθηκε με το SYBYL 8.0.

* Αλληλεπιδράσεις ελευροπαΐνης 180° χωρίς το τμήμα του σακχάρου

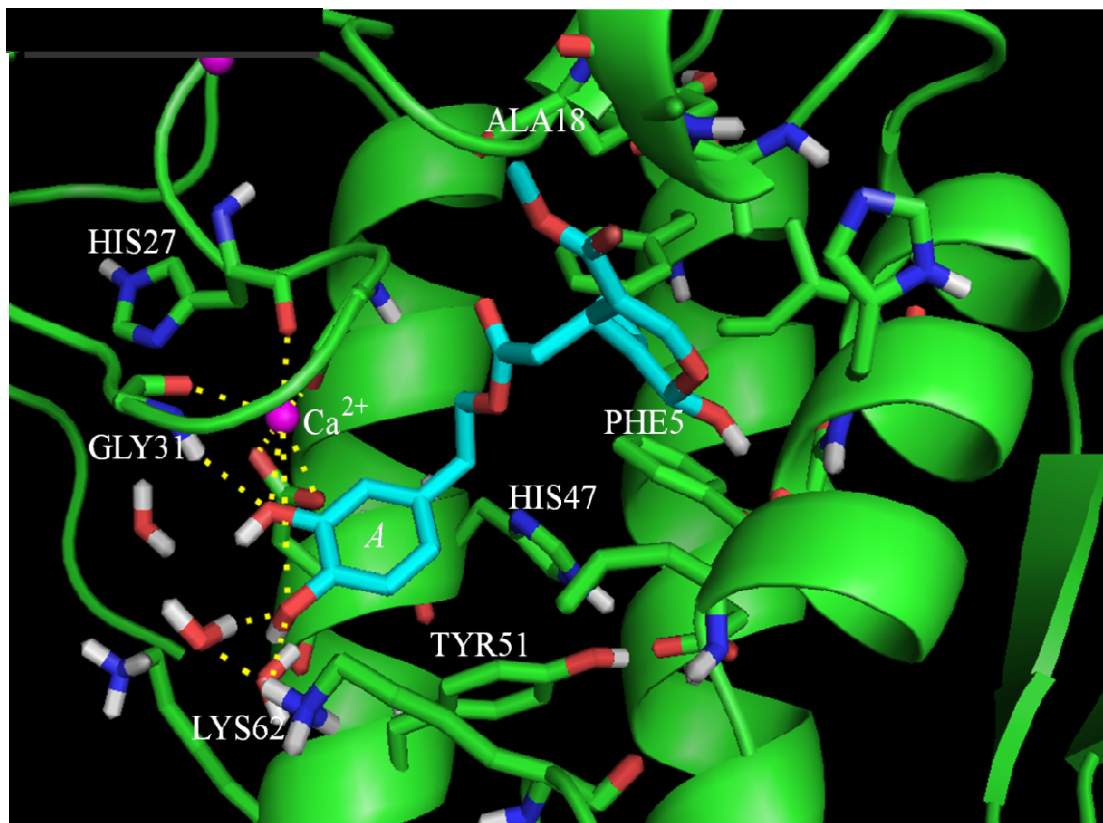


Σχήμα 4.13. Δομή και αρίθμηση ελευροπαΐνης 180° χωρίς το τμήμα του σακχάρου.

Στο Σχήμα 4.13. παριστάνεται η δομή και η αρίθμηση των δακτυλίων του μορίου της ελευροπαΐνης.

Στην Εικόνα 4.22. φαίνεται ο τρόπος αλληλεπίδρασης της ελευροπαΐνης με το ενεργό κέντρο της GIIA sPLA₂.

Η δίεδρη γωνία που μας απασχολεί παραμένει σχεδόν αμετάβλητη (7-6-5-4) σε τιμή $\theta = 179^\circ$, ενώ εμείς αρχικά ορίσαμε γωνία 180° κατά τη πρόσδεση στον υποδοχέα.



Εικόνα 4.22. Τρόπος τοποθέτησης του άγλυκου τμήματος της ελευροπαΐνης 180° χωρίς το μόριο του σακχάρου στο ενεργό κέντρο του ενζύμου.

Από τη μελέτη παρατηρήθηκε:

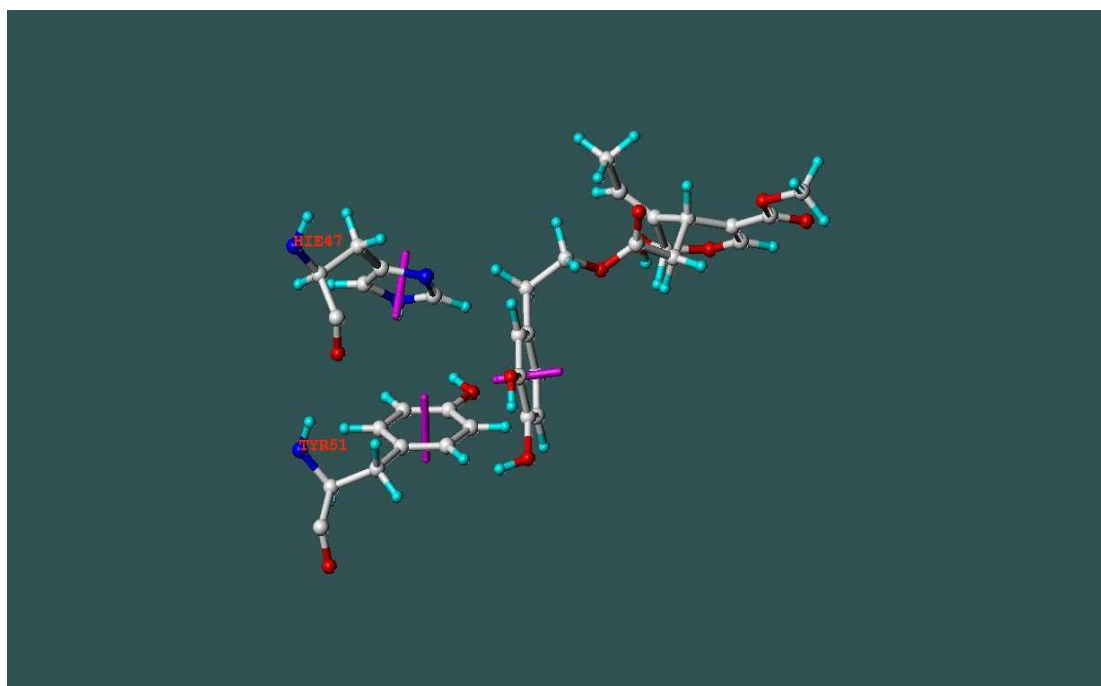
- (i) Ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση του 3'-OH με το Ca^{2+} ($\text{O}\dots\text{Ca}^{2+}$ 2.57 Å).
- (ii) Ο δεσμός υδρογόνου: α) του 3'-OH με την Gly31 ($\text{O}\dots\text{H-N}$ 2.57 Å και $\text{O}\dots\text{N}$ 3.59 Å) και β) του 4'-OH με τη Lys62 μέσω ενός μορίου νερού ($\text{O}\dots\text{H-O}\dots\text{H-N}$ 1.96 Å, 1.89 Å και $\text{O}\dots\text{O}\dots\text{N}$ 2.95 Å, 2.90 Å).
- (iii) π - π Αλληλεπιδράσεις του αρωματικού δακτυλίου με τη His47 και Tyr51.
- (iv) Αλληλεπιδράσεις van der Waals του $\text{C}=\text{C}(8)$ με την Phe5 και του οξυγόνου της ομάδας $-\text{COOCH}_3$ με την Ala18.

Αναλυτικότερα παριστάνονται στον παρακάτω Πίνακα οι αποστάσεις και οι γωνίες που μετρήθηκαν.

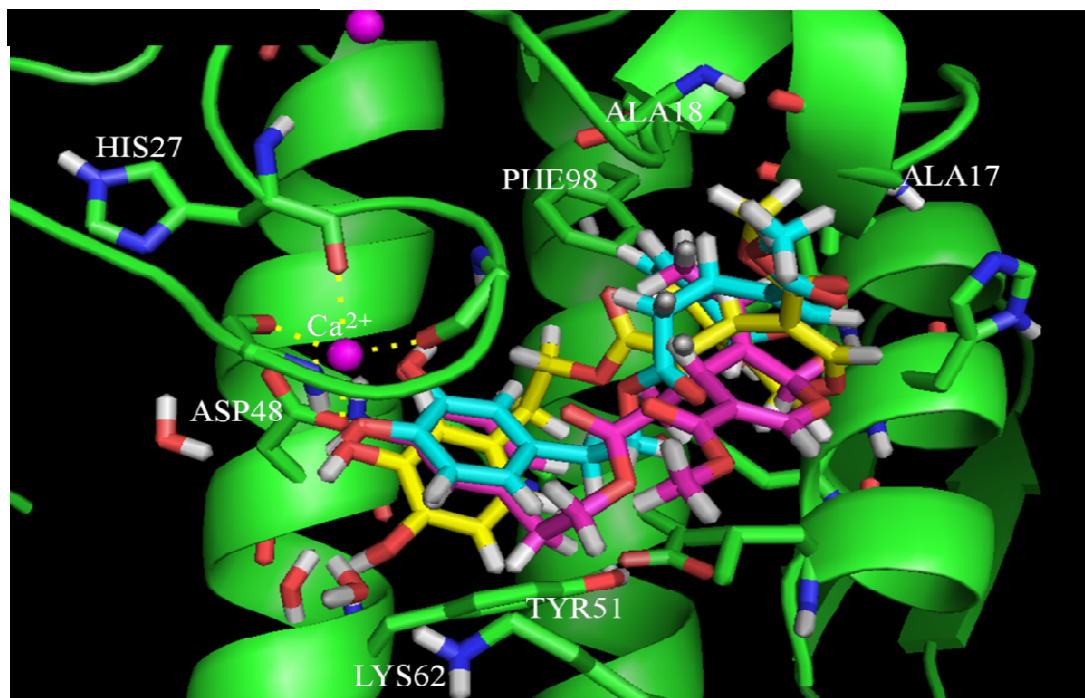
Πίνακας 4.12. Αλληλεπιδράσεις ελευροπαΐνης 180^ο χωρίς το τμήμα του σακχάρου.

Αλληλεπίδραση	Απόσταση σε Å
Ca ²⁺ –OH 3'	2.57
GLy31 –OH 3'	
O...H-N	2.57
O...N	3.59
Lys62– H ₂ O (13) –OH 4'	
O...H-O...H-N	1.96 , 1.89
O...O...N	2.95 , 2.90
C=C (8) – PHE5	4.02
COOCH ₃ – Ala18	3.69
Αλληλεπίδραση	Απόσταση σε Å Γωνίες σε μοίρες
A-HIS47	6.07 , θ=21
A-TYR51	5.14 , θ=57

Στην Εικόνα 4.23. παριστάνονται τα κάθετα διανύσματα που διέρχονται από τα κεντροειδή του αρωματικού δακτυλίου που συμμετέχουν σε αρωματικές αλληλεπιδράσεις (π-π). Για τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε το πακέτο μοριακής μοντελοποίησης SYBYL 8.0.



Εικόνα 4.23. Τα κάθετα διανύσματα που διέρχονται από τα κεντροειδή των αρωματικών δακτυλίων που συμμετέχουν σε αρωματικές αλληλεπιδράσεις της ελευροπαΐνης όπως μετρήθηκε με το SYBYL 8.0.



Εικόνα 4.24. Η ελευροπαΐνη χωρίς το τμήμα του σακχάρου (με γαλάζιο), η ελευροπαΐνη 60° χωρίς το τμήμα του σακχάρου (με ροζ) και η ελευροπαΐνη 180° χωρίς το τμήμα του σακχάρου (με κίτρινο).

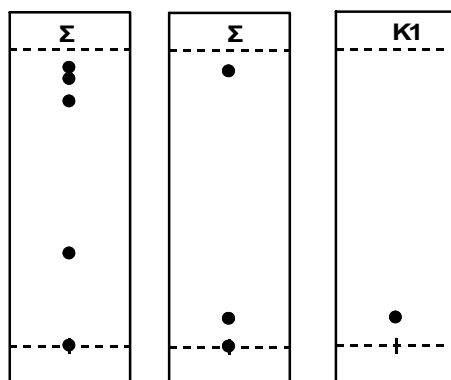
Συμπερασματικά, το άγλυκο τμήμα στο οποίο δεν ορίσαμε διεδρη γωνία εμφανίζει το μεγαλύτερο GOLDscore fitness. Στην Εικόνα 4.24. παρουσιάζεται η υπέρθεση της ελευροπαΐνης χωρίς το τμήμα του σακχάρου (με γαλάζιο), η ελευροπαΐνη 60° χωρίς το τμήμα του σακχάρου (με ροζ) και η ελευροπαΐνη 180° χωρίς το τμήμα του σακχάρου (με κίτρινο). Ενώ το κάθε ένα παρουσιάζει δικό του τρόπο πρόσδεσης, βλέπουμε ότι ο αρωματικός δακτύλιος τοποθετείται με τον ίδιο τρόπο και αλλάζει η διεύθυνση του υπόλοιπου τμήματος. Ουσιαστικά, οι υδροξυλομάδες στην θέση 3' και 4' κλειδώνουν τον δακτύλιο μας να καταλάβει τη θέση που παριστάνεται στην Εικόνα 4.24.

4.8. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ

4.8.1. Εκχύλιση φασκόμηλου

Συσκευασμένο φασκόμηλο του εμπορίου αγοράστηκε από την τοπική αγορά και κονιοποιήθηκε με τη βοήθεια κοπτικής μηχανής. Αλεσμένο ξηρό υλικό 30 g εκχυλίστηκε με 200 mL αιθανόλης, στους 30 °C, για 1 ώρα υπό ανάδευση και αποκλεισμό φωτός. Η διαδικασία της εκχύλισης επαναλήφθηκε τρεις φορές. Στη συνέχεια, το μίγμα διηθήθηκε από βαμβάκι και το διήθημα συμπυκνώθηκε μέχρι ξηρού, οπότε απομονώθηκε στερεό Σ, βάρους 3.21 g. Στο στερεό Σ προστέθηκε πετρελαϊκός αιθέρας υπό ανάδευση για 10 min. Μετά τη διήθηση από ηθμό παρέμεινε αδιάλυτο στερεό Σ₁ που στεγνώθηκε και ζυγίστηκε βάρους, 1,32 g. Ενώ το διήθημα συμπυκνώθηκε μέχρι ξηρού και προέκυψε στερεό Σ₂, βάρους 1,89 g. Το στερεό Σ₁ (600 mg) διαλύθηκε σε 4 mL μεθανόλης και αναμίχθηκε με 5 g silica gel. Το μίγμα στεγνώθηκε και χρωματογραφήθηκε σε στήλη με silica gel και διαλύτη έκλουσης CHCl₃:MeOH, 9:1 v/v. Απομονώθηκε κλάσμα Κ₁, βάρους 100 mg.

Στο Σχήμα 4.14, φαίνεται το χρωματογράφημα λεπτής στοιβάδος του στερεού Σ σε δυο συστήματα ανάπτυξης (A και B) και του κλάσματος Κ₁ στο σύστημα B μετά από εμφάνιση με αιθανολικό διάλυμα FeCl₃. Σύστημα A: CHCl₃ : AcOEt : HCOOH (5:4:1 v/v/v). Σύστημα B: τολουόλιο : AcOEt : CH₃COOH (5:4:1 v/v/v).

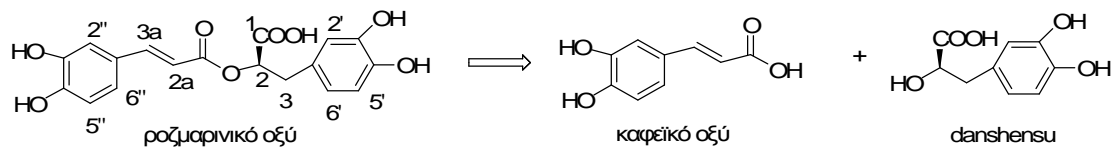


Σύστημα A Σύστημα B Σύστημα B

Σχήμα 4.14. Χρωματογράφημα λεπτής στοιβάδος.

4.8.2. Ταυτοποίηση συστατικών - Φάσμα ^1H NMR ροζμαρινικού οξέος

Το ροζμαρινικό οξύ είναι εστέρας του ακόρεστου οξέος καφεϊκού με μια δευτεροταγή αλκοόλη που στη βιβλιογραφία αναφέρεται ως danshensu (Σχήμα 4.15).



Σχήμα 4.15. Συσχέτιση ροζμαρινικού οξέος με καφεϊκό οξύ και danshensu

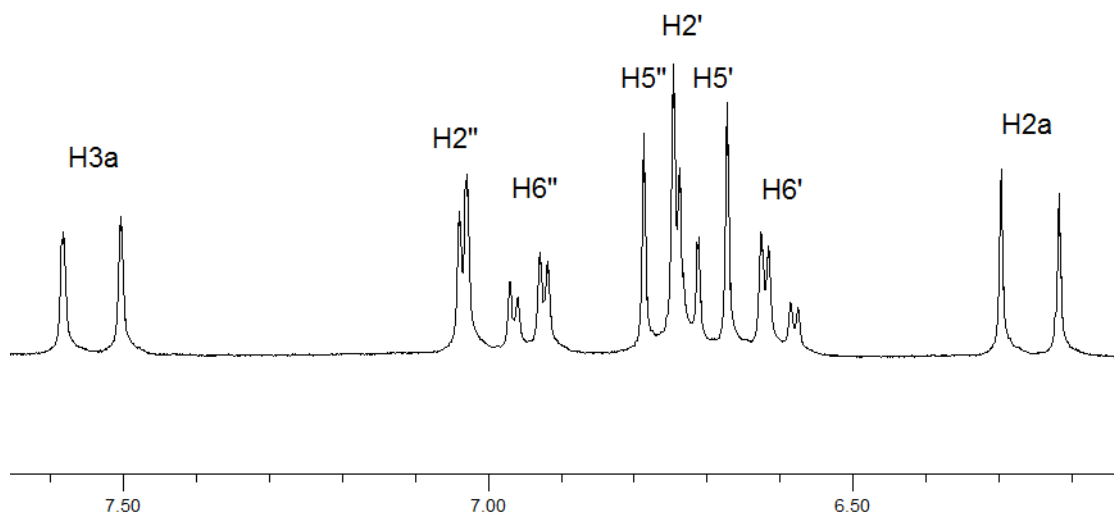
Στο Σχήμα 4.16-A δίνεται το φάσμα ^1H NMR διαλύματος ροζμαρινικού οξέος σε CD_3OD , σε όργανο Varian 200 MHz. Σε αυτό φαίνεται η χημική μετατόπιση των μεθινικών πρωτονίων του διπλού δεσμού H_{3a} και H_{2a} στα 7.54 και 6.26 ppm, ως διπλές με σταθερά σύζευξης $J = 15.9$ Hz, που δείχνει την trans γεωμετρία του διπλού δεσμού.

Τα έξι αρωματικά πρωτόνια των δύο βενζολικών δακτυλίων μπορούν να αποδοθούν λαμβάνοντας υπόψη τη μορφή διάσχισης των κορυφών και των σταθερών σύζευξης τους. Έτσι, στα 7.03 και 6.74 ppm εμφανίζονται οι χημικές μετατοπίσεις των $\text{H}_{2''}$ και $\text{H}_{2'}$, ως διπλές, με σταθερά αλληλικής σύζευξης $J = 2.0$ και $J = 1.8$ Hz αντίστοιχα. Οι διπλές διπλών στα 6.94 ppm με σταθερά σύζευξης $J = 8.2$ Hz και $J = 2.0$ Hz και στα 6.60 ppm με σταθερά σύζευξης $J = 8.1$ Hz και $J = 1.8$ Hz, αντιστοιχούν στα $\text{H}_{6''}$ και $\text{H}_{6'}$. Οι διπλές με σταθερά σύζευξης $J = 8.2$ Hz στα 6.77 ppm και με $J = 8.1$ Hz στα 6.69 ppm αντιστοιχούν στα $\text{H}_{5''}$ και $\text{H}_{5'}$.

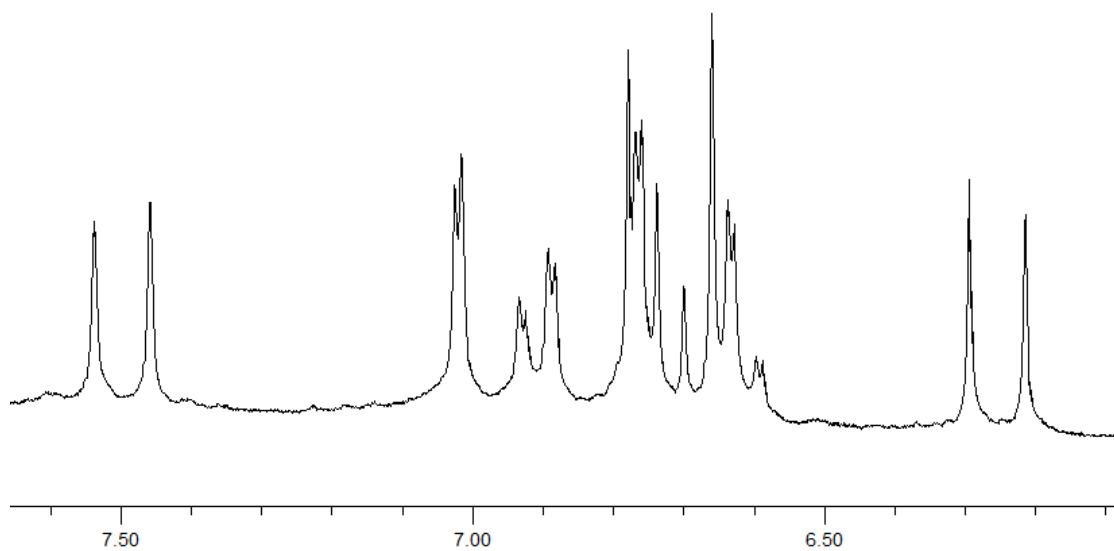
Στα 5.18 ppm η διπλή διπλών με $J = 7.9$ Hz και $J = 4.6$ Hz, αποδίδεται στο πρωτόνιο H_1 , που βρίσκεται σε α-θέση ως προς την καρβοξυλομάδα, ενώ στα 3.10 ppm η διπλή διπλών με $J = 14.9$ Hz και $J = 4.6$ Hz, και η διπλή διπλών στα 2.99 ppm με $J = 14.9$ Hz και $J = 7.9$ Hz, τα πρωτόνια της μεθυλενομάδος C_2 που βρίσκεται σε α-θέση ως προς τον αρωματικό δακτύλιο (Σχήμα 4.17-A).

4.8.3. Ταυτοποίηση συστατικών - Φάσμα ^1H NMR κλάσματος K_1

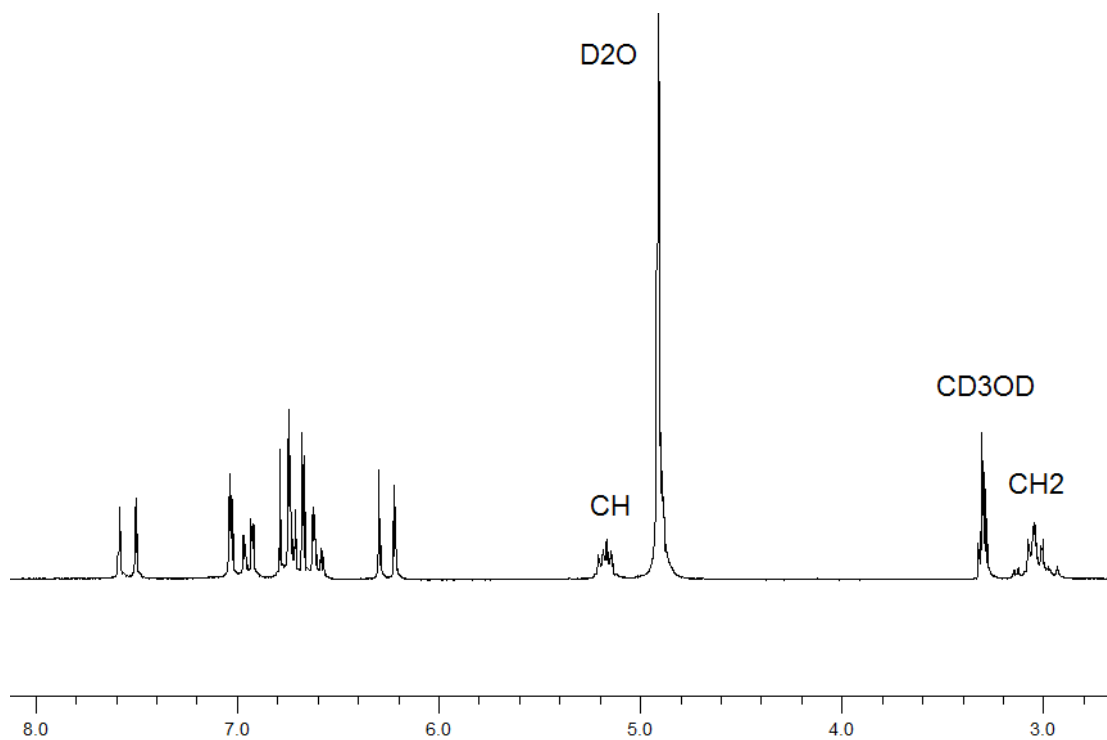
Στο Σχήμα 4.16-B και 4.17-B δίνεται το φάσμα ^1H NMR του κλάσματος K_1 σε CD_3OD .



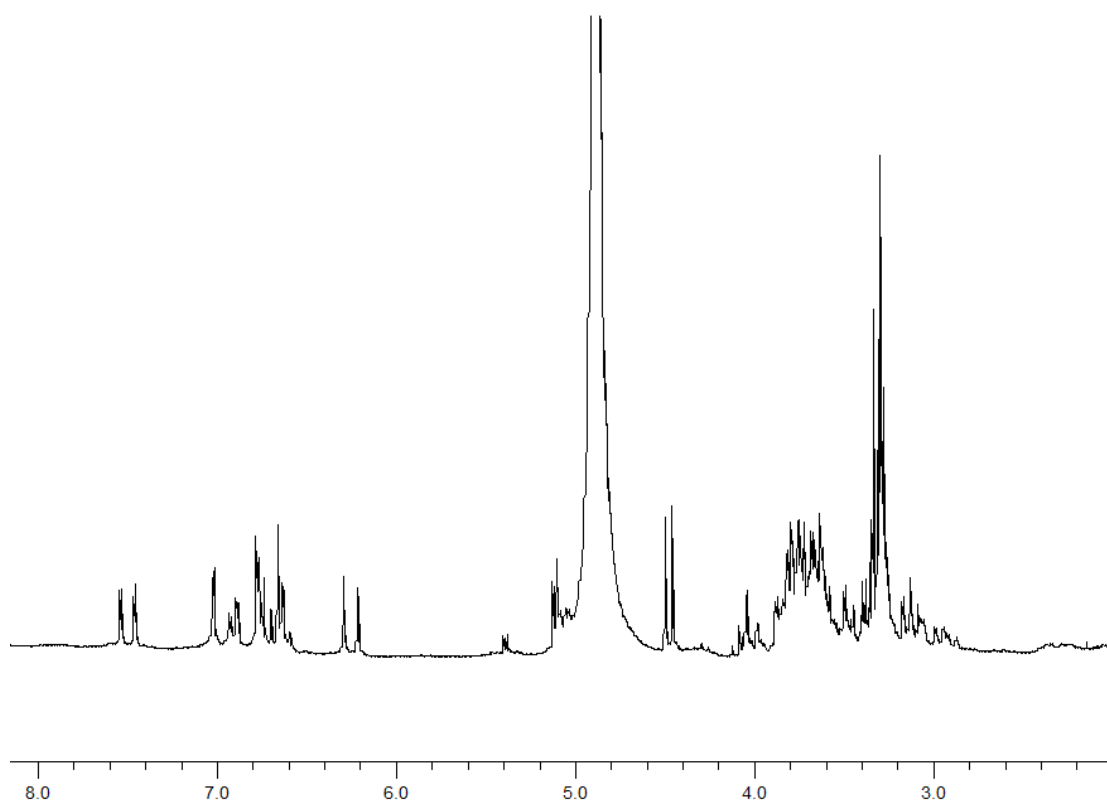
Σχήμα 4.16-A. Επιλεγμένη περιοχή φάσματος ^1H NMR (200 MHz, CD_3OD) του ροζμαρινικού οξέος.



Σχήμα 4.16-B. Επιλεγμένη περιοχή φάσματος ^1H NMR (200 MHz, CD_3OD) του κλάσματος K_1 .



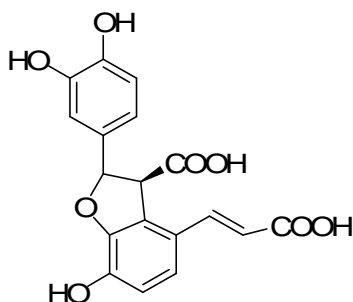
Σχήμα 4.17-B. ^1H NMR (200 MHz, CD_3OD) του ροζμαρινικού οξέος.



Σχήμα 4.17-B. Φάσμα ^1H NMR (200 MHz, CD_3OD) του κλάσματος K_1 .

Σύγκριση των φασμάτων του πρότυπου ροζμαρινικού οξέος και του K₁ στη περιοχή 7.60-6.20 ppm δείχνει τις υπάρχουσες ομοιότητες, αλλά και τις μικρές διαφορές στις χημικές μετατοπίσεις των H_{3a}, H_{6''}, H_{5''} σε υψηλότερα πεδία και του H_{6'} προς χαμηλότερα πεδία. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι το K₁ περιέχει δυο αρωματικούς δακτυλίους, ο ένας έχει το σκελετό του καφεϊκού οξέος και ο άλλος είναι 1,3,4,-τριυποκατεστημένος δακτύλιος.

Οι μεγάλες διαφορές εντοπίζονται στη περιοχή 5.40-2.90 ppm, που οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το K₁ δεν είναι ελεύθερο ροζμαρινικό οξύ, αλλά παράγωγό του. Στη περιοχή 5.40-3.40 ppm συντονίζονται τα ανωμερικά πρωτόνια, τα πρωτόνια των σακχαρικών δακτυλίων και πρωτόνια κοντά σε ηλεκτροαρνητικά άτομα. Στη βιβλιογραφία αναφέρονται παράγωγα του καφεϊκού οξέος που περιέχουν ετεροκυκλικό δακτύλιο όπως το προλιθοσπερμικό οξύ (Σχήμα 4.18) [183]. Σε αυτό αναμένονται χημικές μετατοπίσεις των μεθινικών του πρωτονίων ως διπλές στη περιοχή 5.20- 4.60 ppm, που υπάρχουν στο φάσμα του Σχήματος 4.17-B. Ομως, σε αυτή τη περίπτωση θα αναμέναμε στη περιοχή 7.60-6.20 ένα αρωματικό ανθρακοάτομο λιγότερο.

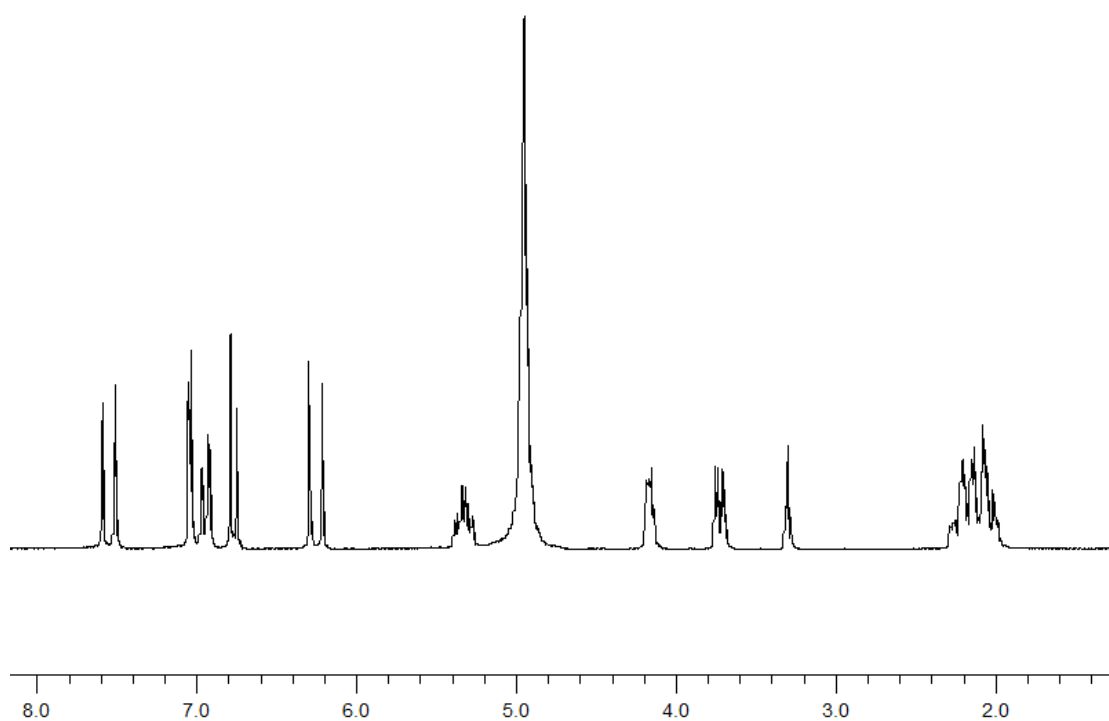
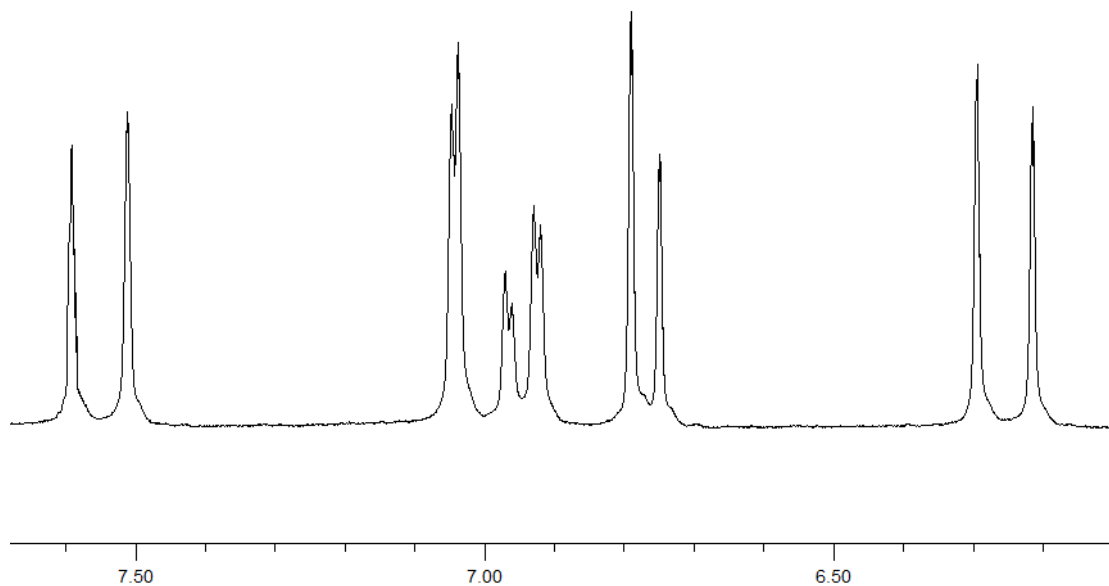


προλιθοσπερμικό οξύ

Σχήμα 4.18. Το προλιθοσπερμικό οξύ

Στο Σχήμα 4.19 δίνεται το φάσμα ¹H NMR του χλωρογενικού οξέος του πιο συνηθισμένου στη φύση παραγώγου του καφεϊκού οξέος που περιέχει ένα αρωματικό δακτύλιο και μια κυκλιτόλη. Η σύγκριση των φασμάτων στα Σχήματα 4.16 και 4.19 δείχνει την απουσία των χημικών μετατοπίσεων που υπάρχουν στη περιοχή 6.75-6.55 ppm στο χλωρογενικό οξύ, λόγω της έλλειψης της παρουσίας της αλκοόλης danshensu. Συνεπώς το K₁ δεν είναι το χλωρογενικό οξύ. Επομένως κανείς θα πρέπει να σκεφθεί την παρουσία σακχάρου στο μόριο του K₁. Η ολοκλήρωση των σημάτων στη περιοχή 4.20-3.40 ppm στο φάσμα του Σχήματος 4.17-B, οδηγεί στη παρουσία

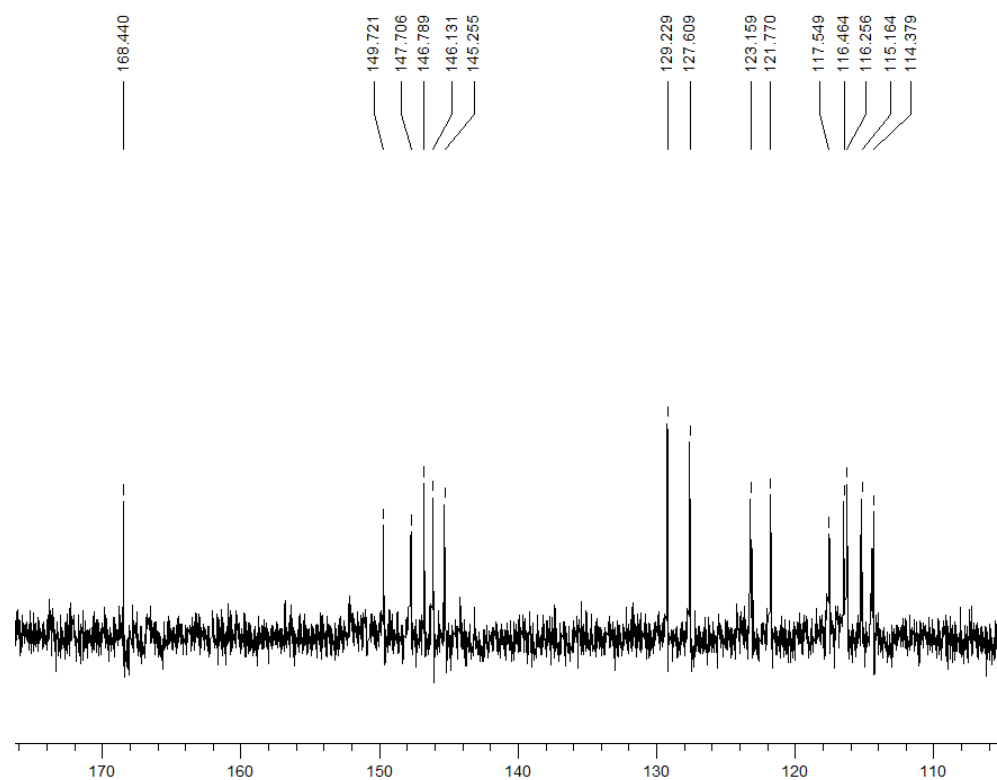
δύο σακχαρικών μονάδων γλυκοζιτικά ενωμένων και με ελεύθερη ημιακεταλική υδροξυλομάδα.



Σχήμα 4.19. Φάσμα ¹H NMR (200 MHz, CD₃OD) του χλωρογενικού οξέος.

4.8.4. Ταυτοποίηση συστατικών - Φάσμα ^{13}C NMR ροζμαρινικού οξέος

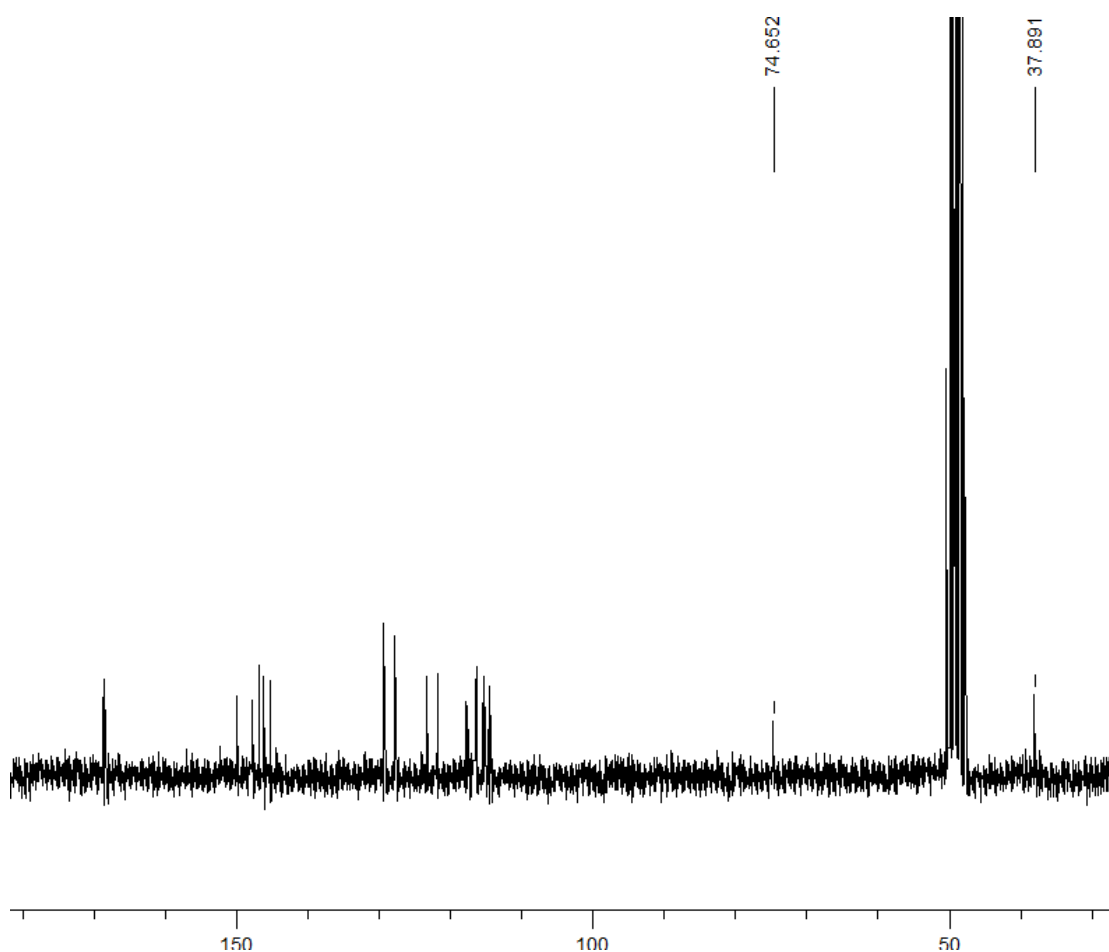
Στο Σχήμα 4.20-A και 4.20-B δίνεται το φάσμα ^{13}C NMR του διαλύματος του ροζμαρινικού οξέος. Ο καρβονυλικός άνθρακας της εστερικής ομάδας μετατοπίζεται στα 168.4 ppm. Στα 149.7, 147.7, 146.8, 146.1 και 145.3 υπάρχουν οι χημικές μετατοπίσεις των τεσσάρων αρωματικών ανθρακοατόμων που φέρουν υδροξυλομάδα ως υποκαταστάτη καθώς και ο $\text{C}_{3\alpha}$. Στα 129.2 και 127.6 ppm οι $\text{C}_{1''}$ και $\text{C}_{1'}$. Στα 123.2, 121.8, 117.5, 116.5, 116.3, 115.2 και 114.4 ppm οι $\text{C}_{2''}$, C_2 , $\text{C}_{5''}$, C_5 , $\text{C}_{6''}$, C_6 και $\text{C}_{2\alpha}$. Στα 74.6 ppm ο C_2 και στα 37.9 ppm ο C_3 .



Σχήμα 4.20-A. Επιλεγμένη περιοχή φάσματος ^{13}C NMR (50 MHz, CD_3OD) του ροζμαρινικού οξέος.

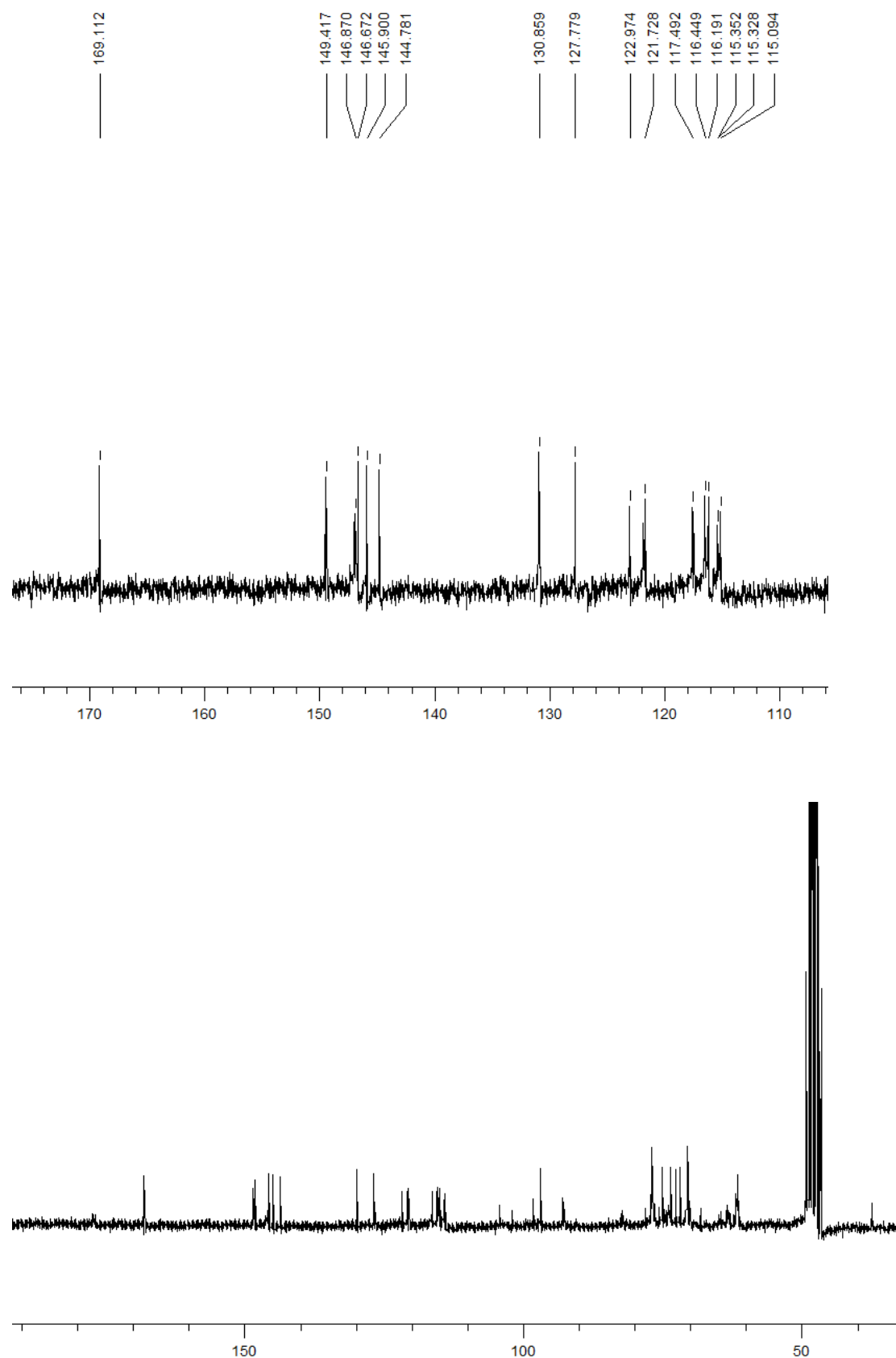
4.8.5. Ταυτοποίηση συστατικών - Φάσμα ^{13}C NMR του κλάσματος K_1

Στο Σχήμα 4.21 δίνεται το φάσμα ^{13}C NMR του κλάσματος K_1 και στο Σχήμα 4.22 το φάσμα ^{13}C NMR του χλωρογενικού οξέος.

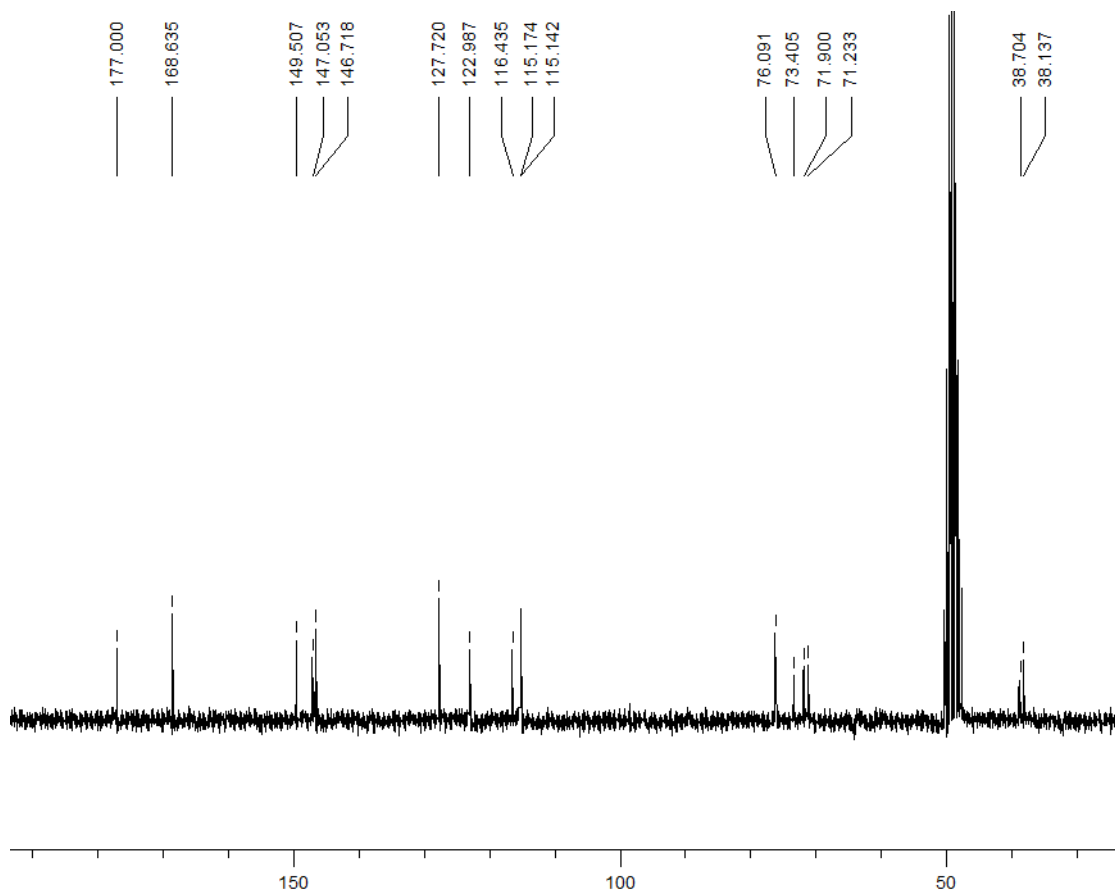


Σχήμα 4.20-B. Φάσμα ^{13}C NMR (50 MHz, CD_3OD) του ροζμαρινικού οξέος.

Σύγκριση των φασμάτων ^{13}C NMR του ροζμαρινικού οξέος, του χλωρογενικού οξέος και του κλάσματος K_1 στη περιοχή 150 – 110 ppm επιβεβαιώνει την παρουσία των δύο αρωματικών δακτυλίων και του διπλού δεσμού στο K_1 . Επίσης, υπάρχει η μεθυλενομάδα στα 37.8 ppm που βρίσκεται σε α -θέση ως προς τον αρωματικό δακτύλιο. Οι χημικές μετατοπίσεις στα 105 – 95 ppm μπορούν να αποδοθούν στους ανωμερικούς άνθρακες δύο μορίων σακχάρων, καθώς επίσης οι χημικές μετατοπίσεις στα 80 – 60 ppm μπορούν να αντιστοιχισθούν στα υπόλοιπα ανθρακοάτομα των σακχαρικών δακτυλίων. Φαίνεται λοιπόν, ότι το K_1 είναι παράγωγο του ροζμαρινικού οξέος με δύο μόρια σακχάρων.



Σχήμα 4.21 Φάσμα ^{13}C NMR (50 MHz, CD_3OD) του κλάσματος K_1 .



Σχήμα 4.22 Φάσμα ^{13}C NMR (50 MHz, CD_3OD) του χλωρογενικού οξέος.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ



Το κλάσμα που απομονώθηκε από το αιθανολικό εκχύλισμα του φασκόμηλου περιέχει παράγωγο του ροζμαρινικού οξέος συζευγμένο πιθανά με δύο σακχαρικές μονάδες, όπως προκύπτει από τη μελέτη με φασματοσκοπία NMR .



Το 5'-OH της κερκετίνης και της λουτεολίνης παίζει σημαντικό ρόλο για την καλύτερη πρόσδεση τους στο ενεργό κέντρο της εκκριτικής φωσφολιπάσης A₂, όπως προκύπτει από την *in silico* μελέτη.



Η ουμπελλιφερόνη παρουσιάζει φτωχά αποτελέσματα πρόσδεσης.



Η ελευροπαΐνη παρουσιάζει αποτελέσματα μοριακής πρόσδεσης στην sPLA₂ καλύτερα από αυτά της κερκετίνης, που είναι γνωστό ότι αναστέλλει την εκκριτική φωσφολιπάση A₂, υποδεικνύοντας ότι η αντιφλεγμονώδης δράση της μπορεί να οφείλεται στη δυνατότητα αναστολής της φωσφολιπάσης A₂.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1]. http://www.esoterica.gr/articlew/alt_med/plants/plants.htm (8/11/2009)
- [2]. Zheng W., Wang S.Y., *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 5165.
- [3]. Al Sereiti M.R., Abu-Amer K.M., Sen P., *Indian J. Exper. Biol.*, **1999**, *37*, 124.
- [4]. Hoefler C., Fleurentin J., Mortier F., *J. Ethnopharmacol.*, **1987**, *19*, 133.
- [5]. Lam F.F.Y., Yeung J. H.K., Kwan Y.W., Chan K.M., Or P.M.E., *Eur. J. Pharmac.*, **2006**, *553*, 240.
- [6]. Ιγναντιάδου-Ραγκούση Β., Χημεία Φυσικών Προϊόντων, Αθανασόπουλος-Παπαδάμης, Αθήνα 1996.
- [7]. Jacob R.A., Burri B. J., *Am. J. Clin. Nutr.* **1996**, *63*, 985S
- [8]. Morton L.W., Caccetta R. A.-A., Puddey I. B., Croft. K. D, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **2000**, *27*, 152.
- [9]. Paganga G. Miller N., Rice-Evans C. A., *Free Radid. Res.*, **1999**, *30*, 153.
- [10]. Pridham J. B., Phenolics in Plants in Health and Disease, Pergamon Press, New York, NY,1960.
- [11]. Hemingway R. W., Laks P.E., Plant polyphenols, Synthesis, Prpperties, Significance, Plenum Press, New York, NY 1992.
- [12]. Price K.R., bacon J. R., Rhodes M.J. C., *J. Agric. Food Chem.*, **1997**, *45*, 938.
- [13]. Manach C., Scalbert A, Morand C, Remesy C and Jimenez L., *Am. J. Clin. Nutr.*, **2004**, *79*, 727.
- [14]. Macheix J J, Fleuriet A., Billot J., “Fruit phenolics”. Boca Raton, FL: CRC Press, 1990.
- [15]. Price S. F., Breen P. J., Valladao M., Watson B.T., *Am. J. Enot. Vitic.* **1995**, *46*, 187.
- [16]. Hettmann K., *J. Food Technol.* **1976**, *11*, 433.
- [17]. Paul A.T., Gohil V.M., Bhutani K.K., *Drug Disc. Today*, **2006**, *11*, 725.

- [18]. Lautreite S., Musonda A.C., Doehemer J., Edwards G. O, Chipman J. K., *Mutagenesis*, **2002**, *17*, 45.
- [19]. Raso G. M., Meli R., Carlo G., Pacilio M., Di Carlo R., *Life Sci.*, **2001**, *68*, 921.
- [20]. Akiyama T., Ishida J., Nikagawa H., Iton S., Shibug A. M., Fukamo Y., *J. Biol. Chem.*, **1987**, *262*, 5590.
- [21]. Plaumann B., Fritsche M., Rimpler H., Bradner G., Hess R. D., *Oncogene*, **1996**, *13*, 1605.
- [22]. Jialal I., Scaccini C., *Curr. Opin. Lipidol.*, **1992**, *3*, 324.
- [23]. Kim D. H., Jung E. A., Sohng I. S., Hang A., Kim T. H., *Arch. Pharmacol. Res.*, **1998**, *21*, 17.
- [24]. Kondo K., Hirano R., Matsumoto A., Igarashi O., Hakura H., *Lancet*, **1996**, *348*, 1514.
- [25]. Maxwell S., Cruiskshank A., Thorpe G., *Lancet*, **1994**, *344*, 193.
- [26]. Hertog G. L., Feskeus J. M., Hollman C. H., Katan M. B., Kromhput D., *Lancet*, **1993**, *342*, :1007.
- [27]. Yochum L., Kushi L. H., Meyer K., Folsom A. R., *Am. J. Epidemiol.*, **1999**, *149*, 943.
- [28]. Anter E., Thomas S.R., Scultz E., Shapira O.M., Vita J.A., Keaney J.F., *J. Biol.Chem.*, **2004**, *279*, 46037.
- [29]. Lee T. P., Matteliano M. L., Middleton E., *Life Sci.*, **1982**, *31*, 2765.
- [30]. Tauber A. I., Fay J. R., Marletta M., *Biochem. Pharmacol.*, **1984**, *33*, 1367.
- [31]. Rotonclo S., De Gaetano G., *World Rev. Nutr. Diet.*, **2000**, *87*, 90.
- [32]. Kuiper G.G., Lemmen J.G., Carisson B., Corton J.C., Safe S.H., Van der Saag P.T., Van der Burg B., Gustafsson J.-A., *Endocrinology*, **1998**, *139*, 4252.
- [33]. Albanese C. V., Codd A., Argentino L., Zamboni- Zalione A., Macintyrel., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **1994**, *15*, 930.
- [34]. Berg P. A., Daniel P, T. *Progress Clin. Boil. Res.*, **1988**, *280*, 157.

- [35]. Zatta D.T., Bara M.T.F., Garrote C.F.D., Pimenta F.C., Tresvenzol L.M.F., Fiuza T.S., Paula J.R. , *Latin Am. J. Pharm.*, **2009**, 28, 293.
- [36]. Kintzios S.E., Sage-the genus *Salvia* Amsterdam , Harwood Academic, 2000.
- [37]. <http://www.hungry.gr/bahar/faskomhlo.asp> (8/11/2009)
- [38]. Gali-Muhtasib H., Hilian C., Khater C., *J. Ethnopharmacol.*, **2000**, 71, 513.
- [39]. Perry E.K., Pickering A.T., Wang W.W., Houghton P.J., Perry N.S.L., *J. Pharmacy Pharmacol.*, **1999**, 51, 527.
- [40]. Newall C.A., Anderson L.A., Philipson J.D., *Herbal medicines: A guide for health-care professionals*, London : The Pharmaceutical Press 1996
- [41]. Fan T. P., Yeh J.C., Leung P.Y.K., Wong R. N. S., *Trends Pharmacol. Sci.*, **2006**, 27, 297.
- [42]. Eidi A., Eidi M., *Clin. Res. Rev.* **2009**, 3, 40.
- [43]. Ulubelen A., Topcu G. *Advances in Natural Product Chemistry*, USA Harwood Academic Publishers 1992.
- [44]. Proestos C., Boziaris I., Nychas G-J., Komaitis M., *Food Chem.*, **2006**, 95, 664.
- [45]. Pitarokili D., Tzakou O., Loukis A., Harvala C., *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51, 3294.
- [46]. Daferera D., Ziogas B., Polissiou M., *J. Agric. Food Chem.*, **1998**, 46, 1739.
- [47]. Sivropoulou A., Nikolaou C., Papanicolaou E., Kokkini S., Lanaras T., Arsenakis M., *J Agric Food Chem.*, **1997**, 45, 3197.
- [48]. Kivrak I., Emin Duru M., Ozturk M., Mercan N., Harmandar M., Topcu G., *Food Chem.*, **2009**, 116, 470.
- [49]. Ninomiya K., Matsuda H., Shimoda H., Nishida N., Kasajima N., Yoshino T., Morikawa T., Yoshikawa M., *Bioorg. Med. Lett.*, **2004**, 14, 1943.
- [50]. Yang J.H., Son K.H., Son J.K., Chang H.W., *Arch. Pharmacol. Res.*, **2008**, 31, 1597.

- [51]. Kang B.Y, Chung S.W., KimS.H., Ryu S.Y., Kim T.S., *Immunopharmacology*, **2000**, 49, 355.
- [52]. Chan K., Lo A.C.T., Yeung J.H.K., Woo K.S., *J. Pharm. Pharmacol.*, **1995**, 47, 402.
- [53]. Perry N.B, Anderson R.E., Brennan N.J., Douglas M.H., Heaney A.J., McGimpsey J.A., *J Agric. Food Chem.*, **1999**, 47, 2048.
- [54]. Liang Q., Liang Z-S., Wang J.-R., Xu W.-H., *Food Chem.*, **2009**, 113, 592.
- [55]. Lu Y., Foo L. Y., *Phytochemistry*, **2002**, 59, 117.
- [56]. Lu Y., Foo L. Y., *Food Chem.*, **2001**, 75, 197.
- [57]. Wang H., Provan G., Helliwell K., *Food Chemistry*, **2004**, 87, 307.
- [58]. Fecka I., Turek S., *J Agric. Food Chem.*, **2007**, 55, 10908.
- [59]. Bissio A., Romussi G., Giarallo G., De Tommasi N., *Pharmazie*, **1997**, 52, 330.
- [60]. Durling N., Catchpole O. Grey J. Webby R., Mitchell K., Foo Y., Perry N., *Food Chem.*, **2007**, 101, 1417.
- [61]. Zhang M., Ignatowa S., Liang Q., Wu F., Sutherland I., Wang Y., Guoan L., *J. Chrom. A*, **2009**, 1216, 3869.
- [62]. Papageorgiou V., Gardeli C., Mallouchos A., Papaioannou M., Komaitis M., *J. Agric. Food Chem.*, **2008**, 56, 7254.
- [63]. Kim H. K., Woo E.R., Lee H. W., Park H.R., Kim H.N., Jung Y.K., Choi J. Y., Chae S.W., Kim H.R., Chae H., *J. Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, **2008**, 30, 347.
- [64]. Topcu G., *J. Nat. Prod.*, **2006**, 69, 482.
- [65]. Dapkevicius A., Venskutonis R., van Beek T.A., Linssen J.P., *J. Sci. Food Agric.*, **1998**, 77, 140.
- [66]. Djarmati Z., Jankov R. M., Schwirtlich E., Djulinac B., Djordjevic A., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1991**, 68, 731.

- [67]. Bauman D., Hadolin M., Rizner-Hras A., Knez Z., *Acta Alimentaria*, **1999**, 28, 15.
- [68]. Bauman D., Knez Z., Murko S., Rostohar Z., **2000**, Patent WO0049115
- [69]. Areias F., Valentao P., Andrade P.B., Ferreres F., Seabra R.M., *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48, 6081.
- [70]. Exarcou V., Nenadis N., Tsimidou M., Gerothanassis I., Troganis A., Boskou D., *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, 5294.
- [71]. Burke J.E., Dennis E.A., *J. Lipid Res.*, **2009**, 50, 237.
- [72]. Burke J.E., Dennis E.A., *Cardiovasc. Drugs Ther.*, **2009**, 23, 45.
- [73]. Funk C.D., *Science*, **2001**, 294, 1871.
- [74]. Rivera R., Chun J., *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **2008**, 160, 25.
- [75]. Schaloske R.H., Dennis E.A., *Biochim. Biophys. Acta*, **2006**, 1761, 1246.
- [76]. Kokotos G., Nicolaou A., Bioactive lipids. The Oily Press: Bridgewater, England, **2004**.
- [77]. Kokotos G., *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **2008**, 110, 1081.
- [78]. Reid R.C., *Curr. Med. Chem.*, **2005**, 12, 3011.
- [79]. Magrioti V., Kokotos G., *Anti-Inflammatory Anti-Allergy Agents Med. Chem.*, **2006**, 5, 189.
- [80]. Lehr M., *Anti-Inflammatory Anti-Allergy Agents Med. Chem.*, **2006**, 5, 149.
- [81]. Lehr M., *Expert Opin. Ther. Pat.*, **2001**, 11, 1123.
- [82]. Clark J.D., Tam S., *Expert Opin. Ther. Pat.*, **2004**, 14, 937.
- [83]. Seilhamer J., Pruzanski W., Vadas P., Plant S., Miller J.A., Kloss J., Johnson L.K., *J. Biol. Chem.*, **1989**, 264, 5335.
- [84]. Berg O.G., Gelb M.H., Tsai M.-D., Jain M.K., *Chem. Rev.*, **2001**, 101, 2613.
- [85]. Lambeau G., Gelb M.H., *Annu. Rev. Biochem.*, **2008**, 77, 495.
- [86]. Boyanovsky B.B., Webb N.R., *Cardiovasc. Drugs Ther.*, **2009**, 23, 61.
- [87]. Balestrieri B., Arm J.P., *Biochim. Biophys. Acta*, **2006**, 1761, 1280.

- [88]. Rosengren B., Jonsson-Rylander A.-C., Peilot H., Camejo G., Hurt-Camejo E., *Biochim. Biophys. Acta*, **2006**, 1761, 1301.
- [89]. Masuda S., Murakami M., Ishikawa Y., Ishii T., Kudo I., *BBA-Mol. Cell Biol. L.*, **2005**, 1736, 200.
- [90]. Henderson Jr. W.R., Chi E.Y., Bollinger J.G., Tien Y.-T., Ye X., Castelli L., Rubtsov Y.P., Gelb M.H., *J. Exp. Med.*, **2007**, 204, 865.
- [91]. Kramer R.M., Checani G.C., Deykin A., *Biochim. Biophys. Acta*, **1986**, 878, 394.
- [92]. Clark J.D., Lin L.-L., Kriz R.W., Ramesha C.S., Sultzman L.A., Lin A.Y., Milona N., Knopf J.L., *Cell*, **1991**, 65, 1043.
- [93]. Kramer R.M., Roberts E.F., Manetta J., Putnam J.E., *J. Biol. Chem.*, **1991**, 266, 5268.
- [94]. Ghosh M.D., Tucker D.E., Burchett S.A., Leslie CC., *Prog. Lipid Res.*, **2006**, 45, 487.
- [95]. Dessen A., Tang J., Schmidt H., Stahl M., Clark J.D., Seehra J., Somers W.S., *Cell*, **1999**, 97, 349.
- [96]. Sharp J.D., Pickard R.T., Chiou X.G., Manetta J.V., Kovacevic S., Miller J.R., Varshavsky, A.D., Roberts E.F., Striffler B.A., Brems D.N., Kramer R.M., *J. Biol. Chem.*, **1994**, 269, 23250.
- [97]. Huang Z., Fayette P., Abdullah K., Cromlish W.A., Kennedy B.P., *Biochemistry*, **1996**, 35, 3712.
- [98]. Bonventre J.V., Huang Z., Taheri M.R., O'Leary E., Li E., Moskowitz M.A., sapirstein A., *Nature*, **1997**, 390, 622.
- [99]. Uozumi N., Kume K., Nagase T., Nakatani H., Ishii S., Tashiro F., Komagata Y., Maki K., Ikuta K., Oushi Y., Miyazaki J.-I., Shimizu T., *Nature*, **1997**, 390, 618.
- [100]. Nagase T., Uozumi N., Ishii S., Kume K., Izumi T., Oushi Y., Shimizu T., *Nat. Immunol.*, **2000**, 1, 42.
- [101]. Larsson P.K., Claesson H.E., Kennedy B.P., *J. Biol. Chem.*, **1998**, 273, 207.

- [102]. Ackermann E.J., Kempner E.S., Dennis E.A., *J. Biol. Chem.*, **1994**, 269, 9227.
- [103]. Balsinde J., Balboa M.A., *Cellular Signalling*, **2005**, 17, 1052.
- [104]. Balsinde J., Perez R., Balboa M.A., *Biochim. Biophys. Acta*, **2006**, 1761, 1344.
- [105]. Hooks S.B., Cummings B.S., *Biochem. Pharmacol.*, **2008**, 76, 1059.
- [106]. Wilkins W.P., Barbour S.E., *Curr. Drug Targets*, **2008**, 9, 683.
- [107]. Stafforini D.M., *Cardiovasc. Drugs Ther.*, **2009**, 23, 73.
- [108]. Tjoelker L.W., Eberhardt C., Unger J., Le Trong H., Zimmerman G.A., McIntyre T.M., Stafforini D.M., Prescott S.M., Gray P.W., *J. Biol. Chem.*, **1995**, 270, 25481.
- [109]. Tjoelker L.W., Wilder C., Eberhardt C., Stafforini D.M., Dietsch G., Schimpf B., Hooper S., Le Trong H., Couzens L.S., Zimmerman G.A., Yamada Y., McIntyre T.M., Prescott S.M., Gray P.W., *Nature*, **1995**, 374, 549.
- [110]. Lavi S., Herrmann J., Lavi R., McConnell J.P., Lerman L.O., Lerman A., *Curr. Atheroscler. Rep.*, **2008**, 10, 230.
- [111]. Eli Lilly & Co. WO0205796, **2002**.
- [112]. Abraham E., Naum C, Bandi V., Gervich D., Lowry S.F., Wunderink R., Schein R.M., Maciaw W., Skarjanec S., Dmitrienko A., Farid N., Fogue S.T., Jiang F., *Crit. Care Med.*, **2003**, 31, 718.
- [113]. Kearney P., Naum C., *Mediators Inflamm.*, **1999**, 8, S8.
- [114]. Rosenson R.S., *Cardiovasc. Drugs Ther.*, **2009**, 23, 93.
- [115]. Anthera Pharmaceuticals Inc. WO2008137803, **2008**.
- [116]. Koenig W., Khuseyinova N., *Cardiovasc. Drugs Ther.*, **2009**, 23, 85.
- [117]. Singer A.G., Ghomashchi F., Le Calvez, C., Bollinger J., Bezzine S., Rouault M., Sadilek M., Nguyen E., Lazdunski M., Lambeau G., Gelb M.H., *J. Biol. Chem.*, **2002**, 277, 48535.
- [118]. Oslund R.C., Cermak N., Gelb M.H., *J. Med. Chem.*, **2008**, 51, 4708.
- [119]. Street I.P., Lin H.-K., Laliberte F., Ghomashchi F., Wang Z., Perrier H., Tremblay N.M., Huang Z., Weech P.K., Gelb M.H., *Biochemistry*, **1993**, 32, 5935.

- [120]. McKew J.C., Foley M.A., Thakker P., Behnke M.L., Lovering F.E., Sum F.-W., Tam S., Wu K., Shen M.W.H., Zhang W., Gonzalez M., Liu S., Mahadevan A., Sard H., Khor S.P., Clark J.D., *J. Med. Chem.*, **2006**, *49*, 135.
- [121]. Lee K.L., Foley M.A., Chen L., Behnke M.L., Lovering F.E., Kirincich S.J., Wang W., Shim J., Tam S., Shen M.W., Khor S., Xu X., Goodwin D.G., Ramarao M.K., Nickerson-Nutter C., Donahue F., Ku M.S., Clark J.D., McKew J.C., *J. Med. Chem.*, **2007**, *50*, 1380.
- [122]. Lee K.L., Behnke M.L., Foley M.A., Chen L., Wang W., Vargas R., Nunez J., Tam S., Mollova N., Xu X., Shen M.W.H., Ramarao M.K., Goodwin D.G., Nickerson-Nutter C.L., Abraham W.M., Williams C., Clark J.D., Mckew J.C., *Bioorg. Med. Chem.*, **2008**, *16*, 1345.
- [123]. McKew J.C., Lee K.L., Shen M.W.H., Thakker p., Foley M.A., Behnke M.L., Hu B., Sum F.-W., Tam S., Hu Y., Chen L., Kirincich S.J., MiChalak R., Thomason J., Ipek M., Wu K., Wooder L., Ramarao M.K., Murphy E.A., Goodwin D.G., Albert L., Xu X., Donahue F., Ku M.S., Keith J., Nickerson-Nutter C.L., Abraham W.M., Williams C., Hegen M., Clark J.D., *J. Med. Chem.*, **2008**, *51*, 3388.
- [124]. Chen L., Wang W., Lee K.L., Shen M.W.H., Murphy E.A., Zhang W., Xu X., Tam S., Nickerson-Nutter C., Goodwin D.G., Clark J.D., McKew J.C., *J. Med. Chem.*, **2009**, *52*, 1156.
- [125]. Ludwig J., Bovens S., Brauch C., Eifringhoff A.S., Lehr M., *J. Med. Chem.*, **2006**, *49*, 2611.
- [126]. Bovens S., Kaptur M., Elfringhoff A.S., Lehr M., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2009**, *19*, 2107.
- [127]. Kokotos G., Six D.A., Loukas V., Smith T., Constantinou-Kokotou V., Hadjipavlou-Litina D., Kotsovolou S., Kokotos G., Dennis E.A., *J. Med. Chem.*, **2004**, *47*, 3615.
- [128]. Yaksh T.L., Kokotos G., Svensson C.I., Stephens D., Kokotos C.G., Fitzsimmons B., Hadjipavlou-Litina D., Kokotos G., Dennis E.A., *J. Pharm. Exp. Ther.*, **2006**, *316*, 466.

- [129]. Stephens D., Barbayianni E., Constantinou-Kokotou V., Peristeraki A., Six D., Cooper J., Harkewicz R., Dennis E.A., Kokotos G., *J. Med. Chem.*, **2006**, *49*, 2821.
- [130]. Six D.A., Barbayianni E., Loukas V., Constantinou-Kokotou V., Hadjipavlou-Litina D., Stephens D., Wong A.C., Dennis E.A., Kokotos G., *J. Med. Chem.*, **2007**, *50*, 4222.
- [131]. Antonopoulou G., Barbayianni E., Magrioti V., Cotton N., Stephens D., Constantinou-Kokotou V., Dennis E.A., Kokotos G., *Bioorg. Med. Chem.*, **2008**, *16*, 10257.
- [132]. Barbayianni E., Stephens D., Grkovich A., Magrioti V., Hsu Y.-H., Dolatzas P., Kalogiannidis D., Kokotos G., *Bioorg. Med. Chem.*, **2009**, *17*, 4833.
- [133]. Burke J.E., Babakhani A., Gorfe A.A., Kokotos G., Li S., Woods Jr. V.L., McCammon J.A., Dennis E.A., *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 8083.
- [134]. Seno K., Okuno T., Nishi K., Nishi K., Murakami Y., Watanabe F., Matsura T., Wada M., Ohtani M., *J. Med. Chem.*, **2000**, *43*, 1041.
- [135]. Eno K., Okuno T., Nishi K., Murakami Y., Yamada K., Nakamoto S., Ono T., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2001**, *11*, 587.
- [136]. Ono T., Yamada K., Chikazawa Y., Ueno M., Nakamoto S., Okuno T., Seno K., *Biochem. J.*, **2002**, *363*, 727.
- [137]. Baskakis C., Magrioti V., Cotton N., Stephens D., Constantinou-Kokotou V., Dennis E.A., Kokotos G., *J. Med. Chem.*, **2008**, *51*, 8027.
- [138]. López-Vales R., Navarro X., Shimizu T., Baskakis C., Kokotos G., Constantinou-Kokotou V., Stephens D., Dennis E.A., David S., *Brain*, **2008**, *131*, 2620.
- [139]. Kalyvas A., Baskakis C., Magrioti V., Constantinou-Kokotou V., Stephens D., Lopez-Valew R., Lu J.-Q., Kokotos G., David S., *Brain*, **2009**, *132*, 1221.
- [140]. Smithkline Beecham PLC. WO0160805, **2001**.
- [141]. Mohler E.R. III, Ballantyne C.M., Davidson M.H., Hanefeld M., Ruilope L.M., Johnson J.L., Zalewski A., *J. Am. Coll. Cardiol.*, **2008**, *51*, 1632.

- [142]. De Silva E. D., Scheuer P.J., *Tetrahedron Lett.*, **1980**, 21, 1611.
- [143]. De Silva E. D., Scheuer P.J., *Tetrahedron Lett.*, **1981**, 22, 3147.
- [144]. Albizati K.F., Holman T., Faulkner D.J., Glaser K.B., Jacobs R.S., *Experientia*, **1987**, 43, 949
- [145]. Kernan M.R., Faulkner D.J., Jacobs R.S., *J. Org. Chem.*, **1987**, 52, 3081
- [146]. Kernan M.R., Faulkner D.J., Parkanyl L., Clardy J., De Carvalho M.S., Jacobs R.S., *Experientia*, **1989**, 45, 388
- [147]. a) De Rosa S., De Stefano S., Zavodnik N., *J. Org. Chem.*, **1988**, 53, 5020 b)
De Rosa S., Crispino A., De Guilio A., Iodice C., Pronzato R., Zavodnik N., *J. Nat. Prod.*, **1995**, 58, 1776
- [148]. Randazzo A., Debitus C., Minale L., Pastor P.G., Alcazar M.J., Paya M., Gomez-Paloma L., *J. Nat. Prod.*, **1998**, 61, 571
- [149]. Dal Piaz F., Casapullo A., Randazzo A., Riccio R., Pucci P., Marino G., Gomez-Paloma L., *ChemBioChem.*, **2002**, 3, 664
- [150]. Chiara Monti M., Casapullo A., Riccio R., Gomez-Paloma L., *Bioorg. Med. Chem.*, **2004**, 12, 1467
- [151]. Chiara Monti M., Casapullo A., Cavassoto C.N., Tosco A., Dal Piaz F., Ziemys A., Margarucci L., Riccio R., *Chem. Eur.*, **2009**, 15, 1155
- [152]. Chiara Monti M., Riccio R., Casapullo A., *Bioorg. Chem.*, **2009**, 37, 6
- [153]. Chiara Monti M., Casapullo A., Cavassoto C.N., Napolitano A., Riccio R., *ChemBioChem.*, **2007**, 8, 1585
- [154]. Mayer A.M.S., Jacobson P.B., Fenical W., Jacobs R.S., Glaser K.B., *Life Sci.*, **1998**, 62, PL 401
- [155]. Lindahl M., Tagesson C., *Inflammation*, **1997**, 21, 347
- [156]. Lattig J., Bohl M., Fischer P., Tischer S., Tietbohl C., Menschikowski M., Gutzeil H.O., Metz P., Pisabarro M.T., *J. Comput. Aided Mol. Des.*, **2007**, 21, 473
- [157]. Chen J., Chank H.C., Kim H.P., Park H., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, 16, 2373

- [158]. Moon T.C., Quan Z., Kim J., Kim H.P., Kudo I., Murakami M., Park H., Chang H.W., *Bioorg. Med. Chem.*, **2007**, *15*, 7138
- [159]. Da Silva S.L., Calgarotto A.K., Maso V., Damico D.C.S., Baldasso P., Veber C.L., Villar J.A.F.P., Oliveira A.R.M., Comar M.Jr., Oliveira K.M.T., Marangoni S., *Eur. J. Med. Chem.*, **2009**, *44*, 312
- [160]. Toyama D.O., Marangoni S., Diz-Filho E.B.S., Oliveira S.C.B., Toyama M.H. *Toxicon*, **2009**, *53*, 417
- [161]. Dharmappa K.K., Kuman R.K., Nataraju A., Mohamed R., Shivaprasad H.V., Vishwanath B.S., *Planta Med.*, **2009**, *75*, 211
- [162]. http://cmm.cit.nih.gov/modeling/guide_documents/molecular_mechanics_document.html (10/09/2007)
- [163]. Μαυρομούστακος Θ., Ζουμπουλάκης Π., Μοριακή Μοντελοποίηση, **2008**, Ιατρικές Εκδόσεις Γιάννης Β. Παρισιάνος
- [164]. Bourquelot E., Vintilesko J.C.R., *Cmpt. Rend. Herbd. Acad. Sci.*, **1908**, *147*, 533.
- [165]. Panizzi L., Scarpati M.L., Oriente G., *Gazz. Chim. Ital.*, **1960**, *90*, 1449.
- [166]. Kuwajima H., Uemura T., Takaishi K., Inoue K., Inouye H., *Phytochemistry*, **1988**, *27*, 1757.
- [167]. Montedoro G., Servili M., Baldioli M., Selvaggini R., Miniati E., Macchioni A., *J. Agric. Food Chem.*, **1993**, *41*, 2228.
- [168]. Fleming H.P., Walter W.M., Etchellis J.L., *Appl. Microbiol.*, **1973**, *26*, 773.
- [169]. Samuelsson G., *Farmaceutisk Revy.*, **1951**, *15*, 229.
- [170]. Zarzuelo A., *Planta Medica*, **1991**, *57*, 417.
- [171]. Aziz N.H., Farag S.E., Mousa L.A., Abo-Zaid M.A., *Microbios*, **1998**, *93*, 43.
- [172]. Tassou C.C., Nychas G.J., *Letters Appl. Microb.*, **1995**, *20*, 120.
- [173]. Koutsoumanis K., Tassou C.C., Taoukis P.S., Nychas G.J., *J. Appl. Microb.*, **1998**, *84*, 981.
- [174]. Vissoli F., Bellomo G., Galli C., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *247*, 60.

- [175]. Petroni A., Blasevich M., Salami M., Papini M., Montedoro G.F., Galli C.G.J., *Thrombosis Res.*, **1995**, 78, 151.
- [176]. Coni E., Di Benedetto R., Di Pasquale M., Masella R., Modesti D., Mattei R., Carlini E.A., *Lipids* **2000**, 35, 45.
- [177]. Scott D.L., White S.P., Otwinowski Z., Yuan W., Gelb M.H., Singer P.B., *Science*, **1990**, 1541
- [178]. Edwards S.H., Thompson D., Baker S.F., Wood S.P., Wilton D.C., *Biochem.*, **2002**,15468.
- [179]. Li Y., Tsai M.-D., *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 8523.
- [180]. GOLD,v4.1,CCDC,<http://www.ccdc.cam.ac.uk/support/documentation/gold/41/gold/gold.1.1.html> (20/07/2009)
- [181]. Hunter, C.; Singh, J.; Thornton, J. *J. Mol. Biol.* **1991**, 218.
- [182]. Μ. Κόκοτου και Δ. Λημνιός, Πτυχιακή εργασία, Πανεπιστήμιο Αθηνών, **2007**.
- [183]. Jiang R.-W., Lau K.-M. Hon P.-M., Mac T., Woo K.-S., Fung K-P., *Curr. Med. Chem.*, **2005**, 12, 237.