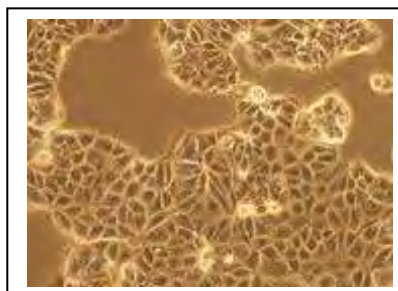
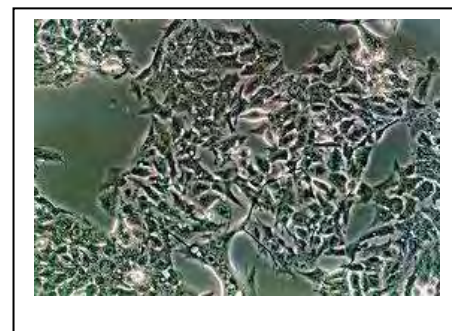
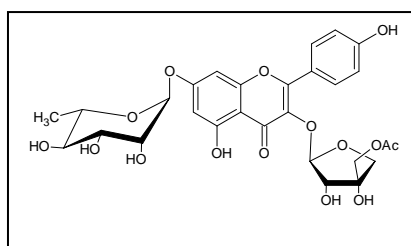
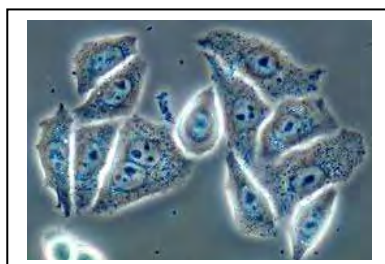
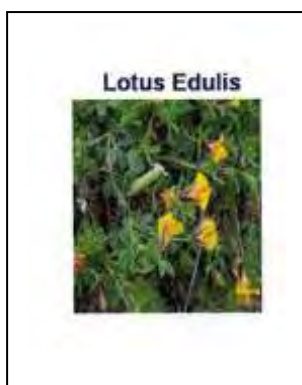


Διπλωματική εργασία

**«Δράση καθαρών πολυφαινολικών ενώσεων από ψυχανθή σε
ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα»**



Φοιτήτρια : Εμμανουηλίδη Αικατερίνη

Επιβλέπουσα καθηγήτρια : Λιαδάκη Καλλιόπη

Λάρισα, 2011

Στοιχεία Πτυχιακής Εργασίας

Το πειραματικό μέρος της πτυχιακής εργασίας με θέμα «Δράση καθαρών πολυφαινολικών ενώσεων από ψυχανθή σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα» πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο κυτταροκαλλιεργειών του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη της κ. Καλλιόπης Λιαδάκη.

Τριμελής Επιτροπή

Λιαδάκη Καλλιόπη, Λέκτορας Βιοχημικής Φαρμακολογίας

Κουρέτας Δημήτριος, Καθηγητής Φυσιολογίας Ζώων

Στάγκος Δημήτριος, Λέκτορας Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών

Ευχαριστίες

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Καλλιόπη Λιαδάκη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε στην ανάθεση της πτυχιακής μου εργασίας, καθώς και την καθοδήγηση, βοήθεια και στήριξή της.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τους γονείς μου που με την αμέριστη αγάπη, στήριξη κι εμπιστοσύνη που μου δείχνουν όλα αυτά τα χρόνια, πραγματοποιώ τα όνειρα και τις φιλοδοξίες μου. Τους ευχαριστώ που πιστεύουν απόλυτα σε μένα και σε κάθε επιλογή μου.

Ευχαριστώ τους φίλους μου που στάθηκαν δίπλα μου και ομόρφυναν τα φοιτητικά μου χρόνια.

Εμμανουηλίδη Κατερίνα

Περιεχόμενα	
Περίληψη	10
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	11
1.1. Πολυσταδιακό μοντέλο καρκινογένεσης	11
1.2. Χημειοπροφύλαξη στον καρκίνο	13
1.2.1. Κατηγορίες χημειοπροφυλακτικών παραγόντων	14
1.3. Οξειδωτικό στρες, ελεύθερες ρίζες και αντιοξειδωτικά	17
1.3.1. Δραστικές μορφές οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS)	17
1.3.2. Οξειδωτικό_στρες και οι συνέπειες του στα κύτταρα	17
1.3.3. Αντιοξειδωτικοί αμυντικοί μηχανισμοί	18
1.4. Πολυφαινόλες	20
1.4.1. Κατηγοριοποίηση	20
1.4.2. Φαινολικά οξέα	22
1.4.2.1. Προέλευση και βιοδιαθεσιμότητα	22
1.4.2.2. Δράση	22
1.4.3. Φλαβονοειδή	24
1.4.3.1. Προέλευση και βιοδιαθεσιμότητα	24
1.4.3.2. Αντικαρκινική δράση φλαβονοειδών	25
1.4.3.3. Φλαβονόλες	26
1.4.3.3.1. Προέλευση και βιοδιαθεσιμότητα	26
1.4.3.3.2. Δράση	27
1.4.3.4. Ανθοκυανίνες	28
1.4.3.4.1. Προέλευση και βιοδιαθεσιμότητα	28
1.4.3.4.2. Δράση	29

1.4.3.5. Κατεχίνες	29
1.4.3.5.1. Προέλευση και βιοδιαθεσιμότητα	29
1.4.3.5.2. Δράση	30
1.4.4. Στιλβένια	31
1.4.4.1. Προέλευση και βιοδιαθεσιμότητα	31
1.4.4.2. Δράση	32
1.4.5. Λιγνάνες	33
1.4.5.1. Προέλευση και βιοδιαθεσιμότητα	33
1.4.5.2. Δράσεις	34
1.4.6. Πολυφαινόλες ως αναστολείς τοποϊσομερασών ως αντικαρκινικοί παράγοντες	35
1.4.6.1. DNA τοποϊσομεράσες	35
1.4.6.2. Αναστολείς DNA τοποϊσομερασών	36
1.4.6.3. Πολυφαινόλες ως αναστολείς των τοποϊσομερασών	38
ΣΚΟΠΟΣ	41
2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	41
2. 1. Υλικά	41
2.1.1. Χημικά αντιδραστήρια	41
2.1.2. Θρεπτικά υλικά	41
2.1.3. Διαδικασία απομόνωσης των φυτικών εκχυλισμάτων και των πολυφαινολικών ενώσεων	41
2.1.4. Καθαρές πολυφαινολικές ενώσεις	42
2.2. Μέθοδοι	45
2.2.1. Καρκινικές κυτταρικές σειρές	45
2.2.1.1. Καλλιέργεια καρκινικών κυτταρικών σειρών	45
2.2.2. Προσδιορισμός κυτταρικής αύξησης με μέθοδο ΧΤΤ	48
2.2.2.1. Αρχή της μεθόδου	48

2.2.2.2. Επιλογή αριθμού κυττάρων για τη μελέτη της κυτταρικής αύξησης	49
3. Αποτελέσματα	51
3.1. Παράμετροι που εξετάζονται για την εύρεση βέλτιστων συνθηκών του πειράματος κυτταρικής επιβίωσης	51
3.2. Επίδραση ενώσεων στην ανάπτυξη κυττάρων HeLa	53
3.3. Επίδραση ενώσεων στην ανάπτυξη κυττάρων HepG2	54
3.4. Επίδραση καθαρών ενώσεων σε κύτταρα MCF-7	56
4. Συζήτηση	59
Βιβλιογραφία	62

Περιεχόμενα Εικόνων

<u>Εικόνα 1:</u> <i>Η υποθετική εξέλιξη από τα φυσιολογικά στα κακοήθη κύτταρα</i>	13
<u>Εικόνα 2:</u> <i>Βασικός σκελετός φλαβονοειδών</i>	21
<u>Εικόνα 3:</u> <i>Σκελετός φλαβονολών και φλαβονών</i>	21
<u>Εικόνα 4:</u> <i>Σκελετός ανθοκυανιδινών</i>	21
<u>Εικόνα 5:</u> <i>Κύριοι αντιπρόσωποι φλαβονολών: κεμπφερόλη, κερσετίνη, μυρισετίνη και ισοραμνετίνη</i>	26
<u>Εικόνα 6:</u> <i>Κατεχίνες</i>	30
<u>Εικόνα 7:</u> <i>Χημική δομή ρεσβερατρόλης</i>	32
<u>Εικόνα 8:</u> <i>Χημική δομή λιγνανών</i>	33
<u>Εικόνα 9 :</u> <i>Χημική δομή εντεροδιόλης κι εντερολακτόνης</i>	34
<u>Εικόνα 10:</u> <i>Αναστολείς της τοποϊσομεράσης II</i>	37
<u>Εικόνα 11:</u> <i>Αναστολείς της τοποϊσομεράσης I</i>	37
<u>Εικόνα 12:</u> <i>Χημική δομή των φλαβονοειδών λουτεολίνη και κερκετίνη</i>	38
<u>Εικόνα 13:</u> <i>Μεταβολισμός του ΧΤΤ σε υδατοδιαλυτό άλας φορμαζάνης, σε μεταβολικά ενεργά κύτταρα</i>	49

Περιεχόμενα Πινάκων

<u>Πίνακας 1:</u> Αντικαρκινικές ιδιότητες των φλαβονοειδών σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές	25
<u>Πίνακας 2:</u> Οι ιδιότητες των ευκαρυωτικών DNA τοποϊσομερασών I και II	36
<u>Πίνακας 3:</u> Ικανότητα αναστολής της τοποϊσομεράσης I από ορισμένα φλαβονοειδή	39
<u>Πίνακας 4:</u> Περιεχόμενο πηγαδιών πειράματος	51
<u>Πίνακας 5:</u> Απορρόφηση ενώσεων σε συγκέντρωση 500 Μμ	52
<u>Πίνακας 6:</u> Απορρόφηση ένωσης LeC2 σε διάφορες συγκεντρώσεις	52

Περιεχόμενα Γραφημάτων

<u>Γράφημα 1:</u> Αναστολή της ανάπτυξης κυττάρων HeLa από τις ενώσεις σε συγκέντρωση 500 μM	53
<u>Γράφημα 2:</u> Αναστολή της ανάπτυξης κυττάρων HeLa από τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις της ένωσης C2.	54
<u>Γράφημα 3:</u> Αναστολή της ανάπτυξης κυττάρων HepG2 από τις ενώσεις σε συγκέντρωση 500 μM	55
<u>Γράφημα 4:</u> Αναστολή της ανάπτυξης κυττάρων HepG2 από τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις της ένωσης C2	56
<u>Γράφημα 5:</u> Αναστολή της ανάπτυξης κυττάρων MCF-7 από τις ενώσεις σε συγκέντρωση 500 μM	57
<u>Γράφημα 6:</u> Αναστολή της ανάπτυξης κυττάρων MCF-7 από τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις της ένωσης C2	58

Περίληψη

Τα ψυχανθή ανήκουν στην οικογένεια *Leguminosae* και καρπός τους είναι τα όσπρια, τα οποία θεωρούνται από τις θρεπτικότερες τροφές της Μεσογειακής διατροφής, καθώς περιέχουν πλήθος ωφέλιμων συστατικών μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται και οι πολυφαινόλες. Οι πολυφαινόλες είναι οργανικές ενώσεις με σπουδαίες αντιοξειδωτικές και αντικαρκινικές ιδιότητες, στις οποίες έχουν αποδωθεί οι χημειοπροστατευτικές τους δράσεις. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν καθαρές ενώσεις που προέρχονται από τα φυτά *Vicia faba* και *Lotus Edulis* ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό ανθρωπίνων καρκινικών κυττάρων τραχήλου της μήτρας (HeLa), ήπατος (HepG2) και μαστού (MCF-7). Συνολικά εξετάστηκαν 7 καθαρές πολυφαινολικές ενώσεις που απομονώθηκαν από μεθανολικά εκχυλίσματα των φυτών *Vicia faba* και *Lotus edulis*, και κυρίως αποτελούν γλυκοσίδια των φλαβονολών κεμπφερόλης και κερκετίνης. Οι ενώσεις αυτές σε συγκέντρωση 500 μM εμφάνισαν χαμηλά ποσοστά αναστολής στην ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων HeLa, HepG2 και MCF-7. Αντιθέτως η ένωση C2, που χαρακτηρίζεται από την παρουσία μιας ακετυλομάδας στο μόριο του σακχάρου, εμφάνισε υψηλά ποσοστά (έως 95%) στην αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης. Στη συνέχεια υπολογίσθηκε ότι η συγκέντρωση της ένωσης C2 στην οποία επιτυγχάνεται το 50% της αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης (IC_{50}) είναι 350 μM για τα κύτταρα HeLa και MCF-7 και 410 μM για τα κύτταρα HepG2. Τα αποτελέσματα συνάδουν με προηγούμενες μελέτες που έχουν αναδείξει την ένωση C2 ως ισχυρό αντιοξειδωτικό και αντιμεταλλαξιγόνο παράγοντα και ως αναστολέα ευκαρυωτικών τοποϊσομερασών και την καθιστούν υποψήφιο χημειοπροστατευτικό και αντικαρκινικό παράγοντα.

1. Εισαγωγή

1.1. Πολυσταδιακό μοντέλο καρκινογένεσης

Με τις μάστιγες της κακής διατροφής και των λοιμωδών ασθενειών κάτω από σχετικά καλό έλεγχο σε πολλά μέρη στον κόσμο, ο καρκίνος έχει αναδειχθεί σε μείζον πρόβλημα υγείας. Με τη συνεχή μείωση της θνησιμότητας από καρδιακή νόσο, ο καρκίνος θα μπορούσε να αναδειχθεί σήμερα σε κύρια αιτία θανάτου στον αναπτυσσόμενο κόσμο. Παρά τις σημαντικές επιτυχίες στη θεραπεία συγκεκριμένων τύπων καρκίνου, οι θάνατοι από τη συγκεκριμένη νόσο παραμένουν σε υψηλά επίπεδα τα τελευταία 30 χρόνια. Φυσικά, ο καρκίνος δεν είναι μια ασθένεια αλλά μια πλειάδα διαφορετικών νόσων που χαρακτηρίζονται από τη θέση, τον τύπο του ιστού και το βαθμό της κακοήθειας.

Αν και η ανάπτυξη καρκίνου σε οποιονδήποτε ασθενή δεν μπορεί να αποδοθεί συχνά σε μια μοναδική κληρονομούμενη ανωμαλία, σε κυτταρικό επίπεδο ο καρκίνος είναι κατά βάση μια γενετική ασθένεια. Κάθε ανθρώπινο κύτταρο φέρει ένα πολύπλοκο και αυστηρά ρυθμιζόμενο γενετικό πρόγραμμα, που ελέγχει τη φυσιολογική κυτταρική αύξηση και διαφοροποίηση. Ο καρκίνος οφείλεται σε μια διαταραχή αυτού του φυσιολογικού ρυθμιστικού προτύπου, με αποτέλεσμα την ανεξέλεγκτη κυτταρική αύξηση και τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό, γεγονότα που χαρακτηρίζουν έναν κακοήθη όγκο. Μέσω της τοπικής αύξησης και της επέκτασής τους, καθώς και μέσω της μεταστατικής διασποράς τους σε απομακρυσμένα σημεία, οι καρκίνοι διαταράσσουν τη φυσιολογική λειτουργία των οργάνων, με αποτέλεσμα σοβαρή νοσηρότητα και συχνά θάνατο.

Η διαδικασία της καρκινογένεσης περιλαμβάνει τρία στάδια: την έναρξη, την προαγωγή και την πρόοδο. Η έναρξη περιλαμβάνει τη μετατροπή μιας προ-καρκινογόνου χημικής ένωσης σε τελικό καρκινογόνο που μπορεί να αντιδρά με το DNA, και την αλληλεπίδραση του τελικού καρκινογόνου με το DNA, με αποτέλεσμα τη δημιουργία μεταλλάξεων. Οι μεταλλάξεις μπορεί να συμβούν σε ογκογονίδια, πρωτο-ογκογονίδια ή ογκοκατασταλτικά γονίδια. Στη συνέχεια πρέπει να ακολουθήσει κυτταρικός πολλαπλασιασμός για την ενσωμάτωση της μετάλλαξης στο DNA. Τα εναρκτήρια κύτταρα μπορεί να παραμείνουν σε λανθάνουσα κατάσταση και για να γίνουν νεοπλαστικά πρέπει να ακολουθήσουν τα στάδια της προαγωγής και της πρόοδου. Η έναρξη είναι μια μη αντιστρεπτή διαδικασία.

Ο όρος προαγωγή της καρκινογένεσης αναφέρεται στο φαινόμενο κατά το οποίο μετά την ενεργοποίηση ενός γονιδίου ο λανθάνων αλλαγμένος φαινότυπος των εναρκτήριων κυττάρων εκφράζεται μέσω επιλογής τους κι επέκτασης του μεταλλαγμένου κλώνου. Η προαγωγή, σε αντίθεση με την έναρξη και την πρόοδο, είναι μια αντιστρεπτή διαδικασία, οπότε για την αύξηση του κυτταρικού πληθυσμού που βρίσκεται στη φάση της προαγωγής (ο οποίος ονομάζεται προ-νεοπλαστική αλλοίωση) είναι απαραίτητη η συνεχής παρουσία των παραγόντων προαγωγής. Η φάση της προαγωγής μπορεί να διαρκέσει ακόμα και δεκαετίες, και ακριβώς λόγω της μακράς διάρκειας και της αντιστρεψιμότητάς της θεωρείται ένας κατάλληλος στόχος για τη χημειοπροφύλαξη.

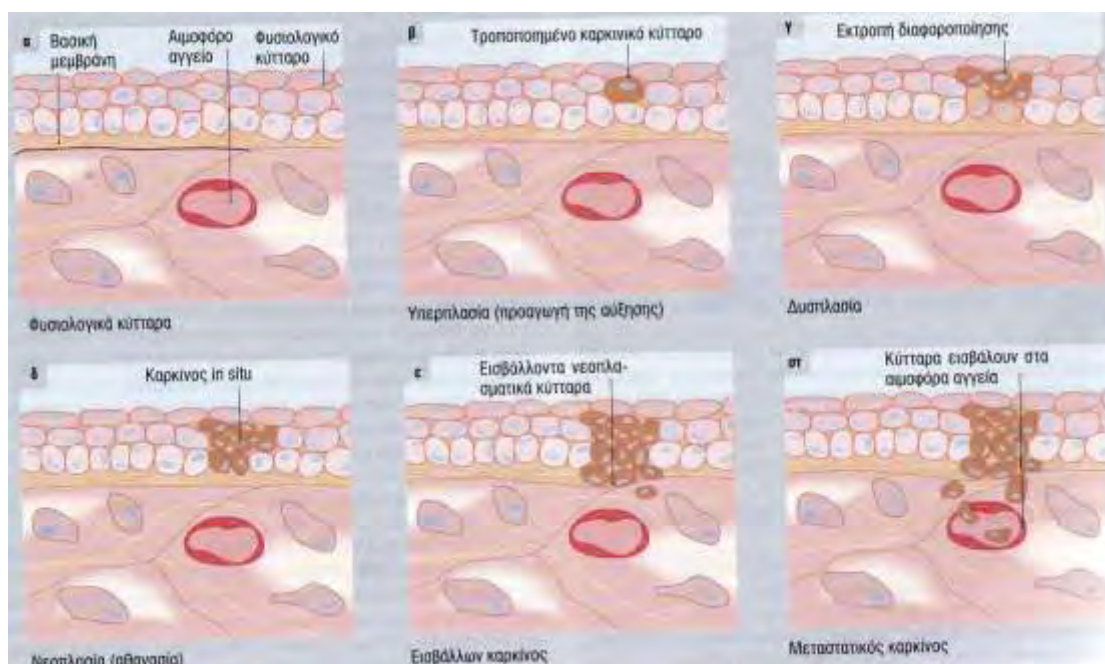
Η πρόοδος είναι το τελευταίο μη αντιστρεπτό στάδιο της καρκινογένεσης και οφείλεται στη συνεχιζόμενη εξέλιξη ενός ασταθούς καρυοτύπου που οδηγεί σε αλλαγή της δομής του κυτταρικού γενώματος. Σε αυτό το στάδιο μπορεί να παρατηρηθούν είτε ήπια νεοπλάσματα είτε κακοήθη. Οι παράγοντες που προκαλούν τη μετάβαση από το στάδιο της προαγωγής στο στάδιο της πρόοδου ονομάζονται παράγοντες πρόοδου και επάγουν χρωμοσωμικές ανωμαλίες που οδηγούν σε εξελισσόμενη καρυοτυπική αστάθεια. Οι εμπλεκόμενοι μηχανισμοί περιλαμβάνουν καταστροφή του μηχανισμού της μίτωσης και αλλαγές στη δράση της τελομεράσης, στη μεθυλίωση του DNA και στον ανασυνδυασμό του, καθώς και στη γονιδιακή μετάθεση. Λόγω των σημαντικών γενετικών αλλαγών, τα κύτταρα που βρίσκονται στο στάδιο της προαγωγής αποκτούν την ικανότητα για επέκταση, μετάσταση και αγγειογένεση, με αποτέλεσμα την εμφάνιση κλινικού καρκίνου.

Τα χαρακτηριστικά των κυττάρων ενός καρκινικού όγκου μπορούν να συνοψιστούν στα εξής:

- Αυτάρκεια σε κυτταρικά σήματα για αύξηση
- Έλλειψη απόκρισης σε σήματα που αναστέλλουν την κυτταρική αύξηση
- Μείωση της απόπτωσης
- Ικανότητα διήθησης σε γειτονικούς ιστούς και μετάσταση
- Ενίσχυση της αγγειογένεσης
- Απεριόριστη ικανότητα για πολλαπλασιασμό

Στην εικόνα 1 παριστάνονται τα πιθανά στάδια μετατροπής φυσιολογικών κυττάρων σε μεταστατικό καρκίνο.

Εικόνα 1: Η υποθετική εξέλιξη από τα φυσιολογικά στα κακοήθη κύτταρα



1.2. Χημειοπροφύλαξη στον καρκίνο

Ο όρος χημειοπροφύλαξη χρησιμοποιείται στην παρατηρούμενη πρόληψη, αναστολή ή αντιστροφή της καρκινογενετικής διαδικασίας με τη χορήγηση ενός ή περισσοτέρων χημικών ενώσεων, είτε με τη μορφή φαρμάκου είτε με τη διατροφή με τα φυσικά συστατικά των τροφών. Τα αποτελέσματα και οι μηχανισμοί της χημειοπροφυλακτικής δράσης σε πειραματόζωα και ανθρώπους έχουν γίνει αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας τα τελευταία δέκα χρόνια (*Morse et al. 1993; Kelloff et al., 1994; Greenwald et al. 1995*). Σύμφωνα με επιδημιολογικές μελέτες, το 80% περίπου των καρκίνων στον άνθρωπο οφείλεται στην έκθεση σε χημικά καρκινογόνα όπως κάπνισμα, διατροφή και εργασιακό περιβάλλον

1.2.1. Κατηγορίες χημειοπροφυλακτικών παραγόντων

Η απόλυτη ταξινόμηση των χημειοπροφυλακτικών παραγόντων δεν είναι εφικτή διότι ο ακριβής μηχανισμός δράσης αρκετών ενώσεων δεν είναι ακόμη γνωστός. Επιπρόσθετα, πολλοί παράγοντες φαίνεται να δρουν μέσω περισσότερων από έναν μηχανισμών, γεγονός που δυσκολεύει την κατάταξη σύμφωνα με τον περισσότερο δραστικό μηχανισμό. Η ακόλουθη ταξινόμηση είναι σύμφωνη με αυτήν του Wattenberg (Wattenberg, 1985) και βασίζεται στη χρονική περίοδο κατά την οποία οι χημειοπροφυλακτικοί παράγοντες φαίνεται να εμφανίζουν την δράση τους σε πειραματικά μοντέλα καρκινογένεσης. Έτσι, ξεχωρίζουν τρεις κατηγορίες:

A. Αναστολείς σχηματισμού του καρκινογόνου

B. Παράγοντες παρεμπόδισης της δράσης του καρκινογόνου. Οι παράγοντες αυτοί αναστέλλουν την πρώτη φάση της καρκινογενετικής διαδικασίας (initiation)

Γ. Παράγοντες καταστολής ή και παρεμπόδισης της νεοπλασματικής ανάπτυξης. Οι παράγοντες αυτοί αναστέλλουν την προαγωγική/προοδευτική φάση της καρκινογένεσης (promotion/progression).

Στη συνέχεια αναλύονται οι ανωτέρω κατηγορίες.

A. Αναστολείς σχηματισμού του καρκινογόνου

Οι παράγοντες αυτοί συνήθως αναστέλλουν τον σχηματισμό νιτροζαμίνης από δευτερογενείς αμίνες και νιτρώδη, σε όξινο περιβάλλον.

Κατηγορίες χημικών ουσιών

Παράγοντες

Αναγωγικά οξέα

Ασκορβικό οξύ

Φαινόλες

Καφεϊκό οξύ, φερουλικό οξύ, γαλλικό οξύ

Σουλφιδρυλικές ενώσεις

N-ακετυλοκυστεΐνη

Αμινοξέα

Προλίνη, Θειοπρολίνη

Το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) όταν υπάρχει σε αρκετή ποσότητα, ελαττώνει τον σχηματισμό νιτροζαμίνης από δευτερογενείς αμίνες ή νιτρώδη, στο όξινο περιβάλλον του στομάχου (Zedeck *et al.*, 1981) και οδηγεί σε ελάττωση της εμφάνισης όγκων του πνεύμονα, σε ποντίκια (Hartman *et al.*, 1990). Άλλες τέτοιες ουσίες είναι οι φαινόλες, όπως το καφεϊκό, το φερουλικό και το γαλλικό οξύ (Kuenzig *et al.*, 1984), καθώς και σουλφιδρυλικές ενώσεις (Shenoy *et al.*, 1992). Τα αμινοξέα προλίνη και θειοπρολίνη δεσμεύουν τα νιτρώδη, αντιδρώντας με αυτά,

σχηματίζοντας μη μεταλλαξιογόνες νιτροζαμίνες. Παράγοντες αυτής της κατηγορίας, θα μπορούσαν να χορηγηθούν με τη διατροφή, σε άτομα με αυξημένους ρυθμούς σχηματισμού ενδογενών νιτροζαμινών.

B. Παράγοντες παρεμπόδισης του καρκινογόνου

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι παράγοντες αυτοί δρουν κατά την πρώτη φάση της καρκινογένεσης (initiation). Ένα σημείο κλειδί στην κατανόηση των αρχικών σταδίων της καρκινογένεσης, αποτελεί το γεγονός ότι τα περισσότερα χημικά καρκινογόνα που βρίσκονται στο περιβάλλον, δεν είναι δραστικά από μόνα τους, αλλά ενεργοποιούνται καθώς μεταβολίζονται σε δραστικές ηλεκτρόφιλες μορφές (*Miller et al., 1985*). Οι δραστικές ηλεκτρόφιλες ουσίες αντιδρούν με το DNA σχηματίζοντας ομοιοπολικές ενώσεις, που οδηγούν σε λάθη κατά την αντιγραφή του DNA (μεταλλάξεις) και ενεργοποίηση πρωτο-ογκογονιδίων ή απενεργοποίηση αντι-ογκογονιδίων. Η σημασία της μεταβολικής ενεργοποίησης των προ-καρκινογόνων αντικατοπτρίζεται ξεκάθαρα στη δυνατότητα που έχουμε να καθορίσουμε το όργανο στόχο ή ακόμη, και την ευαισθησία των διάφορων ζώων στην καρκινογένεση, με βάση την παρουσία ή απουσία των αντίστοιχων για το προ-καρκινογόνο, μεταβολικών δρόμων.

Ο μεταβολισμός των προ-καρκινογόνων ή και γενικά των ξενοβιοτικών ουσιών χωρίζεται σε δύο φάσεις: σε αντιδράσεις της φάσης 1 (συνήθως αντιδράσεις οξειδωσης, αναγωγής ή υδρόλυσης) όπου γίνεται αλλαγή ή απομάκρυνση των ενεργών ομάδων από το αρχικό μόριο της ξενοβιοτικής ουσίας, και σε αντιδράσεις της φάσης 2 στις οποίες γίνεται σύζευξη των προϊόντων της φάσης 1 με διάφορα ενδογενή υποστρώματα του κυττάρου με σκοπό την αύξηση της διαλυτότητας και της απέκκρισης των ξενοβιοτικών ουσιών.

Οι αντιδράσεις της φάσης 1 συχνά περιλαμβάνουν μία αρχική οξειδωση σε κάποιο προϊόν, που τυπικά καταλύεται από το σύστημα του κυτοχρώματος P-450. Το κυτόχρωμα P-450 είναι το κύριο μέλος της κλάσης των ενζύμων που βρίσκονται στο λείο ενδοπλασματικό δίκτυο των ηπατοκυττάρων, αλλά και άλλων κυττάρων τα οποία παίζουν κύριο ρόλο στο μεταβολισμό των ξενοβιοτικών ουσιών. Τα προϊόντα της φάσης 1 μπορεί να είναι λιγότερο ή περισσότερο ενεργά από το μητρικό μόριο.

Οι αντιδράσεις της φάσης 2 περιλαμβάνουν σύζευξη των προϊόντων της φάσης 1 με γλυκουρονικό οξύ, γλουταθειόνη,θειικό οξύ, αμινοξέα, οξικό οξύ κλπ.

Έτσι, το ποσό του τελικού καρκινογόνου που είναι διαθέσιμο για αντίδραση με το DNA εξαρτάται από την ισορροπία μεταξύ αντιδράσεων ενεργοποίησης (Φάση 1) και απενεργοποίησης (Φάση 2). Παρόλο που η ισορροπία αυτή βρίσκεται κάτω από γενετικό έλεγχο, μπορεί να τροποποιηθεί από διάφορους παράγοντες όπως η

διατροφή, η ηλικία, η ορμονική κατάσταση και η έκθεση σε φάρμακα ή άλλες ξενοβιοτικές ουσίες (Conney AH, 1982).

Συνοπτικά οι παράγοντες παρεμπόδισης του καρκινογόνου περιλαμβάνουν: α) αναστολείς ή επαγωγείς του κυτοχρώματος P-450 , β) επαγωγείς των ενζύμων της φάσης 2 (όπως τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) καθώς και η τρανσφεράση του UDP γλυκουρονικού), γ) Εξουδετερωτές των ηλεκτρόφιλων ουσιών και των ελευθέρων ριζών, δ) Επαγωγείς των ενζύμων αποκατάστασης βλαβών του DNA.

Γ. Παράγοντες καταστολής της νεοπλασματικής ανάπτυξης

Η ταξινόμηση των παραγόντων που ανήκουν σε αυτήν την κατηγορία είναι πιο δύσκολη διότι τα κρίσιμα γεγονότα και η ακριβής αλληλουχία τους κατά την προαγωγική φάση και τη φάση της προόδου της καρκινογένεσης δεν έχουν κατανοηθεί πλήρως. Ωστόσο οι περισσότερες από τις χημειοπροφυλακτικές ενώσεις αυτής της κατηγορίας μπορεί να ταξινομηθούν στις εξής:

1. Αναστολείς του μεταβολισμού των πολυαμινών
2. Επαγωγείς της τελικής διαφοροποίησης (όπως βιταμίνη A και ρετινοϊκό οξύ)
3. Ρυθμιστές σε οδούς μετάδοσης σήματος που ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό
4. Ρυθμιστές της δράσης των ορμονών και των αυξητικών παραγόντων
5. Αναστολείς της δράσης των ογκογονιδίων
6. Επαγωγείς της κυτταρικής επικοινωνίας
7. Αποκατάσταση της ανοσολογικής απάντησης
8. Επαγωγείς της απόπτωσης
9. Επιδιορθωτές της ανισορροπίας της μεθυλίωσης του DNA
10. Αναστολείς της αποικοδόμησης της βασικής μεμβράνης
11. Αναστολείς του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος

1.3. Οξειδωτικό στρες, ελεύθερες ρίζες και αντιοξειδωτικά

1.3.1. Δραστικές μορφές οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS)

Σήμερα είναι γνωστό ότι όλες σχεδόν οι επιβλαβείς επιδράσεις του οξυγόνου οφείλονται στο σχηματισμό ελεύθερων ριζών (free radicals) και άλλων δραστικών μορφών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS), στα οποία περιλαμβάνονται τα πρωτογενή δραστικά παράγωγα του οξυγόνου αλλά και όλα εκείνα (ρίζες ή μη), τα οποία προκύπτουν δευτερογενώς κατά τις διάφορες χημικές αλληλεπιδράσεις με τα στοιχεία του κυτταρικού περιβάλλοντος (π.χ. ελεύθερες υπεροξυλ-ρίζες R-C-O-O• και αλκοξυλ-ρίζες R-C-O•, ενδιάμεσα προϊόντα της υπεροξειδωσης λιπιδίων). Οι ROS σχηματίζονται αναπόφευκτα στον αερόβιο μεταβολισμό και είναι η κύρια αιτία εκδήλωσης του φαινομένου του οξειδωτικού στρες στα κύτταρα.

Εκτός από τις ROS πολύ σημαντικές είναι και οι δραστικές μορφές (ρίζες ή μη) άλλων χημικών στοιχείων και μορίων, που διακρίνονται ανάλογα με την προέλευσή τους σε εκείνες που υπάρχουν στο περιβάλλον των κυττάρων και σε εκείνες που σχηματίζονται από τη δράση των ROS επί των διαφόρων κυτταρικών συστατικών. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν τα ιόντα Fe, Cu και άλλων μετάλλων μετάπτωσης (που καταλύουν αντιδράσεις του οξειδωτικού stress και προάγουν οξειδωτικές βλάβες στο κύτταρο), τα ιόντα Cl και το NO• (που παράγεται από την L-αργινίνη με τη δράση του ενζύμου συνθετάση του NO και έχει οξειδωτική και αντιοξειδωτική δράση). Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν οι ελεύθερες ρίζες θείου RS• (προϊόντα της οξειδωτικής βλάβης ή αντιοξειδωτικής δράσης διαφόρων θειολών), ελεύθερες ρίζες άνθρακα R-C• (ενδιάμεσα προϊόντα της υπεροξειδωσης λιπιδίων), ο υπεροξυνιτρίτης ONOO- (προϊόν της αντίδρασης O₂⁻ και NO•), το υποχλωριώδες οξύ HOCl (προϊόν της αντίδρασης H₂O₂ και Cl⁻) κ.α.

1.3.2. Οξειδωτικό στρες και οι συνέπειες του στα κύτταρα

Το οξειδωτικό στρες προέρχεται από την ανατροπή της ισορροπίας ανάμεσα στην παραγωγή δραστικών ενώσεων οξυγόνου ή αζώτου και αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Οι βλάβες που προκαλούνται επηρεάζουν την λειτουργικότητα πολλών κυτταρικών ομοιοστατικών συστημάτων. Έχει δειχθεί η συμμετοχή του οξειδωτικού στρες σε πληθώρα ασθενειών, όπως είναι η αθηροσκλήρωση, η μυοκαρδιακή ισχαιμία/επανεπαίματωση και η καρδιακή ανεπάρκεια (Tsutsui, H. 2006.).

Το οξειδωτικό στρες είναι υπεύθυνο για την πρόκληση πληθώρας βλαβών στα κύτταρα, προκαλώντας αλλαγές στα βιολογικά μακρομόρια του κυττάρου. Η ρίζα $\text{OH}\cdot$ είναι η πιο δραστική ελεύθερη ρίζα οξυγόνου και αποτελεί έναν εξαιρετικά ισχυρό οξειδωτικό παράγοντα που αντιδρά σχεδόν ακαριαία με οποιοδήποτε τύπο βιομορίου τυγχάνει να βρίσκεται πλησίον της θέσης σχηματισμού της. Ένα από τα σημαντικά συστατικά του κυττάρου είναι τα νουκλεϊκά οξέα (DNA και RNA), που μπορεί να υποστούν αλλαγές στις βάσεις (π.χ. προσθήκη του $\text{OH}\cdot$, απαμινώσεις, απομάκρυνση του H) αλλά και στα σάκχαρα ή ακόμα και δημιουργία σπασιμάτων και DNA-protein χιαστοί δεσμοί (cross links).

Εκτός από τα νουκλεϊκά οξέα, συνήθεις είναι και οι βλάβες στις πρωτεΐνες, όπως η δημιουργία υπεροξειδίων στον πεπτιδικό κορμό ή στις πλευρικές αλυσίδες αμινοξέων, η οξείδωση ομάδων του S, τα πρωτεϊνικά καρβονύλια, και οι απαμινώσεις, που επιφέρουν αλλαγές στη δομή και την λειτουργία των πρωτεϊνών. Τέλος, τα λιπιδικά συστατικά των κυττάρων είναι από τους πλέον σημαντικούς στόχους των δραστικών μορφών οξυγόνου, με αποτέλεσμα να προκαλείται υπεροξείδωση των λιπιδίων και κυρίως των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων.

1.3.3. Αντιοξειδωτικοί αμυντικοί μηχανισμοί

Οι αερόβιοι οργανισμοί έχουν αναπτύξει αρκετούς αμυντικούς μηχανισμούς ώστε να μπορούν να επιβιώσουν σε έντονα οξειδωτικές συνθήκες. Είναι σημαντικό ότι κατορθώνουν να διατηρούν την ενδοκυτταρική συγκέντρωση του O_2 σε επίπεδα χαμηλότερα από της ατμόσφαιρας (21%) καθώς και την ικανότητα αποτελεσματικής λειτουργίας της αναπνευστικής αλυσίδας σε αυτά τα χαμηλά επίπεδα O_2 . Το οξειδωτικό φορτίο (ROS και προϊόντα δράσης τους) που δημιουργείται σε αυτές τις συνθήκες αντιμετωπίζεται από την αντιοξειδωτική άμυνα των οργανισμών που συνίσταται σε ένα πολύπλοκο σύστημα με συνεργητικά δρώντα επιμέρους στοιχεία. Οι αντιοξειδωτικοί αμυντικοί μηχανισμοί διακρίνονται σε ενζυμικούς και μη ενζυμικούς.

Στα ενζυμικά αντιοξειδωτικά περιλαμβάνονται

- 1) οι υπεροξειδικές δυσμουτάσες (Superoxide Dismutase, SOD) οι οποίες διασπούν το υπεροξειδικό ανιόν (*Fridovich, I. 1975, Fridovich, I. 1978*)
- 2) η καταλάση (οξειρεδοουκτάση του υπεροξειδίου του υδρογόνου) που καταλύει την αποικοδόμηση του H_2O_2 σε νερό και οξυγόνο (*Berg, J.M., . 2002*)

3) η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (Glutathione Peroxidase,GP) η οποία είναι αντιοξειδωτικό ένζυμο, το οποίο αποτοξινώνει το κύτταρο από λιπιδικά και μη υδροξυπεροξειδία, καθώς και από το H_2O_2

4) η υπεροξειρεδοξίνη (Prx) και το αναγεννητικό της σύστημα, η θειορεδοξίνη (Trx), η οποία από μόνη της έχει αντιοξειδωτική δράση, και η ρεδοκτάση της θειορεδοξίνης (TrcR) αποτελούν ένα επιπλέον αντιοξειδωτικό και οξειδοαναγωγικό ρυθμιστικό σύστημα, το οποίο έχει βρεθεί ότι συμμετέχει σε πληθώρα διεργασιών, που σχετίζονται με ROS. Καταλύουν την αναγέννηση πολλών αντιοξειδωτικών μορίων (Giordano, F.J. 2005). Η έκφρασή τους επάγεται και από το οξειδωτικό στρες.

Στους μη ενζυμικούς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς περιλαμβάνονται ενδοκυτταρικά αντιοξειδωτικά μόρια όπως είναι οι βιταμίνες E, C και β-καροτένιο και πρωτεΐνες όπως η μεταλλοθειονίνη. Η βιταμίνη E (α-τοκοφερόλη) αποτελεί το πιο μελετημένο μη ενζυμικό αντιοξειδωτικό μόριο. Εντοπίζεται στο πλάσμα του αίματος, στις λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας (LDLs -Low Density Lipoproteins) και στις κυτταρικές μεμβράνες. Δρα κυρίως δεσμεύοντας υπεροξειδίο, διακόπτοντας την αλυσιδωτή αντίδραση της λιπιδικής υπεροξειδωσης (Dhalla, N.S 2000).

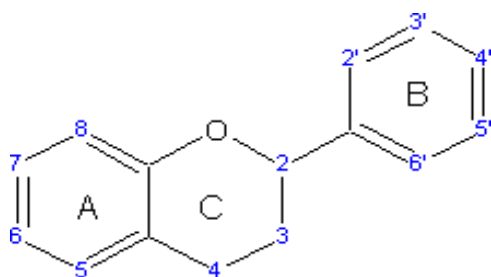
Η μεταλλοθειονίνη, τέλος, είναι πρωτεΐνη που προσδένει μέταλλα μετάπτωσης. Στα θηλαστικά δεσμεύει κυρίως ψευδάργυρο. Υπάρχουν πλέον αρκετές ενδείξεις ότι η δρα αντιοξειδωτικά. Αν και ο ακριβής μηχανισμός δεν είναι γνωστός, φαίνεται ότι δεσμεύει τις ROS και κυρίως τη ρίζα υδροξυλίου.

1.4. Πολυφαινόλες

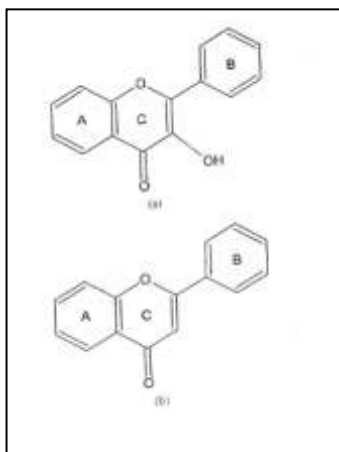
1.4.1. Κατηγοριοποίηση

Οι πολυφαινόλες είναι πολύπλοκες ενώσεις με δύο ή περισσότερους ενωμένους φαινολικούς δακτυλίους και με βάση τη χημική δομή τους μπορούν να διαιρεθούν σε περισσότερους από δέκα τύπους (Strack, 1997). Τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή, τα σπιλβένια και οι λιγνάνες είναι οι πιο συχνά απαντώμενες πολυφαινόλες στα φυτά. Τα πιο κοινά φαινολικά οξέα στα φυτά είναι αυτά που προέρχονται από το υδροξυβενζοϊκό οξύ (γαλλικό οξύ, βανιλλικό οξύ, προκατεχουϊκό οξύ και συριγγικό οξύ) ή το υδροξυκινναμικό οξύ (p-κουμαρικό οξύ, καφεϊκό οξύ και φερουλικό οξύ). Τα φλαβονοειδή μοιράζονται έναν κοινό ανθρακικό σκελετό διφαινυλικών προπαινίων, δύο βενζοϊκούς δακτυλίους που ενώνονται με μια γραμμική αλυσίδα τριών ανθράκων ($C_6 + C_3 + C_6$) (εικόνα 2). Η κεντρική τριπτανθρακική αλυσίδα μπορεί να σχηματίζει έναν κλειστό δακτύλιο πυρανίου με έναν από τους βενζοϊκούς δακτυλίους. Με βάση την κατάσταση οξειδωσης του κεντρικού δακτυλίου πυρανίου, τα φλαβονοειδή μπορούν να διαχωριστούν σε φλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβανόνες, φλαβανονόλες, φλαβανόλες (επίσης ονομάζονται φλαβαν-3-όλες), ισοφλαβόνες, ανθοκυανιδίνες και προανθοκυανιδίνες. Οι φλαβόνες και οι φλαβονόλες έχουν ένα διπλό δεσμό μεταξύ των C_2 και C_3 , αλλά οι φλαβονόλες έχουν μια υδροξυλική ομάδα στον C_3 (εικόνα 3). Οι φλαβανόνες και οι φλαβανονόλες χαρακτηρίζονται από την παρουσία μιας κορεσμένης τριπτανθρακικής αλυσίδας και ενός ατόμου οξυγόνου στον C_4 , ωστόσο οι φλαβανονόλες έχουν μια υδροξυλική ομάδα στον C_3 . Οι φλαβανόλες περιέχουν μια κορεσμένη τριπτανθρακική αλυσίδα με μια υδροξυλική ομάδα. Οι αγλυκονικές μορφές των ανθοκυανινών ονομάζονται ανθοκυανιδίνες (ανθοκυανίνες = ανθοκυανιδίνες + μόριο σακχάρου). Οι προανθοκυανιδίνες είναι συμπυκνωμένες τανίνες, ή πολυμερείς φλαβανόλες, και σχηματίζονται ως αποτέλεσμα σύζευξης μεταξύ μιας ηλεκτρονιόφιλης και μιας πυρηνόφιλης μονάδας φλαβανυλίου (Ferreira et al., 1996; Hemingway, 1989). Στην εικόνα 4 δίνεται ο βασικός σκελετός της ανθοκυανιδίνης.

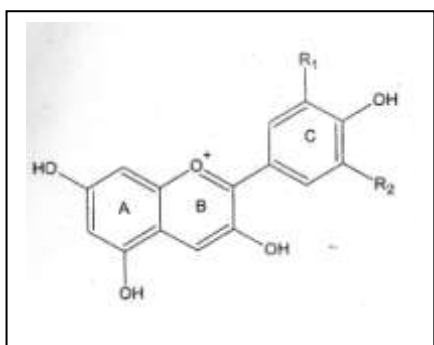
Εικόνα 2: Βασικός σκελετός φλαβονοειδών



Εικόνα 3: Σκελετός φλαβονολών και φλαβονών



Εικόνα 4: Σκελετός ανθοκυανιδινών



1.4.2. Φαινολικά οξέα

1.4.2.1. Προέλευση και βιοδιαθεσιμότητα

Τα φαινολικά οξέα είναι δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται από τη φαινυλαανίνη, μέσω της βιοσυνθετικής οδού του σικιμικού οξέος και από το γενικό βιοσυνθετικό μονοπάτι του φαινυλοπροπανίου (*Duthie et al., 2000*). Κυριότεροι εκπρόσωποι της ομάδας είναι το γαλλικό οξύ, το p-κουμαρικό οξύ, το καφεϊκό οξύ και το φερουλικό οξύ. Τέτοιες ενώσεις είναι πολύ διαδεδομένες στη φύση και βρίσκονται σε αφθονία στην επιδερμίδα πολλών φρούτων, όπως τα μήλα, τα αχλάδια, τα ροδάκινα και σε λαχανικά, όπως το κρεμμύδι και το σπανάκι.

Η μελέτη της βιοδιαθεσιμότητας των φαινολικών συστατικών είναι σημαντική για τον προσδιορισμό του βαθμού της ευεργετικής τους δράσης στον οργανισμό. Βιοδιαθεσιμότητα καλείται το ποσοστό των φαινολικών συστατικών που απορροφάται και αξιοποιείται από τον οργανισμό, αποθηκευόμενο στους διάφορους ιστούς. Η βιοδιαθεσιμότητα εξαρτάται από τη μοριακή δομή των φαινολικών συστατικών, την ποσότητα και τη δομή του τροφίμου, το βαθμό απορρόφησης και από γενετικούς παράγοντες. Τα διάφορα φαινολικά συστατικά εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος και βρίσκονται στο πλάσμα για κάποιο διάστημα ή απεκκρίνονται ταχύτατα από τα ούρα. Παρατηρήθηκε ότι 1-4 ώρες μετά την κατανάλωση κόκκινου κρασιού οι συγκεντρώσεις του γαλλικού και του καφεϊκού οξέος στο πλάσμα αυξήθηκαν σημαντικά (*Morton et al., 2000.*)

1.4.2.2. Δράση

Πολλές *in vitro* μελέτες έχουν εξετάσει τις επιπτώσεις των φαινολικών οξέων σε καρκινικά κύτταρα *in vitro*, και στις περισσότερες έχει διαπιστωθεί αντικαρκινική δράση. Το καφεϊκό οξύ δρα ως χημειοευαισθητοποιητής (chemosensitizer) αυξάνοντας την ευαισθησία των καρκινικών κυττάρων σε χημειοθεραπευτικούς παράγοντες. Σε συγκέντρωση 10 μM αυξάνει αξιοσημείωτα την ευαισθησία των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων μαστού MCF-7 ανθεκτικών στη δοξορουβικίνη, μειώνοντας την IC_{50} από 10,8 μM σε 0,83 μM (*Ahn et al., 1997*). Ωστόσο, σε αντίθεση με τις αντικαρκινικές του ιδιότητες, το καφεϊκό οξύ έχει δείχθει ότι προκαλεί γονοτοξικότητα και χρωμοσωμικές εκτροπές σε ωθηκικά κύτταρα του κινέζικου χάμστερ (*Stich et al., 1981*).

Οι *in vivo* μελέτες έχουν δείξει ότι η καρκινογόνος ή η αντικαρκινική δράση του καφεϊκού οξέος είναι δόσοεξαρτώμενες. Σε δόση 2% είναι καρκινογόνο (*Hagiwara et al., 1991*), σε δόση 0,5-1% δρα ως προωθητής όγκων (*Hirose et al., 1992; Hirose et*

al., 1991) και σε δόση 0,05-0,5% δρα ως αντικαρκινικό (*Tanaka et al.*, 1993). Είναι αρκετά πιθανό η αντικαρκινική δράση να μην είναι αποτέλεσμα του ίδιου του καφεϊκού οξέος, αλλά της δράσης των μεταβολιτών του.

Οι πιθανοί μηχανισμοί της χημειοπροφυλακτικής δράσης των φαινολικών οξέων περιλαμβάνουν αναστολή της πρόσληψης του καρκινογόνου, αναστολή του σχηματισμού ή της ενεργοποίησης του καρκινογόνου, απενεργοποίηση ή αποτοξίνωση του καρκινογόνου, αποτροπή της πρόσδεσης του καρκινογόνου στο DNA και αύξηση του επιπέδου ή της πιστότητας της επιδιόρθωσης του DNA. Ενδεικτικά, το φερουλικό και το χλωρογενικό οξύ αναστέλλουν την λειτουργία του κυτοχρώματος p450, το οποίο μπορεί να ενεργοποιεί ή να απενεργοποιεί τα καρκινογόνα (*Teel and Huynh*, 1998). Το φερουλικό οξύ έχει συσχετιστεί με σημαντική αύξηση της δραστηριότητας της s-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης και της ρεδοκτάσης της κινόνης στο ήπαρ και σε τμήμα του βλεννογόνου του παχέος εντέρου (*Kawabata et al.*, 2000). Το χλωρογενικό οξύ αναστέλλει *in vivo* το σχηματισμό των συμπλόκων χημικών με το DNA (DNA adducts) που σχηματίζονται από τη λιπιδική υπεροξειδωση στα ποντίκια (*Kasai et al.*, 2000). Τέλος, το χλωρογενικό και το καφεϊκό οξύ εμποδίζουν τη νιτροποίηση αρκετών ενώσεων, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε σχηματισμό καρκινογόνων ουσιών (*Kono et al.*, 1995).

Τα φαινολικά οξέα μπορεί να επηρεάζουν την απόπτωση στα καρκινικά κύτταρα. Ενδεικτικά, το καφεϊκό οξύ επάγει την απόπτωση σε ανθρώπινα καρκινικά μαστικά κύτταρα MCF-7 μέσω ενεργοποίησης προαποπτωτικών παραγόντων όπως ο Fas, η πρωτεΐνη Bax και οι κασπάσες (*Watabe et al.*, 2003). Το CAPE από τη μεριά του αναστέλλει την έκφραση της κινάσης εστιακής προσκόλλησης (focal adhesion kinase), η οποία εμπλέκεται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω ιντεγκρινών, στη μετανάστευση και στην απόπτωση (*Weyant et al.*, 2000).

Οι αντιοξειδωτικές ικανότητες των φαινολικών οξέων περιλαμβάνουν «εκκαθάριση» των αντιδρώντων ηλεκτρονιόφιλων, των ριζών οξυγόνου, αναστολή του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος και οφείλονται στη σταθερή και συντονισμένη δομή τους. Μελέτες *in vivo* έδειξαν ότι τα υδροξυκινναμικά οξέα κατατάσσονται με βάση την αντιοξειδωτική τους δραστηριότητά τους ως εξής: καφεϊκό οξύ > φερουλικό οξύ > p-κουμαρικό οξύ (*Castelluccio et al.*, 1996).

Ένας άλλος μηχανισμός μέσω του οποίου μπορεί να δρουν τα φαινολικά οξέα, είναι η αντιμεταλλαξιγένεση. Στη δοκιμασία Ames το καφεϊκό οξύ έδειξε να αναστέλλει τις μεταλλάξεις που προκαλούνταν από αφλατοξίνες (*Karekar et al.*, 2000). Το φερουλικό και το κουμαρικό έχουν δόσοεξαρτώμενη αντιμεταλλαξιγόνο δραστηριότητα (*Ferguson et al.*, 2003) ενώ ο CAPE σε συγκέντρωση 5 μg/ml μειώνει την έκφραση του *ras* ογκογονιδίου (*Na et al.*, 2000) και σε συγκέντρωση 50 μM

ενισχύει την έκφραση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 και της p38 MAPK-ενός απαραίτητου στοιχείου στον αποπτωτικό μηχανισμό (Lee et al., 2003).

Όσον αφορά τις αντιμεταστατικές ιδιότητες των φαινολικών οξέων, ο CAPE έχει δείξει ότι αποκαθιστά τη διακυτταρική επικοινωνία μέσω χασμοσυνδέσμων σε ογκογενή κύτταρα (Na et al., 2000).

Η ρύθμιση της λειτουργίας του ανοσοποιητικού μπορεί να είναι ένας ακόμη μηχανισμός μέσω του οποίου τα φαινολικά οξέα μεταβάλλουν την έκβαση του καρκίνου. Ο CAPE αυξάνει την ευαισθησία των ογκοκυττάρων στην επίθεση των φυσικών φονικών κυττάρων (natural killers cells) και επάγει την έκφραση ογκο-σχετιζόμενων αντιγόνων σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές μελανώματος και καρκίνου του εγκεφάλου (Ghoneum et al., 1995). Το χλωρογενικό, το καφεϊκό και το φερουλικό οξύ αναστέλλουν την έκκριση ισταμίνης από τα μαστικά κύτταρα, αλλά αυξάνουν τις επαγόμενες κυτοκίνες όπως οι ιντερλευκίνες 6, 10 και 13, η ιντερφερόνη-γ και ο TNF-α (Chen et al., 2000). Το χλωρογενικό, το φερουλικό, και το p-κουμαρικό οξύ έδειξαν να ενισχύουν τη δράση και τον πολλαπλασιασμό των ανθρώπινων λεμφοκυττάρων καθώς και την έκκριση IFN-γ (Chiang et al., 2003).

Παρόλες τις χημειοπροστατευτικές τους ιδιότητες τα φαινολικά οξέα σε κάποιες μελέτες έχουν δείξει ότι προάγουν την καρκινογένεση. Όσον αφορά το καφεϊκό οξύ, οι καρκινογενείς μηχανισμοί μπορεί να εμπλέκουν τη βλαπτική επίδραση στο DNA μέσω παραγωγής υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) (Inoue et al., 1992). Ωστόσο έχει προταθεί ότι η έμμεση γενετοξικότητα μέσω ενεργών μορφών οξυγόνου ή ογκο-προωθητικής δραστηριότητας μπορεί να είναι ένας πιο σχετικός μηχανισμός απ' ότι η βλάβη στο DNA (IARC, 1993).

1.4.3. Φλαβονοειδή

1.4.3.1. Προέλευση και βιοδιαθεσιμότητα

Τα φλαβονοειδή διακρίνονται σε φλαβονόλες, φλαβανόνες, φλαβόνες, κατεχίνες, ανθοκυανίνες και ισοφλαβόνες.

Οι φλαβονόλες αποτελούν την πλειοψηφία των φλαβονοειδών στα φρούτα, με την κερσετίνη, την кемπερόλη και τη μυρισετίνη να αποτελούν τους κυριότερους αντιπροσώπους. Οι φλαβανόνες βρίσκονται κυρίως στα εσπεριδοειδή και οι φλαβόνες στο σέλινο. Οι κατεχίνες βρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες στο πράσινο και το μαύρο τσάι και στο κόκκινο κρασί, ενώ οι ανθοκυανίνες βρίσκονται στις φράουλες και σε άλλα μούρα. Οι ισοφλαβόνες απαντώνται σχεδόν αποκλειστικά στα τρόφιμα σόγιας.

Τα φλαβονοειδή είναι θερμοανθεκτικά και οι απώλειες που οφείλονται στο μαγείρεμα και το τηγάνισμα είναι σχετικά χαμηλές (*Hertog et al., 1993*). Απορροφώνται μέσω παθητικής διάχυσης, αφού τα γλυκοσυλιωμένα φλαβονοειδή μετατρέπονται στην αγλυκονική μορφή τους.

1.4.3.2. Αντικαρκινική δράση φλαβονοειδών

Ένας μεγάλος αριθμός πειραμάτων με καρκινικές σειρές έδειξε τις αντικαρκινικές ιδιότητες των φλαβονοειδών, οι οποίες συνοψίζονται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1. Αντικαρκινικές ιδιότητες των φλαβονοειδών σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές (*Wenying et al., 2003*)

Τύπος καρκίνου	Κύτταρα	Φλαβονοειδή
Ανθρώπινος καρκίνος του στόματος	HSC-2, HSG, SCC-25	Φλαβανόνες, ισοφλαβάνες, EGC, χαλκόνες, EGCG, κουρκουμίνη, γενιστεΐνη, ECG, κερσετίνη, cis-πλατίνη
Ανθρώπινος καρκίνος του μαστού	MCF-7	Φλαβανόνες, νταΐζείνη, γενιστεΐνη, κερσετίνη, λουτεολίνη
Ανθρώπινος καρκίνος του θυροειδούς	ARO, NPA, WRO	Γενιστεΐνη, απιγενίνη, καιμπφερόλη, χρυσίνη, λουτεολίνη, βιοχανίνη A
Ανθρώπινος καρκίνος του πνεύμονα	SK-LU1, SW900, H441, H661, haGo-K-1, A549	Φλαβόνη, κερσετίνη
Ανθρώπινος καρκίνος του προστάτη	LNCaP, PC3, DU145	Κατεχίνη, επικατεχίνη, κερσετίνη, καιμπφερόλη, λουτεολίνη, γενιστεΐνη, απιγενίνη, μυρισετίνη, σιλιμαρίνη
Ανθρώπινος καρκίνος του παχέος εντέρου	Caco-2, HT-29, IEC-6, HTC-15	Φλαβόνη, κερσετίνη, γενιστεΐνη, ανθοκυανίνη
Λευχαιμία	HL-60, K562, Jurkat	Απιγενίνη, κερσετίνη, μυρισετίνη, χαλκόνες
B16 μελάνωμα του ποντικού	4A5	Χαλκόνες

Πολλές μελέτες σε ζώα έχουν δείξει μια προστατευτική δράση των τροφίμων σόγιας ενάντια στον καρκίνο του μαστού, ενώ μια διατροφή πλούσια σε ισοφλαβόνες αναστέλλει την ογκογένεση σε πολλά ζωικά μοντέλα για καρκίνο του προστάτη (*Messina et al, 1994*).

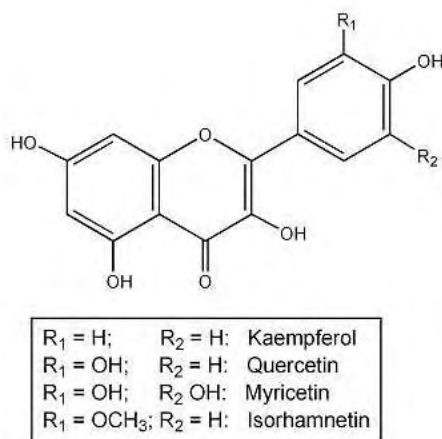
Τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα των αντικαρκινικών δράσεων σε προκλινικές μελέτες έδωσαν την ώθηση για κλινικές δοκιμές με φλαβονοειδή σε ανθρώπους. Οι *Ferry et al.* διεξήγαγαν μια δοσο-αυξανόμενη δοκιμή φάσης I με κερσετίνη, και έδειξαν ότι η ενδοφλέβια χορήγηση της ουσίας ανέστειλε τη λεμφοκυτταρική κίνηση τυροσίνης σε 9 από τους 11 ασθενείς (*Ferry et al, 1996*). Περαιτέρω κλινικές μελέτες περιλαμβάνουν την χρήση ενός υδατοδιαλυτού προφαρμάκου της κερσετίνης ([3' (N-καρβοξυμεθυλ) καρβομυλ-3,4',5,7-τετραϋδροξυφλαβόνη]) (*Mulholland PJ et al 2001*).

1.4.3.3. Φλαβονόλες

1.4.3.3.1. Προέλευση και βιοδιαθεσιμότητα

Οι φλαβονόλες είναι πολυφαινολικοί δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών και οι κύριοι αντιπρόσωποί τους είναι η κερσετίνη, η μυρισετίνη, η кемπφερόλη και η ισοραμνετίνη (εικόνα 5). Στους ιστούς των φυτών οι φλαβόνες και οι φλαβονόλες βρίσκονται συζευγμένες με σάκχαρα, κυρίως γλυκόζη, ραμνόζη και ρουτινόζη (*Herrmann, 1988*). Η κερσετίνη στα φρούτα βρίσκεται στη γλυκοσιδική της μορφή, τη ρουτίνη.

Εικόνα 5: Κύριοι αντιπρόσωποι φλαβονολών: кемпφερόλη, κερσετίνη, μυρισετίνη και ισοραμνετίνη.



1.4.3.3.2. Δράση

Μελέτες *in vitro* έχουν δείξει ότι η δράση της κερσετίνης ως αντι-πολλαπλασιαστικός παράγοντας μπορεί να πραγματοποιείται μέσω αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της ανάπτυξης ή παύσης του κυτταρικού κύκλου. Ενδεικτικά, η κερσετίνη σε συγκεντρώσεις 10 nM-10 μM αναστέλλει με τρόπο δόσοεξαρτώμενο την ανάπτυξη καρκινικών μαστικών κυττάρων (MCF-7 ανθεκτικών σε ανδριαμυκίνη) (*Scambia et al., 1991*) και καρκινικών κυττάρων των οωθηκών (*Scambia et al., 1990*). Επιπλέον, η έκθεση καρκινικών κυττάρων του ενδομητρίου σε συγκεντρώσεις 1, 10 και 100 μM κερσετίνης οδήγησε σε αναστολή της ανάπτυξης σε ποσοστά 3, 51 και 87% αντίστοιχα (*Kaneuchi et al., 2003*). Η κεμπφερόλη, ανάλογα με τις χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις, μπορεί να ευνοήσει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (οιστρογονικός αγωνιστής) ή να τον αναστείλει. Ενδεικτικά, σε συγκεντρώσεις 35 μM κι 70 μM μειώνει τον αριθμό των βιώσιμων MCF-7 καρκινικών κυττάρων που παρουσιάζουν οιστρογονικούς υποδοχείς (*Hung, 2004*), ενώ σε συγκεντρώσεις 20-90 μM ενισχύει τη σύνθεση του DNA και την κυτταρική ανάπτυξη των κυττάρων MCF-7 (*Wang et al, 1997*).

Ο έλεγχος των φλαβονολών επί του κυτταρικού κύκλου, της ανάπτυξης, του πολλαπλασιασμού, της παραγωγής ενζύμων και της απόπτωσης είναι σημαντικοί αντικαρκινικοί μηχανισμοί. Έχει αποδειχθεί ότι η ικανότητα των φλαβονοειδών να επάγουν απόπτωση εξαρτάται από την παρουσία υδροξυλικών ομάδων στη 2-φαινυλομάδα, και η κατηγοριοποίηση έχει ως εξής: απιγενίνη> κερσετίνη> μυρισετίνη> κεμπφερόλη (*Wang et al., 1999*). Αναλυτικότερα παρουσιάζονται οι δράσεις των φλαβονολών, ανάλογα με τον εκάστοτε συνδυασμό τους :

- Η κερσετίνη και η κεμπφερόλη μπορούν να εμποδίζουν την κυτταρική ανάπτυξη μέσω υποδοχέων οιστρογόνων (*Sathyamoorthy et al., 1994*), υποδοχέων υδρογονανθράκων με αρυλομάδες (*Ciolino et al., 1992*) και τύπου II θέσεων δέσμησης των οιστρογόνων (*Ranelletti et al., 1992*), ενώ επάγουν τη ρεδοκτάση της κινόνης - ένα αντικαρκινογόνο ένζυμο φάσης II- σε καρκινικά ηπατικά κύτταρα ποντικού (*Yannai et al., 1998*).
- Η κερσετίνη αναστέλλει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου στα MCF-7 καρκινικά κύτταρα μέσω παροδικής συσσώρευσης στην M φάση, επακόλουθης αναστολής στη G2 και επαγωγή απόπτωσης (*Choi et al., 2001*), ενώ μπορεί και να αναστείλει την ανάπτυξη μέσω μείωσης των κυτταρικών μικροσωληνίσκων και παρεμβολής στις λειτουργίες τους (*Gupta et al., 2002*). Επίσης μειώνει τον αριθμό των υποδοχέων των φορβολεστέρων που εκφράζονται έντονα σε καρκινικά κύτταρα του δέρματος (*Horiuchi et al., 1986*).

- Η κερσετίνη, η κεμπφερόλη και η μυρισετίνη επάγουν την απόπτωση μέσω επαγωγής της κασπάσης-3, της προκασπάσης 9, διάσπασης της πολύ-(ADP-ριβόζη) πολυμεράσης, αύξηση των ενεργών μορφών οξυγόνου και απελευθέρωση του μιτοχονδριακού κυτοχρώματος-c σε λευχαιμικά κύτταρα (*Wang et al., 1999*). Επιπλέον αναστέλλουν τις φαινολ-σουλφοτρανσφεράσες (*Eaton et al., 1996; Tamura et al., 2000*) και καταστέλλουν τη δραστηριότητα της κυκλοοξυγονάσης-2, των τοποϊσομερασών I και II και της αποκαρβοξυλάσης της ορνιθίνης (*Griffiths et al., 1999; Mutoh et al., 2000; Yannai et al., 1998; Yasukawa et al., 1990*).
- Η κεμπφερόλη επάγει απόπτωση μέσω ελέγχου αρκετών στοιχείων της αποπτωτικής μηχανής όπως η κασπάση-7, η ADP-ριβόζη πολυμεράση, η Akt-1 και η πρωτεϊνική κινάση που επάγεται από μιτογόνα, με το αντίστοιχο μονοπάτι. Ακόμη αυξάνει τα κυτταρικά επίπεδα των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bax και bad, μειώνει τα επίπεδα των αντι-αποπτωτικών Bcl-2 και Bcl-xl (*Nguyen et al., 2003*).

1.4.3.4. Ανθοκυανίνες

1.4.3.4.1. Προέλευση και βιοδιαθεσιμότητα

Οι ανθοκυανίνες είναι γλυκοσιδικές μορφές των ανθοκυανιδινών και οι συχνότερα απαντώμενες είναι η κυανιδίνη, η δελφινιδίνη, η πετουνιδίνη, η πελαργονιδίνη, η πεονιδίνη και η μαλβιδίνη (*Parkinson et al., 1981*). Οι προανθοκυανιδίνες είναι ανίκανες να διαπεράσουν το λεπτό έντερο λόγω του υψηλού μοριακού βάρους τους (*Deprez et al., 1999*). Οι ανθοκυανίνες που χορηγούνται ενδοπεριτοναϊκά ή ενδοφλέβια κατανέμονται γρήγορα στο νεφρό, το δέρμα, το ήπαρ, την καρδιά και τους πνεύμονες και απεκκρίνονται πρωταρχικά από τους νεφρούς, ενώ δείχνουν μεγάλη συγγένεια για το συνδετικό ιστό αφού οι συγκεντρώσεις τους στο δέρμα είναι τετραπλάσιες από αυτές του πλάσματος 4 ώρες μετά τη χορήγηση (*Lietti and Forni, 1976*). Τέλος, μπορεί να είναι ασταθείς *in vivo* και να μεταβολίζονται γρήγορα σε προκατεχουικό οξύ (*Tsuda et al., 1999*).

1.4.3.4.2. Δράση

Οι ανθοκυανίνες πελαργονιδίνη, κυανιδίνη και δελφινιδίνη ασκούν πολλαπλασιαστική δράση στο 40% και 60% του επιπέδου ανάπτυξης που προκαλεί η οιστραδιόλη μεμονωμένα. Ανάλογα με τη συγκέντρωση των ενδογενών οιστρογόνων, οι ανθοκυανίνες μπορούν να δράσουν ως οιστρογονικές ή αντι-οιστρογονικές ενώσεις (*Schmitt et al., 2001*). Σε χαμηλές συγκεντρώσεις οι ανθοκυανιδίνες είναι οιστρογονικές καθώς δεσμεύονται στους υποδοχείς των οιστρογόνων και προκαλούν ανάλογες αντιδράσεις. Σε υψηλές συγκεντρώσεις ανταγωνίζονται με τα ισχυρότερα φυσικά οιστρογόνα και γίνονται αντι-οιστρογονικές.

Η αντικαρκινική δράση των ανθοκυανινών οφείλεται στην αντιοξειδωτική δράση τους (*Kamei et al., 1995*), στην ικανότητά τους να προστατεύουν το DNA από μονόκλωνα σπασίματα (*Lazze et al., 2003*) και στην επιρροή τους σε αυξητικούς παράγοντες και παράγοντες κυτταρικής διαφοροποίησης. Ενδεικτικά, σε μελέτη σύγκρισης των προανθοκυανινών με τις βιταμίνες C, E και το β-καροτένιο, οι πρώτες αποδείχθηκαν πολύ ισχυρότερες (*Bagchi et al., 1998*). Επίσης η δελφινιδίνη σε συγκέντρωση 0,01g/L αναστέλλει την VEGF-επαγόμενη ανάπτυξη σε ενδοθηλιακά κύτταρα, μέσω αναστολής του κυτταρικού κύκλου στη φάση G₀-G₁ (*Martin et al., 2003*).

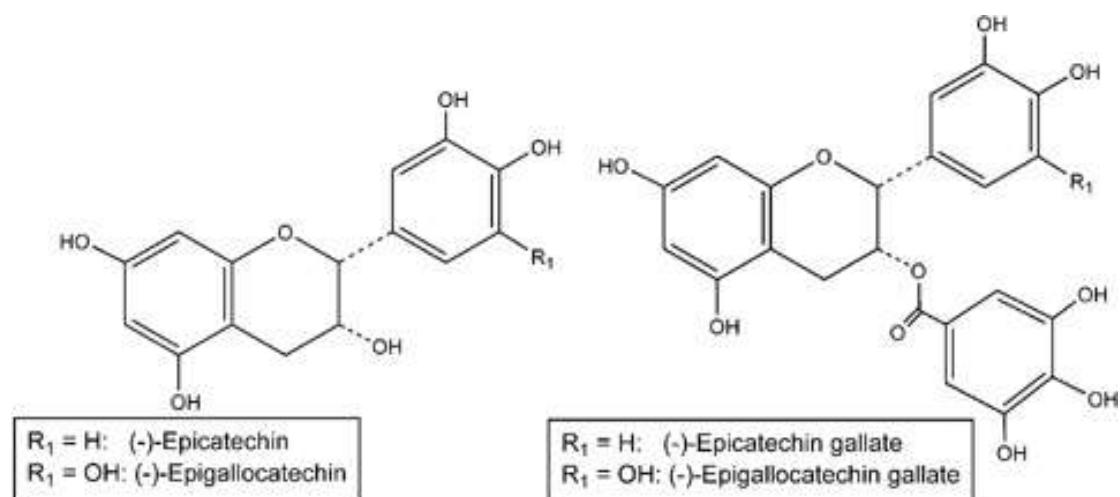
1.4.3.5. Κατεχίνες

1.4.3.5.1. Προέλευση και βιοδιαθεσιμότητα

Οι κατεχίνες χαρακτηρίζονται από υποκατάσταση ομάδας δι- ή τριυδροξυλίου του Β δακτυλίου, και μετα-5,7-διυδροξυ υποκατάσταση του Α δακτυλίου των φλαβονολών. Συμβάλλουν στην πικρότητα και τη στυπτικότητα των τροφίμων και βρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες στο τσάι. Η (-)-επιγαλλοκατεχίνη-3 (EGCG), η (-)-επιγαλλοκατεχίνη, η (-)-επικατεχίνη-3, η (-)-επικατεχίνη, η (+)-γαλλοκατεχίνη και η (+)-κατεχίνη είναι οι κύριες κατεχίνες παρούσες στο πράσινο τσάι (εικόνα 6). Η αποτελεσματική χρήση των κατεχινών ως θεραπευτικοί παράγοντες καθορίζεται από τη βιοδιαθεσιμότητά τους. Η σωματική διαθεσιμότητα των κατεχινών σε ποντίκια Sprague-Dawley ήταν χαμηλή λόγω αργής απορρόφησης και μεγάλης επίδρασης πρώτου περάσματος (*Zhu et al., 2000*). Μελέτη της φαρμακοκινητικής της EGCG σε ποντίκια έδειξε ότι η ουσία υφίσταται γλυκουρονιδίωση έπειτα από ενδοφλέβια και ενδογαστρική χορήγηση. Η ενδογαστρική χορήγηση οδήγησε σε υψηλότερα επίπεδα

EGCG στο λεπτό έντερο σε σύγκριση με συγκεντρώσεις σε άλλους ιστούς (*Lambert et al., 2003*).

Εικόνα 6: Κατεχίνες



1.4.3.5.2. Δράση

Πολλές *in vitro* μελέτες έχουν δείξει ότι οι κατεχίνες και άλλα δομικά παρόμοιες ουσίες εμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό και ελέγχουν την ανάπτυξη καρκινικών και φυσιολογικών κυτταρικών σειρών. Η επιγαλλοκατεχίνη-3, η επιγαλλοκατεχίνη και η γαλλοκατεχίνη φαίνεται να είναι πολύ δραστηρές σε τρεις καρκινικές κυτταρικές σειρές: MCF-7 μαστικά καρκινικά κύτταρα, HT-29 κύτταρα του καρκίνου του εντέρου και UACC-375 κύτταρα μελανώματος (*Valcic et al., 1996*). Ενδεικτικά, σε συγκέντρωση 50 μM η γαλλοκατεχίνη αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των ανθρώπινων MCF-7 κυττάρων σε ποσοστό 95%. Σύμφωνα με μελέτες βασισμένες στον τύπο των κυτταρικών σειρών και των κατεχινών, η αποτελεσματική συγκέντρωση κατεχινών που χρειάζεται για την επίτευξη των *in vitro* ιδιοτήτων τους είναι 20-100 μM. Όμως οι *in vitro* αποτελεσματικές συγκεντρώσεις μπορεί να μη σχετίζονται με αυτές που ανιχνεύονται στον ανθρώπινο ορό. Σε ανθρώπους που καταναλώνουν οκτώ φλυτζάνια μαύρου τσαγιού τη μέρα έχει παρατηρηθεί αύξηση των κατεχινών του ορού από 0,08 σε 0,2 μM (*van het Hof et al., 1999*).

Η επιγαλλοκατεχίνη είναι η κύρια μορφή των κατεχινών και ασκεί μια ποικιλία βιολογικών δραστηριοτήτων όπως αντιοξειδωτικές, ανοσορυθμιστικές και

αντιμικροβιακές έναντι κάποιων παθογόνων (*Ho et al., 1992; Katiyar et al., 1999; Sakagami et al., 1995; Toda et al., 1989*). Η προσθήκη κατεχινών στα μικροσώματα του ήπατος ποντικών ανέστειλε τη μεταλλαξιγόνο δράση των αρωματικών αμινών στην δοκιμασία Ames (*Steele et al., 1985*), ενώ έχει αποδειχθεί επίσης ότι σε συγκέντρωση 100 μΜ οι κατεχίνες αναστέλλουν τις αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-xl (*Leone et al., 2003*). Οι πολυφαινόλες του πράσινου τσαγιού επάγουν την απόπτωση μέσω συσσώρευσης του araf-1 (apoptotic protease activating factor 1) και απελευθέρωσης της κασπάσης-3 από τα μιτοχόνδρια (*Hsu et al., 2003*). Επιπρόσθετα, η EGCG αναστέλλει την αγγειογένεση (*Annabi et al., 2003*) και η EGCG διαταράσσει τον κυτταρικό κύκλο (στην φάση S) σε επιθηλιακά μαστικά μετά από διέγερση με τον παράγοντα EGF κύτταρα (*Liberto and Cobrinik, 2000*).

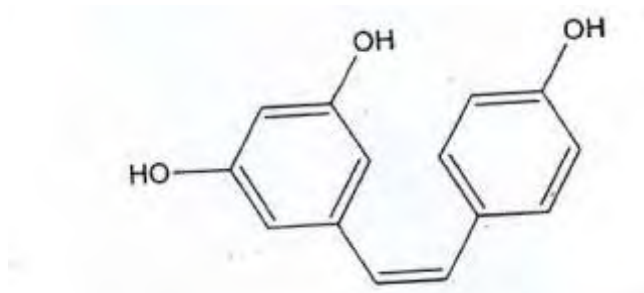
1.4.4. Στιλβένια

1.4.4.1. Προέλευση και βιοδιαθεσιμότητα

Τα στιλβένια είναι οργανικές ενώσεις που περιέχουν 1,2-διφαινυλ-αιθυλένιο ως λειτουργική ομάδα. Παράγονται από τα φυτά κυρίως ως απόκριση στο στρες, τον τραυματισμό, την προσβολή από μύκητες και την UV ακτινοβολία (*Aggarwal et al, 2004*). Σημαντικός αντιπρόσωπός των στιλβενίων είναι η ρεσβερατρόλη (εικόνα 7) η οποία στα φρούτα μπορεί να υπάρχει είτε στην ελεύθερη μορφή της (*cis* ή *trans* διαμόρφωση) είτε ως το γλυκοσίδιό της (ricoid). Απαντάται στα σταφύλια (στη φλούδα τους), το κρασί, το χυμό των σταφυλιών, τα φιστίκια και τα μούρα του γένους *Vaccinum* (*Burns et al., 2002; Rimando et al., 2004; Sanders et al., 2000*).

Παρόλο που η *trans*-ρεσβερατρόλη φαίνεται να απορροφάται καλά μετά από χορήγηση από το στόμα, η βιοδιαθεσιμότητά της είναι σχετικά χαμηλή λόγω του γρήγορου μεταβολισμού της (*Walle et al., 2004; Wenzel et al., 2005*).

Εικόνα 7: Χημική δομή ρεσβερατρόλης



1.4.4.2. Δράση

Η *trans*-ρεσβερατρόλη σε *in vitro* μελέτες δείχνει σημαντική κυτταροτοξικότητα έναντι των καρκινικών ηπατικών κυττάρων HepG2, με IC₅₀ 11,8 g/ml (Kim *et al.*, 2002). Σε συγκεντρώσεις 10⁻⁸ M - 10⁻⁴ M η ρεσβερατρόλη είναι οιστρογονική και αυξάνει την κυτταρική ανάπτυξη σε μαστικά καρκινικά κύτταρα (Levenson *et al.*, 2003).

Ο ρόλος της ρεσβερατρόλης στον καρκίνο του μαστού δεν έχει γίνει ακόμη σαφής. Δύο *in vivo* μελέτες στις οποίες χορηγούνταν ρεσβερατρόλη σε ποντίκια Sprague-Dawley έδειξαν αντιφατικά αποτελέσματα όσον αφορά την πορεία των μαστικών όγκων. Οι μελέτες ωστόσο διέφεραν ως προς τη χορηγούμενη δόση ρεσβερατρόλης (Banerjee *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 2003).

Η αντικαρκινική δράση της ρεσβερατρόλης μπορεί να σχετίζεται με την αντιοξειδωτική και αντιμεταλλαξιγόνο δράση, την αναστολή της βιοενεργοποίησης των καρκινογόνων ουσιών και της επαγωγής ενζύμων της φάσης II του μεταβολισμού των φαρμάκων. Πιο συγκεκριμένα η ρεσβερατρόλη και το διμερές της, η βινεφερίνη, αναστέλλουν τη δραστηριότητα κυτοχρωμάτων που εμπλέκονται στην βιοενεργοποίηση ή απενεργοποίηση πολλών καρκινογόνων (Piver *et al.*, 2003). Ακόμη, η ρεσβερατρόλη αυξάνει τα επίπεδα της ρεδοκτάσης της κινόνης-ενός ενζύμου φάσης II που αποτοξινώνει τα καρκινογόνα (Heo *et al.*, 2001), μειώνει την νέο-αγγείωση ή αγγειογένεση των όγκων (Brakenhielm *et al.*, 2001) και σε συγκέντρωση 30 μM μειώνει την κυτταρική ανάπτυξη μπλοκάροντας τα κύτταρα στο σημείο από την S στη G₂/M φάση, σε HL-60 προμυελωτικές κυτταρικές σειρές (Ragione *et al.*, 1998). Τέλος η ρεσβερατρόλη έχει δείχθει ότι έχει οιστρογονική δραστηριότητα που μπορεί να οφείλεται στη δομική ομοιότητά της με τη

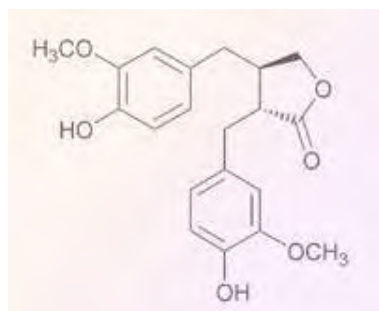
διαιθυστιλβεστρόλη. Η ικανότητα της trans-ρεσβερατρόλης να ανταγωνίζεται την οιστραδιόλη για σύνδεση στους υποδοχείς την καθιστά χημειοπροφυλακτικό παράγοντα για τον ορμονοεξαρτώμενο καρκίνο του μαστού (*Williams et al., 1996*).

1.4.5. Λιγνάνες

1.4.5.1. Προέλευση και βιοδιαθεσιμότητα

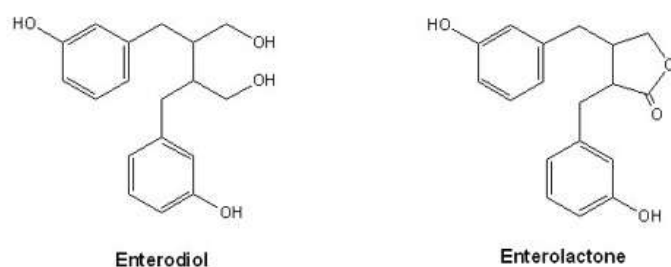
Οι λιγνάνες είναι μια ομάδα πολυφαινολικών χημικών ενώσεων που απαντάται στα φυτά, αποτελούν μια από τις κύριες τάξεις των φυτοοιστρογόνων και δρουν και ως αντιοξειδωτικά. Προέρχονται από τη φαιυλαλανίνη μέσω διμερισμού των υποκατεστημένων κινναμικών αλκοολών, γνωστών ως μονολιγνόλες, σε έναν σκελετό διβενζυλ-βουτανίου (εικόνα 8).

Εικόνα 8: Χημική δομή λιγνανών



Οι πρόδρομες ενώσεις των λιγνανών εντοπίζονται σε φυτικά τρόφιμα όπως οι σπόροι, ολόκληροι καρποί, τα όσπρια, τα φρούτα και τα λαχανικά. Οι λιναρόσποροι είναι η κυριότερη πηγή τέτοιων ενώσεων. Μετά την κατανάλωση, τα βακτήρια που φυσιολογικά βρίσκονται στο παχύ έντερο, μετατρέπουν τις πρόδρομες ενώσεις των λιγνανών σε εντερολιγνάνες, εντεροδιόλη και εντερολακτόνη (*Lampe JW, 2003*) (εικόνα 9).

Εικόνα 9 : Χημική δομή εντεροδιόλης κι εντερολακτόνης



1.4.5.2. Δράσεις

Παρόλο που τα φυτοοιστρογόνα δεσμεύονται στον υποδοχείς οιστρογόνων, η δράση τους είναι ασθενέστερη από αυτή των ενδογενών οιστρογόνων και μπορεί να εμποδίζουν ή να ανταγωνίζονται τις δράσεις των οιστρογόνων σε κάποιους ιστούς (*Wang LQ. 2002*).

Οι εντερολιγνάνες έχουν και βιολογικές δράσεις ανεξάρτητες των αλληλεπιδράσεων με τους υποδοχείς οιστρογόνων. Με την τροποποίηση της δραστηριότητας των ενζύμων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των οιστρογόνων, οι λιγνάνες μπορούν να αλλάζουν τη βιολογική δραστηριότητα των ενδογενών οιστρογόνων (*Brooks et al., 2005*). Οι λιγνάνες μπορούν επίσης να δράσουν ως αντιοξειδωτικά *in vitro*, αλλά η δράση αυτή δεν έχει εξακριβωθεί *in vivo* διότι οι ενώσεις αυτές μεταβολίζονται ταχύτατα και εκτενώς (*Rowland et al., 2003*).

Όσον αφορά τον καρκίνο του μαστού, έρευνες που περιλάμβαναν προ-εμμηνοπαυσιακές γυναίκες δεν έδειξαν συσχέτιση μεταξύ της πρόσληψης λιγνανών και της εμφάνισης της ασθένειας (*Horn-Ross et al., 2004; Touillaud et al., 2006*). Ωστόσο όταν στις έρευνες συμμετείχαν μετα-εμμηνοπαυσιακές γυναίκες, η αυξημένη πρόσληψη λιγνανών συσχετιζόταν με εμφανώς χαμηλότερα ποσοστά εμφάνισης καρκίνου του μαστού (*Touillaud et al., 2009*) Μια άλλη μελέτη έδειξε ότι η αυξημένη πρόσληψη λιγνανών σχετίζεται με χαμηλά ποσοστά εμφάνισης καρκίνου του ενδομητρίου και των ωθηκών, αλλά μόνο σε μετα-εμμηνοπαυσιακές γυναίκες (*Horn-Ross et al., 2003; McCann et al., 2003*).

1.4.6. Πολυφαινόλες ως αναστολείς τοποϊσομερασών ως αντικαρκινικοί παράγοντες

1.4.6.1. DNA τοποϊσομεράσες

Οι DNA τοποϊσομεράσες είναι πυρηνικά ένζυμα που ρυθμίζουν την τρισδιάστατη δομή του DNA, μέσω παροδικών σπασιμάτων κι επανενώσεων. Εμπλέκονται σε όλες τις πτυχές του μεταβολισμού του DNA, συμπεριλαμβανομένων της αντιγραφής, της μεταγραφής και του ανασυνδυασμού. Υπάρχουν δύο μεγάλες ομάδες τοποϊσομερασών: η τύπου I και η τύπου II (πίνακας 2). Οι δύο τύποι τοποϊσομερασών έχουν παρόμοιο καταλυτικό κύκλο που περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:

- i. Αναγνώριση υποστρώματος (διπλή έλικα DNA) και μη-ομοιοπολική δέσμευση σε αυτό.
- ii. Δημιουργία του ομοιοπολικού συμπλόκου σπασίματος (ένζυμο- DNA) κι έναρξη μιας ενδιάμεσης αντίδρασης όπου ο σκελετός του DNA διασπάται με υδρόλυση είτε στον ένα κλώνο (ένζυμο τύπου I) είτε και στους δύο κλώνους (ένζυμο τύπου II). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ομοιοπολική σύνδεση ενός ή δύο καταλοίπων τυροσίνης των τοποϊσομερασών I ή II στο 3' άκρο (τύπος I) ή στο 5' άκρο (τύπος II) του κομμένου DNA.
- iii. Πέρασμα του μονόκλωνου (τύπος I) ή δίκλωνου (τύπος II) DNA ανάμεσα από την εγκοπή.
- iv. Επανένωση της σπασμένης έλικας του DNA ακολουθούμενα από
- v. ATP υδρόλυση (τύπος II μόνο) και
- vi. Ανακύκλωση του ενζύμου, όπου το ένζυμο υφίσταται μια αλλαγή διαμόρφωσης που του επιτρέπει να ξεκινήσει ένα νέο καταλυτικό κύκλο.

Η δραστηριότητα της τοποϊσομεράσης I είναι σχετικά σταθερή κατά τη διάρκεια της κυτταρικής ανάπτυξης και διαφοροποίησης. Αντίθετα, η δραστηριότητα της τοποϊσομεράσης II είναι υψηλότερη σε διαιρούμενα κύτταρα από ότι σε αδρανή. Η καταλυτική δραστηριότητα της τοποϊσομεράσης II είναι απαραίτητη για το διαχωρισμό των συνυφασμένων χρωμοσωμικών μορίων DNA κατά τη μίτωση και το διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων κατά τη μείωση (A. Kragh Larsen, Review, 1994).

Οι ιδιότητες των ευκαρυωτικών DNA τοποϊσομερασών I και II συνοψίζονται στον πίνακα 2 (J. Cummings & J. F. Smyth, 1993)

Πίνακας 2: Οι ιδιότητες των ευκαρυωτικών DNA τοποϊσομερασών I και II

Τοποϊσομεράση I	Τοποϊσομεράση II
Χαλαρώνει θετικές κι αρνητικές υπερελικώσεις	Χαλαρώνει θετικές κι αρνητικές υπερελικώσεις
Όχι δραστικότητα υπερελίκωσης	Όχι δραστικότητα υπερελίκωσης
Συνδέεται ομοιοπολικά στο 3' άκρο του DNA	Συνδέεται ομοιοπολικά στο 5' άκρο του DNA
Τα δισθενή μεταλλικά ιόντα ενισχύουν την καταλυτική δραστικότητα αλλά δεν είναι απαραίτητα	Απαιτεί ATP και δισθενή μεταλλικά ιόντα

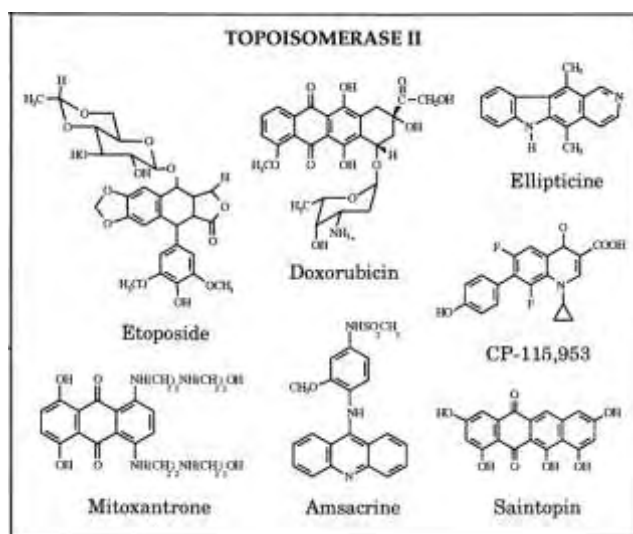
1.4.6.2. Αναστολείς DNA τοποϊσομερασών

Η καταλυτική δραστικότητα των τοποϊσομερασών I και II μπορεί να ανασταλεί σε οποιοδήποτε στάδιο του καταλυτικού κύκλου. Ωστόσο, οι περισσότεροι αναστολείς τοποϊσομερασών που χρησιμοποιούνται κλινικά φαίνεται ότι δρουν στα στάδια του καταλυτικού κύκλου όπου το ένζυμο είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο στο DNA. Τα φάρμακα σταθεροποιούν αυτό το σύμπλοκο. Η παρουσία του συμπλόκου αυτού προκαλεί κυτταρικό θάνατο, ίσως με σύνδεση με τη διχάλα αντιγραφής κατά την αντιγραφή του DNA, που οδηγεί σε αυξημένο ανασυνδυασμό του DNA και απώλεια γονιδίων, Παρόμοια γεγονότα μπορεί να λαμβάνουν χώρα και κατά τη μεταγραφή.

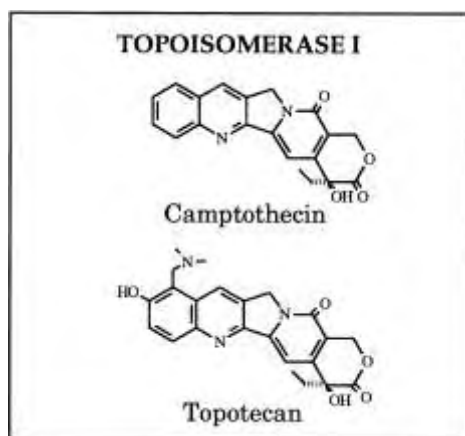
Από τη στιγμή που η τοποϊσομεράση II είναι μια απαραίτητη πρωτεΐνη, είναι πιθανό ότι οι ενώσεις που δρουν σε άλλα βήματα του καταλυτικού κύκλου μπορούν να επάγουν επίσης κυτταρικό θάνατο, είτε με αναστολή της καταλυτικής δραστικότητας που χρειάζεται για το διαχωρισμό των συνυφασμένων χρωμοσωμικών μορίων DNA κατά τη μίτωση, είτε με παρέμβαση στις δομικές λειτουργίες της τοποϊσομεράσης II στην οργάνωση της χρωματίνης. Έτσι πολλά νέα αντικαρκινικά φάρμακα φαίνεται να αλληλεπιδρούν με την τοποϊσομεράση II χωρίς όμως τη σταθεροποίηση των συμπλόκων του ενζύμου με το DNA (*M. L. Rothenberg, Review, 1997*).

Οι αναστολείς της τοποϊσομεράσης II χωρίζονται σε διάφορες κατηγορίες, που περιλαμβάνουν τις ανθρακυκλίνες (όπως την δοξορουβικίνη), ανθρακενεδιόνες, ανθραπυραζόλες, ακτινομυκίνες, ακριδίνες (όπως το m-AMSA), ελλειπτισίνες και επιποδοφυλλοτοξίνες (ετοποσίδη και τενιποσίδη) (εικόνα 10). Η κύρια κατηγορία αναστολέων της τοποϊσομεράσης I που έχει περιγραφεί εκτενώς στη διεθνή βιβλιογραφία περιλαμβάνει τις καμπτοθεκίνες (εικόνα 11).

Εικόνα 10: Αναστολείς της τοποϊσομεράσης II



Εικόνα 11: Αναστολείς της τοποϊσομεράσης I



Η ετοποσίδη επάγει σπασίματα της έλικας σχετιζόμενα με την τοποϊσομεράση II. Είναι δυνητικός επαγωγέας χρωμοσωμικών ανωμαλιών και ανταλλαγής αδερφών χρωματίδων, πράγμα που μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια γονιδίων Η καμπθοεκίνη είναι ένα φυτικό αλκαλοειδές που επάγει σπασίματα της έλικας σχετιζόμενα με την τοποϊσομεράση I. Η καμπθοεκίνη δεν προσδένεται ούτε αλληλεπιδρά με καθαρισμένο DNA). Όπως και οι περισσότεροι αναστολείς της τοποϊσομεράσης II, η καμπθοεκίνη είναι ισχυρός χρωμοσωμικών ανωμαλιών και ανταλλαγής αδερφών χρωματίδων. Επιπρόσθετα, είναι δυνητικός αναστολέας της σύνθεσης DNA και RNA (J. Cummings & J. F. Smyth, Review, 1993)

1.4.6 .3. Πολυφαινόλες ως αναστολείς των τοποϊσομερασών

Όπως έχει αναφερθεί οι πολυφαινόλες έχουν πολλαπλές βιολογικές λειτουργίες, μεταξύ των οποίων είναι και η ισχυρή αντικαρκινική τους δράση. Μελέτες έδειξαν ότι διάφορα πολυφαινολικά μόρια είναι ικανά να δρουν ως αναστολείς των τοποϊσομερασών, όπως για παράδειγμα η ισοφλαβόνη γενιστεΐνη και τα φλαβονοειδή λουτεολίνη και κερκετίνη (εικόνα 12).

Τα δύο φλαβονοειδή, λουτεολίνη και κερκετίνη, δρουν με διαφορετικό τρόπο. Συγκεκριμένα η λουτεολίνη είναι ικανή να αναστέλλει τόσο την τοποϊσομεράση I όσο και την τοποϊσομεράση II, επιδρώντας ως αναστολέας-δηλητήριο (poison) στο σύμπλοκο που δημιουργείται από το DNA με το ένζυμο. Αντίθετα η κερκετίνη δρα ως αναστολέας-δηλητήριο (poison) και για τα δύο ένζυμα, εμποδίζοντας την επανένωση των τμημάτων του DNA ύστερα από το πέρασμα της αλυσίδας του DNA. Κατά συνέπεια, η λουτεολίνη και η κερκετίνη δρουν ως αντικαρκινικοί παράγοντες, γεγονός που τα καθιστά σημαντικά μόρια για την πρόληψη του καρκίνου (Cantero et al., 2006).


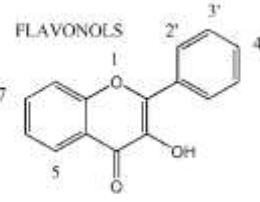
Εικόνα 12: Χημική δομή των φλαβονοειδών λουτεολίνη και κερκετίνη

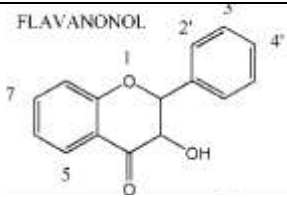
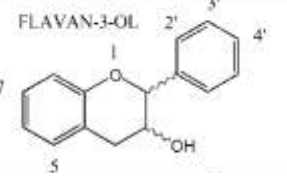

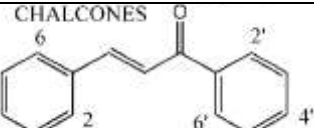
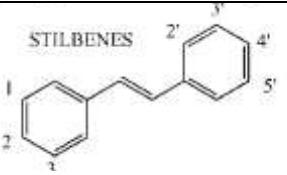


Ένα άλλο πολυφαινολικό μόριο το οποίο εμφανίζει ικανότητα αναστολής της τοποϊσομεράσης II είναι το EGCG (epigallocatechin gallate), το οποίο περιέχεται σε μεγάλο ποσοστό στο πράσινο τσάι. Έχει βρεθεί από μελέτες ότι το EGCG επιδρά στις δύο ισομορφές της τοποϊσομεράσης II, IIα και IIβ. Το EGCG επηρεάζει την ενεργότητα των δύο ισομορφών του ενζύμου με έναν τρόπο που περιλαμβάνει οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, οι οποίες απαιτούν την ομοιοπολική σύνδεση του EGCG στην τοποϊσομεράση IIα και IIβ (Bandelet et al., 2008).

Έχει δειχθεί ότι ικανότητα αναστολής της τοποϊσομεράσης I εμφανίζουν και πολλά γλυκοσίδια φλαβονών, στα οποία περιλαμβάνεται και η ένωση οριεντίνη (πίνακας 3). Πολλά από αυτά τα πολυφαινολικά μόρια έχουν τη δυνατότητα να δρουν ταυτόχρονα και ως καταλυτικοί αναστολείς, αλλά και ως αναστολείς δηλητήρια (poison), παρεμβαίνοντας τόσο στο DNA όσο και στο σύμπλοκο που σχηματίζει η τοποϊσομεράση I με το DNA (Webb et al., 2004).

Πίνακας 3: Ικανότητα αναστολής της τοποϊσομεράσης I από ορισμένα φλαβονοειδή

Χημική Δομή	Κοινή ονομασία	% Αναστολή στα 100 μM (±SD)
	Χρυσίνη	2 (± 2.1)
	Απιγενίνη	44 (±8.9)
	Λουτεολίνη	55 (± 8.2)
	Οριεντίνη	69 (± 5.6)
	Διοσμίνη	13 (± 4.9)
	Φισκίνη	48 (± 1)
	Καιμπφερόλη	56 (± 6.2)
	Κερκετίνη	57 (± 15.6)
	Μυρικετίνη	62 (± 14.9)
	Γκοσιπετίνη	9 (± 4.9)
	Μορίνη	16 (± 5.5)
Ραμνετίνη	<25	

	Ταμαριξετίνη	6 (± 2.5)
<p>FLAVANONOL</p> 	Ταξιφολίνη	14 (± 9.9)
	Σιλιμπινίνη	5 (± 4)
	Κατεχίνη	1 (± 1)
<p>FLAVAN-3-OL</p> 	Επικατεχίνη	9 (± 5.4)
	Επιγαλοκατεχίνη	5
	Χεσπερτίνη	4 (± 2.5)
<p>FLAVANONES</p> 	Γενιστεΐνη	22 (± 9.5)
	Φλορετίνη	19 (± 2.8)
<p>CHALCONES</p> 	Φλοριντζίνη	19 (± 0.7)
	trans-Ρεσβερατρόλη	26 (± 2.1)
<p>STILBENES</p> 	trans-Πικεατανόλη	23 (± 6.4)

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι να μελετηθεί η δράση καθαρών πολυφαινολικών ενώσεων από ψυχανθή σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα.

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2. 1. Υλικά

2.1.1. Χημικά αντιδραστήρια

Τα χημικά αντιδραστήρια ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας και ήταν προϊόντα των εταιρειών Roche Diagnostics και Sigma-Aldrich. Αυτά περιλαμβάνουν το DMSO (διμεθυλ-σουλφοξείδιο) (Sigma # D2650), ετοποσιδη (Sigma # E1383) και το Cell Proliferation Kit II (XTT), (Roche Diagnostics # 11 465 015 001).

2.1.2. Θρεπτικά υλικά

- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium 1x),: περιέχει 4,5 g/L γλυκόζη, L-γλουταμίνη, πυροσταφυλικό οξύ (GIBCO # 41966)
- PBS pH 7,2 (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων, 1x) το οποίο δεν περιέχει CaCl_2 και MgCl_2 (GIBCO # 20012)
- Διάλυμα πενικιλίνης/στρεπτομικίνης: περιέχει 10.000 units/ml πενικιλίνης και 10.000 $\mu\text{g/ml}$ στρεπτομικίνης (Invitrogen # 15140)
- FBS (εμβυϊκός βόειος ορός) (Gibco, #10270)
- Διάλυμα τρυψίνης, 5% (10X) (Gibco, #15400)

2.1.3. Διαδικασία απομόνωσης των φυτικών εκχυλισμάτων και των πολυφαινολικών ενώσεων

Αρχικά απομονώθηκαν τα υπέργεια τμήματα, τα σπέρματα και οι καρποί των φυτών *V. faba* και *L. edulis* και αποξηράνθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου, σε μεγάλους καλά αεριζόμενους χώρους, προστατευμένους από την ηλιακή ακτινοβολία. Ακολούθησε διαλογή του φυτικού υλικού, μακρομερής τεμαχισμός και κονιορτοποίηση του σε ειδικό μύλο (Allenwest, Αγγλία).

Στη συνέχεια μία ποσότητα των φυτικών τμημάτων χρησιμοποιήθηκε για εκχύλιση με μεθανόλη (2:1 κατ'όγκον) και νερό (2:1 κατ'όγκον) σε ειδική συσκευή επιταχυνόμενης εκχύλισης ASE (accelerated solvent extractor). Η παρασκευή των εκχυλισμάτων έγινε υπό καθορισμένες συνθήκες, με σκοπό την εξασφάλιση της

επαναληψιμότητας και τη δυνατότητα της συγκριτικής τους μελέτης. Κάθε εκχύλιση με τον αντίστοιχο διαλύτη (μεθανόλη ή νερό) επαναλήφθηκε τρεις φορές και είχε διάρκεια 48 ώρες. Στα δοχεία εκχύλισης της συσκευής τοποθετήθηκαν 20 g του φυτικού υλικού και η κάθε εκχύλιση πραγματοποιήθηκε σε πίεση 1500 psi, σε θερμοκρασία 70°C και σε 100 mL όγκο διαλύτη. Ακολούθησε απομάκρυνση του διαλύτη των εκχυλισμάτων με τη βοήθεια συσκευής απόσταξης υπό κενό. Η περαιτέρω κλασμάτωση των εκχυλισμάτων, ο καθαρισμός τους και η ταυτοποίηση των καθαρών μορίων έχει περιγραφεί αναλυτικά από τους Spanou et al. (Spanou et al., 2008).

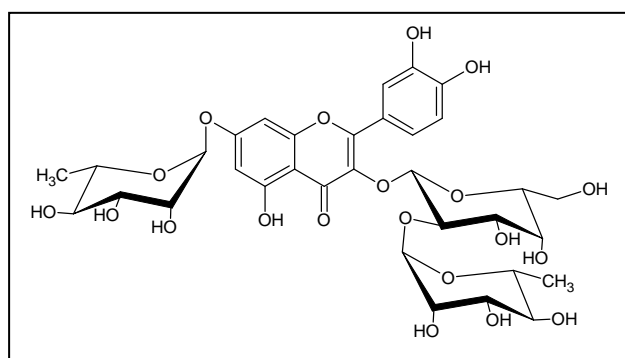
2.1.4. Καθαρές πολυφαινολικές ενώσεις

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν καθαρές πολυφαινολικές ενώσεις που προέρχονται από το φυτό *Vicia faba* (Vf 5a, Vf 7b, Vf 7bb, Vf 12e) και μόρια που προέρχονται από το *Lotus edulis* (Le D₃, Le D₆, Le C₂). Το φυτό *Vicia faba* είναι ένα είδος ψυχανθούς της οικογένειας *Fabaceae*, είναι διπλοειδές φυτό και κάθε του κύτταρο περιέχει 12 χρωμοσώματα (6 ομόλογα ζεύγη). Οι καρποί του είναι γνωστοί ως κουκιά, επιδεικνύουν μια σειρά από σημαντικά οφέλη για την υγεία αλλά περιέχουν και μεγάλες ποσότητες τυραμίνης. Το φυτό *Lotus edulis* ανήκει κι αυτό στην οικογένεια *Fabaceae* και είναι γνωστό ως περατζούνη. Είναι ετήσιο και παρουσιάζει συμβιωτικές σχέσεις με βακτήρια του εδάφους τα οποία σχηματίζουν εξογκώματα στις ρίζες των φυτών και παράγουν ατμοσφαιρικό άζωτο.

Αναλυτικά παρατίθενται πληροφορίες για την κάθε ένωση

Vf 5a

Χημική δομή



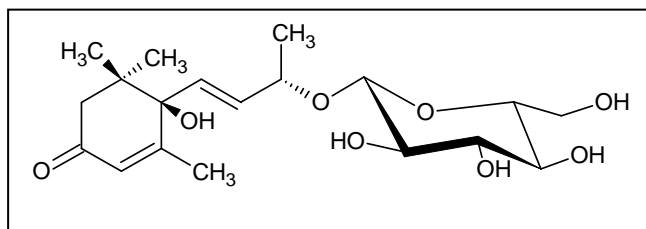
Φυτό προέλευσης: *Vicia faba*

Όνομα: 3-O-(2-O-ραμνοπυρανοσυλο)-γαλακτοπυρανοσυλο-7-O-ραμνοπυρανοσυλο-κερκετίνη

Μοριακό βάρος: 756,66

Vf 7b

Χημική δομή



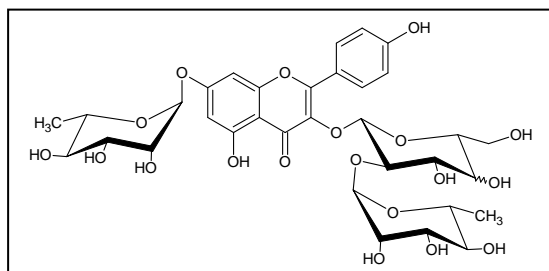
Φυτό προέλευσης: *Vicia faba*

Όνομα: 9-O-β-D-γλυκοπυρανοσυλοξυ-6-υδροξυ-3-οξο-α-ιονόλη

Μοριακό βάρος: 386

Vf 7bb

Χημική δομή



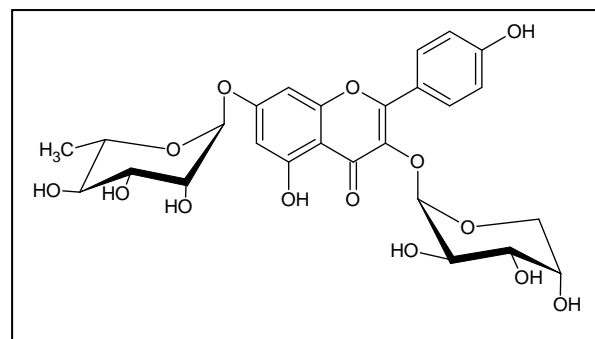
Φυτό προέλευσης: *Vicia faba*

Όνομα: 3-O-(2-O-ραμνοπυρανοσυλο)-γαλακτοπυρανοσυλο-7-O-ραμνοπυρανοσυλο-καιμπφερόλη

Μοριακό βάρος: 740,66

Vf 12e

Χημική δομή



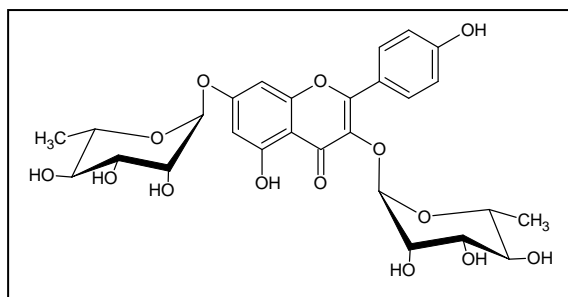
Φυτό προέλευσης: *Vicia faba*

Όνομα: 3-O-αραβινοπυρανοσυλο-7-O-ραμνοπυρανοσυλο-καιμπφερόλη

Μοριακό βάρος: 564,49

Le D₃

Χημική δομή



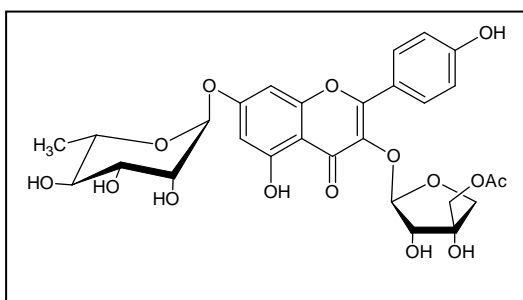
Φυτό προέλευσης: *Lotus edulis*

Όνομα: 3,7-δι-Ο-ραμνοπυρανοσυλο-καιμπφερόλη

Μοριακό βάρος: 578,52

Le C₂

Χημική δομή



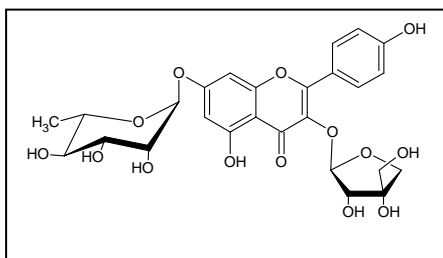
Φυτό προέλευσης: *Lotus edulis*

Όνομα: 3-Ο-(5-Ο-ακετυλαπιοφουρανοσυλο)-7-Ο-ραμνοπυρανοσυλο-καιμπφερόλη

Μοριακό βάρος: 606

Le D₆

Χημική δομή



Φυτό προέλευσης: *Lotus edulis*

Όνομα: 3-Ο-απιοφουρανοσυλο-7-Ο-ραμνοπυρανοσυλο-καιμπφερόλη

Μοριακό βάρος: 578,52

Τα μόρια αυτά αποτελούν γλυκοσίδια των φλαβονολών κερσετίνη και καιμπφερόλη, εκτός από το Vf 7b, που είναι ιονόλη.

2.2. Μέθοδοι

2.2.1. Καρκινικές κυτταρικές σειρές

2.2.1.1. Καλλιέργεια καρκινικών κυτταρικών σειρών

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι καρκινικές κυτταρικές σειρές HeLa, HepG2 και MCF-7.

Τα κύτταρα HeLa προέρχονται από καρκίνο του τραχήλου της μήτρας και αποτελούν την πιο παλιά και συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη ανθρώπινη κυτταρική σειρά. Η ονομασία τους προέρχεται από την ασθενή από την οποία πάρθηκαν τα κύτταρα, την Henrietta Lacks. Τα συγκεκριμένα κύτταρα διατηρούν κατά την κυτταρική διαίρεση μια ενεργή μορφή της τελομεράσης που αποτρέπει την αυξανόμενη βράχυνση των τελομερών, η οποία εμπλέκεται στη γήρανση και στον κυτταρικό θάνατο. Με τον τρόπο αυτό τα HeLa κύτταρα παρακάμπτουν το όριο Hayflick, που είναι περιορισμένος αριθμός διαιρέσεων που πραγματοποιούν τα περισσότερα φυσιολογικά κύτταρα προτού πεθάνουν, σε μια κυτταροκαλλιέργεια.

Τα κύτταρα HepG2 προέρχονται από ανθρώπινο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα και μεγαλώνουν σε μονοστιβάδες και συσσωματώματα. Έχουν πρότυπο χρωμοσωμικό αριθμό 55 και εκκρίνουν πρωτεΐνες του πλάσματος όπως η αλβουμίνη, η τρανσφερίνη, το ινωδογόνο, η α-2-μακροαιμοσφαιρίνη και το πλασμινογόνο. Τα κύτταρα ανταποκρίνονται σε ερέθισμα με ανθρώπινη αυξητική ορμόνη.

Τα κύτταρα MCF-7 προέρχονται από ανθρώπινο μαστικό αδενοκαρκίνωμα και ο καρυότυπός τους επιδεικνύει 69 χρωμοσώματα. MCF-7 είναι το ακρωνύμιο του Michigan Cancer Foundation - 7, του ινστιτούτου όπου καθιερώθηκε η εν λόγω κυτταρική σειρά το 1973. Τα κύτταρα αυτά έχουν υποδοχείς οιστρογόνων, ενώ η ανάπτυξή τους αναστέλλεται από τον TNFα (tumor necrosis factor-παράγοντας νέκρωσης όγκων).

Όλες οι μεταχειρίσεις των κυττάρων πραγματοποιήθηκαν σε θάλαμο καθέτου νηματικής ροής επιπέδου βιοασφάλειας II (laminar flow hood).

1. Συντήρηση κυτταρικών σειρών σε καλλιέργεια

Τα κύτταρα διατηρούνται σε επίπεδες αποστειρωμένες πλαστικές φλάσκες των 75 cm² (T₇₅) ή των 25cm² (T₂₅) και είναι σημαντικό να κρατούνται σημειώσεις για τον αριθμό περάσματος (passage) της κάθε καλλιέργειας. Η καλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιείται σε πλήρες θρεπτικό υλικό το οποίο αποτελείται από θρεπτικό μέσο DMEM παρουσία FBS (τελικής συγκέντρωσης 10% v/v) και αντιβιοτικών πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης (τελικής συγκέντρωσης 100 units/ml και 100 μg/ml αντίστοιχα). Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι για την αποφυγή ενεργοποίησης του συμπληρώματος πριν την χρησιμοποίηση του ορού ο ορός υφίσταται απενεργοποίηση με θέρμανση 30 λεπτών στους 56°C (heat inactivation) και διαχωρίζεται σε μικρότερες ποσότητες που συντηρούνται στους -20°C. Όλα τα αντιδραστήρια διατηρούνται πριν τη χρήση τους προθερμαίνονται σε υδατόλουτρο στους 37°C.

Η παρατήρηση των κυττάρων γίνεται σε μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων. Όταν η επικάλυψη της φλάσκας φτάσει το 80% γίνεται τρυψινοποίηση και μεταφορά των κυττάρων σε νέα φλάσκα (αποφεύγεται έτσι το φαινόμενο της αναστολής εξ επαφής). Αναλυτικά, απομακρύνεται το παλιό θρεπτικό υλικό με αποστειρωμένη πιπέτα Pasteur που είναι συνδεδεμένη σε αντλία κενού και πραγματοποιείται έκπλυση των κυττάρων με διάλυμα PBS. Ο όγκος του PBS ποικίλλει ανάλογα με το μέγεθος της φλάσκας, ενδεικτικά είναι 5ml για την T₂₅ και 10 ml για την T₇₅. Η διεργασία αυτή γίνεται με σκοπό την απομάκρυνση των υπολειμμάτων του ορού που περιέχεται στο θρεπτικό μέσο, ο οποίος απενεργοποιεί την τρυψίνη. Στη συνέχεια αφαιρείται το PBS και προστίθεται τρυψίνη, η οποία διασπά τις συνδέσεις των κυττάρων μεταξύ τους αλλά και με το στερεό τους υπόστρωμα. Ο όγκος του διαλύματος της τρυψίνης που χρησιμοποιείται ποικίλει, ανάλογα με το μέγεθος της φλάσκας, ενδεικτικά 1,5 ml για την T₇₅ και 1 ml για την T₂₅. Ακολουθεί επώαση λίγων λεπτών (περίπου 3-5 λεπτά) στους 37°C ώστε να δράσει η τρυψίνη και μηχανική ανάδευση με πιπέτα ώστε να επιτευχθεί διάσπαση κυτταρικών συσσωματωμάτων και να επιτευχθεί ομοιόμορφη κατανομή των κυττάρων. Τέλος προστίθεται πλήρες θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα μεταφέρονται σε νέα φλάσκα σε αναλογία 1:8 ή 1:10. Τα κύτταρα διατηρούνται σε επωαστικό κλίβανο θερμοκρασίας 37°C, σε ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5% CO₂ / 95% αέρα.

2. Πάγωμα-ξεπάγωμα κυττάρων

Η μακροχρόνια αποθήκευση κυτταρικών σειρών γίνεται με την αποθήκευσή τους σε κρυοπροστατευτικό μέσο (μέσο παγώματος). Αυτό μπορεί να αποτελείται από FBS με 10% DMSO ή από πλήρες θρεπτικό με 10% DMSO. Το DMSO δρα ως κρυοπροστατευτικό, αλλάζοντας τη δομή της κυτταρικής μεμβράνης κι εμποδίζοντας το σχηματισμό πολλών κρυστάλλων νερού κατά το πάγωμα των κυττάρων. Για την επιτυχή διατήρησή τους είναι απαραίτητο τα κύτταρα να βρίσκονται σε καλή μεταβολική κατάσταση πριν το πάγωμα και για το λόγο αυτόν κατά γενικό κανόνα το πάγωμα πραγματοποιείται όταν τα κύτταρα έχουν καλύψει το 80% της επιφάνειας της φλάσκας. Τα πρωτόκολλα που ακολουθούνται είναι οι εξής:

Πάγωμα των κυττάρων

Απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό και πραγματοποιείται έκπλυση της φλάσκας με διάλυμα PBS (5 ml για την T₂₅ και 10 ml για την T₇₅). Μετά την αφαίρεση του PBS προστίθεται διάλυμα τρυψίνης (1,5 ml για την T₇₅ και 1 ml για την T₂₅) και τα κύτταρα επωάζονται για λίγα λεπτά (3-5 λεπτά) στους 37°C. Ακολουθεί μηχανική ανάδευση με πιπέτα ώστε να επιτευχθεί διάσπαση συσσωματωμάτων και να επιτευχθεί ομοιόμορφη κατανομή των κυττάρων. Προστίθεται πλήρες θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα μεταφέρονται σε σωληνάριο των 15 ml και φυγοκεντρούνται στις 1200 στροφές ανά λεπτό (rpm) για 5 λεπτά. Μετά την φυγοκέντρηση απομακρύνεται το υπερκείμενο και τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε μέσο παγώματος- ενδεικτικά χρησιμοποιείται 1 ml ανά σωληνάριο παγώματος (cryovial). Είναι σημαντικό σε κάθε cryovial να αναγράφεται το είδος της κυτταρικής σειράς, ο αριθμός περασμάτων και η ημερομηνία παγώματος. Τα κύτταρα φυλάσσονται στους -20°C για μια ώρα και ακολουθεί μεταφορά τους στους -80°C, έως λίγους μήνες, και τελικά σε δοχείο υγρού αζώτου για μακροχρόνια διατήρηση.

Ξεπάγωμα των κυττάρων

Σε αντίθεση με το πάγωμα, το ξεπάγωμα των κυττάρων πραγματοποιείται σε σύντομο χρονικό διάστημα, για την μείωση του κυτταρικού θανάτου. Τα σωληνάρια με τα παγωμένα κύτταρα (cryovial) μεταφέρονται από τους -80 °C ή το υγρό άζωτο σε υδατόλουτρο 37 °C, όπου ανακινούνται συνεχώς έως ότου τα κύτταρα ξεπαγώσουν πλήρως. Έπειτα τα κύτταρα μεταφέρονται σε σωληνάριο που περιέχει πλήρες θρεπτικό υλικό και αναμιγνύονται πλήρως. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1200 στροφές ανά λεπτό για 5 λεπτά, το υπερκείμενο (που περιέχει το μέσο

παγώματος) απορρίπτεται και τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε πλήρες θρεπτικό υλικό και μεταφέρονται σε φλάσκες T₇₅ ή T₂₅ ανάλογα με τον αριθμό τους.

2.2.2. Προσδιορισμός κυτταρικής αύξησης με μέθοδο ΧΤΤ

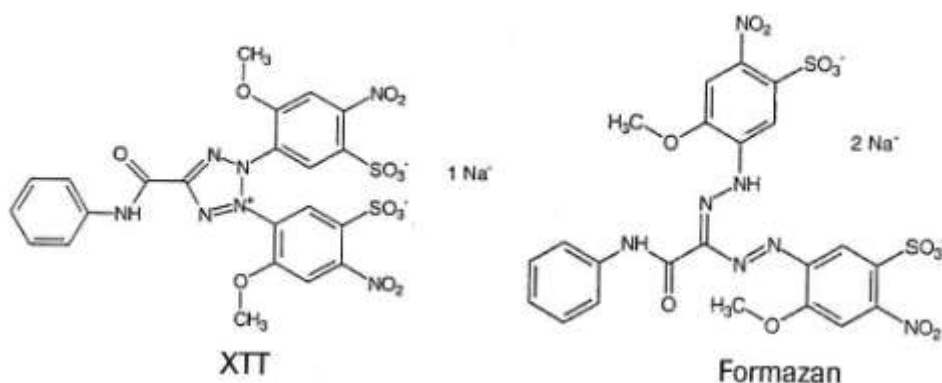
2.2.2.1. Αρχή της μεθόδου

Για τη μη-ραδιενεργή ποσοτικοποίηση της κυτταρικής ανάπτυξης κι επιβίωσης χρησιμοποιήθηκε μια χρωματομετρική μέθοδος η οποία βασίζεται στο αντιδραστήριο ΧΤΤ. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε το cell proliferation kit II της εταιρείας Roche.

Ιστορικά, η μέθοδος περιγράφηκε πρώτα από τους Scudiero et al. και βελτιώθηκε μέσα στα επόμενα χρόνια από άλλους ερευνητές. Βρίσκει εφαρμογή στην εξέταση της κυτταρικής ανάπτυξης σε απόκριση σε αυξητικούς παράγοντες όπως οι κυτοκίνες, αλλά και στη μέτρηση της κυτταροτοξικότητας.

Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα διάσπασης του κίτρινου άλατος τετραζολίου ΧΤΤ και στο σχηματισμό της φορμαζάνης, που είναι μια πορτοκαλί χρωστική. Η αντίδραση αυτή πραγματοποιείται μόνο σε μεταβολικά ενεργά και συνεπώς ζωντανά κύτταρα. Η αύξηση του αριθμού των ζωντανών κυττάρων συνεπάγεται αύξηση της ολικής δραστηριότητας των μιτοχονδριακών δεϋδρογενασών στο δείγμα. Αυτή η αύξηση αντιπροσωπεύεται άμεσα από την ποσότητα της πορτοκαλί φορμαζάνης που σχηματίζεται. Η χρωστική φορμαζάνη είναι υδατοδιαλυτή και μπορεί άμεσα να ποσοτικοποιηθεί από ένα φασματοφωτόμετρο (ELISA reader). Αυτό διασφαλίζει μεγάλο βαθμό ακρίβειας και άμεση επεξεργασία των αποτελεσμάτων από τον υπολογιστή, και συνεπώς καθίσταται δυνατός ο γρήγορος και εύκολος χειρισμός μεγάλου αριθμού δειγμάτων.

Εικόνα 13: Μεταβολισμός του ΧΤΤ σε υδατοδιαλυτό άλας φορμαζάνης, σε μεταβολικά ενεργά κύτταρα



2.2.2.2. Επιλογή αριθμού κυττάρων για τη μελέτη της κυτταρικής αύξησης

Για την εκτίμηση της κυτταρικής αύξησης που θα πραγματοποιηθεί σε τρυβλία των 96 θέσεων (96-well plates) θα πρέπει να υπάρχει ο κατάλληλος αριθμός κυττάρων σε κάθε θέση-πηγαδάκι (well), ώστε τα κύτταρα να μεγαλώνουν ενεργά κατά την διάρκεια του πειράματος. Ενδεικτικά θα πρέπει να υπολογιστεί ο κατάλληλος πληθυσμός ώστε τα κύτταρα να μην βρίσκονται πολύ κοντά μεταξύ τους (αναστολή εξ επαφής) αλλά ούτε και πολύ αραιά, γιατί οι κυτταρικές επαφές είναι σημαντικές για την ανάπτυξη τους. Επίσης είναι καλό τα κύτταρα να μη συσσωρεύονται στο κέντρο του πηγαδιού αλλά ούτε και στα τοιχώματα. Για την πλήρωση των παραπάνω προϋποθέσεων, χρησιμοποιούνται 15.000 HeLa κύτταρα/well, 20.000 MCF-7 κύτταρα/well και 35.000 HepG2 κύτταρα/well.

Η διαδικασία υπολογισμού του αριθμού των κυττάρων ξεκινά με τρυψινοποίηση της κυτταρικής καλλιέργειας και μέτρηση σε πλάκα Neubauer (αιμοκυττόμετρο). Συγκεκριμένα λαμβάνεται δείγμα 10 μl από το κυτταρικό αιώρημα και τοποθετείται στο αιμοκυττόμετρο και στο μικροσκόπιο καταμετράται ο αριθμός τους στα 4 μεγάλα τετράγωνα (Α, Β, Γ, Δ) γύρω από τον κεντρικό σταυρό. Υπολογίζουμε το μέσο όρο των κυττάρων στα τετράγωνα, σύμφωνα με τον τύπο $[(A+B+Γ+Δ) / 4] \times 10^4$. Ο αριθμός που προκύπτει είναι ο πληθυσμός των κυττάρων ανά ml καλλιέργειας. Στη συνέχεια υπολογίζεται η ποσότητα των κυττάρων που θα τοποθετηθεί σε κάθε πηγάδι του τρυβλίου, σε τελικό όγκο 100

2.2.2.3. Πειραματική διαδικασία ΧΤΤ

Σε αυτή τη διαδικασία χρησιμοποιούνται δύο αντιδραστήρια : το ΧΤΤ labeling reagent που περιέχει 1 mg/ml ΧΤΤ {sodium 3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis (4-methoxy-6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate} σε θρεπτικό RPMI 1640, και το Electron-coupling reagent που περιέχει 0,383 mg/ml PMS (N-methyl dibenzopyrazine methyl sulfate) σε PBS (αποστειρωμένο). Τα δύο αυτά αντιδραστήρια αναμειγνύονται σε αναλογία 50:1 λίγο πριν την χρήση τους.

Τα κύτταρα αποκολλώνται με τρυψίνη, επαναιωρούνται σε πλήρες θρεπτικό υλικό, καταμετρώνται και τοποθετούνται σε τρυβλίο 96-θέσεων (96-well plate) μαζί με πλήρες θρεπτικό υλικό (όγκος 100 μl ανά well). Ακολουθεί επώαση 24 ωρών στους 37°C ώστε να προσκολληθούν στον πάτο του πηγαδιού. Στη συνέχεια αφαιρείται το θρεπτικό υλικό και προστίθεται νέο θρεπτικό χωρίς ορό, καθώς και η υπό εξέταση ένωση στην επιθυμητή συγκέντρωση (τελικός όγκος ανά well είναι 100_μl). Τα κύτταρα επωάζονται για 48 ώρες στους 37°C και έπειτα προστίθενται 50 μl μείγματος ΧΤΤ/reagent (50: 1) κι επωάζονται πάλι για 4 ώρες. Τέλος γίνεται φωτομέτρηση στα 450 nm με μήκος κύματος αναφοράς τα 630 nm, και επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Το επί της εκατό (%) ποσοστό αναστολής στην ανάπτυξη των κυττάρων υπολογίζεται από τον ακόλουθο τύπο:

$$[(OD_{\text{αρνητικού μάρτυρα}} - OD_{\text{δείγματος}}) / OD_{\text{αρνητικού μάρτυρα}}] \times 100$$

Κάθε πείραμα περιλαμβάνει τους ακόλουθους μάρτυρες: ως αρνητικός μάρτυρας για την επιβίωση των κυττάρων χρησιμοποιείται ένα πηγάδι που περιέχει κύτταρα με θρεπτικό υλικό DMEM χωρίς ορό (100 μl), και ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιείται ένα πηγάδι που περιέχει κύτταρα με θρεπτικό υλικό DMEM απουσία ορού και παρουσία ετοποσίδης (100 μl). Επιπλέον κάθε πείραμα περιλαμβάνει ένα πηγάδι στο οποίο η καθαρή ένωση επωάζεται με το μείγμα αντιδραστηρίων ΧΤΤ/reagent, απουσία κυττάρων, ώστε να εκτιμηθεί η απορρόφηση της ένωσης στα εξεταζόμενα μήκη κύματος (450 και 630 nm) (πίνακας 4).

Πίνακας 4: Περιεχόμενο πηγαδιών πειράματος

	Κύτταρα	Ετοποοσίδη	Καθαρή ένωση	DMEM χωρίς ορό
Θετικός μάρτυρας	+	+	-	+
Αρνητικός μάρτυρας	+	-	-	+
Πηγάδια υπό εξέταση	+	-	+	+
Μάρτυρας ελέγχου ενώσεων	-	-	+	+

3. Αποτελέσματα

3.1. Παράμετροι που εξετάζονται για την εύρεση βέλτιστων συνθηκών του πειράματος κυτταρικής επιβίωσης

A. Παρουσία ορού

Ένας παράγοντας που πιθανώς να επηρεάζει το πείραμα είναι η παρουσία ή όχι ορού στο θρεπτικό υλικό. Για το λόγο αυτό τοποθετήθηκε ο κατάλληλος κυτταρικός αριθμός (ενδεικτικά 15.000 κύτταρα HeLa) σε δύο πηγάδια και αρχικά τα κύτταρα επωάστηκαν για 24 ώρες με πλήρες θρεπτικό υλικό (DMEM παρουσία 10% FBS και αντιβιοτικών). Μετά την προσκόλληση των κυττάρων στο ένα πηγάδι προστίθεται νέο πλήρες θρεπτικό υλικό ενώ στο άλλο πηγάδι προστίθεται υλικό με αντιβιοτικά, απουσία ορού. Μετά από επώαση 48 ωρών (χρόνος διάρκειας του πειράματος) δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην ανάπτυξη των κυττάρων ανάμεσα στα δυο πηγάδια με τα διαφορετικά θρεπτικά υλικά. Συνεπώς η απουσία ορού δεν επηρεάζει δραστικά την εξέλιξη του πειράματος και απουσία ορού η ανάπτυξη των κυττάρων θα επηρεάζεται μονάχα από τις προστιθέμενες υπό εξέταση ενώσεις.

B. Χρόνος επώασης κυττάρων με το μείγμα αντιδραστηρίων XTT/reagent

Μια σημαντική παράμετρος που εξετάζεται είναι ο χρόνος επώασης των κυττάρων με το μείγμα αντιδραστηρίων (XTT/electron coupling reagent) που παρέχεται από το Cell Proliferation Kit II. Σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή το αντιδραστήριο επωάζεται με τα κύτταρα για 4-24 ώρες. Πραγματοποιήθηκαν

λοιπόν μετρήσεις μετά από 4 και 24 ώρες επώασης και παρατηρήθηκε μεγαλύτερη συμφωνία στα αποτελέσματα (τιμές απορρόφησης σε 450 nm) μετά από 24 ώρες επώασης με το ΧΤΤ/reagent.

Γ. Χρόνος επώασης κυττάρων με τις υπό εξέταση ενώσεις

Είναι σημαντικό να ελεγχθεί ο χρόνος επώασης των κυττάρων με τις υπό μελέτη ενώσεις, σε θρεπτικό υλικό απουσία ορού. Εξετάστηκαν 24 ώρες και 48 ώρες επώασης και βρέθηκε ότι οι 24 ώρες πιθανώς δεν επαρκούν ώστε να ολοκληρωθεί η κυτταροτοξική δράση των ενώσεων (μικρό ποσοστό κυτταρικού θανάτου), συνεπώς επιλέχθηκαν οι 48 ώρες επώασης των κυττάρων με τις εξεταζόμενες ενώσεις.

Δ. Απορρόφηση ενώσεων απουσία κυττάρων

Μετρήθηκε η απορρόφηση όλων των καθαρών ενώσεων σε συγκέντρωση 500 μM απουσία κυττάρων. Συγκεκριμένα, σε πηγάδια του τρυβλίου 96 θέσεων (96 – well plate) προστέθηκε κάθε ένωση σε συγκέντρωση 500 μM και τελικό όγκο 100 μl παρουσία DMEM και αντιβιοτικών και μετά από επώαση 48 ωρών προστέθηκαν 50 μl ΧΤΤ/reagent και επωάστηκαν για 4 ώρες. Ακολούθησε φωτομέτρηση στα 450 nm και 630 nm και υπολογίστηκε η διαφορά στις απορροφήσεις. ($OD_{450-630}$). Το πείραμα επαναλήφθηκε δύο φορές και οι μέσες τιμές δίνονται στον Πίνακα 5

Πίνακας 5: Απορρόφηση ενώσεων σε συγκέντρωση 500 μM

	LeD3	LeD6	Vf 5a	Vf 7b	Vf 7bb	Vf 12e
OD₄₅₀₋₆₃₀	0,2795	0,269	1,1045	0,287	0,289	0,3535

Επιπλέον η ένωση C2 εξετάστηκε σε μεγαλύτερο εύρος συγκεντρώσεων. Αναλυτικά οι συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν ήταν 100 μM, 200 μM, 300 μM, 350 μM, 400 μM και 500 μM και οι μέσες τιμές των απορροφήσεων σε κάθε συγκέντρωση δίνονται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6: Απορρόφηση ένωσης LeC2 σε διάφορες συγκεντρώσεις

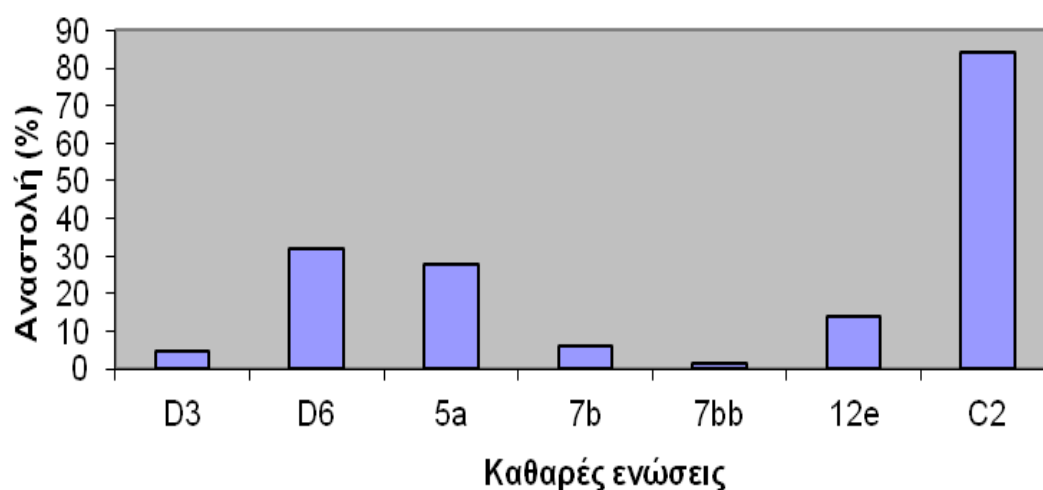
	100 μM	200 μM	300 μM	350 μM	400 μM	500 μM
OD₄₅₀₋₆₃₀	0,188	0,29767	0,375	0,454	0,4705	0,8415

3.2. Επίδραση ενώσεων στην ανάπτυξη κυττάρων HeLa

Αρχικά μελετήθηκε η επίδραση όλων των καθαρών ενώσεων (D3, D6, 5a, 7b, 7bb, 12e, C2) σε κύτταρα HeLa, σε συγκέντρωση 500 μ M. Τα ποσοστά αναστολής της ανάπτυξης των κυττάρων HeLa από τις ενώσεις δίνονται στο Γράφημα 1. .

Βρέθηκε ότι υπήρξε πολύ μικρή αναστολή στην ανάπτυξη των κυττάρων HeLa από τις καθαρές ενώσεις του φυτού *Vicia faba*. Συγκεκριμένα οι ενώσεις 7bb, 7b, 12e και 5a εμφάνισαν αναστολή σε ποσοστά 1.2, 6.25, 14 και 27.5 % αντίστοιχα. Η μεγαλύτερη αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης παρουσιάστηκε από τις ενώσεις του φυτού *Lotus edulis*. Αναλυτικά οι ενώσεις D3, D6 και C2 εμφάνισαν 4.85, 32 και 84% αντίστοιχα.

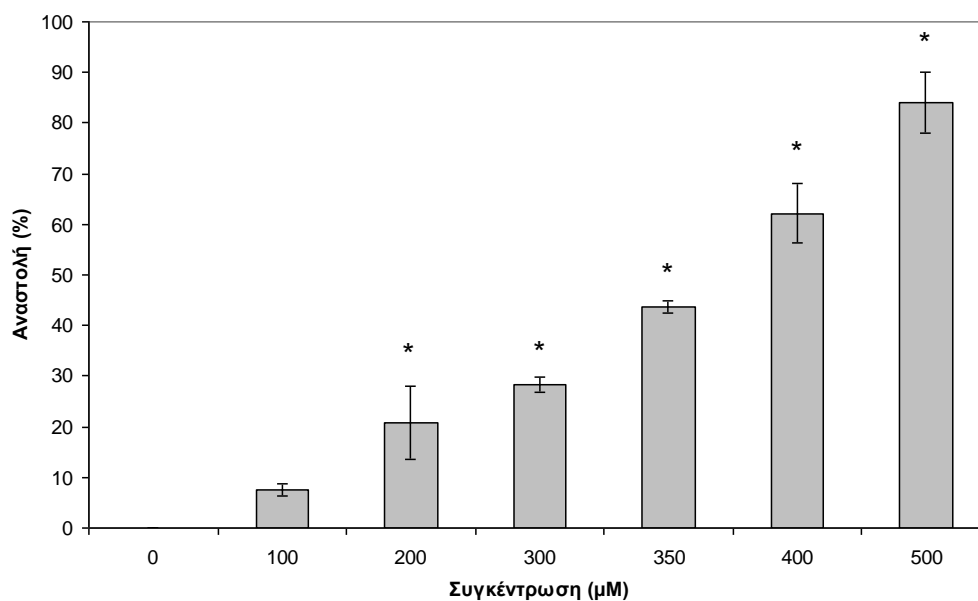
Γράφημα 1: Αναστολή της ανάπτυξης κυττάρων HeLa από τις ενώσεις σε συγκέντρωση 500 μ M.



Είναι εμφανές ότι η ισχυρότερη αναστολή στην ανάπτυξη των κυττάρων HeLa προήλθε από την δράση της ένωσης C2 (ποσοστό αναστολής 84% σε συγκέντρωση 500 μ M). Για τον λόγο αυτό κρίθηκε σημαντική η περαιτέρω μελέτη της ένωσης αυτής στην κυτταρική ανάπτυξη χρησιμοποιώντας μεγαλύτερο εύρος συγκεντρώσεων. Ενδεικτικά κύτταρα HeLa επωάστηκαν με 100, 200, 300, 350, 400 και 500 μ M της ένωσης C2 και το ποσοστό αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης υπολογίσθηκε σε

7.5, 20.75, 28.3, 43.6, 62.2 και 84 % αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα που δίνονται στο Γράφημα 2 αποτελούν την μέση τιμή τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

Γράφημα 2: Αναστολή της ανάπτυξης κυττάρων HeLa από τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις της ένωσης C2.



Με βάση τα ποσοστά αναστολής προσδιορίζεται η τιμή IC_{50} , που αντιστοιχεί στην συγκέντρωση της ένωσης με την οποία πετυχαίνεται 50% αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης. Η τιμή IC_{50} για τα κύτταρα HeLa είναι 350 μ M.

3.3. Επίδραση ενώσεων στην ανάπτυξη κυττάρων HepG2

Ομοίως με τα κύτταρα HeLa, εφαρμόζουμε όλες τις καθαρές ενώσεις (D3, D6, 5a, 7b, 7bb, 12e, C2) σε κύτταρα HepG2, σε συγκέντρωση 500 μ M. Τα ποσοστά αναστολής της ανάπτυξης των κυττάρων HepG2 από τις ενώσεις δίνονται στο Γράφημα 3.

Βρέθηκε ότι υπήρξε πολύ μικρή αναστολή στην ανάπτυξη των κυττάρων HepG2 από τις καθαρές ενώσεις του φυτού *Vicia faba*. Συγκεκριμένα οι ενώσεις 7bb, 7b, 12e και 5a εμφάνισαν αναστολή σε ποσοστά 1, 1, 19,9 και 11,8 % αντίστοιχα. Η μεγαλύτερη αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης παρουσιάστηκε από τις ενώσεις του

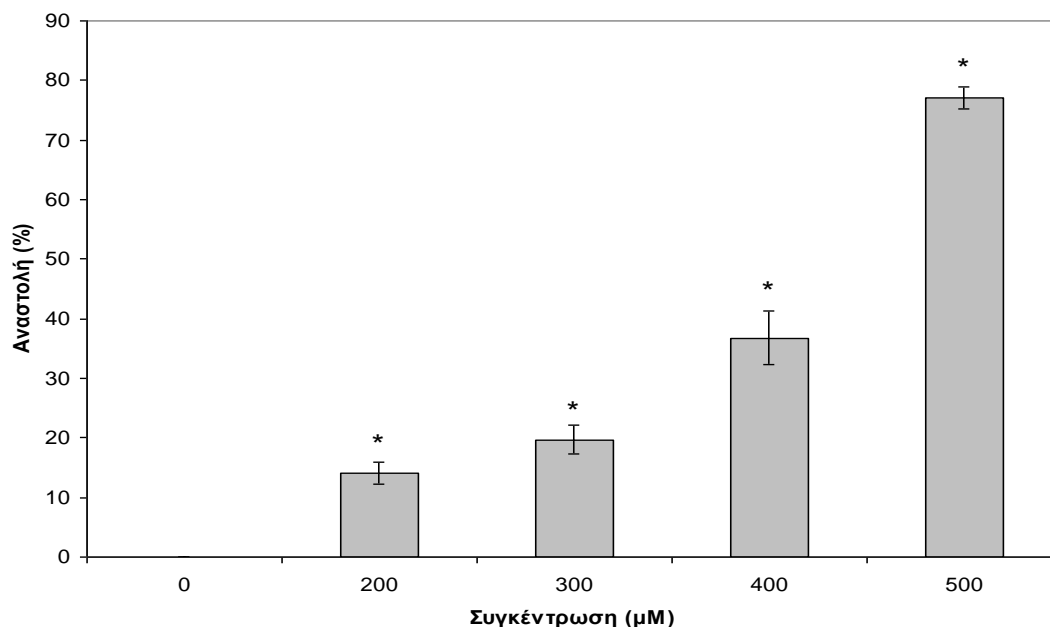
φυτού *Lotus edulis*. Αναλυτικά οι ενώσεις D3, D6 και C2 εμφάνισαν 3,7, 22 και 77,09% αντίστοιχα.

Γράφημα 3: Αναστολή της ανάπτυξης κυττάρων HepG2 από τις ενώσεις σε συγκέντρωση 500 μM



Είναι εμφανές ότι η ισχυρότερη αναστολή στην ανάπτυξη των κυττάρων HepG2 προήλθε από την δράση της ένωσης C2 (ποσοστό αναστολής 77,09% σε συγκέντρωση 500 μM). Για τον λόγο αυτό μελετήθηκε περαιτέρω η ένωση αυτή στην κυτταρική ανάπτυξη χρησιμοποιώντας μεγαλύτερο εύρος συγκεντρώσεων. Ενδεικτικά κύτταρα HepG2 επωάστηκαν με 200, 300, 400 και 500 μM της ένωσης C2 και το ποσοστό αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης υπολογίσθηκε σε 14.07, 19.67, 36.79, και 77,09 % αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα που δίνονται στο Γράφημα 4 αποτελούν την μέση τιμή τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

Γράφημα 4: Αναστολή της ανάπτυξης κυττάρων HepG2 από τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις της ένωσης C2



Με βάση τα ποσοστά αναστολής προσδιορίζεται η τιμή IC_{50} , που για τα κύτταρα HepG2 είναι 410 μ M.

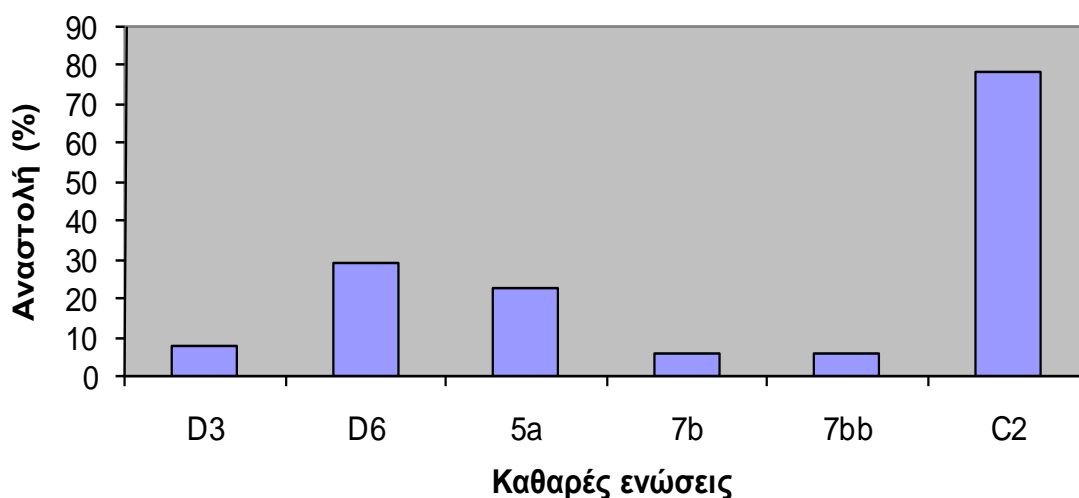
3.4. Επίδραση καθαρών ενώσεων σε κύτταρα MCF-7

Όμοια με πριν, εφαρμόζουμε όλες τις καθарές ενώσεις (D3, D6, 5a, 7b, 7bb, C2) σε κύτταρα MCF-7, σε συγκέντρωση 500 μ M. Δυστυχώς η ποσότητα της διαθέσιμης ένωσης 12e είχε εξαντληθεί, κι έτσι δεν μπόρεσε να εφαρμοστεί στα συγκεκριμένα κύτταρα. Τα ποσοστά αναστολής της ανάπτυξης των κυττάρων MCF-7 από τις ενώσεις δίνονται στο Γράφημα 5. .

Βρέθηκε ότι υπήρξε πολύ μικρή αναστολή στην ανάπτυξη των κυττάρων MCF-7 από τις καθарές ενώσεις του φυτού *Vicia faba*. Συγκεκριμένα οι ενώσεις 7bb, 7b και 5a εμφάνισαν αναστολή σε ποσοστά 5.7519058, 5.530146 και 22.89674 % αντίστοιχα. Η μεγαλύτερη αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης παρουσιάστηκε από

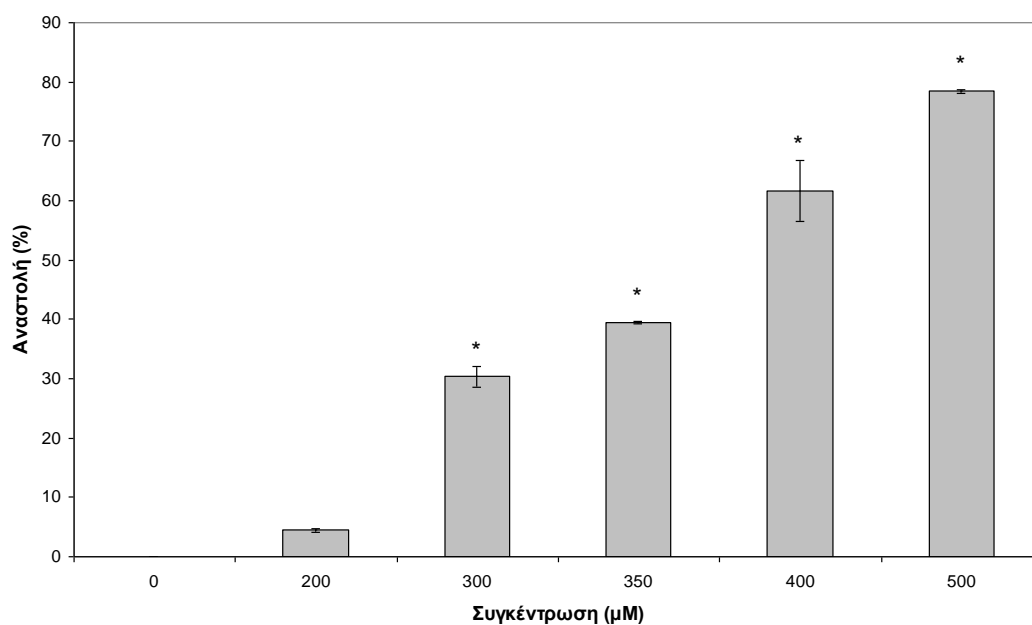
τις ενώσεις του φυτού *Lotus edulis*. Αναλυτικά οι ενώσεις D3, D6 και C2 εμφάνισαν 7.87248787, 28.9536 και 78.45% αντίστοιχα.

Γράφημα 5: Αναστολή της ανάπτυξης κυττάρων MCF-7 από τις ενώσεις σε συγκέντρωση 500 μM



Η ισχυρότερη αναστολή στην ανάπτυξη των κυττάρων MCF-7 προήλθε από την δράση της ένωσης C2 (ποσοστό αναστολής 78,45% σε συγκέντρωση 500 μM) και για το λόγο αυτό μελετήθηκε περαιτέρω η ένωση αυτή στην κυτταρική ανάπτυξη χρησιμοποιώντας μεγαλύτερο εύρος συγκεντρώσεων. Ενδεικτικά κύτταρα MCF-7 επώαστηκαν με 200, 300, 350, 400 και 500 μM της ένωσης C2 και το ποσοστό αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης υπολογίσθηκε σε 4.43, 3.36, 39.4, 61.6 και 78,45 % αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα που δίνονται στο Γράφημα 6 αποτελούν τη μέση τιμή τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων

Γράφημα 6: Αναστολή της ανάπτυξης κυττάρων MCF-7 από τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις της ένωσης C2



Με βάση τα ποσοστά αναστολής προσδιορίζεται η τιμή IC_{50} , που για τα κύτταρα MCF-7 είναι 350 μM.

4. Συζήτηση

Τα ψυχανθή αποτελούν μια από τις πολυπληθέστερες ομάδες των δικοτυλήδονων φυτών και ανήκουν στην οικογένεια *Leguminosae*. Οι καρποί των ψυχανθών, τα όσπρια, αποτελούν σημαντικό συστατικό της Μεσογειακής διατροφής, καθώς περιέχουν μια πληθώρα θρεπτικών συστατικών, όπως για παράδειγμα ανόργανα στοιχεία όπως Ca, Fe, K, Mg, Zn, ιχνοστοιχεία, φυτικές ίνες και ποικίλες φυτοχημικές ουσίες (Madar et al., 2002). Εκτός από τα προαναφερθέντα συστατικά τα ψυχανθή είναι πλούσια και σε πολυφαινόλες.

Οι πολυφαινόλες συναντώνται κυρίως στο κυτταρικό τοίχωμα και αποτελούν ενώσεις με ευεγερτικές επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία. Κατηγοριοποιούνται σε φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή, σιλβένια και λιγνάνες (Nichenametla et al., 2006). Εκτός από τα όσπρια, τροφές πλούσιες σε πολυφαινόλες είναι τα φρούτα, τα λαχανικά, το κρασί, το τσάι, ο καφές, το κακάο, τα δημητριακά και το ελαιόλαδο (Scalbert et al., 2005). Οι πολυφαινόλες εμφανίζουν σπουδαία αντιοξειδωτική δράση, η οποία αποδίδεται στην ικανότητά τους να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες και να ενεργοποιούν ένζυμα με αντιοξειδωτική λειτουργία (Heim et al., 2002). Επιπλέον, οι πολυφαινόλες είναι γνωστές για την χημειοπροστατευτική τους δράση έναντι διάφορων τύπων καρκίνων (Dragsted et al., 2003). Η ικανότητα των πολυφαινολών να δρουν ως χημειοπροστατευτικοί παράγοντες έχει αποδοθεί, μεταξύ άλλων, και στη δυνατότητα αναστολής της δράσης των τοποϊσομερασών, λειτουργώντας είτε ως καταλυτικοί αναστολείς είτε ως καταστολείς-δηλητήρια (poisons) των ενζύμων σε καρκινικά κύτταρα-στόχους (Chowdhury et al., 2002).

Προηγούμενες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ανέδειξαν πολυφαινολικές ενώσεις που προέρχονται από ψυχανθή ως καταλυτικούς αναστολείς των ευκαρυωτικών τοποϊσομερασών. Οι εργασίες αυτές βασίστηκαν σε *in vitro* πείραμα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν καθαρά ένζυμα (τοποϊσομεράση I του σίτου, ανθρώπινη τοποϊσομεράση I και ανθρώπινη τοποϊσομεράση II) έχοντας ως υπόστρωμα υπερελικωμένο πλασμιδιακό DNA. Είναι όμως σημαντικό να διερευνηθεί αν η αναστολή που επιτυγχάνεται σε ένα *in vitro* σύστημα ισχύει και σε ένα σύστημα κυττάρων σε καλλιέργεια. Στην παρούσα εργασία ερευνήθηκε η επίδραση πολυφαινολικών ενώσεων που προέρχονται από ψυχανθή σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα και συγκεκριμένα σε κύτταρα τραχήλου της μήτρας (HeLa), σε ηπατικό καρκίνωμα (HepG2) και σε καρκινικά μαστικά κύτταρα (MCF-7). Συνολικά μελετήθηκαν 7 καθαρές ενώσεις από τις οποίες οι 4 απομονώθηκαν από μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού *Vicia faba* (5a, 7b, 7bb, 12e)

και οι 3 απομονώθηκαν από μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού *Lotus edulis* (D3, D6, C2). Οι ενώσεις αυτές ανήκουν στις πολυφαινόλες και στην πλειοψηφία τους αποτελούν γλυκοσίδια της φλαβονόλης κερμπερόλης, εκτός από μία ένωση που είναι γλυκοσίδιο της κερκετίνης (5a) και μία ένωση που δεν ανήκει στα φλαβονοειδή (7b). Ως τώρα πάνω από 200 γλυκοσίδια κερμπερόλης έχουν εντοπιστεί σε ποικίλες φυτικές πηγές (Crozier et al, 2009).

Αρχικά οι πολυφαινολικές ενώσεις επωάστηκαν με τις ανθρώπινες καρκινικές σειρές HeLa, HepG2 και MCF-7 σε μια ενδεικτική υψηλή συγκέντρωση (500 μ M) για να αναδειχθεί η ικανότητα αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης. Όλες οι ενώσεις (εκτός από την C2) εμφάνισαν χαμηλά ποσοστά αναστολής που κυμαίνονταν από 4,5% έως 32% για τα κύτταρα HeLa, 1% έως 19,9% για τα κύτταρα HepG2 και 5,5% έως 28,9% για τα κύτταρα MCF-7. Τα αποτελέσματα αυτά, δηλαδή η μικρή αναστολή στην κυτταρική ανάπτυξη, συμφωνούν με τα αποτελέσματα προηγούμενων εργασιών, στις οποίες δείχθηκε ότι οι ενώσεις 5a, 7b, 7bb, 12e, D3, D6 δεν ήταν ιδιαίτερα δραστικές στην αναστολή των ευκαρυωτικών τοποϊσομερασών.

Αντίθετα, η ένωση C2 εμφάνισε πολύ υψηλά ποσοστά αναστολής. Σε συγκέντρωση 500 μ M παρουσίασε αναστολή σε ποσοστό 84% για τα κύτταρα HeLa, 77,09% για τα κύτταρα HepG2 και 78,45% για τα κύτταρα MCF-7. Η ένωση C2 μελετήθηκε σε μεγαλύτερο εύρος συγκεντρώσεων με σκοπό τον υπολογισμό της τιμής IC_{50} για την κάθε κυτταρική σειρά. Βρέθηκε ότι η συγκέντρωση της ένωσης C2 στην οποία επιτυγχάνεται το 50% της αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης (IC_{50}) είναι 350 μ M για τα κύτταρα HeLa και MCF-7 και 410 μ M για τα κύτταρα HepG2. Τα αποτελέσματα συνάδουν με αυτά των προηγούμενων εργασιών, στις οποίες δείχθηκε ότι η ένωση C2 αποτελεί τον ισχυρότερο αναστολέα όλων των ευκαρυωτικών τοποϊσομερασών.

Είναι σημαντικό να αναφερθεί το γεγονός ότι οι συγκεντρώσεις της ένωσης C2 που χρειάζονται για την αναστολή των τοποϊσομερασών (IC_{50} :120-240 μ M) είναι πολύ μικρότερες από αυτές που χρειάζονται για την αναστολή της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων (IC_{50} :350-410 μ M). Αυτή η παρατήρηση ήταν αναμενόμενη γιατί ένα σύστημα κυττάρων είναι λιγότερο εύκολα διαθέσιμο σε σύγκριση με ένα *in vitro* πλασμιδιακό σύστημα. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συμφωνούν και με άλλες μελέτες στις οποίες έχει αναδειχθεί η κυτταροτοξική δράση γλυκοσιδίων κερμπερόλης που προέρχονται από διάφορες φυτικές πηγές ενάντια σε καρκινικές κυτταρικές σειρές (Moon et al., 2010; Yang et al., 2010. ; Ibrahim et al., 2008.; Li et al., 2007.)

Όπως προαναφέρθηκε η ένωση 5a αποτελεί γλυκοσίδιο της κερκετίνης, η ένωση 7b είναι ιονόλη, ενώ οι υπόλοιπες ενώσεις που μελετήθηκαν είναι όλες

γλυκοσίδια της κεμπφερόλης. Από αυτές η ένωση C2 διαφέρει από την ένωση D6 ως προς μια ακετυλομάδα και από τις ενώσεις D3, 7bb και 12e ως προς το σάκχαρο που είναι συνδεδεμένο στην υδροξυλομάδα στη θέση του άνθρακα 3. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η ένωση C2 εμφανίζει ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα (εξουδετέρωση της ελεύθερης ρίζας DPPH[·]), καθώς και προστατευτική δράση ενάντια σε μονόκλιωνα σπασίματα που προκαλούνται στο DNA από ελεύθερες ρίζες (OH[·] και ROO[·]). Επιπλέον, διαθέτει και ισχυρή αντιμεταλλαξιγόνο δράση, η οποία ταυτοποιήθηκε με αναστολή της μεταλλαξιγένεσης που επάγεται από μπλεομυκίνη σε βακτηριακά στελέχη *Salmonella typhimurium* (Spanou et al., 2008). Φαίνεται ότι τα δομικά χαρακτηριστικά που φέρει η ένωση C2 και συγκεκριμένα η παρουσία της ακετυλομάδας είναι υπεύθυνα για τις προαναφερθείσες ιδιότητες και την καθιστούν σημαντικό αντικαρκινικό παράγοντα.

Οι μελλοντικές προοπτικές της παρούσας εργασίας θα εστιαστούν στην διερεύνηση των μοριακών μηχανισμών μέσω των οποίων επιτυγχάνεται η υψηλή αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης από την ένωση C2, καθώς και πιθανοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας των καρκινικών κυττάρων.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Morse MA, Stoner GC: Cancer chemoprevention: principles and prospects. (1993) *Carcinogenesis*, 14:1737-1746
- Kelloff GJ, Boone CW, Steele VE, Crowell JA, Lubet R, Sigman CC: Progress in cancer chemoprevention: perspectives on agent selection and short term clinical intervention trials (1994) *Cancer Res*, 54: 2015-2024
- Greenwald P, Kelloff G, Burch Whitman C, Kramer BS: Chemoprevention (1995) *CA Cancer J Clin*, 45: 31-49
- ACS. Cancer Facts and Figures, 1995. Atlanta, GA: American Cancer Society, 1-3
- Wattenberg LW: Chemoprevention of cancer (1985) *Cancer Res*, 45: 1-8
- Mirvish SS: Ascorbic acid inhibition of N-nitroso compound formation in chemical, food and biological systems. In: *Inhibition of Tumor Induction and Development* (Zedeck MS, Lipkin M, eds). New York:Plenum, 1981: 101-126
- Hartman PE, Shankel DM: Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules (1990) *Environ Mol Mutagen*, 15: 145-182
- Kuenzig W, Chau J, Norkus E, Holowaschenko H, Newmark H, Mergens W, Conney AH: Caffeic acid and ferulic acid as blockers of nitrosamine formation (1984) *Carcinogenesis*, 5: 309-314
- Shenoy NR, Choughuley ASU: Inhibitory effect of diet related sulfhydryl compounds on the formation of carcinogenic nitrosamines (1992) *Cancer Lett*, 65: 227-232
- Miller EC, Miller JA: Some historical perspectives on the metabolism of xenobiotic chemicals to reactive electrophils. In: *Bioactivation of foreign Compounds* (Anders MW, ed). New York: Academic Press, 1985: 1-28
- Conney AH: Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons: GHA Clowes Memorial Lecture (1982) *Cancer Res*, 42: 4875-4917
- Morse MA, Eklind KI, Hecht SS, Jordan KG, Choi C-I, Desai DH, Amin SG, Chung F-L: Structure activity relationships for inhibition of 4-methylnitrosamino-1-3(pyridyl)-1-dutanone (NNK) lung tumorigenesis by arylalkyl isothiocyanates in A/J mice (1991) *Cancer Res*, 51: 1846-1850
- Stoner GD, Siglin JC, Morse MA, Desai DH, Amin SG, Kresty LA, Toburen AL, Heffner EM, Francis DJ: Enhancement of esophageal carcinogenesis in male F344 rats by dietary phenyl hexyl isothiocyanate (1995) *Carcinogenesis*, 16: 2473-2476
- Wattenberg LW, Loub WD: Inhibition of polycyclic aromatic hydrocarbon-induced neoplasia by naturally occurring indoles (1978) *Cancer Res*, 38: 1410-1413
- Tanaka T, Mori Y, Morishita Y, Hara A, Ohno T, Kojima T, Mori H: Inhibitory effect of sinigrin and indole-3-carbinol on diethylnitrosamine induced hepatocarcinogenesis in male ACI/N rats (1990) *Carcinogenesis*, 10: 175-181
- Pence BC, Buddingh F, Yang SP: Multiple dietary factors in the enhancement of dimethylhydrazine carcinogenesis: main effect of indole-3-carbinol (1986) *J Natl Cancer Inst*, 77: 269-276
- Bailey GS, Hendricks JD, Shelton DW, Nixon JE, Pawlowski NE: Enhancement of carcinogenesis by the natural anticarcinogen indole-3-carbinol (1987) *J Natl Cancer Inst* , 78: 931-934
- Zhang Y, Talalay P, Cho C-G, Posner GH: A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure (1992) *Proc Natl Acad Sci USA*, 89: 2399-2403
- Zhang Y, Kensler TW, Cho C-G, Posner GH, Talalay P: Anticarcinogenic activities of sulforaphane and structurally related synthetic norbonyl isothiocyanates (1994) *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 3147-3150
- Roebuck BD, Liu Y-L, Rogers AE, Groopman JD, Kensler TW: Protection against aflatoxin B1 induced hepatocarcinogenesis in F344 rats by 5-(2-pyrazinyl)-4-methyl-1,2-dithiol-3-thione (oltipraz): predictive role of molecular dosimetry (1991) *Cancer Res*, 51: 5501-5506
- Sayer JM, Yagi H, Wood AW, Conney AH, Jerina DM: Extremely facile reaction between the ultimate carcinogen benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10epoxide and ellagic acid (1982) *J Am Chem Soc*, 104: 5562-5564
- Packer JE, Mahood JS, Mora-Arellano VO, Slater TF, Wilson RL, Wolfenden BS: Free radicals and singlet oxygen scavengers: reaction of a peroxy radical with beta-carotene,

- diphenyl furan and 1,4-diazobicyclo (2,2,2)-octane (1981) *Biochem Biophys Res Commun*, 98: 901-906
- Kensler TW, Trush MA, Guyton KZ: Free radicals as targets for cancer chemoprevention: prospects and problems. In *Cellular and Molecular Targets for Chemoprevention* (Steele VH, Stoner GD, Boone CW, Kelloff GJ, eds). Boca Raton, FL: CRC Press, 1992:173-191
 - Imanishi H, Sakaki YF, Matsumoto K, Watanabe M, Ohta T, Shirasu Y, Tutikawa K: Suppression of 6-TG-resistant mutations in V79 cells and recessive spot formations in mice by vanillin (1990) *Mutat Res*, 243: 151-158
 - Farzaneh F, Panayotou GN, Bowler LD, Hardas BD, Broom T, Walther C, Shall S: ADP-ribosylation is involved in the integration of foreign DNA into the mammalian cell genome (1988) *Nucleic Acid Res*, 16: 1319-1326
 - Cesarone CF, Scovassi AI, Scarabelli L, Izzo R, Orunesu M, Bertazzoni U: Depletion of adenosine diphosphate-ribosyl transferase activity in rat liver during exposure to N-2-acetylaminofluorene: effect of thiols (1988) *Cancer Res*, 48: 3581-3585
 - Meyn SM, Rossman T, Troll WA: A protease inhibitor blocks SOS functions in *Escherichia Coli*: Antipain prevents lambda repressor inactivation, ultraviolet mutagenesis and filamentous growth (1977) *Proc Natl Acad Sci USA*, 74: 1152-1156
 - De Flora S, Ramel C: Classification of mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis (1990) *Basic Life Sci*, 52: 461-462
 - Kelloff GJ, Boone CW, Steele VE, Fay JR, Lubet RA, Crowell JA, Sigman CC: Mechanistic considerations in chemopreventive drug development (1994) *J Cell Biochem (Suppl)* 20: 1024
 - Pegg AE: Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and as a target for chemotherapy (1988) *Cancer Res*, 48: 759-774
 - Slaga TJ: Overview of tumor promotion in animals (1983) *Environ Health Perspect*, 50: 3-14
 - Thompson HJ, Ronan AM: Inhibition of 1-methyl-1-nitrosourea induced mammary tumorigenesis by α -difluoromethylornithine and retinyl acetate (1983) *Proc Am Assoc Cancer Res*, 24: 86
 - Whitfield JF: Calcium: driver of cell cycles, trigger of differentiation, and killer of cells. In *Cellular and Molecular Targets for Chemoprevention* (Steele VE, Stoner GD, Boone CW, Kelloff GJ, eds). Boca Raton, FL: CRC Press, 1992: 257-311
 - Kelloff GJ, Boone CW, Steele VE, Ray JR, Sigman CC: Inhibition of chemical carcinogenesis. In *Chemical induction of Cancer: Modulation and Combination Effects* (Arcos J, Argus M, Woo Y, eds) Boston: Birkhauser Boston, 1997
 - Roberts AB, Sporn MB: Transforming growth factor β (1988) *Adv Cancer Res*, 51: 107-145
 - Jordan VC: The strategic use of antiestrogens to control the development and growth of breast cancer (1992) *Cancer*, 70: 977-982
 - Elson CE, Maltzman TH, Boston JL, Tanner MA, Gould MN: Anti-carcinogenic activity of D-limonene during the initiation and promotion/progression stages of DMBA induced rat mammalian carcinogenesis (1988) *Carcinogenesis*, 9: 331-332
 - Lowenstein WR: Junctional intercellular communication and the control of growth (1979) *Biochem Biophys Acta*, 560: 1-65
 - Zhang L-X, Cooney RV, Bertram JS: Carotenoids enhance gap junctional communication and inhibit lipid peroxidation in C3H/10T1/2 cells (1991) *Carcinogenesis*, 12: 2109-2114
 - Hill DL, Grubbs CJ: Retinoids and cancer prevention (1992) *Annu Rev Nutr*, 12: 161-181
 - Oren M: The involvement of oncogenes and tumor suppressor genes in the control of apoptosis (1992) *Cancer Metastasis Rev*, 11: 141-148
 - Bursch W, Oberhammer F, Schulte-Hermann R: Cell death by apoptosis and its protective role against disease (1992) *Trends Pharmacol Sci*, 13: 245-251
 - Labayle D, Fischer D, Vielh P, Drouhin F, Pariente A, Bories C, Duhamel O, Troussset M, Attali P: Sulindac causes regression of rectal polyps in familial adenomatous polyposis (1991) *Gastroenterology*, 101: 635-639
 - Wainfain E, Poirier A: Methyl groups in carcinogenesis: effects of DNA methylation and gene expression (1992) *Cancer Res*, 52: 2071-2077
 - Wainfain E, Dizik M: Suppression by methionine and choline of onco-fetal patterns of liver t-RNA methyltransferase activities in carcinogen treated rats (1987) *Carcinogenesis*, 8: 615-617
 - Troll W, Kennedy AR: Protease inhibitors as cancer chemopreventive agents (1988) *Cancer Res*, 49: 499-502

- Reddy BS, Maruyama H, Kelloff G: Dose related inhibition of colon carcinogenesis by dietary piroxicam, a non steroidal antiinflammatory drug, during different stages of rat colon tumor development (1987) *Cancer Res*, 47: 5340-5346
- Huang M-T, Lysz T, Ferraro T, Abidi TF, Laskin JD, Conney AH: Inhibitory effects of curcumin on in vitro lipoxygenase and cyclooxygenase activities in mouse epidermis (1991) *Cancer Res*, 51: 813-819
- Lampe JW., Isoflavonoid and lignan phytoestrogens as dietary biomarkers., *J Nutr.* 2003;133 Suppl 3:956S-964S
- Wang LQ, Mammalian phytoestrogens: enterodiol and enterolactone, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2002;777(1-2):289-309
- Brooks JD, Thompson LU. Mammalian lignans and genistein decrease the activities of aromatase and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase in MCF-7 cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2005;94(5):461-467
- Rowland I, Faughnan M, Hoey L, Wahala K, Williamson G, Cassidy A. Bioavailability of phyto-oestrogens. *Br J Nutr.* 2003;89 Suppl 1:S45-58.
- Horn-Ross PL, Hoggatt KJ, West DW, et al. Recent diet and breast cancer risk: the California Teachers Study (USA). *Cancer Causes Control.* 2002;13(5):407-415.
- Keinan-Boker L, van Der Schouw YT, Grobbee DE, Peeters PH. Dietary phytoestrogens and breast cancer risk. *Am J Clin Nutr.* 2004;79(2):282-288
- Touillaud MS, Thiebaut AC, Niravong M, Boutron-Ruault MC, Clavel-Chapelon F. No association between dietary phytoestrogens and risk of premenopausal breast cancer in a French cohort study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15(12):2574-2576
- Touillaud MS, Thiebaut AC, Fournier A, Niravong M, Boutron-Ruault MC, Clavel-Chapelon F. Dietary lignan intake and postmenopausal breast cancer risk by estrogen and progesterone receptor status. *J Natl Cancer Inst.* 2007;99(6):475-486.

- Velentzis LS, Cantwell MM, Cardwell C, Keshtgar MR, Leathem AJ, Woodside JV. Lignans and breast cancer risk in pre- and post-menopausal women: meta-analyses of observational studies. *Br J Cancer.* 2009;100(9):1492-1498
- Horn-Ross PL, John EM, Canchola AJ, Stewart SL, Lee MM. Phytoestrogen intake and endometrial cancer risk. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95(15):1158-1164
- McCann SE, Freudenheim JL, Marshall JR, Graham S. Risk of human ovarian cancer is related to dietary intake of selected nutrients, phytochemicals and food groups. *J Nutr.* 2003;133(6):1937-1942.
- Tsutsui H, Mitochondrial oxidative stress and heart failure, *Intern Med* (2006) 45: 809-13.
- Fridovich I, Superoxide dismutases, *Annu Rev Biochem.* 1975;44:147-59.

- Fridovich I., Superoxide dismutases: defence against endogenous superoxide radical, *Ciba Found Symp.* 1978;(65):77-93.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., and Stryer, L. (2002) *Biochemistry*, 5th Ed., pp. 205-206, W. H. Freeman and Co., New York
- Giordano FJ., Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure., *J Clin Invest.* 2005 ;115(3):500-8.
- Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T, Role of oxidative stress in cardiovascular diseases ,*J Hypertens.* 2000;18(6):655-73.
- Duthie GG, Duthie SJ, Kyle JA. Plant polyphenols in cancer and heart disease : implications as nutritional antioxidants. *Nutr. Res. Rev.* 2000;13.
- Morton LW, Caccetta RA, Puddey IB, Croft KD. Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds. *Clin. Exp. Pharmac. and Physiol.* 2000;27:152.
- Mulholland PJ, Ferry DR, Anderson D, Hussain SA, Young AM, Cook JE, Hodgkin E, Seymour LW, Kerr DJ., Pre-clinical and clinical study of QC12, a water-soluble, pro-drug of quercetin., *Ann Oncol.* 2001;12(2):245-8.
- Aggarwal BB, Bhardwaj A, Aggarwal RS, Seeram NP, Shishodia S, Takada Y. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res.* 2004;24(5A):2783-2840
- Walle T, Hsieh F, DeLegge MH, Oatis JE, Jr., Walle UK. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab Dispos.* 2004;32(12):1377-1382

- Wenzel E, Somoza V. Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. *Mol Nutr Food Res.* 2005;49(5):472-481
- Burns J, Yokota T, Ashihara H, Lean ME, Crozier A. Plant foods and herbal sources of resveratrol. *J Agric Food Chem.* 2002;50(11):3337-3340.
- Rimando AM, Kalt W, Magee JB, Dewey J, Ballington JR. Resveratrol, pterostilbene, and piceatannol in vaccinium berries. *J Agric Food Chem.* 2004;52(15):4713-4719.
- Sanders TH, McMichael RW, Jr., Hendrix KW. Occurrence of resveratrol in edible peanuts. *J Agric Food Chem.* 2000;48(4):1243-1246.
- M. L. Rothenberg, Topoisomerase I inhibitors: Review and update, *Annals of Oncology* 8: 837-855, 1997
- Kragh Larsen, Involvement of DNA topoisomerases and DNA topoisomerase inhibitors in the induction of leukemia cell differentiation, *Annals of Oncology* 5: 679-688, 1994
- J. Cummings & J. F. Smyth, DNA topoisomerase I and II as targets for rational design of new anticancer drugs, *Annals of Oncology* 4: 533-543, 1993
- Madar Z., Stark A., (2002), New legume sources as therapeutic agents, *British Journal of Nutrition*, 88:287-292
- Nichenametla SN, Taruscio TG, Barney DL, Exon JH A review of the effects and mechanisms of polyphenolics in cancer., *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2006;46(2):161-83. Review
- Scalbert A., Manach C., Morand C., Remesy C., (2005), Dietary polyphenols and the prevention of diseases, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45:287-306
- Heim K. E., Tagliaferro A. R., Bobilya D.J, (2002), Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13:572-584
- Dragsted LO., Antioxidant actions of polyphenols in humans., *Int J Vitam Nutr Res.* 2003 Mar;73(2):112-9. Review.
- Chowdhury A. R., Sharma S., Mandal S., Goswami A., Mukhopadhyay S., Majumder H. K., (2002), Luteolin, an emerging anti-cancer flavonoid, poisons eukaryotic DNA topoisomerase I, *Biochemical Society*, 366: 653-661
- Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN., Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health., *Nat Prod Rep.* 2009 ;26(8):1001-43
- Moon SS, Rahman MA, Manir MM, Jamal Ahamed VS., Kaempferol glycosides and cardenolide glycosides, cytotoxic constituents from the seeds of *Draba nemorosa* (Brassicaceae), *Arch Pharm Res.* 2010;33(8):1169-73.
- Yang JH, Kondratyuk TP, Marler LE, Qiu X, Choi Y, Cao H, Yu R, Sturdy M, Pegan S, Liu Y, Wang LQ, Mesecar AD, Van Breemen RB, Pezzuto JM, Fong HH, Chen YG, Zhang HJ., Isolation and evaluation of kaempferol glycosides from the fern *Neocheiropteris palmatopedata*, *Phytochemistry.* 2010;71(5-6):641-7
- Ibrahim LF, Kawashty SA, El-Hagrassy AM, Nassar MI, Mabry TJ., A new kaempferol triglycoside from *Fagonia taekholmiana*: cytotoxic activity of its extracts, *Carbohydr Res.* 2008;343(1):155-8..
- Li YL, Gan GP, Zhang HZ, Wu HZ, Li CL, Huang YP, Liu YW, Liu JW (2007), A flavonoid glycoside isolated from *Smilax china* L rhizome in vitro anticancer effects on human cancer cell lines. *J. Ethnopharmacol.*, 113: 115–124.
- Spanou C., Bourou G., Dervishi A., Aligiannis N., Angelis N., Komiotis D., Skaltsounis A. L., Kouretas D., (2008), Antioxidant and chemoprotective properties of polyphenolic compounds derived from Greek legume plant extracts, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 6967-6976
- Block G, Patterson B, Subar A, Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence, *Nutr Cancer.* 1992;18(1):1-29.
- Djuric Z, Depper JB, Uhley V, Smith D, Lababidi S, Martino S, Heilbrun LK, Oxidative DNA damage levels in blood from women at high risk for breast cancer are associated with dietary intakes of meats, vegetables, and fruits, *J Am Diet Assoc.* 1998;98(5):524-8.
- Kumpulainen, J.T., and Salonen, J.T., *Natural Antioxidants and Anticarcinogens in Nutrition, Health and disease*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1998

- Macheix, J.J., Fleuriet, A., and Billot, J. , Fruit Phenolics, CRC Press: Boca Raton, FL, 1990
- Rajan P, Vedernikova I, Cos P, Berghe DV, Augustyns K, Haemers A., Synthesis and evaluation of caffeic acid amides as antioxidants, *Bioorg Med Chem Lett*. 2001;11(2):215-7
- Rapta P, Misík V, Stasko A, Vrábek I., Redox intermediates of flavonoids and caffeic acid esters from propolis: an EPR spectroscopy and cyclic voltammetry study, *Free Radic Biol Med*. 1995;18(5):901-8.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G., Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids., *Free Radic Biol Med*. 1996;20(7):933-56. Erratum in: *Free Radic Biol Med* 1996;21(3):417.
- Agullo G, Gamet-Payraastre L, Manenti S, Viala C, Rémésy C, Chap H, Payraastre B., Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase: a comparison with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition., *Biochem Pharmacol*. 1997;53(11):1649-57.
- Strack, D., Phenolic metabolism, *Plant Biochemistry* 1997; pp. 387-416
- Ferreira, D., and Bekker, R. , *Natural Product reports* 1996; pp. 411-413
- Hemingway, R., *Chemistry and significance of condensed tannins* 1989; pp. 83-107
- Shigeoka Y, Igishi T, Matsumoto S, Nakanishi H, Kodani M, Yasuda K, Hitsuda Y, Shimizu E., Sulindac sulfide and caffeic acid phenethyl ester suppress the motility of lung adenocarcinoma cells promoted by transforming growth factor-beta through Akt inhibition., *J Cancer Res Clin Oncol*. 2004;130(3):146-52
- Ahn CH, Choi WC, Kong JY., Chemosensitizing activity of caffeic acid in multidrug-resistant MCF-7/Dox human breast carcinoma cells., *Anticancer Res*. 1997;17(3C):1913-7
- Stich HF, Rosin MP, Wu CH, Powrie WD., A comparative genotoxicity study of chlorogenic acid (3-O-caffeoylquinic acid), *Mutat Res*. 1981;90(3):201-12.
- Hagiwara A, Hirose M, Takahashi S, Ogawa K, Shirai T, Ito N., Forestomach and kidney carcinogenicity of caffeic acid in F344 rats and C57BL/6N x C3H/HeN F1 mice., *Cancer Res*. 1991;51(20):5655-60
- Hirose M, Kawabe M, Shibata M, Takahashi S, Okazaki S, Ito N., Influence of caffeic acid and other o-dihydroxybenzene derivatives on N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-initiated rat forestomach carcinogenesis., *Carcinogenesis*. 1992;13(10):1825-8.
- Hirose, M., Mutai, M., Takahashi, S. , Effects of phenolic antioxidants in low dose combination on forestomach carcinogenesis in rats pretreated with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, *Cancer Res*. 1991; 51:824-827
- Tanaka T, Kojima T, Kawamori T, Wang A, Suzui M, Okamoto K, Mori H., Inhibition of 4-nitroquinoline-1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis by the naturally occurring plant phenolics caffeic, ellagic, chlorogenic and ferulic acids., *Carcinogenesis*. 1993;14(7):1321-5.
- Castelluccio C, Bolwell GP, Gerrish C, Rice-Evans C., Differential distribution of ferulic acid to the major plasma constituents in relation to its potential as an antioxidant., *Biochem J*. 1996 ;316 (Pt 2):691-4.
- Hiipakka RA, Zhang HZ, Dai W, Dai Q, Liao S., Structure-activity relationships for inhibition of human 5alpha-reductases by polyphenols., *Biochem Pharmacol*. 2002;63(6):1165-76
- Fesen MR, Pommier Y, Leteurtre F, Hiroguchi S, Yung J, Kohn KW., Inhibition of HIV-1 integrase by flavones, caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and related compounds., *Biochem Pharmacol*. 1994 ;48(3):595-608.
- Song YS, Park EH, Hur GM, Ryu YS, Lee YS, Lee JY, Kim YM, Jin C., Caffeic acid phenethyl ester inhibits nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity., *Cancer Lett*. 2002;175(1):53-61.
- Rao CV, Desai D, Kaul B, Amin S, Reddy BS., Effect of caffeic acid esters on carcinogen-induced mutagenicity and human colon adenocarcinoma cell growth., *Chem Biol Interact*. 1992;84(3):277-90.
- Sud'ina GF, Mirzoeva OK, Pushkareva MA, Korshunova GA, Sumbatyan NV, Varfolomeev SD., Caffeic acid phenethyl ester as a lipoxygenase inhibitor with antioxidant properties., *FEBS Lett*. 1993;329(1-2):21-4.

- Teel RW, Huynh H., Modulation by phytochemicals of cytochrome P450-linked enzyme activity., *Cancer Lett.* 1998;133(2):135-41.
- Kawabata K, Yamamoto T, Hara A, Shimizu M, Yamada Y, Matsunaga K, Tanaka T, Mori H., Modifying effects of ferulic acid on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F344 rats., *Cancer Lett.* 2000 ;157(1):15-21.
- Kasai H, Fukada S, Yamaizumi Z, Sugie S, Mori H., Action of chlorogenic acid in vegetables and fruits as an inhibitor of 8-hydroxydeoxyguanosine formation in vitro and in a rat carcinogenesis model., *Food Chem Toxicol.* 2000;38(5):467-71.
- . Kono Y, Shibata H, Kodama Y, Sawa Y., The suppression of the N-nitrosating reaction by chlorogenic acid., *Biochem J.* 1995;312 (Pt 3):947-53
- Watabe M, Hishikawa K, Takayanagi A, Shimizu N, Nakaki T, Caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis by inhibition of NFkappaB and activation of Fas in human breast cancer MCF-7 cells., *J Biol Chem.* 2004;279(7):6017-26.
- Weyant MJ, Carothers AM, Bertagnolli ME, Bertagnolli MM, Colon cancer chemopreventive drugs modulate integrin-mediated signaling pathways., *Clin Cancer Res.* 2000;6(3):949-56.
- Karekar V, Joshi S, Shinde SL, Antimutagenic profile of three antioxidants in the Ames assay and the Drosophila wing spot test., *Mutat Res.* 2000 Jul 10;468(2):183-94.
- Ferguson LR, Lim IF, Pearson AE, Ralph J, Harris PJ., Bacterial antimutagenesis by hydroxycinnamic acids from plant cell walls., *Mutat Res.* 2003;542(1-2):49-58.
- Na HK, Wilson MR, Kang KS, Chang CC, Grunberger D, Trosko JE., Restoration of gap junctional intercellular communication by caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in a ras-transformed rat liver epithelial cell line., *Cancer Lett.* 2000;157(1):31-8.
- . Lee YJ, Kuo HC, Chu CY, Wang CJ, Lin WC, Tseng TH, Involvement of tumor suppressor protein p53 and p38 MAPK in caffeic acid phenethyl ester-induced apoptosis of C6 glioma cells., *Biochem Pharmacol.* 2003;66(12):2281-9.
- M Ghoneum, O Mermel, L Williams, N Attallah & Y Hashimoto, Susceptibility of propolis-treated tumor cells to human natural killer cell activity in vitro, *Cancer Detection and Prevention* 1995; 19(1).
- Chen S, Gong J, Liu F, Mohammed U., Naturally occurring polyphenolic antioxidants modulate IgE-mediated mast cell activation., *Immunology.* 2000;100(4):471-80.
- Chiang LC, Ng LT, Chiang W, Chang MY, Lin CC., Immunomodulatory activities of flavonoids, monoterpenoids, triterpenoids, iridoid glycosides and phenolic compounds of *Plantago* species., *Planta Med.* 2003;69(7):600-4.
- Inoue S, Ito K, Yamamoto K, Kawanishi S., Caffeic acid causes metal-dependent damage to cellular and isolated DNA through H₂O₂ formation., *Carcinogenesis.* 1992;13(9):1497-502
- IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins, Volume 56 (1993)
- Hertog MG, Bueno-de-Mesquita HB, Fehily AM, Sweetnam PM, Elwood PC, Kromhout D, Fruit and vegetable consumption and cancer mortality in the Caerphilly Study, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1996 ;5(9):673-7.
- Messina MJ, Persky V, Setchell KD, Barnes S., Soy intake and cancer risk: a review of the in vitro and in vivo data, *Nutr Cancer.* 1994;21(2):113-31.
- Bors W, Heller W, Michel C, Saran M., Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies, *Methods Enzymol.* 1990;186:343-55.
- Ferry DR, Smith A, Malkhandi J, Fyfe DW, deTakats PG, Anderson D, Baker J, Kerr DJ, Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: Pharmacokinetics and evidence for in vivo tyrosine kinase inhibition, *Clin Cancer Res* 1996;2:659-668
- Kioka N, Hosokawa N, Komano T, Hirayoshi K, Nagata K, Ueda K., Quercetin, a bioflavonoid, inhibits the increase of human multidrug resistance gene (MDR1) expression caused by arsenite., *FEBS Lett.* 1992;301(3):307-9.
- Di Pietro A, Dayan G, Conseil G, Steinfels E, Krell T, Trompier D, Baubichon-Cortay H, Jault J, P-glycoprotein-mediated resistance to chemotherapy in cancer cells: using recombinant cytosolic domains to establish structure-function relationships, *Braz J Med Biol Res.* 1999;32(8):925-39.
- Di Pietro A, Conseil G, Pérez-Victoria JM, Dayan G, Baubichon-Cortay H, Trompier D, Steinfels E, Jault JM, de Wet H, Maitrejean M, Comte G, Boumendjel A, Mariotte

- AM, Dumontet C, McIntosh DB, Goffeau A, Castanys S, Gamarro F, Barron D., Modulation by flavonoids of cell multidrug resistance mediated by P-glycoprotein and related ABC transporters, *Cell Mol Life Sci.* 2002;59(2):307-22.
- De Vincenzo R, Ferlini C, Distefano M, Gaggini C, Riva A, Bombardelli E, Morazzoni P, Valenti P, Belluti F, Ranelletti FO, Mancuso S, Scambia G., In vitro evaluation of newly developed chalcone analogues in human cancer cells, *Cancer Chemother Pharmacol.* 2000;46(4):305-12.
 - Blagosklonny MV., Treatment with inhibitors of caspases, that are substrates of drug transporters, selectively permits chemotherapy-induced apoptosis in multidrug-resistant cells but protects normal cells., *Leukemia.* 2001;15(6):936-41.
 - Sadzuka Y, Sugiyama T, Sonobe T, Efficacies of tea components on doxorubicin induced antitumor activity and reversal of multidrug resistance, . *Toxicol Lett.* 2000;114(1-3):155-62.
 - Choi SU, Ryu SY, Yoon SK, Jung NP, Park SH, Kim KH, Choi EJ, Lee CO, Effects of flavonoids on the growth and cell cycle of cancer cells., *Anticancer Res.* 1999;19(6B):5229-33.
 - Herrmann K., On the occurrence of flavonols and flavones glycosides in vegetables, *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*, Volume 186, Number 1, 1-5, DOI: 10.1007/BF01027170
 - Scambia G, Ranelletti FO, Benedetti Panici P, Piantelli M, Bonanno G, De Vincenzo R, Ferrandina G, Pierelli L, Capelli A, Mancuso S., Quercetin inhibits the growth of a multidrug-resistant estrogen-receptor-negative MCF-7 human breast-cancer cell line expressing type II estrogen-binding sites, *Cancer Chemother Pharmacol.* 1991;28(4):255-8.
 - Scambia G, Ranelletti FO, Panici PB, Piantelli M, Bonanno G, De Vincenzo R, Ferrandina G, Rumi C, Larocca LM, Mancuso S., Inhibitory effect of quercetin on OVCA 433 cells and presence of type II oestrogen binding sites in primary ovarian tumours and cultured cells., *Br J Cancer.* 1990;62(6):942-6.
 - Kaneuchi M, Sasaki M, Tanaka Y, Sakuragi N, Fujimoto S, Dahiya R., Quercetin regulates growth of Ishikawa cells through the suppression of EGF and cyclin D1., *Int J Oncol.* 2003;22(1):159-64.
 - Hung H., Inhibition of estrogen receptor alpha expression and function in MCF-7 cells by kaempferol, *J Cell Physiol.* 2004;198(2):197-208.
 - Wang C, Kurzer MS, Phytoestrogen concentration determines effects on DNA synthesis in human breast cancer cells, *Nutr Cancer.* 1997;28(3):236-47.
 - Wang IK, Lin-Shiau SY, Lin JK., Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells., *Eur J Cancer.* 1999;35(10):1517-25.
 - Sathyamoorthy N, Wang TT, Phang JM., Stimulation of pS2 expression by diet-derived compounds., *Cancer Res.* 1994;54(4):957-61.
 - Ranelletti FO, Ricci R, Larocca LM, Maggiano N, Capelli A, Scambia G, Benedetti-Panici P, Mancuso S, Rumi C, Piantelli M., Growth-inhibitory effect of quercetin and presence of type-II estrogen-binding sites in human colon-cancer cell lines and primary colorectal tumors., *Int J Cancer.* 1992;50(3):486-92.
 - Yannai S, Day AJ, Williamson G, Rhodes MJ., Characterization of flavonoids as monofunctional or bifunctional inducers of quinone reductase in murine hepatoma cell lines, *Food Chem Toxicol.* 1998;36(8):623-30.
 - Choi JA, Kim JY, Lee JY, Kang CM, Kwon HJ, Yoo YD, Kim TW, Lee YS, Lee SJ, Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells by quercetin, *Int J Oncol.* 2001;19(4):837-44.
 - Gupta K, Panda D., Perturbation of microtubule polymerization by quercetin through tubulin binding: a novel mechanism of its antiproliferative activity, *Biochemistry.* 2002;41(43):13029-38
- Horiuchi T, Fujiki H, Hakii H, Suganuma M, Yamashita K, Sugimura T., Modulation of phorbol ester receptors in mouse skin by application of quercetin., *Jpn J Cancer Res.* 1986;77(6):526-31.
 - Eaton EA, Walle UK, Lewis AJ, Hudson T, Wilson AA, Walle T., Flavonoids, potent inhibitors of the human P-form phenolsulfotransferase. Potential role in drug metabolism and chemoprevention., *Drug Metab Dispos.* 1996;24(2):232-7.

- Tamura H, Matsui M., Inhibitory effects of green tea and grape juice on the phenol sulfotransferase activity of mouse intestines and human colon carcinoma cell line, Caco-2, *Biol Pharm Bull.* 2000;23(6):695-9.
- Griffiths K, Morton MS, Denis L., Certain aspects of molecular endocrinology that relate to the influence of dietary factors on the pathogenesis of prostate cancer, *Eur Urol.* 1999;35(5-6):443-55.
- Mutoh M, Takahashi M, Fukuda K, Matsushima-Hibiya Y, Mutoh H, Sugimura T, Wakabayashi K., Suppression of cyclooxygenase-2 promoter-dependent transcriptional activity in colon cancer cells by chemopreventive agents with a resorcin-type structure., *Carcinogenesis.* 2000;21(5):959-63.
- Yasukawa K, Takido M, Takeuchi M, Sato Y, Nitta K, Nakagawa S., Inhibitory effects of flavonol glycosides on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor promotion., *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 1990;38(3):774-6.
- Nguyen TT, Tran E, Ong CK, Lee SK, Do PT, Huynh TT, Nguyen TH, Lee JJ, Tan Y, Ong CS, Huynh H., Kaempferol-induced growth inhibition and apoptosis in A549 lung cancer cells is mediated by activation of MEK-MAPK, *J Cell Physiol.* 2003;197(1):110-21
- Parkinson TM, Brown JP., Metabolic fate of food colorants., *Annu Rev Nutr.* 1981;1:175-205
- Déprez S, Mila I, Scalbert A., Carbon-14 biolabeling of (+)-catechin and proanthocyanidin oligomers in willow tree cuttings., *J Agric Food Chem.* 1999;47(10):4219-30.
- Lietti A, Forni G., Studies on *Vaccinium myrtillus* anthocyanosides. II. Aspects of anthocyanins pharmacokinetics in the rat, *Arzneimittelforschung.* 1976;26(5):832-5.
- Tsuda T, Horio F, Osawa T., Absorption and metabolism of cyanidin 3-O-beta-D-glucoside in rats., *FEBS Lett.* 1999;449(2-3):179-82.
- Schmitt E, Stopper H., Estrogenic activity of naturally occurring anthocyanidins., *Nutr Cancer.* 2001;41(1-2):145-9.
- Kamei H, Kojima T, Hasegawa M, Koide T, Umeda T, Yukawa T, Terabe K., Suppression of tumor cell growth by anthocyanins in vitro., *Cancer Invest.* 1995;13(6):590-4.
- Lazzé MC, Pizzala R, Savio M, Stivala LA, Prospero E, Bianchi L., Anthocyanins protect against DNA damage induced by tert-butyl-hydroperoxide in rat smooth muscle and hepatoma cells., *Mutat Res.* 2003;535(1):103-15.
- Bagchi D, Garg A, Krohn RL, Bagchi M, Bagchi DJ, Balmoori J, Stohs SJ., Protective effects of grape seed proanthocyanidins and selected antioxidants against TPA-induced hepatic and brain lipid peroxidation and DNA fragmentation, and peritoneal macrophage activation in mice., *Gen Pharmacol.* 1998;30(5):771-6
- Martin S, Favot L, Matz R, Lugnier C, Andriantsitohaina R, Delphinidin inhibits endothelial cell proliferation and cell cycle progression through a transient activation of ERK-1/-2, *Biochem Pharmacol.* 2003;65(4):669-75.
- Zhu M, Chen Y, Li RC., Oral absorption and bioavailability of tea catechins, *Planta Med.* 2000;66(5):444-7
- Valcic S, Timmermann BN, Alberts DS, Wächter GA, Krutzsch M, Wymer J, Guillén JM., Inhibitory effect of six green tea catechins and caffeine on the growth of four selected human tumor cell lines., *Anticancer Drugs.* 1996;7(4):461-8
- van het Hof KH, Wiseman SA, Yang CS, Tijburg LB., Plasma and lipoprotein levels of tea catechins following repeated tea consumption., *Proc Soc Exp Biol Med.* 1999;220(4):203-9.
- Ho CT, Chen Q, Shi H, Zhang KQ, Rosen RT, Antioxidative effect of polyphenol extract prepared from various Chinese teas., *Prev Med.* 1992;21(4):520-5
- Katiyar SK, Challa A, McCormick TS, Cooper KD, Mukhtar H., Prevention of UVB-induced immunosuppression in mice by the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate may be associated with alterations in IL-10 and IL-12 production., *Carcinogenesis.* 1999;20(11):2117-24
- Sakagami H, Takeda M, Sugaya K, Omata T, Takahashi H, Yamamura M, Hara Y, Shimamura T., Stimulation by epigallocatechin gallate of interleukin-1 production by human peripheral blood mononuclear cells., *Anticancer Res.* 1995;15(3):971-4.
- Masako Toda, Sachie Okubo, Reiko Hiyoshi, Tadakatsu Shimamura, The bactericidal activity of tea and coffee, *Letters in Applied Microbiology.* 1989, Volume 8, Issue 4, pages 123-125

- Steele CM, Lilies M, Ioannides C., Inhibition of the mutagenicity of aromatic amines by the plant flavonoid (+)-catechin., *Cancer Res.* 1985;45(8):3573-7
- Leone M, Zhai D, Sareth S, Kitada S, Reed JC, Pellicchia M., Cancer prevention by tea polyphenols is linked to their direct inhibition of antiapoptotic Bcl-2-family proteins., *Cancer Res.* 2003;63(23):8118-21.
- Hsu S, Lewis J, Singh B, Schoenlein P, Osaki T, Athar M, Porter AG, Schuster G., Green tea polyphenol targets the mitochondria in tumor cells inducing caspase 3-dependent apoptosis, *Anticancer Res.* 2003;23(2B):1533-9
- Annabi B, Lee YT, Martel C, Pilorget A, Bahary JP, Béliveau R., Radiation induced-tubulogenesis in endothelial cells is antagonized by the antiangiogenic properties of green tea polyphenol (-) epigallocatechin-3-gallate., *Cancer Biol Ther.* 2003;2(6):642-9.
- Liberto M, Cobrinik D., Growth factor-dependent induction of p21(CIP1) by the green tea polyphenol, epigallocatechin gallate, *Cancer Lett.* 2000;154(2):151-61.
- Kim HJ, Chang EJ, Bae SJ, Shim SM, Park HD, Rhee CH, Park JH, Choi SW., Cytotoxic and antimutagenic stilbenes from seeds of *Paeonia lactiflora*, *Arch Pharm Res.* 2002;25(3):293-9.
- Levenson AS, Gehm BD, Pearce ST, Horiguchi J, Simons LA, Ward JE 3rd, Jameson JL, Jordan VC., Resveratrol acts as an estrogen receptor (ER) agonist in breast cancer cells stably transfected with ER alpha., *Int J Cancer.* 2003;104(5):587-96.
- Banerjee S, Bueso-Ramos C, Aggarwal BB., Suppression of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary carcinogenesis in rats by resveratrol: role of nuclear factor-kappaB, cyclooxygenase 2, and matrix metalloproteinase 9, *Cancer Res.* 2002;62(17):4945-54.
- Sato M, Pei RJ, Yuri T, Danbara N, Nakane Y, Tsubura A., Prepubertal resveratrol exposure accelerates N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary carcinoma in female Sprague-Dawley rats, *Cancer Lett.* 2003;202(2):137-45.
- Piver B, Berthou F, Dreano Y, Lucas D, Differential inhibition of human cytochrome P450 enzymes by epsilon-viniferin, the dimer of resveratrol: comparison with resveratrol and polyphenols from alcoholized beverages, *Life Sci.* 2003;73(9):1199-213.
- Heo YH, Kim S, Park JE, Jeong LS, Lee SK., Induction of quinone reductase activity by stilbene analogs in mouse Hepa 1c1c7 cells., *Arch Pharm Res.* 2001;24(6):597-600
- Bråkenhielm E, Cao R, Cao Y., Suppression of angiogenesis, tumor growth, and wound healing by resveratrol, a natural compound in red wine and grapes., *FASEB J.* 2001;15(10):1798-800
- Ragione FD, Cucciolla V, Borriello A, Pietra VD, Racioppi L, Soldati G, Manna C, Galletti P, Zappia V, Resveratrol arrests the cell division cycle at S/G2 phase transition., *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;250(1):53-8.
- Williams, R.L., Elliott, M., Perry, R., and Greaves, B., The estrogenic activity of the polyphenolic resveratrol , benefits of moderate consumption of red wine, *Polyphenols Communications*, 1996; pp.489-490
- Nichenametla SN, Taruscio TG, Barney DL, Exon JH., A review of the effects and mechanisms of polyphenolics in cancer., *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2006;46(2):161-83.
- Bors W, Michel C., Chemistry of the antioxidant effect of polyphenols, *Ann N Y Acad Sci.* 2002;957:57-69.
- Ren W, Qiao Z, Wang H, Zhu L, Zhang L., Flavonoids: promising anticancer agents, *Med Res Rev.* 2003;23(4):519-34.
- Dimas K, Demetzos C, Mitaku S, Marselos M, Tzavaras T, Kokkinopoulos D, Cytotoxic activity of kaempferol glycosides against human leukaemic cell lines in vitro, *Pharmacol Res.* 2000;41(1):85-8.
- Wang P, Ownby S, Zhang Z, Yuan W, Li S., Cytotoxicity and inhibition of DNA topoisomerase I of polyhydroxylated triterpenoids and triterpenoid glycosides, *Bioorg Med Chem Lett.* 2010;20(9):2790-6
- Dragsted LO., Antioxidant actions of polyphenols in humans, *Int J Vitam Nutr Res.* 2003;73(2):112-9.
- Le Marchand L., Cancer preventive effects of flavonoids--a review, *Biomed Pharmacother.* 2002;56(6):296-301.

