

The antioxidant flavonoid 7-mono-O (B-hydroxyethyl)-rutoside : from clinic to concept

Citation for published version (APA):

Jacobs, H. (2011). *The antioxidant flavonoid 7-mono-O (B-hydroxyethyl)-rutoside : from clinic to concept*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20110701hj>

Document status and date:

Published: 01/01/2011

DOI:

[10.26481/dis.20110701hj](https://doi.org/10.26481/dis.20110701hj)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Chapter 8

Summary and general discussion

Preclinical experiments have shown that the antioxidant flavonoid monoHER has several beneficial pharmacological actions (**Chapter 1**). One of its most important actions is that it protects the heart against doxorubicin-induced damage in mice. Unexpectedly, this protection could not clearly be observed in a clinical phase II study with metastatic cancer patients. In addition, the results of this clinical study suggest that monoHER enhances the antitumour activity of doxorubicin. The aim of this thesis was to explain these unexpected clinical findings. This was done by further investigating the antioxidant properties of monoHER and its interaction with endogenous antioxidants. Also the possible molecular mechanisms behind the antitumour effect of monoHER were studied. Moreover, to explain the different biological effects of monoHER in men and mice, the metabolism of monoHER was studied in both species and its metabolites were characterized.

Antioxidant function of monoHER

During the scavenging of highly reactive species, antioxidants donate an electron or a hydrogen atom to the radical involved. In this way the reactivity of the radical is annihilated. However, in this reaction the antioxidant itself is converted into an oxidation product that takes over part of the reactivity of the radical. In **Chapter 2**, it was shown that in the process of offering protection against free radicals, monoHER is likewise converted into a quinone. This monoHER quinone is reactive towards thiols, e.g. it reacts with glutathione (GSH), thereby forming a GSH-monoHER adduct. Characterization of this adduct by MS and ^1H NMR revealed that GSH binds to the C2' position in the B ring of the monoHER quinone, identifying it as 2'-GSH-monoHER. Molecular quantum chemical calculations revealed that the C2' of the monoHER quinone has the highest LUMO (lowest unoccupied molecular orbital) value, which underscores that the C2' atom is most susceptible to nucleophilic attack by GSH. The GSH-monoHER adduct could also be detected in the bile fluid of a healthy volunteer who received monoHER by intravenous infusion. To our knowledge we were the first to detect a GSH-flavonoid conjugate *in vivo*. The formation of the electrophilic monoHER quinone is potentially harmful because when it reacts with GSH it might lower GSH levels and thus the antioxidant defense. In addition to the reaction with GSH, it is assumed that the quinone is also prone to react with e.g. essential thiol groups of proteins or enzymes, which might cause damage. Thus, the supposed beneficial effect of monoHER as an antioxidant could be eclipsed by the formation of quinone-like products with an electrophilic, toxic potential.

In **Chapter 3** the reactivity of the 2'-GSH-monoHER adduct was studied and compared with that of the 6- or 8-GSH-quercetin adduct. It was found that GSH-quercetin reacts with the thiol N-acetyl-L-cysteine (NAC) to form NAC-quercetin, whereas GSH-monoHER does not react with NAC. In addition, the adduct of the monoHER quinone with the dithiol dithiothreitol (DTT) is relatively stable, whereas the DTT-quercetin adduct is readily converted into quercetin and DTT disulfide. These differences in reactivity of the thiol-flavonoid adducts demonstrate that GSH-monoHER is relatively stable, whereas GSH-quercetin is not. This difference in reactivity was corroborated by molecular quantum chemical calculations. Thus, although both flavonoid quinones are rapidly scavenged by GSH, the advantage of monoHER is that it forms a stable conjugate with GSH, thereby preventing the possible spread of toxicity. These findings demonstrate that even structurally comparable flavonoids behave differently, which should be considered when evaluating the health effects of flavonoids.

To prevent damage by reactive oxidation products of antioxidants, the human body has an intricate network of antioxidants that pass over the reactivity from one antioxidant to another in a controlled way, thereby gradually diminishing the reactivity of the radical and recycling the antioxidants. In **Chapter 4**, it was investigated how monoHER fits into this antioxidant network. This position was compared with that of quercetin. Both the monoHER quinone and the quercetin quinone are reactive towards thiols of both GSH and proteins. However, in human blood plasma where GSH is practically absent, oxidized quercetin readily reacts with protein thiols, whereas oxidized monoHER does not react with plasma protein thiols. This could be explained by the presence of ascorbate in plasma, because ascorbate is able to reduce oxidized monoHER to the parent compound monoHER before oxidized monoHER can react with thiols. This is a major difference with oxidized quercetin that preferentially reacts with thiols rather than ascorbate (Boots *et al.*, 2003). The difference in selectivity between monoHER and quercetin originates from an intrinsic difference in the chemical nature of their oxidation products, which was confirmed by molecular quantum chemical calculations. The reactivity is directed in different ways by the two flavonoids studied. The advantage of monoHER is that it can safely channel the reactivity of radicals into the antioxidant network where the reactivity is neutralized. Thus, structurally related flavonoids belonging to the same subgroup and displaying a comparable radical scavenging activity, may have a different impact on health.

Antitumour effect of monoHER

The results of the clinical phase II study, evaluating the protective effects of monoHER on doxorubicin-induced cardiotoxicity, suggest that monoHER enhances the antitumour activity of doxorubicin in soft tissue sarcomas. This effect was investigated *in vitro* using soft tissue sarcoma cell lines (**Chapter 5**). In one (WLS-160) of the four cell lines monoHER potentiated the antitumour activity of doxorubicin. In this cell line it appeared that the effect is mediated by the induction of an apoptotic pathway. Because monoHER is able to form a GSH-monoHER adduct, it was investigated whether monoHER can deplete GSH in the soft tissue sarcoma cell lines. In contrast to the known GSH depleter L-buthionine sulfoximine (BSO), monoHER did not significantly change GSH levels in these cancer cells. This suggests that the growth inhibitory effect of monoHER in WLS-160 cells is not mediated via GSH depletion, which is in contrast to the GSH depletion observed in some cancer cells by some other flavonoids (Kachadourian and Day, 2006; Kachadourian *et al.*, 2007; Ramos and Aller, 2008). It is known that many chemotherapeutic agents induce the transcription factor NF- κ B, which causes drug resistance in cancer cells (Sarkar and Li, 2008). Accordingly, doxorubicin rapidly induced NF- κ B activity in WLS-160 cells, which was prevented by monoHER. Thus, down-regulation of NF- κ B activation by monoHER may be responsible for the sensitization of these cancer cells to doxorubicin. From this study it may be assumed that monoHER might improve chemotherapy for certain soft tissue sarcoma patients. Moreover, it cannot be excluded that monoHER may also be valuable for the treatment of other tumours that have developed resistance through NF- κ B activation.

Metabolism of monoHER in mice and men

In mice, monoHER has been successfully used as a protector against doxorubicin-induced cardiotoxicity. However, most monoHER has already been cleared from the body at the time that doxorubicin concentrations are still high. This suggests that not only the parent compound monoHER itself, but also monoHER metabolites could be responsible for the observed cardioprotective effects in mice. In **Chapter 6**, the metabolism of monoHER was investigated in the bile fluid of mice. This led to the characterization of thirteen different metabolites. The observed routes of monoHER metabolism were methylation, glucuronidation, oxidation of its hydroxyethyl group, GSH conjugation, and hydrolysis of its disaccharide. In line with other flavonoids, methylated monoHER and the monoHER glucosides were expected to have a relatively high cellular uptake and a low clearance from the body. Therefore, it is suggestive that these metabolites

might contribute to the observed protection of monoHER against doxorubicin-induced cardiotoxicity.

The observed preclinical protection of monoHER against doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice could however not be observed in the clinical phase II study with metastatic cancer patients (Bruynzeel *et al.*, 2007). It could be that metabolites of monoHER, which contribute to its cardioprotection, are formed in mice but not (or to a lesser extent) in men. Therefore, the metabolism of monoHER was also investigated in the bile fluid of healthy volunteers (**Chapter 7**). The same metabolites were found in men as previously in mice; however the relative amounts of the metabolites were quite different. The major metabolic route in mice appeared to be methylation while in humans especially glucuronidation was observed. It has been shown that methylation of flavonoids makes them more lipophilic, thereby improving their transport over biological membranes and increasing their cellular uptake (Spencer *et al.*, 2004; Spencer *et al.*, 2003). It is therefore suggestive that the methylated conjugates of monoHER are active metabolites that contribute to the observed cardioprotective effect of monoHER in mice. Glucuronidation, on the other hand, leads to reduced cellular uptake and accelerated elimination (Miners and Mackenzie, 1991) and thus does not contribute to the cardioprotective effect of monoHER. Moreover in mice, in contrast to men, monoHER metabolites in which the disaccharide is cleaved -and thus contain a free glucose moiety- were formed at later time-points and to a greater extent. These metabolites are possibly taken up by cardiac cells via glucose transporters, thereby increasing the intracellular antioxidant concentration and contributing to the protective effect of monoHER. From this study it could be concluded that the difference in the metabolic profile between men and mice might possibly explain the different biological activity of monoHER in both species.

Implications and further research

MonoHER and its metabolites are good candidates for further investigations. Besides the favourable properties of monoHER described in the introductory chapter, the research described in this thesis added some more advantages, i.e., the oxidation product of monoHER (in contrast to that of quercetin) can more easily be reduced to monoHER and is therefore relatively harmless, monoHER can reduce NF- κ B activation in certain tumour cells, and certain monoHER metabolites may contribute to cardioprotection and possibly to antitumour activity.

Therefore, several interesting research lines are open for the future:

- Concerning the antitumour properties of monoHER, it would be interesting to investigate whether monoHER also sensitises other tumours that have developed resistance to chemotherapy through NF- κ B activation.
- It would also be valuable to study the antioxidant and antitumour activities of the newly identified monoHER metabolites.
- Promising active metabolites can then be further investigated in a tumour bearing nude mouse model.
- Because it is likely that the methylated metabolites of monoHER contribute to its cardioprotective effects, it would be interesting to measure their effects in our mouse atrium model and to measure the pharmacokinetics of the active metabolites in plasma and heart tissue of mice.
- In a next step, the cardioprotective metabolites have to be investigated in mice.
- If results are promising, clinical study/studies may be proposed regarding the antitumour and/or cardioprotective effect.

References

- Boots AW, Kubben N, Haenen GR, Bast A (2003) Oxidized quercetin reacts with thiols rather than with ascorbate: implication for quercetin supplementation. *Biochem Biophys Res Commun* **308**: 560-565
- Bruynzeel AM, Niessen HW, Bronzwaer JG, van der Hoeven JJ, Berkhof J, Bast A, van der Vijgh WJ, van Groenigen CJ (2007) The effect of monohydroxyethylrutoside on doxorubicin-induced cardiotoxicity in patients treated for metastatic cancer in a phase II study. *Br J Cancer* **97**: 1084-1089
- Kachadourian R, Day BJ (2006) Flavonoid-induced glutathione depletion: potential implications for cancer treatment. *Free Radic Biol Med* **41**: 65-76
- Kachadourian R, Leitner HM, Day BJ (2007) Selected flavonoids potentiate the toxicity of cisplatin in human lung adenocarcinoma cells: a role for glutathione depletion. *Int J Oncol* **31**: 161-168
- Miners JO, Mackenzie PI (1991) Drug glucuronidation in humans. *Pharmacol Ther* **51**: 347-369
- Ramos AM, Aller P (2008) Quercetin decreases intracellular GSH content and potentiates the apoptotic action of the antileukemic drug arsenic trioxide in human leukemia cell lines. *Biochem Pharmacol* **75**: 1912-1923
- Sarkar FH, Li Y (2008) NF-kappaB: a potential target for cancer chemoprevention and therapy. *Front Biosci* **13**: 2950-2959
- Spencer JP, Abd-el-Mohsen MM, Rice-Evans C (2004) Cellular uptake and metabolism of flavonoids and their metabolites: implications for their bioactivity. *Arch Biochem Biophys* **423**: 148-161
- Spencer JP, Kuhnle GG, Williams RJ, Rice-Evans C (2003) Intracellular metabolism and bioactivity of quercetin and its in vivo metabolites. *Biochem J* **372**: 173-181

Samenvatting en algemene discussie

Uit preklinische experimenten is gebleken dat het antioxidant flavonoïde monoHER verschillende gunstige farmacologische eigenschappen bezit (**Hoofdstuk 1**). Eén opmerkelijke eigenschap is de bescherming tegen doxorubicine geïnduceerde hartschade in muizen. Deze bescherming kon helaas niet duidelijk worden bevestigd in een klinische fase II studie met een kleine groep kankerpatiënten met een metastatische ziekte. De resultaten van deze klinische studie suggereerden wel dat monoHER de antitumor activiteit van doxorubicine versterkt. Het doel van dit proefschrift was om deze onverwachte klinische bevindingen nader te verklaren. Hiertoe werden de antioxidant eigenschappen van monoHER en de interactie met endogene antioxidanten nader bestudeerd. Ook werden de mogelijke moleculaire mechanismen achter het gunstige effect van monoHER op de antitumor werking van doxorubicine onderzocht. Om de verschillende biologische effecten van monoHER in muis en mens te verklaren, werd bovendien het metabolisme van monoHER in zowel muis als mens bestudeerd en werden de monoHER metabolieten gekarakteriseerd.

Antioxidant functie van monoHER

Tijdens het wegvangen van reactieve deeltjes (radicalen) doneren antioxidanten een elektron of een waterstofatoom aan het betrokken radicaal. Op deze manier wordt de reactiviteit van het radicaal tenietgedaan. Tijdens deze reactie wordt het antioxidant echter zelf omgezet in een oxidatieproduct, dat een deel van de reactiviteit van het radicaal overneemt. In **Hoofdstuk 2** werd aangetoond dat monoHER ook wordt omgezet in een oxidatieproduct (quinon) wanneer het beschermt tegen vrije radicalen. Dit monoHER quinon is reactief met thiolen, het reageert met glutathion (GSH) waarbij een GSH-monoHER adduct wordt gevormd. Opheldering van de structuur van dit adduct met MS en ^1H NMR toonde aan dat GSH op de C2' plaats in de B ring van het monoHER quinon bindt, waardoor het als 2'-GSH-monoHER geïdentificeerd werd. Moleculair kwantum chemische berekeningen toonden aan dat het C2' atoom van het monoHER quinon de hoogste LUMO (laagst onbezette moleculaire orbitaal) waarde heeft. Dit verklaart dat het C2' atoom de meest waarschijnlijke plaats is voor nucleofiele aanval van GSH. Het GSH-monoHER adduct werd ook teruggevonden in de galvloeistof van een gezonde vrijwilliger die monoHER kreeg toegediend via een intraveneus infuus. Voor zover wij weten, zijn wij de eersten die een GSH-flavonoïde adduct hebben gedetecteerd *in vivo*. De vorming van het elektrofile monoHER quinon is mogelijk schadelijk omdat het, wanneer het met GSH reageert, de GSH concentraties en dus het antioxidant verdedigingsmechanisme verlaagt. Bovendien wordt verondersteld dat het quinon, naast

GSH, ook met essentiële thiolgroepen van eiwitten, zoals enzymen, kan reageren. Het veronderstelde positieve effect van monoHER als antioxidant kan dus worden overschaduwd door de vorming van quinon producten met een elektrofiel en potentieel toxisch karakter.

In **Hoofdstuk 3** werd de reactiviteit van het 2'-GSH-monoHER adduct bestudeerd en vergeleken met dat van het 6- of 8-GSH-quercetine adduct. Er werd gevonden dat GSH-quercetine met het thiol N-acetyl-L-cysteine (NAC) reageert, waarbij NAC-quercetine wordt gevormd. Het GSH-monoHER adduct daarentegen reageerde niet met NAC. Bovendien werd gevonden dat het adduct van het monoHER quinon met de dithiol dithiothreitol (DTT) relatief stabiel is, terwijl het DTT-quercetine adduct snel wordt omgezet in quercetine en DTT disulfide. Deze verschillen in reactiviteit van de thiol-flavonoïde adducten tonen aan dat GSH-monoHER veel stabiel is dan GSH-quercetine. Dit verschil in reactiviteit werd bevestigd door moleculair kwantum chemische berekeningen. Hoewel beide quinonen van monoHER en quercetine snel ingevangen worden door GSH, is het voordeel van monoHER t.o.v. quercetine dat het een stabiel adduct vormt met GSH en daarbij de mogelijke verspreiding van toxiciteit voorkomt. Deze bevindingen tonen aan dat zelfs flavonoïden met een zeer vergelijkbare structuur zich verschillend gedragen. Dit kan tot uiting komen in de biologische effecten van deze flavonoïden.

Om schade veroorzaakt door reactieve oxidatieproducten van antioxidanten te voorkomen, heeft het menselijk lichaam een intrinsiek netwerk van antioxidanten, die op een gecontroleerde manier de reactiviteit van het ene naar het andere antioxidant overbrengen. Op deze manier wordt de reactiviteit van het radicaal geleidelijk verminderd en worden de antioxidanten telkens terug gevormd. In **Hoofdstuk 4** werd onderzocht hoe monoHER in dit antioxidantnetwerk past. Deze positie werd vergeleken met die van quercetine. Zowel het monoHER quinon als het quercetine quinon zijn reactief met thiolen van zowel GSH als eiwitten. In humaan bloed plasma, dat bijna geen GSH bevat, reageert geoxideerd quercetine echter snel met eiwitthiolen, terwijl geoxideerd monoHER niet met plasma eiwitthiolen reageert. Dit kon worden verklaard door de aanwezigheid van vitamine C in plasma. Vitamine C is in staat het geoxideerde monoHER te reduceren tot monoHER voordat het geoxideerde monoHER met thiolen kan reageren. Dit is in tegenstelling met het geoxideerde quercetine dat eerder met thiolen reageert dan met vitamine C. Het verschil in deze selectiviteit tussen monoHER en quercetine, komt door een intrinsiek verschil in de chemische aard van hun oxidatieproducten. Dit werd bevestigd door moleculair kwantum chemische berekeningen. De reactiviteit wordt door de twee bestudeerde flavonoïden op verschillende manieren gereguleerd. Het voordeel van

monoHER is dat het de reactiviteit van de radicalen veilig het antioxidantnetwerk in kan sturen, zodat de reactiviteit geneutraliseerd wordt. Dit toont wederom aan dat structuur gerelateerde flavonoiden, die tot dezelfde subgroep behoren en een vergelijkbare radicaal vangende activiteit hebben, een heel verschillende impact op de gezondheid kunnen hebben.

Antitumor effect van monoHER

De resultaten van de klinische fase II studie, waarin de beschermende effecten van monoHER op doxorubicine geïnduceerde cardiotoxiciteit geëvalueerd werden, suggereren dat monoHER het antitumor effect van doxorubicine in weke delen sarcomen versterkt. Dit effect werd *in vitro* verder onderzocht door gebruik te maken van weke delen sarcomen cellijnen (**Hoofdstuk 5**). In één (WLS-160) van de vier onderzochte cellijnen, versterkte monoHER het antitumor effect van doxorubicine. In deze cellijn bleek het effect van monoHER gemedieerd te worden door de inductie van apoptose. Omdat monoHER in staat is een GSH-monoHER adduct te vormen, werd er onderzocht of monoHER het GSH-niveau in de weke delen sarcomen cellijnen kan verlagen. In tegenstelling tot de bekende GSH verlagende stof, L-buthionine sulfoximine (BSO), had monoHER geen significante invloed op de GSH-niveaus in deze kankercellen. Dit suggereert dat, in tegenstelling tot de GSH-depletie die werd waargenomen in sommige kankercellen veroorzaakt door enkele andere flavonoiden, de groeiremmende effecten van monoHER in WLS-160 cellen niet gemedieerd werden door GSH depletie. Het is bekend dat vele chemotherapeutische middelen de transcriptiefactor NF- κ B activeren, hetgeen resistentie tegen deze middelen veroorzaakt in kankercellen. Zo activeerde doxorubicine ook snel NF- κ B in WLS-160 cellen, wat voorkomen werd door monoHER. Vermindering van NF- κ B activatie door monoHER zou dus verantwoordelijk kunnen zijn voor het gevoelig maken van deze kankercellen voor doxorubicine. Uit deze studie kan geconcludeerd worden dat monoHER de chemotherapie voor bepaalde patiënten met een weke delen sarcoom mogelijk kan verbeteren. Vervolgonderzoek moet aantonen of monoHER ook waardevol kan zijn voor de behandeling van andere tumoren die resistentie ontwikkeld hebben via NF- κ B activatie.

Metabolisme van monoHER in muis en mens

In muizen werd monoHER met succes gebruikt als een beschermer tegen doxorubicine geïnduceerde cardiotoxiciteit. Het merendeel van monoHER is echter al verdwenen uit het lichaam op het moment dat de doxorubicine con-

centraties nog hoog zijn. Dit suggereert dat, naast monoHER zelf, ook monoHER metabolieten betrokken kunnen zijn bij het vastgestelde hartbeschermende effect van monoHER in muizen. In **Hoofdstuk 6** werd het metabolisme van monoHER onderzocht door de galvloeistof van muizen, die monoHER kregen toegediend, te verzamelen. Dit leidde tot de karakterisatie van dertien verschillende metabolieten. De volgende metabole routes van monoHER werden waargenomen: methylering, glucuronidering, oxidatie van de hydroxyethyl groep, GSH conjugatie en hydrolyse van het disaccharide. Op grond van bevindingen met andere flavonoïden wordt verwacht dat gemethyleerd monoHER en de monoHER glucosiden een relatief hoge cellulaire opname en relatief lage klaring uit het lichaam hebben. Het is daarom aannemelijk dat deze metabolieten kunnen bijdragen aan de waargenomen bescherming van monoHER tegen doxorubicine geïnduceerde cardiotoxiciteit.

De in muizen gevonden bescherming van monoHER tegen doxorubicine geïnduceerde cardiotoxiciteit kon niet duidelijk worden bevestigd in de klinische fase II studie met kankerpatiënten met een gemetastaseerde ziekte. Mogelijk worden monoHER metabolieten, die bijdragen tot de bescherming, wel gevormd in muizen, maar niet (of in mindere mate) in mensen. Daarom werd het monoHER metabolisme ook onderzocht in de galvloeistof van gezonde vrijwilligers (**Hoofdstuk 7**). In deze mensen werden dezelfde metabolieten teruggevonden als eerder in muizen. De relatieve hoeveelheden van de metabolieten verschilden wel in hoge mate tussen beide soorten. De belangrijkste metabole route in muizen bleek methylering te zijn, terwijl in mensen vooral glucuronidering werd waargenomen. Methylering maakt flavonoïden lipofiel, waardoor ze beter over biologische membranen getransporteerd kunnen worden en hun cellulaire opname verhoogd wordt. Het is daarom aannemelijk dat de gemethyleerde metabolieten van monoHER bijdragen aan het hartbeschermende effect van monoHER, dat werd waargenomen in muizen. Glucuronidering, daarentegen, vermindert de opname in de cel en versnelt de eliminatie. De geglucuronideerde metabolieten zullen daarom niet bijdragen aan het hartbeschermende effect van monoHER. Bovendien werden er in muizen, in tegenstelling tot in mensen, meer monoHER metabolieten gevormd die een vrije glucose groep bevatten (monoHER glucosiden). Verondersteld wordt dat deze metabolieten actief worden opgenomen door hartcellen via glucose transporters, wat de intracellulaire antioxidant concentratie verhoogt en dus bijdraagt aan het beschermende effect van monoHER. Uit deze studie kon geconcludeerd worden dat het verschil in het metabole profiel tussen muis en mens mogelijk de verschillende biologische activiteit van monoHER in beide species verklaart.

Implicaties en verder onderzoek

MonoHER en de metabolieten van monoHER zijn goede kandidaten voor verder onderzoek. Aan de positieve eigenschappen van monoHER, die werden beschreven in het inleidende hoofdstuk, heeft het onderzoek beschreven in dit proefschrift er nog enkele toegevoegd. Zo kan het oxidatieproduct van monoHER (in tegenstelling tot dat van quercetine) gemakkelijker gereduceerd worden tot monoHER waardoor het minder schadelijk is, monoHER kan NF- κ B activatie verminderen in bepaalde kankercellen en verondersteld wordt dat bepaalde monoHER metabolieten bijdragen tot de hartbescherming en mogelijk de antitumor activiteit.

Er staan daarom verschillende interessante onderzoeklijnen open voor de toekomst:

- Wat het antitumor effect van monoHER betreft, zou het interessant zijn om te onderzoeken of monoHER, naast de bestudeerde liposarcoma WLS-160, ook andere tumoren, die resistentie voor chemotherapie ontwikkeld hebben door NF- κ B activatie, terug gevoeliger kan maken voor chemotherapie.
- Het zou ook waardevol zijn om de antioxidant en antitumor activiteiten van de nieuw geïdentificeerde monoHER metabolieten te onderzoeken.
- Veelbelovende actieve metabolieten kunnen dan verder onderzocht worden in ons tumordragende naakte muizenmodel.
- Gebaseerd op de veronderstelling dat de gemethyleerde metabolieten van monoHER het hart beschermen, zou het interessant zijn om deze stoffen te onderzoeken in ons muis atrium model en om de farmacokinetiek van de actieve metabolieten te bepalen in plasma en hartweefsel van muizen.
- In een volgende stap zullen de hartbeschermende metabolieten onderzocht moeten worden in muizen, *in vivo*.
- Als de resultaten veelbelovend zijn, kan het antitumor en/of hartbeschermende effect van de monoHER metabolieten klinisch worden onderzocht.