

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΣΠΑΝΟΥ ΒΙΚΤΩΡΙΑ ΜΑΡΙΝΑ

**ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ
ΜΟΡΙΑΚΗΣ
ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2021

**«ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΩΝ
ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ
ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ»**

**«ASSESSMENT OF THE EFFECT OF ISOLATED
FLAVONOIDS ON THE REGULATION OF
MITOCHONDRIAL FUNCTIONS»**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ψαρρά Άννα-Μαρία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας ΤΒΒ, Π.Θ.

Λεωνίδας Δημήτριος, Καθηγητής Βιοχημείας ΤΒΒ, Π.Θ.

Σκαμνάκη Βασιλική, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας-Μεταβολισμού ΤΒΒ, Π.Θ.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα μιτοχόνδρια είναι υποκυτταρικά οργανίδια με ουσιαστικό ρόλο στη ζωτικότητα και επιβίωση του κυττάρου. Η σύνθεση του ATP μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, η ρύθμιση της απόπτωσης και της οξειδοαγανωγικής ισορροπίας, η βιοσύνθεση αμινοξέων, αίμης, και άλλων ενώσεων καθώς και η β-οξείδωση των λιπαρών οξέων είναι μερικές από τις κρίσιμες βιολογικές διαδικασίες που διενεργούνται τα μιτοχόνδρια. Τα φλαβονοειδή, φυσικά συστατικά των φυτών, συναντώνται στα περισσότερα φρούτα και λαχανικά, και εμφανίζουν ευεργετικές δράσεις για τον άνθρωπο. Μεταξύ των δράσεων τους, τα φλαβονοειδή παρουσιάζουν αντιοξειδωτικές, αντι-αποπτωτικές, κυτταροπροστατευτικές ή αποπτωτικές ιδιότητες τόσο *in vitro* σε κυτταρικές σειρές όσο και *in vivo* σε πειραματικά μοντέλα, και βρίσκονται στο επίκεντρο της έρευνας ως φυσικά και ασφαλή θεραπευτικά εργαλεία ενάντια πληθώρας παθολογικών καταστάσεων, όπως νευροεκφυλιστικών ασθενειών και του καρκίνου. Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν να διερευνήσει την επίδραση απομονωμένων φλαβονοειδών στη ρύθμιση της μιτοχονδριακής λειτουργίας σε καρκινικά κύτταρα ανθρώπινου νευροβλαστώματος SH-SY5Y.

Για το σκοπό αυτό, οι ενώσεις: πεονιδίνη, δελφινιδίνη, κυανιδίνη, μπαϊκαλεΐνη, κουερσιτρίνη και NP-013703 μελετήθηκαν ως προς την επίδρασή τους στην ένταση φθορισμού της φθορίζουσας χρωστικής MitoTracker CMXRos, η οποία συσσωρεύεται, σημαίνοντας επιλεκτικά, μόνο στα μιτοχόνδρια των ζωντανών κυττάρων, βασιζόμενη στο μιτοχονδριακό δυναμικό μεμβράνης. Η ένταση του φθορισμού της χρωστικής MitoTracker CMXRos προσδιορίστηκε με το πρόγραμμα Image J και κανονικοποιήθηκε ως προς τον αρνητικό μάρτυρα και το φθορισμό πεδίου, ενώ το t-test χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της στατιστικής σημαντικότητας ($P < 0,05$).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η δελφινιδίνη εμφάνισε τη μεγαλύτερη αποπτωτική δράση στα κύτταρα SH-SY5Y, πιθανά μέσω του μιτοχονδριακού ενδογενούς μονοπατιού απόπτωσης, καθώς η μειωμένη ένταση φθορισμού της CMXRos οφείλεται σε μεταβολές στο μιτοχονδριακό δυναμικό μεμβράνης, κρίσιμο σημείο κατά την επαγωγή της απόπτωσης. Αποπτωτική δράση με μείωση της σχετικής έντασης φθορισμού της CMXRos μικρότερη της δελφινιδίνης αλλά στατιστικά σημαντική, εμφάνισε η κυανιδίνη, η μπαϊκαλεΐνη και ουσία NP-013703, ενώ μη στατιστικά σημαντική αποπτωτική δράση, η πεονιδίνη. Αντίθετα, η κουερσιτρίνη δεν παρουσίασε κυτταροτοξική δράση, αλλά πιθανή κυτταροπροστατευτική και αντι-αποπτωτική, χωρίς όμως να είναι στατιστικά σημαντική η δράση της. Η δράση των φλαβονοειδών ποικίλει στα κύτταρα SH-SY5Y, η δελφινιδίνη και η κουερσιτρίνη εμφανίζουν πιθανές αποπτωτικές και νευροπροστατευτικές ικανότητες, αντίστοιχα, με σημαντικές προοπτικές ως εν δυνάμει φυσικά χημειοθεραπευτικά ή χημειοπροστατευτικά μέσα.

Λέξεις-κλειδιά:

Ανοσοκυτταροχημεία, απόπτωση, μιτοχόνδρια, μιτοχονδριακό δυναμικό μεμβράνης, φλαβονοειδή, SH-SY5Y

ABSTRACT

Mitochondria are subcellular organelles with key role on cell growth and survival. The ATP synthesis by electron transport chain and OXPHOS, the regulation of apoptosis and of the balance between antioxidants and ROS, the biosynthesis of amino-acids, heme and other molecules, as well as the oxidation of fatty acids are several of the critical biological processes of mitochondria. Flavonoids, natural plant substances abundant in various fruits and vegetables, exhibit beneficial properties for human health. Among their actions, flavonoids present antioxidative, anti-apoptotic, cytoprotective or apoptotic effect either *in vitro* in various cell lines or *in vivo* on experimental models. A lot of research has focused on these substances; they are attractive as natural and safe therapeutic tools against a variety of pathological conditions, including neurodegenerative disorders and cancer. The aim of this thesis was to assess the effect of isolated flavonoids on the regulation of mitochondrial function in human neuroblastoma cells SH-SY5Y.

For this purpose, the effect of the compounds: peonidin, delphinidin, cyanidin chloride, baicalein, quercitrin (quercetin O-glucoside) and NP-013703 on the fluorescence intensity of MitoTracker CMXRos, a fluorescence marker that accumulates, staining selectively, only in the mitochondria of live cells, based on mitochondria membrane potential, was investigated. The fluorescence intensity of MitoTracker CMXRos marker was assessed by Image J analysis and normalized to the negative control and background fluorescence, while t-test was employed for statistical analysis. Significant difference was determined $P < 0,05$.

Study results showed that delphinidin exhibits the higher apoptotic effect in SH-SY5Y cells, probably via the intrinsic mitochondrial apoptotic pathway, since decreased fluorescence of CMXRos is attributed to mitochondrial membrane depolarization, a critical point of apoptotic process. An apoptotic effect evidenced with significantly lower fluorescence of CMXRos was observed when cells incubated with cyanidin, baicalein and NP-013703. However, peonidin exhibits a non-significant even though apoptotic effect. On the contrary, no cytotoxic effect was observed after quercitrin incubation but a potential cytoprotective and anti-apoptotic effect, though it was not significant. Flavonoids' properties vary in SH-SY5Y cancer cells, delphinidin and quercitrin exhibit possible apoptotic and neuroprotective effects, respectively, with great potential as chemotherapeutic or chemoprotective tools.

Keywords:

Apoptosis, flavonoids, immunocytochemistry, mitochondria, mitochondrial membrane potential, SH-SY5Y

Πίνακας περιεχομένων

.....	1
1. Εισαγωγή.....	8
1.1. Τα μιτοχόνδρια.....	8
1.1.1. Δομή μιτοχονδρίου.....	8
1.1.2. Δυναμικό μεμβράνης.....	10
1.1.3. Γενετικό υλικό.....	11
1.2. Λειτουργία- Οξειδωτική Φωσφορυλίωση.....	12
1.3. Μιτοχόνδρια και Απόπτωση.....	12
1.3.1. Ενδογενές μονοπάτι απόπτωσης.....	14
1.3.2. Εξωγενές μονοπάτι απόπτωσης.....	15
1.4. Μιτοχόνδρια και παραγωγή ROS.....	16
1.5. Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί.....	17
1.6. Πολυφαινόλες.....	18
1.6.1. Δομή και κατηγορίες των πολυφαινολών.....	18
1.6.2. Φλαβονοειδή.....	18
1.6.3. Χημική δομή, ομάδες και υποομάδες φλαβονοειδών.....	19
1.7. Απομάκρυνση των μιτοχονδριακών ROS από τα φλαβονοειδή.....	27
1.8. Αντι-αποπτωτικές και προ-αποπτωτικές δράσεις των φλαβονοειδών.....	28
2. Σκοπός.....	29
3. Υλικά και Μέθοδοι.....	29
3.1. Υλικά.....	29
3.1.1. Οργανολογία.....	29
3.1.2. Χημικά αντιδραστήρια.....	29
3.1.3. Διαλύματα.....	30
3.1.4. Αναλώσιμα.....	31
3.1.4. Κυτταρικές Σειρές.....	31
3.2. Μέθοδοι.....	33
3.2.1. Βασικές Αρχές Κυτταροκαλλιέργειών.....	33
3.2.2. Ανοσοκυτταροχημεία- Συνεστιακή Μικροσκοπία.....	36
3.2.3. Image J Ανάλυση.....	40
3.2.4. Στατιστική Ανάλυση.....	40
4. Αποτελέσματα.....	40
4.1. Απεικόνιση καρκινικών κυττάρων ανθρώπινου νευροβλαστώματος SH-SY5Y (αντικειμενικός 20X) με συνεστιακή μικροσκοπία μετά από επώαση με απομονωμένα φλαβονοειδή και με τις φθορίζουσες χρωστικές MitoTracker CMXRos και Hoechst.....	41
4.2. Προσδιορισμός της σχετικής έντασης φθορισμού της χρωστικής MitoTracker CMXRos σε αντικειμενικό φακό 20x.....	42
4.3. Απεικόνιση καρκινικών κυττάρων ανθρώπινου νευροβλαστώματος SH-SY5Y (αντικειμενικός 63x) με συνεστιακή μικροσκοπία μετά από επώαση με απομονωμένα φλαβονοειδή και με τις φθορίζουσες χρωστικές MitoTracker CMXRos και Hoechst.....	43
4.4. Προσδιορισμός της σχετικής έντασης φθορισμού της χρωστικής MitoTracker CMXRos σε αντικειμενικό φακό 63x.....	45

4.5. Συγκεντρωτικός πίνακας της σχετικής έντασης φθορισμού της χρωστικής MitoTracker CMXRos (ένταση φθορισμού CMXRos / control) μετά από επώαση με τα φλαβονοειδή στους αντικειμενικούς φακούς 20X και 63X.....	46
5. Συζήτηση-Συμπεράσματα	47
6. Ευχαριστίες	50
7. Βιβλιογραφία	50

1. Εισαγωγή

1.1. Τα μιτοχόνδρια

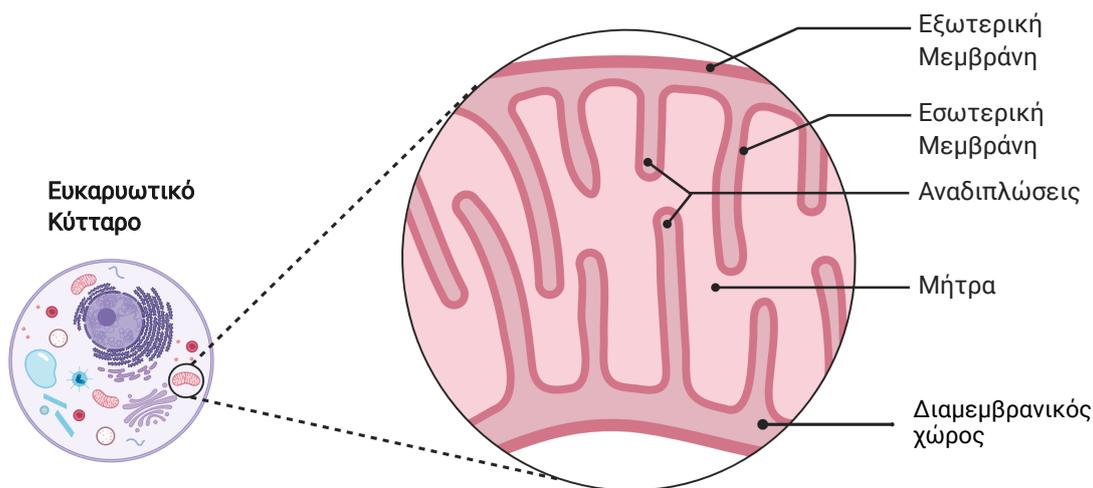
Τα μιτοχόνδρια είναι κυτταρικά οργανίδια ζωτικής σημασίας, λόγω του σημαντικού ρόλου τους σε κρίσιμες βιοσυνθετικές διεργασίες των ευκαρυωτικών κυττάρων, όπως η παραγωγή της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), αίμης και χοληστερόλης. Το ATP παράγεται, κυρίως, μέσω της διαδικασίας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS) (van der Giezen and Tovar, 2005), ενώ η παραγωγή του βασίζεται σε μεταβολικές διαδικασίες στις οποίες συμπεριλαμβάνονται ο κύκλος του τρικαρβοξυλικού ή κιτρικού οξέος (TCA) και η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων.

Επίσης, σημαντικός είναι ο ρόλος των μιτοχονδρίων στη ρύθμιση του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (Kuznetsov and Margreiter, 2009), της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας και της βιοσύνθεσης αμινοξέων, υπομονάδων μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, συμπαραγόντων βιταμινών και νευροδιαβιβαστών (Waldbaum and Patel, 2010).

Στα μιτοχόνδρια πραγματοποιείται, επίσης, η παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) (Duchen, 2004; Waldbaum and Patel, 2010). Οι ROS εμπλέκονται σε πολλά μονοπάτια σηματοδότησης, ως δευτερογενείς αγγελιοφόροι, διεγείροντας την απελευθέρωση και έκκριση κυτταροκινών ή την ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων. Ταυτόχρονα, όμως, ευθύνονται για την πρόκληση βλαβών στα μιτοχόνδρια και κατ' επέκταση στα κύτταρα. Πολλές μεταβολικές και εκφυλιστικές ασθένειες, η γήρανση, ακόμα και η καρκινογένεση έχουν συσχετιστεί με διαταραχές στη λειτουργία των μιτοχονδρίων.

1.1.1. Δομή μιτοχονδρίου

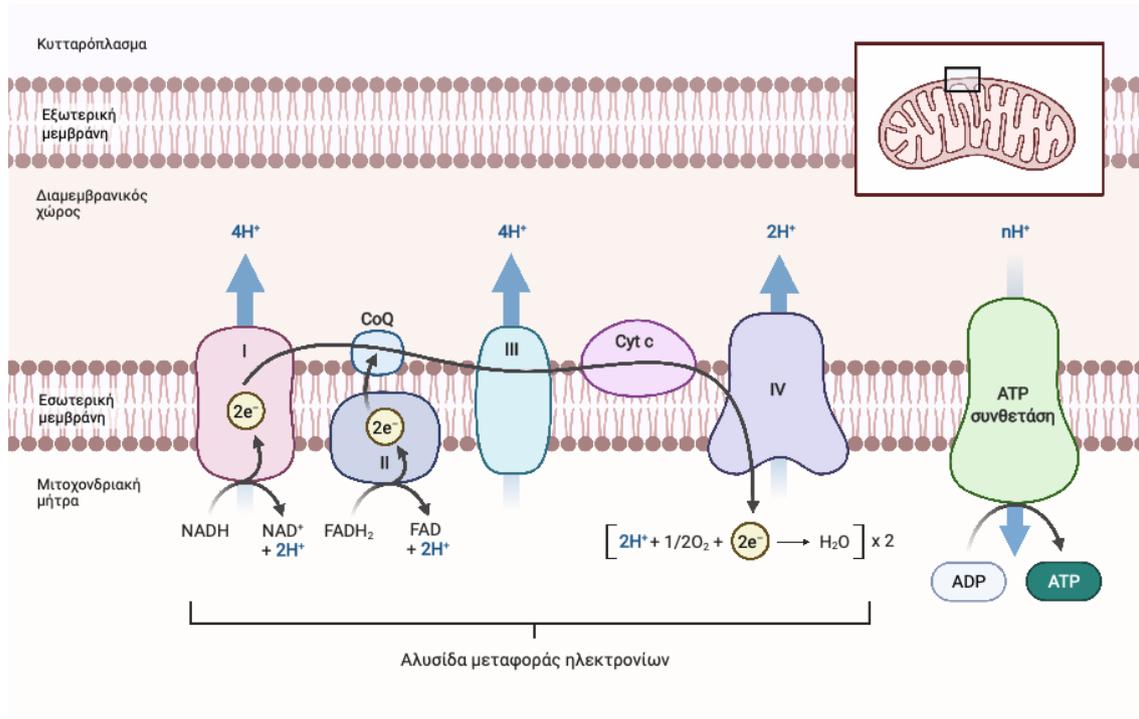
Τα μιτοχόνδρια εμφανίζουν ποικιλία όσον αφορά το μέγεθος, με διάμετρο από 0.2- 5 μm και μήκος έως και 20 μm, και το σχήμα τους, το οποίο εξαρτάται από το είδος του οργανισμού, τον κυτταρικό τύπο και την μεταβολική κατάσταση (Reichert and Neupert, 2002). Το σχήμα το μιτοχονδρίων μπορεί να είναι επίμηκες, σφαιρικό ή ωσειδές. Αποτελείται από δύο μεμβράνες, την εσωτερική και την εξωτερική (**Εικόνα 1**).



Εικόνα 1: Δομή διπλής μεμβράνης (εσωτερικής και εξωτερικής) του μιτοχονδρίου, του διαμεμβρανικού χώρου μεταξύ της εσωτερικής μεμβράνης, και της μήτρας, η οποία περιβάλλεται από την εσωτερική μεμβράνη. (Created with BioRender.com)

Η εξωτερική μεμβράνη είναι λεία και περιλαμβάνει συγκεκριμένες πρωτεΐνες, οι οποίες ονομάζονται πορίνες και επιτρέπουν τη διαμέσου της μεμβράνης διέλευση μορίων μοριακού βάρους μικρότερου των 5-6 kDa (Waldbaum and Patel, 2010). Χημικές ενώσεις, όπως το νερό, O_2 , CO_2 , και NH_3 διαπερνούν τη μεμβράνη, ενώ η χρήση ειδικών διαύλων ή η συμμετοχή πρωτεϊνών-μεταφορέων είναι απαραίτητη για τη διέλευση υδρόφιλων μεταβολιτών και ανόργανων ιόντων (Szewczyk and Wojtczak, 2002).

Σε αντίθεση, η εσωτερική μεμβράνη επιτρέπει τη διέλευση μόνο συγκεκριμένων μορίων, σχηματίζοντας πολυάριθμες πτυχώσεις και αναδιπλώσεις. Η εσωτερική μεμβράνη περικλείει έναν ενδοκυττάριο χώρο του μιτοχονδρίου, ο οποίος ονομάζεται μήτρα και περιέχει το DNA, τα ριβοσώματα και τα ένζυμα που καταλύουν τις βιολογικές διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα στο μιτοχόνδριο, όπως το σύμπλεγμα ένζυμων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Το συγκεκριμένο ενζυμικό σύμπλεγμα περιλαμβάνει τέσσερις οξειδοαναγωγάσες που συμμετέχουν στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (Complexes I - IV) και το σύμπλεγμα σύνθεσης του ATP (Complex V) (**Εικόνα 2**) (Winge, 2012). Στη μήτρα λαμβάνουν χώρα, επίσης, οι περισσότερες αντιδράσεις του κύκλου του κιτρικού οξέος και της οξείδωσης των λιπαρών οξέων. Ο μεταξύ των μεμβρανών χώρος, το διαμεμβρανικό διάστημα, πληρείται από υγρό και είναι σημαντικός για την μεταξύ των μεμβρανών επικοινωνία και για τη διατήρηση του διαμεμβρανικού δυναμικού.



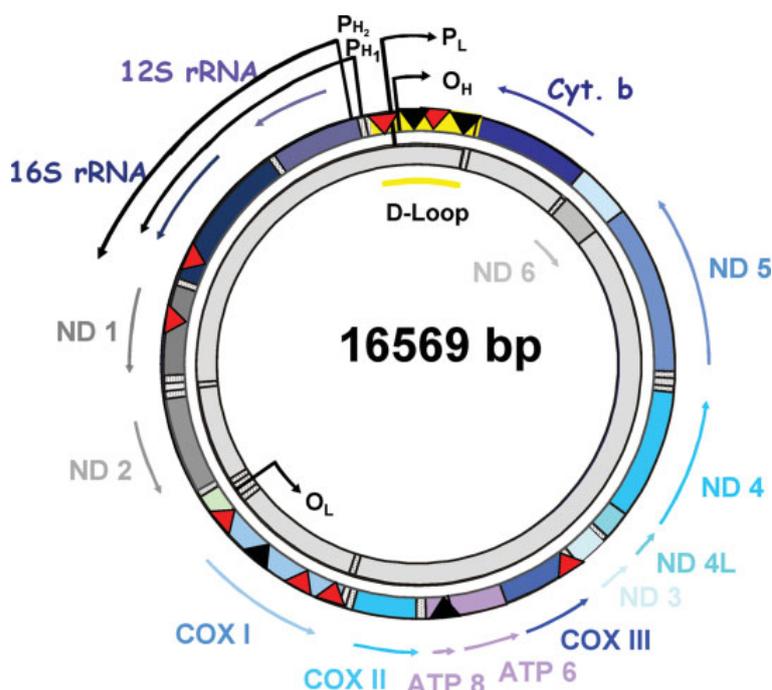
Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση των ενζυμικών συμπλεγμάτων I-V της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου. (Created with BioRender.com)

1.1.2. Δυναμικό μεμβράνης

Η αντλία πρωτονίων της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων καθορίζει το μιτοχονδριακό δυναμικό μεμβράνης, δηλαδή την πρωτονιοκινητική δύναμη. Τα κατιόντα H^+ αντλούνται από τη μιτοχονδριακή μήτρα στο διαμεμβρανικό χώρο δημιουργώντας ηλεκτρικό φορτίο κατά μήκος της εσωτερικής μεμβράνης και επιστρέφουν στη μήτρα μέσω της ATPάσης για τη σύνθεση του ATP. Τα μιτοχόνδρια, ως ενδοκυτταρικά οργανίδια, διατηρούν ένα λειτουργικό δυναμικό μεμβράνης μεγαλύτερο από αυτό της πλασματικής μεμβράνης. Η εκτίμηση των μεμβρανικών δυναμικών παρέχει σημαντικές πληροφορίες για τα ηλεκτροχημικά σήματα που διέπουν την κυτταρική λειτουργία. Η διαπερατότητα διαμέσου των πορινών, πολυπρωτεϊνικά συμπλέγματα που φέρουν σε επαφή την εσωτερική και την εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, παίζει κρίσιμο ρόλο στην επικοινωνία μεταξύ του κυτταροπλάσματος, του διαμεμβρανικού χώρου και της μήτρας καθώς εμπλέκεται στη ρύθμιση των ιόντων Ca^{2+} , του pH και του διαμεμβρανικού δυναμικού ($\Delta\Psi_m$) (Zamzami et al., 2007). Το μιτοχονδριακό διαμεμβρανικό δυναμικό ($\Delta\Psi_m$) εμπλέκεται καθοριστικά στη διαδικασία της απόπτωσης.

1.1.3. Γενετικό υλικό

Τα μιτοχόνδρια των θηλαστικών διαθέτουν αυτόνομο γενετικό σύστημα. Το μιτοχονδριακό γενετικό υλικό είναι δίκλωνο κυκλικό DNA και σε κάθε μιτοχόνδριο μπορεί να περιέχονται πολλαπλά αντίγραφα του. Έχει μέγεθος περίπου 16.6 Kb και κωδικοποιεί mRNAs για 13 βασικές υπομονάδες MRC, 2 rRNAs (12S και 16S) και 22 tRNA, απαραίτητες για τη βιοσύνθεση των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών (Chen and Chan, 2009). Λόγω της ασύμμετρης κατανομής των πουρινών και πυριμιδινών μεταξύ των δύο κλώνων, δημιουργούνται δύο αλυσίδες μια βαριά (H) και μια ελαφριά (L) (**Εικόνα 3**). Η μεταγραφή της ελαφριάς (L) αλυσίδας πραγματοποιείται μέσω του υποκινητή (PL), ενώ η μεταγραφή της βαριάς (H) αλυσίδας βασίζεται σε δύο γειτονικούς υποκινητές (PH1 και PH2) που εδράζονται σε μια περιοχή ελέγχου, η οποία περιλαμβάνει εκτοπισμένο βρόχο (D-loop) (Chen and Chan, 2009). Όταν η μεταγραφή ξεκινά από τους υποκινητές PH2 και PL οδηγεί στη σύνθεση πολυκιστρονικών μορίων mRNA με μήκος σχεδόν ολόκληρου του mtDNA τα οποία κωδικοποιούν ώριμα mRNAs και tRNAs, ενώ τα μετάγραφα που προκύπτουν από τον PH1 είναι μικρότερου μήκους και κωδικοποιεί δυο rRNAs (Psarra and Sekeris, 2008).



Εικόνα 3: Απεικόνιση των δύο αλυσίδων DNA (ελαφριάς και βαριάς) του μιτοχονδριακού γονιδιώματος των θηλαστικών, μήκους περίπου 16.6 kb. Το σύνολο των υποκινητών εδράζεται σε ρυθμιστική περιοχή η οποία περιλαμβάνει εκτοπισμένο βρόγχο (D-loop), ενώ υπάρχουν εσωτερικά HREs πυρηνικών υποδοχέων τάξης I (κόκκινα βέλη) και υποδοχέων τάξης II (μαύρα βέλη), με πιθανό ρυθμιστικό ρόλο στη μεταγραφή. Η ελαφριά αλυσίδα μεταγράφεται μέσω του υποκινητή (PL), ενώ η βαριά

αλυσίδα μεταγράφεται μέσω δύο γειτονικών υποκινητών (PH1 και PH2) (Psarra and Sekeris, 2008).

1.2. Λειτουργία- Οξειδωτική Φωσφορυλίωση

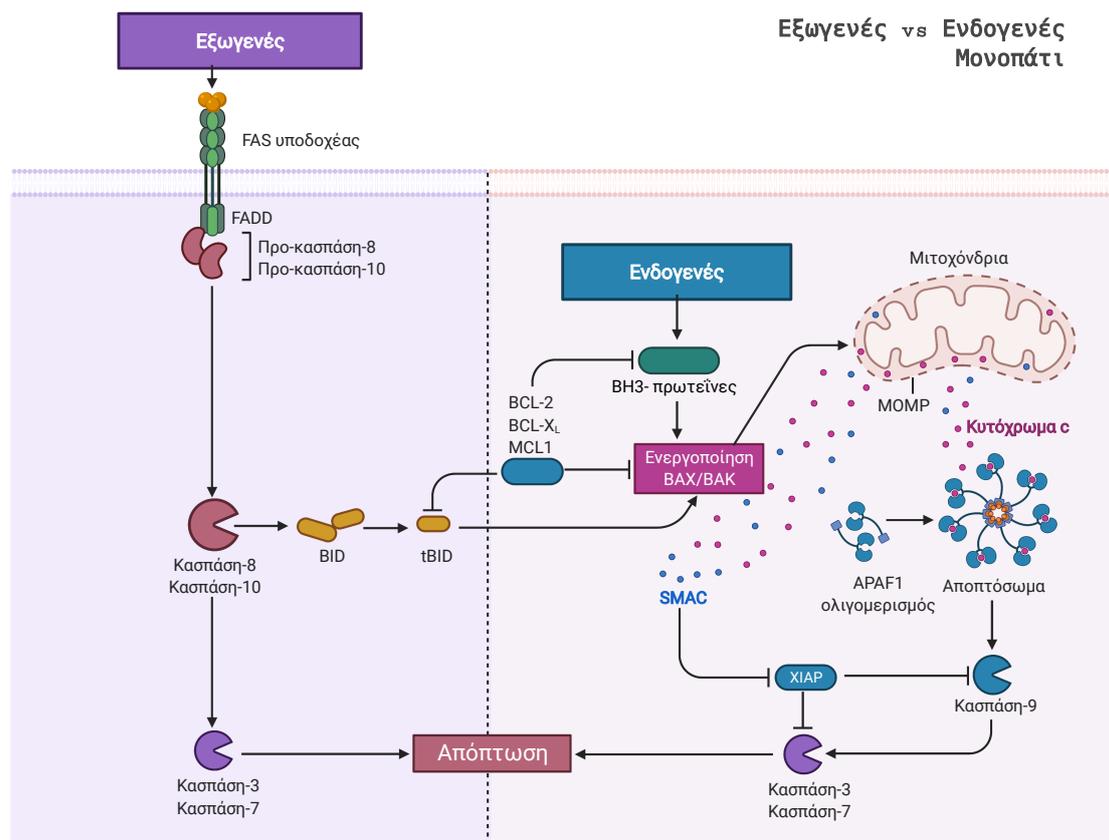
Τα μιτοχόνδρια συνεργάζονται και με άλλα οργανίδια του κυττάρου. Πιο συγκεκριμένα, η διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης απαιτεί τη συμμετοχή ενζύμων τα οποία κωδικοποιούνται από το ίδιο το μιτοχόνδριο αλλά και από τον πυρήνα. Απώτερο στόχο της ΟΧΡΗΟΣ αποτελεί η δημιουργία λειτουργικών αναπνευστικών συμπλόκων. Γενικότερα, τα μιτοχόνδρια λειτουργούν σαν αισθητήρες του κυττάρου και συμβάλλουν στην προσαρμογή και τη ρύθμιση του μονοπατιού της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Σε περιπτώσεις κατά τις οποίες, η απαίτηση του κυττάρου σε ενέργεια εμφανίζει μείωση, η παραγωγή του ATP μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας μειώνεται μέσω μεταβολικών αλλοστερικής ενεργοποίησης (π.χ. ADP). Αντιθέτως, όταν απαιτήσεις του κυττάρου σε ενέργεια αυξάνονται κατά τη διάρκεια συγκεκριμένων αναπτυξιακών σταδίων, το κύτταρο αποκρίνεται μέσω αύξησης της βιοσύνθεσης της ΟΧΡΗΟΣ, ή σε σπάνιες περιπτώσεις μέσω βιογένεσης των μιτοχονδρίων, στην οποία συμπεριλαμβάνεται η αυξημένη μεταγραφή γονιδίων του πυρήνα και των μιτοχονδρίων (Psarra and Sekeris, 2008).

1.3. Μιτοχόνδρια και Απόπτωση

Εκτός από τον κεντρικό ρόλο των μιτοχονδρίων στην παραγωγή ενέργειας του κυττάρου, τα μιτοχόνδρια εμπλέκονται ενεργά στη ρύθμιση του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, δηλαδή της απόπτωσης. Η απόπτωση είναι μιας ζωτικής σημασίας κυτταρική διεργασία καθώς αποτελεί τον κύριο μηχανισμό ομοιόστασης, ρυθμίζοντας τα στάδια ανάπτυξης και γήρανσης ενός κυτταρικού πληθυσμού. Επίσης, λειτουργεί ως μηχανισμός άμυνας σε κυτταρική βλάβη ανοσολογικής αιτιολογίας ή λόγω προσβολής από παθογόνους παράγοντες, ενώ παράλληλα αποτελεί τη βασική άμυνα του οργανισμού ενάντια στην καρκινογένεση (Elmore, 2007). Διάφορες νευρομυϊκές εκφυλιστικές ασθένειες, όπως η νόσος Alzheimer, το Parkinson και η αμυοτροφική σκλήρωση έχουν επίσης συσχετιστεί με διαταραχή στη ρύθμιση και ενεργοποίηση της απόπτωσης (Lin and Beal, 2006).

Η απόπτωση χαρακτηρίζεται από μια σειρά διαδοχικών χημικών και δομικών μεταβολών του κυττάρου, οι οποίες οδηγούν στο θάνατο του κυττάρου αλλά ταυτόχρονα το προετοιμάζουν για την αναγνώρισή του από το ανοσοποιητικό σύστημα με σκοπό τη φαγοκυττάρωσή του, αποφεύγοντας ανεπιθύμητες ανοσολογικές αποκρίσεις (Taylor et al., 2008). Συγκεκριμένα, κατά τη διαδικασία της απόπτωσης, η χρωματίνη του πυρήνα συμπυκνώνεται, το γενετικό υλικό κατακερματίζεται σχηματίζοντας αποπτωτικά κυστίδια και στη συνέχεια τα κυτταρικά υπολείμματα απομακρύνονται μέσω της φαγοκυττάρωσης (Robertson and Orrenius, 2000).

Οι κασπάσες, μια οικογένεια πρωτεϊνών κυστεΐνης, διαδραματίζουν βασικό ρόλο, ενορχηστρώνοντας τη διαδικασία της απόπτωσης και στοχεύοντας εξειδικευμένα χιλιάδες πρωτεΐνες. Η πρωτεολυτική τους δράση ασκείται δηλαδή, με αυστηρά ελεγχόμενο τρόπο, ελαχιστοποιώντας τη βλάβη γειτονικών κυττάρων και αποτρέποντας την απελευθέρωση ανοσοδιεγερτικών μορίων (Taylor et al., 2008). Η ενεργοποίηση των κασπασών πραγματοποιείται με δύο μηχανισμούς, είτε μέσω υποδοχέων στην επιφάνεια των κυττάρων, με το εξωγενές μονοπάτι απόπτωσης, ή μέσω των μιτοχονδρίων με το ενδογενές μονοπάτι απόπτωσης (**Εικόνα 4**).



Εικόνα 4: Σχηματική απεικόνιση των εξωγενών και ενδογενών μονοπατιών επαγωγής της απόπτωσης και των ανασταλτικών μηχανισμών. Το εξωγενές μονοπάτι (αριστερά) ενεργοποιείται με τη πρόσδεση του Fas (FasL) στον υποδοχέα Fas, και το ενδογενές μονοπάτι (αριστερά) εξαρτώμενο από το μιτοχόνδριο. Το αποπτωτικό στρες επάγει τη συσσώρευση των πρωτεϊνών BH3, οδηγώντας σε ολιγομερισμό των BAX/BAK, μεταβολή διαπερατότητας της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης MOMP και απελευθέρωση των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα. Το κυτόχρωμα c οδηγεί στο σχηματισμό του αποπτωσώματος, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των κασπασών και την απόπτωση. Οι πρωτεΐνες Smac και Omi δεσμεύουν και καταστέλλουν τους αναστολείς των κασπασών XIAP. (Created with BioRender.com)

1.3.1 Ενδογενές μονοπάτι απόπτωσης

Το μονοπάτι επαγωγής της απόπτωσης μέσω των μιτοχονδρίων ή ενδογενές μονοπάτι, διεγείρεται από ποικίλα ερεθίσματα, τα οποία μπορεί να έχουν άμεση δράση στα κύτταρα χωρίς να είναι απαραίτητη η πρόσδεσή τους σε υποδοχείς. Κρίσιμο σημείο του ενδογενούς μονοπατιού επαγωγής της απόπτωσης αποτελεί η διαταραχή της διαπερατότητας της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization-MOMP). Η διαταραχή αυτή έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια του μιτοχονδριακού διαμεμβρανικού δυναμικού και την έκλυση προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών από το διαμεμβρανικό χώρο στο κυτταρόπλασμα, όπου οδηγούν σε ενεργοποίηση των κασπασών (Saelens et al., 2004).

Οι προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες κυτόχρωμα c, Smac/DIABLO και το σύμπλοκο σερίνης HtrA2/Omi είναι οι υπεύθυνες για την ενεργοποίηση του μιτοχονδριακού μονοπατιού της απόπτωσης μέσω των κασπασών. Συγκεκριμένα, οι πρωτεΐνες Smac/DIABLO και HtrA2/Omi προσδένονται και καταστέλλουν τη δράση των αναστολέων της απόπτωσης (inhibitor of apoptosis, XIAP), η αντι-αποπτωτική δράση των οποίων βασίζεται στην αναστολή ή την παρεμπόδιση της ενεργοποίησης των προκασπασών και των κασπασών.

Το κυτόχρωμα c βρίσκεται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και έχει ρυθμιστική δράση στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, μεταξύ των συμπλόκων III και IV (Winge, 2012). Ωστόσο, όταν απελευθερωθεί από τα μιτοχόνδρια αποκτά θανατηφόρο δράση, απαραίτητη για την ενεργοποίηση των κασπασών. Απελευθερώνεται από τα μιτοχόνδρια μέσω διαύλων MAC (mitochondrial apoptosis-induced channel), ο σχηματισμός των οποίων ρυθμίζεται από διάφορες πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένου πρωτεϊνών, οι οποίες προέρχονται από την έκφραση των αντι-αποπτωτικών γονιδίων της οικογένειας Bcl-2. Η πρωτεΐνη Bcl-2 επάγουν ή καταστέλλουν την απόπτωση μέσω τη άμεσης δράσης στους διαύλους MAC. Ειδικότερα, οι πρωτεΐνες Bax ή/και Bak προάγουν το σχηματισμό του διαύλου, ενώ οι πρωτεΐνες Bcl-2, Bcl-xL ή Mcl-1 τον παρεμποδίζουν.

Το κυτοχρώμα c προσδένεται, μετά την απελευθέρωσή του από το μιτοχόνδριο, στην πρωτεΐνη ενεργοποίησης της απόπτωσης 1 (APAF-1), προκαλώντας μορφολογικές αλλαγές, ολιγομερισμό και σχηματισμό μιας επταμερούς δομής, ενός πρωτεϊνικού συμπλόκου, το οποίο είναι γνωστό ως αποπτώσωμα. Στη συνέχεια, το αποπτώσωμα συνδέεται με την προκασπάση-9, την ενεργοποιεί και η ίδια πυροδοτεί την ενεργοποίηση της κασπάσης-3 και της κασπάσης-7 (Dejean et al., 2006). Οι κασπάσες 3 και 7 εισέρχονται στον πυρήνα του κυττάρου, διασπούν την πρωτεΐνη PARP (polyADP ribose polymerase) με αποτέλεσμα τον κατακερματισμό του DNA (Du et al., 2000; Garrido et al., 2006).

Σε αυτό το στάδιο, αφού έχει προγραμματιστεί η απόπτωση, απελευθερώνονται οι προ-αποπτωτικών πρωτεΐνες AIF, ενδονουκλεάση G και CAD. Η πρωτεΐνη AIF

μεταναστεύει στον πυρήνα του κυττάρου προκαλώντας συμπύκνωση της χρωματίνης και κατάτμηση του DNA. Ομοίως, η ενδονουκλεάση G, μιτοχονδριακό ένζυμο το οποίο φυσιολογικά συμμετέχει στην αντιγραφή του DNA, στα αποπτωτικά κύτταρα απελευθερώνεται από τα μιτοχόνδρια και μεταναστεύει στον πυρήνα, όπου διασπά την πυρηνική χρωματίνη. Η πρωτεΐνη CAD απελευθερώνεται επίσης από τα μιτοχόνδρια και μετατοπίζεται στον πυρήνα, όμως αλληλεπιδρά με την κασπάση-3, η οποία οδηγεί σε διάσπαση και ενεργοποίηση της CAD, ώστε να προκαλέσει περαιτέρω συμπύκνωση και κατάτμηση της χρωματίνης και DNA, αντίστοιχα (Enari et al., 1998).

1.3.2 Εξωγενές μονοπάτι απόπτωσης

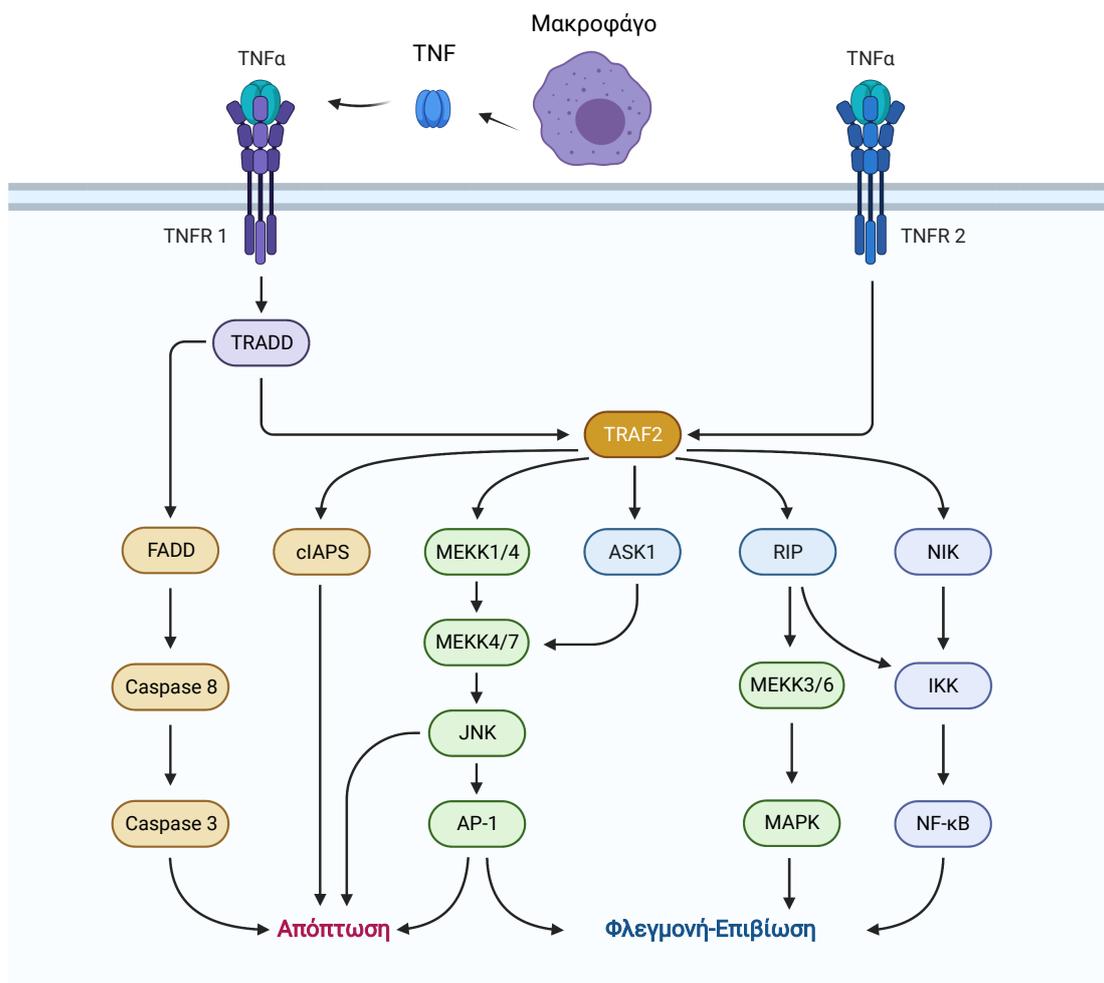
Όσον αφορά το εξωγενές μονοπάτι επαγωγής της απόπτωσης, επικρατούν δύο θεωρίες ως προς την εκκίνηση της απόπτωσης είτε μέσω του παράγοντα νέκρωσης όγκου TNF (Tumor Necrosis Factor) ή της σύνδεσης υποδοχέα Fas- προσδέτη FasL.

1.3.2.1. Μονοπάτι του Fas

Ο υποδοχέας Fas (γνωστός ως Apo-1 ή CD95) συνδέεται με τον προσδέτη Fas (FasL), μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη, μέλος της οικογένειας TNF (Wajant, 2002). Η σύνδεση Fas και FasL οδηγεί στο σχηματισμό του συμπλόκου DISC, το οποίο περιλαμβάνει το FADD, την κασπάση-8 και την κασπάση-10. Σε κυτταρικούς πληθυσμούς τύπου I, η κασπάση-8 πυροδοτεί την άμεση ενεργοποίηση άλλων κασπασών για τη ολοκλήρωση της διαδικασίας της απόπτωσης. Σε κυτταρικούς πληθυσμούς τύπου II, το σύμπλοκο Fas-DISC εγείρει έμμεσα μέσω μιας σύνθετης διαδικασίας την απελευθέρωση προ-αποπτωτικών παραγόντων από τα μιτοχόνδρια και την ενεργοποίηση της κασπάσης 8, η οποία ενεργοποιεί με τη σειρά της, την κασπάση 3 και την κασπάση 7, μέσω ενός μιτοχονδριακά εξαρτώμενου ή μη μηχανισμού, ξεκινώντας τη διαδικασία της απόπτωσης. Ο μιτοχονδριακά εξαρτώμενος μηχανισμός, ξεκινά όταν η κασπάση 8 η οποία έχει ενεργοποιηθεί από τη σύνδεση Fas και FasL στην κυτταρική μεμβράνη, τέμνει την πρωτεΐνη Bid, μέλος της οικογένειας Bcl-2 και απελευθερώνει την καρβοξυτελική της επικράτεια. Η μετατόπιση της καρβοξυτελικής επικράτειας της Bid στη μιτοχονδριακή μεμβράνη επάγει την απόπτωση, εκλύοντας το κυτόχρωμα c (Herr et al., 2007; Hsu et al., 1995; Madesh et al., 2002).

1.3.2.2. Μονοπάτι του TNF

Η σύνδεση του TNF, κυτταροκίνη η οποία παράγεται κυρίως από τα ενεργοποιημένα μακροφάγα, με τον υποδοχέα TNF-R1 επάγει την απόπτωση εκκινώντας ένα μονοπάτι ενεργοποίησης των κασπασών μέσω των πρωτεΐνης θανάτου η οποία σχετίζεται με τον υποδοχέα TNF (TNF receptor-associated death domain ή TRADD) και της πρωτεΐνης θανάτου που σχετίζεται με το FAS (Fas-associated death domain protein ή FADD) (Chen and Goeddel, 2002). Επίσης, η σύνδεση TNF-TNF-R1, έχει σαν αποτέλεσμα την έμμεση ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων φλεγμονής και κυτταρικής επιβίωσης (**Εικόνα 5**).



Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση των διαμέσου TNF μονοπατιών επαγωγής της απόπτωσης, ενεργοποίησης της φλεγμονής και της κυτταρικής επιβίωσης. (Created with BioRender.com)

1.4. Μιτοχόνδρια και παραγωγή ROS

Τα μιτοχόνδρια όπως αναφέρθηκε και παραπάνω αποτελούν τα «εργοστάσια» παραγωγής ενέργειας των κυττάρων, καθώς είναι το σημείο όπου η παραγόμενη ενέργεια από τα ηλεκτρόνια της αναπνευστικής αλυσίδας χρησιμοποιείται στη σύνθεση ATP. Ωστόσο, αποτελούν μία από τις κυριότερες πηγές παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS), καθώς από την ροή των ηλεκτρονίων διαφεύγουν ηλεκτρόνια, που δεν συμμετέχουν σε αναγωγικές αντιδράσεις, τα οποία μεταφέρονται στο οξυγόνο, προκαλούν μερική αναγωγή του και παράγεται O^{2-} αλλά και H_2O_2 (Cadenas and Davies, 2000; Halliwell and Gutteridge, 2015). Αν και τα ακριβή σημεία διαφυγής των ηλεκτρονίων δεν είναι γνωστά, στην πληθώρα των περιπτώσεων φαίνεται να οφείλεται στις φλαβοπρωτεΐνες του συμπλόκου I, στην ελεύθερη ρίζα του συνενζύμου Q και στο σύμπλοκο III (Glasauer and Chandel, 2014).

Αξίζει αν σημειωθεί πως το παραγόμενο O_2^- και H_2O_2 επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τις φυσιολογικές λειτουργίες των κυττάρων (Cadenas and Davies, 2000). Τα ROS αποτελούν κύριους ενδογενείς αποπτωτικούς παράγοντες. Ωστόσο, η παρατηρούμενη διακύμανση της παραγωγής ενέργειας σε ορισμένες ακραίες περιπτώσεις μπορεί να έχει επιβλαβείς επιπτώσεις σχετικά με τη βιωσιμότητα των κυττάρων. Τα μιτοχόνδρια λαμβάνουν και ενσωματώνουν μια σειρά εξωγενών και ενδογενών αποπτωτικών και αντι-αποπτωτικών σημάτων. Μεταξύ των κύριων εξωγενών σημάτων είναι οι στεροειδείς και οι θυρεοειδείς ορμόνες. Ερευνητικά αποτελέσματα αποκαλύπτουν ότι μερικά από τα ορμονικά αποπτωτικά και αντι-αποπτωτικά αποτελέσματα διαμεσολαβούνται από τους αντίστοιχους μιτοχονδριακούς υποδοχείς (Psarra and Sekeris, 2008).

1.5. Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Μέχρι πριν λίγα χρόνια, ο όρος «αντιοξειδωτικό» αφορούσε κάθε ένωση, η οποία όταν βρίσκεται σε μικρή συγκέντρωση, σε σχέση με την συγκέντρωση ενός υποστρώματος που πρόκειται να οξειδωθεί, καθυστερεί ή προλαμβάνει την οξείδωση του συγκεκριμένου υποστρώματος σε μεγάλο βαθμό (Halliwell and Gutteridge, 1995). Ωστόσο, στον παραπάνω ορισμό δεν αναφέρονται τα μόρια-συνοδοί (chaperones), τα συστήματα επιδιόρθωσης και οι αναστολείς που παρεμποδίζουν την παραγωγή των δραστικών μορφών. Έτσι, έχει δημιουργηθεί αντιπαράθεση εντός της επιστημονικής κοινότητας, σχετικά με το αν πρέπει να ονομάζονται ή όχι αντιοξειδωτικά μόρια (Halliwell, 2007). Επομένως, ο ορισμός έχει αναπροσαρμοστεί και ως αντιοξειδωτική ένωση πλέον αναφέρεται οποιαδήποτε χημική ένωση καθυστερεί, προλαμβάνει ή απομακρύνει την οξειδωτική βλάβη σε/από ένα μόριο-στόχο (Gutteridge and Halliwell, 2010). Ο ρόλος τους είναι η εξουδετέρωση της περίσσειας των ελευθέρων ριζών, η προστασία των κυττάρων από τις τοξικές επιδράσεις των ελεύθερων ριζών, καθώς και η πρόληψη των ασθενειών.

Το οξειδωτικό στρες προκαλείται όταν διαταράσσεται η ισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών μορίων ή ουσιών στον οργανισμό με την κλίση να βαίνει υπέρ των πρώτων. Ως αποτέλεσμα της ανισορροπίας αυτής, τα αυξημένα επίπεδα ROS, τα οποία εμπλέκονται σε σημαντικά σηματοδοτικά μονοπάτια και προκαλούν βλάβη στο κύτταρο (Halliwell and Gutteridge, 2015; Zhang et al., 2016), οδηγώντας σε κυτταρικές μεταβολές όπως η γήρανση, η μιτοχονδριακή βλάβη, ο πολλαπλασιασμός ή ο κυτταρικός θάνατος και μεταξύ αυτών και μεταβολικές διαταραχές, οι οποίες προδιαθέτουν σε εμφάνιση πληθώρας παθολογικών καταστάσεων και νοσημάτων. Στα νοσήματα που έχουν συσχετιστεί με το οξειδωτικό στρες περιλαμβάνονται οι παθήσεις του μεταβολικού συνδρόμου, όπως ο σακχαρώδης διαβήτης, η παχυσαρκία, η αθηρωματοσκλήρωση και καρδιαγγειακές διαταραχές, ο καρκίνος, η κυστική ίωση καθώς και φλεγμονώδεις και νευροεκφυλιστικές διεργασίες, όπως η νόσος Alzheimer (Halliwell and Gutteridge, 2015).

Αυξημένα επίπεδα ROS, έχουν αναφερθεί σε διάφορα στάδια του καρκίνου, από τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την απόπτωση, τη διήθηση και μετάσταση στους γύρω ιστούς έως και την αγγειογένεση, και εμπλέκονται με μεταβολές στην κυτταρική σηματοδότηση και γονιδιακή έκφραση, μειώνοντας την αντιοξειδωτική άμυνα και τα επιδιορθωτικά ένζυμα και προάγοντας τη μεταλλαξιγένεση (Ahmadi and Shadboorestan, 2016).

Υπάρχουν σημαντικές αναφορές, ότι μια διατροφή βασισμένη στην κατανάλωση φρούτων, λαχανικών και δημητριακών καρπών, μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου καθώς ορισμένα συστατικά των τροφών αυτών όπως οι πολυφαινόλες μπορούν να επηρεάσουν τις επιγενετικές αλλαγές οι οποίες συμβαίνουν κατά την καρκινογένεση, όπως οι μεθυλιώσεις του DNA και η ρύθμιση των ιστονών (Bishop and Ferguson, 2015).

1.6. Πολυφαινόλες

Οι πολυφαινόλες είναι δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών με σημαντικό ρόλο για τη δομή τους, προσδίδοντας χρώμα, γεύση και σταθερότητα, αλλά και για τη λειτουργία τους. Η σημασία τους έγκειται στη συμμετοχή τους σε βασικές διεργασίες των φυτών, όπως η ανάπτυξη και η αναπαραγωγή τους. Επίσης, συμβάλλουν στην άμυνα των φυτικών οργανισμών εναντίον παθογόνων μικροοργανισμών (βακτηρίων, ιών, μυκήτων) και περιβαλλοντικών παραγόντων, όπως η ακτινοβολία, το όζον, η χαμηλή θερμοκρασία και οι τοξίνες. Επιπλέον, λειτουργούν ως μόρια σηματοδότησης των κυτάρων οδηγώντας στην επαγωγή της μεταγραφής γονιδίων από αυτά (Korkina et al., 2009).

1.6.1. Δομή και κατηγορίες των πολυφαινολών

Οι πολυφαινόλες είναι φαινολικές ενώσεις που στη χημική τους δομή έχουν ως κοινό χαρακτηριστικό έναν (ή και περισσότερους) αρωματικό δακτύλιο υποκατεστημένο με τουλάχιστον μία υδροξυλομάδα. Οι ευεργετικές ιδιότητες των πολυφαινολών, και κυρίως των φλαβονοειδών, σχετίζονται με την παρουσία ελεύθερων ομάδων υδροξυλίων καθώς και με τον αριθμό των συνδεδεμένων γλυκοσιδίων, τα οποία ελαττώνουν την ευεργετική τους δράση μειώνοντας την ικανότητα δέσμευσης ROS (Jing et al., 2015). Οι πολυφαινόλες κατηγοριοποιούνται σύμφωνα με τη χημική τους δομή, την προέλευση, αλλά και τη λειτουργία τους στα βιολογικά συστήματα (Tsao, 2010). Η πιο κοινά χρησιμοποιούμενη διάκριση είναι σε φλαβονοειδή και μη φλαβονοειδή. Στα μη φλαβονοειδή περιλαμβάνονται τα βενζοϊκά οξέα, οι ξανθόνες, τα στιλβένια, οι λιγνάνες, οι χαλκόνες, οι κουμαρίνες και άλλες ουσίες η δομή των οποίων εξαρτάται από τον αριθμό των ανθράκων.

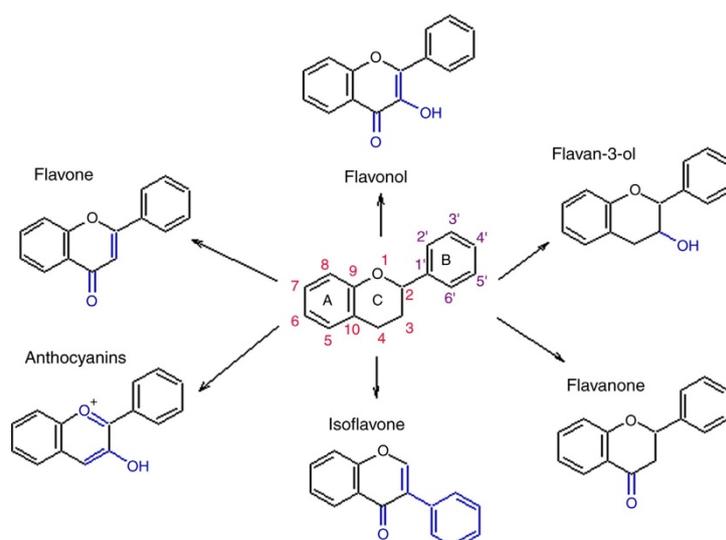
1.6.2. Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή έχουν μελετηθεί περισσότερο από όλες τις κατηγορίες των πολυφαινολών. Οι δύο αρωματικοί δακτύλιοι (A και B) που ενώνονται μεταξύ τους

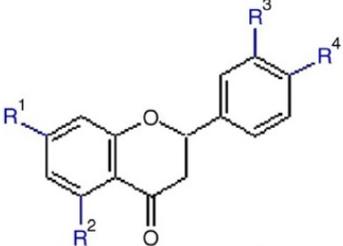
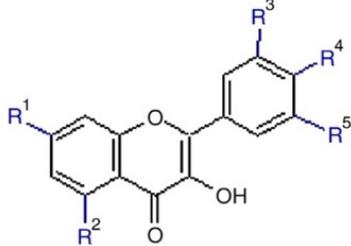
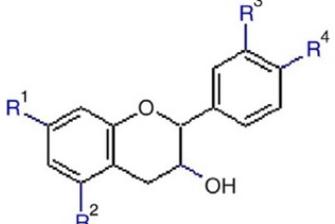
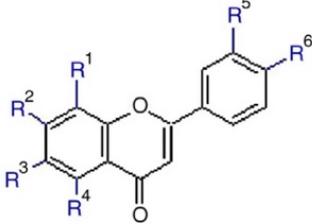
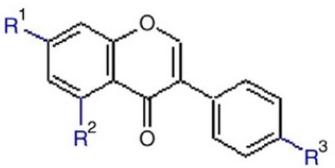
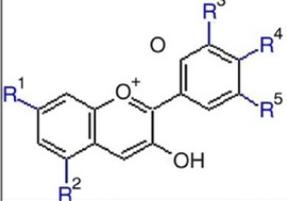
μέσω ενός πυρανικού δακτυλίου (C) που περιέχει οξυγόνο είναι χαρακτηριστικό της χημικής δομής των αυτών των ενώσεων. Στην πληθώρα των φυτικών οργανισμών η πλειοψηφία των φλαβονοειδών συναντάται στη γλυκοσυλιωμένη τους μορφή συζευγμένα με σάκχαρα (Tsao, 2010).

1.6.3. Χημική δομή, ομάδες και υποομάδες φλαβονοειδών

Μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε επιμέρους ομάδες: τις φλαβόνες, τις φλαβονόλες, τις διϋδροφλαβονόλες, τις ανθοκυανιδίνες, τις προανθοκυανιδίνες, τις ισοφλαβόνες, τις φλαβονόλες και τις φλαβάνες. Η παραπάνω διάκριση πραγματοποιείται με βάση τη χημική τους δομή (C6-C3-C6) και πιο συγκεκριμένα με τον αριθμό των αρωματικών δακτυλίων ή με το είδος των ομάδων που έχουν συζευχθεί σε αυτούς (Manach et al., 2004). Αποτελέσματα ερευνών έχουν καταστήσει σαφή την αντιοξειδωτική τους δράση, η οποία συσχετίζεται με την παρεμπόδιση της υπεροξειδωσης των λιπιδίων των κυτταρικών μεμβρανών. Ταυτόχρονα, τα φλαβονοειδή χαρακτηρίζονται από αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινικές ιδιότητες οι οποίες μπορούν να αποδοθούν στην αντιοξειδωτική τους δράση (Korkina et al., 2009).



Εικόνα 6: Χημική δομή κύριων φλαβονοειδών. Η βασική χημική τους δομή C6-C3-C6 αποτελείται από δύο βενζοϊκούς δακτυλίους συνδεδεμένους με έναν πυρανικό δακτύλιο (Calderón-Oliver and Ponce-Alquicira, 2018).

	Flavanones			Flavonols			
							
	<i>Hesperetin</i>	<i>Naringenin</i>	<i>Eriodictyol</i>	<i>Quercetin</i>	<i>Kaempferol</i>	<i>Myricetin</i>	
R1	-OH	-OH	-OH	-OH	-OH	-OH	
R2	-OH	-OH	-OH	-OH	-OH	-OH	
R3	-OH	-H	-OH	-H	-H	-OH	
R4	-O-CH ₃	-OH	-OH	-OH	-OH	-OH	
R5	---	---	---	-OH	-H	-OH	
	Flavanols			Flavones			
							
	<i>(-) -Epicatechin</i>	<i>Quercetin</i>	<i>Luteolin</i>	<i>Apigenin</i>	<i>Bacalein</i>		
R1	-OH	-OH	-H	-H	-H		
R2	-OH	-OH	-OH	-OH	-OH		
R3	-OH	-H	-H	-H	-OH		
R4	-OH	-OH	-OH	-OH	-OH		
R5	---	---	-OH	-H	-H		
R6	---	---	-OH	-OH	-H		
	Isoflavones			Anthocyanins			
							
	<i>Daidzein</i>	<i>Genistein</i>	<i>Cyanidin</i>	<i>Malvidin</i>	<i>Delphinidin</i>	<i>Petunidin</i>	
R1	-OH	-OH	-OH	-OH	-OH	-OH	
R2	-H	-OH	-OH	-OH	-OH	-OH	
R3	-OH	-OH	-OH	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	
R4	---	---	-OH	-OH	-OH	-OH	
R5	---	---	-H	-OCH ₃	-OH	-OH	

Εικόνα 7: Χημική δομή διαφορετικών τύπων φλαβονοειδών (Calderón-Oliver and Ponce-Alquicira, 2018).

1.6.3.1. Ανθοκυανιδίνες

Οι ανθοκυανιδίνες, είναι μια ευρέως διαδεδομένη ομάδα φλαβονοειδών, καθώς αποτελούν βασικά συστατικά των φυτών και υδατοδιαλυτές φυσικές χρωστικές με έντονα χρώματα. Είναι υπεύθυνες για το κόκκινο και μπλε χρώμα πολλών φρούτων και λαχανικών, όπως τα σταφύλια. Η βασική δομή των ανθοκυανιδινών αποτελείται από έναν αρωματικό δακτύλιο [A] συνδεδεμένο με έναν ετεροκυκλικό δακτύλιο [C] που περιέχει ένα μόριο οξυγόνου επίσης συνδεδεμένο με δεσμό C-C σε ένα τρίτο

αρωματικό δακτύλιο [B]. Ανήκουν στις φαινολικές ομάδες και περιέχουν τουλάχιστον μια ομάδα -OH στον βενζολικό τους δακτύλιο. Μεταξύ των πιο κοινών ανθοκυανιδινών είναι η κυανιδίνη, η πεονιδίνη, η δελφινιδίνη, η πελαργονιδίνη, η πετουινιδίνη και η μαλβινιδίνη.

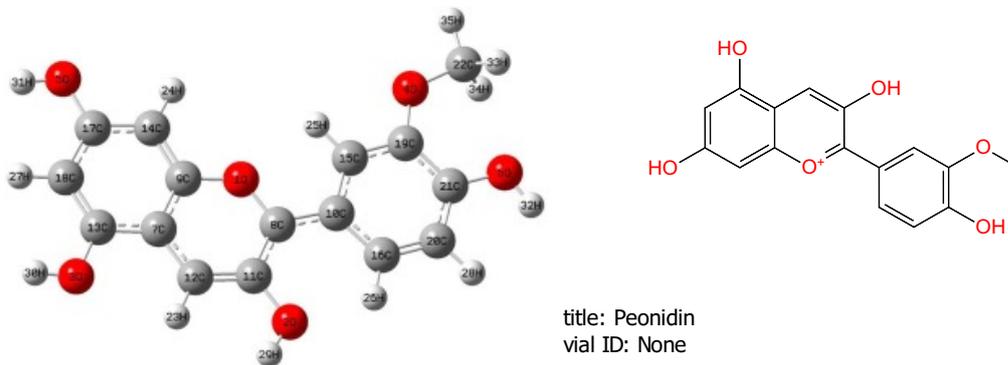
Οι ανθοκυανιδίνες διαθέτουν ευρύ φάσμα ευεργετικών ιδιοτήτων όπως η αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδης δράση τους καθώς και η προστατευτικές επιδράσεις στη λειτουργία του αγγειακού συστήματος (Kuntz et al., 2014; Speciale et al., 2014; Zhu et al., 2013). Πολλές μελέτες εστιάζουν στη συνεργιστική δράση που φαίνεται να έχει η πρόσληψη διαφορετικών ανθοκυανιδινών που περιέχονται στα φρούτα και λαχανικά. Έχει αποδειχθεί η θεραπευτική δράση της χορήγησης δελφινιδίνης και κυανιδίνης σε πειραματικά μοντέλα ποντικών με σακχαρώδη διαβήτη, μέσω της μείωσης της γλυκοζυλίωσης της αιμοσφαιρίνης (Gharib et al., 2013).

Το φραγκοστάφυλο (black-currant) είναι σημαντική πηγή ανθοκυανιδινών και εκχυλίσματα του έχουν δείξει χημειοπροστατευτικές δράσεις έναντι του ηπατοκυτταρικού καρκίνου σε ποντικούς, μείωση του οξειδωτικού στρες και κυτταροτοξικότητα σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του ήπατος HepG2 και του κόλπου HT29 (Bishayee et al., 2010; Thoppil et al., 2012; Wu et al., 2007).

Η απορρύθμιση και η διαφυγή της διαδικασίας της απόπτωσης, μέσω της υπερέκφρασης των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2 και UHRF1, είναι ένας από τους βασικότερους μηχανισμούς με τον οποίον δρουν τα καρκινικά κύτταρα, εξασφαλίζοντας την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό τους (Alhosin et al., 2011; Cimmino et al., 2005). Οι πολυφαινόλες ασκούν την αποπτωτική τους δράση παρεμβαίνοντας στην παραλλαγμένη αυτή σηματοδότηση των καρκινικών κυττάρων με διάφορους τρόπους.

1.6.3.1.1. Πεονιδίνη

Τα ακετυλο-γλυκοσίδια των ανθοκυανιδινών ονομάζονται ανθοκυανίνες και σε αυτές συγκαταλέγεται και η πεονιδίνη μεταξύ άλλων. Η πεονιδίνη είναι υπεύθυνη για την ένταση του χρώματος στα cranberry, αποτελεί μία από τις βασικές ανθοκυανιδίνες και ανήκει στην οικογένεια των θρεπτικών συστατικών των φυτών και συναντάται επίσης στα κεράσια, τα μούρα κ.α. Το όνομα της προέρχεται από το χρώμα του λουλουδιού παιώνια (Paeonia). Στη χημική της δομή φέρει 4 υδροξυλομάδες στις θέσεις 3, 4, 5 και 7 και μια μεθοξυ-ομάδα στη θέση 3 (**Εικόνα 8**). Μελέτες έχουν αποδείξει την αντιοξειδωτική, αντικαρκινική και αντιδιαβητική της ικανότητα (Chen et al., 2005; Rajan et al., 2018). Η πεονιδίνη έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να αναστείλει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων μέσω την αναστολής του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2/M, μειώνοντας την έκφραση των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στον κυτταρικό κύκλο, όπως την εξαρτώμενη από κυκλίνη κινάση 1 και 2, την κυκλίνη B1 και την κυκλίνη E (Chen et al., 2005).



Εικόνα 8: Σταθερή διαμόρφωση της πεονιδίνης.

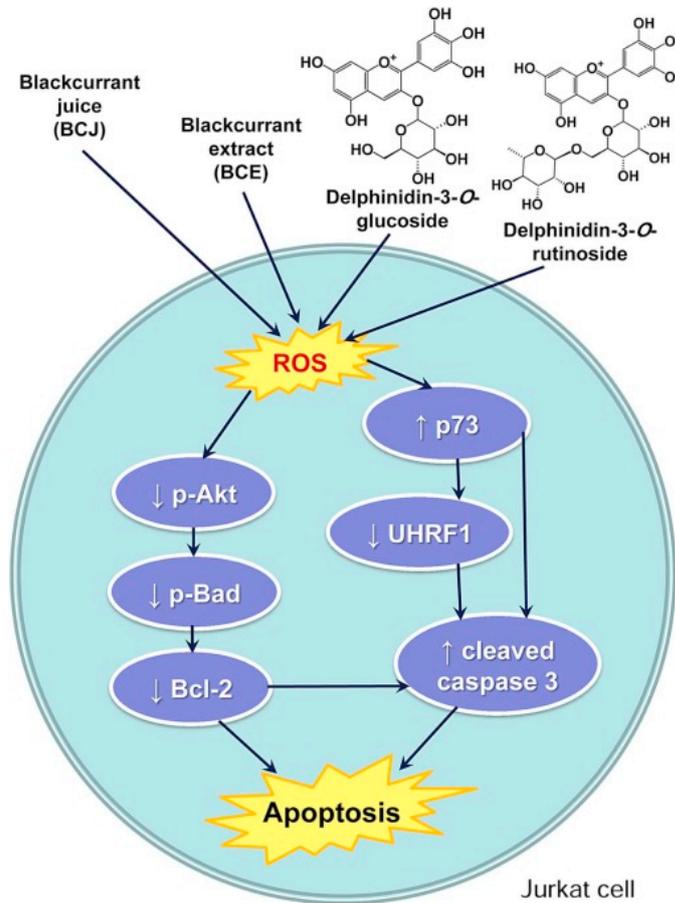
1.6.3.1.2. Δελφινιδίνη

Η δελφινιδίνη ανήκει στην ομάδα των ανθοκυανιδών, ουσίες υπεύθυνες για το κόκκινο-μπλε χρώμα διάφορων φρούτων και λαχανικών. Η δελφινιδίνη είναι η κύρια ανθοκυανιδίνη στη μελιτζάνα, προσδίδοντας παράλληλα το χαρακτηριστικό μωβ χρώμα. Η δελφινιδίνη έχει αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις καθώς και αντι- ή προ-αποπτωτικές ιδιότητες σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους. Εμφανίζει προστατευτικές ιδιότητες, προλαμβάνοντας την ανάπτυξη αθηρωματικής πλάκας και καρδιαγγειακών παθήσεων (Chen et al., 2010). Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι παρουσιάζει αντιοξειδωτική δράση, μειώνοντας τα επίπεδα των ROS και την οξείδωση των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας σε ενδοθηλιακά κύτταρα της ομφαλικής φλέβας (Chen et al., 2010). Στον ίδιο πληθυσμό κυττάρων εμφάνισε επίσης αντι-αποπτωτική δράση, προλαμβάνοντας αποτελεσματικά τη μειωμένη έκφραση των πρωτεϊνών Bcl-2, την επακόλουθη υπερέκφραση των Bax και την επαγωγή της απόπτωσης.

Σε αντίθεση, η δελφινιδίνη εμφανίζει αποπτωτική δράση σε καρκινικά κύτταρα λευχαιμίας μέσω επαγωγής του μονοπατιού των κασπασών και συγκεκριμένα της κασπάσης-3 (**Εικόνα 9**) (León-González et al., 2015). Μια προ-οξειδωτική δράση και παραγωγή ROS, παρά τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των πολυφαινολών συνδέεται με την αποπτωτική τους δράση και σε άλλους καρκινικούς τύπους, όπως το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα (Weisburg et al., 2010). Η προ-αποπτωτική σηματοδότηση συνδέθηκε με αύξηση του σχηματισμού ROS, γεγονός το οποίο ενισχύεται από τη σημαντική μείωση της ενεργοποίησης της κασπάσης-3 παρουσία αντιοξειδωτικών ουσιών (León-González et al., 2015).

Οι προ-αποπτωτικές ιδιότητες της δελφινιδίνης έχουν επίσης αποδειχθεί σε καρκινικά κύτταρα κόλουν HCT116. Η επώαση των κυττάρων αυτών με δελφινιδίνη οδήγησε μείωση της ζωτικότητάς τους και επαγωγή της απόπτωσης μέσω ενεργοποίησης του

μονοπατιού των κασπασών 3, 8 και 9 αλλά και μέσω καταστολής του μονοπατιού NF-κappa B (Yun et al., 2009).



Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση σηματοδοτικού μονοπατιού επαγωγής της απόπτωσης από εκχύλισμα φραγκοστάφυλου (*black-currant*) πλούσιο σε ανθοκυανιδίνες και συγκεκριμένα δελφινιδίνη σε καρκινικά κύτταρα λευχαιμίας *Jurkat*. Η δελφινιδίνη (*Delphinidin-3-O-glucoside* και *Delphinidin-3-O-rutinoside*) και τα εκχυλίσματα *black-currant* μπορούν να επάγουν την απόπτωση μέσω ενός μονοπατιού εξαρτώμενο από την ενεργοποίηση των κασπασών, με αύξηση της έκφρασης της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p73, ενεργοποίηση της κασπάσης-3, μείωση της έκφρασης του UHRF1 και αποφωσφορυλίωση των πρωτεϊνών Akt/ Bad οδηγώντας σε μείωση της έκφρασης των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι ο μηχανισμός επαγωγής της απόπτωσης συνδέθηκε με μια προ-αποπτωτική αύξηση των επιπέδων των ROS, η οποία φαίνεται να είναι σημείο κλειδί στην προ-αποπτωτική σηματοδότηση (León-González et al., 2015).

1.6.3.1.3. Κυανιδίνη

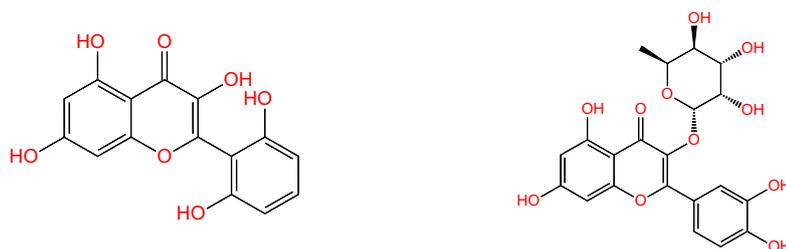
Η κυανιδίνη αποτελεί βασική χρωστική των φρούτων, με μεγάλες συγκεντρώσεις στα κεράσια και τα διάφορα μούρα, όπως τα μούρα Acai (Acai berries), φραγκοστάφυλα (blackberries), αμελάγχιερ (chokeberries), αρκτικά βατόμουρα (arctic bramble berries)

κ.α. Η κυανιδίνη εμφανίζει σημαντική αντιοξειδωτική δράση, παγιδεύοντας τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και προστατεύοντας το κύτταρο από οξειδωτική βλάβη (Sorrenti et al., 2015; Thilavech et al., 2016). Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι εμφανίζει αντι-αποπτωτικές ιδιότητες, οι οποίες βασίζονται στην ικανότητα πρόληψης της οξειδωτικής βλάβης σε β-κύτταρα του παγκρέατος (Lee et al., 2015). Η αντιφλεγμονώδης δράση με μείωση των επιπέδων των φλεγμονωδών κυτταροκινών της έχει αποδειχθεί σε μοντέλα ποντικών με μεταβολικές διαταραχές οι οποίες συσχετίζονται με την παχυσαρκία, όπως η ηπατική λιπώειδωση και η αντίσταση στην ινσουλίνη (Guo et al., 2012).

Εκτός, της αντιοξειδωτικής και αντιφλεγμονώδους δράσης της, η κυανιδίνη εμφανίζει αντικαρκινικές ιδιότητες, παρεμποδίζοντας την *in vitro* μετάσταση και διήθηση καρκινικών κυττάρων πνεύμονα A549 υψηλής μεταστατικής ικανότητας χωρίς την πρόκληση κυτταροτοξικότητας, καθιστώντας την κυανιδίνη μια ουσία με σημαντικές προοπτικές στη θεραπεία του καρκίνου (Chen et al., 2006). Η αντικαρκινική της δράσης ασκείται και μέσω της αύξησης της έκφρασης ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών, όπως είναι η P75NGFR (Sorrenti et al., 2015).

1.6.3.2. Κουερσετίνη

Η κουερσετίνη είναι μία πολυφαινόλη που συναντάται σε πολλά τρόφιμα όπως τα σταφύλια, το σίλι, οι φράουλες, και καταναλώνεται σε καθημερινή βάση. Η ουσία NP-013703 αποτελεί ένα τροποποιημένο φλαβονοειδές κουερσετίνης, με δομή $C_{15}H_{10}O_7$, ενώ η ουσία quercitrin είναι γλυκοσίδιο της κουερσετίνης (quercetin O-glucoside) σχηματίζεται από την κουερσετίνη με υποκατάσταση στη θέση 3 μιας ομάδας α-L-rhamnosyl μέσω ενός γλυκοσιδικού δεσμού (**Εικόνα 10**). Έρευνες που αφορούν την βιοενεργότητα της κουερσετίνης έχουν συσχετιστεί με πληθώρα μονοπατιών, μέσω των οποίων η συγκεκριμένη ουσία μπορεί να παρεμποδίσει ή να καθυστερήσει την εμφάνιση εκφυλιστικών παθήσεων.



title: NP-013703
vial ID: AD205370-04

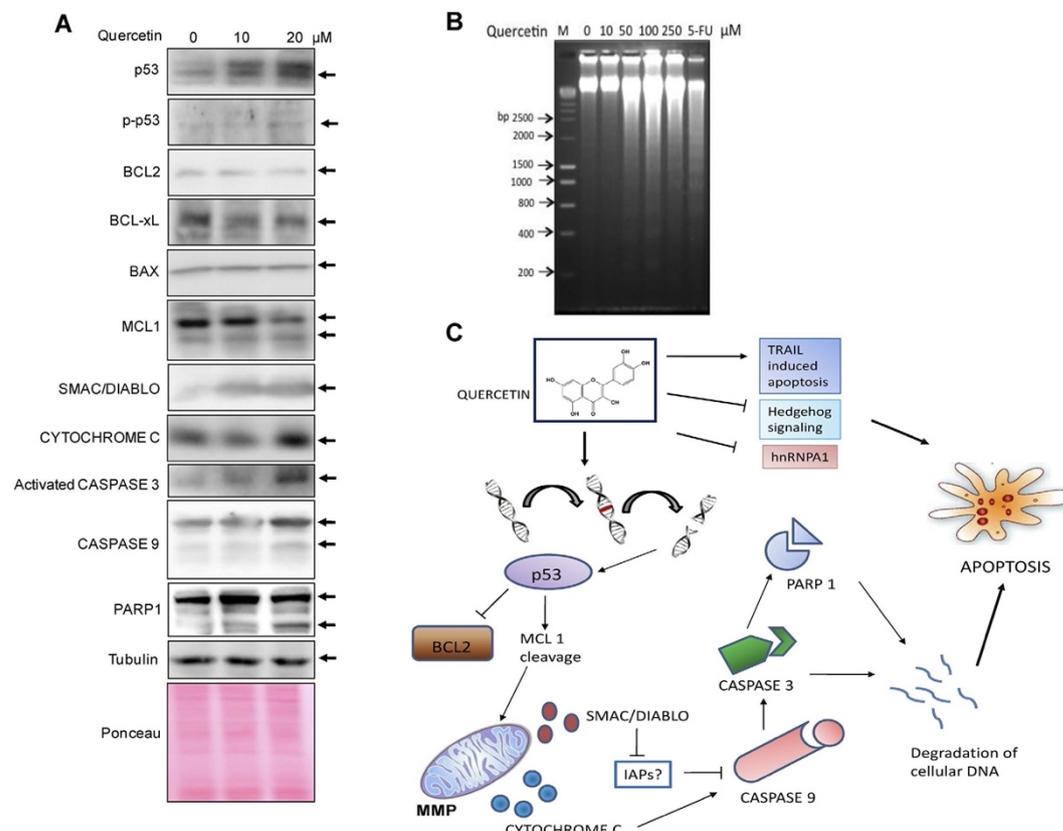
title: Quercitrin
vial ID: None

Εικόνα 10: Τροποποιημένο φλαβονοειδές κουερσετίνης με δομή $C_{15}H_{10}O_7$ (αριστερά) και δομή κουερσιτρίνης, γλυκοσιδίου κουερσετίνης (quercetin O-glucoside) $C_{21}H_{20}O_{11}$ (δεξιά).

Η κουερσετίνη είναι ένα από τα σημαντικότερα φλαβονοειδή με ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, παγιδεύει τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (Hanasaki et al., 1994), και στην

ιδιότητα αυτή βασίζεται και η αντιφλεγμονώδης δράση της (D'Andrea, 2015). Η κυτταροπροστατευτική και αντιοξειδωτική δράση της κουερσετίνης σχετίζεται με τη συσσώρευση του φλαβονοειδούς ενδοκυτταρικά μέσω της δέσμευσης του σε ενδοκυτταρικά συστατικά. Ειδικότερα, έχει αποδειχθεί ότι προστατεύει από μιτοχονδριακή βλάβη και προάγει την επιβίωση των κυττάρων παρουσία δραστικών ριζών ONOO- ή μειωμένων οξειδωτικών εξοκυτταρικών ενώσεων (Fiorani M. et al 2009)

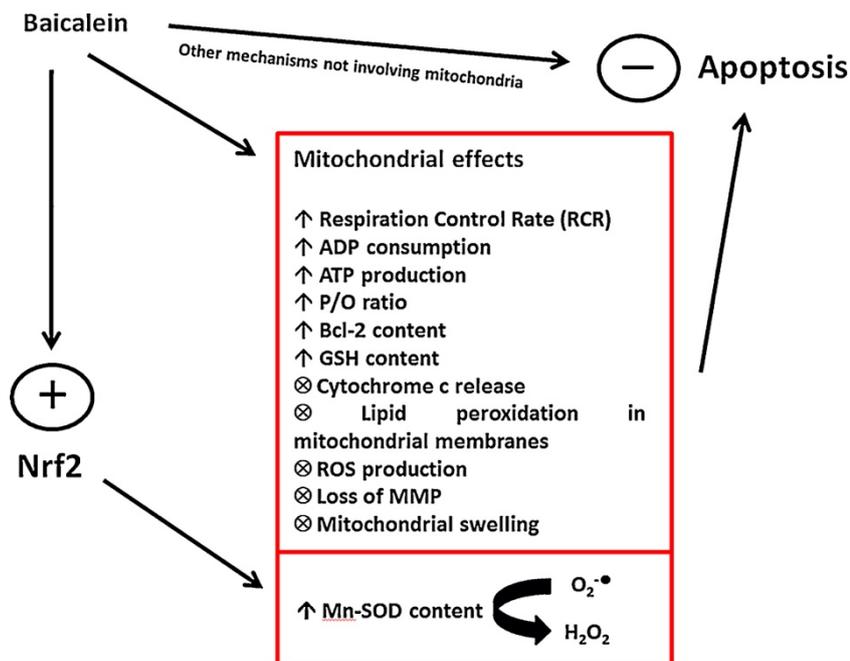
Εκτός από τις αντιοξειδωτικές και αντι-αποπτωτικές της δράσεις, η κουερσετίνη εμπλέκεται στη ρύθμιση της μιτοχονδριακής λειτουργίας, με αλλαγές που αφορούν τη βιογένεση των μιτοχονδρίων, το δυναμικό της μεμβράνης και την παραγωγή του ATP, επηρεάζοντας τις αλυσίδες μεταφοράς των ηλεκτρονίων. Συμπερασματικά, μπορεί να παρεμποδίσει ή και να επάγει την απόπτωση (de Oliveira et al., 2016). Η αντικαρκινική δράση της έχει αποδειχθεί, επάγοντας απόπτωση σε διαφορετικές καρκινικές κυτταρικές σειρές, διαμέσου μονοπατιών εξαρτώμενα από τα ROS (Zhang et al., 2012). Η κουερσετίνη έχει ισχυρή κυτταροτοξική δράση έναντι καρκινικών κυττάρων του αιμοποιητικού ιστού, ενώ εμφανίζει μικρότερη κυτταροτοξικότητα σε καρκινικά κύτταρα μαστού και περιορισμένη σε φυσιολογικά κύτταρα (Srivastava et al., 2016). Ειδικότερα, η κουερσετίνη αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο στη φάση S, επάγοντας απόπτωση μέσω άμεσης επίδρασης στο DNA και ενεργοποίησης του ενδογενούς μιτοχονδριακού μονοπατιού, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* σε ζωικά πρότυπα ποντικών (Εικόνα 11) (Srivastava et al., 2016).



Εικόνα 11: Επίδραση κουερσεΐνης στην έκφραση αποπτωτικών πρωτεϊνών και σηματοδοτικό μονοπάτι επαγωγής της απόπτωσης (Srivastava et al., 2016). **A:** Με Western blot μελετήθηκαν τα πρότυπα έκφρασης των αποπτωτικών πρωτεϊνών: p53, p-p53, Bcl2, Bcl-xL, BAX, MCL 1, κυτόχρωμα C, Smac/Diablo, ενεργοποιημένη κασπάση-3, κασπάση-9, PARP1 and τουμπουλίνη. **B:** Άμεση επίδραση και κατάτμηση του DNA, **C:** Η άμεση βλάβη στο DNA οδηγεί σε υπερέκφραση της πρωτεΐνης p53, η οποία με τη σειρά της οδηγεί σε μειωμένη έκφραση των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2 και διάσπαση της μεμβρανικής πρωτεΐνης MCL-1, με αποτέλεσμα τη διαταραχή του μιτοχονδριακού δυναμικού μεμβράνης MMP και την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και του Smac/Diablo, την ενεργοποίηση των κασπασών 3 και 9 και την επαγωγή της απόπτωσης.

1.6.3.3. Μπαϊκαλεΐνη

Η μπαϊκαλεΐνη (5,6,7-τριυδροξυφλαβόνη) και η μπαϊκαλίνη είναι τα βασικά συστατικά μεταξύ των υπόλοιπων 30 παραγώγων των φλαβονοειδών των ριζών του είδους *Scutellaria baicalensis* Georgi (*Scutellariae radix*) (skullcap), γνωστό εδώ και αρκετά χρόνια στην παραδοσιακή κινέζικη ιατρική. Η μπαϊκαλεΐνη έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον των φαρμακοβιομηχανιών, των βιομηχανιών καλλυντικών και τροφίμων εξαιτίας της σημαντικής βιολογικής της δράσης. Πιο συγκεκριμένα, αυτά τα δύο φλαβονοειδή έχει φανεί πως έχουν αντιφλεγμονώδη δράση καθώς και πως βελτιώνουν την μιτοχονδριακή λειτουργία (**Εικόνα 12**). Επιπλέον, η συνδυαστική τους χρήση σαν χημειοθεραπευτικά πρόσθετα έχει αποκαλύψει την επιθυμητή αντικαρκινική ενεργότητα μέσω της στόχευσης συγκεκριμένων κυτταρικών σειρών και σχετικών σηματοδοτικών μονοπατιών (de Oliveira et al., 2015). Η μπαϊκαλεΐνη επάγει την απόπτωση μέσω του ενδογενούς ή του εξωγενούς μονοπατιού σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές (Gao et al., 2016), αλλά και μέσω του μονοπατιού του Nrf2.



Εικόνα 12: Σύνοψη της επίδρασης της μπαϊκαλεΐνης στο δυναμικό μεμβράνης, τη λειτουργία και την απόπτωση του μιτοχονδρίου. Η μπαϊκαλεΐνη είναι μια πολυφαινόλη που συμβάλλει στην προστασία της μιτοχονδριακής λειτουργίας καθώς έχει αποδειχθεί ότι παρέχει προστασία από τη χημικά προκαλούμενη απόπτωση σε πολλά πειραματικά μοντέλα. Η μπαϊκαλεΐνη αυξάνει τη μιτοχονδριακή δραστηριότητα και βελτιώνει την οξειδοαναγωγική κατάσταση του οργανιδίου. Επιπλέον, παρεμποδίζει τις αλλαγές στη μιτοχονδριακή λειτουργία και το μιτοχονδριακό δυναμικό μεμβράνης που θα οδηγούσαν σε απόπτωση. Η μπαϊκαλεΐνη επίσης, ενεργοποιεί τον παράγοντα Nrf2 που είναι βασικός για την ρύθμιση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των κυττάρων των θηλαστικών και προκαλεί αύξηση της έκφρασης του αντιοξειδωτικού ενζύμου Mn-SOD, που μετατρέπει το $O_2^{\bullet-}$ σε H_2O_2 στο μιτοχόνδριο με αποτέλεσμα τη μείωση της οξειδωτικής βλάβης (de Oliveira et al., 2015).

1.7. Απομάκρυνση των μιτοχονδριακών ROS από τα φλαβονοειδή

Αυξημένα επίπεδα ROS μπορούν να οδηγήσουν στην οξείδωση πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων και λιπιδίων, με δυσμενείς επιπτώσεις για τον οργανισμό, όπως η κυτταρική γήρανση, η μεταλλαξιγένεση και η καρκινογένεση. Οι θετικές επιδράσεις των φλαβονοειδών έχουν αποδοθεί στις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως τα μιτοχόνδρια είναι η κύρια ενδογενής πηγή παραγωγής ROS. Πολλές μελέτες έχουν αποδείξει πως οι φλαβονόλες (κατεχίνες και κουερσετίνη) προστατεύουν τα κύτταρα από το οξειδωτικό στρες μέσω της ενεργοποίησης της μεταγραφής αντιοξειδωτικών ενζύμων. Παρόλο που υπάρχουν αναφορές που διερευνούν τον ακριβή ρόλο των φλαβονοειδών στον καθαρισμό των ROS, υποθέσεις που έχουν γίνει αναφέρουν πως οι προστατευτικές τους δράσεις μπορεί να οφείλονται στην έκθεση των διαφορετικών οργάνων σε αυτές τις ενώσεις ή μέσω της συσσώρευσης τους στα μιτοχόνδρια. Πράγματι, οι ουσίες που στοχεύουν στο

καθαρισμό των ROS που έχουν παραχθεί στα μιτοχόνδρια φαίνεται πως συμβάλλουν στην προστασία από διάφορες μορφές καρκίνου και καρδιακές νόσους (Kicinska and Jarmuszkiewicz, 2020).

1.8. Αντι-αποπτωτικές και προ-αποπτωτικές δράσεις των φλαβονοειδών

Τα φλαβονοειδή εμφανίζουν αντικαρκινικές και κυτταροτοξικές ιδιότητες καθώς εμπλέκονται στη ρύθμιση ποικίλων βιοχημικών μονοπατιών, συμπεριλαμβανομένων μονοπατιών που αφορούν την αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, την αναστολή διαφορετικών σταδίων του κυτταρικού κύκλου, την επαγωγή της απόπτωσης, τη ρύθμιση σηματοδοτικών μονοπατιών που σχετίζονται με την έκφραση σημαντικών ενζύμων.

Παρόλο που αρκετές αναφορές έχουν περιγράψει τις αποπτωτικές δράσεις των φλαβονοειδών και κατ' επέκταση την πιθανή χρήση τους στην πρόληψη του καρκίνου, αρκετά φλαβονοειδή έχει επίσης φανεί πως έχουν πιθανή αντι-αποπτωτική δράση και παρέχουν προστασία στα κύτταρα σε πληθώρα συνθηκών. Στην περίπτωση της πρόκλησης κυτταρικού θανάτου από το μονοπάτι I/R, μία αύξηση των επιπέδων της αναλογίας της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2/ προ-αποπτωτική BAX έχει παρατηρηθεί σε πολλά πειραματικά μοντέλα με διαφορετικά φλαβονοειδή (πχ τιλινίνη, τοιλεολίνη, φλαβόνη του *Bauhinia championii*, κουερσετίνη, μπαϊκαλεΐνη, απιγενίνη και ναρινγενίνη. Ένας ανάλογος μηχανισμός έχει παρατηρηθεί για την κουερσετίνη σε PC12 κύτταρα, καθώς επίσης και για την χρυσίνη σε μοντέλα με νόσο του Parkinson. Επιπλέον, έχει αναφερθεί πως η απόπτωση που προκαλείται από κυτταροτοξικές ουσίες μπορεί να μειωθεί μέσω των φλαβονοειδών (Kicinska and Jarmuszkiewicz, 2020).

Τα καρκινικά κύτταρα στοχεύουν στην αναστολή της μιτοχονδριακής απόπτωσης, υιοθετώντας διάφορα μέσα (Fernald and Kurokawa, 2013). Η αναστολή της μεταβολής στη διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης μέσω αύξησης της έκφρασης των αντι-αποπτωτικών Bcl-2 πρωτεϊνών αποτελεί ένα κοινό και χαρακτηριστικό μηχανισμό παρεμπόδισης της απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων (Tsujiimoto et al, 1984). Ως αίτιο έχει ταυτοποιηθεί μια χρωμοσωμική μετατόπιση του γονιδίου Bcl-2, η οποία ενισχύει την έκφρασή του. Η υπερέκφραση των αντι-αποπτωτικών Bcl-2 σε συνδυασμό με την έκφραση ογκογονιδίων που προωθούν την κυτταρική ανάπτυξη ενισχύουν δραματικά την καρκινογένεση (Strasser et al, 1990). Ένας ακόμη μηχανισμός είναι η μείωση της λειτουργικότητας της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53 η οποία συνδέεται με τις μεμβρανικές πρωτεΐνες **(Εικόνα 11)**. Και οι δύο μηχανισμοί έχουν αναφερθεί ως μηχανισμοί για πρόκληση απόπτωσης κατά του νευροβλαστώματος. Συμπερασματικά, τα φλαβονοειδή μπορούν να παρουσιάσουν αντι-αποπτωτικές ή αποπτωτικές δράσεις, παρεμβαίνοντας στη ρύθμιση της ισορροπίας μεταξύ προ-αποπτωτικών και αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών ή και την έκφραση ογκοκατασταλτικών γονιδίων όπως το p53.

2. Σκοπός

Ο σκοπός της παρούσας ερευνητικής μελέτης ήταν να διερευνήσει την επίδραση απομονωμένων φλαβονοειδών στη μιτοχονδριακή λειτουργία σε καρκινικά κύτταρα ανθρώπινου νευροβλαστώματος. Συγκεκριμένα, να μελετήσει τις επιπτώσεις ενώσεων με αντιοξειδωτική, αντι-αποπτωτική ή προ-αποπτωτική δράση συμπεριλαμβανομένου της κουερσετίνης, της δελφινιδίνης, της πεονιδίνης, της μπαϊκαλεΐνης και της κυανιδίνης στη μιτοχονδριακή λειτουργία καρκινικών κυττάρων SH-SY5Y, λαμβάνοντας υπόψη τον κρίσιμο ρόλο των μιτοχονδρίων στη ρύθμιση της απόπτωσης και γενικότερα της επιβίωσης και ανάπτυξης του κυττάρου.

3. Υλικά και Μέθοδοι

3.1. Υλικά

3.1.1 Οργανολογία

- Συσκευή καθέτου νηματικής ροής (Laminar Flow Hood) Tel Star AV-30/70
- Επωαστήρας: New Brunswick (an Eppendorf Company) Galaxy 170S
- Επωαστήρας: SHEL LAB
- Υδατόλουτρο: P SELECTA
- Ανάστροφο Μικροσκόπιο (αντίθεσης φάσης): A. Kruss Optronic Germany
- Φυγόκεντρος στις κυτταροκαλλιέργειες: Entrofriger- BLII/ PS Selecta®
- Συνεστιακό μικροσκόπιο: LSM 800 Zeiss
- Φυγόκεντρος Helme Z36HK
- Φυγόκεντρος Eppendorf 5810R
- Αναδευτήρας: Heidolph Rotamax

3.1.2. Χημικά αντιδραστήρια

- Acetic acid (Scharlau)
- MitoTracker CMX Ros
- DMSO (Sigma)
- DTT (SERVA)
- EDTA (SERVA)
- ENLITEN® ATP assay (PROMEGA)
- FBS (Gibco®)
- Glycine (SERVA)
- HCl (Merck)
- Hoechst (life technologies)
- KCl (EMSURE)
- L-Glutamine (Gibco)
- Midori Green (Nippon Genetics)
- Na₂HPO₄ (EMSURE)

- NaCl (Scharlan)
- NaOH (Merck)
- RBS 1x (Gibco)
- PMSF (SERVA)
- Polyvinyl Alcohol (PVA) (Sigma)
- SDS (SIGMA)
- TEMED (Applichem)
- TCA (Applichem)
- Tris (SERVA)
- Triton X-100 (Applichem)
- Trypsin-EDTA 5% 10× (Gibco)
- Tween 20 (BioChemica)
- Αιθανόλη (SIGMA)
- Βιοαιθανόλη (Kalochem)
- Γλυκερόλη (Applichem)
- Μεθανόλη (Sigma)
- Πενικιλίνη - Στρεπταμυκίνη (Gibco)
- Μείγμα αναστολέων πρωτεασών (SIGMA)
- Flavonoids: peonidin, cyanidin chloride, delphinidin, quercitrin (quercetin O-glucoside), baicalein, NP-013703

3.1.3. Διαλύματα

- PMSF 200 mM: Για την παρασκευή 2mL PMSF 200 mM διαλύονται 0.07gr PMSF σε 2mL ισοπροπανόλης. Γίνεται ο διαμοιρασμός του σε κλάσματα των 200 μL και αποθηκεύονται στους -20°C. Με αραιώση 10% σε ισοπροπανόλη παρασκευάζονται διαλύματα PMSF συγκέντρωσης 20 mM.
- Tris 20 mM pH 7.5: Σε πλαστικό σωληνάριο τύπου erpendorf (1.5 mLmL) αναμειγνύονται 20μL stock διαλύματος Tris 1 M pH 7.5 (4°C) με 980μL ddH₂O. Το διάλυμα διατηρείται σε R.T.
- Tris-HCl 1.5 M pH 8.8: Για την παρασκευή 0.2 L διαλύματος ζυγίζονται 36,342 gr Tris τα οποία διαλύονται σε dH₂O. Το pH ρυθμίζεται στο 8.8 με προσθήκη HCl 12N και συμπληρώνεται ο όγκος με dH₂O. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4°C.
- TEMED: Χρησιμοποιείται χωρίς κάποια αραιώση, όπως ακριβώς παραλαμβάνεται. Αποθηκεύεται στους 4°C.
- Υπερθειικό αμμώνιο (APS) 10 % (w/v): Παρασκευάζεται διαλύοντας 100 mg APS σε 1mL ddH₂O. Αποθηκεύεται στους -20°C και κατά τη διάρκεια χρήσης του παραμένει σε πάγο (4°C).

- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) 10x: Ζυγίζονται 2 gr KCl, 2,4gr KH_2PO_4 , 17,8 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ και 80 gr NaCl, τα οποία διαλύονται σε όγκο 1L. Αποθήκευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος
- Ρυθμιστικό διάλυμα PBS-T 1x: Αποτελείται από 10% (v/v) ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10x και 1% (v/v) Tween-20. Ο όγκος συμπληρώνεται με dH_2O ή ddH_2O . Αποθήκευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος

3.1.4. Αναλώσιμα

- Σωληνάρια για φύλαξη κυττάρων σε βαθιά κατάψυξη (cryovials ή cryotubes)
- Ειδικές φιάλες για ανάπτυξη ευκαρυωτικών κυττάρων (flasks) (Sarstedt)
- Βαθμονομημένοι σωλήνες με καπάκι (falcons) (15 mL, 50 mL) (Sarstedt)
- Πλαστικά σωληνάρια τύπου eppendorfs (1.5 mL, 2.0 mL) (Sarstedt)
- Πιπέττες ορολογικές - Serological (2, 5, 10 και 25 mL) (Sarstedt)
- Ρύγχοι (0.2-10 μL , 20-200 μL και 100-1000 μL) (Sarstedt)
- Πλάκες κυτταροκαλλιέργειας (well-plates) με 6x και 24x wells (Sarstedt)
- Γυάλινα σιφώνια (Kimble)
- Καλυπτρίδες, coverslips
- Αντικειμενοφόρες πλάκες μικροσκοπίου
- Αιμοκυτταρόμετρο για μέτρηση κυττάρων, Neubauer

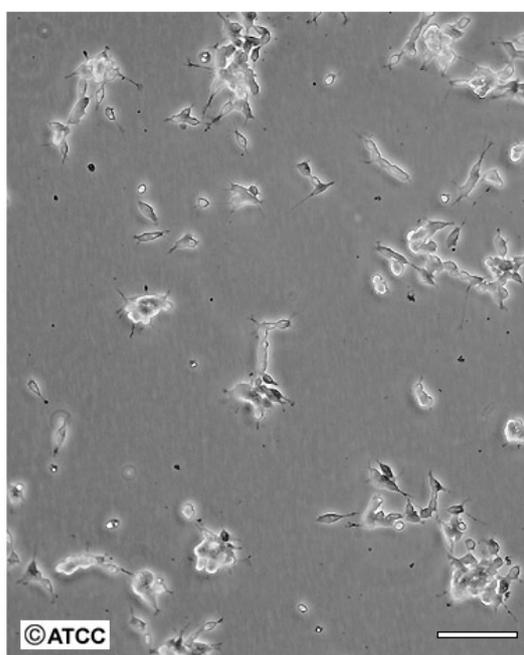
3.1.4. Κυτταρικές Σειρές

Το νευροβλάστωμα είναι ο συχνότερος εξωκρανιακός συμπαγής όγκος στην παιδική ηλικία και σχετίζεται με αυξημένα ποσοστά θνησιμότητας, περίπου 15% των παιδικών νεοπλασιών (Valter et al., 2018). Προέρχεται από το συμπαθητικό νευρικό σύστημα και εμφανίζει μεγάλη ετερογένεια στο βαθμό διαφοροποίησης των κυττάρων, γεγονός που καθιστά δύσκολη τη θεραπεία. Αν και οι μεταλλάξεις τόσο στη πρωτεΐνη p53 όσο και στις αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bcl-2 είναι σπάνιες στο νευροβλάστωμα, η απορρύθμιση του μιτοχονδριακού μονοπατιού και αυξημένα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων Bcl-2 έχουν ταυτοποιηθεί (Goldsmith et al., 2012). Έτσι, θεραπευτικές προσεγγίσεις με στόχευση τη ρύθμιση και τροποποίηση της ισορροπίας μεταξύ προ- και αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών είναι πολλά υποσχόμενες.

Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν οι σταθερά διαμολυσμένες κυτταρικές σειρές SH-SY5Y, οι οποίες δημιουργήθηκαν από τον υποψήφιο διδάκτορα Τσιάλτα Ιωάννη στο πλαίσιο της διατριβής του και υπερεκφράζουν, την πρωτεΐνη “σημαία” GFP, την πρωτεΐνη GFP με μιτοχονδριακή στόχευση “mtGFP”, τη χιμαιρική πρωτεΐνη “GFP ERβ” και τη χιμαιρική πρωτεΐνη “mtGFP ERβ”. Στις περισσότερες κυτταρικές σειρές, τα μιτοχόνδρια κατανέμονται σε ένα ωοειδούς σχήματος δίκτυο ή με δομή πολλαπλών βραχιόνων, ακολουθώντας την κατανομή των μικροσωληνίσκων.

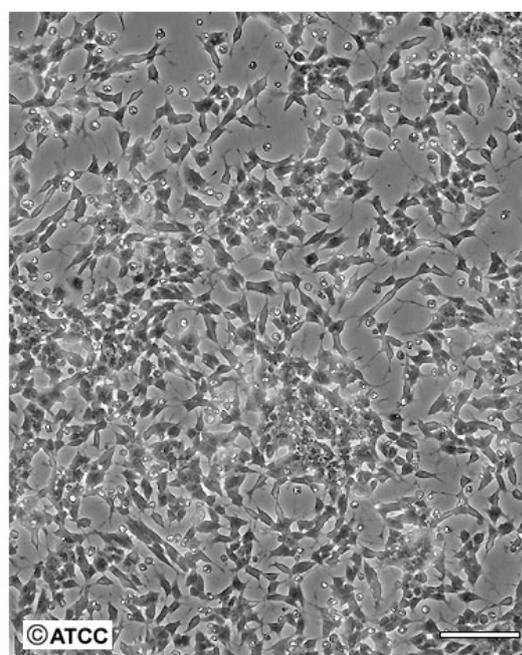
Πληροφορίες από ATCC για την κυτταρική σειρά SH-SY5Y (ATCC® CRL-2266TM)
Οργανισμός: Homo sapiens, human
Ιστός: μυελός των οστών
Κυτταρικός τύπος: επιθηλιακά κύτταρα
Ασθένεια: νευροβλάστωμα
Στέλεχος: A
Καρυότυπος: μη σταθερός που κυμαίνεται από 94-98 χρωμοσώματα
Μορφολογία: Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε ομάδες, και έχουν πολλαπλές βραχείες και λεπτές προεξοχές τους δενδρίτες και τους νευράξονες, ανάλογα με το βαθμό διαφοροποίησής τους.

ATCC Number: **CRL-2266**
Designation: **SH-SY5Y**



© ATCC
Low Density

Scale Bar = 100µm



© ATCC
High Density

Scale Bar = 100µm

Εικόνα 13: Κυτταρικοί πληθυσμοί καρκινικών κυτάρων ανθρώπινου νευροβλαστώματος SH-SY5Y.

3.1.5. Θρεπτικά Υλικά

- Dulbecco's modified eagle medium DMEM Gibco® 1g/mol Glucose (Life Technologies - Invitrogen)
 - [+] L-glutamate, [+] pyruvate
- Dulbecco's modified eagle medium DMEM Gibco® 1g/mol Glucose (Life Technologies - Invitrogen)
 - [-] L-glutamate, [-] phenol red

3.2. Μέθοδοι

3.2.1. Βασικές Αρχές Κυτταροκαλλιέργειών

3.2.1.1. Ξεπάγωμα κυτάρων

Οι κυτταρικές σειρές φυλάσσονται σε φιαλίδια (vials) στους -80°C ή σε υγρό άζωτο στους -120°C . Η προετοιμασία του θρεπτικού μέσου είναι το πρώτο βήμα πριν την έναρξη της διαδικασίας ξεπαγώματος, ώστε μόλις ξεπαγώσει το φιαλίδιο να τοποθετηθούν άμεσα τα κύτταρα σε αυτό. Το θρεπτικό μέσο πρέπει να έχει μικρότερη συγκέντρωση DMSO, σε σύγκριση με το θρεπτικό μέσο φύλαξης. Όλα τα θρεπτικά και τα απαραίτητα υλικά τοποθετούνται στο θάλαμο κάθετου νηματικής ροής (laminar flow hood), όπου πραγματοποιούνται όλες οι διαδικασίες σε στείρες συνθήκες. Μόλις τα κύτταρα ξεπαγώσουν, τοποθετούνται σε 4mL θρεπτικού υλικού DMEM 1g/mol γλυκόζης σε δοκιμαστικό σωλήνα (falcon) των 15mL, ο οποίος έχει ήδη τοποθετηθεί στο θάλαμο νηματικής ροής με μερικώς ανοιχτό το καπάκι. Μια καινούργια φλάσκα κυτταροκαλλιέργειας, έχει τοποθετηθεί επίσης με μερικώς ανοιχτό το καπάκι κάθετα στο θάλαμο νηματικής ροής.

Το φιαλίδιο με τα κύτταρα αφού βγει από τους -80°C , τοποθετείται στο υδατόλουτρο με προσοχή το καπάκι να μην έρχεται σε επαφή με το νερό, αλλά να καλύπτει το μεγαλύτερο μέρος του. Μετά από 3-4 min, το περιεχόμενο του φιαλιδίου έχει αρχίσει να υγροποιείται, αλλά δεν έχει ξεπαγώσει πλήρως και μια μικρή ποσότητα πάγου έχει παραμείνει. Τη στιγμή αυτή, απομακρύνεται από το υδατόλουτρο και μετά από καλό στέγνωμα του φιαλιδίου, γίνεται αποστείρωση με αιθανόλη 70% και τοποθέτησή του σε στατώ εντός του θαλάμου νηματικής ροής. Με προσοχή να μην έρθουν σε επαφή τα κύτταρα με την αιθανόλη ανοίγουμε το καπάκι. Με σιφώνιο των 2mL λαμβάνεται το περιεχόμενο του vial και τοποθετείται στο falcon με τα 4mL θρεπτικού, το οποίο όπως αναφέρθηκε είχε τοποθετηθεί στο θάλαμο νηματικής ροής κατά την προετοιμασία. Ακολουθεί φυγοκέντρηση του falcon για 5min σε 1000rpm στους $20-25^{\circ}\text{C}$. Η φλάσκα κυτταροκαλλιέργειας σημαίνεται με όλα τα στοιχεία των κυτάρων (όνομα κυτταρικής σειράς, ημερομηνία παγώματος και ξεπαγώματος, θρυψινοποίηση-passage).

Μετά τη φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο αναρροφάται με γυάλινη πιπέτα Pasteur και το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 5mL θρεπτικού μέσου, DMEM 1g/mol glucose (low glucose). Το επαναδιαλυτοποιημένο περιεχόμενο με τη χρήση πιπέτας των 5 ή 10mL τοποθετείται στη φλάσκα και ακολουθεί η μικροσκοπική εξέταση των κυττάρων ως προς τη μορφολογία και τον αριθμό τους. Τα φυσιολογικά νευρικά κύτταρα είναι σχετικά μεγάλα, στρογγυλά και πολλά, καθώς για την ανάπτυξη τους είναι απαραίτητο να βρίσκονται σε μεγάλους πληθυσμούς στο θρεπτικό μέσο. Επίσης, είναι σημαντικό να επιπλέουν, να είναι διαπερατά στο φως και να μην υπάρχουν συσσωματώματα κυττάρων. Μετά τη μικροσκοπική παρατήρηση, τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο, σε συνθήκες 37°C και 5.0% CO_2 .

3.2.1.2. Θρυψινοποίηση

Η θρυψίνη είναι πρωτεολυτικό ένζυμο και χρησιμοποιείται στις κυτταροκαλλιέργειες για τη διάσπαση των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην προσκόλληση των κυττάρων τόσο στο τοίχωμα της φλάσκας όσο και στα γειτονικά κύτταρα. Η διαδικασία ονομάζεται θρυψινοποίηση και είναι απαραίτητη σε περιπτώσεις κορεσμού (80-90% κάλυψης της επιφάνειας της φλάσκας), σε περιπτώσεις δημιουργίας συσσωματωμάτων αλλά και γενικότερα πριν τη χρήση ή τη μεταφορά κυττάρων. Η κάθε θρυψινοποίηση αντιστοιχεί σε ένα πέρασμα (passage).

Κατά την έναρξη της διαδικασίας η θρυψίνη και τα θρεπτικά μέσα τοποθετούνται στο υδατόλουτρο στους 37°C. Το θρεπτικό μέσο, το οποίο προϋπήρχε στη φλάσκα, αναρροφάται και τοποθετείται 1-1.5mL θρυψίνη. Κλείνουμε τη φλάσκα και αναδεύουμε με ήπιες κινήσεις ώστε όλα τα κύτταρα να διαβρέχονται από θρυψίνη. Παρατηρούμε μικροσκόπιο τα κύτταρα για λίγο και τοποθετούμε άμεσα τη φλάσκα στον επωαστικό κλίβανο για 1-2min. Αφού περάσει ο χρόνος (συνήθως το πρώτο λεπτό), εξετάζουμε στο μικροσκόπιο. Ιδανικά όλα τα κύτταρα, μεμονωμένα ή σε συσσωματώματα πρέπει να επιπλέουν. Αν δεν έχουμε αυτήν τη εικόνα, ανακινούμε με ήπιες κινήσεις τη φλάσκα ή τοποθετούμε για μισό λεπτό ξανά στον κλίβανο και παρατηρούμε ξανά. Ο χρόνος έκθεσης των κυττάρων στη θρυψίνη είναι κρίσιμος και πρέπει να ελέγχεται αυστηρά καθώς η παρατεταμένη πρωτεόλυση των μεμβρανικών πρωτεϊνών μπορεί να προκαλέσει κυτταροτοξικότητα.

Στη συνέχεια, η φλάσκα τοποθετείται σε όρθια θέση στο θάλαμο νηματικής ροής και προστίθενται 4mL θρεπτικού μέσου, τα οποία και σταματούν τη δράση της θρυψίνης. Το περιεχόμενο της φλάσκας μεταφέρεται σε falcon των 15mL και φυγοκεντρείται για 5min 1000rpm στους 20-25 °C. Αφού ολοκληρωθεί η φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε θρεπτικό μέσο. Τα κύτταρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν περαιτέρω ή να επανατοποθετηθούν στη φλάσκα ανάπτυξης, η οποία συμπληρώνεται με θρεπτικό υλικό DMEM 1g/mol glucose.

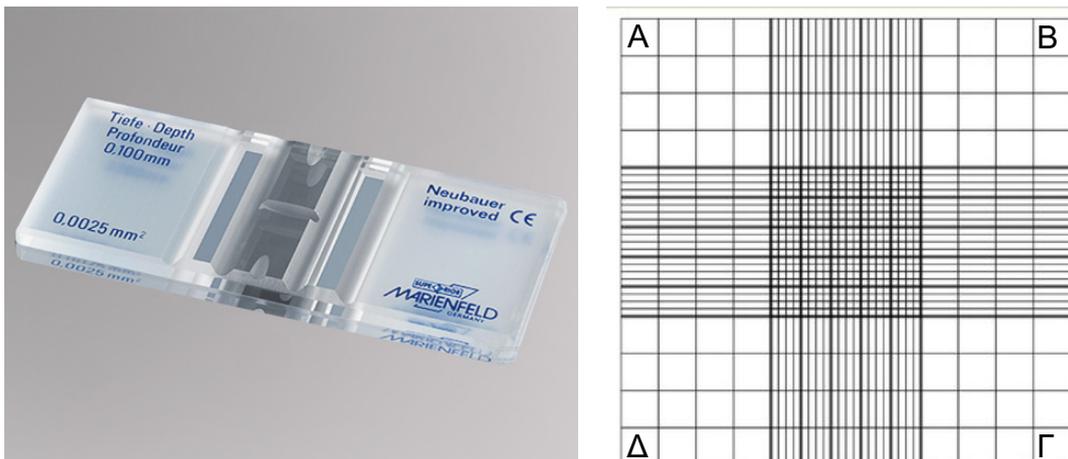
3.2.1.3. Πάγωμα κυττάρων

Κατά την προετοιμασία, όλα τα απαραίτητα υλικά (FBS, θρυψίνη και θρεπτικά μέσα) τοποθετούνται στο υδατόλουτρο στους 37°C, ώστε να ξεπαγώσουν. Παράλληλα γίνεται προετοιμασία και σήμανση (όνομα, ημ/νια, passage) δύο νέων φιαλιδίων (cryovial) για το πάγωμα των κυττάρων στους -80° C. Συνήθως παγώνουμε δύο cryovial αλλά ο αριθμός εξαρτάται από το συνολικό αριθμό των κυττάρων και τις ανάγκες ανακαλλιέργειας. Αφού υπολογίσουμε τα mL FBS που θα χρειαστούν για δύο cryovial και ανακαλλιέργεια, λαμβάνοντας υπόψη ότι απαιτούνται 0,9mL FBS /vial, πραγματοποιείται θρυψινοποίηση των κυττάρων. Αφού ολοκληρωθεί η φυγοκέντρηση, απορρίπτεται το υπερκείμενο και το ίζημα διαλυτοποιείται στην υπολογισμένη ποσότητα του FBS. Σε κάθε cryovial τοποθετούνται 0,9 mL FBS με τα κύτταρα. Η υπόλοιπη ποσότητα, επανατοποθετείται στη φλάσκα, συμπληρώνεται (έως τα 5mL) με θρεπτικό μέσο DMEM Low Glucose και τοποθετείται στον επωαστικό κλίβανο. Σε

κάθε cryovial προστίθεται 0,1mL DMSO, γίνεται συνεχόμενη ανάδευση πάνω- κάτω και τα cryovials τοποθετούνται στους -80°C άμεσα καθώς το DMSO είναι εξαιρετικά κυτταροτοξικό. Τέλος, γίνεται αρχειοθέτηση των cryovial, σημειώνοντας τη θέση τους σε κατάλληλο αρχείο.

3.2.1.4. Καταμέτρηση και στρώσιμο κυττάρων

Πριν τα κύτταρα χρησιμοποιηθούν σε διάφορες ερευνητικές διαδικασίες όπως η μελέτη επίδρασης ουσιών ή η μελέτη κυτταρικής απόκρισης με ανοσοϊστοχημικές τεχνικές (IHC) είναι απαραίτητη η καταμέτρηση του κυτταρικού πληθυσμού και η ισόποση τοποθέτηση του ή στρώσιμο σε πλάκες κυτταροκαλλιέργειας (well-plates). Πριν τη διαδικασία της καταμέτρησης του κυτταρικού πληθυσμού, προηγείται η διαδικασία της θρυψινοποίησης. Μετά τη φυγοκέντρηση και επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος, η οποία σε περίπτωση μέτρησης πρέπει να είναι ακριβής, λαμβάνονται 10μL από τα κύτταρα και τοποθετούνται εντός της καλυπτρίδας στο αιμοκυτταρόμετρο neubauer. Η πλάκα neubauer εξετάζεται στο μικροσκόπιο, εστιάζοντας στα τεταρτημόρια και καταμετρώντας τον αριθμό των κυττάρων σε κάθε τεταρτημόριο.



Εικόνα 14: Απεικόνιση αιμοκυτταρομέτρου neubauer (αριστερά) και των τεταρτημόριων όπως απεικονίζονται μικροσκοπικά ύστερα από μεγέθυνση (δεξιά).

Κατά τη μικροσκόπηση, αρχικά εστιάζουμε στο σταυρό και στη συνέχεια από το κέντρο του μπορούμε να διαχωρίσουμε τα τεταρτημόρια (**Εικόνα 14**). Συνήθως, το 1^ο πάνω αριστερά τεταρτημόριο, ονομάζεται Α, το αμέσως διπλανό του Β, κάτω από το Β είναι το Γ και αριστερά του Γ (δηλ. κάτω από το Α) είναι το Δ. Η καταμέτρηση γίνεται με κατεύθυνση από το Α προς το Δ και καταγράφεται ο αριθμός των κυττάρων σε κάθε τεταρτημόριο. Ο μέσος όρος των κυττάρων ανά τεταρτημόριο υπολογίζεται ως εξής: $\mu.o. = (A+B+\Gamma+\Delta)/4$ και πολλαπλασιάζεται με το 10.000. Με αυτόν τον τρόπο υπολογίζουμε κατά προσέγγιση τον αριθμό των κυττάρων/ mL, στο συγκεκριμένο κυτταρικό πληθυσμό.

Διαιρώντας τον επιθυμητό αριθμό κυττάρων προς τον αριθμό κυττάρων του πληθυσμού, μπορούμε να υπολογίσουμε τον όγκο (mL) που χρειαζόμαστε από το

επαναδιαλυτοποιημένο κυτταρικό ίζημα της φυγοκέντρωσης για τη πειραματική διαδικασία. Η επαναδιαλυτοποίηση γίνεται πριν από την καταμέτρηση, ώστε ο κυτταρικός πληθυσμός να είναι ομοιογενής στο θρεπτικό μέσο. Ο επιθυμητός όγκος τοποθετείται σε νέο falcon φυγοκεντρείται για 5min 1000rpm στους 20-25°C και μπορεί να χρησιμοποιηθεί, ενώ τα υπόλοιπα κύτταρα συνήθως επιστρέφονται για ανακαλλιέργεια.

Για πειράματα ανοσοκυτταροχημείας, απαιτείται η τοποθέτηση αποστειρωμένων καλυπτρίδων (coverslips) εντός των βοθρίων (wells) σε well plates. Μετά την τοποθέτηση των καλυπτρίδων, στο χώρο των κυτταροκαλλιιεργειών, τα well plates παραμένουν στο θάλαμο καθέτου νηματικής ροής υπό τη δράση του UV light, για τουλάχιστον μισή ώρα, ώστε να γίνει πλήρης αποστείρωση. Τέλος, τα κύτταρα τοποθετούνται εντός των βοθρίων και το πιάτο κλείνει. Για να είναι ομοιόμορφη η κατανομή των κυττάρων εντός βοθρίων γίνεται μία ήπια περιφερική κίνηση της πλάκας με προσοχή να μην είναι γίνει έντονη ανακίνηση, καθώς λόγω του στατικού ηλεκτρισμού και της δύνης μπορεί να δημιουργηθούν συσσωματώματα κυττάρων. Πριν τα πιάτα τοποθετηθούν στον επωαστικό κλίβανο, πραγματοποιείται μικροσκοπική εκτίμηση του αριθμού και της μορφολογίας τους.

3.2.1.5. Συλλογή

Η συλλογή κυττάρων (harvesting) πραγματοποιείται συνήθως μετά το πέρας καθορισμένου χρόνου σύμφωνα με το πειραματικό πρωτόκολλο. Κατά τη διαδικασία της συλλογής των κυττάρων από τα βοθρία, αναρροφάται το θρεπτικό υλικό και γίνεται μια πλύση με PBS 1x (500μL). Με μια ράβδο scraper (ράβδος με πλαστική εύκαμπτη επιφάνεια στην άκρη) σύρουμε ολόκληρη την επιφάνεια του βοθρίου ώστε να ξεκολλήσουν τα κύτταρα και τα συλλέγουμε σε αποστειρωμένα φιαλίδια τύπου erpendorf σε πάγο. Ακολουθεί μια δεύτερη πλύση με PBS 1x (500μL) και πάλι χρησιμοποιούμε το scraper στην επιφάνεια του βοθρίου αν χρειάζεται. Αφού τα κύτταρα συλλεχθούν στα erpendorfs, φυγοκεντρώνται για 5min στα 1500rpm σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα με τα κύτταρα είτε αποθηκεύεται στους -80°C ή χρησιμοποιείται για την άμεσα σε πειραματική διαδικασία. Προσοχή, είναι απαραίτητη η φυγοκέντρωση και η αφαίρεση του υπερκείμενου πριν την αποθήκευση στους -80°C, καθώς σε περίπτωση αποθήκευσης με το PBS ή το θρεπτικό υλικό υπάρχει ο κίνδυνος λύσης των κυττάρων.

3.2.2. Ανοσοκυτταροχημεία- Συνεστιακή Μικροσκοπία

Με την τεχνική της ανοσοκυτταροχημείας είναι δυνατός ο προσδιορισμός και η ανίχνευση μορίων στην επιφάνεια ή στο εσωτερικό των κυττάρων με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων συνδεδεμένων με φθορίζουσες χρωστικές, τα οποία στοχεύουν τα υπο μελέτη μόρια. Η τεχνική μπορεί να εφαρμοστεί τόσο σε ζωντανά αλλά και σε μονιμοποιημένα κύτταρα. Η αρχή της διαδικασίας, πραγματοποιείται στην αίθουσα των κυτταροκαλλιιεργειών, όπου πριν από την προσθήκη των κυττάρων στα ειδικά βοθρία, τοποθετούνται καλυπτρίδες (coverslips). Μετά την τοποθέτησή τους, οι

καλυπτρίδες αφήνονται για τουλάχιστον μισή ώρα υπό την ακτινοβολία του UV ώστε να γίνει αποστείρωση. Στη συνέχεια, ακολουθεί η τεχνική της μονιμοποίησης (fixation), αν πρόκειται για μονιμοποιημένα κύτταρα, η επώαση με τα αντισώματα (πρωτογενή και δευτερογενή) και η επικόλληση των καλυπτρίδων σε αντικειμενοφόρους πλάκες ώστε να παρατηρηθούν στο μικροσκόπιο.

Στην παρούσα μελέτη, η σήμανση των μορίων πραγματοποιήθηκε με κατάλληλους φθορίζοντες δείκτες απευθείας χωρίς την σύζευξή του με αντισώματα. Τα ζωντανά κύτταρα επώαστηκαν με τους φθορίζοντες δείκτες Hoechst 33258 και MitoTracker™ CMXRos και ακολούθησε η μονιμοποίησή τους.

Για τη σήμανση του πυρήνα, η χρωστική Hoechst αραιώνεται σε αναλογία 1:1000 σε θρεπτικό μέσο low glucose, για παράδειγμα, στα 2mL θρεπτικού γίνεται προσθήκη 2μL Hoechst, ενώ γίνεται προσθήκη της χρωστικής MitoTracker™ Red CMXRos για σήμανση των μιτοχονδρίων.

Ακολουθεί επώαση 20-30 λεπτά στον επωαστικό κλίβανο. Τα well plates μεταφέρονται στον πάγκο του εργαστήριο από το χώρο των κυτταροκαλλιιεργειών όπου ακολουθεί η διαδικασία της μονιμοποίησης. Για τη μονιμοποίηση, γίνεται αρχικά έκπλυση με PBS (500μL σε κάθε βοθρίο), προσθήκη 500μL μεθανόλης -20°C και τοποθέτηση των πλακών στους -20°C για 10min. Στη συνέχεια ακολουθούν 2 πλύσεις με κρύο PBS 1x. Τέλος, πραγματοποιείται σταθεροποίηση των καλυπτρίδων με την προσθήκη μίας σταγόνας ρυθμιστικού διαλύματος πολυβινυλ-αλκοόλης (PVA), σε αντικειμενοφόρο πλάκα,

Οι αντικειμενοφόρες πλάκες, τοποθετούνται σε ειδική κασετίνα, όπου αφήνονται στους 4°C, για να στεγνώσουν για 24 ώρες σε RT πριν την παρατήρησή τους στο συνεστιακό μικροσκόπιο. Το ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει πολυβινυλ-αλκοόλη χρησιμοποιείται τόσο για τη σταθεροποίηση των καλυπτρίδων όσο και για την προστασία των δειγμάτων από εξασθένηση του φθορισμού.

3.2.2.1. Hoechst 33258

Η Hoechst 33258 είναι μια φθορίζουσα χρωστική-δείκτης, η οποία συνδέεται στη μικρή αύλακα του DNA, προσδίδοντας μπλε χρώμα που αντιστοιχεί στο DNA του πυρήνα ζωντανών ή μη κυττάρων.

3.2.2.2. MitoTracker CMXRos Red

Για την εκτίμηση του δυναμικού μεμβράνης μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορες κατιονικές φθορίζουσες χρωστικές. Οι χρωστικές αυτές είναι σημαντικό να είναι διαπερατές διαμέσου των μεμβρανών και να μη δεσμεύονται, παραμόνο ελάχιστα, στις μεμβράνες. Τα κατιόντα ελκύονται από το αρνητικά φορτισμένο δυναμικό, περνούν ως την εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και συσσωρεύονται στα μιτοχόνδρια των ζωντανών κυττάρων, διασχίζοντας πολύ αποτελεσματικά τις υδρόφοβες μεμβράνες (Yousif et al., 2009).

Η χρωστική MitoTracker CMXRos εμφανίζει μεγάλη ευαισθησία στις μεταβολές του διαμεμβρανικού μιτοχονδριακού δυναμικού ($\Delta\Psi_m$) και προσφέρει τη δυνατότητα ποσοτικοποίησης (αυξημένη ή μειωμένη ένταση χρώματος) εκτός της ποιοτικής εκτίμησης (αλλαγής χρώματος) αυτών των μεταβολών (Cottet-Rousselle et al., 2011). Η κατανομή της χρωστικής εξαρτάται από το $\Delta\Psi_m$, όσο πιο αρνητικά φορτισμένα το δυναμικό τόσο μεγαλύτερη η συσσώρευση της θετικά φορτισμένης χρωστικής και καθορίζεται από την εξίσωση του Nernst, $V = -\frac{RT}{ZF} \ln \frac{C_i}{C_o}$, όπου V:δυναμικό μεμβράνης, Z: ιοντικό φορτίο, R: ιδανική σταθερά αερίων, T: θερμοκρασία, F: σταθερά Faraday, C_i , C_o : ενδοκυτταρική και εξωκυτταρική συγκέντρωση ιόντων (Ehrenberg et al., 1988). Η εκτίμηση του $\Delta\Psi_m$ διαφέρει στα απομονωμένα μιτοχόνδρια και στα ακέραια κύτταρα, λόγω της παρουσίας της πλασματικής μεμβράνης.

Σε αντίθεση με τις κοινές χρωστικές οι οποίες ξεπλένονται εύκολα μόλις χαθεί το δυναμικό μεμβράνης, η CMXRos διαπερνά με παθητική διάχυση την πλασματική μεμβράνη και συσσωρεύεται στα ζωντανά μιτοχόνδρια, όπου δεσμεύεται διαμέσου της ενεργής θειόλης της χλωρομεθυλικής ομάδας (thiol-reactive chloromethyl moiety) που περιέχει στη δομή της, η οποία είναι υπεύθυνη για τη διατήρηση της χρωστικής στα μιτοχόνδρια. Η CMXRos ανήκει στην οικογένεια μορίων ροζαμίνης και έχει το πλεονέκτημα να διατηρείται στο κύτταρο μετά τη μονιμοποίηση με φορμαλδεΐδη. Έτσι, η συγκεκριμένη χρωστική μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ζωντανά και μονιμοποιημένα κύτταρα με ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τη μελέτη ενδοκυτταρικών αντιγόνων.

Όσον αφορά την εφαρμογή της για τη μελέτη της απόπτωσης, η ένταση του φθορισμού της χρωστικής CMXRos συσχετίζεται άμεσα με την κατάσταση του μιτοχονδριακού δυναμικού. Τα ζωντανά κύτταρα παρουσιάζουν έντονο φθορισμό, ενώ στα αποπτωτικά ένταση φθορισμού είναι χαμηλή. Έτσι, με ποσοτικοποίηση του φθορισμού μπορεί να γίνει η διάκριση των ζωντανών και των αποπτωτικών κυττάρων.

3.2.2.3. Πειραματική διαδικασία

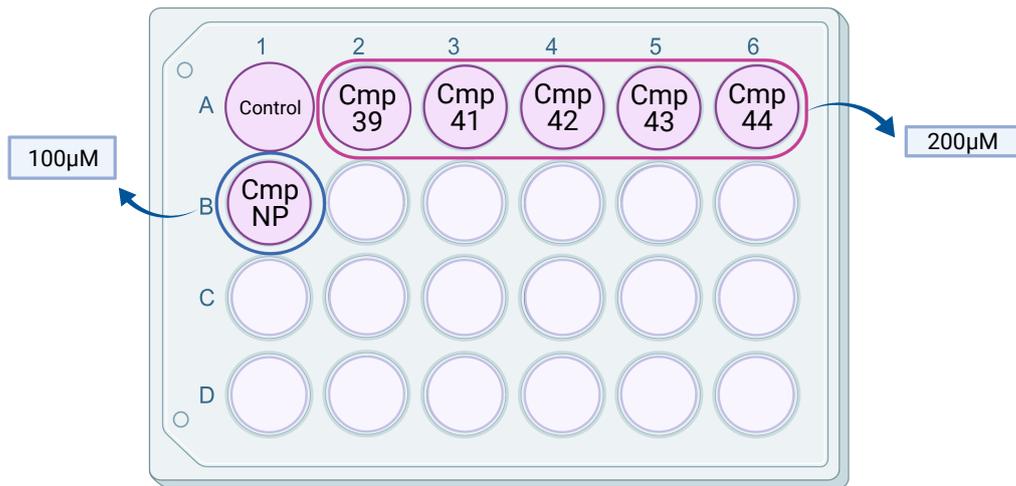
Πριν την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας, γυάλινες καλυπτρίδες (coverslips) τοποθετήθηκαν στα ειδικά πηγαδάκια ενός 24 well plate και ακολούθησε αποστείρωση με UV σε ειδικό θάλαμο.

Ημέρα 0: Πάνω στις καλυπτρίδες τοποθετήθηκαν και καλλιεργήθηκαν τα κύτταρα για 2 μέρες σε θρεπτικό DMEM low glucose + 10% (v/v) FBS + 1% (v/v) L-GLU + 1% (v/v) P/S (treatment Buffer).

Ημέρα 2: Τα κύτταρα επωάστηκαν για 48 ώρες με θρεπτικό ίδιας σύστασης (treatment buffer) και με τις εξής ενώσεις:

Πίνακας 1: Οι τελικές συγκεντρώσεις των διαφορετικών φλαβονοειδών που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη.

	Φλαβονοειδή	Τελική Συγκέντρωση
Cmp 39	Baicalein	200 μ M
Cmp 41	Peonidin	200 μ M
Cmp 42	Quercitrin (quercetin O-glucoside)	200 μ M
Cmp 43	Delphinidin	200 μ M
Cmp 44	Cyanidin Chloride	200 μ M
Cmp NP	NP-013703	100 μ M



Εικόνα 15: Απεικόνιση σε ένα well-plate 24 βοθρίων, των θέσεων και των συγκεντρώσεων των ουσιών Cmp 39, 41, 42, 43, 44, NP και του αρνητικού μάρτυρα control (πάνω αριστερά). (Created with BioRender.com)

Ημέρα 4: Ακολούθησε σήμανση των μιτοχονδρίων και των πυρήνων με επώαση των κυττάρων για 30 min με 200nM της χρωστικής MitoTracker™ Red CMXRos και με 1 μ g/mL της χρωστικής Hoechst 33258. Η χρωστική MitoTracker™ Red CMXRos περιέχει ανιχνευτές, οι οποίοι με παθητική διάχυση διαπερνούν την πλασματική μεμβράνη και συσσωρεύονται μόνο στα βιολογικά ενεργά μιτοχόνδρια των ζωντανών κυττάρων, καθώς η συσσώρευσή τους εξαρτάται από το δυναμικό μεμβράνης του κυττάρου και τα σημαίνουν με κόκκινο χρώμα. Η χρωστική Hoechst 33258 συνδέεται στη μικρή αύλακα του DNA, προσδίδοντας μπλε χρώμα που αντιστοιχεί στους πυρήνες.

Τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν για να εξασφαλιστεί η διατήρηση της μορφολογίας τους και η προστασία τους από πρωτεολυτικά ένζυμα. Για την μονιμοποίηση των κυττάρων, αφού απορρίφθηκε το treatment buffer, προστέθηκε PBS 1x από τους 4 °C και ακολούθησαν 1-3 πλύσεις με PBS 1x. Προστέθηκε στη συνέχεια, μεθανόλη για 10 min από τους -20° C και ακολούθησαν 1-3 πλύσεις με PBS 1x. Προστέθηκε τέλος, ακετόνη για < 1 min από τους -20° C και ακολούθησαν 1-3 πλύσεις με PBS 1x.

Μετά από στέγνωμα σε χαρτί, οι καλυπτρίδες επικολλήθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες με μία σταγόνα διαλύματος πολυβινυλ-αλκοόλης (PVA) για την κάθε μία και αφέθηκαν να στεγνώσουν για 24 ώρες.

Ημέρα 5: Η παρατήρηση των αντικειμενοφόρων πλακών και η λήψη των εικόνων πραγματοποιήθηκε στο συνεστιακό μικροσκόπιο LSM 800 Zeiss με χρήση δύο διαφορετικών φακών εστίασης 20x (**Εικόνα 16**) και 63x (**Εικόνα 17**).

3.2.3. Image J Ανάλυση

Η ποσοτικοποίηση της έντασης του φθορισμού της φθορίζουσας χρωστικής MitoTracker CMXRos πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Image J και κανονικοποιήθηκε ως προς τον φθορισμό πεδίου.

3.2.4. Στατιστική Ανάλυση

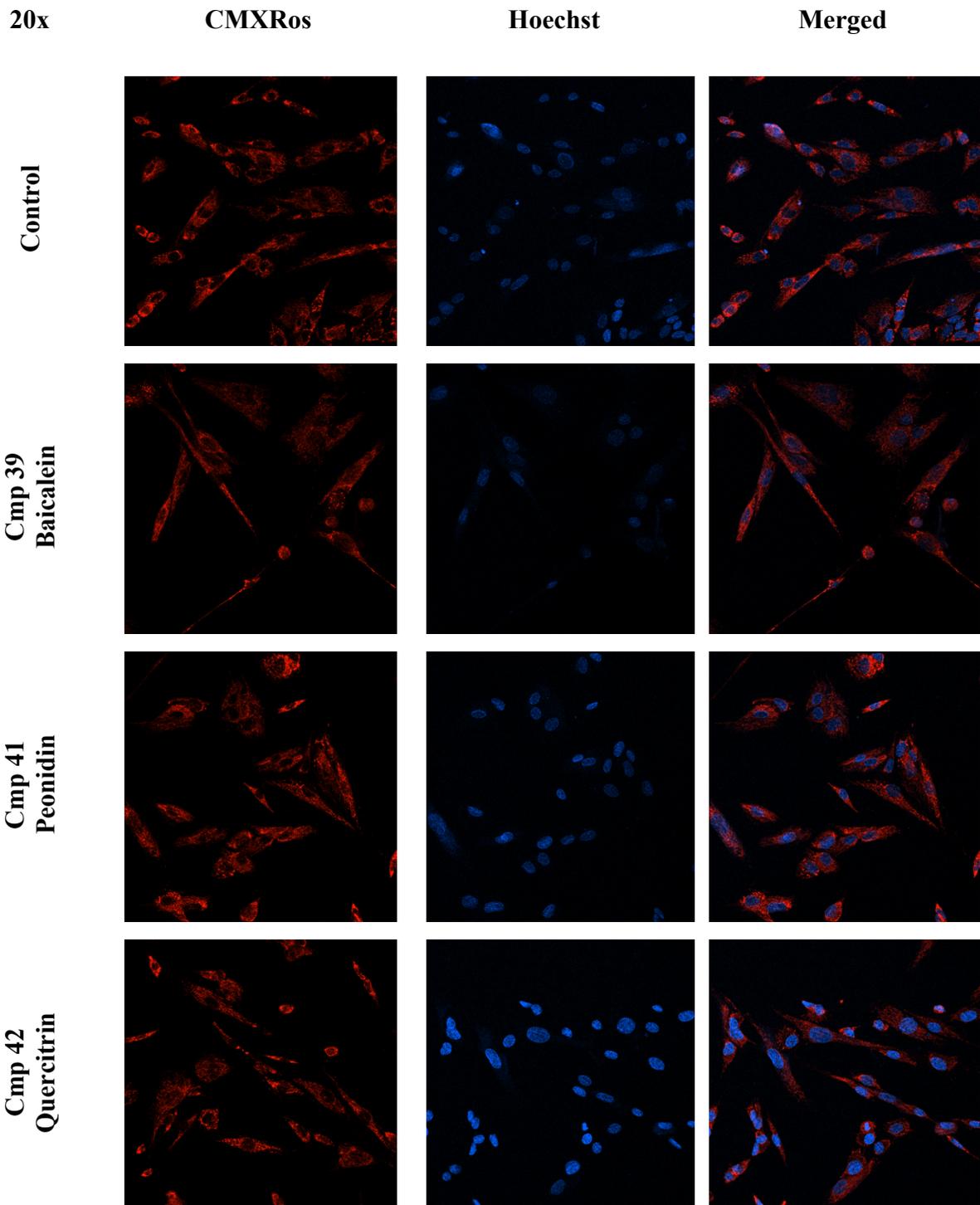
Οι κανονικοποίηση όλων των πειραματικών διαδικασιών πραγματοποιήθηκε με το Microsoft Office Excel. Το t-test χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της στατιστικά σημαντικής διαφοράς. Η στατιστική σημαντικότητα ορίστηκε ως $p \leq 0.05$.

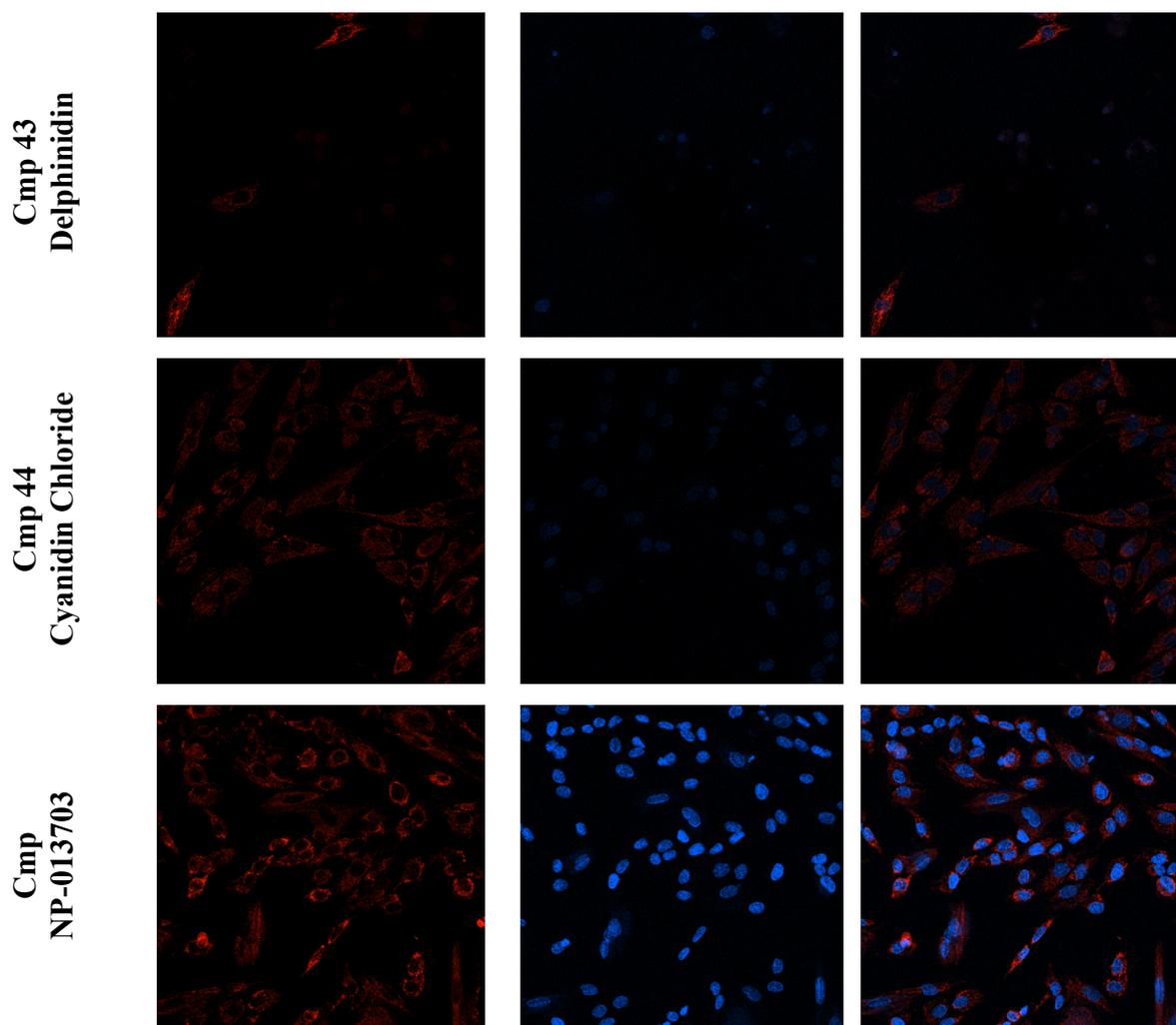
4. Αποτελέσματα

Ο φθορισμός της χρωστικής MitoTracker CMXRos αξιολογήθηκε πειραματικά σε καρκινικά κύτταρα ανθρώπινου νευροβλαστώματος SH-SY5Y πριν (Control) και μετά από επώαση των κυττάρων για 48 ώρες με τις ενώσεις: Μπαϊκαλεΐνη (Baicalein/**Cmp 39**), Πεονιδίνη (Peonidin/**Cmp 41**), Κουερσιτρίνη (Quercetin O-glucoside/**Cmp 42**), Δελφινιδίνη (Delphinidin/**Cmp 43**), Κυανιδίνη (Cyanidin Chloride/**Cmp 44**) και της τροποποιημένης κουερσετίνης NP-013703/**CmpNP**.

Η ένταση φθορισμού της χρωστικής CMXRos μετρήθηκε και κανονικοποιήθηκε ως προς το φθορισμό πεδίου, με το πρόγραμμα *Image J*. Η σχετική ένταση φθορισμού της CMXRos υπολογίστηκε ως η ένταση φθορισμού της CMXRos ύστερα από επώαση με τις διαφορετικές ουσίες προς την ένταση φθορισμού της CMXRos του Control σε δύο φακούς εστίασης 20x (**Γράφημα 1**) και 63x (**Γράφημα 2**). Για τη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το t-test και για την επεξεργασία των δεδομένων το Microsoft Excel. Η στατιστική σημαντικότητα ορίστηκε ως $p \leq 0.05$.

4.1. Απεικόνιση καρκινικών κυττάρων ανθρώπινου νευροβλαστώματος SH-SY5Y (αντικειμενικός 20x) με συνεστιακή μικροσκοπία μετά από επώαση με απομονωμένα φλαβονοειδή και με τις φθορίζουσες χρωστικές MitoTracker CMXRos και Hoechst.



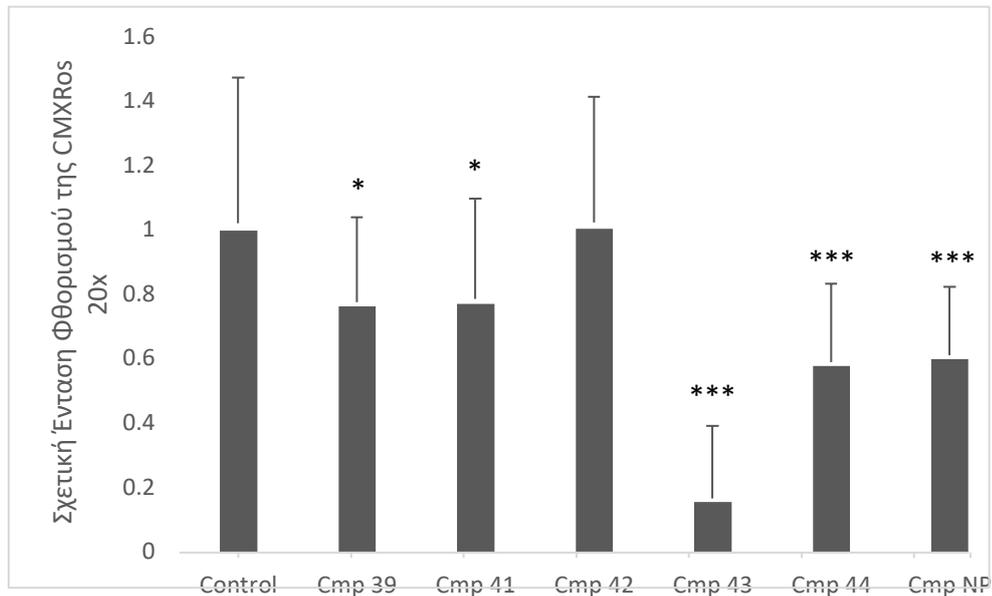


Εικόνα 16: Απεικόνιση καρκινικών κυττάρων ανθρώπινου νευροβλαστώματος SH-SY5Y πριν (Control) και μετά από επώαση με τις ουσίες (Cmp 39: Μπαϊκαλεΐνη, Cmp 41: Πεονιδίνη, Cmp 42: Κουερσιτρίνη, Cmp 43: Δελφινιδίνη, Cmp 44: Κυανιδίνη, Cmp NP-013703), με συνεστιακή μικροσκοπία (αντικειμενικός φακός 20x). **MitoTracker CMXRos:** φθορίζουσα χρωστική κόκκινου χρώματος με αποκλειστική εντόπιση στα μιτοχόνδρια; **Hoechst 33258:** φθορίζουσα χρωστική μπλε χρώματος με αποκλειστική εντόπιση στους πυρήνες; **Merged:** συνδυασμένη εικόνα των δύο παραπάνω χρωστικών.

4.2. Προσδιορισμός της σχετικής έντασης φθορισμού της χρωστικής MitoTracker CMXRos σε αντικειμενικό φακό 20x.

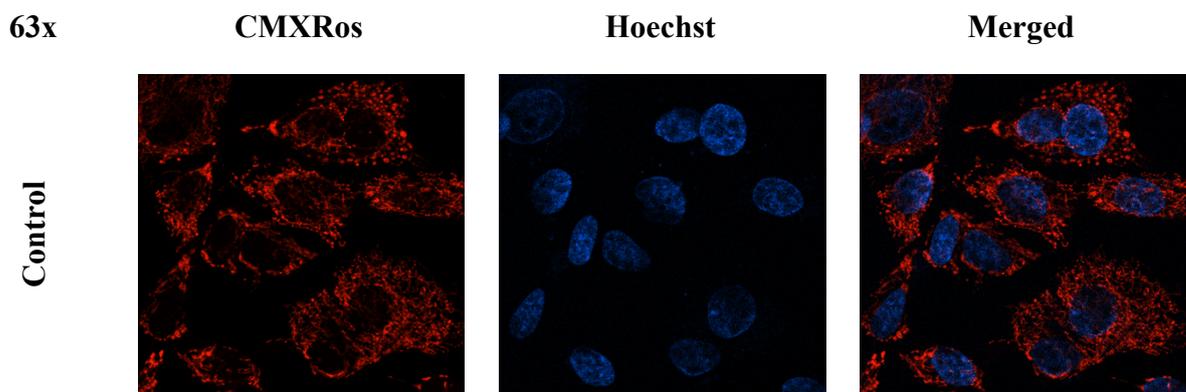
Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση του φθορισμού της χρωστικής CMXRos σε σχέση με το Control για τις ουσίες Cmp 39, Cmp 41, Cmp 43, Cmp 44 και Cmp NP, σε αντικειμενικό φακό 20x (**Γράφημα 1**). Συγκεκριμένα, ο φθορισμός της χρωστικής CMXRos μειώθηκε στο 76.37% του Control όσον αφορά την ουσία Cmp 39, 77.15% για την ουσία Cmp 41, 15.62% για την ουσία Cmp 43, 57.88% για την ουσία Cmp 44 και 60% για την ουσία Cmp NP. Για την ουσία Cmp 42, ο φθορισμός της CMXRos δε μειώθηκε, αντίθετα

παρουσίασε αύξηση της τάξεως του 0,53% σε σχέση με το Control, η οποία όμως δεν είναι στατιστικά σημαντική.

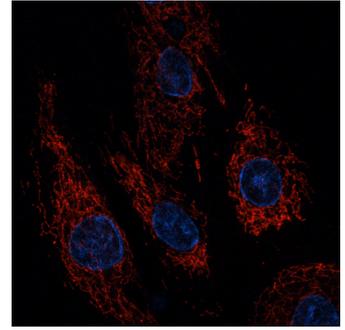
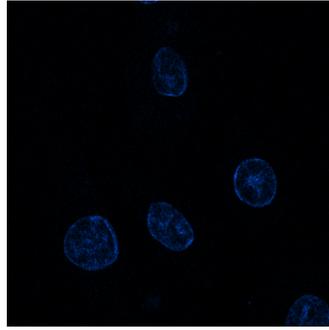
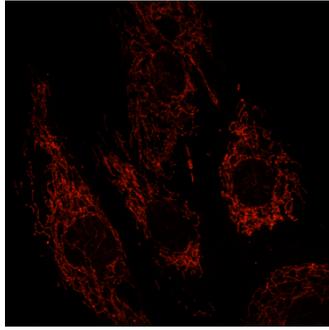


Γράφημα 1: Μέσος όρος και τυπική απόκλιση της σχετικής έντασης φθορισμού της χρωστικής MitoTracker CMXRos σε καρκινικά κύτταρα ανθρώπινου νευροβλαστώματος SH-SY5Y πριν (Control) και μετά από επώαση με τις ουσίες (Cmp 39:Μπαϊκαλίνη, Cmp 41: Πεονιδίνη, Cmp 42: Κουερσιτρίνη, Cmp 43: Δελφινιδίνη, Cmp 44: Κυανιδίνη και Cmp NP-013703). N=20-30 κύτταρα, * P<0.05, ***P<0.001

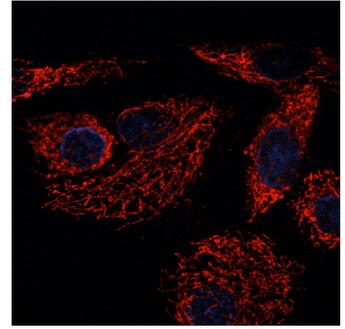
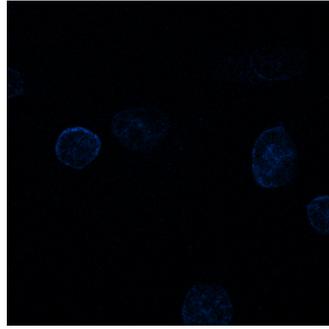
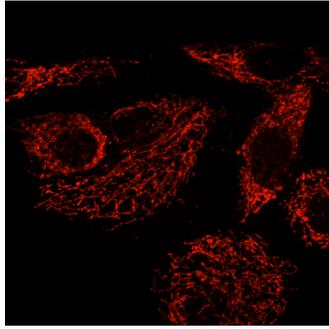
4.3. Απεικόνιση καρκινικών κυττάρων ανθρώπινου νευροβλαστώματος SH-SY5Y (αντικειμενικός 63x) με συνεστιακή μικροσκοπία μετά από επώαση με απομονωμένα φλαβονοειδή και με τις φθορίζουσες χρωστικές MitoTracker CMXRos και Hoechst.



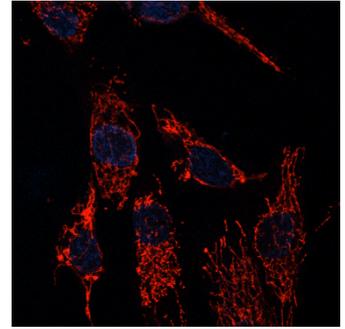
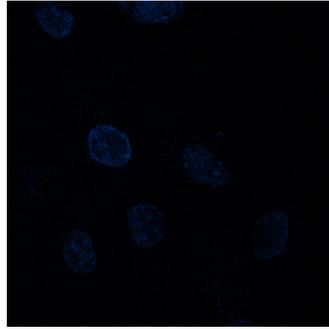
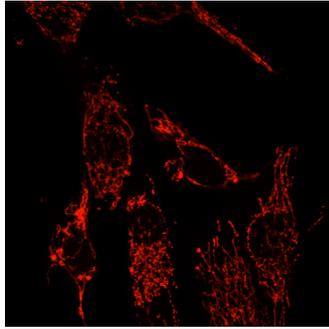
Cmp 39
Baicalein



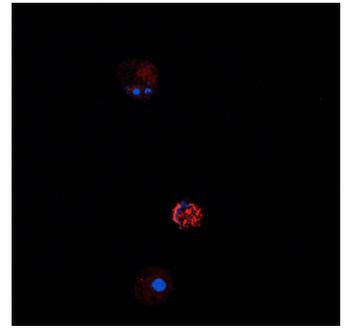
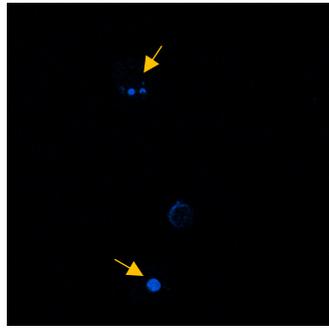
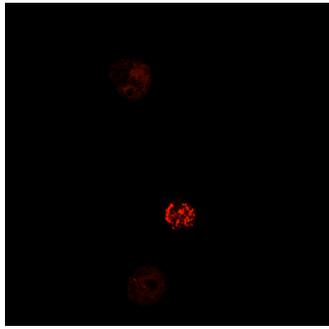
Cmp 41
Peonidin



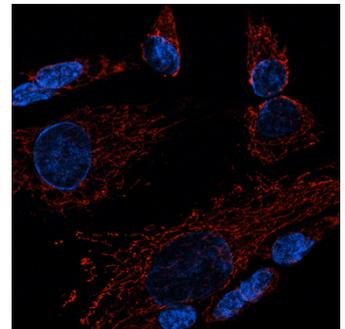
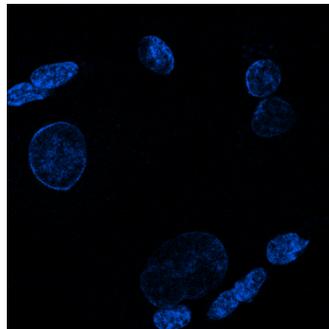
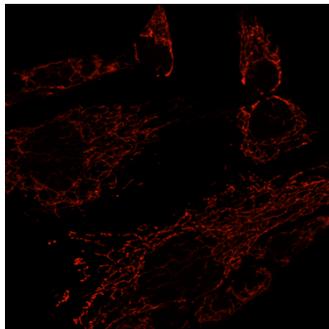
Cmp 42
Quercitrin



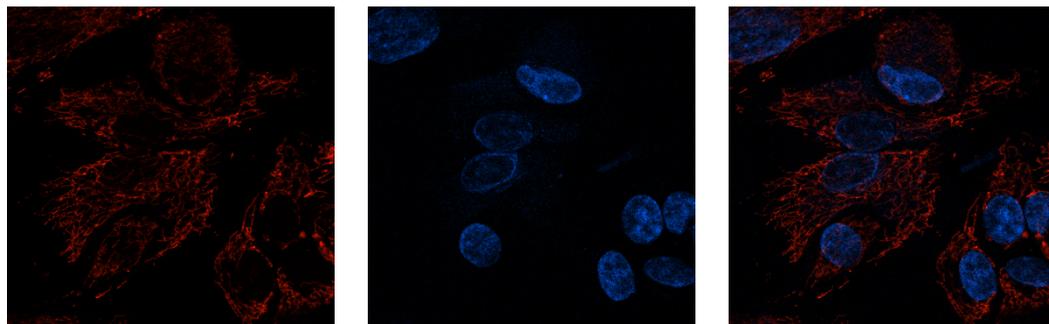
Cmp 43
Delphinidin



Cmp 44
Cyanidin Chloride



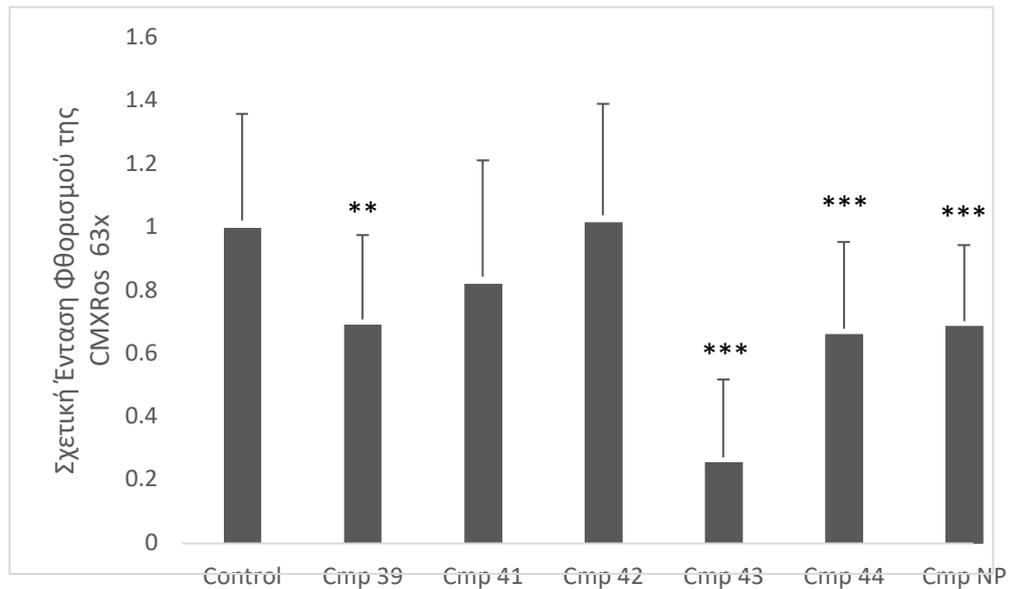
Cmp NP-013703



Εικόνα 17: Απεικόνιση καρκινικών κυττάρων ανθρώπινου νευροβλαστώματος SH-SY5Y πριν (Control) και μετά από επώαση με τις ουσίες (Cmp 39: Μπαϊκαλεΐνη, Cmp 41: Πεονιδίνη, Cmp 42: Κουερσιτρίνη, Cmp 43: Δελφινιδίνη, Cmp 44: Κυανιδίνη και Cmp NP-013703), με συνεστιακή μικροσκοπία (αντικειμενικός φακός 63x). **CMXRos:** φθορίζουσα χρωστική κόκκινου χρώματος με αποκλειστική εντόπιση στα μιτοχόνδρια; **Hoechst 33258:** φθορίζουσα χρωστική μπλε χρώματος με αποκλειστική εντόπιση στους πυρήνες; **Merged:** συνδυασμένη εικόνα των δύο παραπάνω χρωστικών. *Τα κίτρινα βέλη υποδεικνύουν τη συμπίκνωση και κατάτμηση του πυρηνικού DNA.

4.4. Προσδιορισμός της σχετικής έντασης φθορισμού της χρωστικής MitoTracker CMXRos σε αντικειμενικό φακό 63x.

Στον αντικειμενικό φακό 63x παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση του φθορισμού της χρωστικής CMXRos σε σχέση με το Control για τις ουσίες Cmp 39, Cmp 43, Cmp 44 και Cmp NP. Συγκεκριμένα, ο φθορισμός της χρωστικής CMXRos παρουσίασε μείωση στο 69.25% του Control όσον αφορά την ουσία Cmp 39, 25.73% για την ουσία Cmp 43, 66.33% για την ουσία Cmp 44 και 68.85% για την ουσία Cmp NP. Για την ουσία Cmp 41 ο φθορισμός της CMXRos μειώθηκε στο 82.18% του Control, η μείωση αυτή όμως δεν είναι στατιστικά σημαντική. Αντίθετα για την ουσία Cmp 42, η ένταση του φθορισμού της χρωστικής CMXRos αυξήθηκε κατά 1,7% σε σχέση με το Control χωρίς να είναι όμως στατιστικά σημαντική αυτή η αύξηση (**Γράφημα 2**).



Γράφημα 2: Μέσος όρος και τυπική απόκλιση της σχετικής έντασης φθορισμού της χρωστικής CMXRos σε καρκινικά κύτταρα ανθρώπινου νευροβλαστώματος SH-SY5Y πριν (Control) και μετά από επώαση με τις ουσίες (Cmp 39:Μπαϊκαλεΐνη, Cmp 41: Πεονιδίνη, Cmp 42: Κουερσιτρίνη, Cmp 43: Δελφινιδίνη, Cmp 44: Κυανιδίνη, Cmp NP-013703). N=20-30 κύτταρα, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

4.5. Συγκεντρωτικός πίνακας της σχετικής έντασης φθορισμού της χρωστικής MitoTracker CMXRos (ένταση φθορισμού CMXRos / control) μετά από επώαση με τα φλαβονοειδή στους αντικειμενικούς φακούς 20x και 63x.

Φλαβονοειδή	Ένταση Φθορισμού CMXRos / Control 20x (%)	Ένταση Φθορισμού CMXRos / Control 63x (%)
Δελφινιδίνη	15,62 % ***	25,73 % ***
Πεονιδίνη	77,15 % *	82,18 %
Κυανιδίνη	57,88 % ***	66,33 % ***
Κουερσιτρίνη	100,53%	101,70%
NP-013703	60,00 % ***	68,85 % ***
Μπαϊκαλεΐνη	76,37% *	69,25 % **

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

5. Συζήτηση-Συμπεράσματα

Τα φλαβονοειδή, φυσικά συστατικά των φυτών, έχουν συνδεθεί με πολλές ευεργετικές δράσεις, όπως η πρόληψη της εμφάνισης παθολογικών καταστάσεων στον άνθρωπο και οι διαφορετικές δράσεις τους έχουν μελετηθεί τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές. Στην παρούσα μελέτη η επίδραση των απομονωμένων φλαβονοειδών, πεονιδίνη, κυανιδίνη, δελφινιδίνη, κουερσετίνη και μπαϊκαλεΐνη καθώς και ενός τροποποιημένου φλαβονοειδούς κουερσετίνης διερευνήθηκε σε καρκινικά κύτταρα ανθρώπινου νευροβλαστώματος SH-SY5Y. Τα αποτελέσματα της μελέτης δείχνουν ότι οι δράσεις των ουσιών αυτών διαφέρουν, με κάποιες ουσίες να παρουσιάζουν αποπτωτική δράση, άλλες πιθανή κυτταροπροστατευτική ή αντι-αποπτωτική δράση και κάποιες χωρίς σημαντική επίδραση στη συγκεκριμένη καρκινική κυτταρική σειρά. Η δελφινιδίνη παρουσίασε τη μεγαλύτερη κυτταροτοξικότητα, επάγοντας απόπτωση στα κύτταρα SH-SY5Y, πιθανά μέσω του ενδογενούς μιτοχονδριακού μηχανισμού. Η παρατήρηση αυτή είναι σύμφωνη με πειραματικά δεδομένα από άλλες ερευνητικές ομάδες που δείχνουν ότι, η δελφινιδίνη εμφάνισε τη μεγαλύτερη κυτταροτοξική δράση μεταξύ άλλων φλαβονοειδών σε καρκινικά κύτταρα ωοθηκών, προκαλώντας μείωση στο διαμεμβρανικό μιτοχονδριακό δυναμικό (Piehowska et al., 2021). Μια ακόμη σημαντική παρατήρηση, η οποία συνηγορεί με τη σημαντική μείωση του φθορισμού της CMXRos που προκλήθηκε ύστερα από την επίδραση της δελφινιδίνης, είναι η συρρίκνωση των κυττάρων και η κατάτμηση του DNA, ευρήματα ενδεικτικά της ενεργοποίησης της διαδικασίας της απόπτωσης/νέκρωσης. Μετά τη δελφινιδίνη ακολουθούν οι ουσίες κυανιδίνη, μπαϊκαλεΐνη και NP, οι οποίες εμφάνισαν σημαντική κυτταροτοξικότητα και αποπτωτική δράση. Όσον αφορά την πεονιδίνη, η αποπτωτική δράση της ήταν περιορισμένη και μη στατιστικά σημαντική.

Η απόπτωση διερευνήθηκε μέσω μιας φθορίζουσας χρωστικής δείκτη, με επιλεκτική συσσώρευση μόνο στα βιολογικά ενεργά μιτοχόνδρια εξαρτώμενη από το διαμεμβρανικό δυναμικό. Η διαταραχή του διαμεμβρανικού δυναμικού, όπως αναφέρθηκε, αποτελεί κρίσιμο σημείο για τη διαδικασία της απόπτωσης. Η ενεργοποίηση των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bax, Bak, BH3 και η δημιουργία πόρων/διαύλων στην εξωτερική μεμβράνη, οδηγεί σε μεταβολή του ΔΨm, το οποίο στα φυσιολογικά μιτοχόνδρια είναι υψηλό ώστε να διατηρεί συγκεκριμένες πρωτεΐνες στο διαμεμβρανικό χώρο, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση των πρωτεϊνών αυτών, συμπεριλαμβανομένου του κυτοχρώματος c και την επαγωγή της απόπτωσης (Kroemer et al., 2007). Η μεταβολή του ΔΨm, καθορίζει το πρώτο στάδιο της απόπτωσης και ακολουθείται από μεταβολή στη διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης (MMP). Ωστόσο υπάρχουν περιπτώσεις παροδικής διαταραχής του ΔΨm, με μερική μεταβολή της διαπερατότητας στη μεμβράνης, χωρίς να ακολουθήσει η απόπτωση του κυττάρου (de Graaf et al., 2004). Ο προσδιορισμός της έκφρασης αποπτωτικών πρωτεϊνών, όπως για παράδειγμα των κασπασών, θα παρείχε περισσότερες πληροφορίες για το μηχανισμό επαγωγής της απόπτωσης.

Η επαγόμενη από τα υπό μελέτη φλαβονοειδή αποπτωτική δράση στην καρκινική σειρά SH-SY5Y είναι σε συμφωνία με δεδομένα διεθνούς βιβλιογραφίας, όπου αποκαλύπτεται ότι και κάποια άλλα φλαβονοειδή, όπως η απιγενίνη, η γενιστεΐνη και η κατεχίνη προκάλεσαν αύξηση του ενδοκυττάρου Ca^{2+} και της αναλογίας Bax/Bcl-2, οδηγώντας σε απελευθέρωση κυτοχρώματος c και απόπτωση μέσω του μιτοχονδριακού μονοπατιού (Das et al., 2006). Ομοίως, ανάμεσα στα φλαβονοειδή με κυτταροτοξική δράση στη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά συγκαταλέγονται η moringin (Cirimi et al., 2019) και isoliquiritigenin (Escobar et al., 2019), οδηγώντας τα καρκινικά κύτταρα σε θάνατο είτε μέσω του ενδογενούς μιτοχονδριακού μονοπατιού απόπτωσης ή μέσω ενός νεκροπρωτικού μηχανισμού χωρίς της επαγωγή απόπτωσης, αντίστοιχα.

Στην παρούσα μελέτη, ωστόσο, αλλά και γενικότερα η αποπτωτική δράση εξαρτάται και από τις συγκεντρώσεις των ουσιών και τη διάρκεια επώασης των κυττάρων με αυτές. Αντίθετη επίδραση φαίνεται να έχουν χαμηλότερες συγκεντρώσεις κυανιδίνης από αυτή που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη, εμφανίζοντας κυτταροπροστατευτική και αντιοξειδωτική δράση σε κύτταρα SH-SY5Y μετά από επαγόμενη μέσω ουσιών νευροτοξικότητα, αναστέλλοντας την αύξηση των Bax και προλαμβάνοντας την απόπτωση (Chen et al., 2018). Αντίστοιχη αντι-αποπτωτική και αντιοξειδωτική δράση έχει αποδειχθεί και ύστερα από επώαση με μικρότερες συγκεντρώσεις με εκχύλισμα κόκκινων μούρων (red-berries) και φραγκοστάφυλου (black-currant), πλούσια σε ανθοκυανιδίνες (Carballeda-Sangiao et al., 2021; Ghosh et al., 2006). Στην παρούσα μελέτη η κυανιδίνη εμφάνισε σημαντική αποπτωτική ικανότητα, την επόμενη μεγαλύτερη μετά τη δελφινιδίνη, ωστόσο και οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν μεγαλύτερες, όπως αναφέρθηκε αλλά και ο χρόνος επώασης (Chen et al., 2018). Επίσης, στη παρούσα μελέτη η δράση των φλαβονοειδών αξιολογήθηκε σε απομονωμένες ουσίες, σε αντίθεση με τα παραπάνω εκχυλίσματα που η δράση των ανθοκυανιδινών είναι συνεργιστική και όχι μεμονωμένη.

Αντίθετα, η κουερσετίνη δεν παρουσίασε κυτταροτοξική δράση, αλλά πιθανή κυτταροπροστατευτική δράση στην καρκινική σειρά SH-SY5Y χωρίς, όμως, να είναι στατιστικά σημαντική. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται και από άλλες μελέτες, όπου διαφορετικές συγκεντρώσεις της ουσίας, ακόμη και μικρότερες συγκεντρώσεις (1μM-100μM) έχουν δείξει τη νευροπροστατευτική και αντι-αποπτωτική της δράση σε επαγόμενη από διάφορες ουσίες κυτταροτοξικότητα, όπως οι μυκοτοξίνες (Kalagatur et al., 2021) ή H_2O_2 (Suematsu et al., 2011), μειώνοντας τα επίπεδα των ROS και προστατεύοντας το μιτοχονδριακό δυναμικό μεμβράνης, αναστέλλοντας την ενεργοποίηση των κασπασών και οδηγώντας σε αύξηση της ζωτικότητας των κυττάρων SH-SY5Y. Αποτελέσματα μελετών υποδεικνύουν την κουερσετίνη ως μια πιθανή νευρο-προστατευτική ουσία για την αντιμετώπιση νευροεκφυλιστικών παθήσεων.

Η αξιολόγηση της έντασης φθορισμού της CMXRos πραγματοποιήθηκε σε δύο διαφορετικές μεγεθύνσεις για να είναι πιο ακριβής και αντικειμενική. Η μεγαλύτερη μεγέθυνση προσφέρει μεγαλύτερη ακρίβεια και καλύτερη απεικονιστική ικανότητα της

μιτοχονδριακής σήμανσης, όμως εξετάζεται μικρότερος αριθμός κυττάρων. Σε αντίθεση, η μικρότερη μεγέθυνση παρέχει μεγαλύτερο αριθμό κυττάρων προς εκτίμηση αλλά μικρότερη ακρίβεια. Επίσης, η ένταση φθορισμού κανονικοποιήθηκε ως προς τον φθορισμό πεδίου και τον αρνητικό μάρτυρα, ώστε η σχετική ένταση φθορισμού να μην εξαρτάται από εξωγενείς παράγοντες και να είναι πιο αξιόπιστη. Τα αποτελέσματα των δύο διαφορετικών μεγεθύνσεων παρουσίασαν υψηλή συμφωνία, αν και υπήρχαν μικρές διαφορές, οι οποίες μπορεί να οφείλονται στην αντικειμενικότητα τόσο της επιλογής των εικόνων όσο και των κυττάρων. Για παράδειγμα, η πεονιδίνη εμφάνισε διαφορές στη στατιστική σημαντικότητα της αποπτωτικής δράσης της στις δύο μεγεθύνσεις, ωστόσο και στις δύο είχε τη μικρότερη αποπτωτική δράση.

Τα καρκινικά κύτταρα διαθέτουν την ικανότητα να διαφεύγουν τους φυσικούς μηχανισμούς άμυνας του κυττάρου, με συνέπεια τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό τους και την αποφυγή της διαδικασίας της απόπτωσης. Η χρήση αντικαρκινικών χημειοθεραπευτικών φαρμάκων δεν είναι πάντα αποτελεσματική, καθώς η ανταπόκριση εξαρτάται από τον τύπο των καρκινικών κυττάρων, το στάδιο, τις μεταλλάξεις του DNA και άλλους παράγοντες και συνοδεύεται από σημαντικές παρενέργειες, ακόμη και θανατηφόρες κάποιες φορές. Η ανάδειξη φυσικών και ασφαλών βιοδραστικών ουσιών με χημειοπροστατευτικές και χημειοθεραπευτικές ιδιότητες είναι στο επίκεντρο της έρευνας ως νέα όπλα ενάντια σε πληθώρα παθήσεων συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι η δελφινιδίνη και η κουερσιτρίνη εμφανίζουν πιθανές αποπτωτικές και νευροπροστατευτικές ικανότητες, αντίστοιχα, με σημαντικές προοπτικές ως εν δυνάμει φυσικά χημειοθεραπευτικά ή χημειοπροστατευτικά μέσα για την αντιμετώπιση του καρκίνου και των νευροεκφυλιστικών παθήσεων.

6. Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Δρ. Άννα-Μαρία Ψαρρά, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και επιβλέπουσα καθηγήτρια της παρούσας διπλωματικής εργασίας, για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπαιδευτώ στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, να ενταχθώ στην ερευνητική της ομάδα και να εκπονήσω την παρούσα εργασία.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτωρ Ιωάννη Τσιάλτα και τα υπόλοιπα μέλη της ερευνητικής ομάδας της Δρ. Ψαρρά και του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για την άψογη συνεργασία, την καθοδήγηση και τη στήριξη καθ' όλη τη διάρκεια της ερευνητικής μου μελέτης.

Τέλος, ένα από τα μεγαλύτερα ευχαριστώ ανήκει στην οικογένειά μου για τη στήριξη ηθική και οικονομική που μου προσφέρει αδιάκοπα όλα τα χρόνια των σπουδών μου ώστε να ολοκληρώσω ακόμη έναν από τους μεγαλύτερους στόχους της ζωής μου, μέχρι τον επόμενο.

7. Βιβλιογραφία

- Ahmadi, A., Shadboorestan, A., 2016. Oxidative stress and cancer; the role of hesperidin, a citrus natural bioflavonoid, as a cancer chemoprotective agent. *Nutr Cancer* 68, 29-39.
- Alhosin, M., Sharif, T., Mousli, M., Etienne-Selloum, N., Fuhrmann, G., Schini-Kerth, V.B., Bronner, C., 2011. Down-regulation of UHRF1, associated with re-expression of tumor suppressor genes, is a common feature of natural compounds exhibiting anti-cancer properties. *J Exp Clin Cancer Res* 30, 41.
- Bishayee, A., Haznagy-Radnai, E., Mbimba, T., Sipos, P., Morazzoni, P., Darvesh, A.S., Bhatia, D., Hohmann, J., 2010. Anthocyanin-rich black currant extract suppresses the growth of human hepatocellular carcinoma cells. *Nat Prod Commun* 5, 1613-1618.
- Bishop, K.S., Ferguson, L.R., 2015. The interaction between epigenetics, nutrition and the development of cancer. *Nutrients* 7, 922-947.
- Cadenas, E., Davies, K.J., 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med* 29, 222-230.
- Calderón-Oliver, M., Ponce-Alquicira, E. 2018. Chapter 7 - Fruits: A Source of Polyphenols and Health Benefits, In: Grumezescu, A.M., Holban, A.M. (Eds.) *Natural and Artificial Flavoring Agents and Food Dyes*. Academic Press, 189-228.

- Carballeda-Sangiao, N., Chamorro, S., de Pascual-Teresa, S., 2021. A Red-Berry Mixture as a Nutraceutical: Detailed Composition and Neuronal Protective Effect. *Molecules* 26.
- Chen, C.Y., Yi, L., Jin, X., Mi, M.T., Zhang, T., Ling, W.H., Yu, B., 2010. Delphinidin attenuates stress injury induced by oxidized low-density lipoprotein in human umbilical vein endothelial cells. *Chem Biol Interact* 183, 105-112.
- Chen, G., Goeddel, D.V., 2002. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 296, 1634-1635.
- Chen, H., Chan, D.C., 2009. Mitochondrial dynamics--fusion, fission, movement, and mitophagy--in neurodegenerative diseases. *Hum Mol Genet* 18, R169-176.
- Chen, J., Sun, J., Jiang, J., Zhou, J., 2018. Cyanidin Protects SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cells from 1-Methyl-4-Phenylpyridinium-Induced Neurotoxicity. *Pharmacology* 102, 126-132.
- Chen, P.N., Chu, S.C., Chiou, H.L., Chiang, C.L., Yang, S.F., Hsieh, Y.S., 2005. Cyanidin 3-glucoside and peonidin 3-glucoside inhibit tumor cell growth and induce apoptosis in vitro and suppress tumor growth in vivo. *Nutr Cancer* 53, 232-243.
- Chen, P.N., Chu, S.C., Chiou, H.L., Kuo, W.H., Chiang, C.L., Hsieh, Y.S., 2006. Mulberry anthocyanins, cyanidin 3-rutinoside and cyanidin 3-glucoside, exhibited an inhibitory effect on the migration and invasion of a human lung cancer cell line. *Cancer Lett* 235, 248-259.
- Cimmino, A., Calin, G.A., Fabbri, M., Iorio, M.V., Ferracin, M., Shimizu, M., Wojcik, S.E., Aqeilan, R.I., Zupo, S., Dono, M., Rassenti, L., Alder, H., Volinia, S., Liu, C.G., Kipps, T.J., Negrini, M., Croce, C.M., 2005. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 13944-13949.
- Cirmi, S., Ferlazzo, N., Gugliandolo, A., Musumeci, L., Mazzon, E., Bramanti, A., Navarra, M., 2019. Moringin from Moringa Oleifera Seeds Inhibits Growth, Arrests Cell-Cycle, and Induces Apoptosis of SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cells through the Modulation of NF- κ B and Apoptotic Related Factors. *Int J Mol Sci* 20, 1930.
- Cottet-Rousselle, C., Ronot, X., Leverve, X., Mayol, J.F., 2011. Cytometric assessment of mitochondria using fluorescent probes. *Cytometry A* 79, 405-425.
- D'Andrea, G., 2015. Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications? *Fitoterapia* 106, 256-271.
- Das, A., Banik, N.L., Ray, S.K., 2006. Mechanism of apoptosis with the involvement of calpain and caspase cascades in human malignant neuroblastoma SH-SY5Y cells exposed to flavonoids. *Int J Cancer* 119, 2575-2585.
- de Graaf, A.O., van den Heuvel, L.P., Dijkman, H.B., de Abreu, R.A., Birkenkamp, K.U., de Witte, T., van der Reijden, B.A., Smeitink, J.A., Jansen, J.H., 2004. Bcl-2 prevents loss of mitochondria in CCCP-induced apoptosis. *Exp Cell Res* 299, 533-540.
- de Oliveira, M.R., Nabavi, S.F., Habtemariam, S., Erdogan Orhan, I., Daglia, M., Nabavi, S.M., 2015. The effects of baicalein and baicalin on mitochondrial function and dynamics: A review. *Pharmacological Research* 100, 296-308.
- de Oliveira, M.R., Nabavi, S.M., Braidly, N., Setzer, W.N., Ahmed, T., Nabavi, S.F., 2016. Quercetin and the mitochondria: A mechanistic view. *Biotechnol Adv* 34, 532-549.
- Dejean, L.M., Martinez-Caballero, S., Manon, S., Kinnally, K.W., 2006. Regulation of the mitochondrial apoptosis-induced channel, MAC, by BCL-2 family proteins. *Biochim Biophys Acta* 1762, 191-201.

- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., Wang, X., 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102, 33-42.
- Duchen, M.R., 2004. Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. *Mol Aspects Med* 25, 365-451.
- Ehrenberg, B., Montana, V., Wei, M.D., Wuskell, J.P., Loew, L.M., 1988. Membrane potential can be determined in individual cells from the nernstian distribution of cationic dyes. *Biophys J* 53, 785-794.
- Elmore, S., 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35, 495-516.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., Nagata, S., 1998. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391, 43-50.
- Escobar, S.J.M., Fong, G.M., Winnischofer, S.M.B., Simone, M., Munoz, L., Dennis, J.M., Rocha, M.E.M., Witting, P.K., 2019. Anti-proliferative and cytotoxic activities of the flavonoid isoliquiritigenin in the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *Chem Biol Interact* 299, 77-87.
- Fernald, K., Kurokawa, M., 2013. Evading apoptosis in cancer. *Trends Cell Biol* 23, 620-633.
- Gao, Y., Snyder, S.A., Smith, J.N., Chen, Y.C., 2016. Anticancer properties of baicalein: a review. *Med Chem Res* 25, 1515-1523.
- Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M., Puig, P.E., Didelot, C., Kroemer, G., 2006. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ* 13, 1423-1433.
- Gharib, A., Faezizadeh, Z., Godarzee, M., 2013. Treatment of diabetes in the mouse model by delphinidin and cyanidin hydrochloride in free and liposomal forms. *Planta Med* 79, 1599-1604.
- Ghosh, D., McGhie, T.K., Zhang, J., Adaim, A., Skinner, M., 2006. Effects of anthocyanins and other phenolics of boysenberry and blackcurrant as inhibitors of oxidative stress and damage to cellular DNA in SH-SY5Y and HL-60 cells. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86, 678-686.
- Glasauer, A., Chandel, N.S., 2014. Targeting antioxidants for cancer therapy. *Biochem Pharmacol* 92, 90-101.
- Goldsmith, K.C., Gross, M., Peirce, S., Luyindula, D., Liu, X., Vu, A., Sliozberg, M., Guo, R., Zhao, H., Reynolds, C.P., Hogarty, M.D., 2012. Mitochondrial Bcl-2 family dynamics define therapy response and resistance in neuroblastoma. *Cancer Res* 72, 2565-2577.
- Guo, H., Xia, M., Zou, T., Ling, W., Zhong, R., Zhang, W., 2012. Cyanidin 3-glucoside attenuates obesity-associated insulin resistance and hepatic steatosis in high-fat diet-fed and db/db mice via the transcription factor FoxO1. *J Nutr Biochem* 23, 349-360.
- Gutteridge, J.M., Halliwell, B., 2010. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochem Biophys Res Commun* 393, 561-564.
- Halliwell, B., 2007. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans* 35, 1147-1150.
- Halliwell, B., Gutteridge, J., 2015. *Free Radicals in Biology and Medicine*.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M., 1995. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic Biol Med* 18, 125-126.

- Hanasaki, Y., Ogawa, S., Fukui, S., 1994. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic Biol Med* 16, 845-850.
- Herr, I., Gassler, N., Friess, H., Büchler, M.W., 2007. Regulation of differential pro- and anti-apoptotic signaling by glucocorticoids. *Apoptosis* 12, 271-291.
- Hsu, H., Xiong, J., Goeddel, D.V., 1995. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 81, 495-504.
- Jing, L., Ma, H., Fan, P., Gao, R., Jia, Z., 2015. Antioxidant potential, total phenolic and total flavonoid contents of *Rhododendron anthopogonoides* and its protective effect on hypoxia-induced injury in PC12 cells. *BMC Complement Altern Med* 15, 287.
- Kalagatur, N.K., Abd Allah, E.F., Poda, S., Kadirvelu, K., Hashem, A., Mudili, V., Siddaiah, C., 2021. Quercetin mitigates the deoxynivalenol mycotoxin induced apoptosis in SH-SY5Y cells by modulating the oxidative stress mediators. *Saudi J Biol Sci* 28, 465-477.
- Kicinska, A., Jarmuszkiewicz, W., 2020. Flavonoids and Mitochondria: Activation of Cytoprotective Pathways? *Molecules* 25, 3060.
- Korkina, L.G., Luca, C.D., Kostyuk, V.A., Pastore, S., 2009. Plant Polyphenols and Tumors: From Mechanisms to Therapies, Prevention, and Protection Against Toxicity of Anti-Cancer Treatments. *Current Medicinal Chemistry* 16, 3943-3965.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Brenner, C., 2007. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 87, 99-163.
- Kuntz, S., Kunz, C., Herrmann, J., Borsch, C.H., Abel, G., Frohling, B., Dietrich, H., Rudloff, S., 2014. Anthocyanins from fruit juices improve the antioxidant status of healthy young female volunteers without affecting anti-inflammatory parameters: results from the randomised, double-blind, placebo-controlled, cross-over ANTHONIA (ANTHOcyanins in Nutrition Investigation Alliance) study. *Br J Nutr* 112, 925-936.
- Kuznetsov, A.V., Margreiter, R., 2009. Heterogeneity of mitochondria and mitochondrial function within cells as another level of mitochondrial complexity. *Int J Mol Sci* 10, 1911-1929.
- Lee, J.S., Kim, Y.R., Song, I.G., Ha, S.J., Kim, Y.E., Baek, N.I., Hong, E.K., 2015. Cyanidin-3-glucoside isolated from mulberry fruit protects pancreatic β -cells against oxidative stress-induced apoptosis. *Int J Mol Med* 35, 405-412.
- León-González, A.J., Sharif, T., Kayali, A., Abbas, M., Dandache, I., Etienne-Selloum, N., Kevers, C., Pincemail, J., Auger, C., Chabert, P., Alhosin, M., Schini-Kerth, V.B., 2015. Delphinidin-3-O-glucoside and delphinidin-3-O-rutinoside mediate the redox-sensitive caspase 3-related pro-apoptotic effect of blackcurrant juice on leukaemia Jurkat cells. *Journal of Functional Foods* 17, 847-856.
- Lin, M.T., Beal, M.F., 2006. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443, 787-795.
- Madesh, M., Antonsson, B., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., Hajnóczky, G., 2002. Rapid kinetics of tBid-induced cytochrome c and Smac/DIABLO release and mitochondrial depolarization. *J Biol Chem* 277, 5651-5659.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L., 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 79, 727-747.
- Pieńkowska, N., Bartosz, G., Furdak, P., Sadowska-Bartosz, I., 2021. Delphinidin Increases the Sensitivity of Ovarian Cancer Cell Lines to 3-Bromopyruvate. *Int J Mol Sci* 22, 709.

- Psarra, A.M., Sekeris, C.E., 2008. Nuclear receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria: regulatory molecules in a new environment. *Biochim Biophys Acta* 1783, 1-11.
- Rajan, V.K., Hasna, C.K., Muraleedharan, K., 2018. The natural food colorant Peonidin from cranberries as a potential radical scavenger - A DFT based mechanistic analysis. *Food Chem* 262, 184-190.
- Reichert, A.S., Neupert, W., 2002. Contact sites between the outer and inner membrane of mitochondria-role in protein transport. *Biochim Biophys Acta* 1592, 41-49.
- Robertson, J.D., Orrenius, S., 2000. Molecular mechanisms of apoptosis induced by cytotoxic chemicals. *Crit Rev Toxicol* 30, 609-627.
- Saelens, X., Festjens, N., Vande Walle, L., van Gurp, M., van Loo, G., Vandenabeele, P., 2004. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 23, 2861-2874.
- Sorrenti, V., Vanella, L., Acquaviva, R., Cardile, V., Giofrè, S., Di Giacomo, C., 2015. Cyanidin induces apoptosis and differentiation in prostate cancer cells. *Int J Oncol* 47, 1303-1310.
- Speciale, A., Cimino, F., Saija, A., Canali, R., Virgili, F., 2014. Bioavailability and molecular activities of anthocyanins as modulators of endothelial function. *Genes Nutr* 9, 404.
- Srivastava, S., Somasagara, R.R., Hegde, M., Nishana, M., Tadi, S.K., Srivastava, M., Choudhary, B., Raghavan, S.C., 2016. Quercetin, a Natural Flavonoid Interacts with DNA, Arrests Cell Cycle and Causes Tumor Regression by Activating Mitochondrial Pathway of Apoptosis. *Sci Rep* 6, 24049.
- Suematsu, N., Hosoda, M., Fujimori, K., 2011. Protective effects of quercetin against hydrogen peroxide-induced apoptosis in human neuronal SH-SY5Y cells. *Neuroscience Letters* 504, 223-227.
- Szewczyk, A., Wojtczak, L., 2002. Mitochondria as a pharmacological target. *Pharmacol Rev* 54, 101-127.
- Taylor, R.C., Cullen, S.P., Martin, S.J., 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 231-241.
- Thilavech, T., Ngamukote, S., Belobrajdic, D., Abeywardena, M., Adisakwattana, S., 2016. Cyanidin-3-rutinoside attenuates methylglyoxal-induced protein glycation and DNA damage via carbonyl trapping ability and scavenging reactive oxygen species. *BMC Complement Altern Med* 16, 138-138.
- Thoppil, R.J., Bhatia, D., Barnes, K.F., Haznagy-Radnai, E., Hohmann, J., Darvesh, A.S., Bishayee, A., 2012. Black currant anthocyanins abrogate oxidative stress through Nrf2- mediated antioxidant mechanisms in a rat model of hepatocellular carcinoma. *Curr Cancer Drug Targets* 12, 1244-1257.
- Tsao, R., 2010. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* 2, 1231-1246.
- Valter, K., Zhivotovsky, B., Gogvadze, V., 2018. Cell death-based treatment of neuroblastoma. *Cell Death & Disease* 9, 113.
- van der Giezen, M., Tovar, J., 2005. Degenerate mitochondria. *EMBO Rep* 6, 525-530.
- Wajant, H., 2002. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* 296, 1635-1636.
- Waldbaum, S., Patel, M., 2010. Mitochondria, oxidative stress, and temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 88, 23-45.
- Weisburg, J.H., Schuck, A.G., Silverman, M.S., Ovits-Levy, C.G., Solodokin, L.J., Zuckerbraun, H.L., Babich, H., 2010. Pomegranate extract, a prooxidant with

- antiproliferative and proapoptotic activities preferentially towards carcinoma cells. *Anticancer Agents Med Chem* 10, 634-644.
- Winge, D.R., 2012. Sealing the mitochondrial respirasome. *Mol Cell Biol* 32, 2647-2652.
- Wu, Q.K., Koponen, J.M., Mykkanen, H.M., Torronen, A.R., 2007. Berry phenolic extracts modulate the expression of p21(WAF1) and Bax but not Bcl-2 in HT-29 colon cancer cells. *J Agric Food Chem* 55, 1156-1163.
- Yousif, L.F., Stewart, K.M., Kelley, S.O., 2009. Targeting mitochondria with organelle-specific compounds: strategies and applications. *Chembiochem* 10, 1939-1950.
- Yun, J.M., Afaq, F., Khan, N., Mukhtar, H., 2009. Delphinidin, an anthocyanidin in pigmented fruits and vegetables, induces apoptosis and cell cycle arrest in human colon cancer HCT116 cells. *Mol Carcinog* 48, 260-270.
- Zamzami, N., Maise, C., Métivier, D., Kroemer, G., 2007. Measurement of membrane permeability and the permeability transition of mitochondria. *Methods Cell Biol* 80, 327-340.
- Zhang, H., Zhang, M., Yu, L., Zhao, Y., He, N., Yang, X., 2012. Antitumor activities of quercetin and quercetin-5',8-disulfonate in human colon and breast cancer cell lines. *Food Chem Toxicol* 50, 1589-1599.
- Zhang, J., Wang, X., Vikash, V., Ye, Q., Wu, D., Liu, Y., Dong, W., 2016. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016, 4350965.
- Zhu, J.J., Li, Y.R., Liao, J.X., 2013. Involvement of anthocyanins in the resistance to chilling-induced oxidative stress in *Saccharum officinarum* L. leaves. *Plant Physiol Biochem* 73, 427-433.