



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΙΑ



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

με θέμα:

**“ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ
ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ”**

της Αρτεμισίας - Φοίβης Νιφλή

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2006

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Εργαστηριακής Ενδοκρινολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης, υπό την επίβλεψη του καθηγητού Ηλ.Καστανά.

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Ηλ.Καστανάς

Αχ.Γραβάνης (Καθηγητής Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης)

Αν.Χατζόγλου (Καθηγήτρια, Faculté de Sciences, Université Paul Sabatier, Toulouse, Γαλλία)

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Ηλ.Καστανάς

Αχ.Γραβάνης

Χ.Κατερινόπουλος (Καθηγητής Οργανικής Χημείας, Τμήμα Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης)

Ε.Κουρούμαλης (Καθηγητής Γαστρεντερολογίας, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης)

Α.Μαργιωρής (Καθηγητής Κλινικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης)

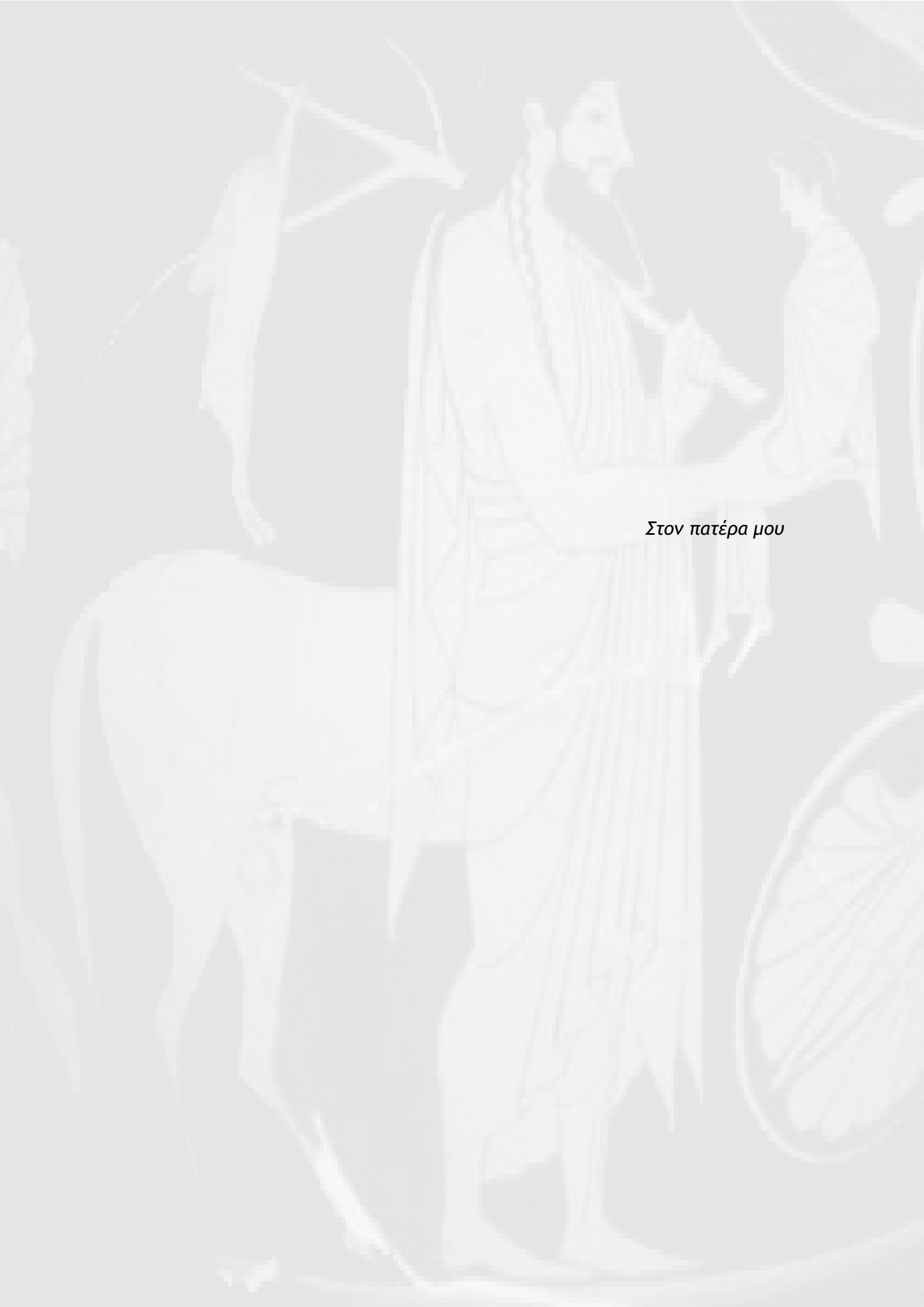
Ε.Σταθόπουλος (Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης)

Π.Θεοδωρόπουλος (Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης)

Η διδάκτορας ελάμβανε υποτροφία από το Κοινοφελές Ίδρυμα «Α.Σ.Ωνάσης» για την εκπόνηση διδακτορικής διατριβής στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης, από τον Οκτώβριο του έτους 2001.



Η παρούσα εργασία χρηματοδοτήθηκε μερικώς από την Ευρωπαϊκή Ένωση (COOP-CT-2003-508649, Πρόγραμμα PARADOX) και το IEVSRV (Institut Européen Vin et Santé des Régions Viticoles).



Στον πατέρα μου

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν στην εκπόνηση και ολοκλήρωση της παρούσης διδακτορικής διατριβής. Καταρχήν, τον επιβλέποντα καθηγητή Ηλ.Καστανά, για την φιλοξενία στο εργαστήριό του, την επιστημονική του καθοδήγηση, όπως επίσης και για την ευρύτητα πνεύματος που επέδειξε στην διαμόρφωση του πειραματικού πρωτοκόλλου.

Ευχαριστώ επίσης τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, τον καθ.Αχ.Γραβάνη και την Αν.Χατζόγλου, όπως και τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής καθ.Χ.Κατερινόπουλο, αν.καθ.Ε.Σταθόπουλο, καθ.Ε.Κουρούμαλη και καθ.Α.Μαργιωρή για την καθοδήγησή τους κατά την διάρκεια των σπουδών μου.

Ιδιαίτερως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επικ.καθ.Π.Θεοδωρόπουλο, τον καθ. J.Vercauteren (Laboratoire de Pharmacognosie, Université Montpellier I, Γαλλία), την Μ. Καμπά, τον Γ.Νότα, τον Μ.Ρουσσάκη, την S.Munier, την C.Castagnino, την Χ.Κόγια, την Β.Πελεκάνου και τον D.Vauzour, για την αगाστή συνεργασία μας και την συμβολή τους στην πειραματική διαδικασία, όπως επίσης και τον John Braisted (TIGR, Rockville, MD), για την εξ αποστάσεως ανιδιοτελή συνεισφορά του. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου Ι.Αλεξάκη και Δ.Βάσσου, καθώς και τις γραμματείς μας Ρ.Βλαχάκη και Ειρ. Κυπράκη.

Τέλος, ευχαριστώ εκ βάθους καρδιάς την οικογένειά μου και το Κοινωνικό Ίδρυμα “Α.Σ.Ωνάσης”, οι οποίοι με υποστήριξαν κατά την διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών, παρά τις όποιες αντιξοότητες, και χωρίς την ηθική συμπαράσταση των οποίων δεν θα ήταν δυνατή η ολοκλήρωση αυτού του κύκλου ζωής.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2006

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνομα	Αρτεμισία-Φοίβη
Επώνυμο	Νιφλή
Ημερομηνία γεννήσεως	9/1/1976
Τόπος γεννήσεως	Λάρισα
Υπηκοότητα	Ελληνική

ΤΙΤΛΟΙ

2001	Δίπλωμα Ειδίκευσης (Master) στις Βασικές Νευροεπιστήμες, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης (8,51/10)
1997	Πτυχίο Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης (7,92/10)

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

Αγγλικά	FCE, TOEFL
Γαλλικά	SORBONNE III (option littérature) SORBONNE II (option traduction) DALF (option Médecine et Sciences de la vie)

ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ-ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ

- 3^ο Βραβείο στον «1^ο Διεθνή Διαγωνισμό Ερευνητικών Εργασιών σε θέματα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής», που διοργανώθηκε από το Ίδρυμα Αριστείδης Δασκαλόπουλος, 1 Νοεμβρίου 2006, για την εργασία: «Η διατροφικά προσλαμβανόμενη φλαβονόλη *quercetin* μεταφέρεται ενεργητικά από τα επιθηλιακά κύτταρα, εντοπίζεται ταχέως στους πυρηνίσκους και επάγει υποακετυλίωση του p53».
- Υποτροφία από το Κοινωνικό Ίδρυμα «Α.Σ. Ωνάσης», για την εκπόνηση διδακτορικής διατριβής, από 1/10/2001 έως 31/3/2006.
- Υποτροφία ΙΚΥ ακαδημαϊκού έτους 1996-1997 (για την επίδοσή μου στο Γ' έτος Σπουδών Βιολογίας).

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Kampa M, Nifli A-P, Notas G, Castanas E. Polyphenols and cancer cell growth. *BBA Reviews on Cancer* (2006) *accepted*.

Notas G*, Nifli AP*, Kampa M, Vercauteren J, Kouroumalis E, Castanas E. Resveratrol exerts its antiproliferative effect on HepG2 hepatocellular carcinoma cells, by inducing cell cycle arrest, and NOS activation. *Biochim Biophys Acta*. (2006), 1760: 1657-66.

*= Authors equally contributed

Tsiakalou V, Tsangaridou E, Polioudaki H, Nifli AP, Koulentaki M, Akoumianaki T, Kouroumalis E, Castanas E, Theodoropoulos PA. Optimized detection of circulating anti-nuclear envelope autoantibodies by immunofluorescence. *BMC Immunol*. (2006), 6;7:20.

Alexaki VI, Dermitzaki R, Charalampopoulos I, Kampa M, Nifli AP, Gravanis A, Margioris AN, Castanas E. Neuronal differentiation of PC12 cells abolishes the expression of membrane androgen receptors. *Exp Cell Res* (2006), 312(15):2745-56.

Nifli AP*, Notas G*, Mamoulaki M*, Niniraki M, Ampartzaki V, Theodoropoulos PA, Kopnitsky MJ, Castanas E., Comparison of a multiplex, bead-based fluorescent assay and immunofluorescence methods for the detection of ANA and ANCA autoantibodies in human serum. *J Immunol Methods* (2006), 311: 189-197.

*= Authors equally contributed

Alexaki VI, Charalampopoulos I, Kampa M, Nifli AP, Hatzoglou A, Gravanis A, Castanas E. Activation of membrane estrogen receptors induce pro-survival kinases. *J Steroid Biochem Mol Biol* (2006), 98(2-3): 97-110.

Shariftabrizi A*, Nifli AP*, Ansari M, Saadat F, Ebrahimkhani MR, Alizadeh N, Nasseh A, Alexaki VI, Dehpour AR, Castanas E, Khorramizadeh MR. Matrix metalloproteinase 2 secretion in WEHI 164 fibrosarcoma cells is nitric oxide-related and modified by morphine. *Eur J Pharmacol* (2006), 530(1-2): 33-9.

*= Authors equally contributed

Roussakis E, Liepouri F, Nifli AP, Castanas E, Deligeorgiev TG, Katerinopoulos HE. ICPBC and C12-ICPBC: two new red emitting, fluorescent Ca²⁺ indicators excited with visible light. *Cell Calcium* (2006), 39(1): 3-11.

Nifli A-P, Bosson-Kouamé A, Papadopoulou N, Kogia C, Kampa M, Castagnino C, Strournaras C, Vercauteren J, Castanas E. Monomeric and oligomeric flavanols are agonists of membrane androgen receptors. *Exp Cell Res* (2005), 309: 329-339, 2005.

Nifli A-P, Kampa M, Alexaki VI, Notas G, Castanas E. Polyphenol interaction with the T47D human breast cancer cell line. *J Dairy Res* (2005), 72(S1): 44-50.

Kampa M, Nifli AP, Charalampopoulos I, Alexaki VI, Theodoropoulos PA, Stathopoulos EN, Gravanis A, Castanas E. Opposing effects of estradiol- and testosterone-membrane binding sites on T47D breast cancer cell apoptosis. *Exp Cell Res* (2005), 307: 41-51.

M.Khorramizadeh, A.Shariftabrizi, A.Nifli, I.Vaslli. Nitric oxide modulates morphine-induced inhibition of gelatinase secretion from the mice fibrosarcoma cells: participation of P38 MAPK". *Clin Chim Acta* (2005), 355:421.

Nifli A-P and Castanas E. Polyphenols in the prevention of chronic diseases: Antioxidants and beyond. *Mediet 2005 Proceedings* (2005).

Kampa M, Nifli A-P, Notas G, Alexaki VI, Hatzoglou A, Castanas E. Antioxidant plant phenols and cancer cell growth. In *Antioxidant plant phenols: Sources, Structure-Activity Relationship, Current Trends in Analysis and Characterization*. (D. Boskou, I. Gerothanasis, P. Kefalas, Eds). Singpost Research Editions (2005).

Kampa M, Alexaki VI, Notas G, **Nifli AP**, Nistikaki A, Hatzoglou A, Bakogeorgou E, Kouimtzooglou E, Blekas G, Boskou D, Gravanis A, Castanas E. Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action. *Breast Cancer Res* (2004), 6(2): R63-R74.

Traka M, Goutebroze L, Denisenko N, Bessa M, **Nifli A**, Havaki S, Iwakura Y, Fukamauchi F, Watanabe K, Soliven B, Girault JA, Karagogeos D. Association of TAG-1 with Caspr2 is essential for the molecular organization of juxtaparanodal regions of myelinated fibers. *Journal of Cell Biology* (2003), 162(6): 1161-72.

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ

Παρουσίαση πόστερ στο 58^ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας με τίτλο: “*Pistacia lentiscus* var. *chia* mastic extracts as anti-inflammatory and cytostatic agents”, **AP. Nifli**, E. Castanas, 9-11 Νοεμβρίου 2005, Πάτρα.

Ομιλία στο 1^ο Διεθνές Συνέδριο Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής, με τίτλο: «Η διατροφικά προσλαμβανόμενη φλαβονόλη *quercetin* μεταφέρεται ενεργητικά από τα επιθηλιακά κύτταρα, εντοπίζεται ταχέως στους πυρηνίσκους και επάγει υποακετυλίωση του p53» **A.-Φ. Νιφλή**, Π. Θεοδωρόπουλος, S. Munier, C. Castagnino, Εμ. Ρουσσάκης, Χ. Κατερινόπουλος, J. Vercauteren και Η. Καστανάς, 31 Οκτωβρίου-1 Νοεμβρίου 2006, Αθήνα.

Παρουσίαση πόστερ στο Συνέδριο, που διοργανώθηκε από την Ευρωπαϊκή Οργάνωση Μοριακών Βιολόγων (EMBO) και θέμα: “Mammary Gland Development and Breast Cancer Progression”, με τίτλο: “Monomeric and dimeric flavanols induce actin reorganization through androgen membrane binding sites”, **AP. Nifli**, A. Bosson-Kouamé, N. Papadopoulou, C. Kogia, M. Kampa, C. Castagnino, C. Stournaras, J. Vercauteren, E. Castanas, 6-8 Ιουνίου 2006, Δουβλίνο, Ιρλανδία.

Προσκεκλημένη ομιλήτρια στο 2^ο Διεθνές Συνέδριο «ΑΜΠΕΛΟΣ 2006», Διεθνές Συμπόσιο για την αξιολόγηση και την ανάδειξη ποικιλιών ενός terroir μέσω των μεθόδων οινοποίησης και της εμπορικής διάθεσης των οίνων. Ομιλία με τίτλο: “Vine monomeric and dimeric flavanols: molecular actions”, **AP. Nifli**, 1-3 Ιουνίου 2006, Σαντορίνη.

Παρουσίαση πόστερ στο 57^ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας με τίτλο: “Monomeric and dimeric flavanols induce actin reorganization through androgen membrane binding sites”, **AP. Nifli**, A. Bosson-Kouamé, N. Papadopoulou, C. Kogia, M. Kampa, C. Castagnino, C. Stournaras, J. Vercauteren, E. Castanas, 9-11 Δεκεμβρίου 2005, Αθήνα.

Παρουσίαση πόστερ στο 57^ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας με τίτλο: “Opposing effects of steroid hormones via intracellular and membrane binding sites on the proliferation and apoptosis of HaCaT human keratinocytes”, VI. Alexaki, M. Kampa, I. Charalampopoulos, **AP. Nifli**, A. Gravanis, E. Castanas, 9-11 Δεκεμβρίου 2005, Αθήνα.

Παρουσίαση πόστερ στο 57^ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας με τίτλο: “Testosterone potentiates the antiproliferative effect of Taxol® on prostate cancer cells via membrane binding sites, both *in vitro* and *in vivo*”, M. Kampa, I. Charalampopoulos, C. Kogia, V.I. Alexaki, **A.P. Nifli**, P. Anezinis, P.A. Theodoropoulos, E. N. Stathopoulos, A. Hatzoglou, C. Stournaras, A. Gravanis, E. Castanas, 9-11 Δεκεμβρίου 2005, Αθήνα.

Προσκεκλημένη ομιλήτρια στο 2ο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Επούλωσης Τραυμάτων και Ελκών. Ομιλία με τίτλο: “Effect of vine extracts on the survival and viability of human keratinocytes”, **AP. Nifli**, 23-25 Σεπτεμβρίου 2005, Αθήνα.

Παρουσίαση πόστερ στο 16^ο Ευρωπαϊκό Συνέδριο των IFCC-FESCC (*EUROMEDLAB 2005*) με τίτλο: “Nitric oxide modulates morphine-induced inhibition of gelatinase secretion from the mice fibrosarcoma cells: participation of P38 MAPK”, M.Khorramizadeh, A.Shariftabrizi, **A.Nifli**, I.Vaslli, 8-12 Μαΐου 2005, Γλασκώβη, Ην.Βασίλειο.

Ομιλία στο 2^ο Διεθνές Συνέδριο Παραδοσιακής Μεσογειακής Διατροφής: παρόν, παρελθόν, μέλλον, με τίτλο: “Quercetin Internalization in Breast and Hepatocellular Cancer Cells”, **A.-P. Nifli**, E. Roussakis, G. Notas, ΗΕ. Katerinopoulos, J. Vercauteren, P.A. Theodoropoulos, E. Castanas, 20-22 Απριλίου 2005, Αθήνα.

Ομιλία στην 39^η Ετήσια Επιστημονική Συνάντηση της Ευρωπαϊκής Εταιρείας Κλινικής Έρευνας (ESCI) με τίτλο: “Quercetin internalization in breast and hepatocellular cancer cells”, **A.-P. Nifli**, E. Roussakis, M. Kampa, V.-I. Alexaki, P.A. Theodoropoulos & E. Castanas, 6-9 Απριλίου 2005, Αθήνα.

Παρουσίαση πόστερ στην 39^η Ετήσια Επιστημονική Συνάντηση της Ευρωπαϊκής Εταιρείας Κλινικής Έρευνας (ESCI) με τίτλο: “Antioxidant polyphenols and phenolic acids decrease cancer cell growth, through multiple cellular mechanisms”, M. Kampa, **A.P. Nifli**, G. Notas, V.I. Alexaki, I. Charalampopoulos, A. Gravanis. E. Castanas , 6-9 Απριλίου 2005, Αθήνα.

Παρουσίαση πόστερ στην 39^η Ετήσια Επιστημονική Συνάντηση της Ευρωπαϊκής Εταιρείας Κλινικής Έρευνας (ESCI) με τίτλο: “Estrogen act as neuroprotectants in PC12 cells”, V.I. Alexaki, I. Charalampopoulos, M. Kampa, **A.P. Nifli**, A. Hatzoglou, A. Gravanis & E. Castanas, 6-9 Απριλίου 2005, Αθήνα.

Παρουσίαση πόστερ στο 56^ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας με τίτλο: “The NO/NOS system mediates the antiproliferative effect of wine polyphenols in different cell lines”, **AP. Nifli**, M. Kampa, G. Notas, VI Alexaki, J. Vercauteren, A. Hatzoglou, E. Castanas, 25-27 Νοεμβρίου 2004, Λάρισα.

Παρουσίαση πόστερ στο 56^ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας με τίτλο: “Τα οιστρογόνα διεξάγουν την νευροπροστατευτική τους δράση μέσω ενεργοποίησης πολλαπλών μονοπατιών κινασών επιβίωσης”, Β. Αλεξάκη, Ι. Χαραλαμπίδης, Μ. Καμπά, **Α. Νιφλή**, Α. Χατζόγλου, Α. Γραβάνης και Η. Καστανάς, 25-27 Νοεμβρίου 2004, Λάρισα.

Ομιλία στο 2nd Phytohealth open plenary meeting με τίτλο: “Effect of polyphenols on cell proliferation and tumor apoptosis”, **Artemissia-Phoebe Nifli**, Marilena Kampa, George Notas, Vassilis-Ismini Alexaki, Ioannis Charalampopoulos, Joseph Vercauteren, Achille Gravanis, Elias Castanas, 27-30 Οκτωβρίου 2004, Χερσόνησος.

Παρουσίαση πόστερ στο 22^ο Διεθνές Συνέδριο για Πολυφαινόλες (*ICP*), με τίτλο: “The NO/NOS system mediates the antiproliferative effect of wine polyphenols in different cell lines”, **A.-Ph. Nifli**, M. Kampa, G. Notas, V.-I. Alexaki, J. Vercauteren, A. Hatzoglou, E. Castanas, 25-29 Αυγούστου 2004, Ελσίνκι, Φιλανδία.

Παρουσίαση πόστερ στο 55^ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, με τίτλο: “Signalling mechanisms of phenolic acids on T47D human breast cancer cells”. **Nifli, A.-Ph.**, Kampa, M., Alexaki, V.-I., Notas, G., Nistikaki, A., Hatzoglou, A., Bakogeorgou, E., Kouimtzooglou, E., Blekas, G., Boskou, D., Gravanis, A. and Castanas, E., 13-15 Νοεμβρίου 2003, Αθήνα.

Παρουσίαση πόστερ στο 17ο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας για τις Νευροεπιστήμες, με τίτλο: “Lack of the adhesion molecule TAG-1 results in molecular alterations of the juxtaparanodal regions of myelinated fibers”. Traka, M., Goutebroze, L., Denisenko, N., **Nifli, F.**, Havaki, S., Iwakura, Y., Fukamauchi, F., Watanabe, K., Girault, J.A., Karagogeos, D. 4-6 Οκτωβρίου 2002, Ρέθυμνο.

Παρουσίαση πόστερ στο 16ο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας για τις Νευροεπιστήμες, με τίτλο: “A molecular approach to identify the adhesion molecules involved in the migration

of inhibitory cortical interneurons”. Nifli, A.-F., Denaxa, M., Karagogeos, D.. 19-21 Οκτωβρίου 2001, Θεσσαλονίκη.

Παρουσίαση πόστερ στο Διεθνές Θερινό Σχολείο με θέμα: “Neuronal cells: from differentiation to death”, που οργανώθηκε από το FEBS. Τίτλος: “A molecular approach to identify the adhesion molecules involved in the migration of inhibitory cortical interneurons”. Nifli, A.-F., Denaxa, M., Karagogeos, D.. 15-24 Σεπτεμβρίου 2001, Σπέτσες.

Παρουσίαση πόστερ στο 15ο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας για τις Νευροεπιστήμες, με τίτλο: “Downregulation of somatostatin receptor (sst2A and sst2B) in retinas of mice overexpressing cortistatin: an immunohistochemical study”. Mastrodimitrou, N., Vassilaki, A., Nifli, F., DeLecea, L. and Thermos, K.. 27-29 Οκτωβρίου 2000, Πάτρα.

Παρουσίαση πόστερ στο 19ο Πανελλήνιο Επιστημονικό Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών, με τίτλο: “Απομόνωση και προσδιορισμός μικροοργανισμών ικανών να αναπτύσσονται σε απόβλητα ελαιοτριβείου”. Νιφλή Α.-Φ., Καραμανλίδου Χ., Κολιάτης, Σ., Γιάγκου, Μ.. 15-18 Μαΐου 1997, Θεσσαλονίκη.

ΣΥΜΜΕΤΟΧΕΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ/ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ:

1^ο Διεθνές Συνέδριο Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής, 31 Οκτωβρίου-1 Νοεμβρίου 2006, Αθήνα.

The 2006 Onassis Foundation Science Lecture Series in Biology “Brain Plasticity: From Molecules to Behavior”, 17-21 Ιουλίου 2006, Ηράκλειο.

EMBO Molecular Medicine Conference: “Common Molecular Mechanisms of Mammary Gland Development and Breast Cancer Progression”, 6-8 Ιουνίου 2006, Δουβλίνο, Ιρλανδία

2^ο Διεθνές Συνέδριο «ΑΜΠΕΛΟΣ 2006»: Διεθνές Συμπόσιο για την αξιολόγηση και την ανάδειξη ποικιλιών ενός terroir μέσω των μεθόδων οινοποίησης και της εμπορικής διάθεσης των οίνων, 1-3 Ιουνίου 2006, Σαντορίνη.

COST Strategic Workshop με θέμα “Food & Health: The Way Forward”, 1-3 Φεβρουαρίου 2006, Βρυξέλλες, Βέλγιο.

57^ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, 9-11 Νοεμβρίου 2005, Αθήνα.

3rd International Workshop on Mammary Gland Biotechnology: Nutrition, Genomics and Breast Cancer, το οποίο διοργανώθηκε από την COST B20 ACTION on mammary development, function and cancer, 29 Σεπτεμβρίου έως 1 Οκτωβρίου 2005, Barcelona, Spain.

2^ο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Επούλωσης Τραυμάτων και Ελκών, 23-25 Σεπτεμβρίου 2005, Αθήνα.

The 2005 Onassis Foundation Science Lecture Series in Biology “Programmed cell death and cell signaling in health and disease”, 4-8 Ιουλίου 2005, Ηράκλειο.

2^ο Διεθνές Συνέδριο Παραδοσιακής Μεσογειακής Διατροφής: παρόν, παρελθόν, μέλλον, 20-22 Απριλίου 2005, Αθήνα.

39^η Ετήσια Επιστημονική Συνάντηση της Ευρωπαϊκής Εταιρείας Κλινικής Έρευνας (ESCI), 6-9 Απριλίου 2005, Αθήνα

In situ training on “Luminex Technology: Advanced Applications-Protein Detection” από την Luminex Corporation® (Austin, TX), 21-24 Φεβρουαρίου 2005.

56^ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, 25-27 Νοεμβρίου 2004, Λάρισα.

2nd Phytohealth open plenary meeting, 27-30 Οκτωβρίου 2004, Χερσόνησος.

22^ο Διεθνές Συνέδριο για Πολυφαινόλες (ICP2004), 25-29 Αυγούστου 2004, Ελσίνκι, Φιλανδία.

55^ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, 13-15 Νοεμβρίου 2003, Αθήνα.

2^η Διεθνής Συνάντηση, η οποία οργανώθηκε από την Ελληνική Ενδοκρινολογική Εταιρεία και την Πανελλήνια Ένωση Ενδοκρινολόγων, 25 Οκτωβρίου 2003, Αθήνα.

1^ο Συμπόσιο Βιοϊατρικής Έρευνας. Πανεπιστήμιο Κρήτης, 8-9 Νοεμβρίου 2002, Ηράκλειο.

17^ο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας για τις Νευροεπιστήμες, 4-6 Οκτωβρίου 2002, Ρέθυμνο.

16^ο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας για τις Νευροεπιστήμες, 19-21 Οκτωβρίου 2001, Θεσσαλονίκη.

Διεθνές Θερινό Σχολείο με θέμα "Neuronal cells: from differentiation to death", που οργανώθηκε από το FEBS, 15-24 Σεπτεμβρίου 2001, Σπέτσες.

15^ο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας για τις Νευροεπιστήμες, 27-29 Οκτωβρίου 2000, Πάτρα.

13^ο Συνέδριο της Διεθνούς Εταιρείας Αναπτυξιακής Νευροβιολογίας (ISDN), 28 Ιουλίου-1^η Αυγούστου 2000, Heidelberg, Germany.

Εκπαιδευτικά Σεμινάρια για παιδιά Δημοτικού στα πλαίσια της "Brain Awareness Week", 13-19 Μαρτίου 2000, Ηράκλειο.

Θερινό Σεμινάριο για μεταπτυχιακούς φοιτητές, το οποίο διοργανώθηκε από το Διατμηματικό Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Μοριακής Βιολογίας-Βιοϊατρικής (Τμήματα Ιατρικής και Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης), Αύγουστος 2000, Κολυμπάρι.

14^ο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας για τις Νευροεπιστήμες, 14-16 Μαΐου 1999, Βόλος.

Διεθνές Θερινό Σχολείο Υπολογιστικών Νευροεπιστημών, το οποίο διοργανώθηκε από το Ινστιτούτο Εφαρμοσμένων Μαθηματικών Ηρακλείου Κρήτης, 13 Σεπτεμβρίου έως 9 Οκτωβρίου, 1998, Ηράκλειο.

Ειδικό Συμπόσιο Βιοτεχνολογίας-Φαρμακολογίας: " Η πρόκληση της Βιοτεχνολογίας στην Υγεία: Βιοτεχνολογικά Προϊόντα και Υπηρεσίες " του Τμήματος Φαρμακευτικής του Α.Π.Θ., Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, 22-23 Μαΐου 1998, Αθήνα.

Διεθνές Συνέδριο Μουσικής Πληροφορικής υπό την αιγίδα του Τομέα Ψυχοκινητικής του Τμήματος Ιατρικής του Α.Π.Θ., 25-30 Σεπτεμβρίου 1997, Θεσσαλονίκη.

Ημερίδα: Η ιατροκοινωνική διάσταση του AIDS και τα αντιρετροϊκά φάρμακα, Ελληνική Εταιρεία Μελέτης και αντιμετώπισης του AIDS, 20 Σεπτεμβρίου 1997 Θεσσαλονίκη.

19^ο Πανελλήνιο Επιστημονικό Συνέδριο Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών και 1^ο Βιολογικό Συνέδριο Βαλκανικών Χωρών, 15-18 Μαΐου 1997, Θεσσαλονίκη.

Σεμινάριο εξ αποστάσεως: " Science on the edge of Chaos, Part 2: The self-organisation of life ", EuroPACE, 26 Απριλίου 1995, Θεσσαλονίκη,.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

➤ Ιούλιος 2003 έως σήμερα:

Εκπόνηση διδακτορικής διατριβής με επιβλέποντα τον Καθηγητή Η.Καστανά (Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης) και θέμα: «Μηχανισμός δράσης αντιοξειδωτικών σε κυτταρικό επίπεδο».

➤ Ιούνιος 2001 έως Φεβρουάριος 2003:

Εκπόνηση διδακτορικής διατριβής με επιβλέπουσα την Αν.Καθ.Δ.Καραγωγέως (Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης) και θέμα: «Μελέτη των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στην μετανάστευση των ανασταλτικών ενδονευρώνων του εγκεφαλικού φλοιού».

➤ Νοέμβριος 2000-Μάρτιος 2001:

Απασχόληση στο εργαστήριο της Αν.Καθ.Δ.Καραγωγέως στο πλαίσιο ερευνητικού προγράμματος ΠΕΝΕΔ, με υπεύθυνο τον καθ.Η.Κούβελα (Εργαστήριο Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Πατρών) με θέμα: «Γενοτυπική και φαινοτυπική ανάλυση του διαγονιδίου rcr2-TAX».

➤ Ιανουάριος 2000-Απρίλιος 2000:

Εργαστηριακή άσκηση (rotation) στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας (Τμήμα Ιατρικής, Π.Κ., υπεύθυνη Καθηγήτρια Κ.Θερμού) με θέμα «Ανίχνευση των υποδοχέων νευροδιαβιβαστών στον αμφιβληστροειδή επίμυος και μελέτη της επιδράσεως των αναλόγων σωματοστατίνης στην έκκριση ντοπαμίνης».

➤ Οκτώβριος 1999 - Δεκέμβριος 1999:

Εργαστηριακή άσκηση (rotation) στο Εργαστήριο Νευροεπιστημών (Τμήμα Ιατρικής, Π.Κ., υπεύθυνη Καθηγήτρια Δ.Καραγωγέως) με θέμα «Λειτουργική μελέτη του γονιδίου NSCL-1 στην όρνιθα».

➤ Ιούνιος 1999 - Σεπτέμβριος 1999:

Εργαστηριακή άσκηση (rotation) στο Εργαστήριο Νευρολογίας και Νευρομεταβολικών Νοσημάτων (Τμήμα Ιατρικής, Π.Κ., υπεύθυνος Καθηγητής Α.Πλαϊτάκης) με θέμα: «Αλληλεπίδραση της huntingtin με τη γλουταμινική αφυδρογονάση σε μεταγραφικό, μεταφραστικό και κυτταρικό επίπεδο».

➤ Νοέμβριος 1998 έως Μάιος 1999:

Εργαστηριακή άσκηση (rotation) στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας Θηλαστικών (Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοχημείας, ΙΤΕ, Κρήτη, υπεύθυνος Καθηγητής Ι.Παπαματθαϊάκης) με θέμα: «Επίδραση της νευροτροφίνης NGF στην ανοσολογική απόκριση μέσω των υποδοχέων χαμηλής και υψηλής συγγένειας».

➤ Νοέμβριος 1997 - Φεβρουάριος 1998:

Απασχόληση στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιολογίας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης (Υπεύθυνος καθηγητής Μ.Γιάγκου) και στο Εργαστήριο Ανοσοβιολογίας (Ιπποκράτειο Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης, υπεύθυνοι κκ Πολυμενίδης και Αντωνιάδης), με στόχο την εκμάθηση τεχνικών.

➤ Μάιος 1996 - Νοέμβριος 1997:

Εκπόνηση Διπλωματικής Εργασίας στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιολογίας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης (υπεύθυνοι Καθηγητές Μ.Γιάγκου και Σ.Κολιάης) με θέμα «Απομόνωση και προσδιορισμός μικροοργανισμών ικανών να αναπτύσσονται σε απόβλητα ελαιολάδου» .

➤ Φεβρουάριος 1997 - Απρίλιος 1997:

Μελέτη της συμπεριφοράς φυσιολογικών, κύρια νευρικών, συστημάτων μέσω προσομείωσης σε Η/Υ στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζώων (Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, υπεύθυνος Καθηγητής κ.Θεοφιλίδης).

ΔΙΔΑΚΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

➤ Οκτώβριος 2002 έως σήμερα:

Εργαστηριακός συνεργάτης στο Μάθημα της Γενετικής, στο Τμήμα Φυτικής Παραγωγής του Α.Τ.Ε.Ι. Ηρακλείου Κρήτης.

ΆΛΛΕΣ ΑΣΧΟΛΙΕΣ

1. Πιάνο Δίπλωμα, 13/6/1998
2. Αρμονία Δίπλωμα, 7/5/1991
3. Σπουδές Αντίστιξης 1994-1997
4. Συμμετοχή στο Διεθνές Συνέδριο Μουσικής Πληροφορικής υπό την αιγίδα του Τομέα Ψυχοκινητικής του Τμήματος Ιατρικής του Α.Π.Θ., Θεσσαλονίκη, 25-30 Σεπτεμβρίου, 1997.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι πολυφαινόλες αποτελούν μία ετερογενή ομάδα διατροφικών στοιχείων φυτικής προελεύσεως. Πέραν των αντιοξειδωτικών τους ικανοτήτων, εμφανίζουν μία σειρά δράσεων, όπως αναστολή των κινασών και των τοποϊσομερασών, ενεργοποίηση των απακετυλασών και ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, μέσω των αλληλουχιών πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων NFκappaB ή AP-1, καθώς και αλληλουχιών απόκρισης σε ξενοβιοτικά. Εντούτοις, η μελέτη τους εμφανίζει τρία βασικά προβλήματα. Καταρχήν, οι πολυφαινόλες εμφανίζουν μικρή βιοδιαθεσιμότητα σε ανθρώπους ή ζώα, θέτοντας εν αμφιβόλω την βιολογική σημασία της *in vitro* πειραματικής τους δράσης σε υψηλές συγκεντρώσεις. Δεύτερον, ορισμένες δράσεις σε απομονωμένα συστήματα (υποδοχείς, ένζυμα ή μεταγραφικούς παράγοντες) δεν επιβεβαιώνονται απολύτως σε κύτταρα και τέλος, λόγω της έλλειψης τεχνικών, είναι δύσκολο να διεκρινισθεί, αν οι ουσίες αυτές εισέρχονται στα κύτταρα και κατ'επέκταση αν συνεντοπίζονται με τα μόρια-στόχους τους.

Στην παρούσα μελέτη εξετάσαμε σε κυτταρικό και συστημικό επίπεδο την βιοδιαθεσιμότητά μονομερών και συμπλόκων πολυφαινολών της αμπέλου, καθώς και την συμβολή τους στην κυτταρική ομοιόσταση, τον μεταβολισμό και την σηματοδότηση, ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο. Οι βιολογικές δράσεις των ενώσεων αυτών μελετήθηκαν σε συγκεντρώσεις 10^{-12} - 10^{-6} M, συμβατές με αυτές που παρατηρούνται φυσιολογικά στον οργανισμό, μετά από πρόσληψή τους μέσω της διατροφής.

Τόσο οι μονομερείς πολυφαινόλες, όσο και οι σύμπλοκες, απορροφώνται άμεσα μετά την κατανάλωσή τους σε υγιή υποκείμενα ή κυτταρικές σειρές ενδοθηλιακού τύπου. Η μεταφορά τους είναι ενεργητική και διαμεσολαβείται από συστατικά εκφραζόμενους μεμβρανικούς διαύλους, οι οποίοι ευθύνονται για την ενδοκύττωση των οργανικών ανιόντων και για την εξωκύττωση των ξενοβιοτικών. Επιπροσθέτως, οι πολυφαινόλες εντοπίζονται παροδικά σε υποκυτταρικές δομές (πυρηνίσκους ή ενδοπλασματικό δίκτυο).

Οι πολυφαινόλες εμφανίζουν ποικιλία δράσεων στην κυτταρική ανάπτυξη και μετανάστευση, οι οποίες εκδηλώνονται βραχυπρόθεσμα έως μεσοπρόθεσμα και εξαρτώνται από το μελετώμενο σύστημα. Ανταγωνίζονται την πρόσδεση των ανδρογόνων σε θέσεις της πλασματικής μεμβράνης, μέσω των οποίων ενεργοποιούν τις κινάσες PI3 και FAK, την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού ακτίνης και την μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων. Μέσω του συστήματος NO/NOS επάγουν κυττόσταση και εν τέλει απόπτωση. Ακόμη, προκαλούν άμεση υποακετυλίωση της πρωτεΐνης p53 και επάγουν την έκφραση της απακετυλάσης SIRT1 και των ριβοσωμικών πρωτεϊνών. Το φαινόμενο αυτό σχετίζεται με την παράκαμψη της κυτταρικής γήρανσης και την λειτουργική ρύθμιση της «ηλικίας» των κυττάρων και είναι ιδιαίτερα εμφανές σε μη νεοπλασματικά κύτταρα.

Οι παρατηρήσεις μας υποδεικνύουν τον ρυθμιστικό ρόλο των πολυφαινολών στον καθορισμό της τύχης των κυττάρων και την δυναμική προστατευτική τους δράση. Οι

ιδιότητες αυτές θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν σε κλινικό επίπεδο, για την πρόληψη και αντιμετώπιση παθολογικών καταστάσεων ή χρόνιων νόσων.

SUMMARY

Polyphenols constitute a heterogeneous group of plant-derived dietary micronutrients. Besides their antioxidant properties, they were shown to modulate several molecular pathways, including kinase and topoisomerase inhibition, acetylase activation and NFkappaB or AP-1 transcriptional activity. However, limited bioavailability and tenuous replication of biochemical actions in cellular systems question their efficacy, while current implements are not adequate to define whereas polyphenols enter the cell and colocalize with their presumptive molecular targets.

In the present work, we investigated the bioavailability, as well as the contribution of monomeric and polymeric grape polyphenolic compounds in cell metabolism and homeostasis at cellular and systemic level. Polyphenols were studied at physiologically relevant concentrations, ranging from 10^{-12} to 10^{-6} M.

We found that monomeric and condensed polyphenols are rapidly absorbed after consumption by healthy individuals or administration in epithelia monolayers. They are transported across plasma membrane through constitutively expressed channels, such as organic anion transporters and multi-drug resistant protein pumps. In addition, we demonstrated that polyphenols accumulate promptly but transiently in subcellular compartments (nucleoli or ER), without intercalating to macromolecules.

Polyphenols exert short- or mid-term actions on cell proliferation and adhesion, depending on cellular context. Through androgen membrane binding sites, they activate PI3K and FAK and they further modulate actin cytoskeleton rearrangement and cell migration. Moreover, polyphenols induce apoptosis via NO/NOS system regulation. Finally, they rapidly induce p53 hypoacetylation and SIRT1 and ribosomal protein expression. These rapid transcriptional modifications provide evidences about the role of polyphenols in RNA metabolism, joint to cell survival or demise.

Our data suggest a complicate but substantial role of dietary polyphenols in cell fate regulation. These properties could be of potential value in the prevention and treatment of chronic conditions and diseases.

 **EPIEXOMENA**

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	iii
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ.....	ix
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	xvii
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	xxi
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ.....	xxix

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1. ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ.....	5
1.1.1. Βιοσύνθεση.....	5
1.1.1.1. Shikimates.....	5
1.1.1.2. Polyacetates	6
1.1.2. ΜΟΝΟΜΕΡΕΙΣ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ.....	7
1.1.2.1. Φαινολικά οξέα.....	7
1.1.2.2. Στυλβένια	8
1.1.2.3. Λιγνάνες.....	8
1.1.2.4. Φλαβονοειδή.....	8
1.1.2.4.1. Φλαβονόλες.....	9
1.1.2.4.2. Φλαβανόνες.....	9
1.1.2.4.3. Χαλκόνες.....	9
1.1.2.4.4. Φλαβανονόλες/Κατεχίνες.....	10
1.1.2.4.5. Φλαβόνες.....	10
1.1.2.4.6. Ισοφλαβονοειδή.....	10
1.1.3. ΣΥΜΠΛΟΚΕΣ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ.....	11
1.2. ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑ-ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ.....	15
1.2.1. Ορισμοί-Προβλήματα στην μελέτη των πολυφαινολικών ουσιών.....	15
1.2.1.1. Βιοδιαθεσιμότητα.....	15
1.2.1.2. Απορρόφηση.....	16
1.2.1.3. Απέκκριση.....	16
1.2.1.4. Βιοαποικοδόμηση.....	17
1.2.1.1. Βιολογικοί δείκτες (Biomarkers)	17
1.2.2. Βιβλιογραφικά δεδομένα.....	18
1.2.2.1. Απομόνωση και ανάλυση των πολυφαινολών από το πλάσμα και τα ούρα.....	18
1.2.2.2. Μονομερείς πολυφαινόλες:.....	19
Βιοδιαθεσιμότητα-φαρμακοκινητική-βιολογικοί δείκτες.....	19
1.2.2.3. Σύμπλοκες πολυφαινόλες:.....	21
Βιοδιαθεσιμότητα-φαρμακοκινητική-βιολογικοί δείκτες.....	21
1.2.2.4. Μεταβολισμός.....	23
1.2.2.4.1. Μεταβολισμός των πολυφαινολών πριν την απορρόφησή τους.....	23
1.2.2.4.1. Προσυστημικός μεταβολισμός.....	24
1.2.2.4.1. Συστημικός μεταβολισμός.....	25
1.3. ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΕΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ.....	30
1.3.1. Αντιοξειδωτική δράση.....	30

1.3.2. Ρύθμιση της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL).....	32
1.3.3. Αλληλεπίδραση με την οξειδάση της ξανθίνης	33
1.3.4. Συσσώρευση αιμοπεταλίων	33
1.3.5. Αντικαρκινική δράση	34
1.3.5.1. Επιδημιολογικά δεδομένα.....	34
1.3.5.2. Πειραματικά μοντέλα σε ζώα.....	34
1.3.6. Αναστολή των κινασών	39
1.3.7. Ρύθμιση της μεταγραφικής δραστηριότητας.....	39
1.3.7.1. Πρόσδεση σε μεταγραφικούς παράγοντες	39
1.3.7.2. Ρύθμιση της μεταγραφής μέσω άμεσης πρόσδεσης στο DNA.....	40
1.3.8. Συσχετισμός με γνωσιακές λειτουργίες	40
1.3.9. Προστασία από νευροεκφυλιστικές νόσους (Alzheimer και Parkinson)	41
1.3.10. Ρύθμιση της δράσεως του πρωτεοσώματος.....	42
1.3.11. Αντιϊκή δράση.....	43
1.3.12. Άλλες δράσεις	44
1.4. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	45
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	47
2.1. Αντιδραστήρια	49
2.2. Πολυφαινόλες.....	49
2.2.1. Απομόνωση απλών μορίων	49
2.2.2. Απομόνωση ολιγομερών.....	49
2.2.3. Κλασμάτωση εκκυλισμάτων σταφυλής	49
2.3. Φασματοσκοπική ανάλυση.....	51
2.4. Ανάλυση των μεταβολιτών της quercetin με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσεως (HPLC)	51
2.5. Κυτταροκαλλιέργειες	52
2.5.1. Επίδραση με πολυφαινόλες	52
2.5.2. Επίδραση με H ₂ O ₂	53
2.5.3. Επίδραση με υπεριώδη ακτινοβολία	53
2.6. Μέτρηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.....	53
2.6.1. Μέθοδος MTT.....	53
2.6.2. Μέθοδος Sulphorhodamine B (SRB).....	54
2.7. Εκτίμηση της κυτταρικής μετανάστευσης.....	54
2.8. Μέτρηση αποπτωτικών δεικτών.....	55
2.8.1. ApoPercentage Assay	55
2.8.2. Χρώση με Annexin V και ιωδιούχο προπίδιο	55
2.8.3. Ποσοτικός προσδιορισμός ολιγονουκλεοσωμάτων	55
2.9. Συνεστιακή μικροσκοπία	56

2.9.1. Χρώση νουκλεϊκών οξέων.....	56
2.9.2. Άμεση χρώση του κυτταροσκελετού ακτίνης.....	56
2.9.3. Ανοσοφθορισμός.....	56
2.9.4. Μελέτες ενδοκύττωσης και εξωκύττωσης	57
2.9.4.1. Μονιμοποίηση.....	57
2.9.4.2. Αγωγή με νουκλεάσες.....	58
2.9.4.4. Τροποποίηση του πυρηνικού φακέλλου	59
2.10. Αλληλεπίδραση της quercetin με DNA.....	59
2.11. Ηλεκτροφόρηση δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων σε πηκτή αγαρόζης.....	59
2.12. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	60
2.13. Χρήση μικροσυστοιχιών (DNA microarrays).....	61
2.13.1. Γενικές αρχές	61
2.13.2. Σύνθεση ανιχνευτών	61
2.13.3. Σχεδιασμός και επιλογή ανιχνευτών.....	62
2.13.4. Πειραματικό πρωτόκολλο	62
2.13.5. Στατιστική ανάλυση	63
2.14. Μέθοδος προσδιορισμού συγκέντρωσης πρωτεϊνών κατά Bradford	64
2.15. Ανάλυση πρωτεϊνών	64
2.15.1. Εκχύλιση πρωτεϊνών.....	64
2.15.2. Ανοσοκατακρήμνιση	65
2.15.3. Υπολογισμός του λόγου πολυμερούς/μονομερούς ακτίνης.....	65
2.15.4. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών (PAGE) - Ανοσοεντύπωμα (Western)	66
2.16. Αλληλεπίδραση της quercetin με πρωτεΐνες	67
2.17. Μέτρηση των παραγόμενων ελευθέρων ριζών οξυγόνου (Reactive oxygen species, ROS).....	67
2.18. Μελέτη του συστήματος NO/NOS.....	68
2.18.1. Κυτταρομετρία ροής	68
2.18.2. Υπολογισμός μεταβολιτών αζώτου σε υπερκείμενα κυτταροκαλλιέργειας	68
2.18.3. Μέτρηση της ενεργότητας της συνθάσης του NO.....	69
2.18.4. Ημιποσοτικός προσδιορισμός της έκφρασης των NOS.....	70
2.19. Μελέτη της πρόσδεσης των πολυφαινολών σε μεμβρανικούς υποδοχείς στεροειδών	70
2.19.1. Θεωρητικό υπόβαθρο.....	70
2.19.2. Μελέτη της πρόσδεσης των πολυφαινολών σε μεμβρανικούς υποδοχείς στεροειδών σε απομονωμένες μεμβράνες	72
2.19.3. Μελέτη της πρόσδεσης των πολυφαινολών σε μεμβρανικούς υποδοχείς στεροειδών σε άθικτα κύτταρα με κυτταρομετρία ροής	73
2.19.4. Μελέτη της πρόσδεσης των πολυφαινολών σε μεμβρανικούς υποδοχείς στεροειδών σε άθικτα κύτταρα με συνεστιακή μικροσκοπία	73

2.20. Έλεγχος της in vivo αντικαρκινικής δράσεως των φλαβονοειδών σε πειραματικό μοντέλο αθυμικών επίμυων	74
2.21. Υπολογισμός της αντιοξειδωτικής και οξειδωτικής ικανότητας του ορού.....	74
2.22. Προσδιορισμός ιντερλευκινών ορού	75
3. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	77
3.1. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΣΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ ΚΑΙ ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ NO/NOS	81
3.1.1. Αντιπολλαπλασιαστική δράση	81
3.1.2. Ρόλος του συστήματος NO/NOS	84
3.1.3. Συζήτηση.....	92
3.1.4. Ενεργοποίηση ενδοκυττάρων μηχανισμών μεταγωγής σήματος.....	96
3.2 ΤΑΧΕΙΑ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΣΤΟ ΕΠΙΠΕΔΟ ΤΗΣ ΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ	101
3.2.1. ΚΥΤΤΑΡΟΣΚΕΛΕΤΟΣ ΑΚΤΙΝΗΣ	101
3.2.1.1. Δομή και λειτουργία	101
3.2.1.4. Δομές F-actin	104
3.2.1.4.1. Ινίδια και ίνες.....	104
3.2.1.4.2. Δέσμες	104
3.2.1.4.3. Λαμελλιπόδια-Λαμέλλα-Αψίδα	105
3.2.1.4.4. Φιλοπόδια-Μικροακίδες.....	106
3.2.1.5. Ρυθμιστικές πρωτεΐνες	106
3.2.2. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΜΕ ΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΟΣΚΕΛΕΤΟ ΑΚΤΙΝΗΣ	111
3.2.2.1. Μετανάστευση	111
3.2.2.2. Διήθηση και αγγειογένεση	114
3.2.3. ΣΤΕΡΟΕΙΔΗ.....	116
3.2.3.1. Μηχανισμοί δράσεως στεροειδών	116
3.2.3.2. Δομή μεμβρανικών υποδοχέων στεροειδών.....	117
3.2.3.3. Στεροειδικές δράσεις των πολυφαινολών	120
3.2.4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	124
3.2.5. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΗΣ ΤΑΧΕΙΑΣ ΔΡΑΣΕΩΣ ΤΩΝ ΟΛΙΓΟΜΕΡΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΑΝΔΡΟΓΟΝΩΝ	127
3.2.5.1. Πρώιμα αποτελέσματα	127
3.2.5.1.1. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός.....	127
3.2.5.1.2. Αντιοξειδωτική δράση	128
3.2.5.1.3. Τροποποίηση του κυτταροσκελετού της ακτίνης.....	129
3.2.5.2. Διαλογή μεμονωμένων πολυφαινολών.....	131
3.2.5.2.1. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός.....	131
3.2.5.2.2. Αντιοξειδωτική δράση	132
3.2.5.1.3. Τροποποίηση του κυτταροσκελετού της ακτίνης.....	136
3.2.6. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΜΕ ΤΙΣ ΜΕΜΒΡΑΝΙΚΕΣ ΘΕΣΕΙΣ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΤΩΝ ΑΝΔΡΟΓΟΝΩΝ	141

3.2.6.1. Μεμβρανικές θέσεις πρόσδεσης στεροειδών	141
3.2.6.1.1. Ανίχνευση	141
3.2.6.1.2. Βιολογική δράση	142
3.2.6.2. Ανταγωνιστική πρόσδεση των μονομερών και διμερών φλαβονολών στις μεμβρανικές θέσεις πρόσδεσης ανδρογόνων στα κύτταρα T47D	142
3.2.6.2.1. Πρόσδεση των πολυφαινολών σε μεμβρανικούς υποδοχείς ανδρογόνων	143
3.2.6.1.2. Επίδραση των μονομερών και διμερών φλαβονολών στον κυτταροσκελετό ακτίνης.....	144
Εκτίμηση της αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού με ανοσοφθορισμό.....	144
Ανοσοεντύπωμα ποσοτική εκτίμηση του πολυμερισμού της ακτίνης με ανοσοεντύπωμα .	145
3.2.6.1.3. Αλληλεπίδραση των πολυφαινολών με σηματοδοτικούς μηχανισμούς	145
3.2.6.1.4. Φυσιολογικός ρόλος της αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού.....	147
3.2.6.1.5. Συζήτηση	148
3.2.7. <i>IN VIVO ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΔΙΜΕΡΩΝ ΦΛΑΒΑΝΟΛΩΝ</i>	152
3.3. ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΣΤΟ ΠΛΑΣΜΑ.....	159
3.3.1. <i>Μακροχρόνια χορήγηση</i>	159
3.3.1.1. Εκκύλιση ελιάς.....	161
3.3.1.1.1. Πειραματικό υλικό	161
3.3.1.1.2. Αποτελέσματα	161
3.3.1.2. Εκκύλιση συμπλόκων πολυφαινολών αμπέλου	162
3.3.1.2.1. Πειραματικό υλικό	163
3.3.1.2.2. Αποτελέσματα	164
3.3.2. <i>Βραχυχρόνια χορήγηση</i>	164
3.3.2.1. Πειραματικό υλικό	164
3.3.2.2. Αποτελέσματα	165
3.3.3. <i>Συζήτηση</i>	166
3.4. ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ.....	171
3.4.1. <i>Διαθέσιμες μέθοδοι-εργαλεία</i>	171
3.4.2. <i>Παρατηρήσεις σε in vitro συστήματα</i>	174
3.4.3. <i>Quercetin (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone)</i>	175
3.4.3.1. Φθορισμός.....	175
3.4.3.1.1. <i>Η quercetin εμφανίζει συγκεκριμένες φθορίζουσες ιδιότητες σε κυτταρικό περιβάλλον</i>	176
3.4.3.1.2. <i>Αλληλεπιδράσεις της quercetin με νουκλεϊκά οξέα</i>	178
3.4.3.1.3. <i>Αλληλεπιδράσεις της quercetin με αλβουμίνη</i>	181
3.4.3.1.4. <i>Αλληλεπιδράσεις της quercetin με ακτίνη</i>	182
3.4.3.1.5. <i>Αλληλεπιδράσεις της quercetin με άλλες ενδοκυττάρειες πρωτεΐνες</i>	183
3.4.3.2. Ενδοκύττωση	184
3.4.3.3. Εξωκύττωση	188
3.4.3.4. Πυρηνική μεταφορά	190
3.4.3.5. Μεταβολισμός.....	191
3.4.3.5. Υποκυτταρικός εντοπισμός	194
3.5. ΤΑΧΕΙΑ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ QUERCETIN ΣΤΟΝ ΠΥΡΗΝΑ	201

3.5.1. Υποακετυλίωση του ογκογονιδίου p53	202
3.5.2. Ρύθμιση της μεταμεταγραφικής τροποποίησης των πυρηνικών πρωτεϊνών....	204
3.5.3. Ρύθμιση της γονιδιακής μεταγραφής	206
3.5.4. Συζήτηση.....	208
3.6. Επίδραση των πολυφαινολών σε μη νεοπλαστικά κύτταρα	215
3.6.1. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός	215
3.6.2. Αντιοξειδωτική δράση.....	216
3.6.3. Προστασία από την υπεριώδη ακτινοβολία	217
3.6.4. Αλκάλωση.....	219
3.6.5. Κυτταρική μετανάστευση	219
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	221
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	233

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

12-HETE: 12-Hydroxyeicosatetraenoic acid
3 β -HSD: 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase, δεϋδρογενάση των 3 β -υδροξυστεροειδών
A/P ενδονουκλεάση: Apurinic/aprimidinic endonuclease
ABAP: 2,2'-azobis-(2-amidinopropane) dihydrochloride
ABC: ATP Binding Cassette transporter
ABTS: 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)
ACTH: adrenocorticotropic hormone ή corticotropin, αδρενοκορτικοτροπίνη
ADF/coffilin: Actin Depolymerising Factor
ADP: adenosine diphosphate, διφωσφορική αδενοσίνη
AFG3L1: ATPase Family Gene 3-Like 1
AhR: aryl hydrocarbon receptor, υποδοχέας διοξινών
AKT/PKB: protein kinase B, πρωτεϊνική κινάση B
AMPK: AMP-activated protein kinase
AP-1: μεταγραφικός παράγων, ετεροδιμερές των c-jun και c-Fos
APCI: Atmospheric Pressure Chemical Ionization, χημικός ψεκασμός-ιονισμός υποβοηθούμενος από ατμοσφαιρική πίεση
APP: amyloid β (A4) precursor protein
AR: Androgen Receptor, υποδοχέας ανδρογόνων
ARA55: androgen receptor associated protein 55 ή Hic-5
Arf: ADP-ribosylation factor
Arp2/3: actin related protein 2/3
ATP: adenosine triphosphate, τριφωσφορική αδενοσίνη
B4GALT1: Beta-GALactosylTransferase 2
Bax: Bcl2-associated X protein
BCRP/ABCG2: ATP-binding cassette, sub-family G
Bmf: Bcl2 modifying factor
BSA: Bovine Serum Albumin
bp: basepair
C-3-G: cyanidin-3-O-beta-glucopyranoside
cAMP: cyclic adenosine monophosphate, κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη
CBB: Coomassie Brilliant Blue
CBP/P300: cAMP responsive element binding protein
Cdc: cyclin
Cdk: Cyclin-dependent kinase
cDNA: complementary deoxyribonucleic acid
CE: Capillary Electrophoresis
CK: casein kinase
COA: COrrispondance Analysis, Ανάλυσης Ανταπόκρισης
COMT: Catechol-O-MethylTransferase
COX: cyclooxygenase
CPC: Centrifugal Partition Chromatography
Csk: carboxyl-terminal Src kinase

cTAC: corrected Total Antioxidant Capacity, «διορθωμένη» ολική αντιοξειδωτική ικανότητα
CYP: Cytochrome P450 subfamily I (aromatic compound-inducible) member, κυττόχρωμα
CYP7A: cholesterol-7 α -hydroxylase
DAD-FLD-ESI/MS: Diode Array Detection - Fluorescence Detector - Electron Spray Ionization / Mass spectrometry
DAF: diaminofluorescein diacetate
DAG: diacylglycerol, διακυγλυκερόλη
DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole
DCMS: Dorsal Cortical Microfilament Sheath
DHR123: Dihydrorhodamine 123
DHT: dihydrotestosterone
DMBA: dimethylbenz[a]anthracene
DMSO: dimethyl sulfoxide
DNA: deoxyribonucleic acid, δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
dNTP: deoxynucleotide, δεοξυνουκλεοτίδιο
Dok1: p62 docking protein
DRB: 5,6-dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazole
Drf3: Diaphanous-related formin 3
DTT: dithiothreitol
ΕΥΚ: Εμβασό Υπό την Καμπύλη
ECL: Enzymatic Chemiluminescence, ενζυμική χημειοφωταύγεια
EDRF: erythroid differentiation associated factor
EDTA: αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
EG: epicatechin gallate
EGC: epigallocatechin
EGCG: epigallocatechin gallate
EGF: Epidermal Growth Factor
Egr1: Early Growth Response 1
EGTA: αιθυλενογλυκολ-δισ(β-αμινο)-N,N,N',N'-τετραοξικό οξύ
EI: Electron ionization, ιονισμός με ηλεκτρόνια
Ena/VASP: Ena/vasodilator stimulated phosphoprotein
END5/YLR337C/END5/MDP2/YLR337W: Proline-rich actin-associated protein involved in cytoskeletal organization and cytokinesis; related to mammalian Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP)-interacting protein (WIP)
eNOS: endothelial nitric oxide synthase, ενδοθηλιακή συνθάση του NO
EpRE: antioxidant/Electrophile Response Element
ER: Estrogen Receptor, υποδοχέας οιστρογόνων
ERK: Extracellular signal-regulated kinase
ERM: ezrin/radixin/moesin
ESI: ElectroSpray Ionization, ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό
ET: endothelin
EtBr: βρωμιούχο εθίδιο
FAB: Fast Atom Bombardement, ταχύς βομβαρδισμός με άτομα
FABP1: fatty acid binding protein 1

FAD: flavin adenine dinucleotide, φλαβινοαδερινονουκλεοτίδιο
FAK: Focal Adhesion Kinase
FBS: Fetal bovine serum, ορός εμβρύου βοός
FDA: Food and Drug Administration, Αμερικανικός Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων
FDPS: farnesyl diphosphate synthase, συνθάση πυροφωσφορικού φαρνεσουλίου
FGF: Fibroblast growth factor
FITC: fluorescein isothiocyanate
FKHR-L1 ή Fhl1: Forkhead in rhabdomyosarcoma like 1
FMN: Flavin mononucleotide
FRET: Fluorescence/Förster resonance energy transfer
FSH: Follicle stimulating hormone, θυλακιοτρόπος ορμόνη
FT-ICR-MS: Fourier Transform-Ion Cyclotron Resonance-Mass Spectrometry, ανάλυση Fourier σε συνδυασμό με ιονικό συντονισμό και φασματομετρία μάζας
FXR: farnesoyl X receptor
F-ακτίνη: filamentous actin, ινίδια ακτίνης
FoxO: Forkhead Box O
GABA_A: γ-aminobutyric acid (GABA) A receptor
G-actin: globular actin, μονομερής ακτίνη
GC: Gas Chromatography, αέριος χρωματογραφία
GEF: GDP/GTP exchange factors
GEK: Genghis Khan
GFP: Green Fluorescent Protein
GLUT: glutamate transporter, υποδοχέας γλουταμινικού οξέος
GlyR: υποδοχέας γλυκίνης
GMO-free: genetically modified organism-free
GPR30: G protein-coupled receptor 30
GSE: grape seed extract
GSH: glutathione
GSH: N-(N-L-γ-glutamyl-L-cysteinyl)glycine ή glutathione, γλουταθειόνη
GST: Glutathione S-Transferase, S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης
HBSS: Hank's Balanced Salt Solution
HDAC: histone deacetylase, απακετυλάση
HDL: High Density Lipoprotein, λιποπρωτεΐνη Υψηλής Πυκνότητας
HDM2: human double minute 2
HEPES: 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid
HGF: Hepatocyte Growth Factor
Hic-5/ARA55: androgen receptor coactivator isoform 1/androgen receptor associated protein 55, ARA55
HIF-1: Hypoxia Inducible factor 1
HIV-1: Human Immunodeficiency Virus 1
HMG-CoA reductase: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase
HNF: Hepatocyte Nuclear Factor
HOX : heme oxygenase, οξυγενάση της αίμης
HPLC: High-Pressure Liquid Chromatography, υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσεως

HPLC-ESI-MS
HRP: Horse Radish Peroxidase, υπεροξειδάση χρένου
hsp27: heat shock protein 27
hsp90: heat shock protein 90
HUVEC: Human Umbilical Vein Endothelial Cells
IC₅₀: half maximal inhibitory concentration
ICAM: InterCellular Adhesion Molecule
ICAM-1: InterCellular Adhesion Molecule-1
IFN: interferon, ιντερφερόνη
IGF: Insulin Growth Factor
IGFBP-3: Insulin-like Growth Factor Binding Protein 3
IL: interleukine, ιντερλευκίνη
iNOS: inducible nitric oxide synthase, επαγόμενη συνθάση του NO
IP₃: inositol triphosphate, τριφωσφορική ινοσιτόλη
IRS-1: insulin receptor substrate protein-1
IRSp53: insulin receptor substrate p53/p58
JNK: c-Jun N-terminal kinase
K_d: dissociation constant, σταθερά διάστασης
Kb: kilobases
kD: kiloDalton
ΚΝΣ: Κεντρικό Νευρικό Σύστημα
LC/ESI: Liquid Chromatography/Electron Spray Ionization
LD₅₀: median lethal dose
LDL: Λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας
L-DOPA: levodopa ή 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine, ντοπαμίνη
LH: luteinizing hormone, ωχρινοποιητική ορμόνη
L-NAME: N^G-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride
LOX: lipoxygenase
LPA: lysophosphatidic acid
LPS: Lipopolysaccharide
LSIMS: Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry, φασματομετρία υγρής φάσης δευτερευόντων ιόντων
LXR: Liver X Receptor, ηπατικός υποδοχέας X
MALDI-TOF-MS: Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight-Mass Spectrometry, διέγερση με μονοχρωματική ακτινοβολία σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας
MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase
MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase
MB: μοριακό βάρος
MDMA: 3,4-methylenedioxymethamphetamine, ecstasy
MDR: Multi-Drug Resistant Protein
Melan-A/MART-1: Melanoma antigen recognized by T-cells 1
MLV: Moloney virus
MMP: Matrix MetalloProtease
MPTP: 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
MRM: Multiple Reaction ion Monitoring

mRNA: messenger ribonucleic acid
mRNA: messenger RNA
MRP: Multidrug Resistance associated Protein
MS: Mass Spectrometry, φασματομετρία μάζας
MTT: 3-(4,5 dimethylthiazol-2yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide
NAD: Nicotinamide Adenine Dinucleotide, νικοτιναμινοδινουκλεοτιδίο
NADPH: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, φωσφονικοτιναμινοδινουκλεοτιδίο
Nck: Non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein
NF-160: neurofilament-160
NF-200: neurofilament-200
NFκB: Nuclear Factor κ B
NMR: Nuclear Magnetic Resonance, πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός
NO: Nitric Oxide, μονοξείδιο του αζώτου
NPC: Nuclear Pore Complex, σύμπλοκο πυρηνικών πόρων
NQO1: οξειδοαναγωγή NADPH/κινόνης
O/N: overnight
OATP: Organic Anion Transporter Polypeptide, πολυπεπτιδικός μεταφορέας οργανικών ανιόντων
OD: Optical Absorbance, οπτική πυκνότητα
OPC: Oligomeric ProCyanidins, ανθοκυανίνες
p.o.: *per os*
PAGE: PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή ακρυλαμίδης
PAHs: πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες
PAK: P21-Activated Kinase
PBR: Peripheral-type Benzodiazepine Receptor, περιφερειακός (μιτοχονδριακός) υποδοχέας βενζοδιαζεπινών
PBS: Phosphate Buffer Saline, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών
PCA: υπερκλωρικό οξύ
PCO: ProCyanidolic Oligomers, ανθοκυανίνες
PCR: Polymerase Chain Reaction, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
PDGF: Platelet-Derived Growth Factor
PEI: polyethylenimine
PI: ιωδιούχο προπίδιο
PI3K: Phosphatidylinositol 3-Kinase
PI-4-P5K: phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase
PIF: Proteolysis-Inducing Factor
PIP₂: διφωσφορική ινοσιτόλη
PKA: protein kinase A, πρωτεϊνική κινάση A
PKC: Protein kinase C, πρωτεϊνική κινάση C
PLA₂: phospholipase A₂, φωσφολιπάση A₂
PLC: phospholipase C, φωσφολιπάση C
PMA: Phorbol 12-myristate 13-acetate
PML: ProMyelocytic Leukemia protein
PMSF: phenylmethylsulphonylfluoride
POD: peroxidase, υπεροξειδάση

Pol II: RNA polymerase II, πολυμεράση II
POR-1: Partner Of Rac
PPAR: Peroxisome Proliferative Activated Receptor
PR: Progesterone Receptor, υποδοχέας προγεστερόνης
Prep-HPLC: παρασκευαστική HPLC
PSA: Prostate specific antigen, προστατικό αντιγόνο
PTX: Pertussis Toxin
rDNA: ριβοσωμικό DNA
RNS: Reactive Nitrogen Species, ελεύθερες ρίζες αζώτου
ROK: Rho-associated kinase
ROS: Reactive Oxygen Species, ελεύθερες ρίζες οξυγόνου
rRNA: ριβοσωμικό RNA
RT-PCR: Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
RXR: Retinoid X Receptor, υποδοχέας ρετινοϊκού οξέος
SDS: Sodium Dodecyl Sulfate
SGLT: solute carrier family (SCL), Sodium/GLucose coTransporter, συμμεταφορέας νατρίου/γλυκόζης
SHBG: Sex Hormone-Binding Globulin
siRNA: small interfering RNA, short interfering RNA ή silencing RNA
SIRT/SIR: sirtuin
SNAP: (S)-Nitroso-N-acetylpenicillamine
SRB: SulphoRhodamine B
SRE: Sterol Regulatory Elements
SREBP: Sterol Regulatory Element Binding Proteins
SRF: serum response factor/c-fos serum response element-binding transcription factor
StAR: Steroidogenic Acute Regulatory protein, οξεία ρυθμιστική στεροειδογενετική πρωτεΐνη
Stat: Signal transducer and activator of transcription
SULT: Sulfotransferase
TAC: Total Antioxidant Capacity, ολική αντιοξειδωτική ικανότητα
Tandem mass spectrometric methods
TBARS: Thiobarbituric Acid Reactive Species
TCA: τριχλωροξικό οξύ
TGF: Transforming Growth Factor
TIMP: Tissue Inhibitor of MetalloProteases
TNF: Tumor Necrosis Factor
TOR: Target Of Rapamycin
TPA: 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate
TRAMP model: TRansgenic Adenocarcinoma Mouse Prostate model
TSA: TrichoStatin A
TTF: Translocation Three Four
TOC: Total Oxidant Capacity, ολική οξειδωτική ικανότητα
UDP-glucuronosyl transferase, UDP-glucuronosyl transferase
UGT : UDP-GlucuronosylTransferase
UHT : Ultra Heat Treatment
u-PA: urokinase-type plasminogen activator

UV: UltraViolet radiation

VCAM: Vascular Cell Adhesion Molecule

VEGF/VPF: Vascular Endothelial Growth Factor

WASP (Wiskott-Aldrich syndrome proteins, αιματοποιητικό WASP και N-WASP)

WASP: Wiskott-Aldrich Syndrome Protein

XBP1: X box Binding Protein-1

XRE: Xenobiotic Response Element

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1. ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ	5
1.1.1. Βιοσύνθεση	5
1.1.1.1. Shikimates	5
1.1.1.2. Polyacetates	6
1.1.2. ΜΟΝΟΜΕΡΕΙΣ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ	7
1.1.2.1. Φαινολικά οξέα	7
1.1.2.2. Στυλβένια	8
1.1.2.3. Λιγνάνες	8
1.1.2.4. Φλαβονοειδή	8
1.1.2.4.1. Φλαβονόλες	9
1.1.2.4.2. Φλαβανόνες	9
1.1.2.4.3. Χαλκόνες	9
1.1.2.4.4. Φλαβανονόλες/Κατεχίνες	10
1.1.2.4.5. Φλαβόνες	10
1.1.2.4.6. Ισοφλαβονοειδή	10
1.1.3. ΣΥΜΠΛΟΚΕΣ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ	11
1.2. ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑ-ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ	15
1.2.1. Ορισμοί-Προβλήματα στην μελέτη των πολυφαινολικών ουσιών	15
1.2.1.1. Βιοδιαθεσιμότητα	15
1.2.1.2. Απορρόφηση	16
1.2.1.3. Απέκκριση	16
1.2.1.4. Βιοαποικοδόμηση	17
1.2.1.1. Βιολογικοί δείκτες (Biomarkers)	17
1.2.2. Βιβλιογραφικά δεδομένα	18
1.2.2.1. Απομόνωση και ανάλυση των πολυφαινολών από το πλάσμα και τα ούρα	18
1.2.2.2. Μονομερείς πολυφαινόλες:	19
Βιοδιαθεσιμότητα-φαρμακοκινητική-βιολογικοί δείκτες	19
1.2.2.3. Σύμπλοκες πολυφαινόλες:	21
Βιοδιαθεσιμότητα-φαρμακοκινητική-βιολογικοί δείκτες	21
1.2.2.4. Μεταβολισμός	23
1.2.2.4.1. Μεταβολισμός των πολυφαινολών πριν την απορρόφησή τους	23
1.2.2.4.1. Προσυστημικός μεταβολισμός	24
1.2.2.4.1. Συστημικός μεταβολισμός	25
1.3. ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΕΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ	30
1.3.1. Αντιοξειδωτική δράση	30
1.3.2. Ρύθμιση της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL)	32
1.3.3. Αλληλεπίδραση με την οξειδάση της ξανθίνης	33
1.3.4. Συσώρευση αιμοπεταλίων	33
1.3.5. Αντικαρκινική δράση	34
1.3.5.1. Επιδημιολογικά δεδομένα	34
1.3.5.2. Πειραματικά μοντέλα σε ζώα	34

1.3.6. Αναστολή των κινασών	39
1.3.7. Ρύθμιση της μεταγραφικής δραστηριότητας.....	39
1.3.7.1. Πρόσδεση σε μεταγραφικούς παράγοντες	39
1.3.7.2. Ρύθμιση της μεταγραφής μέσω άμεσης πρόσδεσης στο DNA.....	40
1.3.8. Συσχετισμός με γνωσιακές λειτουργίες	40
1.3.9. Προστασία από νευροεκφυλιστικές νόσους (<i>Alzheimer</i> και <i>Parkinson</i>).....	41
1.3.10. Ρύθμιση της δράσεως του πρωτεοσώματος.....	42
1.3.11. Αντιϊκή δράση.....	43
1.3.12. Άλλες δράσεις	44
1.4. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	45

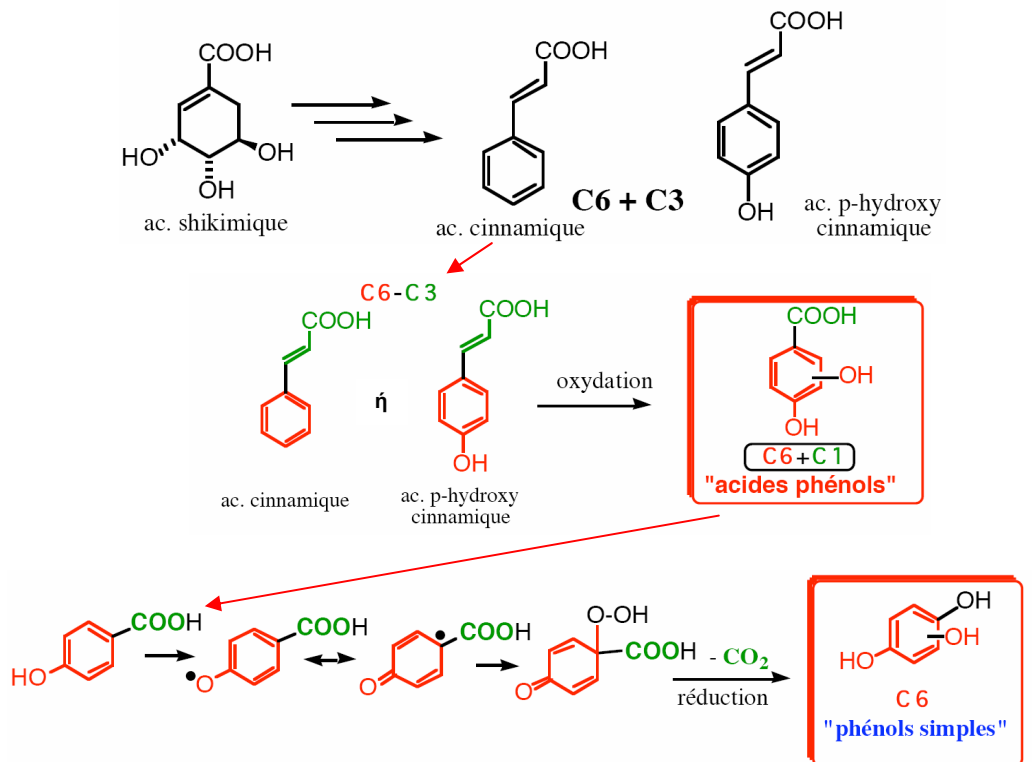
1.1. ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ

1.1.1. Βιοσύνθεση

Οι πολυφαινόλες συνιστούν μία ετερογενή ομάδα διατροφικών συστατικών φυτικής προελεύσεως (Paganga et al., 1999). Αποτελούν δευτερογενή προϊόντα του κυτταρικού μεταβολισμού και συντίθενται μετά από έκθεση των φυτών σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες (Liakourou et al., 2006; Schaefer and Rolshausen, 2006). Για τον λόγο αυτό, θα μπορούσαν να θεωρηθούν το ανάλογο του ζωϊκού ανοσοποιητικού συστήματος. Εμφανίζουν αντιμικροβιακές και αντιϊικές ιδιότητες, όπως επίσης απορροφούν μεγάλο μέρος της ορατής και υπεριώδους ακτινοβολίας. Η βιοσύνθεση των πολυφαινολικών ουσιών προκύπτει από δύο οδούς: (i) την οδό των shikimates και (ii) αυτή των polyacetates (Vercauteren, 2005).

1.1.1.1. Shikimates

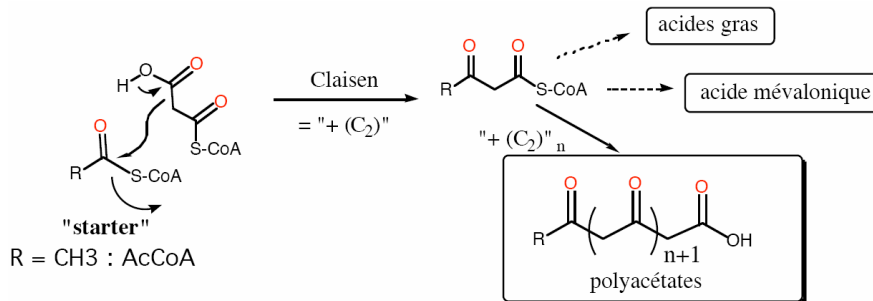
Η οδός των shikimates (Εικ. 1.1.) οδηγεί στην βιογένεση του shikimic acid και των κινναμικών οξέων C6-C3. Περαιτέρω υποκατάσταση των κινναμικών οξέων με λακτόζη οδηγεί στην σύνθεση των κουμαρινών. Η οξειδωση των κινναμικών οξέων οδηγεί στην δημιουργία των λιγνανών, ενώ η οξειδωτική τους αποικοδόμηση σε βενζοϊκά οξέα, τους προδρόμους των φαινολικών οξέων (C6-C1). Τέλος, η αποκαρβοξυλίωση των φαινολικών οξέων καταλήγει σε απλές φαινόλες.



Εικόνα 1.1. Σχηματισμός των φαινολικών οξέων και του σκελετού των πολυφαινολών από τα φυτά, μέσω της οδού των shikimates.

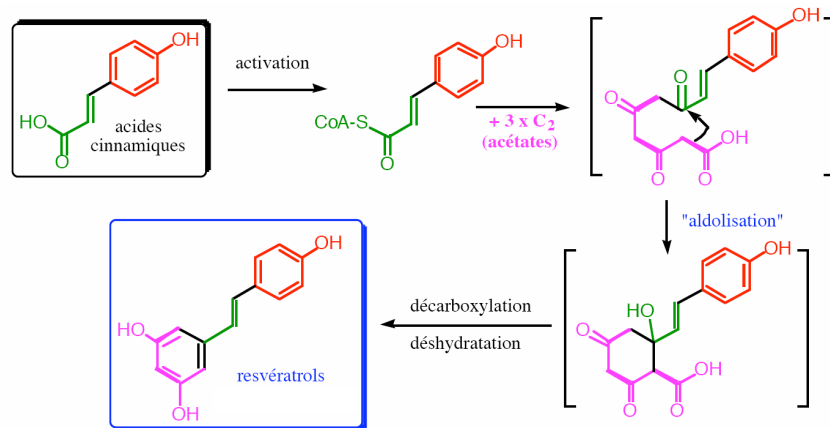
1.1.1.2. Polyacetates

Πολυφαινόλες συντίθενται επίσης και μέσω της μεικτής οδού των shikimic και οξεικού οξέος (Εικ. 1.2.). Η κυκλοποίηση του τριοξεικού οξέος (αντίδραση Claisen), οδηγεί στην σύνθεση των *sensu lato* φλαβονοειδών με δομή C6-C3-C6 και στην βιογένεση του πυρήνα των στυλβενίων (C6-C2-C6).



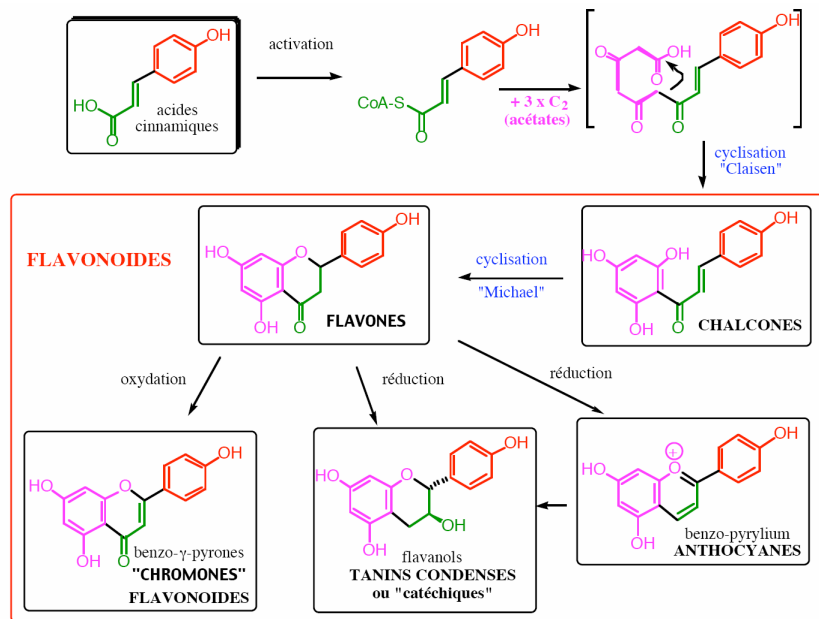
Εικόνα 1.2. Σχηματική αναπαράσταση της αντίδρασης Claisen.

Συνεχείς κυκλοποιήσεις οδηγούν στην δημιουργία στυλβενικού τύπου φαινολών, όπως η resveratrol (Εικ. 1.3.). Τα μόρια αυτά δεν απαντώνται σε μεγάλες ποσότητες στη φύση και κατ'έπекταση σε φυτικά εκχυλίσματα.



Εικόνα 1.3. Σχηματική αναπαράσταση της σύνθεσης της resveratrol.

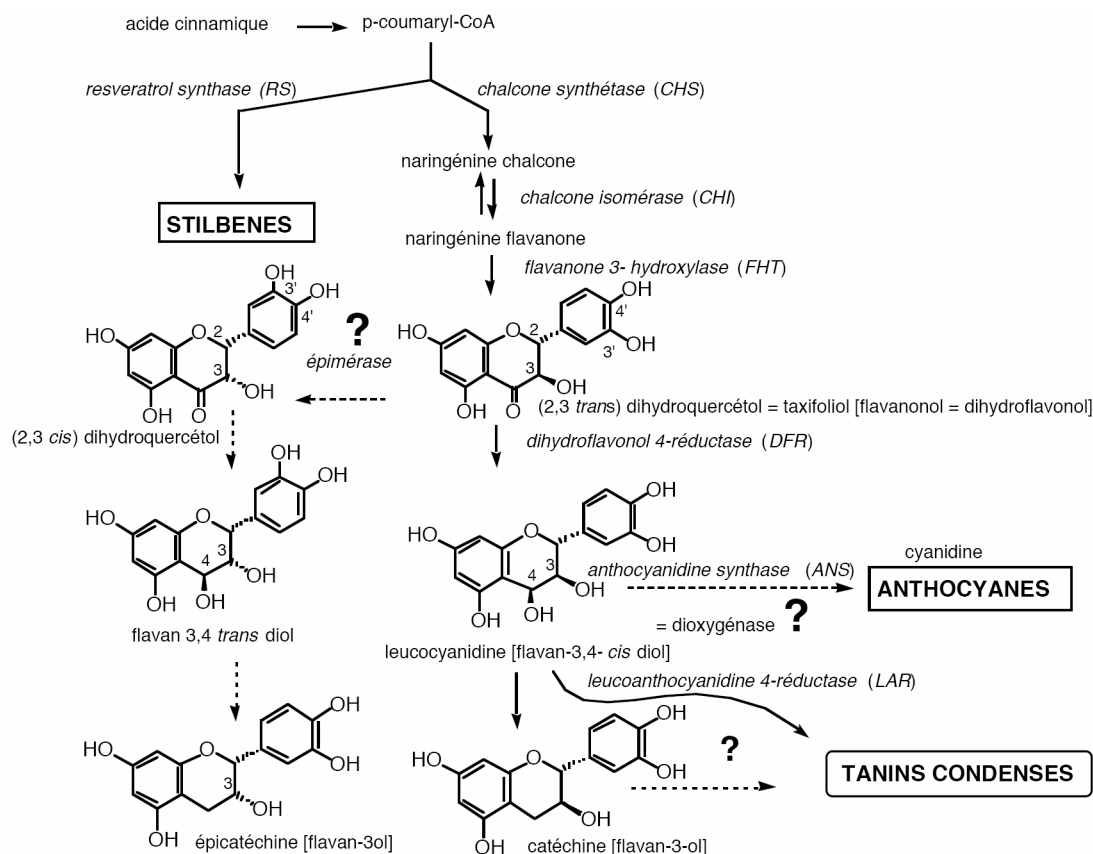
Με ανάλογες τροποποιήσεις προκύπτουν και τα μόρια των φλαβονοειδών (Εικ. 1.4.).



Εικόνα 1.4. Σχηματική αναπαράσταση της σύνθεσης των φλαβονοειδών.

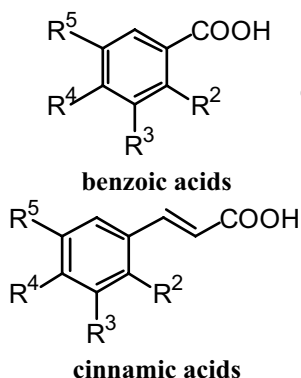
1.1.2. ΜΟΝΟΜΕΡΕΙΣ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ

Οι πολυφαινόλες αποτελούν μία ετερογενή ομάδα μορίων (Εικ. 1.5.). Για λόγους ευκολίας και με βάση την δομή τους ταξινομούνται σε μονομερείς και ολιγομερείς. Οι τελευταίες προκύπτουν από τον πολυμερισμό των μονομερών ενώσεων ή σε συνδυασμό με σάκχαρα.



Εικόνα 1.5. Κυριότερες ομάδες πολυφαινολών και ένζυμα που συμμετέχουν στην βιοσύνθεσή τους.

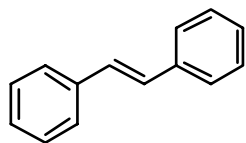
1.1.2.1. Φαινολικά οξέα



Τα φαινολικά οξέα αποτελούν παράγωγα του βενζοϊκού ή του κινναμικού οξέος. Τα πρώτα απαντώνται σχετικά σπάνια στα φυτά, κυρίως σε κόκκινα φρούτα, στο black radish και στο κρεμμύδι (>10mg/kg νωπού βάρους)· ιδιαίτερα το γαλλικό οξύ απαντάται στο τσάι (4,5 g/kg φύλλων φρέσκου τσαγιού) (Shahidi and Naczki, 2003). Υδροξυβενζοϊκά οξέα συμμετέχουν επίσης στον σχηματισμό πολυπλοκότερων μορίων όπως οι υδρολυτές ταννίνες (gallotannins στο μάνγκο) ή ellagitannins στα κόκκινα φρούτα (φράουλες, raspberries, blackberries) (Clifford et al., 2000; Gil et al., 2000). Αντιθέτως, τα παράγωγα του κινναμικού οξέος (πικουμαρικό, καφφεϊκό, φερουλικό και σιναπικό οξύ) βρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες στα blueberries, τα ακτινίδια, τα δαμάσκηνα, τα κεράσια και τα μήλα. Συνήθως απαντώνται υποκατεστημένα με σάκχαρα ή ως εστέρες του quinic, shikimic ή τρυγικού οξέος (Macheix,

1990). Αυτούσια, βρίσκονται στις προεπεξεργασμένες τροφές, μετά από κατάψυξη, αποστείρωση ή ζύμωση. Ειδικότερα, το καφεϊκό οξύ βρίσκεται ως χλωρογενικό οξύ και αποτελεί το πιο συχνά απαντώμενο φαινολικό οξύ στα φρούτα, ενώ η συγκέντρωσή του ποικίλλει ανάλογα με το στάδιο ωρίμανσης και το μέγεθος των καρπών. Το φερουλικό οξύ απαντάται κυρίως στα σιτηρά, εστεροποιημένο με συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος (αραβινοξυλάνες και ημικυτταρίνες).

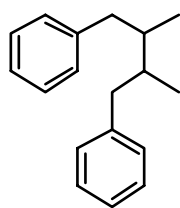
1.1.2.2. Στιλβένια



stilbenoids

Τα στιλβένια αποτελούν πολύ μικρό ποσοστό του πολυφαινολικού περιεχομένου της διατροφής μας. Το πιο διαδεμένο στιλβένιο είναι η (+)trans-resveratrol (αναφέρεται και ως polydatin) και ο μεταβολίτης της piceic οξύ. Σπανιότερα απαντώμενα στιλβένια είναι οι astringin, και vaticaffinol, καθώς και τα πολυμερή της resveratrol pallidol piceatannol, vaticanol και α-, σ- και ε-viniferin.

1.1.2.3. Λιγνάνες



lignans

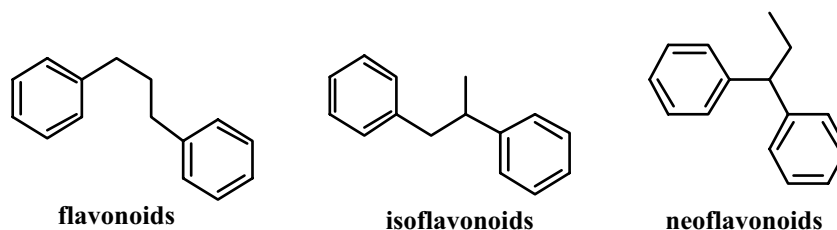
Οι λιγνάνες αποτελούνται από δύο μονάδες φαινυλοπροπανίου και συναντώνται σε περιορισμένο αριθμό φυτών, κυρίως στον λιναρόσπορο, ως secoisolariciresinol και metaresinol. Ο εκτεταμένος μεταβολισμός τους σε enterodiol και enterolactone (πιθανόν και equol*) από την εντερική χλωρίδα δεν διευκολύνει την ανίχνευση και ταυτοποίηση αναλόγων ουσιών σε αρκετά φρούτα και λαχανικά, καθώς άλλες ουσίες φυτικής προελεύσεως, όπως οι hydroxytyrosol και oleuropein, οδηγούν επίσης στον σχηματισμό αυτών των μεταβολιτών. Πρόσφατα, οι (+)-1-acetoxypinoresinol και (+)-pinoresinol χαρακτηρίστηκαν ως οι κύριες λιγνάνες του ελαιολάδου (Owen et al., 2000).

* Μόνο 30-40% του δυτικού κόσμου φαίνεται να μπορούν να μετασχηματίζουν την ισοφλαβόνη diadzein σε equol (equol producers) (Setchell et al., 2002), ενώ σε Ασιάτες άνδρες η ικανότητα κυμαίνεται στο 60% (Morton et al., 2002). Η ιδιότητα αυτή -ή η απουσία της- φαίνεται να διατηρείται για χρόνια και οφείλεται σε βακτήρια της εντερικής χλωρίδος (*Streptococcus intermedius* spp., *Ruminococcus productus* spp. και *Bacteroides ovatus* spp.) (Wu et al., 2006).

1.1.2.4. Φλαβονοειδή

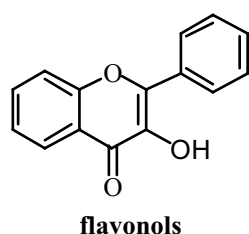
Τα φλαβονοειδή αποτελούνται από δύο βενζοϊκούς δακτυλίους (A και B), οι οποίοι διασυνδέονται με έναν πυρανικό δακτύλιο που περιέχει οξυγόνο (C). Τα φλαβονοειδή που περιέχουν μία υδροξυλομάδα στην θέση C-3 του δακτυλίου C χαρακτηρίζονται ως 3-υδροξυφλαβονοειδή (φλαβονόλες, ανθοκυανίνες, λευκοανθοκυανίνες και κατεχίνες), ενώ αυτά που δεν έχουν τέτοιους υποκαταστάτες ως 3-δεσοξυφλαβονοειδή (φλαβανόνες και

φλαβόνες). Τα ισοφλαβονοειδή διαφοροποιούνται, καθώς οι δακτύλιοι B και C διασυνδέονται μέσω της θέσεως C-2 του δακτυλίου C (Kuhnau, 1976).



Τα φλαβονοειδή απαντώνται στα φυτά κυρίως ως O-γλυκοζίτες, υποκατεστημένες με μονοσακχαρίτες ή συνδυασμούς τους (Williams et al., 1994), κυρίως D-γλυκόζη ή L-ραμνόζη (Harborne and Williams, 2001), καθώς και malonylglycosides και acetylglycosides.

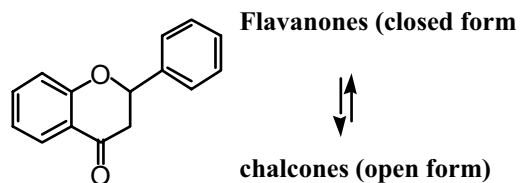
1.1.2.4.1. Φλαβονόλες



Η πλέον συνήθης φλαβονόλη είναι η quercetin, η οποία απαντάται σε αρκετά φρούτα και λαχανικά, βρίσκεται όμως σε εξαιρετικά υψηλές συγκεντρώσεις στο κρεμμύδι (Paganga et al., 1999). Η ημερήσια πρόσληψη quercetin υπολογίζεται σε 3-38 mg (Hertog et al., 1995). Η quercetin απαντάται συνήθως quercetin-3-rutinoside (ή quercetin-3-rhamnoglucoside ή rutin) και ως quercetin-4'-

glucoside και quercetin-3,4'-glucoside στο κρεμμύδι, quercetin galactosides στα μήλα και quercetin arabinosides στα μούρα. Άλλες γνωστές φλαβονόλες είναι η kaempferol (μπρόκολο), η myricetin (μούρα) και isorhamnetin (κρεμμύδι).

1.1.2.4.2. Φλαβανόνες



Οι φλαβανόνες απαντώνται αποκλειστικά στη σάρκα των εσπεριδοειδών και στον χυμό τους (500 mg/l) (Gil-Izquierdo et al., 2003), με κυριότερους εκπροσώπους την hesperidin (hesperetin-7-rutinoside) και την narirutin (naringenin-7-rutinoside) στα πορτοκάλια και τα μανταρίνια και τις naringenin-7-

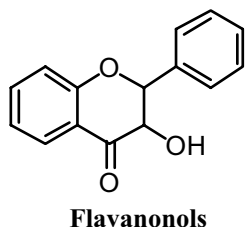
neohesperoside (70%) και narirutin (20%) στο γκρέιπφρουτ (Kawaii et al., 1999). Ωστόσο, η naringenin chalcone ανιχνεύεται και στον φλοιό της τομάτας, ενώ μετατρέπεται σε naringenin κατά την διάρκεια παραγωγής ketchup (Krause and Galensa, 1991). Η ημερήσια κατανάλωση των πιο χαρακτηριστικών φλαβανονών υπολογίζεται σε 8,3 mg (naringenin) και 28,3 mg (hesperetin) (Knekt et al., 2002).

1.1.2.4.3. Χαλκόνες

Οι χαλκόνες είναι ισομερή των φλαβονονών. Διϋδροχαλκόνες (phloretin-αγλυκόνη- και phloridzin- (phloretin-2'-O-β-D-glucoside) απαντώνται κυρίως στα μήλα. Η naringenin

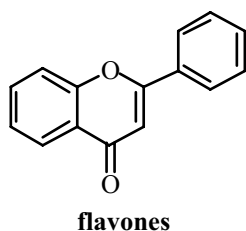
chalcone απαντάται στις ντομάτες και η arbutin στα αχλάδια, και σε μικρότερο βαθμό στις φράουλες, τα δημητριακά, το κρασί, το τσάι και τα μπρόκκολα (Hijona, 2006). Αξίζει να σημειωθεί, ότι η phloridzin χρησιμοποιείται πειραματικά, προκειμένου να επάγει γλυκοζουρία, καθώς καταστέλλει την επαναπρόσληψη της γλυκόζης.

1.1.2.4.4. Φλαβανονόλες/Κατεχίνες



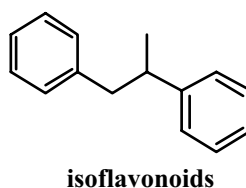
Οι κατεχίνες απαντώνται αυτούσιες ή εστεροποιημένες με γαλλικό οξύ. Οι (+)-catechin και (-)-epicatechin βρίσκονται κυρίως στο τσάι, το κακάο και το κόκκινο κρασί, αλλά και στα μήλα, τα αχλάδια, τα σταφύλια και τα ροδάκινα (Arts et al., 2000a; Arts et al., 2000b). Οι φλαβανονόλες του τσαγιού μελετώνται αρκετά συχνά στο σύνολό τους και περιλαμβάνουν τις catechin, epicatechin, epicatechin gallate (EG), epigallocatechin (EGC) και epigallocatechin gallate (EGCG), όπως και τα παράγωγα τους κατά την παρασκευή του τσαγιού theaflavins και thearubigins.

1.1.2.4.5. Φλαβόνες



Οι κυριότερες φλαβόνες είναι οι apigenin και luteolin, οι οποίες όμως δεν καταναλώνονται σε μεγάλες ποσότητες, καθώς ανιχνεύονται στο κόκκινο πιπέρι, τον μαϊδανό, το σέλερυ και το χαμομήλι (Hertog et al., 1993a; Hertog et al., 1993b). Ακόμη, στην φλούδα των εσπεριδοειδών απαντώνται πολυμεθοξυλιωμένες φλαβόνες (τα πλέον υδρόφοβα φλαβονοειδή), μεταξύ των οποίων οι tangeretin, nobiletin και sinensetin (6,5 g/l στο αιθέριο έλαιο του μανταρινιού) (Shahidi and Naczki, 2003).

1.1.2.4.6. Ισοφλαβονοειδή

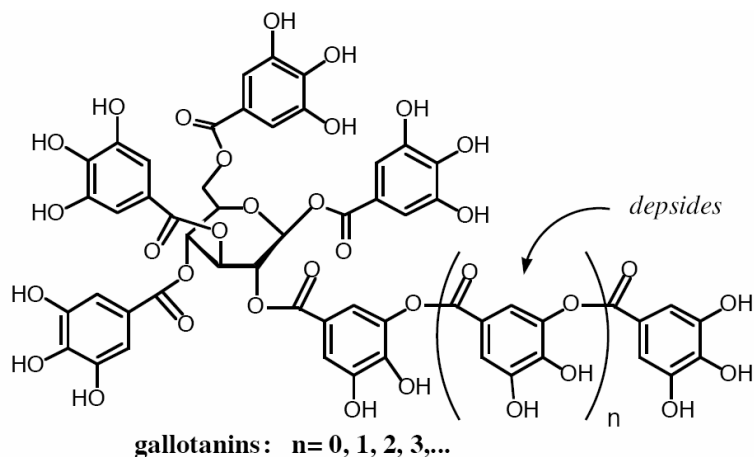


Ως ισοφλαβόνες χαρακτηρίζονται τα φλαβονοειδή που διαθέτουν υδροξυλομάδες στις θέσεις 7' και 4', κατ'αναλογία με την οιστραδιόλη, γ'αυτό και καλούνται φυτοοιστρογόνα. Τα κυριότερα ισοφλαβονοειδή είναι οι genistein, daidzein και glycitein και απαντώνται στα δημητριακά και όσπρια, προπάντων στη σόγια (Liggins et al., 2002; Mazur, 1998). Η μεγαλύτερη συγκέντρωση ισοφλαβόνης (puerarin - daidzein 8-C-glucoside) έχει βρεθεί στην ρίζα του φυτού kudzu (*Pueraria lobata*) (>2 mg/g ξηρού βάρους) (Prasain et al., 2003). Η ζύμωση της σόγιας (στο miso ή το tempeh) οδηγεί στην υδρόλυση των γλυκοζιτών σε αγλυκόνες, οι οποίες είναι πιο σταθερές σε υψηλές θερμοκρασίες. Οι ισοφλαβόνες έχουν ικανότητα πρόσδεσης στους υποδοχείς οιστρογόνων ERα και ERβ, παρόλα ταύτα εμφανίζουν μεγαλύτερη επιλεκτικότητα για τον ERβ (reviewed in Messina et al., 2006).

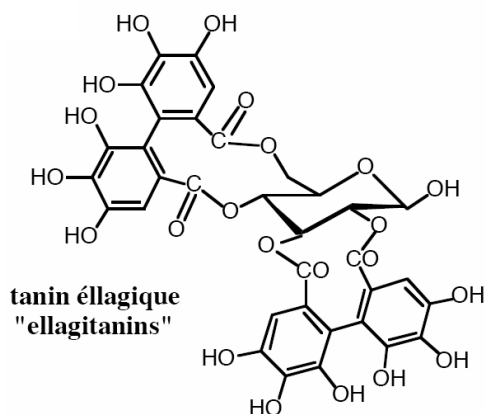
1.1.3. ΣΥΜΠΛΟΚΕΣ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ

Οι σύμπλοκες πολυφαινολικές ενώσεις διακρίνονται στις εξής κατηγορίες:

- τις υδρολυτές ταννίνες· πρόκειται για εστέρες του gallic και ellagic οξέος (Εικ. 1.6.).



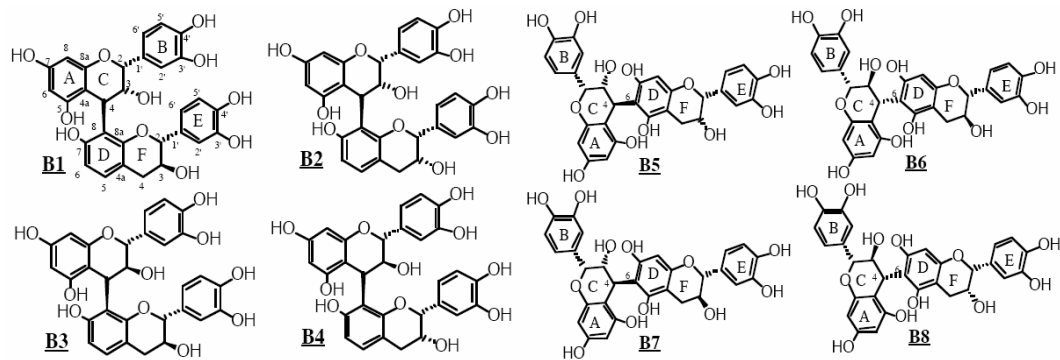
Εικόνα 1.6.
Τυπική δομή
των
υδρολυτών
ταννινών.



- τις "συμπυκνωμένες" ταννίνες ή προκυανιδόλες (ή προκυανίνες ή προανθοκυανίνες), οι οποίες αποτελούν ομο- ή ετεροπολυμερή των (+)-catechin και (-)-epicatechin (Εικ. 1.7.) και

- ανθοκυάνες (O-υποκατεστημένα ιόντα flavylium ή 2-phenylbenzopyrylium). Αν και δεν πρόκειται ουσιαστικά για πολυμερή μονάδων flavylium, συνήθως κατατάσσονται στις σύμπλοκες πολυφαινόλες, επειδή διαθέτουν τουλάχιστον ένα σάκχαρο-υποκαταστάτη (γλυκόζη, ξυλόζη, ραμνόζη, γαλακτόζη, διόζη ή τριόζη) σε αντίθεση με τις ταννίνες.

Οι υδρολυτές ταννίνες απαντώνται στην πλειοψηφία των φυτών και εκχυλισμάτων τους και συμβάλλουν σημαντικά στις οργανοληπτικές τους ιδιότητες (στυφή ή πικρή γεύση).



Εικόνα 1.7. Χαρακτηριστική δομή των προανθοκυανινών.

Οι ανθοκυανίνες αποτελούν την μεγαλύτερη οικογένεια υδροδιαλυτών φυσικών χρωστικών, οι οποίες ευθύνονται για το έντονο κόκκινο, μωβ και μπλε χρώμα των καρπών και των ανθών (Brouillard and Cheminat, 1988; Grotewold, 2006; Harborne and Williams, 2001; Moyer et al., 2002; Schaefer and Rolshausen, 2006). Μέχρι το 2003, είχαν απομονωθεί από φυτικά εκχυλίσματα και χαρακτηριστεί 17 ανθοκυανίνες, εκ των οποίων μόνο οι έξι προέρχονται από ανώτερα φυτά - cyanidin, peonidin, pelargonidin, malvidin, delphinidin και petunidin (Kong et al., 2003), με πρωτεύουσα την cyanidin (Harborne and Williams, 2001; Parry et al., 2006). Έντεκα επιπλέον ανθοκυανίνες (apigeninidin, aurantinidin, capensinidin, europinidin, hirsutidin, 6-hydroxycyanidin, luteolinidin, 5-methylcyanidin, pulchellidin, rosinidin και tricetinidin) ανιχνεύθηκαν εκ των υστέρων (Hou, 2003). Η σύσταση κάθε φυτού σε ανθοκυανίνες επιτρέπει πολλές φορές την ταυτοποίησή του, αν και κάποιες από αυτές είναι ευρέως διαδεδομένες στο φυτικό βασίλειο - cyanidin (50%), pelargonidin (12%), peonidin (12%), delphinidin (12%), petunidin (7%) και malvidin (7%) (Kong et al., 2003). Σε ποικιλίες κόκκινου σταφυλιού έχουν ανιχνευθεί πάνω από 20 τέτοια μόρια (Boido et al., 2006; Castellarin et al., 2006; Kammerer et al., 2004; Mattivi et al., 2006; Mazzuca et al., 2005; Vian et al., 2006).

Οι διαφορές μεταξύ των συνηθέστερα απαντώμενα μορίων αφορούν την υποκατάστασή τους στις θέσεις 3' και 5'. Οι ανθοκυανίνες, χάρη στην ύπαρξη θετικά φορτισμένου συζυγιακού συστήματος χρωματίζονται έντονα υπό όξινες συνθήκες και εκπέμπουν στο ορατό (465-550 nm), ενώ απορροφούν στο υπεριώδες (270-280 nm) (Εικ. 1.8).

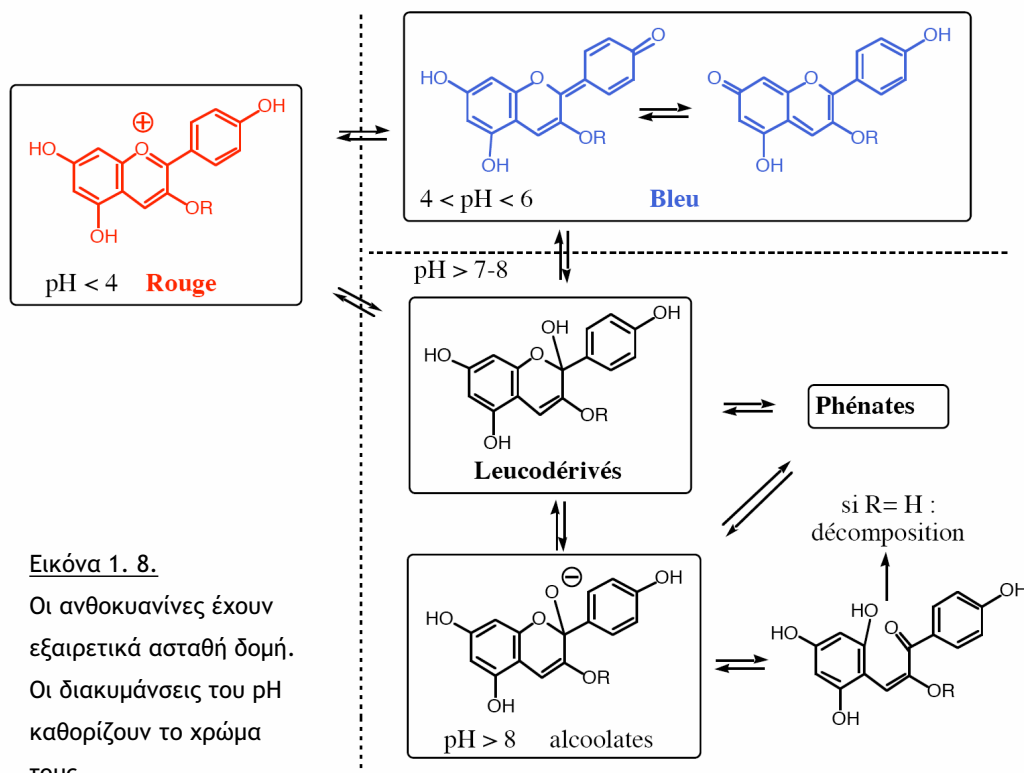
Αξίζει να σημειωθεί, ότι οι ανθοκυανίνες χρησιμοποιούνται ευρέως στην χημεία τροφίμων ως χρωστικές -είναι γνωστές ως E163 (Πίν.1.1.)- και εμφανίζουν ιδιαίτερα πλεονεκτήματα στην εφαρμογή τους (Parkinson and Brown, 1981; Yamakoshi et al., 2002). Με εξαίρεση το E163 (ii) (μέχρι 2,5 mg/kg σωματικού βάρους), δεν έχει καθοριστεί ανώτατο όριο λήψης. Μάλιστα, στην Φινλανδία φαίνεται ότι αποτελούν -ως χρωστικές- μία από τις κυριότερες πηγές πολυμερών πολυφαινολών (Heinonen, 1991).

Εν γένει θεωρούνται ασφαλή μόρια, καθώς καταναλώνονται από ζώα και ανθρώπους, χωρίς προφανείς επιπτώσεις στην υγεία τους (Timberlake and Henry, 1988). Το 1996, εκχύλισμα από το φυτό *V. myrtillus* με περιεκτικότητα 36% σε ανθοκυανίνες, ελέγχθηκε, όσον αφορά

στην ανεκτικότητα και ασφάλειά του σε ζώα (Hou, 2003; Maffei Facino et al., 1996; Morazzoni et al., 1991). Στους επίμυς και τους αρουραίους η LD₅₀ κυμαινόταν στα 2000 mg/kg σωματικού βάρους., ενώ στους σκύλους άπαξ χορήγηση 3000 mg/kg δεν είχε συνέπειες. Χρόνια *p.o.* χορήγηση (για 6 μήνες) του εκχυλίσματος σε αρουραίους και σκύλους (125-150 ή 80-320 mg/kg σωματικού βάρους ημερησίως αντίστοιχα) δεν εμφάνισε τοξικότητα ή θνησιμότητα. Περαιτέρω έλεγχος του προϊόντος επιβεβαίωσε την κλινική ασφάλειά του (Morazzoni and Bombardelli, 1996), καθώς μόνο 4% των καταναλωτών ανέφερε διαταραχές του γαστρεντερικού ή δερματίτιδες.

Πίνακας 1.1. Ανθοκυανίνες που απαρτίζουν την οικογένεια E163 και χρησιμοποιούνται ως χρωστικές στην βιομηχανία τροφίμων.

Κωδικός	Ουσία	Χρώμα
E163a	κυανιδίνη	κόκκινη
E163b	δελφινιδίνη	μπλε
E163c	μαλβιδίνη	μωβ
E163d	πελαργονιδίνη	πορτοκαλί
E163e	πεονιδίνη	καφέ
E163f	πετουνιδίνη	μπορντώ
E163 (i)	εκχύλισμα του φλοιού του κίτρου	
E163 (ii)	μείγμα ανθοκυανινών	
E163 (iii)	μαύρο εκχύλισμα	



Εικόνα 1. 8.

Οι ανθοκυανίνες έχουν εξαιρετικά ασταθή δομή. Οι διακυμάνσεις του pH καθορίζουν το χρώμα τους.

Μη υποκατεστημένες ανθοκυανίνες (ανθοκυάνες) απαντώνται σπάνια σε νωπό φυτικό υλικό (Gu et al., 2004; Sprygin and Kushnerova, 2002) ή παράγωγά του, όπως το κρασί (Waterhouse, 2002), καθώς δεν είναι σταθερά μόρια. Η αποικοδόμησή τους σε ουδέτερο pH είναι συνήθης, γεγονός που καθιστά δύσκολο τον χειρισμό τους σε κυτταρικά συστήματα (Prior and Wu, 2006). Η υποκατάσταση με σάκχαρα, συνήθως γλυκόζη, ραμνόζη, ξυλόζη, γαλακτόζη, αραβινόζη, φρουκτόζη και σπανιότερα ρουτινόζη, σοφορόζη, γκεντοβιόζη, σαμπουμπιόζη, ξυλοσυλρουτινόζη και γλυκοσυλρουτινόζη (Delgado-Vargas et al., 2000; Naczki and Shahidi, 2004), οδηγεί σε πιο σταθερές ενώσεις που ονομάζονται ανθοκυανίνες (Willstätter PM, Nobel laureate, Chemistry, 1915). Επιπλέον υποκατάσταση περιλαμβάνει ακυλιώσεις με οργανικά οξέα, όπως cinnamic acid, caffeic acid, p-coumaric acid, ferulic acid, sinaric acid ή αλιφατικά οξέα όπως οξικό, μαλικό, μαλονικό, οξαλικό και σουκκινικό (Giusti et al., 1999; Mazza, 1995). Χάριν στους πιθανούς συνδυασμούς υποκαταστάσεων, ο αριθμός των ανθοκυανινών υπολογίζεται περί τις 600 (Andersen, 2002). Ακόμη, η επεξεργασία των φυτικών εκχυλισμάτων (μαύρου και oolong τσάι) καθώς και της τροφής κατά το μαγείρεμα ευνοεί την δημιουργία theaflavins και thearubigins - μία ετερογενής ομάδα πολυμερών φλαβονολών με μοριακό βάρος 1-10 kDa. Η πολυπλοκότητα και το μεγάλο μοριακό τους βάρος καθιστά δύσκολο τον προσδιορισμό της χημικής τους δομής (Bailey et al., 1992).

Οι ανθοκυανίν(ι)νες προσλαμβάνονται από τον ανθρώπινο οργανισμό, κυρίως από τα φρούτα και το κόκκινο κρασί (Galvano et al., 2004). Η ετήσια παγκόσμια κατανάλωσή τους ανέρχεται σε 10000 τόνους, όσον αφορά μόνο στα κόκκινα σταφύλια. Η ελάχιστη κατ'άτομο ημερήσια κατανάλωση υπολογίζεται σε 100 mg/ημέρα (Prior and Wu, 2006), κατά πολύ μεγαλύτερη από αυτή των μονομερών φλαβονοειδών (23 mg/ημέρα) (Cao and Prior, 1999; Hertog et al., 1993b; Prior and Cao, 1999). Οι διατροφικές συνήθειες, όπως η τακτική κατανάλωση κόκκινου κρασιού (Timberlake and Henry, 1988) μπορεί να αυξήσουν έως μία τάξη μεγέθους την πρόσληψη ανθοκυανινών, ενώ πρόσφατα κυκλοφόρησαν στο εμπόριο συμπληρώματα διατροφής από εκχυλίσματα bilberry ή elderberry, πλούσια σε ανθοκυανίνες.

Οι ανθοκυανίνες υπόκεινται σε μία σειρά αλληλεπιδράσεων με άλλα μόρια πολυφαινολών σε φυτικά εκχυλίσματα: η παρουσία συγχρωστικών - φλαβονόλες, φαινολικά οξέα και ταννίνες - προωθεί την δημιουργία πολυπλοκότερων μορίων (Madhavi et al. 1996). Αν και η ζωή αυτών των συμπλόκων είναι εξαιρετικά σύντομη (μsec), αρκετά από αυτά καταλήγουν σε «νέες» σταθερές χρωστικές (Boido et al., 2006; Brouillard et al., 1997; Eiro and Heinonen, 2002; Perez-Magarino and Gonzalez-San Jose, 2004; Wang et al., 2003). Μεταξύ αυτών και τα σύμπλοκα ανθοκυανινών-ταννινών, γνωστά και ως έγχρωμες ταννίνες, τα οποία εμφανίζονται συν τω χρόνω στο παλαιωμένο κρασί (Waterhouse, 2002).

1.2. ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑ-ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ

1.2.1. Ορισμοί-Προβλήματα στην μελέτη των πολυφαινολικών ουσιών

Την τελευταία εικοσαετία, οι πολυφαινόλες έχουν συγκεντρώσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, λόγω της ωφέλιμης βιολογικής τους δράσεως, όπως φαίνεται από επιδημιολογικές, αλλά και *in vitro* μελέτες. Εντούτοις, τα δεδομένα που υπάρχουν σχετικά με την βιοδιαθεσιμότητά τους είναι αντικρουόμενα, ενώ οι διαθέσιμες τεχνικές δεν επιτρέπουν διεξοδική ανάλυση.

1.2.1.1. Βιοδιαθεσιμότητα

Σύμφωνα με τον Αμερικανικό Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA), ως βιοδιαθεσιμότητα ορίζεται «ο ρυθμός και ο βαθμός στον οποίο μία θεραπευτική ουσία απορροφάται και καθίσταται διαθέσιμη στο σημείο δράσης της». Στην περίπτωση των πολυφαινολών, η έννοια βιοδιαθεσιμότητα μπορεί να παρερμηνευθεί, καθώς στην πλειοψηφία των πειραμάτων υπολογίζεται το ποσοστό της χορηγούμενης ουσίας, το οποίο εισέρχεται στην κυκλοφορία. Επιπλέον, πληθώρα παραγόντων, όπως η δίαιτα, η διαδικασία παραγωγής των πολυφαινολών, η χημική τους σύσταση και η πιθανή ταυτόχρονη λήψη παρεμφερών ουσιών επηρεάζουν την βιοδιαθεσιμότητά τους.

Η βιοδιαθεσιμότητα επίσης επηρεάζεται από το σύστημα/υποκείμενο στο οποίο χορηγείται. Λόγου χάριν, η επιφάνεια απορρόφησης (mucosal mass), η διάρκεια παραμονής στο έντερο, η σύνθεση της εντερικής χλωρίδας και η ταχύτητα της πέψης μπορούν να την επιβραδύνουν ή να την επιταχύνουν. Τέλος, περαιτέρω μεταβολισμός μιας ουσίας από τα κύτταρα του εντερικού τοιχώματος ή το ήπαρ, κατά την διάρκεια της απορρόφησης της, μπορεί να επηρεάσει επίσης την συγκέντρωσή της στο αίμα· το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό ως *μεταβολισμός πρώτης διόδου (first-pass effect)*.

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την μελέτη της βιοδιαθεσιμότητας εμφανίζουν μειονεκτήματα (Heaney, 2001): η μέθοδος ισορροπίας, η οποία υπολογίζει την διαφορά μεταξύ της ποσότητας που χορηγείται και αυτής που καταναλώνεται δεν λαμβάνει υπόψιν τον μετασχηματισμό ή την αποικοδόμηση από την βακτηριακή χλωρίδα· ομοίως, η χρήση μη βιοδιασπώμενων ή ραδιενεργών ισοτόπων, αν και αρκετά ευαίσθητη ως μέθοδος, δεν δίνει πληροφορίες για τον πιθανό μεταβολισμό μιας ουσίας· εναλλακτικά, θα μπορούσε να υπολογισθεί η *in vivo* δράση της ουσίας και να αναχθεί κατόπιν στην αντίστοιχη συγκέντρωση βάσει των *in vitro* δεδομένων. Όσον αφορά στις πολυφαινόλες, ο υπολογισμός της βιολογικής/φυσιολογικής δραστηριότητάς τους εξαρτάται επιπλέον από την δίαιτα του υποκειμένου, ενώ αρκετά συχνά παραβλέπεται η πιθανότητα απέκκρισης μέσω της χολής.

Αμέσως μετά από εφάπαξ χορήγηση μιας ουσίας, παρατηρείται αύξηση της συγκεντρώσεώς του στο πλάσμα, ενώ κατόπιν, καθώς ο ρυθμός απεκκρίσεώς του αυξάνει, η συγκέντρωσή του μειώνεται εκθετικά με τον χρόνο. Σύμφωνα όμως με το μοντέλο των δύο διαμερισμάτων (πλάσμα και ιστοί-στόχοι), η συγκέντρωση μιας ουσίας στους ιστούς-στόχους αυξάνει απότομα, ενώ ο μεταβολισμός και η απελευθέρωσή της γίνονται με αργούς ρυθμούς. Επιπλέον, αν και το πρότυπο βιοδιαθεσιμότητας μιας ένωσης δεν διαφέρει συνήθως σε άπαξ ή πολλαπλή χορήγησή της, σε κάποιες περιπτώσεις, λόγω κορεσμού ή επαγωγής των μεταβολικών διαδικασιών η κινητική συμπεριφορά μιας ουσίας μπορεί να διαφοροποιείται μετά από μακροχρόνια χορήγηση (Ludden, 1991).

Αν λάβουμε υπόψιν τα περιγεγραμμένα «σημεία δράσεως» των πολυφαινολών, η παρουσία τους σε αυτά έχει δειχθεί μόνο έμμεσες τεχνικές.

1.2.1.2. Απορρόφηση

Η απορρόφηση αντιστοιχεί στην μετάβαση μιας ουσίας από το σημείο χορηγήσεώς της στην κυκλοφορία και επηρεάζεται από παράγοντες όπως η χαμηλή σπλαχνική κινητικότητα, οι χημικοί παράγοντες (παρουσία ιόντων, διαλυτότητα σε λιπίδια, αλληλεπίδραση με το περιεχόμενο της γαστρεντερικής κοιλότητας), η αιμάτωση των σπλάχνων, το μέγεθος των προς απορρόφηση σωματιδίων και ο πιθανός μικροεγκλεισμός τους σε προστατευτικό κέλυφος, καθώς και η παρουσία ανταγωνιστών της υποβοηθούμενης μεταφοράς τους. Η ενεργότητα και ο αριθμός μεταφορέων ή εκκριτικών πρωτεϊνών, όπως η γλυκοπρωτεΐνη Ρ ή η MRP2 (multidrug resistance associated protein 2), επηρεάζουν επίσης το επίπεδο απόλυτης απορροφήσεως μιας ένωσης (Wagner et al., 2001). Η γλυκοζυλίωση επηρεάζει σημαντικά την απορρόφηση των φλαβονοειδών, καθώς δεν επιτρέπει καταρχήν την πρόσληψή τους από το επιθήλιο του στομάχου, με εξαίρεση τις μη γλυκοζυλιωμένες quercetin και diadzein (Piskula et al., 1999). Η θέση επίσης, ο αριθμός και το είδος των υποκαταστατών καθορίζει περαιτέρω την πρόσληψή τους από το λεπτό ή το παχύ έντερο. Παραδείγματος χάριν, η μέγιστη πρόσληψη της quercetin 4'-glucoside συμβαίνει 0,5-0,7h μετά την πρόσληψή της, της rutin (quercetin-3-β-rutinoside) 6-9h αργότερα (Graefe et al., 2001), ενώ η πρόσληψη αναλόγων της quercetin από το κρεμμύδι (γλυκοζίτες) είναι γρηγορότερη από αυτή των μήλων (glucosides και glycosides) (Hollman and Katan, 1997).

1.2.1.3. Απέκκριση

Η απέκκριση ενός φαρμακολογικού παράγοντα μπορεί να γίνει από τους νεφρούς, την επιδερμίδα, τους πνεύμονες ή την χολή και μέσω μεταβολισμού ή αποικοδομήσεώς του. Η αποβολή από τους νεφρούς διαμεσολαβείται από την σπειραματική διήθηση και την ενεργή ή παθητική μεταφορά τους από το επιθήλιο των σωληναρίων. Σχεδόν όλα τα μόρια με MW<20 kD μπορούν να διαπεράσουν τα σπειραματικά (glomerular) τριχοειδή, σε αντίθεση με τα μακρομόρια, όπως η αλβουμίνη (69 kD) και προφανώς και οι ουσίες που προσδένονται σε αυτή. Καθώς η σωληναριακή απέκκριση αποτελεί έναν από τους κυριότερους μηχανισμούς αποβολής ουσιών, εξειδικευμένες πρωτεΐνες αναλαμβάνουν την μεταφορά των οξέων και

των βάσεων που προσδένονται σε πρωτεΐνες του ορού. Οι πολυφαινόλες έχει αναφερθεί ότι αποβάλλονται ως έχουν. Εντούτοις, εμφανίζουν εξαιρετικά μεγάλη συγγένεια με πρωτεΐνες και ιδίως την αλβουμίνη (Dufour and Dangles, 2005).

1.2.1.4. Βιοαποικοδόμηση

Η βιοαποικοδόμηση αποτελεί ένα από τα κυριότερα βήματα στην αποβολή ουσιών. Βιοχημικές αντιδράσεις Φάσεως I (οξειδωση, αναγωγή και υδρόλυση), μπορεί να οδηγήσουν στον σχηματισμό πιο δραστικών μορίων σε σχέση με την πρωτογενή χορηγούμενη ουσία. Οι υποκαταστάσεις της Φάσεως II οδηγούν συνήθως στον σχηματισμό λιγότερο τοξικών ή δραστικών μεταβολιτών, διευκολύνοντας παράλληλα την έκκρισή τους. Το ήπαρ, θεωρείται το κατεξοχήν σημείο μετασχηματισμού, παρόλα ταύτα, τα τελευταία χρόνια βρέθηκε ότι και το γαστρεντερικό σύστημα συμβάλλει στην βιοαποικοδόμηση. Μεταξύ των ενζύμων που συμμετέχουν, τον πλέον σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν τα κυττοχρώματα (υπεροικογένεια των κυττοχρωμάτων P450). Για αρκετές ξеноβιοτικές ουσίες έχει σημειωθεί επίσης η προσθήκη μορίων γλουκουρονικού οξέος και σουλφομάδων. Στους ανθρώπους, έχουν χαρακτηριστεί 17 UGTs (UDPglucuronosyltransferases) (Meech and Mackenzie, 1997) και 11 SULTs (κυτταροπλασματικές sulfotransferases) (Glatt, 2000; Glatt et al., 2000). Αξίζει να σημειωθεί, ότι τα ισόένζυμα διαφέρουν ως προς την ειδικότητά τους για διάφορα υποστρώματα και ως προς τα επίπεδα έκφρασής τους ανάλογα με τον ιστό, ενώ διαφοροποιήσεις παρατηρούνται ακόμη στην ενεργότητα και σύνθεσή τους στον πληθυσμό (Bachmann, 2002; Fisher et al., 2000; Glatt, 2000; Her et al., 1996; Lin and Lu, 2001; Ma et al., 2002; Xie et al., 2001).

1.2.1.1. Βιολογικοί δείκτες (Biomarkers)

Όσον αφορά σε φαρμακολογικούς και διαιτολογικούς παράγοντες, οι βιολογικοί δείκτες αντανακλούν την έκθεση σε αυτούς, την ευαισθησία σε μία ασθένεια και την κατάσταση/βαρύτητά της, καθώς και την πιθανή δράση/συνέργεια της ουσίας (Kohlmeier, 1991). Οι επιδημιολόγοι, προσπαθώντας να προσεγγίσουν την ευεργετική ή επιβλαβή δράση διατροφικών παραγόντων χρησιμοποιούν διάφορες παραμέτρους της κυτταρικής φυσιολογίας (Bates et al., 1997; Hunter, 1998). Η χρήση δεικτών στην μελέτη βιοδιαθεσιμότητας των πολυφαινολών είναι επιβεβλημένη. Εντούτοις, υπόκειται σε περιορισμούς, καθώς απαιτείται σαφής και λεπτομερής καταγραφή της πλήρους δίαιτας των υποκειμένων. Μέχρις ένα βαθμό, η συγκέντρωση κάποιων δεικτών στο αίμα είναι αρκετή για την γενικότερη αξιολόγηση των παρατηρήσεων, αν και ο μεταβολισμός και η «φαρμακοκινητική» των διατροφικών συστατικών επηρεάζουν παροδικά τις συγκεντρώσεις τους στο πλάσμα. Ένας ιδανικός βιοδείκτης, όπως ο λιπώδης ιστός και τα νύχια των ποδιών για το Se, θα πρέπει να αντανακλά μακροπρόθεσμα την κατανάλωση μιας ουσίας. Στη περίπτωση της Βιταμίνης A και του ασβεστίου, οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις στο πλάσμα δεν είναι ενδεικτικές της κατανάλωσής τους. Για τον λόγο αυτό, επιβάλλεται η υπό συνθήκη συλλογή στοιχείων (υπολογισμός ημίσειας ζωής, δοσοεξαρτώμενα πειράματα και έλεγχος

της βιοδιαθεσιμότητός τους. Χρήσιμο στοιχείο αποτελεί επίσης η άμεση σύγκριση των βιοδεικτών και των αντιστοίχων παραμέτρων της χορηγούμενης ουσίας.

1.2.2. Βιβλιογραφικά δεδομένα

1.2.2.1. Απομόνωση και ανάλυση των πολυφαινολών από το πλάσμα και τα ούρα

Με την εφεύρεση της χρωματογραφίας έγινε εφικτός ο χαρακτηρισμός αρκετών φυσικών ουσιών, μεταξύ των οποίων και τα φλαβονοειδή φυτικής προελεύσεως (Robards and Antolovich, 1997). Η ανάλυσή τους γίνεται σήμερα μετά από όξινη υδρόλυση του φυτικού υλικού και υψηλής πίεσης υγρή χρωματογραφία (HPLC) (Hakkinen and Auriola, 1998; Mattila et al., 2000). Η ανάλυση των φλαβονοειδών σε ανθρώπινο πλάσμα και ιστούς είναι αρκετά δύσκολη, καθώς είναι σε μεγάλο βαθμό προσδεδεμένα σε πρωτεΐνες και τα λίγα ελεύθερα μόρια έχουν υψηλή συγγένεια για τα μέταλλα και τις επιφάνειες silica που χρησιμοποιούνται στην χρωματογραφία. Οι κοινές φασματοσκοπικές μέθοδοι δεν επιτρέπουν επίσης την ανίχνευση των πολυφαινολών στο πλάσμα ή τα ούρα, όταν βρίσκονται σε συγκεντρώσεις ανάλογες με αυτές μετά από συνήθη δίαιτα· οι Liu et al. (Liu et al., 1995) ανέπτυξαν μία μέθοδο με ελάχιστη ευαισθησία 100 μg/l. Η εφαρμογή επίσης πρωτοκόλλου εκκύλισης μεταξύ υγρών φάσεων δυσχεραίνει τον καθαρισμό μορίων που είναι προσδεδεμένα σε πρωτεΐνες. Οι Hollman et al. (Hollman et al., 1996) πρότειναν μία μέθοδο απομονώσεως της quercetin με υποχλωρικό οξύ και μεθανόλη από το πλάσμα και την συλλογή της με τη βοήθεια ιόντων αλουμινίου, με ελάχιστη ευαισθησία 2 μg/l. Αντίστοιχες μέθοδοι που περιλαμβάνουν εκκύλιση στερεής φάσης ή με acetonitrile, σε συνδυασμό με φασματοσκοπία (υπεριώδους ή μάζας) επιτρέπουν με περιορισμούς την ανίχνευση μορίων πολυφαινολών (Ameer et al., 1996; Ishii et al., 1997; Lee and Reidenberg, 1998).

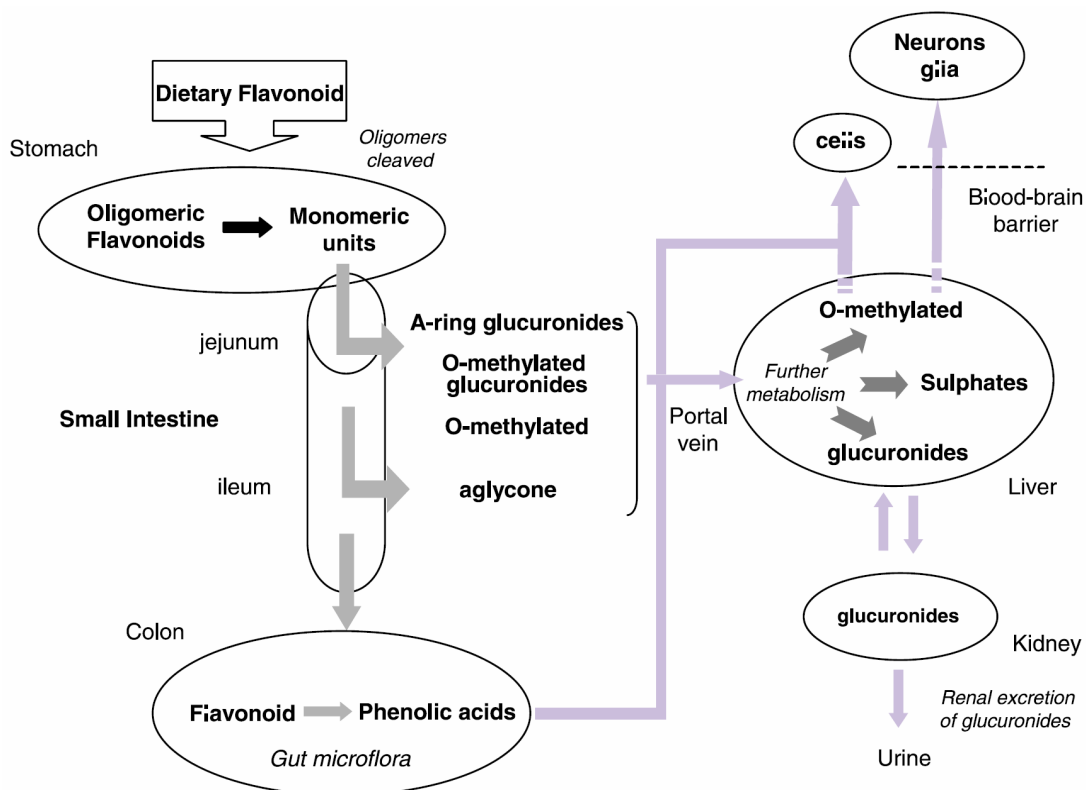
Ο πλέον άμεσος τρόπος ανίχνευσης των πολυφαινολών είναι η χρήση του αντιδραστηρίου Folin Ciocalteu, το οποίο αποτελείται $H_3PW_{12}O_{40}$ και $H_3PMo_{12}O_{40}$. Παρουσία φαινολικών ενώσεων, το αντιδραστήριο ανάγεται σε κυανά-ιώδη οξειδία, τα οποία μπορούν να υπολογισθούν ποσοτικά μέσω της απορροφήσεώς τους στα 760 nm (Singleton and Rossi Jr, 1965).

1.2.2.2. Μονομερείς πολυφαινόλες:

Βιοδιαθεσιμότητα-φαρμακοκινητική-βιολογικοί δείκτες

Λόγω της δυσκολίας στην απομόνωση και την ταυτοποίηση των πολυφαινόλων, τα περισσότερα δεδομένα βιοδιαθεσιμότητας και φαρμακοκινητικής αφορούν τα φλαβονοειδή και ιδιαίτερως την quercetin, τις κατεχίνες και τις ισοφλαβόνες (Εικ. 1.9.).

Μόνο ένα μικρό μέρος των ελεύθερων (βιολογικά ενεργών) πολυφαινόλων περνάει στην κυκλοφορία· περίπου 75% απεκκρίνεται (Walle et al., 2001a; Wenzel and Somoza, 2005). Τα μονομερή φλαβονοειδή μεταβολίζονται εκτενώς σε Ο-μεθυλοανάλογα ή/και υφίστανται γλυκουρονιδίωση και σουλφονυλίωση στο έντερο. Οι γλυκουρονυλιωμένοι μεταβολίτες είναι συνήθως πολικά μόρια, γεγονός που οδηγεί στην απέκκρισή τους από τους νεφρούς. Στο ήπαρ, οι κυριότερες τροποποιήσεις περιλαμβάνουν την προσθήκη μεθυλομάδων από τα κυτοχρώματα στον β-κατεχολικό δακτύλιο, οδηγώντας στην δημιουργία μορίων με ασθενέστερες αντιοξειδωτικές ιδιότητες, και την αφαίρεση των σακχάρων από τους γλυκουρονυλιωμένους μεταβολίτες, επαναφέροντας τα φλαβονοειδή στην αρχική τους μορφή. Μελέτες έδειξαν επίσης ότι αρκετά από τα ένζυμα που εμπλέκονται στον μεταβολισμό των πολυφαινόλων εμφανίζουν εκλεκτικότητα για τα υποστρώματά τους· π.χ. η ανθρώπινη UGTs (UDP-glucuronosyltransferases) δεν μπορούν να μεταβολίσουν την epicatechin, ενώ αντίθετα όλες οι ισομορφές των SULTs (sulfotransferases) μπορούν να συνθέσουν σουλφο-παράγωγά της (Vaidyanathan and Walle, 2003).



Εικόνα 1.9. Σχηματική απεικόνιση της μεταφοράς, της απορρόφησης, της απέκκρισης και του μεταβολισμού των πολυφαινόλων (Spencer et al., 2004).

Αν και η πρώτη μελέτη που αφορούσε στην βιοδιαθεσιμότητα της quercetin έδειξε ότι η φλαβονόλη δεν απορροφάται, ο Hollman et al. (Hollman et al., 1995; Hollman and Katan, 1999; Hollman et al., 2001; Hollman et al., 1997a; Hollman et al., 1997b; Hollman et al., 1996; Sesink et al., 2001) διαπίστωσαν ότι η φλαβονόλη είναι βιοδιαθέσιμη από πληθώρα τροφίμων και διατροφικών συμπληρωμάτων, είτε μετά από εφάπαξ χορήγηση, είτε μετά από μακροχρόνια πρόθεσημη κατανάλωση. Η αποβολή της quercetin μέσω των ούρων κυμαίνεται σε 0,07-1,4% της χορηγούμενης ποσότητας, ενώ ελαττώνεται όταν χορηγείται ως quercetin rutinoside, χωρίς να αποκλείεται η πιθανότητα επέκκρισής της μέσω της χολής (Crespy et al., 2002; Ueno et al., 1983)· σε αρουραίους, μετά από χορήγηση quercetin (0.25% της δίαιτάς τους), η συγκέντρωση της φλαβονόλης και των μεθυλιωμένων μεταβολιτών της ήταν τριπλάσια στην χολή σε σχέση με αυτή στα ούρα, γεγονός το οποίο μπορεί να οφείλεται στο μεγάλο μέγεθος των γλουκουρονιδίων και σουλφοπαραγώγων της και την αυξημένη ικανότητά τους να προσδένονται σε πρωτεΐνες (Boulton et al., 1998; Manach et al., 1995; Spencer et al., 1999). Στους ανθρώπους η συγκέντρωση της quercetin στο πλάσμα βρέθηκε $23 \pm 4 \mu\text{g/l}$ (Noroozi et al., 2000). Σε μία συγκριτική μελέτη, όπου ερευνήθηκε η βιοδιαθεσιμότητα της quercetin και της rutin σε ανθρώπους, οι οποίοι κατανάλωσαν *p.o.* συμπληρώματα διατροφής ή 100 g/ ημέρα μούρα (black currants και bilberries) η συγκέντρωση της quercetin στο πλάσμα ήταν κατά 30-50% υψηλότερη από αυτή στην ομάδα μάρτυρα ($16 \pm 13 \mu\text{g/l}$) (Erlund et al., 2006; Erlund et al., 2003). Αν και τα φλαβονοειδή είχαν διαφορετική συμπεριφορά, η μέση C_{max} και το $\text{EYK}_{(0-32)}$ κυμαίνονταν σε παρόμοια επίπεδα. Οι γλυκοζίτες της quercetin βρέθηκε ότι απορροφώνται από το δωδεκαδάκτυλο, ενώ οι quercetin και rutin από το λεπτό έντερο και το ορθό. Επίσης στους ανθρώπους, σε αντίθεση με τους χοίρους και τους αρουραίους, δεν ανιχνεύονται μεθυλιωμένα παράγωγα στο πλάσμα, στα ούρα και την χολή (Cermak et al., 2003).

Η quercetin του πλάσματος αποτελεί έναν αρκετά καλό βιολογικό δείκτη, καθώς η συγκέντρωσή της αυξάνει ανάλογα με την περιεκτικότητα της τροφής σε αυτή, ενώ έχει σχετικά μεγάλο χρόνο ημίσειας ζωής (de Vries et al., 1998; Noroozi et al., 2000). Αντιθέτως, η συγκέντρωση της quercetin (μετά από *δίαιτα-fasting plasma concentration*) στο πλάσμα και των φλαβονονών στα ούρα δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αξιόπιστοι δείκτες βιοδιαθεσιμότητας· εναλλακτικά, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί η μέτρησή τους στα ούρα κατά την διάρκεια του 24ώρου.

Οι φλαβανόνες hesperetin και naringenin μετά την κατανάλωση 400-760 ml χυμού πορτοκαλιού ή γκρέϊπφρουτ απορροφώνται από το λεπτό έντερο και το ορθό και ανιχνεύονται στις υψηλότερες συγκεντρώσεις τους στο πλάσμα μετά από 1-2 h. Ωστόσο, η απέκκριση της naringenin μέσω των ούρων είναι 1% για τον χυμό πορτοκαλιού και 30% για τον χυμό γκρέϊπφρουτ, ενώ η αντίστοιχη τιμή για την hesperetin από χυμό πορτοκαλιού είναι 5%. Αν και η συνολική απορρόφηση των φλαβονονών φτάνει το 90%, το 57% ανακτάται από την χολή, ενώ σημαντικό μέρος τους αποβάλλεται από τους πνεύμονες ως CO_2 (Erlund, 2004). Άλλες μελέτες έδειξαν ότι η κατανάλωση χυμού ή λήψη συμπληρωμάτων διατροφής

μπορεί να καταλήξει σε 5-59% νεφρική απέκκριση (Ameer et al., 1996; Fuhr and Kummert, 1995; Ishii et al., 2000; Lee and Reidenberg, 1998).

Σε μία συγκριτική μελέτη της κινητικής της resveratrol μετά από ενδοφλέβια ή *p.o.* χορήγηση σε αρουραίους (Marier et al., 2002) βρέθηκε ότι το στυλβένιο ανακυκλώνεται: αμέσως μετά από την ενδοφλέβια χορήγηση τα επίπεδα της αγλυκόνης στο πλάσμα μειώνονται ($t_{1/2}=0,13$ ώρες), ενώ επανέρχονται αργότερα (4-8 ώρες) στο μέγιστο· συγκρίνοντας τα ευρήματα με αυτά μετά από *p.o.* χορήγηση βρέθηκε ότι η resveratrol (αγλυκόνη) είναι κατά 38% βιοδιαθέσιμη, λόγω εκτεταμένης γλυκοσυλίωσης, και εισέρχεται στο αίμα μέσω της εντεροηπατικής κυκλοφορίας· η απέκκριση τόσο της αγλυκόνης όσο και των γλυκοζιτών της resveratrol γίνεται κυρίως μέσω της χολής, παρά μέσω των ούρων. Ανάλογα, στους ανθρώπους, η resveratrol μετά από *p.o.* χορήγηση (0,03 mg/kg σωματικού βάρους) ανιχνεύεται επίσης γρήγορα στο αίμα και τα ούρα (Meng et al., 2004), ενώ η κατανάλωση χυμού grapefruit (μεγάλη περιεκτικότητα σε γλυκοζίτες της) έδειξε ότι μειώνουν την βιοδιαθεσιμότητά της στο 5%. Η resveratrol ανιχνεύεται κύρια στο ήπαρ και τους νεφρούς επίμυων και σε μικρότερο βαθμό στο ορθό, τους πνεύμονες, την καρδιά και τον εγκέφαλο (Vitrac et al., 2003), εντούτοις, δεν έχει διευκρινισθεί αντίστοιχη κατανομή στους ανθρώπινους ιστούς.

Η παρουσία σακχάρων στο μόριο των πολυφαινολών (γλυκόζη, γαλακτόζη) επιτρέπει την προσρόφησή τους από το λεπτό έντερο μέσω της κυτταροπλασματικής β -glucosidase/lactase phlorizin υδροξυλάσης (Scalbert and Williamson, 2000). Μόρια υποκατεστημένα με ραμνόζη δεν απορροφώνται, αλλά αποικοδομούνται από την εντερική χλωρίδα (α -rhamnosidases) (Paganga and Rice-Evans, 1997; Scalbert and Williamson, 2000). Ακετυλιωμένα μόρια, όπως οι epicatechin και EGC απορροφώνται αυτούσια.

Τέλος, η βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών επηρεάζεται ακόμη από το φύλο· η quercetin-3-rutinoside ανιχνεύεται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στις γυναίκες, ιδιαίτερα σε αυτές που λαμβάνουν αντισυλληπτικά, ($t_{1/2}$ μεταξύ 15 και 18 h), σε σχέση με τους άνδρες (Erlund, 2004). Επιπλέον, η απορρόφηση των πολυφαινολών μπορεί να διευκολύνεται ή να παρεμποδίζεται από άλλα στοιχεία της διατροφής. Η παράλληλη κατανάλωση λιπιδίων συνήθως αυξάνει τα επίπεδά τους (Lesser et al., 2004). Αξίζει επίσης να σημειωθεί, ότι η ικανότητα του σώματος να προσροφά τις πολυφαινόλες είναι περιορισμένη και κατά συνέπεια η ταυτόχρονη χορήγηση δύο τουλάχιστον ουσιών έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της συγκέντρωσης καθεμιάς στο πλάσμα, διατηρώντας όμως την συνολική τους συγκέντρωση σε μικρομοριακά επίπεδα (Silberberg et al., 2005).

1.2.2.3. Σύμπλοκες πολυφαινόλες:

Βιοδιαθεσιμότητα-φαρμακοκινητική-βιολογικοί δείκτες

Οι πολυμερείς προανθοκυανίνες (ταννίνες) θεωρήθηκε ότι δεν μπορούν να απορροφηθούν από το λεπτό έντερο, παρά μόνο μετά την μετατροπή τους από την μικροχλωρίδα σε

αρωματικά οξέα διαφορετικού βαθμού υδροξυλίωσης και μήκους της πλευρικής αλιφατικής αλυσίδος (Deprez et al., 2000). Η μέγιστη συγκέντρωση των μη υδροξυλιωμένων οξέων, αλλά και αυτών με μ-υδροξυφαινολομάδες παρατηρείται μετά από 24 ώρες. Αντιθέτως, στην περίπτωση των φαινολικών οξέων με π-υδροξυφαινολομάδες, η συγκέντρωσή τους είναι μέγιστη στις 6 ώρες και φθίνει κατόπιν μέχρι τις επόμενες 24-48 ώρες. μ-Υδροξυφαινολικά οξέα μπορεί να προκύψουν και από τον μεταβολισμό των κατεχινών (Meselhy et al., 1997). Ο μεταβολισμός των ταννινών οδηγεί στον σχηματισμό φαινολοπροπιονικού οξέος και σε μικρότερο βαθμό φαινολοξικού και βενζοϊκού οξέος, τα τελευταία όμως δεν θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες, καθώς αποτελούν ενδιάμεσους μεταβολίτες πολλών αρωματικών ενώσεων, όπως οι κατεχίνες (Meselhy et al., 1997) ή το διμερές της προκυανιδίνης B3 (Groenewoud and Hundt, 1986). Μεταβολίτες που χαρακτηρίζουν την κατανάλωση κατεχίνης ή B3 είναι οι φαινολβαλερολακτόνες και τα παράγωγα της διαρυλ-2-όλης (Groenewoud and Hundt, 1984; Groenewoud and Hundt, 1986; Meselhy et al., 1997; Scheline, 1970) και εμφανίζονται σχετικά σύντομα μετά την πρόσληψη των πολυφαινολών. Τα δεδομένα αυτά οδήγησαν σε αναθεώρηση της άποψης για υστερημένη απορρόφηση των συμπλόκων πολυφαινολών. Είναι πλέον γενικώς αποδεκτό ότι και οι γλυκοσυλιωμένες ανθοκυανίνες απορροφώνται αυτούσιες (Cao and Prior, 1999; Matsumoto et al., 2001; McGhie et al., 2003; Miyazawa et al., 1999; Wu et al., 2002). Οι Spencer et al. πρότειναν ότι η διάσπαση-υδρόλυση των πολυμερών προκυανινών και ταννινών σε μείγματα μονομερών και διμερών γίνεται στο στομάχι, διευκολύντας την απορρόφησή τους από το λεπτό έντερο (Spencer et al., 2004). Παρά την έλλειψη πειραματικών ενδείξεων για μεταβολισμό των προανθοκυανινών στο στομάχι, μόρια B2 ανιχνεύονται στο πλάσμα δύο ώρες μετά την κατανάλωση σοκολατούχου σκευάσματος (Holt et al., 2002). Εντούτοις, η B2 είναι ελάχιστα απορροφήσιμη στους αρουραίους (Baba et al., 2002), ενώ η B3 καθόλου (Donovan et al., 2002).

Σε αντίθεση με τις μονομερείς πολυφαινόλες, οι ανθοκυανίνες έχει προταθεί ότι απορροφώνται υποβοηθούμενες από την χολή στην γλυκοζυλιωμένη τους μορφή (Passamonti et al., 2002). Ακόμη, τα μόρια που είναι υποκατεστημένα με γλυκόζη εμφανίζουν μεγαλύτερη εντερική απορρόφηση (Delgado-Vargas and Paredes-Lopez, 2003), καθώς είναι τα πλέον σταθερά σε pH>7 (πλάσμα ή ενδοκυττάριο περιβάλλον), ενώ οι 3,5-διγλυκοζίτες ανιχνεύονται σε διπλάσιες συγκεντρώσεις από τους 3-γλυκοζίτες στα ούρα. Έχει αναφερθεί ότι η απορρόφηση των γλυκοζυλιωμένων ανθοκυανινών γίνεται ανάλογα με αυτή των γλυκοζυλιωμένων φλαβονοειδών, μέσω των Na-εξαρτώμενων μεταφορέων γλυκόζης SGLT1 (Gee et al., 2000; Gee et al., 1998). Εντούτοις, μέσω του ίδιου μηχανισμού απορροφώνται και οι αγλυκόνες (Mulleder et al., 2002), καθώς η προσθήκη γλυκόζης σε εκχύλισμα χυμού elderberry είχε ως αποτέλεσμα την καθυστέρηση και μείωση της αποβολής των μεταβολιτών τους. Εναλλακτικά, η φαινομενικά ανταγωνιστική πρόσληψη γλυκοζιτών και γλυκόζης θα μπορούσε να οφείλεται στην αναστολή της λειτουργίας των SGLT1 από τις ανθοκυανίνες, ενώ η μεταφορά των πολυφαινολών να διαμεσολαβείται από άλλο σύστημα (Gee et al., 2000). Οι Tsuda et al. πρότειναν επίσης ότι η απορρόφηση του

cyanidin-3-glucoside από το λεπτό έντερο μπορεί να γίνει με την μορφή αγλυκόνης, αφού υδρολυθεί από τις β-γλυκοσιδάσες (Tsuda et al., 1999b). Τέτοιου είδους τροποποιήσεις έχουν δειχθεί σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από κύτταρα εντέρου και ήπατος (Day et al., 2000b). Υπεύθυνη είναι η lactase phlorizin hydrolase (LPH), η μόνη γνωστή β-γλυκοσιδάση που εντοπίζεται στον αυλό του εντέρου των θηλαστικών. Ακόμη, η ακυλίωση των ανθοκυανών, αν και τις προστατεύει από την θερμότητα, την ακτινοβολία, το υψηλό pH και το SO₂ (Delgado-Vargas and Paredes-Lopez, 2003), δυσχεραίνει την βιοδιαθεσιμότητά τους (Cacace and Mazza, 2002; Wu et al., 2004).

1.2.2.4. Μεταβολισμός

1.2.2.4.1. Μεταβολισμός των πολυφαινολών πριν την απορρόφησή τους

Ο μεταβολισμός των πολυφαινολών, με κυριότερη την απογλυκοζυλίωση των φλαβονοειδών, διευκολύνει την απορρόφησή τους και μπορεί να γίνει από την lactase-phloridzin hydrolase του ψηκτροειδούς επιθηλίου (Day et al., 2000a) ή την β-γλυκοζιδάση (Day et al., 1998), η οποία εμφανίζει μικρότερη συγγένεια. *In vitro*, η lactase-phloridzin hydrolase μπορεί να μεταβολίζει τις quercetin-4'-glucoside, quercetin-3-glucoside, quercetin-3,4'-glucoside, 3'-methylquercetin-3-glucoside, genistein-7-glucoside και daidzein-7-glucoside, αλλά όχι τις quercetin-3-rhamnoglucoside (rutin) και naringenin-7-rhamnoglucoside (naringin). Ανάλογα, εκχυλίσματα από κύτταρα εντέρου ή ήπατος, τα οποία περιέχουν β-γλυκοσιδάση, είναι ικανά να υδρολύουν glucosides φλαβονοειδών υποκατεστημένα στις θέσεις 4'-OH ή 7'-OH, αλλά όχι τις quercetin-3,4'-glucoside, quercetin-3-glucoside, quercetin-3-rhamnoglucoside (rutin) και naringenin-7-rhamnoglucoside (naringin). Στην πράξη δεν έχουν εντοπισθεί quercetin glycosides στην κυκλοφορία, με εξαίρεση δύο μελέτες (Aziz et al., 1998; Paganga and Rice-Evans, 1997) στις οποίες πιθανόν, λόγω παρόμοιου χρόνου κατακράτησης στο HPLC και φάσματος απορρόφησης στο υπεριώδες, συγχέονται με glucuronides φλαβονοειδών. Επίσης, σε αντίθεση με την πλειοψηφία των φλαβονοειδών και παρά την ομοιότητά της με την quercetin και τον ενδιάμεσο μεταβολισμό της σε glucuronides ή sulfates, η chrysin αποβάλλεται αυτούσια (Walle et al., 2001a).

Ακόμη, τόσο η μικροχλωρίδα της στοματικής κοιλότητας, όσο και τα κύτταρα του στοματικού επιθηλίου φαίνεται ότι έχουν την ικανότητα να υδρολύουν γλυκοζυλιωμένα φλαβονοειδή (Walle et al., 2005). Επιπλέον, ένζυμα (β-glucosidase, α-ραμνοσιδάση) που παράγονται από την γαστρεντερική χλωρίδα, όπως τα Bacteroides JY-6 (Jang and Kim, 1996), Streptococcus faecium VGH-1 και Streptococcus sp. FRP-17 (MacDonald et al., 1984), έχει δειχθεί ότι υδρολύουν τα φλαβονοειδή ή τα καταβολίζουν σε υδροξυφαινυλοξικά (από φλαβονόλες) και υδροξυφαινυλοπροπιονικά οξέα (από φλαβανόνες) ή φαινυλβαλερολακτόνες και υδροξυφαινυλοπροπιονικά οξέα (από φλαβανόλες) (Baba et al., 1981; Nakagawa et al., 1965). Περαιτέρω καταβολισμός των οξέων αυτών οδηγεί στον σχηματισμό βενζοϊκού οξέος. Ειδικότερα στην περίπτωση των κατεχινών σχηματίζεται 3-hydroxyhippuric acid, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης μεταβολισμού τους, σε

αντίθεση με το hippuric acid, το οποίο μπορεί να προέλθει και από quinic acid ή αρωματικά οξέα (Rechner et al., 2001). Τέλος, στον άνθρωπο, οι ανθοκυανίνες, ανιχνεύονται στα ούρα ως μεθυλο- ή γλυκοζυλμεταβολίτες, μετά από κατανάλωση εκχυλίσματος elderberry ή blueberry (Wu et al., 2002) ή ως chalcones στο πλάσμα (Delgado-Vargas and Paredes-Lopez, 2003). Στους επίμυες, παρά την εκτεταμένη τροποποίησή τους και την μειωμένη απορρόφηση από το έντερο, η χορήγηση ανθοκυανινών έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση δύο μόνο μεταβολιτών (με διπλό δεσμό σε συζυγία με τον βενζολικό δακτύλιο) στο πλάσμα (He, 2004).

1.2.2.4.1. Προσυστημικός μεταβολισμός

Μελέτες έγχυσης (perfusion) σε έντερο αρουραίου έδειξαν ότι μέρος των quercetin glucuronides και sulfates παράγεται από το εντερικό τοίχωμα (Crespy et al., 1999; Spencer et al., 1999), ενώ υψηλές συγκεντρώσεις μεθυλιωμένης quercetin (3'-methylquercetin (isorhamnetin) και 4'-methylquercetin (tamarixetin), ανιχνεύθηκαν στα ούρα και την χολή αρουραίων μετά από δίαιτα πλούσια στην φλαβονόλη (0.25%) (Manach et al., 1997; Manach et al., 1995). Εντούτοις, στους ανθρώπους η συγκέντρωση των μεταβολιτών αυτών είναι εξαιρετικά μικρή (Erlund, 2004; Manach et al., 1998). Η παραγωγή των μεθυλιωμένων παραγώγων φαίνεται ότι συντελείται κυρίως στο ήπαρ, παρά στο έντερο (Crespy et al., 1999), όπως έχει δειχθεί και σε απομονωμένα κύτταρα της σειράς HepG2 (Boulton et al., 1999). *Ex vivo* πειράματα σε εντερικό μοντέλο perfusion, έδειξε επίσης ότι η resveratrol (837-1704 nmol) απορροφάται κατά 54% από τα κύτταρα του εντερικού τοιχώματος (Andlauer et al., 2000). Από αυτή την ποσότητα, 21% ανιχνεύθηκε στην βασική πλευρά (κυκλοφορία), ενώ μόνο 2% εντοπίστηκε εντός των κυττάρων του εντέρου. Από την συνολική ποσότητα του στυλβενίου στο αίμα, 40% αντιστοιχούσε σε ελεύθερη resveratrol, 11% σε γλυκοζίτες της και 3% σε σουλφοπαράγωγα. Η μετακίνηση των αναλόγων της resveratrol από τα κύτταρα του εντέρου ήταν αμφίδρομη. Σε ανάλογο μοντέλο έγχυσης (perfusion) νήστιδος-ειλεού, 90 min μετά την χορήγηση resveratrol, ελάχιστη ποσότητα ανιχνεύθηκε στην βασική πλευρά των εντεροκυττάρων της νήστιδος και κατά πολύ μικρότερη στον ειλεό, ενώ η πλειοψηφία των μορίων αντιστοιχούσαν σε glucuronides (Kuhnle et al., 2000). *P.o.* ή ενδογαστρική χορήγηση κόκκινου κρασιού σε αρουραίους (Bertelli et al., 1996a; Bertelli et al., 1996b; Bertelli et al., 1998), έδειξε ότι η resveratrol εισέρχεται στην κυκλοφορία 30 min αργότερα, ενώ φθάνει στην μέγιστη συγκέντρωσή της στο ήπαρ και τα νεφρά μετά από μία ώρα. Άλλη ομάδα έδειξε ότι μετά από διασωλήνωση, η resveratrol ανιχνεύεται στο αίμα μετά από 15min, ενώ η συγκέντρωση του στυλβενίου αυξάνεται μέχρι τα 30 min και έπειτα φθίνει (Soleas et al., 2001). Ιστολογική ανάλυση μετά από χορήγηση trans-resveratrol σε επίμυες έδειξε ότι το στυλβένιο συσσωρεύεται στο δωδεκαδάκτυλο, τον φλοιό των νεφρών και το παρέγχυμα του ήπατος (Vitrac et al., 2003). Η εντεροηπατική κυκλοφορία φαίνεται επίσης να συμβάλλει στην επαναπρόσληψη/ανακύκλωση των πολυφαινολών και κυρίως των μεταβολιτών τους, με αποτέλεσμα την καθυστερημένη ανάκαμψη των επιπέδων τους στην κυκλοφορία (Marier et

al., 2002). Αξίζει να σημειωθεί ότι μετά από *p.o.* χορήγηση της resveratrol σε επίμυες, αρουραίους και κονίκλους η μέγιστη συγκέντρωσή της (περίπου 1nmol/gr φρέσκου ιστού) παρατηρήθηκε 10 min αργότερα στον εγκέφαλο, τους πνεύμονες, το ήπαρ και τους νεφρούς (Asensi et al., 2002). Στους ανθρώπους, μετά από λήψη resveratrol, catechin (25 mg/70kg σωματικού βάρους) ή quercetin (10 mg/70 kg σωματικού βάρους), η μέγιστη συγκέντρωση των πολυφαινολών στον ορό παρατηρήθηκε μετά από 30 min, ανεξάρτητα με το έκδοχο που χρησιμοποιήθηκε (χυμός σταφυλιών, κρασί ή χυμός λαχανικών), ενώ μέχρι τις 4h βρέθηκε να ελαττώνεται αισθητά. Το έκδοχο επηρέασε μόνο τον ρυθμό μείωσης της συγκέντρωσης στο πλάσμα (εντονότερος στον χυμό), αλλά όχι τον ρυθμό απέκκρισης (Goldberg et al., 2003). Η αποικοδόμηση των πολυφαινολών είναι εξίσου ταχεία, καθώς οι ουσίες ανιχνεύονται αυτούσιες στο πλάσμα μετά από ενδοφλέβια χορήγηση για μέγιστο χρονικό διάστημα 30 min (Walle et al., 2004). Η προσθήκη ομάδων σακκάρων στο μόριο του στιλβενίου είναι εφικτή τόσο στο έντερο, όσο και στο ήπαρ· η διαδικασία αυτή φαίνεται να είναι κοινή για τις πολυφαινόλες, καθώς η φλαβονόλη quercetin μπορεί να ανταγωνισθεί την glucuronidation της resveratrol (Aumont et al., 2001; de Santi et al., 2000a; de Santi et al., 2000b).

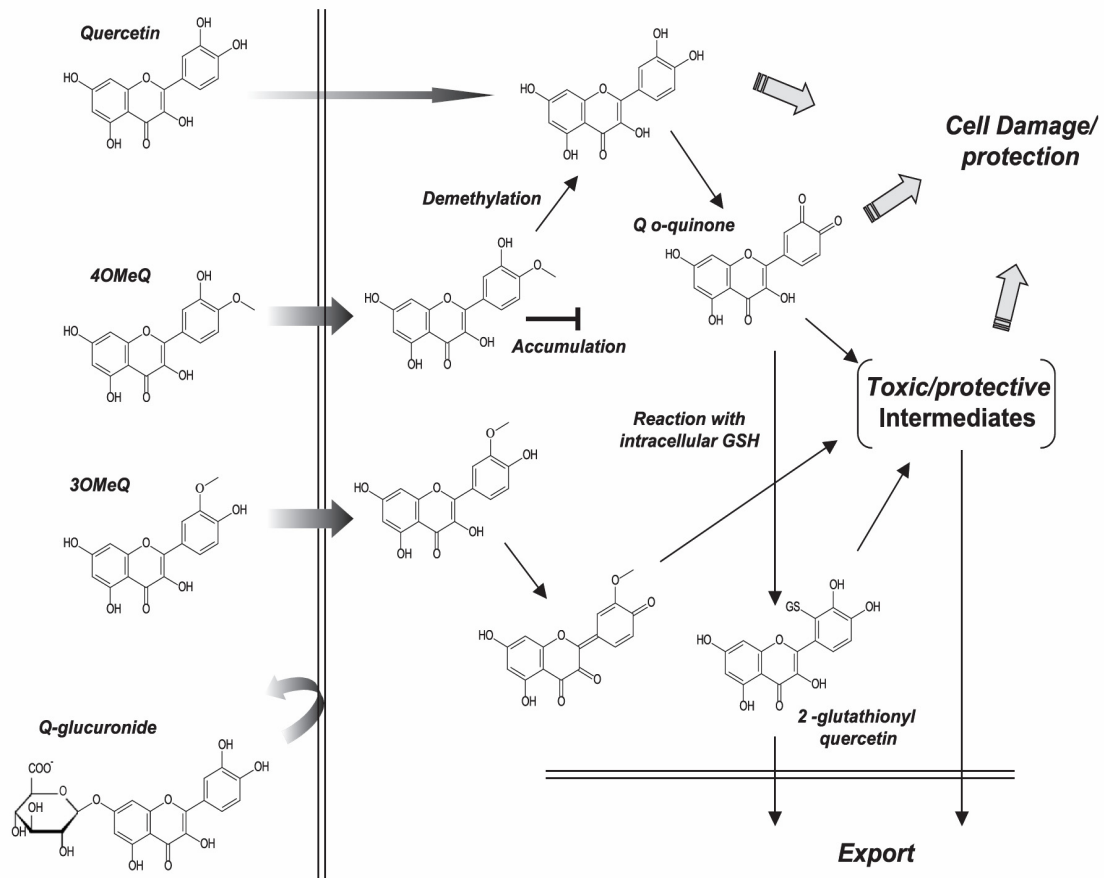
Ωστόσο, παρά την συμβολή των ενζύμων της φάσης II στον *in vitro* μεταβολισμό των πολυφαινολών, όπως επίσης και σε απομονωμένα μικροσωμάτια ήπατος, σε *in vivo* πειράματα, φαίνεται η μεθυλίωση να επισκιάζει τις υπόλοιπες τροποποιήσεις. Η Ο-μεθυλίωση των φλαβονοειδών που περιέχουν β-κατεχολικό δακτύλιο στο μόριό τους επιτελείται από την COMT (Spencer et al., 1999). Η τροποποίηση αυτή έχει μελετηθεί εκτενώς για το μόριο της quercetin, (σχηματισμός της isorhamnetin - 3'-O-methylquercetin), για την οποία η COMT εμφανίζει κατά πολύ μεγαλύτερη ενεργότητα σε σχέση με τα οιστρογόνα ή τις κατεχολαμίνες (Zhu, 2004). Επίσης, ο μεταβολισμός του καφεϊκού οξέος από τα ηπατοκύτταρα διαμεσολαβείται από την COMT, τα κυτοχρώματα και τις β-οξειδάσες· η COMT συμμετέχει στην μετατροπή του καφεϊκού ή του διϋδροκαφεϊκού οξέος σε φερουλικό ή διϋδροφερουλικό οξύ, η απομεθυλίωση των οποίων επιτελείται από τα CYP1A1/2, αλλά όχι από το CYP2E1· η αποϋδροξυλίωση του διϋδροκαφεϊκού και του διϋδροφερουλικού οξέος διαμεσολαβούνται από την δεϋδρογονάση του ακετυλοσυνενζύμου Α (β-οξειδάση) (Moridani et al., 2002). Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι οι κατεχίνες του τσαγιού, καθώς και οι εστέρες του γαλλικού οξέος έχουν την ικανότητα να παρεμποδίζουν την μετατροπή του protocatechuic acid σε βανιλλικό οξύ από την COMT, τόσο σε κυτταροπλασματικό εκχύλισμα ηπατοκυττάρων αρουραίου, όσο και σε ολόκληρα κύτταρα. Η παρουσία υποκαταστατών γαλλικού οξέος στην θέση C3 του δακτυλίου C προκαλεί εντονότερη αναστολή της δραστηριότητας της COMT· οι φλαβονόλες και οι φλαβονόλες δεν την επηρεάζουν (Kadowaki et al., 2005).

1.2.2.4.1. Συστημικός μεταβολισμός

Οι πολυφαινόλες, αν και έχει δειχθεί ότι επηρεάζουν τα επίπεδα των κυκλοφορούντων λιποπρωτεϊνών και την διαθεσιμότητα της χοληστερόλης, στην πλειοψηφία τους είναι

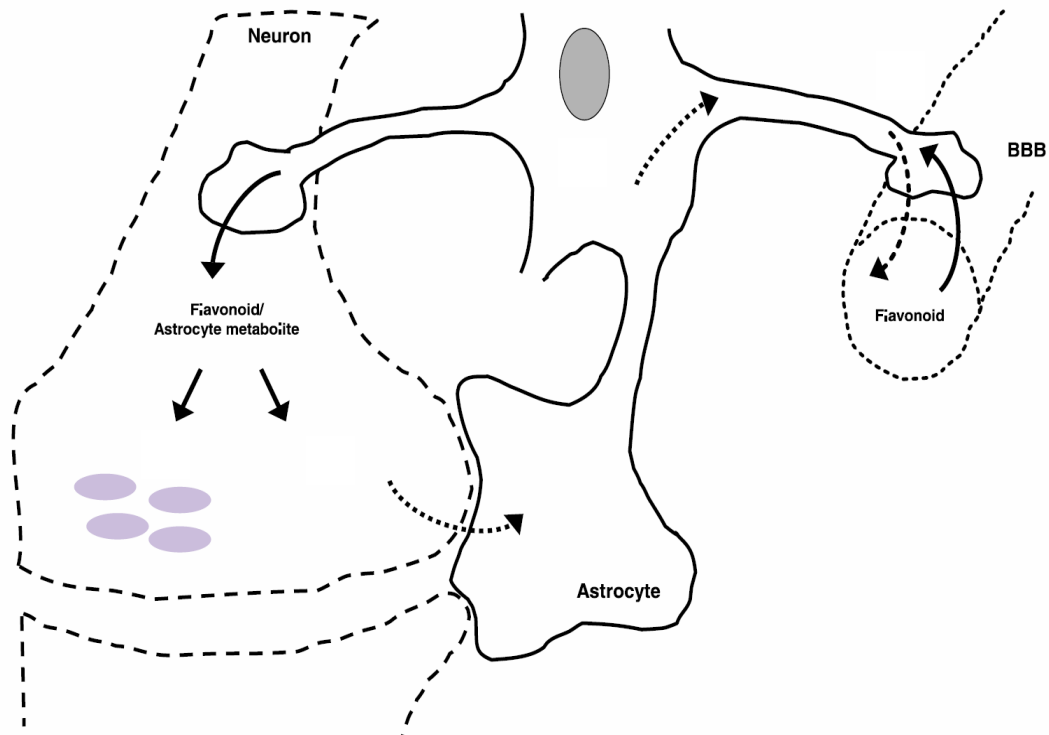
κυρίως προσδεμένες στην αλβουμίνη του ορού (Boulton et al., 1998). Μικρό ποσοστό των πολυφαινόλων προσδένεται στην LDL (Vinson et al., 1995), ενώ η genistein και οι μεταβολίτες της φαίνεται να αλληλεπιδρούν κυρίως με την HDL (Kaamanen et al., 2003). Έχει προταθεί ότι η προσκόλληση στις πρωτεΐνες του ορού διευκολύνει την απορρόφησή τους από τα κύτταρα, καθώς η μη ειδική αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης με τις λιπιδιακές μεμβράνες επάγει στερεοχημικές αλλαγές σε αυτή και πιθανόν την απελευθέρωση των προσδετών (Horie et al., 1988).

Τα κύτταρα της επιδερμίδας - κερατινοκύτταρα ή ινοβλάστες - μπορούν επίσης να απορροφούν και να μεταβολίζουν της πολυφαινόλες. Ωστόσο, η τροποποίηση των μορίων είναι επιλεκτική, καθώς έχουν βρεθεί 3'-O-methyl και epicatechin 4'-O-methyl epicatechin, αλλά όχι epicatechin 5-O-β-D-glucuronide (Spencer et al., 2001). Στην περίπτωση της quercetin, οι ινοβλάστες (Εικ. 1.10.) είναι ικανοί να παράγουν μεταβολίτες όπως 2'-glutathionyl quercetin και quercetin quinone/quinone methide (Spencer et al., 2003), πιθανόν μέσω της ενζυμικής δράσης της S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης. Η 4'-O-methyl quercetin εμφανίζει μειωμένη ικανότητα απορρόφησης και στερείται περαιτέρω οξειδωτικής αποικοδόμησης, σε σχέση με την 3'-O-methyl quercetin. Κατ'αναλογία με την epicatechin, η quercetin-7-O-β-D-glucuronide δεν μπορεί να απορροφηθεί, ούτε να μεταβολισθεί περαιτέρω. Οι ινοβλάστες της επιδερμίδας μπορούν επίσης να μεταβολίζουν τις φλαβανόνες (naringenin και hesperetin), σχηματίζοντας γλουκουρονιδιωμένα παράγωγά τους· η ιδιότητα αυτή δείχνει εκλεκτικότητα των ενδογενών UDP-glucuronosyl-transferases, καθώς δεν συμβαίνει το ίδιο για τις quercetin και epicatechin (Proteggente et al., 2003).



Εικόνα 1.10. Μεταβολισμός παραγώγων της quercetin από τους ινοβλάστες (Williams and Grayer, 2004).

Ενδοθηλιακά κύτταρα από εγκέφαλο αρουραίου (RBE4) ή επίμυος (bEND5) είναι ικανά να συσσωρεύουν φλαβονοειδή (Youdim et al., 2003), αν και το φαινόμενο ευνοείται στην περίπτωση λιπόφιλων μορίων. Για τον λόγο αυτό, οι hesperetin και naringenin απορροφώνται ευκολότερα από τις ανθοκυανίνες cyanidin-3-rutinoside και pelargonidin-3-glucoside ή O-μεθυλιωμένα φλαβονοειδή. Στα αστροκύτταρα παρατηρείται αυξημένη πρόσληψη της ericatechin και των O-μεθυλιωμένων παραγώγων της και απομεθυλίωση, σε σχέση με πρωτογενείς καλλιέργειες φλοιϊκών νευρώνων (Spencer et al., 2001). κοινό χαρακτηριστικό στους δύο τύπους κυττάρων αποτελεί η οξειδωτική αποικοδόμηση φλαβονολών, όπως η quercetin και kaempferol, καθώς και ο σχηματισμός συμπλόκων ενώσεων με γλουταθειόνη.



Εικόνα 1.11. Μεταφορά των φλαβονοειδών στο ΚΝΣ (Spencer et al., 2004).
(BBB: αιματοεγκεφαλικός φραγμός).

Ο σχηματισμός συμπλόκων φλαβονοειδών γλουταθειόνης, πιθανόν μέσω του συστήματος NADPH/CYP2E1 (Moridani et al., 2002), σηματοδοτεί, λόγω μεγέθους, την έκκρισή τους με την χολή από το ήπαρ, και ακολούθως την επαναπρόσληψή τους από το δωδεκαδάκτυλο, όπου μπορεί να μετασχηματίζονται σε γλουταμικό οξύ και γλυκίνη, καθώς και σε cysteinyl-flavonoids (Spencer et al., 2004). Οι τελευταίες ενώσεις είναι πιθανό να επαναπρολαμβάνονται από το γαστρεντερικό σύστημα και να εισέρχονται στην κυκλοφορία ή να αποβάλλονται με τα ούρα, αφού ακετυλιωθούν στους νεφρούς. Ακόμη, η σύζευξη των πολυφαινόλων με γλουταθειόνη προτάθηκε ότι αυξάνει την κυτταροτοξικότητά τους, ανάλογα με το MDMA (3,4-methylenedioxyamphetamin, ecstasy) ή τις κατεχολαμίνες, την ντοπαμίνη και την L-DOPA. Εντούτοις, η πρόσληψη και η κυτταροτοξικότητα της 2'-glutathionyl quercetin στους ινοβλάστες της επιδερμίδος και τα εγκεφαλικά κύτταρα είναι κατά πολύ μικρότερη σε σχέση με τις πρωτογενείς ουσίες (Spencer et al., 2003).

Ο οξειδωτικός καταβολισμός είναι ιδιαίτερα συχνός για τα διϋδροξυφλαβονοειδή, καθώς και όσες πολυφαινόλες περιέχουν β-κατεχολικούς δακτυλίους, με αποτέλεσμα την παραγωγή κινονών και H_2O_2 (Spencer et al., 2004). Το H_2O_2 λειτουργεί άμεσα ως δότης οξειδωτικών ριζών, εξίσου όμως επιβλαβείς μπορεί να είναι και οι κινόνες, καθώς λειτουργούν ως αποδέκτες Michael, δηλαδή προοξειδωτικά μόρια, μετά την μετατροπή τους σε semiquinone ή quinodal παράγωγα, και προάγουν αλκυλιώσεις των ενδοκυττάρων πρωτεϊνών και του DNA. Οξειδωτική αποικοδόμηση μέσω των κυτοχρωμάτων (CYPs) έχει δείχθει για απλές

πολυφαινόλες (galangin, kaempferide, chrysin, genistein), αλλά και πολυπλοκότερα μορία (xanthohumol) και επιτελείται από τα CYP2C9, CYP1A2, CYP1A1, CYP1B1 και CYP2E1 (Doostdar et al., 2000; Hu et al., 2003; Otake and Walle, 2002; Yilmazer et al., 2001).

Ακόμη, η glucuronidation των πολυφαινολών μπορεί επιπλέον να επάγεται κατά την διάρκεια της φλεγμονής, είτε τοπικά, είτε συστημικά, καθώς οι ενδοκυττάριας β -glucuronidases απελευθερώνονται. Παραδείγματος χάριν, η ισταμίνη επάγει την εξωκύττωσή τους από τα μακροφάγα των πνευμόνων, ενώ ενεργοποιημένα (με ιονομυκίνη) ουδετερόφιλα απελευθερώνουν την luteolin από το β -glucuronide παράγωγό της (Shimoi et al., 2000; Shimoi et al., 2001; Triggiani et al., 2001).

Τέλος, αν και οι πνεύμονες διαμεσολαβούν την απελευθέρωση CO_2 που προέρχεται από τον μεταβολισμό των φλαβονοειδών δεν είναι βέβαιο ότι συμμετέχουν στον καταβολισμό τους (Walle et al., 2001b).

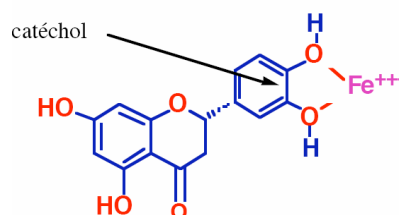
1.3. ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΕΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ

Οι βιολογικές δράσεις των πολυφαινολών έχουν μελετηθεί σε πληθώρα *in vitro*, *ex vivo* και *in vivo* συστημάτων. Ωστόσο, θα πρέπει να ληφθεί υπόψιν, ότι για την μελέτη των διατροφικών παραγόντων απαιτείται ένα σύστημα το οποίο προσομοιάζει την δυναμική και την ακεραιότητα ενός πολύπλοκου βιολογικού δικτύου. Στον παρόν κεφάλαιο, συζητώνται οι βιολογικές δράσεις των πολυφαινολών, ανεξαρτήτως της συγκεντρώσεως στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν και της πιθανής απουσίας αναλόγων *in vivo* φαινομένων, λόγω επικάλυψης ή συμπληρωματικότητας με βασικές κυτταρικές-συστημικές λειτουργίες.

1.3.1. Αντιοξειδωτική δράση

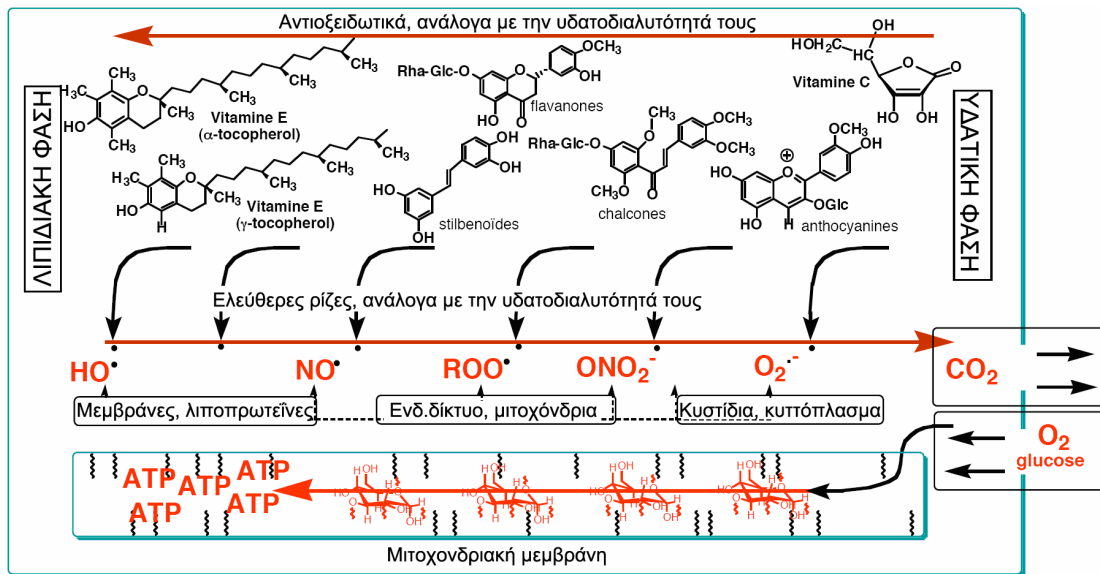
Οι πολυφαινόλες αποτελούν έναν από τους κυριότερους ενδογενείς μηχανισμούς προστασίας των φυτών έναντι πλήθους περιβαλλοντικών παραγόντων, οι οποίοι ενεργοποιούν περαιτέρω την σύνθεσή τους μέσω ενός ανάδρομου ενισχυτικού βρόγχου (positive feedback loop). Λαμβάνοντας υπόψιν τόσο τον ρόλο τους στην υγεία ενός φυτού, όσο και τις βιοσυνθετικές διαδικασίες από τις οποίες προκύπτουν, αρκετοί ερευνητές προσανατολίστηκαν στην ύπαρξη αναλόγων δράσεων στους ανώτερους ζωικούς οργανισμούς. Πράγματι, οι πολυφαινόλες λειτουργούν ως αντιοξειδωτικά και συμπλοκοποιητές μετάλλων (Εικ. 1.12-14).

Εικόνα 1.12. Η παρουσία κατεχολικού δακτυλίου διευκολύνει την συμπλοκοποίηση των φλαβονοειδών με ιόντα μετάλλων.

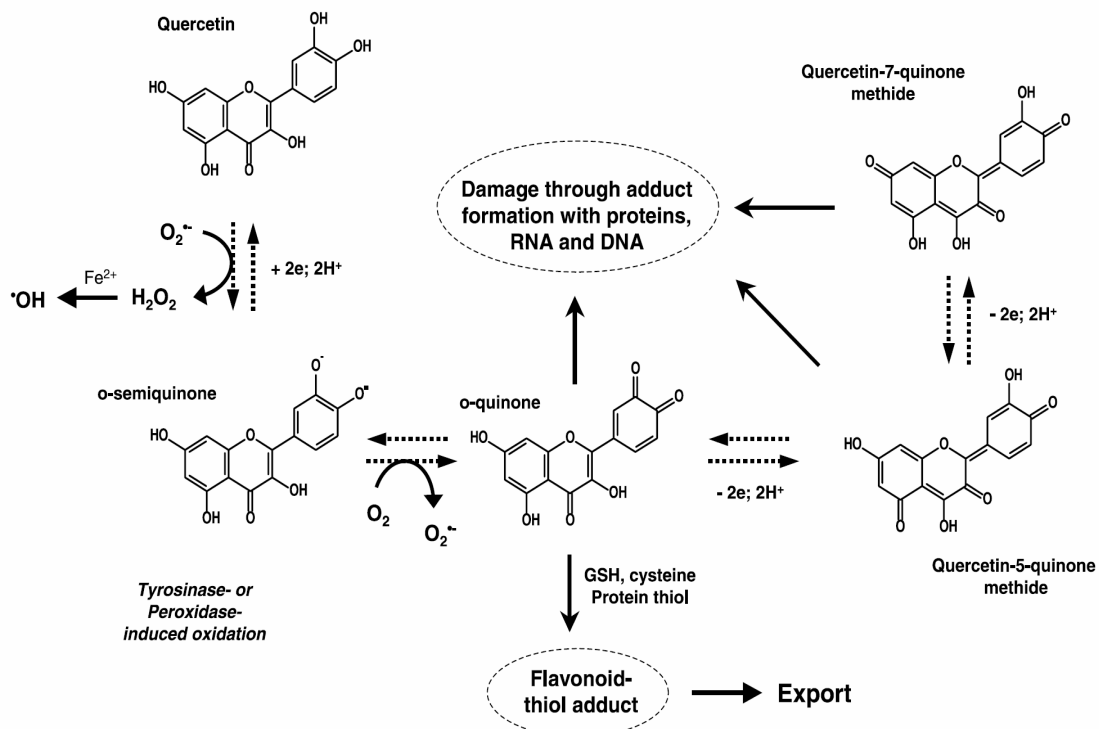


Η τελευταία ιδιότητα είναι ιδιαίτερα εμφανής σε φλαβονοειδή με 4-καρβονυλο- ή 1,5- ή 3-υδροξυ- υποκαταστάτες. Μπορούν επίσης να προσδένονται και να ανάγουν μέταλλα, όπως ο σίδηρος και ο χαλκός, αναστέλλοντας την αντίδραση Fenton (Pietta, 2000). Ακόμη, η παρουσία υδροξυλομάδων στο μόριο των φλαβονοειδών διευκολύνει την πρόσδεση και απενεργοποίηση ριζών νιτρικού υπεροξειδίου (Heijnen et al., 2001). Τέλος, χάριν στην παρουσία αρωματικών δακτυλίων λειτουργούν ως ασπίδα ενάντια στην υπεριώδη ακτινοβολία, ενώ απορροφούν μέρος της ορατής ακτινοβολίας στην περιοχή 350-450 nm, αποτρέποντας την δημιουργία ελευθέρων ριζών. Παρόλα ταύτα, η αντιοξειδωτική τους δράση είναι ασθενέστερη από αυτή άλλων διαιτητικών ουσιών, όπως το ασκορβικό οξύ και η τοκοφερόλη.

Η προστασία των λιπιδίων από οξείδωση περιλαμβάνει την εξουδετέρωση των ενδιάμεσων μεταβολιτών περοξυ- και αλκοξυ- ριζών. Το φερουλικό οξύ και κατεχίνες είναι ικανά να εξουδετερώνουν ρίζες υδροξυλίου, υπεροξειδίου, αζώτου, νιτρώδους και υποχλωρικού οξέος (Scott et al., 1993).



Εικόνα 1.13. Οι πολυφαινόλες εμφανίζουν ποικίλη υδατοδιαλυτότητα και έχουν αντίστοιχη ικανότητα να εξουδετερών τις ελεύθερες ρίζες που παράγονται κατά την διάρκεια της αναπνοής σε κάθε υποκυτταρικό διαμέρισμα.



Εικόνα 1.14. Η οξειδωση της quercetin υπό φυσιολογικές συνθήκες προκαλείται από ιόντα μετάλλων ή διαμεσολαβείται από τυροσινάσες ή υπεροξειδάσες. Η δημιουργία συμπλόκων με GSH διευκολύνει την αποβολή της από τα κύτταρα.

1.3.2. Ρύθμιση της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL)

Επιδημιολογικά δεδομένα συγκλίνουν στον προστατευτικό ρόλο των πολυφαινολών κατά την δημιουργία αθηρωματικών πλακών. Οι Frankel et al. (Frankel et al., 1993) έδειξαν ότι η ex vivo οξειδωση της LDL παρουσία Cu^{2+} καταστέλλεται ισχυρά από ολικό εκχύλισμα πολυφαινολών κόκκινου, αλλά όχι λευκού κρασιού. Μελέτη επιμέρους συστατικών, όπως φαινολικών οξέων, quercetin, catechin, epicatechin και trans-resveratrol, επιβεβαίωσε την προστατευτική τους δράση, ακόμη και παρουσία καταλυτών της οξειδωσης των λιπιδίων, όπως η μωσοφαιρίνη, τα κυτοχρώματα και ο ασκορβικός σίδηρος (Kanner et al., 1994). Τα φαινολικά οξέα φαίνεται να καταστέλλουν την οξειδωση της LDL, ανεξάρτητα από την παράλληλη αναγωγή της φερρυλμοσοφαιρίνης ($\text{FeIV}=\text{O}$). Ακόμη, τα φαινολικά οξέα καθυστερούν την κατανάλωση της α-τοκοφερόλης όταν προστίθενται πριν την έναρξη των οξειδωτικών αντιδράσεων, ενώ όταν προστίθενται αργότερα βοηθούν στην ανακύκλωσή της. Ανάλογα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στην οξειδωση της LDL από μακροφάγα (Jessup et al., 1990), αν και η δράση τους είναι ανεξάρτητη από την καταστολή των TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Species).

Σε μοριακό επίπεδο, η σύνθεση και η ενδοκύττωση των λιπιδίων ρυθμίζονται από τις πρωτεΐνες SREBPs (sterol regulatory element binding proteins): η SREBP-1 ελέγχει την βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων και η SREBP-2 των μεταβολισμό των στερολών. Οι SREBPs ενεργοποιούνται παρουσία υψηλής ενδοκυττάριας συγκέντρωσης στερολών ή μέσω φωσφορυλίωσης των MAPK και μετατοπίζονται στον πυρήνα, όπου προσδένονται στα στοιχεία SREs (Sterol Regulatory Elements) και επάγουν την μεταγραφή του υποδοχέα LDL-receptor ή την αναγωγή της HMG-CoA (Osborne, 2000). Υποδοχείς-μεταγραφικοί παράγοντες όπως ο LXR (ηπατικός υποδοχέας X) και ο RXR (υποδοχέας ρετινοϊκού οξέος) προσδένονται σε οξειδωμένα παράγωγα της χοληστερόλης και ρυθμίζουν την σηματοδότηση μέσω SREBP (Repa et al., 2000), ενώ οι FXR (farnesoyl X receptor) και HNF (Hepatocyte Nuclear factor) και η ινσουλίνη ελέγχουν την έκφραση του CYP7A (cholesterol-7 α -hydroxylase) (De Fabiani et al., 2000). Οι Kappor et al. (Kappor et al., 2002) έδειξαν ότι η curcumin αλληλεπιδρά με τον Raf-1 και επάγει την έκφραση του υποδοχέα της LDL. Η curcumin βρέθηκε επίσης ότι επηρεάζει την ομοιοστάση των λιπιδίων και της χοληστερόλης, καθώς μειώνει την προσδεσμένη στην LDL χοληστερόλη στο πλάσμα. Ένας πιθανός μηχανισμός δράσης περιλαμβάνει την αναστολή απορροφήσεως της από το γαστρεντερικό σύστημα. Εναλλακτικά, θα μπορούσε να επηρεάζει την αποβολή της χοληστερόλης μέσω του υποδοχέα της LDL ή να υποβοηθά την αποικοδόμησή της από την CYP7A. Στα κύτταρα HepG2, η curcumin βρέθηκε να επάγει την έκφραση του υποδοχέα της LDL, αλλά και αυτή της αναγωγής HMGCoA και της συνθάσης του πυροφωσφορικού φαρνεσουλίου (FDPS), η επαγωγή όμως των SREBPs ήταν αρκετά χαμηλή. Επιπλέον, η curcumin έχει αναφερθεί ότι μώνει τα επίπεδα της FABP1 (fatty acid binding protein 1) και της CD36 (μεταθετάση των λιπαρών οξέων). Οι αλλαγές αυτές έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση της καθαρής πρόσληψης της LDL-χοληστερόλης από το πλάσμα (Peschel et al., 2006). Ανάλογη δράση έχει και σε μακροφάγα, όπου οδηγεί σε συσσώρευση του υποδοχέα της LDL (Fan et al.,

2005a; Fan et al., 2005b). Τέλος, σε *in vitro* πειράματα βρέθηκε ότι οι catechins επηρεάζουν την διαλυτότητα της χοληστερόλης σε μεμβρανικές κατασκευές (μυκήλλια), γεγονός που σχετίζεται με την χαμηλή *in vivo* απορρόφησή της (Ikeda et al., 1992).

1.3.3. Αλληλεπίδραση με την οξειδάση της ξανθίνης

Η οξειδάση της ξανθίνης καταλύει την υδροξυλίωση πουρινινών, ενώ παράλληλα μετατρέπει ένα μόριο υποξανθίνης σε ξανθίνη και κατόπιν, παρουσία O_2 , σε ουρικό οξύ και O_2^- . Κατά τις βιοχημικές αυτές μετατροπές, οι O_2^- προκαλούν οίδημα και σχετίζονται με την φλεγμονή στο ήπαρ (ηπατίτιδα και ηπατοτοξικότητα), με την εμφάνιση αρθρίτιδας και την ανάπτυξη όγκων στον εγκέφαλο. Αρκετά φλαβονοειδή, μεταξύ των οποίων οι quercetin, catechin και epicatechin βρέθηκε ότι μπορούν να αναστέλλουν την δράση του ενζύμου (Chang et al., 1993; Hanasaki et al., 1994). Επίσης, ο Dok-Go et al. έδειξαν ότι η quercetin, καθώς και τα παράγωγά της (+)-dihydroquercetin και quercetin 3-methylether που απομονώθηκαν από το φυτό *Opuntia ficus-indica*, λειτουργούν προστατευτικά σε πρωτογενείς καλλιέργειες φλοιϊκών νευρώνων αρουραίου έναντι των $H_2O_2^-$ και X/XO (Dok-Go et al., 2003).

1.3.4. Συσσώρευση αιμοπεταλίων

Συγκριτική μελέτη πολυφαινολών έδειξε ότι οι γλυκοσυλιωμένες τους μορφές και οι φλαβονόνες δεν είναι ικανές να αναστείλουν την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, με εξαίρεση τις φλαβονόλες, οι οποίες καταστέλλουν ισχυρά τις COX και την αδενυλική κυκλάση (Landolfi et al., 1984). Άλλες μελέτες έδειξαν ότι τα φλαβονοειδή μπορούν να καταστέλλουν επίσης τις φωσφοδιεστεράσες των cAMP (Ferrell et al., 1979) και cGMP (Ruckstuhl et al., 1979), ανταγωνιζόμενα την πρόσδεση των κυκλικών νουκλεοτιδίων. Σε γενικές γραμμές οι πολυφαινόλες είναι ικανές να καταστέλλουν την σύνθεση των εικοσανοειδών και λευκοτριενίων, αν και ο βαθμός αναστολής ποικίλλει (Landolfi et al., 1984). Τέλος, το gentisic acid (2,5-διυδροξυβενζοϊκό οξύ), το οποίο απαντάται και στο λευκό και το κόκκινο κρασί (>2.25mg/l), εμφανίζει δομικές ομοιότητες με το σαλικυλικό οξύ (2-υδροξυβενζοϊκό οξύ), το κύριο συστατικό της ασπιρίνης και εμφανίζει ανάλογες ιδιότητες.

Στον μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος κύριο ρόλο διαδραματίζουν οι λιποξυγενάσες. Φλαβονοειδή, όπως οι quercetin, rutin, morin, αναστέλλουν την LOX-1, και κατά συνέπεια την σύνθεση των λευκοτριενίων, σε ανθρώπινα ουδετερόφιλα (Corvazier and Maclouf, 1985). Η παρουσία σακκάρων στο μόριο των πολυφαινολών μειώνει σημαντικά την ικανότητά τους αυτή, ενώ η ύπαρξη κατεχολικών δεσμών στον β-δακτύλιο και η υποκατάσταση με υδροξύλια την αυξάνει και τα καθιστά ειδικούς αναστολείς της κυκλοξυγενάσης.

Ανάλογα, η quercetin βρέθηκε να αναστέλλει κατά 70% την παραγωγή 12-HETE, ενώ άλλες πολυφαινόλες, μεταξύ των οποίων και το στιλβένιο resveratrol, δεν εμφάνισαν δράση

(Pace-Asciak et al., 1995). Σε *ex vivo* σύστημα οι quercetin και morin βρέθηκε ότι παρεμποδίζουν την προσκόλληση διεγερμένων αιμοπεταλίων στο αγγειακό επιθήλιο· προσδένονται επιλεκτικά στους πρώιμους θρόμβους, όπου και απενεργοποιούν τις ελεύθερες ρίζες και επάγουν την βιοσύνθεση και δράση της προστακυκλίνης και του EDRF από το ενδοθήλιο, ενώ η απελευθέρωση θρομβολυτικών και αγγειοπροστατευτικών διαμεσολαβητών περιορίζεται μόνο στα σημεία όπου έχει καλυφθεί από αιμοπετάλια (Gryglewski et al., 1987). Τέλος, ο Bakovic et al. έδειξαν ότι παράγωγα του κινναμικού οξέος (καφφεϊκό οξύ, φερουλικό οξύ και π-κουμαρικό οξύ) εκτός του ότι αναστέλλουν την παραγωγή 5- και 12-HETE και την ενεργότητα των λιποξυγενασών, ενισχύουν την δράση της υπεροξειδάσης της συνθάσης PGH και την σύνθεση των προσταγλαδινών. Η ιδιότητα αυτή θα μπορούσε να αξιοποιηθεί στα συμβατικά θεραπευτικά σχήματα, όπου χρησιμοποιούνται μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα-αναστολείς των λιποξυγενασών. Τέλος, η quercetin βρέθηκε να αναστέλλει την PLA₂, μιας πρωτεΐνη οξείας φάσης, η οποία εμπλέκεται στην σύνθεση διαμεσολαβητών της φλεγμονής, όπως οι προσταγλαδίνες, τα λευκοτριένια, ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων και τα λυσοφωσφολιπίδια (Lindahl and Tagesson, 1993).

1.3.5. Αντικαρκινική δράση

1.3.5.1. Επιδημιολογικά δεδομένα

Τα πρώτα δεδομένα σχετικά με την εμπλοκή των πολυφαινολών στον καρκίνο προέκυψαν από επιδημιολογικές μελέτες (Πίν. 1.2.). Ειδικότερα, η κατανάλωση τσαγιού, προϊόντων σόγιας, ελαιολάδου και αναποφλοιώτων δημητριακών βρήθηκε ότι μειώνει σημαντικά την πιθανότητα εμφάνισης διαφόρων μορφών καρκίνου (Blot et al., 1996; Yang et al., 2002; Zeegers et al., 2001). Σε μία συγκριτική μελέτη, η οποία διεξήχθη σε οκτώ χώρες, οι Sun et al. έδειξαν ότι η κατανάλωση τσαγιού μειώνει την εμφάνιση καρκίνου του μαστού (Sun et al., 2005). Σε μία ανάλογη έρευνα, οι Severson et al. (Severson et al., 1989) έδειξαν ότι η κατανάλωση σόγιας (ως tofu) μειώνει την πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του προστάτου, ενώ σε μία αντίστοιχη έρευνα σε άνδρες από 59 χώρες δείχθηκε ότι η κατανάλωση προϊόντων σόγιας σχετίζεται με μειωμένη θνησιμότητα από καρκίνο του προστάτου. Παρόλα ταύτα, θα πρέπει να σημειωθεί ότι αρκετές μελέτες, όπως η Netherlands Cohort Study on Diet and Cancer δεν παρατήρησαν αντίστοιχο συσχετισμό ως προς την κατανάλωση μαύρου τσαγιού (Goldbohm et al., 1996). Εντούτοις, ο θετικός ρόλος των πολυφαινολών στην εμφάνιση ή/και θνησιμότητα του καρκίνου είναι αδιαμφισβήτητος (Severson et al., 1989).

1.3.5.2. Πειραματικά μοντέλα σε ζώα

Επιπρόσθετα με τα επιδημιολογικά δεδομένα, πληθώρα ενδείξεων, σχετικά με την δράση αρκετών συστατικών φυτών, λαχανικών, βοτάνων και καρυκευμάτων, προέρχονται από πειραματικά μοντέλα όγκων σε ζώα (Πίν. 1.3.). Το πράσινο και το μαύρο τσάι βρέθηκε ότι

προστατεύουν από καρκίνο προκαλούμενο από υπεριώδη ακτινοβολία, όπως επίσης και από χημικές ουσίες σε γενετικά μοντέλα καρκίνου της επιδερμίδας, των πνευμόνων, του

Πίνακας 1.2. Επιδημιολογικές μελέτες που αφορούν στην αντικαρκινική δράση των πολυφαινολών.

Cancer	Food/ Polyphenol	Relative Risk	No. of Studies	Reference
Breast	Soy products, Tea,		14	(Wu et al., 2002); (Wu et al., 1996); (Lee et al., 1991; 1992); (Dai et al., 2001); (Shu et al., 2001); (Yamamoto et al., 2003)
	Whole grain, Dietary flavone, Resveratrol Isoflavones	Reduced risk	8	(Wu et al., 2003a); (Wu et al., 2003b); (Franceschi et al., 1995); (Sun et al., 2005); (Hirvonen et al., 2006); (Yuan et al., 2005); (Jakes et al., 2002); (Chatenoud et al., 1998); (Peterson et al., 2003); (Bosetti et al., 2005); (Adebamowo et al., 2005); (Levi et al., 2005); (Keinan-Boker et al., 2004); (Atkinson et al., 2004; Lu et al., 2000)
	Equol/Enterolactone lignan		2	(Ingram et al., 1997); (Pietinen et al., 2001)
	Tea, Soy products Enterolactone	No association	9 2	(Goldbohm et al., 1996); (Key et al., 1999); (Yuan et al., 1995); (Key et al., 1999); (Horn-Ross et al., 2001); (Hirose et al., 1995); (Michels et al., 2002) (Zheng et al., 1996); (Suzuki et al., 2004) (Kilkinen et al., 2004) (den Tonkelaar et al., 2001)
Stomach	Tea	Increased risk	1	(Rosenblatt et al., 1999)
	Tea, Soy food, Allium vegetables		14	(Tajima and Tominaga, 1985); (Kono et al., 1988); (Inoue et al., 1998); (Yu and Hsieh, 1991; Yu et al., 1995); (Ji et al., 1996); (Sun et al., 2002b); (Hansson et al., 1993); (Setiawan et al., 2001); (Mu et al., 2003); (Arts et al., 2002); (Zheng et al., 1996); (Nagata et al., 2002); (Gao et al., 1999) (Lagrou et al., 2004b)
	Diet analysis/flavone	Reduced risk	1	
	Whole grain, Olive oil		3	(Chatenoud et al., 1998); (Buiatti et al., 1990; Cipriani et al., 1991)
Prostate	Tea, Catechins	No association	8	(Hoshiyama and Sasaba, 1992); (Goldbohm et al., 1996); (Chow et al., 1999); (Heilbrunn et al., 1986); (Trichopoulos et al., 1985); (La Vecchia et al., 1992); (Tsubono et al., 2001); (Arts et al., 2002)
	Tea, Soy products		7	(Heilbrunn et al., 1986); (Jain et al., 1998); (Jacobsen et al., 1998); (Lee et al., 2003); (Sonoda et al., 2004); (Severson et al., 1989); (Hebert et al., 1998)
	Tocopherol, Genistein	Reduced risk	2	(Weinstein et al., 2005); (Strom et al., 1999)
	Whole grain, Myricetin		2	(Chatenoud et al., 1998); (Knekt et al., 2002)
	Tea, Soy products	No association	4	(La Vecchia et al., 1992); (Ellison, 2000); (Nagata, 2000); (Nomura et al., 2004)
	Myricetin, Enterolactone		2	(Hirvonen et al., 2001); (Kilkinen et al., 2003)
Colorectal	Campesterol, Stigmasterol	Increased risk	1	(Strom et al., 1999)
	Tea, Whole grain, fruits	Reduced risk	5	(Tajima and Tominaga, 1985); (Ji et al., 1997) (Chatenoud et al., 1998); (Hirvonen et al., 2001); (Steinmetz et al., 1994)
	Tea	No association	8	(Nagano et al., 2001); (Goldbohm et al., 1996); (Hartman et al., 1998); (Heilbrunn et al., 1986) (Olsen and Kronborg, 1993); (Baron et al., 1994); (Terry and Wolk, 2001); (Ilyasova et al., 2003)
	Tea, Soy products	Increased risk	2	(Cerhan et al., 2001); (Nagata, 2000)

Ovarian	Tea, Soy products Whole grain	Reduced risk	3 1	(Zhang et al., 2002); (Zhang et al., 2004a), (Zhang et al., 2004b) (Chatenoud et al., 1998)
Lung	Tea, Soy products	Reduced risk	2	(Ohno et al., 1995), (Nagata, 2000)
	Quercetin, Myricetin	Reduced risk	1	(Knekt et al., 2002)
	Apple Catechins		1	(Arts et al., 2001)
	Carotenoids		1	(Wright et al., 2003)
Pancreatic	Tea/Tea catechins Kaempferol, luteolin, quercetin	No association	4 1	(Goldbohm et al., 1996); (Heilbrun et al., 1986); (Zheng et al., 1996), (Arts et al., 2001) (Garcia-Closas et al., 1998)
	Tea, Diet analysis/flavonol	Increased risk	2	(Tewes et al., 1990), (Lagiou et al., 2004a)
	Tea, Whole grain Catechins	No association	4	(Nagano et al., 2001); (Heilbrun et al., 1986); (Bueno de Mesquita et al., 1992); (Gullo et al., 1995), (Chatenoud et al., 1998), (Arts et al., 2002)
	Tea, White wine	Reduced risk	2	(Shibata et al., 1994), (Bueno de Mesquita et al., 1992)
Bladder	Tea, Whole grain	Reduced risk	2	(Zeegers et al., 2001), (Chatenoud et al., 1998)
	Tea	No association	5	(Nagano et al., 2001); (Nagano et al., 2000); (La Vecchia et al., 1992); (Yu et al., 1997); (Nagano et al., 2000)
	Tea, Soy products	Increased risk	4	(Jensen et al., 1986); (Lu et al., 1999), (Sun et al., 2002a); (Sun et al., 2004)
Esophageal	Tea, Whole grain	Reduced risk	5	(Heilbrun et al., 1986); (Gao et al., 1994); (Sun et al., 2002b); (Gao et al., 1999), (Chatenoud et al., 1998)
	Tea	No association	4	(De Jong et al., 1974), (Kinlenn and McPherson, 1984) (La Vecchia et al., 1992), (Mu et al., 2003)
	Green tea	Increased risk	1	(Hu et al., 1994)
Hepatocellular	Soy products, Whole grain	Reduced risk	2	(Sharp et al., 2005); (Chatenoud et al., 1998)
	Tea	No association	2	(Nagano et al., 2001); (Heilbrun et al., 1986)
Kidney	Tea	No association	3	(Heilbrun et al., 1986); (La Vecchia et al., 1992); (Bianchi et al., 2000)
Thyroid	Tea, Wine, Whole grain, Soy products	Reduced risk	4	(Mack et al., 2002), (Mack et al., 2003), (Chatenoud et al., 1998), (Horn-Ross et al., 2002)
	Olive oil	Reduced risk	1	(Tzonou et al., 1996)
Endometrial	Whole grain	No association	1	(Chatenoud et al., 1998)

Πίνακας 1.3. Μελέτες που αφορούν στην δράση των πολυφαινολών σε μοντέλα καρκίνου σε ζώα.

Cancer	Type of tumor induction	Food/ Antioxidant	Effect	Reference
Skin	UVB&TPA/DMBA	Green/black tea polyphenols	Inhibition of tumor formation	(Wang et al., 1992); (Wang et al., 1994)
	DMBA/TPA	Black tea polyphenols	"	(Javed et al., 1998)
Lung	BP/UVB/DMBA	Green tea polyphenols	"	(Mukhtar et al., 1992)
	B16-BL6 melanoma cells	EGCG, Apigenin, Quercetin, Resveratrol	Inhibition of tumor growth	(Caltagirone et al., 2000)
	TPA	Curcumin, Caffeic acid	"	(Conney et al., 1991)
	Benzo[a]pyrene (BP)	Curcumin (topical)	Inhibition of tumor formation	(Huang et al., 1997)
Liver	Benzo(a)pyrene (BP)	Green tea polyphenols	Inhibition of tumor growth	(Katiyar et al., 1993)
	Transgenic mice	Wine solids	"	(Clifford et al., 1996)
	NNK	Arylalkyl isothiocyanates	"	(Stoner and Morse, 1997)
Liver	NNK	Black tea polyphenols	Inhibition of tumor growth	(Yang et al., 1997); (Yang et al., 1998)
	C3H mice with genetic defect NDEA	Tannic acid	Inhibition of tumor formation	(Nepka et al., 1999)
Breast	Transplanted hepatoma H22 model	Tea polyphenols	Inhibition of pre-cancerous lesions	(Jia et al., 2002)
	DMBA	Resveratrol	Inhibition of tumor growth	(Yu et al., 2003)
	HER-2/neu transgenic mice	Grape seed extract, Curcumin	Inhibition of tumor formation	(Kim et al., 2004); (Singletary et al., 1996)
Prostate	4T1 cells in BALB/c mice	Resveratrol	Inhibition of tumor formation/growth	(Provinciali et al., 2005)
	MCF7 cell implants	Green tea polyphenols	Inhibition of tumor growth/metastasis	(Baliga et al., 2005)
	TRAMP model	Genistein	Increased tumor size	(Hsieh et al., 1998)
	NNK	Green tea polyphenols	Inhibition of tumor formation	(Gupta et al., 2001)
Oesophageal	NMBA	Arylalkyl isothiocyanates	"	(Stoner and Morse, 1997)
	Azoxymethane	EGCG, Theaflavins	"	(Morse et al., 1997)
Colon	Tumor xenografts with SW620 cell	Curcumin	Inhibition of tumor formation	(Rao et al., 1995); (Huang et al., 1997)
	Tumor xenografts	Apple polyphenols	Inhibition of tumor growth	(Gosse et al., 2005)
Nasopharyngeal	Tumor xenografts	Tea polyphenols	"	(Feng et al., 2002)
Fore stomach	BP and Diethylnitrosamine (DEN)	Curcumin and green tea	Inhibition of tumor formation	(Huang et al., 1997); (Katiyar et al., 1993)
Deodenum cancer	ENG, azoxymethane, BP	polyphenols	"	(Huang et al., 1997)
	Injection of leukemia cells	Resveratrol	Weak antileukemic activity	(Gao et al., 2002)
Leukemia	DMBA	Curcumin	Inhibition of leukemia incidence	(Huang et al., 1998)

προστάτη, της ουρήθρας, του ορθού, του στομάχου, της στοματικής κοιλότητας, του οισοφάγου, του εντέρου και του παγκρέατος (Lambert and Yang, 2003; Yang et al., 2000; Yang and Wang, 1993). Ειδικότερα, κατανάλωση πολυφαινόλων πράσινου τσαγιού (0.1%) προκάλεσε μείωση κατά 65% της εμφάνισης καρκίνου σε διαγονιδιακό μοντέλο αδενοκαρκινώματος προστάτου (TRAMP model) (Gupta et al., 2001). Το πράσινο τσάι επίσης (0.6 % σε πόσιμη μορφή) ελάττωσε τον αριθμό και το μέγεθος των όγκων σε χημικά επαγόμενο (με dimethylbenz[a]anthracene, DMBA) καρκίνο του στόματος σε χάμστερ (Li et al., 2002). Επιπροσθέτως, το πράσινο τσάι, ελάττωσε το μέγεθος των όγκων του μαστού, την δημιουργία εστιών αδενοκαρκινωμάτων στο ορθό (Weisburger et al., 1997), και μείωσε τον αυθόρμητο σχηματισμό ραβδομυοσαρκωμάτων στους πνεύμονες σε AJ επίμυες (Landau et al., 1998). Η sesamin ανέστειλε την εμφάνιση καρκίνου του μαστού προκαλούμενου από DMBA (Hirose et al., 1992), ενώ δίαιτα πλούσια σε σόγια επιβράδυνεται το ρυθμό ανάπτυξης ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων προστάτου (LNCaP) σε SCID επίμυες (Bylund et al., 2000). Ελάττωση επίσης της ανάπτυξης των όγκων προστάτου παρατηρήθηκε και σε επαγόμενους από N-methyl-N-nitrosourea ανδρογόνο-εξαρτώμενους όγκους, αλλά και σε Dunning R-3327H μοντέλο καρκίνου προστάτου, μετά από δίαιτα πλούσια σε πολυφαινόλες τομάτας (Boileau et al., 2003).

1.3.6. Αναστολή των κινασών

Η quercetin, curcumin και genistein αποτελούν τα κυριότερα φλαβονοειδή με ιδιότητες αναστολέα κινάσης. Ειδικότερα, οι quercetin και myricetin ανταγωνίζονται την πρόσδεση του ATP στο μόριο της PI3 κινάσης (Walker et al., 2000). Η δράση αυτή (10-30 μM) σχετίζεται με την υποφωσφορυλίωση των μορίων Akt και ERK, την ενεργοποίηση της caspase 3 και την επαγωγή αποπτώσεως σε πρωτογενείς καλλιέργειες νευρώνων (Spencer et al., 2003). Οι συγκεντρώσεις αυτές δεν αντιστοιχούν σε αυτές που απαντώνται σε βιολογικά συστήματα. Τέλος, οι Davies et al. {Davies, 2000 #251 έδειξαν ότι η quercetin σε βιολογικά σημαντικές συγκεντρώσεις μπορεί να μειώνει έως 20% την δραστηριότητα των CK2, AMPK και PI3K.

1.3.7. Ρύθμιση της μεταγραφικής δραστηριότητας

1.3.7.1. Πρόσδεση σε μεταγραφικούς παράγοντες

Η ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων συνήθως γίνεται έμμεσα (μέσω κινασών) και στην πλειοψηφία των περιπτώσεων επηρεάζει την αναλογία Bax/Bcl-2, με τελικό αποτέλεσμα την απόπτωση των κυττάρων. Παραδείγματος χάριν, η EGCG αναστέλλει την ενεργοποίηση των παραγόντων NF κ B και p53 στα κύτταρα προστάτου LNCaP {She, 2001 #253; Brownson, 2002 #252}. Οι epigallocatechin gallate, genistein, quercetin, naringenin, και resveratrol ρυθμίζουν την ενεργότητα του NF κ B, η δράση τους όμως αυτή είναι διαφορετική για κάθε πολυφαινόλη και εξαρτάται από την μελετώμενη κυτταρική σειρά (Katula et al., 2005). Αρκετά φλαβονοειδή επίσης μέσω της κινάσης JNK επάγουν την

έκφραση του c-jun και ρυθμίζουν την μεταγραφική δραστηριότητα των AP-1 και NF-kB, καθορίζοντας τελικά την απόκριση των κυττάρων κατά την φλεγμονή ή κατά την έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία (Chen et al., 2004; Kundu and Surh, 2004). Ακόμη, η arigenin βρέθηκε ότι αναστέλλει την συσσώρευση του NKX3.1, μέσω της CK2 σε κύτταρα προστάτου (Li et al., 2006). Τέλος, η resveratrol καταστέλλει την μεταγωγή σήματος από τον ενεργοποιητή Stat3 σε σειρές μαστού, προστάτου, παγκρέατος και μετασχηματισμένους ινοβλάστες (Kotha et al., 2006).

1.3.7.2. Ρύθμιση της μεταγραφής μέσω άμεσης πρόσδεσης στο DNA

Οι πολυφαινόλες βρέθηκε ότι αλληλεπιδρούν με κυτταρικά συστήματα άμυνας, όπως αυτά που απενεργοποιούν τοξικές ουσίες (ένζυμα φάσης I και II) (Raucy, 2003; Raucy and Allen, 2001). Η δράση αυτή διαμεσολαβείται από την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα AhR (aryl hydrocarbon receptor), χάριν στην δομική τους ομοιότητα με τους πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (PAHs) και την πρόσδεσή του στην αλληλουχία XRE (xenobiotic response element) του υποκινητή των κυτοχρωμάτων (Ciolino et al., 1999; Ciolino and Yeh, 1999a; Ciolino and Yeh, 1999b). Συνεπώς, τακτική πρόσληψη πολυφαινολών μέσω της δίαιτας μπορεί να ευαισθητοποιήσει τα κύτταρα και να τα προετοιμάσει έναντι πιθανόν τοξικών παραγόντων.

Επιπλέον, οι ισοφλαβόνες ενεργοποιούν τους παράγοντες PPAR α και PPAR γ (Shen et al., 2006), ενώ πρόσφατα βρέθηκε ότι και οι ανθοκυανίνες έχουν αυτή την ικανότητα (Xia et al., 2005). Ο PPAR γ ρυθμίζει επίσης την ομοίωση των λιπιδίων και την έκφραση ενζύμων που συμμετέχουν στην κυτταρική άμυνα, όπως η NQO1 (οξειδοαναγωγή των NADPH-κινόνης), η GST (S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης, η UDP-glucuronosyl τρανσφεράση, η θειορεδοξίνη, η iNOS (επαγόμενη συνθάση του NO), η οξυγενάση της αίμης τύπου 1 (HOX-1) και η φερριτίνη, μέσω πρόσδεσης στην αλληλουχία ARE (EpRE, antioxidant/electrophile response element).

1.3.8. Συσχετισμός με γνωσιακές λειτουργίες

Παρατηρήθηκε ότι η χορήγηση συμπληρωμάτων διατροφής από πολυφαινόλες πράσινου τσαγιού και *Gingko biloba* (EGb 761) βελτιώνει τα συμπτώματα άνοιας (Huang et al., 2004; Oken et al., 1998). Χορήγηση επίσης σε γηραιούς αρουραίους ολικού πολυφαινολικού εκχυλίσματος από φράουλες, βατόμουρα και σπανάκι βρέθηκε να αναστέλλει την έναρξη της έκπτωσης των γνωσιακών ικανοτήτων (Rabin et al., 2005), να μειώνουν τα νευρολογικά συμπτώματα (Gemma et al., 2002; Wang et al., 2005) ή ακόμη και να τα αναστρέφει (Cacace and Mazza, 2002). Η ενίσχυση επίσης του σχηματισμού διαλυτού αμυλοειδούς β, μέσω της ρύθμισης της α-σεκρετάσης, θα μπορούσε επίσης να σχετίζεται με τον θετικό ρόλο των πολυφαινολών στην εκβλάστηση των νευριτών, την συναπτογένεση, την αύξηση των νευρικών κυττάρων και επιπλέον την ρύθμιση της ομοίωσης του Ca²⁺, το οποίο υποβοηθά την εγκαθίδρυση της μνήμης. Ενδιαφέρον είναι ότι διαγονιδιακοί επίμυς, οι οποίοι

υπερπράγουν αμυλοειδές β, αποκρίθηκαν εξαιρετικά καλά σε δοκιμασία Υ-λαβυρίνθου, μετά από δίαιτα 8 εβδομάδων που περιείχε 2% w/w πολυφαινόλες μούρων (Joseph et al., 2003). Καθώς τα ιστολογικά ευρήματα δεν έδειξαν διαφοροποιήσεις στην παραγωγή και εναπόθεση του αμυλοειδούς β, θεωρήθηκε ότι η δράση των ανθοκυανινών σχετίζεται με την ρύθμιση της νευρωνικής λειτουργίας. Αντίστοιχη δίαιτα είχε ως αποτέλεσμα την διάσωση των φλοιϊκών νευρώνων και την αύξηση της κινητικής δραστηριότητας μετά από την πρόκληση ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου (Lin et al., 2005) ή την διάσωση των CA1 και CA2 νευρώνων του ιπποκάμπου (Sweeney et al., 2002). Η resveratrol επίσης βρέθηκε να επάγει την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Egr1 (Early Growth Response 1) και να μεταβάλλει την συναπτική πλαστικότητα, ρυθμίζοντας τις διαδικασίες της μάθησης και της μνήμης (Della Ragione et al., 2002).

Ακόμη, τα ginkgolides A, B, C και J προσδέονται και αναστέλλουν ειδικά την δραστηριότητα των ενεργών ετερομερών υποδοχέων γλυκίνης ($\alpha 1/\beta$ GlyR) στους πυραμιδικούς νευρώνες του ιπποκάμπου αρουραίου (Kondratskaya et al., 2004). Οι GlyR ανήκουν στην υπεροικογένεια των διαύλων ιόντων, η οποία συμπεριλαμβάνει τους νικοτινικούς υποδοχείς, τους υποδοχείς γ-αμινοβουτυρικού οξέος GABA_A και τους υποδοχείς 5-υδροξυτρυπταμίνης 5-HT₃. Αρκετά μέλη της οικογένειας των πολυφαινολών, όπως η EGCG, φαίνεται ότι είναι ικανά να προσδέονται στην θέση της βενζοδιαζεπίνης στον υποδοχέα GABA_A, γεγονός που τους προσδίδει ηρεμιστικές ιδιότητες (Vignes et al., 2006). Εντούτοις, οι Fernandez et al. χρησιμοποιώντας διάφορες συμπεριφορικές δοκιμασίες σε συνδυασμό με την ταυτόχρονη χορήγηση πικροτοξίνης και μελέτες πρόσδεσης σε μεμβράνες φλοιϊκών νευρώνων, παρατήρησαν ότι τα φλαβονοειδή eriocitrin, prunin, narirutin, eriodyctiol, quercetin, rutin, naringenin, 2S-hesperidin, 2S-neohesperidin, 2S-hesperetin, 2S-naringin, linarin, diosmetin και diosmin, καθώς και τα γλυκοζυλιωμένα παράγωγά τους εμφανίζουν επιλεκτικές (ασθενείς ή ισχυρές) αγχολυτικές, ηρεμιστικές και μυοχαλαρωτικές ιδιότητες ανεξάρτητα από τους GABA_A (Vignes et al., 2006).

1.3.9. Προστασία από νευροεκφυλιστικές νόσους (Alzheimer και Parkinson)

Οι νευροεκφυλιστικές νόσοι, συμπεριλαμβανομένων των νόσων Alzheimer και Parkinson, οφείλονται σε πληθώρα γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων και χαρακτηρίζονται από συσσώρευση ινιδίων ή «πλακών» μη λειτουργικών πρωτεϊνών, οι οποίες επηρεάζουν την νευρωνική ομοιόσταση και μέσω διαδικασιών που προσομοιάζουν στην φλεγμονή προκαλούν κυτταρικό θάνατο. *Post mortem* ιστολογικές μελέτες εγκεφάλων ασθενών έδειξαν εκτεταμένες οξειδωτικές βλάβες όλων των μορίων που συμμετέχουν στην συγκρότηση και λειτουργία των κυττάρων (Bastianetto et al., 2000; Ramassamy et al., 2000). Οι πολυφαινόλες φαίνεται ότι επηρεάζουν θετικά τόσο την εμφάνιση, όσο και την πορεία των νόσων (Checkoway et al., 2002). Σε μία τριετή μελέτη, η κατανάλωση 3-4 ποτηριών κρασιού ημερησίως βρέθηκε να μειώνει κατά 80% την εμφάνιση άνοιας στους

ηλικιωμένους, σε σχέση με συνομηλίκους τους, οι οποίοι κατανάλωναν λιγότερο ή καθόλου κρασί (Lemeshow et al., 1998). Ανάλογα αποτελέσματα απέδωσε μία πενταετής συγκριτική έρευνα σε 1367 ανθρώπους άνω των 65 ετών, όπου η ελάχιστη κατανάλωση πολυφαινολών ανερχόταν σε 14,4 mg ημερησίως, ανεξαρτήτως διαιτητικής πηγής - φρούτα (35,2%), λαχανικά (19,1%), κρασί (16,9%) ή τσάι (16%) (Compenhes et al., 2000)}. Η προστατευτική δράση των πολυφαινολών σχετίζεται πέραν των αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων και με την δομική ομοιότητά τους με νευροδιαβιβαστές. Η παρουσία κατεχολικού δακτυλίου επιτρέπει την ανταγωνιστική πρόσδεση σε προσυναπτικούς και κυστιδιακούς μεταφορείς ντοπαμινεργικών ουσιών και προστατεύει από την MPTP-προκαλούμενη νευροτοξικότητα (Pan et al., 2003). Μεταξύ επίσης των πολυφαινολών του πράσινου τσαγιού, η EGCG είναι ικανή να αναστέλλει την πρωτεόλυση του προδρόμου μορίου του αμυλοειδούς β (APP) *in vitro* και *in vivo* (Levites et al., 2003). Σε καλλιέργειες νευρώνων η EGCG βρέθηκε επίσης να επάγει την ενεργότητα της α-σεκρετάσης, ενώ η epicatechin ανέστειλε την δημιουργία ινιδίων αμυλοειδούς β (Ono et al., 2003).

Ακόμη, η παροδική απώλεια δραστηριότητας της PKC στα νευρικά κύτταρα, λόγω ισχαιμίας, ή η συστατικά μειωμένη προσδετικότητα του ενεργοποιητή της rhorbol ester στην μέλανα ουσία των ασθενών με Parkinson φαίνεται να αποτρέπονται από μακροχρόνια χορήγηση EGCG: *in vivo* πειράματα σε επίμους έδειξαν ενεργοποίηση της PKCα μετά από MPTP-προκαλούμενη νευροτοξικότητα (Mandel et al., 2005) και ενεργοποίηση των PKCα και ε στον ιππόκαμπο φυσιολογικών ζώων (Levites et al., 2003)- αντίστοιχα η *in vitro* δράση της φλαβονόλης στην επαγωγή της α-σεκρετάσης και τον σχηματισμό του διαλυτού αμυλοειδούς β στα PC12 και σε SH-SY5Y ανθρώπινα κύτταρα νευροβλάστωματος διαμεσολαβείται από την PKC.

1.3.10. Ρύθμιση της δράσεως του πρωτεοσώματος

Ουσίες οι οποίες αναστέλλουν την μετατόπιση του NF-κΒ στον πυρήνα έχει αποδειχθεί ωφέλιμες στην απώλεια μυϊκής μάζας και την καχεξία, που προκαλούνται από καρκίνο. Η μετατόπιση μπορεί να αποτραπεί είτε με άμεση δράση στο μόριο του NF-κΒ, είτε με ρύθμιση της επακόλουθης ενεργοποίησης του PIF (proteolysis-inducing factor) και της έκφρασης της 20S α πρωτεασωμικής υπομονάδος, των ρυθμιστικών πρωτεϊνών MSS1 και p42 της 19S πρωτεασωμικής υπομονάδος και του E2(14k) ενζύμου που σχετίζεται με την ουβικουΐτινη. Φυσικά και συνθετικά ανάλογα των πολυφαινολών που περιέχουν εστερικούς δεσμούς αποτελούν ειδικούς και ισχυρούς μη πεπτιδικούς αναστολείς του πρωτεασώματος. Ειδικότερα, η EGCG ακετυλιώνει μη-αντιστρεπτά την θρεονίνη 1 της καταλυτικής υπομονάδος β5 και προκαλεί αναστολή της δράσης χυμοτρυψίνης της υπομονάδος 20S του πρωτεασώματος. Η ιδιότητα αυτή φαίνεται ότι είναι κοινή για τα περισσότερα ανάλογα της EGCG (Smith et al., 2004). Ακόμη, οι curcumin (50 μM) και resveratrol (30 μM) αναστέλλουν την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών σε μυϊκές ίνες επίμους, ανεξαρτήτως της παρουσίας του παράγοντα PIF, ενώ αναστέλλουν και την δράση του τελευταίου. Εντούτοις, η curcumin

(150-300 mg/kg σωματικού βάρους) δεν επηρεάζει την απώλεια βάρους και μυϊκής μάζας σε επίμεις με όγκους MAC16. Αντιθέτως, η resveratrol (1 mg/kg σωματικού βάρους) ελαττώνει σημαντικά αυτές τις παραμέτρους, ενώ μειώνει παράλληλα την πρόσδεση του NF-κΒ στο DNA και την απόκριση των σχετικών γονιδίων (Wyke et al., 2004). Η resveratrol επίσης βρέθηκε να μειώνει την έκκριση του αμυλοειδούς β, μέσω επαγωγής της αποικοδόμησής του από το πρωτεόσωμα (Marambaud et al., 2005). Αντιθέτως, το σιλιβένιο δεν είναι ικανό να αναστείλει την αποικοδόμηση του παράγοντα IκΒα από τον ίδιο μηχανισμό (Jang and Surh, 2003), ενώ ευνοεί την αποικοδόμηση του HIF-1α, όταν εφαρμόζεται πριν την υποξία, σε πλακώδη καρκινικά κύτταρα γλώσσας και ηπατοκαρκινώματος, μέσω ενίσχυσης της δράσης του πρωτεόσωματος 26S (Zhang et al., 2005). Στην περίπτωση αυτή, η πολυφαινόλη καταστέλλει την μεταγραφική δραστηριότητα του HIF-1α και την έκφραση του VEGF, με απώτερο αποτέλεσμα την μείωση της διεισδυτικής/μεταστατικής ικανότητας των καρκινικών κυττάρων.

1.3.11. Αντιϊική δράση

Χάριν στην ανταγωνιστική τους πρόσδεση οι quercetin, quercetagenin, myricetin και ιδιαίτερα η baicalein αναστέλλουν ισχυρά τις ανάστροφες μεταγραφάσες MLV (Rauscher και Moloney strains) και HIV-1 reverse transcriptases (Ono et al., 1989). Συγκριτικές μελέτες φλαβονοειδών (hydroxyflavones, dihydroxyflavones, polyhydroxyflavones και flavanones) έδειξε ότι η παρουσία μη κορεσμένων ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ των θέσεων 2 και 3 στον πυρονικό δακτύλιο, καθώς και η παρουσία υδροξυλομάδων στις θέσεις 5, 6 και 7 (π.χ. baicalein) αποτελούν απαραίτητη προϋπόθεση για την αναστολή της ανάστροφης μεταγραφάσης (Ono et al., 1990) και κατ' επέκταση της αντιϊικής τους δράσης. Περαιτέρω πειράματα έδειξαν ότι τα φλαβονοειδή παρεμποδίζουν την είσοδο και τον πολλαπλασιασμό των ιών στα μονοκύτταρα, μέσω υποέκφρασης των μεμβρανικών υποδοχέων τους (Nair et al., 2002) ή αναστολής της RNA πολυμεράσης II (Chao and Price, 2001). Ακόμη, ένας μεγάλος αριθμός φλαβονών, φλαβανονών, κατεχινών, χαλκονών και ιδίων φλαβονολών (quercetin, butein and luteolin) είχε ανασταλτική επίδραση στην ενεργότητα της πρωτεάσης του HIV-1 (Xu et al., 2000). Εντούτοις, η πλειοψηφία των αλληλεπιδράσεων πολυφαινολών και ενζύμων έχει μελετηθεί σε απομονωμένα ενζυμικά συστήματα, καθιστώντας αμφίβολη την βιολογική σημασία τους. Σε μία προσπάθεια συγκερασμού παρατηρήσεων σε διαλύματα και *in vivo* δράσης, οι Chao et al. έδειξαν ότι η flavopiridol, ένα συνθετικό φλαβονοειδές, καταστέλλει την ενεργοποίηση του Tat του HIV και τον πολλαπλασιασμό του, αφενός μέσω αδρανοποίησης του P-TEFb και αφετέρου μέσω της Cdk9/cyclin T1 και της φωσφορυλίωσης τόσο της RNA πολυμεράσης II καθώς και της μεγάλης υπομονάδας του επαγόμενου από DRB (5,6-dichloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazole) παράγοντα, παρά μέσω άμεσης δράσης στο μόριο της RNA πολυμεράσης (Chao and Price, 2001).

1.3.12. Άλλες δράσεις

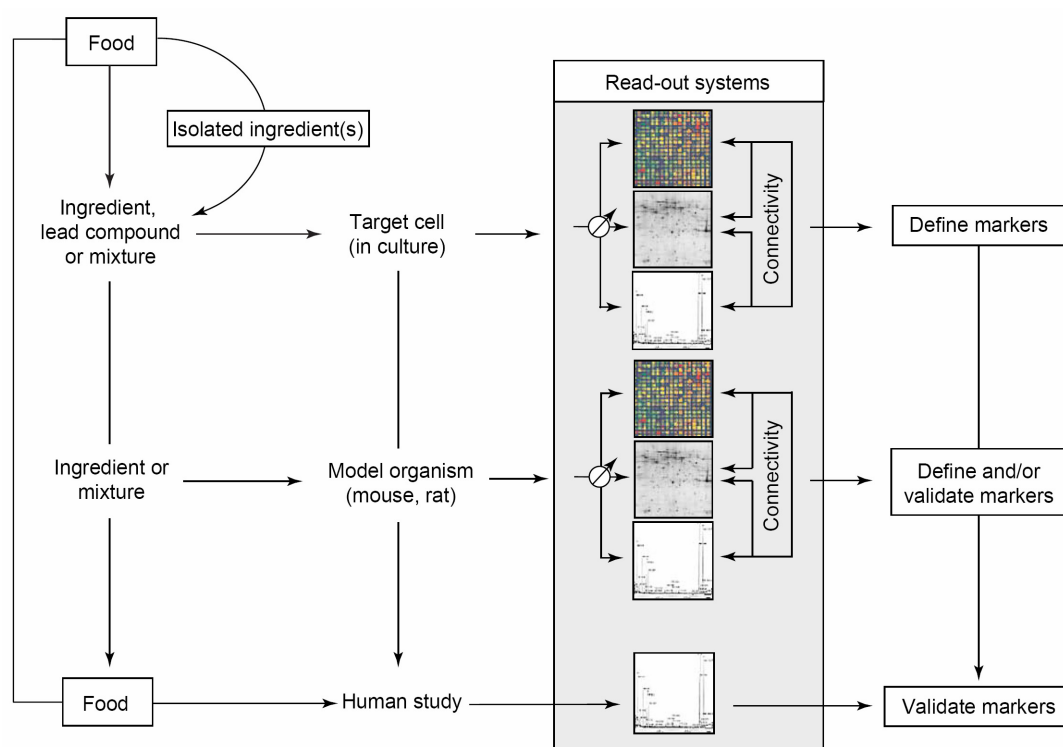
Οι πολυφαινόλες εμφανίζουν και άλλες δράσεις. Έχει δειχθεί ότι μειώνουν την διαπερατότητα και την ευαισθησία των τριχοειδών (Cohen-Boulakia et al., 2000), προλαμβάνουν την παχυσαρκία (Tsuda et al., 2003), προστατεύουν από ηπατική ισχαιμία (Tsuda et al., 1999a), βελτιώνουν την όραση (Canter and Ernst, 2004; Nakaishi et al., 2000) και ρυθμίζουν την δράση της ινσουλίνης (Jankowski et al., 2000).

Τέλος, σε *in vitro* συστήματα έχει βρεθεί ότι προσδέονται σε πληθώρα πρωτεϊνών (de Freitas and Mateus, 2001; Yan and Bennick, 1995), μεταξύ αυτών και η σιαλική αμυλάση. Ιδιαίτερα οι οιτανίνες αναστέλλουν την δραστηριότητά της, γεγονός στο οποίο αποδίδεται η προστατευτική τους δράση ενάντια στην πλάκα και την τερηδόνα (Zhang and Kashket, 1998).

1.4. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Η παρούσα μελέτη εστιάζει στον κυτταροπροστατευτικό ρόλο των πολυφαινολών, την συμβολή τους στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και την σημασία τους στην αντιμετώπιση χρόνιων ασθενειών, όπως ο καρκίνος, η αρτηριοσκλήρωση και οι νευροεκφυλιστικές νόσοι.

Στο παρόν πρωτόκολλο δόθηκε έμφαση στην μελέτη αντιοξειδωτικών πολυφαινολικών ουσιών, δευτερογενών προϊόντων του φυτικού μεταβολισμού, οι οποίες περιέχονται στο κρασί και στο λάδι, με σκοπό την διασαφήνιση του τρόπου δράσης τους. Οι βιολογικές δράσεις των ενώσεων αυτών μελετήθηκαν σε συγκεντρώσεις 10^{-12} - 10^{-6} Μ, συμβατές με αυτές που παρατηρούνται φυσιολογικά στον οργανισμό, μετά από πρόσληψή τους. Λόγω της πολυπλοκότητας του πρωτογενούς υλικού και του ρόλου τους στην διατροφή του ανθρώπου, ελέγξαμε την δράση μεμονωμένων πολυφαινολικών μορίων ή μειγμάτων τους, σε κυτταρικό και συστημικό επίπεδο, όπως περιγράφεται στο ακόλουθο σχήμα (Rist et al., 2006):



προκειμένου να διασαφηνίσουμε

- ❖ την βιοδιαθεσιμότητά τους και
- ❖ την ποιοτική και ποσοτική συμβολή τους
 - στην κυτταρική ομοίωση
 - τον μεταβολισμό και
 - την σηματοδότηση, ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο.

Απώτερος σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η κατανόηση των μοριακών και κυτταρικών μηχανισμών δράσης των πολυφαινολών και η πιθανή αξιοποίησή τους στην θεραπευτική προσέγγιση χρόνιων νόσων.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	49
2.1. Αντιδραστήρια	49
2.2. Πολυφαινόλες	49
2.2.1. Απομόνωση απλών μορίων.....	49
2.2.2. Απομόνωση ολιγομερών.....	49
2.2.3. Κλασμάτωση εκκυλισμάτων σταφυλής	49
2.3. Φασματοσκοπική ανάλυση	51
2.4. Ανάλυση των μεταβολιτών της quercetin με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσεως (HPLC).....	51
2.5. Κυτταροκαλλιέργειες	52
2.5.1. Επίδραση με πολυφαινόλες	52
2.5.2. Επίδραση με H ₂ O ₂	53
2.5.3. Επίδραση με υπεριώδη ακτινοβολία	53
2.6. Μέτρηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού	53
2.6.1. Μέθοδος MTT.....	53
2.6.2. Μέθοδος Sulphorhodamine B (SRB).....	54
2.7. Εκτίμηση της κυτταρικής μετανάστευσης.....	54
2.8. Μέτρηση αποπτωτικών δεικτών.....	55
2.8.1. ApoPercentage Assay.....	55
2.8.2. Χρώση με Annexin V και ιωδιούχο προπίδιο.....	55
2.8.3. Ποσοτικός προσδιορισμός ολιγονουκλεοσωμάτων	55
2.9. Συνεστιακή μικροσκοπία	56
2.9.1. Χρώση νουκλεϊκών οξέων.....	56
2.9.2. Άμεση χρώση του κυτταροσκελετού ακτίνης.....	56
2.9.3. Ανοσοφθορισμός.....	56
2.9.4. Μελέτες ενδοκύττωσης και εξωκύττωσης.....	57
2.9.4.1. Μονιμοποίηση.....	57
2.9.4.2. Αγωγή με νουκλεάσες.....	58
2.9.4.4. Τροποποίηση του πυρηνικού φακέλλου.....	59
2.10. Αλληλεπίδραση της quercetin με DNA	59
2.11. Ηλεκτροφόρηση δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων σε πηκτή αγαρόζης.....	59
2.12. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	60
2.13. Χρήση μικροσυστοιχιών (DNA microarrays).....	61
2.13.1. Γενικές αρχές	61
2.13.2. Σύνθεση ανιχνευτών	61
2.13.3. Σχεδιασμός και επιλογή ανιχνευτών.....	62
2.13.4. Πειραματικό πρωτόκολλο	62
2.13.5. Στατιστική ανάλυση	63
2.14. Μέθοδος προσδιορισμού συγκέντρωσης πρωτεϊνών κατά Bradford	64
2.15. Ανάλυση πρωτεϊνών	64
2.15.1. Εκχύλιση πρωτεϊνών.....	64

2.15.2. Ανοσοκατακρήμνιση.....	65
2.15.3. Υπολογισμός του λόγου πολυμερούς/μονομερούς ακτίνης.....	65
2.15.4. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών (PAGE) - Ανοσοεντύπωμα (Western).....	66
2.16. Αλληλεπίδραση της quercetin με πρωτεΐνες.....	67
2.17. Μέτρηση των παραγόμενων ελευθέρων ριζών οξυγόνου (Reactive oxygen species, ROS)...	67
2.18. Μελέτη του συστήματος NO/NOS	68
2.18.1. Κυτταρομετρία ροής.....	68
2.18.2. Υπολογισμός μεταβολιτών αζώτου σε υπερκείμενα κυτταροκαλλιέργειας	68
2.18.3. Μέτρηση της ενεργότητας της συνθάσης του NO.....	69
2.18.4. Ημιποσοτικός προσδιορισμός της έκφρασης των NOS.....	70
2.19. Μελέτη της πρόσδεσης των πολυφαινολών σε μεμβρανικούς υποδοχείς στεροειδών	70
2.19.1. Θεωρητικό υπόβαθρο.....	70
2.19.2. Μελέτη της πρόσδεσης των πολυφαινολών σε μεμβρανικούς υποδοχείς στεροειδών σε απομονωμένες μεμβράνες	72
2.19.3. Μελέτη της πρόσδεσης των πολυφαινολών σε μεμβρανικούς υποδοχείς στεροειδών σε άθικτα κύτταρα με κυτταρομετρία ροής	73
2.19.4. Μελέτη της πρόσδεσης των πολυφαινολών σε μεμβρανικούς υποδοχείς στεροειδών σε άθικτα κύτταρα με συνεστιακή μικροσκοπία.....	73
2.20. Έλεγχος της in vivo αντικαρκινικής δράσεως των φλαβονοειδών σε πειραματικό μοντέλο αθυμικών επίμυων	74
2.21. Υπολογισμός της αντιοξειδωτικής και οξειδωτικής ικανότητας του ορού	74
2.22. Προσδιορισμός ιντερλευκινών ορού	75

2.1. Αντιδραστήρια

Όλα τα αντιδραστήρια αγοράστηκαν από τις Sigma-Hellas (Athens, Greece) και Tocris (Bristol, UK). Τα θρεπτικά κυττατοκαλλιργειών αγοράστηκαν από την Gibco BRL (Life Technologies, Paisley, UK).

2.2. Πολυφαινόλες

2.2.1. Απομόνωση απλών μορίων

Οι *trans-resveratrol*, *quercetin*, (+)-catechin και (-)-epicatechin απομονώθηκαν από ολικό πολυφαινολικό εκχύλισμα από κόκκινο κρασί με ημι-παρασκευαστική υγρή χρωματογραφία υψηλής πιέσεως (HPLC) σε συνδυασμό με φασματοφωτομετρία. Η καθαρότητά τους (>99%) επιβεβαιώθηκε με αναλυτική HPLC και φασματογραφία μαγνητικού πυρηνικού συντονισμού (NMR) ισχύος 500 MHz. Οι πολυφαινόλες διατηρούνταν σε μορφή σκόνης σε σκούρο δοχείο, στους -20°C, σε υγρό άζωτο.

2.2.2. Απομόνωση ολιγομερών

Τα μονομερή (+)-catechin και (-)-epicatechin εκχυλίσθηκαν από σπόρους σταφυλιών με ακετόνη:H₂O (70:30) και κατόπιν με συνδυασμό χρωματογραφίας-φυγοκέντρισης (Centrifugal Partition Chromatography, CPC) σε σύστημα Εξανίου/Ethyl acetate/Αιθανόλης/H₂O (1:8:2:7, v/v/v/v) (Delaunay et al., 2002). Η οπτική καθαρότητα των ισομερών ελέγχθηκε βάσει specific rotation values σε διάλυμα ακετόνης (c = 1, k = 589 nm). Τα διμερή B2 και B5 απομονώθηκαν από κόκκους κακάο με αιθανόλη/H₂O (70:30) (Vercauteren et al., 2001). Οι ξανθίνες (θεοβρωμίνη και καφεΐνη) απομακρύνθηκαν με CHCl₃. Τα υπολείμματα ύδατος αφαιρέθηκαν με CPC και ανάστροφη παρασκευαστική υγρή χρωματογραφία υψηλής ανάλυσης (Prep-HPLC) σε διαβάθμιση 15-100% μεθανόλης:H₂O. Η ταυτοποίηση των ουσιών έγινε με αναλυτική HPLC και μαγνητικό πυρηνικό συντονισμό (2D NMR long-range heteronuclear ¹³C-¹H spectra) (Balas et al., 1995).

2.2.3. Κλασμάτωση εκχυλισμάτων σταφυλής

Παρασκευάστηκαν τα κάτωθι εκχυλίσματα:

1. **GAT**: υγρό, ολικό πολυφαινολικό εκχύλισμα (120 mg/ml, 92 % ανάλογα κατεχινών, 50 % προκυανιδίνη B2, 15 % ολιγομερείς προκυανιδίνες, 100 ppm resveratrol και 2 % ανθοκυάνες. Ως πρώτη ύλη χρησιμοποιήθηκε πολτός σταφυλιών (παραπροϊόν κατά την οινοπαραγωγή). Μετά από επαναλειμμένη σύνθλιψη, ο πολτός υπέστη εκχύλιση με ένα σύστημα «πράσινου» διαλύτη ("green" extraction solvent), το οποίο περιελάμβανε θρυμματοποίηση με υγρό άζωτο και εκχύλιση σε υγρό CO₂. Η απομόνωση των πολυφαινολών έγινε με χρωματογραφικές μεθόδους και κρυσταλλοποίηση.
2. **OPC40**: στερεό πολυφαινολικό εκχύλισμα, το οποίο προέκυψε μετά από επεξεργασία του GAT, ώστε να αυξηθεί η περιεκτικότητά του σε πολυμερείς ενώσεις.

3. **GSE** (grape seed extract)/OPC80: στερεό πολυφαινολικό εκχύλισμα αντίστοιχο του OPC40, το οποίο παρασκευάστηκε από σπόρους σταφυλιών. Τα διαλυτά στοιχεία απομακρύνθηκαν με στήλες C18 Sep-Pak (Waters, Milford, MA, U.S.A.) (Corder et al., 2001).

4. **Μικροσφαιρίδια (microcapsules)** τα οποία περιείχαν 5% (v/v) εκχύλισμα GAT.

Τα εκχυλίσματα 2 και 3 επαναδιαλύθηκαν σε όξινο αλκοολούχο διάλυμα (20% αιθανόλη, 10 mM HCl) σε συγκέντρωση 120 mg/ml. Περαιτέρω αραιώσεις έγιναν σε θρεπτικό μέσο καλλιέργειας.

Η τεχνολογία που χρησιμοποιήθηκε για τον εγκλεισμό των πολυφαινολών σε μικροσφαιρίδια δεν περιλαμβάνει την χρήση γενετικά τροποποιημένων οργανισμών (GMO-free). Ο εγκλεισμός έγινε με χημικές διαδικασίες, χωρίς την προσθήκη υδατανθράκων και πρωτεϊνών. Οι πολυφαινόλες διαλύθηκαν σε ένα μεικτό σύστημα ελαίου/H₂O και εγκλείστηκαν σε ένα κέλυφος cross-linked πολυμερών, με αποτέλεσμα την δημιουργία ελαστικών μικροσκοπικών σφαιριδίων, διαμέτρου 2μm. Τα μικροσφαιρίδια είναι σταθερά σε τιμές του pH>3,6. Για τον λόγο αυτό είναι ανθεκτικά στην παστερίωση, στην μέθοδο UHT (ultra heat treatment), την ομογενοποίηση ή την ξήρανση. Η κατανάλωσή τους επιτρέπει την ασφαλή διαδρομή τους μέχρι το στομάχι, όπου αποικοδομούνται και απελευθερώνεται το περιεχόμενό τους.

Για τον έλεγχο των εγκλεισμένων πολυφαινολών σε in vitro πρωτόκολλα εργασίας, επεξεργαστήκαμε τα μικροσφαιρίδια με 50 mM HCl (18 h, 4°C) και χρησιμοποιήσαμε κατόπιν την υποκείμενη φάση.

Για τον περαιτέρω έλεγχο επιμέρους πολυφαινολών των παραπάνω κλασμάτων έγινε εκχύλιση θρυμματισμένου πολτού σταφυλιών με ethyl acetate/water 90:10. Το ίζημα σταθεροποιήθηκε με την προσθήκη εξανίου. Ακολούθησε κλασμάτωση με την βοήθεια στηλών Sephadex LH20 και τους ακόλουθους διαλύτες (Corder et al., 2001):

1. Ολικό εκχύλισμα (80 % αιθανόλη)
2. Ολικό εκχύλισμα (90% ακετόνη)
3. Ολικό εκχύλισμα (90% ethyl acetate)
4. Ολικό εκχύλισμα μετά από καθίζηση με εξάνιο (90% ethyl acetate), "polyphenol extract"
5. Ολικό εκχύλισμα μετά από καθίζηση με CO₂ και ethyl acetate
6. Μάρτυρας από στήλη ρητίνης Sephadex
7. Κλάσμα από καθαρισμό με στήλη ρητίνης Sephadex (επικατεχίνη, 90%)
8. Κλάσμα από καθαρισμό με στήλη ρητίνης Sephadex (κατεχίνη και επικατεχίνη)
9. Κλάσμα από καθαρισμό με στήλη ρητίνης Sephadex (προκυανίνες και κατεχίνη, 3:1)
10. Κλάσμα από καθαρισμό με στήλη ρητίνης Sephadex (προκυανίνες, >80%)

Επειδή, όλοι οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν είναι τοξικοί, όλα τα εκχυλίσματα ξηράθηκαν *in vacuo* και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε όξινη αιθανόλη (20% αιθανόλη, 10 mM HCl), σε τελική συγκέντρωση 12 mg/ml. Κατόπιν, οι ουσίες διαλύθηκαν περαιτέρω σε θρεπτικό μέσο καλλιέργειας.

2.3. Φασματοσκοπική ανάλυση

Αρχικώς η quercetin διαλύθηκε σε απόλυτη αιθανόλη ($10^{-2}M$). Στην συνέχεια, οι αραιώσεις έγιναν στον απαιτούμενο διαλύτη. Για τα πειράματα πρόσδεσης χρησιμοποιήθηκαν (α) υπερελικωμένο πλασμιδιακό DNA (φορέας pGL2, Promega, Madison, WI), μετά από καθαρισμό με CsCl, (β) ανθρώπινο γενωμικό DNA, μετά από απομόνωση με στήλες συγγένειας (Qiagen N.V., Venlo, The Netherlands) και (γ) BSA, Fraction V. Οι ουσίες αναμείχθηκαν είτε σε απεσταγμένο H_2O είτε σε διάλυμα φωσφορικών (PBS) και καταγράφηκαν τα αντίστοιχα φάσματα φθορισμού σε φθορισμόμετρο Aminco Bowman Series 2 fluorimeter (Spectronics Instrument Rochester, NY, USA), χρησιμοποιώντας τον κατάλληλο διαλύτη ως μάρτυρα. Τα φάσματα απορρόφησης της quercetin καταγράφηκαν σε φωτόμετρο PerkinElmer Lambda 6, UV/VIS και αναλύθηκαν με το λογισμικό *Spectrum v2.00* (Perkin-Elmer Co, Wellesley, MA). Για την μελέτη της αλληλεπίδρασης της quercetin με κυτταρικές πρωτεΐνες, χρησιμοποιήθηκε ολικό εκκύλισμα κυττάρων HepG2. Τα κύτταρα ομογενοποιήθηκαν με υπερήχους σε διάλυμα 50mM Tris, pH 7.4, παρουσία αναστολέων πρωτεασών (10μg/ml PMSF και 1μg/ml aprotinin). Το υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκε αμέσως μετά την απομάκρυνση των αδιάρρηκτων κυττάρων με φυγοκέντρηση στα 2500g για 15 min.

2.4. Ανάλυση των μεταβολιτών της quercetin με υγρή χρωματογραφία υψηλής πιέσεως (HPLC)

Κύτταρα της σειράς HepG2 καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία 10 mm \varnothing , μέχρι να φθάσουν σε πυκνότητα 80%. Στην συνέχεια ξεπλύθηκαν με διάλυμα PBS και επώαστηκαν με 3 μM quercetin σε PBS για χρονικό διάστημα 5-60 min. Κατόπιν, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν ξανά με PBS και προστέθηκε όξινο διάλυμα μεθανόλης (0,2% οξικό οξύ), στο οποίο εκκυλίσθηκαν οι πολυφαινόλες οι οποίες είχαν «παγιδευθεί» στα κύτταρα. Τα μονιμοποιημένα υπολείμματα των κυττάρων συλλέχθηκαν ξεχωριστά με απόξεση και κατατμήθηκαν με υπερήχους. Τα δύο κλάσματα ξηράθηκαν υπό κενό, επαναδιαλύθηκαν σε 25 μl ακετονιτριλίου και αναλύθηκαν με HPLC-ESI-MS. Χρησιμοποιήθηκε το σύστημα Waters 1525 binary HPLC pump (Waters, Milford, MA) συζευγμένο με DAD-FLD-ESI/MS (Thermo Electron, Waltham, MA). Το σήμα απορρόφησης στο υπεριώδες που καταγράφηκε από την συστοιχία φωτοδιόδων Waters 2996 και τα δεδομένα φθορισμού από τον ανιχνευτή Waters 2475 multi λ fluorescence detector αναλύθηκαν με το λογισμικό Empower. Στην συνέχεια τα μόρια των πολυφαινολών κατευθύνθηκαν σε ένα σύστημα ηλεκροϊοντισμού (electron spray ionization source, ESI) και ακολούθησε φασματομετρία μάζας (Thermo Finnigan LCQ Advantage ion-trap mass spectrometer). Για την ανάλυση HPLC χρησιμοποιήθηκαν στήλες Atlantis RP18 column (5 μm , 250 x 4.6 mm i.d., with a guard column-2 cm). Η έκλυση έγινε στους 30°C, με ταχύτητα 500 $\mu l/min$ και ισοκρατικό σύστημα διαλύτη ddH₂O-ακετυλονιτρίλιο-οξικό οξύ (42/58/2, v/v/v). Τα φάσματα απορροφήσεως στο υπεριώδες καταγράφηκαν στην περιοχή 200-600 nm (βήμα 2nm) και τα φάσματα φθορισμού στην περιοχή 400-600 nm (345 nm_{ex}). Ο φασματογράφος μάζας χρησιμοποιήθηκε σε θετικό και αρνητικό πλαίσιο, η πηγή τάσης ήταν σταθερή στα 4,5kV, η τάση των

τριχοειδών στα -38.0V (+9.0V), ο ουδός των φακών -40V (-10V) και η θερμοκρασία των τριχοειδών 200°C.

2.5. Κυτταροκαλλιέργειες

Χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές του Πίν. 2.1. Καλλιεργήθηκαν σε στείρες συνθήκες, στο απαιτούμενο θρεπτικό μέσο, σε θάλαμο κορεσμένο σε υγρασία, 37°C, 5% CO₂, μέχρι να καλύψουν το 80 % της επιφάνειας των τρυβλίων/φλασκών. Προκειμένου τα κύτταρα να μεταφερθούν σε νέο δοχείο, αφαιρούνταν το υπερκείμενο θρεπτικό, τα κύτταρα ξεπλένονταν με θρεπτικό μέσο χωρίς ορό, επώαζονταν για 5 min (μέχρι να αποκολληθούν) με διάλυμα τρυψίνης/EDTA και συλλέγονταν σε θρεπτικό με ορό. Κατόπιν, το εναιώρημα φυγοκεντρώνταν (x 600 g), το ίζημα (κύτταρα) επαναδιαλυόταν σε φρέσκο θρεπτικό μέσο με ορό και μεταφερόταν σε νέες φλάσκες.

Πίνακας 2.1. Κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

Κυτταρική Σειρά	Περιγραφή-προέλευση	Μέσο καλλιέργειας	Πρόσθετες πληροφορίες
T47D	Απομονώθηκε από πλευρικές μεταστάσεις ductal καρκίνου μαστού (85102201, European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK)	RPMI 1640-10% FBS	Εκφράζουν υποδοχείς στεροειδών
MCF-7	Αδενοκαρκίνωμα μαστού (ATCC, Teddington, UK)	DMEM -10% FBS-10 mg/l κρυσταλλική ινσουλίνη	Εκφράζουν υποδοχείς στεροειδών
LNCaP	Μεταστατικό καρκίνωμα προστάτου (ATCC, Teddington, UK)	RPMI 1640-10% FBS	Εκφράζει υποδοχείς ανδρογόνων
DU-145	Απομονώθηκε από τον εγκέφαλο ασθενούς με μεταστατικό καρκίνο προστάτου (ATCC, Teddington, UK)	RPMI 1640-10% FBS	Δεν εκφράζει υποδοχείς ανδρογόνων
HepG2	Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (ATCC, Teddington, UK)	RPMI 1640-10% FBS	
HaCaT	Αυθορμήτως αθανатоποιημένα κερατινοκύτταρα, ευγενική προσφορά από τον Δρ. Δ. Καρδάση (Ιατρική Σχολή, Πανεπιστημίου Κρήτης)	DMEM-10% FBS	

Οι κυτταρικές σειρές αποθηκεύονται στους -80°C, αφότου τα κύτταρα διαλυθούν σε θρεπτικό μέσο με 40% FBS και 10% DMSO.

2.5.1. Επίδραση με πολυφαινόλες

Προκειμένου να μελετηθεί η δράση μεμονωμένων πολυφαινολών ή εκκυλισμάτων πλουσιών σε αυτές, τα κύτταρα επώασθησαν για το αναφερόμενο χρονικό διάστημα με συγκεντρώσεις αντίστοιχες αυτών που παρατηρούνται φυσιολογικά στον οργανισμό, μετά από πρόσληψή τους μέσω της διατροφής: 10⁻¹²-10⁻⁶ M.

2.5.2. Επίδραση με H₂O₂

Προκειμένου να μελετηθεί η άμεση αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν παρουσία διαβαθμισμένης συγκέντρωσης H₂O₂ για 2 h. Κατόπιν, υπολογίστηκε ο αριθμός των ζώντων κυττάρων με την μέθοδο MTT ή SRB. Οι πολυφαινόλες προστέθηκαν ταυτόχρονα με το H₂O₂. Εναλλακτικά, για να υπολογίσουμε πιθανή ενεργοποίηση των αντιοξειδωτικών διαδικασιών (έμμεση αντιοξειδωτική δράση), προεπωάσαμε τα κύτταρα για 24 h με πολυφαινόλες και στην συνέχεια προστέθηκε H₂O₂.

2.5.3. Επίδραση με υπεριώδη ακτινοβολία

Προκειμένου να μελετηθεί η προστατευτική δράση των πολυφαινολών κατά την έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία, τα κύτταρα εκτέθηκαν σε υπεριώδη ακτινοβολία (30 mJ/cm²), επανατοποθετήθηκαν στον επωαστήρα για 24 h και υπολογίστηκε ο αριθμός των ζώντων κυττάρων με την μέθοδο MTT ή SRB. Οι πολυφαινόλες προστέθηκαν 24 h πριν, ταυτοχρόνως ή αμέσως μετά την έκθεση σε UV.

2.6. Μέτρηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση των πολυφαινολών στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε πλάκες 24 οπών σε πυκνότητα 2×10^4 κύτταρα/οπή. Μία ημέρα αργότερα (πειραματική ημέρα 0), προστέθηκε στα κύτταρα η προς μελέτη ουσία ή ο αντίστοιχος μάρτυρας. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν κατά περίπτωση από 2-6 ημέρες και ακολούθησε ο υπολογισμός του αριθμού των κυττάρων με την μέθοδο MTT ή SRB.

Στην περίπτωση όπου επρόκειτο να μελετηθεί η προστατευτική-αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών ενάντια στο H₂O₂, τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε πλάκες 96 οπών σε πυκνότητα 2×10^4 κύτταρα/οπή, ενώ τροποποιήθηκε αναλόγως ο όγκος των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν κατόπιν.

2.6.1. Μέθοδος MTT

Ο προσδιορισμός του κυτταρικού πολλαπλασιασμού με τη μέθοδο MTT βασίζεται στην ικανότητα των αφυδρογονασών των μιτοχονδρίων ζώντων κυττάρων να μεταβολίζουν το άλας του τετραζολίου [3-(4,5 dimethylthiazol-2yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide]. Οι παραγόμενοι από την αντίδραση μπλε κρύσταλλοι είναι υδροφοβικής φύσεως και διαλύονται σε οργανικό διαλύτη (προπανόλη-1) (Denizot and Lang, 1986; Mosmann, 1983). Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε πλάκες με επίπεδο πυθμένα. Η συγκέντρωσή τους εξαρτάται από τον τύπο της κυτταρικής σειράς, την διάρκεια και τον τύπο του πειράματος. Στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας, αφαιρείται το υπερκείμενο, τα κύτταρα ξεπλένονται και προστίθεται διάλυμα MTT (0,5 mg/ml σε θρεπτικό μέσο χωρίς ορό). Τα κύτταρα τοποθετούνται ξανά στον επωαστήρα για 3-4 h και κατόπιν προστίθεται ίσως όγκος

προπανόλης-1. Το περιεχόμενο κάθε οπής αναδεύεται μέχρι την πλήρη διάλυση των κρυστάλλων και υπολογίζεται η οπτική του πυκνότητα στα 595 nm. Οι αντιδράσεις γίνονται εις τριπλούν.

2.6.2. Μέθοδος Sulphorhodamine B (SRB)

Η μέθοδος Sulphorhodamine B (SRB) βασίζεται στη χρώση μεμβρανικών πρωτεϊνών και παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα εν συγκρίσει με τη μέθοδο MTT. Στη μέθοδο SRB εμφανίζεται γραμμική σχέση μεταξύ της μετρούμενης οπτικής πυκνότητας (OD) και της συγκέντρωσης των κυττάρων, ακόμη και αν ο αριθμός των κυττάρων φθάνει σε υψηλές τιμές, σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της μεθόδου MTT, τα οποία δεν είναι γραμμικά ανάλογα με τον αριθμό των κυττάρων σε υψηλές συγκεντρώσεις κυττάρων. Επιπλέον, επειδή η χρώση με SRB δεν εξαρτάται από τη μιτοχονδριακή ενεργότητα, τα αποτελέσματα δεν επηρεάζονται από την αλληλεπίδραση παραγόντων που χρησιμοποιούνται κατά την πειραματική διαδικασία (π.χ. οι πολυφαινόλες που έχουν χρησιμοποιηθεί στην παρούσα μελέτη εμφανίζουν έντονη αντιοξειδωτική δράση, λόγω της οποίας η φυσιολογική οξειδωση του MTT πιθανόν καταστέλλεται).

Στην περίπτωση που τα κύτταρα καλλιεργούνται σε πλάκες 24 οπών, στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας, αφαιρείται το θρεπτικό υλικό, τα κύτταρα ξεπλένονται με ρυθμιστικό διάλυμα PBS (2ml/οπή) και μονιμοποιούνται με διάλυμα 50% τετραχλωρο-οξικού οξέος (TCA) (0,25ml/οπή) για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν, οι πλάκες φυγοκεντρούνται για 10 min στις 2000rpm, αφαιρείται το υπερκείμενο, τα κύτταρα ξεπλένονται δύο φορές με ddH₂O και ξηραίνονται. Στην συνέχεια, προστίθεται διάλυμα SRB (0,4%, σε 1% οξικό οξύ, 0,5ml/οπή· Molecular Probes Eugene, USA), τα μονιμοποιημένα κύτταρα επώάζονται για 30 min σε RT και ξεπλένονται τέσσερις φορές με διάλυμα 1% οξικού οξέος. Αφού οι πλάκες στεγνώσουν, η δεσμευμένη χρωστική επαναδιαλύεται με την προσθήκη 10mM Tris base, pH 10,5 (0,5ml/θέση) και ανακίνηση για 10 min. Τέλος, υπολογίζεται η απορρόφηση (OD) σε μήκος κύματος 570nm σε φωτόμετρο πλακών (Skehan et al., 1990).

2.7. Εκτίμηση της κυτταρικής μετανάστευσης

Προκειμένου να υπολογισθεί η μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων παρουσία πολυφαινολών, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε πλάκες 6 οπών. Στην συνέχεια, δημιουργήθηκε με τη βοήθεια ενός ακροφυσίου μία λεπτή ασυνέχεια στην στοιβάδα των κυττάρων και προστέθηκε νέο θρεπτικό υλικό που περιείχε τις προς μελέτη ουσίες ή τον μάρτυρα. Με την βοήθεια ανάστροφου μικροσκοπίου () φωτογραφήθηκε η «επούλωση» της ασυνέχειας τις επόμενες 2-24 h και υπολογίσθηκε το εύρος της με την βοήθεια του λογισμικού ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA).

2.8. Μέτρηση αποπτωτικών δεικτών

2.8.1. ApoPercentage Assay

Το ApoPercentage Apoptosis Assay Kit (Biocolor Ltd., Belfast, N. Ireland) βασίζεται στην αναστροφή των λιπιδίων της πλασματικής μεμβράνης κατά την έναρξη της απόπτωσης. Η χρωστική που περιέχεται στο kit εισέρχεται στα κύτταρα κατά την διάρκεια της μετατόπισης (flip-flop) των λιπιδίων. Τα κεχρωσμένα κύτταρα μπορούν να παρατηρηθούν σε ανάστροφο μικροσκόπιο. Για την ποσοτικοποίηση της αποπτώσεως, η προσδεσμένη χρωστική εκλούεται με το παρεχόμενο διάλυμα και μετράται η οπτική απορρόφηση στα 540 nm/620nm σε φωτόμετρο πλακών (Dynatech MicroElisa reader Chantilly, VA).

2.8.2. Χρώση με Annexin V και ιωδιούχο προπίδιο

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται σε δύο χαρακτηριστικά της αποπτώσεως: την έκθεση των ομάδων φωσφατιδυλοσερίνης της πλασματικής μεμβράνης, οι οποίες εμφανίζουν συγγένεια για το μόριο της annexin και την αύξηση της διαπερατότητας των κυττάρων, με αποτέλεσμα να προσροφούν το ιωδιούχο προπίδιο (PI).

Για την ποσοτική μέτρηση της αποπτώσεως και την διαλογή των πρώιμων (θετικά για annexin-FITC) και των όψιμων αποπτωτικών κυττάρων (θετικά για annexin-FITC και PI) χρησιμοποιήθηκε το kit της εταιρείας BD Biosciences Pharmingen (San Diego, CA) και κυτταρομετρία ροής. Στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας, τα κύτταρα συλλέγονται με απόξεση από τα τρυβλία, ξεπλένονται με HBSS και επαναδιαλύονται στο προτεινόμενο διάλυμα σε συγκέντρωση 10^6 /ml. Προστίθενται 2 μg/ml Annexin V-FITC ή/και 0,1 μg/ml ιωδιούχο προπίδιο για 10 λεπτά στο σκοτάδι και κατόπιν τα κύτταρα μετρώνται με κυτταρομετρία ροής.

2.8.3. Ποσοτικός προσδιορισμός ολιγονουκλεοσωμάτων

Στα τελευταία στάδια της αποπτώσεως παρατηρείται ενεργοποίηση των ενδογενών νουκλεασών, οι οποίες κατατέμνουν το γενετικό υλικό του κυττάρου στις θέσεις μεταξύ των νουκλεοσωμάτων. Τα μονο- και ολιγονουκλεοτίδια που παράγονται ανιχνεύονται στο κυτταρόπλασμα. Προκειμένου να υπολογίσουμε ποσοτικά τον υποκυτταρικό πλυθισμό των όψιμων αποπτωτικών κυττάρων, χρησιμοποιήσαμε το kit Cell death detection ELISA Assay (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Βάσει των οδηγιών της εταιρείας, τα προς μελέτη κύτταρα λύονται και το κυτταροπλασματικό κλάσμα μεταφέρεται σε πλάκες 96 οπών επιστρωμένες με στρεπταβιδίνη, όπου επωάζονται για 2 ώρες με βιοτινιλυμένα αντισώματα εναντίον των ιστονών και αντισώματα (σύμπλοκα με υπεροξειδάση, POD) εναντίον των νουκλεοτιδίων. Ακολουθεί προσθήκη του υποστρώματος της υπεροξειδάσης ABTS και φωτομέτρηση των πλακών στα 405nm (με μήκος κύματος αναφοράς 490 nm) σε φωτόμετρο τύπου ELISA (Biorad PR2100, Hercules, CA).

2.9. Συνεστιακή μικροσκοπία

Σε όλες τις περιπτώσεις που απαιτούνταν η χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε καλυπτρίδες επικαλυμμένες με πολυ-L-λυσίνη, εντός πλακών 6 οπών. Κατά περίπτωση, τα κύτταρα επωάζονται με τους προς μελέτη παράγοντες, μονιμοποιούνται ή «βάφονται» και τοποθετούνται ανάποδα σε αντικειμενοφόρους με μία σταγόνα αντι-αποχρωματιστικού παράγοντα Mowiol. Τα κύτταρα παρατηρούνται κατόπιν σε σύστημα συνεστιακού μικροσκοπίου (Leica TCS SP confocal scanner system, Leica Lasertechnik, Heidelberg GmbH, Germany) με τη βοήθεια καταδυτικού φακού (40x ή 63x) και μετά από μονοχρωματική διέγερση με Laser Ar-Kr στα 488 ή 568 nm λαμβάνονται φωτογραφίες στο παράθυρο επιλογής και βήμα 0,5μm.

2.9.1. Χρώση νουκλεϊκών οξέων

Η χρώση των νουκλεϊκών οξέων έγινε με DAPI, η οποία προσδένεται αποκλειστικά στο DNA, ή με PI (ιωδιούχο προπίδιο), το οποίο προσδένεται και στο DNA και στο RNA. Η DAPI προστίθεται σε μονιμοποιημένα κύτταρα στο τέλος οποιασδήποτε πειραματικής διαδικασίας αγωγής ή χρώσης, σε τελική συγκέντρωση 1 μg/ml για 10min. Κατόπιν τα κύτταρα ξεπλένονται με PBS και παρατηρούνται. Αν και η χρήση της DAPI είναι πιο αποτελεσματική, δεν είναι εφικτό να ληφθούν φωτογραφίες στο συνεστιακό μικροσκόπιο. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιήσαμε PI. Τα κύτταρα υφίστανται οποιαδήποτε αγωγή, χρώση ή μονιμοποίηση και ξεπλένονται με PBS. Στην συνέχεια, επωάζονται με 1μl/οπή RnaseA (DNase free, 0,2 mg/ml, Qiagen N.V., Venlo, The Netherlands), προκειμένου να κατατμηστεί το RNA, ξεπλένονται, προστίθεται PI (0,2 μg/ml PI) για 15 min και παρατηρούνται στο μικροσκόπιο.

2.9.2. Άμεση χρώση του κυτταροσκελετού ακτίνης

Η χρώση στηρίζεται στην ιδιότητα της φαλλοιδίνης να προσδένεται ειδικά στα ινίδια της ακτίνης. Για τον λόγο αυτό, διατίθενται στο εμπόριο συνθετικά σύμπλοκα φθορίζοντα μόρια φαλλοιδίνης και χρωμοφόρου. Μετά τις επιδράσεις με τις πολυφαινόλες, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με 3,7% φορμαλδεΐδη (5 min) και κατόπιν με ακετόνη (-20°C, 3 min). Ακολούθησε ενυδάτωση με PBS και επώαση με ροδαμίνη-φαλλοιδίνη, 1u/οπή (Molecular Probes, Leiden, NL) για 40 min σε RT. Τα κύτταρα παρατηρήθηκαν στην συνέχεια σε συνεστιακό μικροσκόπιο.

Στην περίπτωση, όπου εξετάσθηκε η εμπλοκή της κινάσης PI3K, τα κύτταρα προεπώασθησαν με τον αναστολέα της wortmannin (100 nM), για 1 h και μετέπειτα ακολούθησε επίδραση με πολυφαινόλες και χρώση του κυτταροσκελετού.

2.9.3. Ανοσοφθορισμός

Η διαδικασία του ανοσοφθορισμού ακολουθεί τα παρακάτω στάδια (Theodoropoulos et al., 1999):

- Μονιμοποίηση των κυττάρων με 4% φορμαλδεΐδη, 5 min.
- Κάλυψη των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης με διάλυμα ζελατίνης χονδρικού 1%.
- Επώαση με το πρώτο (primary) αντίσωμα, 1-3 h σε RT ή O/N στους 4°C

- Επώαση με το δεύτερο (secondary) αντίσωμα για 1 h σε RT.

Μεταξύ κάθε βήματος γίνονται τρεις πλύσεις με διάλυμα ανοσοφθορισμού (100 mM φωσφορικών αλάτων νατρίου, 0,7% NaCl, 2 mM MgCl₂, 0,5% ζελατίνη χονδρική και 0,2% Triton-X-100, pH 7,3), στο οποίο επίσης διαλύονται και τα αντισώματα. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντισώματα στις αναφερόμενες αραιώσεις:

anti-fibrillarin (1:100, ab5821) και anti-rabbit IgG-Texas Red (1:250, ab6719) από την εταιρεία Abcam (Cambridge, UK), anti-sir2 (1:100· 07-131, Upstate, Dundee, UK) και anti-rabbit-TRITC (1:200· T5268, Sigma-Hellas, Athens, GR). Η LaminB ανιχνεύθηκε με αντίσωμα έναντι συνθετικού πεπτιδίου (Georgatos et al., 1997).

2.9.4. Μελέτες ενδοκύττωσης και εξωκύττωσης

Το σκεπτικό που διέπει τα πειράματα μεταφοράς στηρίζεται στον ανταγωνισμό των ουσιών για την μετακίνησή τους διά μέσω της πλασματικής μεμβράνης, μέσω υποδοχέων που διαμελαβούν την ενδοκύττωση ή την εξωκύττωσή τους, όπως συμβαίνει και στις μελέτες ανταγωνιστικής πρόσδεσης. Στην περίπτωση αυτή δεν χρησιμοποιήθηκαν ραδιοσημασμένα ανάλογα, αλλά αξιοποιήθηκαν οι φθορίζουσες ιδιότητες της φλαβονόλης quercetin. Όπως δείξαμε με φασματοφωτομετρικές μεθόδους (3.4.3.1.1.), η φλαβονόλη εμφανίζει φθορίζουσες ιδιότητες, μετά την ενδοκύττωσή της και την αλληλεπίδραση με στοιχεία του κυττάρου. Κατά συνέπεια, στις μελέτες ενδοκύττωσης, η παρουσία ανανταγωνιστών έχει ως αποτέλεσμα την μείωση του ενδοκυττάρου φθορισμού, ενώ στις μελέτες εξωκύττωσης την αύξηση του ενδοκυττάρου φθορισμού, όπως έχει περιγραφεί για την ροδαμίνη 123 (Cho et al., 2000).

Για την μελέτη των υποδοχέων που εμπλέκονται στην ενδοκύττωση της quercetin, τα κύτταρα επώαστηκαν ταυτόχρονα με την φλαβονόλη (3 μM) και 100πλάσια συγκέντρωση χολικών οξέων, πολυφαινολών ή σακχάρων για διάστημα 2-30 min.

Για την μελέτη των υποδοχέων που εμπλέκονται στην εξωκύττωση της quercetin, τα κύτταρα επώαστηκαν καταρχήν για 30 min με την φλαβονόλη (3 μM) και κατόπιν προστέθηκε 100πλάσια συγκέντρωση από υποστρώματα-αναστολείς των πρωτεϊνών ABC (Εικ. 2.1.).

Μετά τις επιδράσεις, όπως περιγράφεται κατά περίπτωση, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με 4% formaldehyde, για 5 min. Ακολούθως, οι καλυπτρίδες μεταφέρθηκαν ανάστροφα σε αντικειμενοφόρους με αντι-αποχρωματιστικό μέσο Mowiol. Τα δείγματα παρατηρήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο Leica TCS SP (Heidelberg GmbH, Germany), με τη βοήθεια καταδυτικού φακού 40x ή 63x. Περαιτέρω επεξεργασία των εικόνων έγινε με το λογισμικό Adobe Photoshop® 7.0.

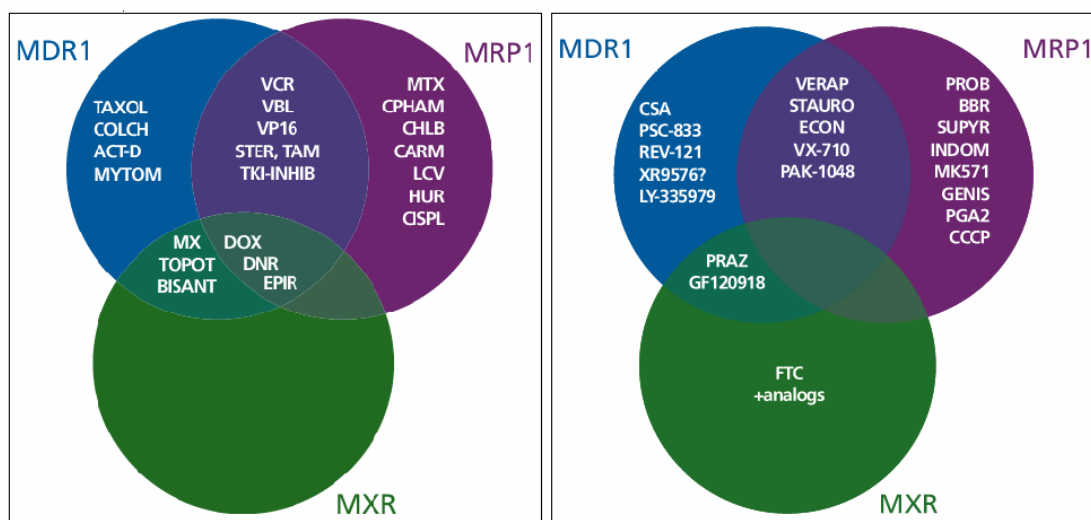
2.9.4.1. Μονιμοποίηση

Η μονιμοποίηση των κυττάρων έχει ως στόχο την διατήρηση της δομής των κυττάρων ή των ιστών, κατά την χρώση τους, διευκολύνει την πρόσβαση και πρόσδεση των μορίων-χρωστικών, όπως επίσης βοηθά και την διατήρηση των συμπλόκων που προκύπτουν.

Για να διαπιστώσουμε την φύση πρόσδεσης της quercetin χρησιμοποιήσαμε εναλλακτικές τεχνικές. Μεταξύ αυτών η φορμαλδεΐδη (1-5 %, 5 min) ήταν η πιο αποτελεσματική στην διατήρηση του

σήματος, μετά την πρόσληψη της φλαβονόλης από ζωντανά κύτταρα. Πολικοί διαλύτες, όπως οι αλκοόλες ή η ακετόνη, οι οποίοι βοηθούν στην έκλυση των διαλυτών πρωτεϊνών και των λιπιδίων είχαν ως αποτέλεσμα την απόσβεση του φθορισμού. Σε συνδυασμό με την φορμαλδεΐδη, προκάλεσαν διάχυση του σήματος. Στην περίπτωση που ακολούθησε άμεση χρώση του κυτταροσκελετού με ροδαμίνη-φαλλοϊδίνη, η ακετόνη χρησιμοποιήθηκε αναγκαστικά.

Ελέγξαμε ακόμη κατά πόσον η quercetin είναι ικανή να εισέρχεται σε μονιμοποιημένα κύτταρα. Η χρήση των μονιμοποιητικών οδηγεί στην αύξηση της διαπερατότητας των κυττάρων καθώς δημιουργεί οπές στις μεμβράνες τους. Η φορμαλδεΐδη δεν είναι εξίσου αποτελεσματική με τους πολικούς διαλύτες, γι'αυτό χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια απορρυπαντικό (0,05-2 % Triton-X-100). Επιπλέον, η πρόσδεση της quercetin σε μονιμοποιημένα κύτταρα ελέγχθηκε παρουσία κυμαινόμενης συγκέντρωσης αλάτων (10-100 mM Tris, pH 7.4).



Εικόνα 2.1. Προκειμένου να μελετηθεί η συμμετοχή των αντλιών της οικογένειας ABC στην μεταφορά ουσιών, χρησιμοποιούνται υποστρώματά τους (αριστερά) ή τροποποιητές τους (δεξιά) (TAXOL: paclitaxel, COLCH: κολχικίνη, ACT-D: ακτινομυκίνη D, MYTOM: μυτομυκίνη, VCR: βινκριστίνη, VBL: βινπλαστίνη, VP16: ετοποσίδη, STER: στεροειδή, TAM: ταμοξιφαίνη, TKI-INHIB: αναστολείς κινασών τυροσίνης, MTX: μεθορεξάτη, CPHAM: κυκλοφωσφαμίδη, CHLB: chlorambucil, CARM: carmustine, LCV: λευκοβορίνη, HUR: υδροξουρία, CIPL: σισπλατίνη, MX: μιτοξανθρόνη, TOPO: toptecan, BISANT: βισανθρόνη, DOX: δοξορουβικίνη, DNR: δαουνορουβικίνη, EPIR: επιρουβικίνη, CSA: κυκλοσπορίνη A, VERAP: βεραπαμίλη, STAURO: σταυροσπορίνη, ECON: εκοναζόλη, PROB: probenecide, BBR: benzbromarone, SUPYR: σουλφιπυραζόνη, INDOM: ινδομεθακίνη, GENIS: genistein, PGA2: προσταγλαδίνη A2, CCCP: chlorocarbonyl cyanide phenylhydrazone, PRAZ: πραζοσίνη, FTC: fumitremorgin C).

2.9.4.2. Αγωγή με νουκλεάσες

Παρατηρήσαμε ότι η quercetin συσσωρεύεται στον πυρήνα των κυττάρων, ενώ υπάρχουν εκτεταμένες αναφορές στην πρόσδεσή της σε νουκλεϊκά οξέα, ιδίως DNA. Ελέγξαμε αν το φθορίζων σήμα διατηρείται στην περίπτωση αγωγής με νουκλεάσες. Η διαδικασία αυτή έγινε σε μονιμοποιημένα κύτταρα, τα οποία είτε είχαν ενδοκυττώσει την φλαβονόλη, είτε επώαστηκαν κατόπιν με αυτή.

Για την απομάκρυνση των ριβονουκλεϊκών οξέων χρησιμοποιήθηκε 1μl/οπή RnaseA (DNase free, 0,2 mg/ml, Qiagen N.V., Venlo, The Netherlands) σε ddH₂O, ενώ για την απομάκρυνση των δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων 1 μl/οπή DNase I amplification grade (Invitrogen™, Carlsbad, CA) στο συνοδευτικό διάλυμα αντίδρασης. Οι αντιδράσεις έγιναν σε RT και διήρκησαν 20 min. Κατόπιν τα κύτταρα εκπλύθηκαν τρεις με PBS και ακολούθησε παρατήρηση σε συνεστιακό μικροσκόπιο ή επώαση με quercetin.

2.9.4.4. Τροποποίηση του πυρηνικού φακέλλου

Προκειμένου να ελέγξουμε την συμμετοχή του συμπλόκου των πυρηνικών πόρων (NPCs) στην πυρηνική μεταφορά της quercetin, τα κύτταρα επώαστηκαν με paclitaxel 0,9 nM (για 24h στην περίπτωση των T47D ή 48 h στην περίπτωση των HepG2). Η ταξάνη προσδένεται στους μικροσωληνίσκους και παρεμποδίζει τον πολυμερισμό τους και την κυτταρική διαίρεση, με αποτέλεσμα την δημιουργία πολυλοβωτών πυρήνων, την έκτοπη κατανομή των συμπλόκων πυρηνικών πόρων του πυρηνικού φακέλλου και την αναστολή της λειτουργίας τους (Theodoropoulos et al., 1999).

2.10. Αλληλεπίδραση της quercetin με DNA

Η quercetin αναμείχθηκε σε διάφορες ποσότητες (ξεκινώντας από την ελάχιστη ισομοριακή αναλογία με νουλεππίδια) με γραμμικό DNA (100 bp DNA ladder, Invitrogen, Carlsbad, CA) και επώασθηκε σε RT για 30 min. Ποσότητα του κάθε μείγματος, η οποία περιείχε 1 μg DNA, διαχωρίστηκε σε πηκτή αγαρόζης 2 %, σε διάλυμα TBE, απουσία EtBr. Οι πηκτές φωτογραφήθηκαν στο υπεριώδες πριν και μετά την επώασή τους σε διάλυμα EtBr (2,5 mg/l).

2.11. Ηλεκτροφόρηση δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων σε πηκτή αγαρόζης

Τα νουκλεϊκά οξέα διαχωρίζονται ανάλογα με το μοριακό τους βάρος σε πηκτή αγαρόζης (2% αγαρόζη, 2,5 mg/l EtBr), σε διάλυμα TBE (44 mM Tris-base, 44 mM βορικό οξύ, 1 mM EDTA, pH 8), υπό τάση 100 V (250 mA) σε συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης (Horizon® 11-14, Life Technologies, Gibco BRL, Goettingen, Germany). Για τον ακριβή υπολογισμό του μοριακού τους βάρους χρησιμοποιούνται εμπορικοί μάρτυρες (100 bp DNA ladder, Invitrogen, Carlsbad, CA). Για την φόρτωση των δειγμάτων στην πηκτή, στα δείγματα προστίθεται διάλυμα (6x: 10mM Tris, pH 7.6, 0,15% orange G, 60% γλυκερόλη, 60mM EDTA). Στο τέλος της ηλεκτροφόρησης οι πηκτές εκτίθενται στο υπεριώδες και φωτογραφίζονται.

2.12. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Για τον ημιποσοτικό υπολογισμό της έκφρασης των γονιδίων του Πίνακα 2.2. χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction). Τα κύτταρα επωάστηκαν με τις προς μελέτη ουσίες για διάφορα χρονικά διαστήματα και συλλέχθηκε το ολικό RNA μέσω διαλυτοποίησής τους σε TRIzol® (Invitrogen, Carisbad CA, USA). Η εκκύλιση του RNA έγινε βάσει του πρωτοκόλλου του κατασκευαστή με μία επιπλέον έκπλυση με 70% αιθανόλη και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε συγκέντρωση 1μg/μl. Η καθαρότητα του RNA ελέγχθηκε με φωτομέτρηση στα 260 nm/280 nm (απαιτούμενος λόγος 1,8-2). Στην συνέχεια συντέθηκε το συμπληρωματικό DNA (cDNA): i) 1 μg ολικού RNA επωάστηκε με DNase I amplification grade (Invitrogen™, Carisbad, CA) για 20 min στους 25°C, προκειμένου να απομακρυνθούν τα υπολείμματα DNA, και το ένζυμο απενεργοποιήθηκε για 10 min στους 65°C, ii) ακολούθησε η προσθήκη SuperScript™ II RNA H⁺ reverse transcriptase (Invitrogen™, Carisbad, CA), 5μM poly d(T) (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) και 1μl αναστολέα ριβονουκλεασών rRNasin® (Promega, Madison, WI), σε συνολικό όγκο 20 μl, για 1 h στους 42°C και η αντίδραση τερματίστηκε με επώαση για 5 min στους 95°C. Χρησιμοποιώντας ως μήτρα το cDNA, ελέγξαμε τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων με multiplex PCR: 1 μl από το προϊόν cDNA product (~0.05 μg) επωάστηκε με 100 nM ικνηθετών DNA κατά περίπτωση (DNA primers), 200μM dNTP (Invitrogen™, Carisbad, CA) και 1 u DyNAzyme II polymerase (Finzyme, Ozyme, France), σε συνολικό όγκο 25μl. Ειδικά στην περίπτωση του γονιδίου της iNOS, η συγκέντρωση των ικνηθετών ακτίνης ήταν 250 nM. Η αντίδραση περιλάμβανε ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης (95°C, 5 min) και κατόπιν 35 κύκλους συνεχούς αποδιάταξης (95°C, 30 sec)-πρόσδεσης (βλ. Πίν. 2.2 °C, 30 sec)-επιμήκυνσης (74°C, 30 sec). Το προϊόν ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αгарόζης 3% και υπολογίσθηκε η ένταση των ζωνών που αντιστοιχούσαν σε κάθε γονίδιο σε σχέση με αυτό της ακτίνης, με τη βοήθεια του λογισμικού Molecular Analyst (Biorad, Hercules, CA).

Πίνακας 2.2. Κατάλογος των ειδικών ικνηθετών (primers), οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν για τον ημιποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης των ακόλουθων γονιδίων

eNOS, 58,3 °C	forward	AAT CCT GTA TGG CTC CGA GA
	reverse	GGG ACA CCA CGT CAT ACT CA
iNOS, 59,1 °C	forward	ACA GGA GGG GTT AAA GCT GC
	reverse	TTG TCT CCA AGG GAC CAG G
AhR, 50,5 °C	forward	GCT ACC ACA TCC ACT CTA AGC AAG G
	reverse	TGG ATT GTA CTG CAT CTG ACC CAC G
ARNT, 56,3 °C	forward	CAT CTG ATG ACG ACT GGG
	reverse	AAC CAA TCT GGA TGC CTC
CYP1A1, 57,3 °C	forward	CTC TTA GGT GCT TGA GAG CCC
	reverse	CAT CAG CAT CTA TGT GGC CC
CYP1A2, 55,3 °C	forward	GAA GTG TAT CGG TGA GAC CA
	reverse	GTA GAC AGA GTC TAG GCC TCA
CYP1B1, 54,9 °C	forward	CTT AGC CTT TAC CTG TGA AGT G
	reverse	TGT TGT TTC CCC AGA ATG
Actin, 61 °C	forward	GGT GGC TTT TAG GAT GGC AAG
	reverse	ACT GGA ACG GTG AAG GTG ACA

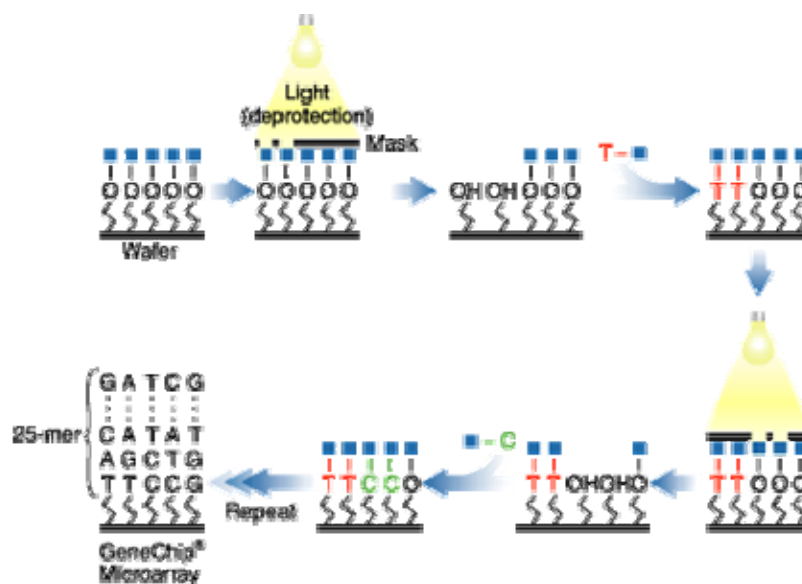
2.13. Χρήση μικροσυστοιχιών (DNA microarrays)

2.13.1. Γενικές αρχές

Η τεχνολογία των μικροσυστοιχιών (GeneChips/microarrays) συνίσταται στην χρήση μικρών αλληλουχιών DNA, γνωστών ως ανιχνευτών (probes), οι οποίες συντίθενται χημικά σε συγκεκριμένες θέσεις πάνω σε μία επιφάνεια χαλαζία. Η ακριβής θέση του κάθε ανιχνευτή ονομάζεται feature και καταλαμβάνει περίπου 5 μm, ενώ κάθε μικροσυστοιχία μπορεί να περιλαμβάνει έως μερικά εκατομμύρια τέτοιων θέσεων. Ο καθαρισμός και η σήμανση νουκλεϊκών οξέων από πειραματικά/βιολογικά δείγματα και η υβριδοποίησή τους στην επιφάνεια της μικροσυστοιχίας, επιτρέπει την περαιτέρω εφαρμογή πειραματικών πρωτοκόλλων που αφορούν την έκφραση γονιδίων ή εξονίων, σε όλο το φάσμα του γενετικού υλικού, την ανακάλυψη νέων μεταγράφων, την γονοτυπική ανάλυση και επαναλληλούχιση (resequencing). Σε συνδυασμό με τεχνικές ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης, η τεχνολογία των μικροσυστοιχιών επιτρέπει την ταυτοποίηση μεταγραφικών παραγόντων, καθώς και των θέσεων προσδέσεώς τους στο DNA.

2.13.2. Σύνθεση ανιχνευτών

Η κατασκευή μιας μικροσυστοιχίας στηρίζεται σε μία εφεύρεση της Silicon Valley, η οποία συνδυάζει τεχνικές κατασκευής ημιαγωγών, χημεία στερεούς φάσεως, αναλυτική χημεία, μοριακή βιολογία και ρομποτική, με αποτέλεσμα την φωτολιθογραφική σύνθεση ολιγονουκλεοτιδίων σε μία υάλινη επιφάνεια. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.2., η επιφάνεια του χαλαζία καλύπτεται με μία φωτοευαίσθητη ουσία και κατόπιν με ένα διάλυμα νουκλεοτιδίων. Μέσω συνεχών κύκλων αποπροστασίας και προστασίας «σημειακών» θέσεων, επιτυγχάνεται η αυστηρά ελεγχόμενη σύνθεση αλληλουχιών μήκους περίπου 25 νουκλεοτιδίων.



Εικόνα 2.2. Για την κατασκευή των μικροσυστοιχιών (GeneChip® Arrays) αξιοποιούνται τεχνικές φωτολιθογραφίας και χημείας.

2.13.3. Σχεδιασμός και επιλογή ανιχνευτών

Οι ανιχνευτές σχεδιάζονται με βάση την συμπληρωματικότητα της αλληλουχίας τους με το περιεχόμενο RNA ή DNA ενός δείγματος. Η επιλογή των 25μερών ανιχνευτών επιτρέπει την διάκριση αλληλουχιών με αρκετά συγγενή σύσταση (αρκετά σημαντική σε πρωτόκολλα γενωτυπικής ανάλυσης), καθώς λόγω του μήκους τους εμφανίζει την μέγιστη ειδικότητα και ευαισθησία, σε σχέση με τον θόρυβο. Ακόμη, σε κάθε γονίδιο αντιστοιχεί και ένας «mismatch» ανιχνευτής, ο οποίος χρησιμεύει ως εσωτερικός μάρτυρας, ώστε να υπολογίζεται και να αφαιρείται ο πλεονάζων, μη ειδικός, φθορισμός. Επιπλέον, η αυξημένη χωρητικότητα της μικροσυστοιχίας, επιτρέπει την χρήση πολλαπλών ανιχνευτών για τον έλεγχο της έκφρασης του αυτού γονιδίου· συνήθως χρησιμοποιούνται 22-40 ανιχνευτές ανά γονίδιο.

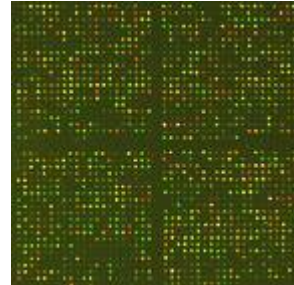
2.13.4. Πειραματικό πρωτόκολλο

Ο ποιοτικός και ποσοτικός έλεγχος της έκφρασης ενός γονιδίου με την βοήθεια μικροσυστοιχειών ανιχνευτών στηρίζεται στην υβριδοποίηση ενός δείγματος στην επιφάνεια του GeneChip. Στην συγκεκριμένη μελέτη κύτταρα της σειράς HepG2 επώασθησαν με 3μM quercetin ή 0.3 % αιθανόλη (μάρτυρας) σε θρεπτικό υλικό RPMI-10% FBS, για χρόνο 0-8 ώρες. Στο τέλος της επώασης, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο, τα κύτταρα συλλέχθηκαν και ξεπλύθηκαν γρήγορα με φυσιολογικό διάλυμα HBSS και συλλέχθηκαν σε αποδιατακτικό διάλυμα εκκύλισης. Η απομόνωση του συνολικού κλάσματος RNA έγινε με στήλες NucleoSpin® RNA II (Macherey-Nagel, Düren, Germany), σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας. Η ποιότητα του RNA ελέγχθηκε με φασματοφωτομετρικές μεθόδους με τον αναλυτή Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Palo Alto, CA) και ηλεκτροφόρηση αγαρόζης, σε σχέση με εμπορικούς μάρτυρες. Η σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA), με μήτρα το mRNA, και η σήμανσή τους με φθορίζουσες ουσίες, όπως και η υβριδοποίηση στις μικροσυστοιχείες έγινες σύμφωνα με τα πειραματικά πρωτόκολλα της εταιρείας Affymetrix (Santa Clara, CA, USA).

Χρησιμοποιήθηκαν 5 μg συνολικού RNA ως μήτρα και το αντίστοιχο cDNA υβριδοποιήθηκε σε «pan-genomic U133 Plus 2.0 GeneChip oligonucleotide Arrays» (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Οι μικροσυστοιχείες U133 Plus 2.0 περιέχουν 54675 ζεύγη ανιχνευτών, τα οποία αντιστοιχούν σε 39000 περίπου μοναδικά γονίδια του ανθρωπίνου γονιδιώματος. Η ειδική πρόσδεση των αλληλουχιών cDNA στην επιφάνεια του array και η μέτρηση του φθορισμού σε κάθε feature επέτρεψε την δημιουργία μιας πρωτογενούς «εικόνας», όπως φαίνεται ενδεικτικά στην Εικόνα 2.3.. Η περαιτέρω ανάλυση αυτής της εικόνας, με την βοήθεια του λογισμικού GeneChip Operating Software 1.1 (GCOS, Affymetrix), οδήγησε στον υπολογισμό των πρωτογενών τιμών ή αλλιώς του «σήματος» (signal) για κάθε ανιχνευτή. Στην συνέχεια, το σήμα κανονικοποιήθηκε με βάση μία αυθαίρετη κλίμακα από το 1 έως το 100 με βάση την επιλογή “global scaling” του λογισμικού GCOS. Η ποσοτική μεταβολή στην έκφραση των γονιδίων για κάθε χρονική στιγμή, υπολογίστηκε με βάση τον λόγο των κανονικοποιημένων σημάτων. Τα γονίδια των οποίων η έκφραση αυξήθηκε ή μεταβλήθηκε σημαντικά ($p \leq 0,05$) χαρακτηρίστηκαν αντιστοίχως ως D και I.

Η υβριδοποίηση και η πρωτογενής ανάλυση των δειγμάτων έγινε από την Ομάδα Laboratoire de transcriptome et de protéome (Institut de Recherche en Biothérapie, Hôpital Saint-Eloi, Université Montpellier I, Research Institute for Biotherapy, Montpellier University Hospital, http://irb.chu-montpellier.fr/en/laboratories_microarray.html).

Εικόνα 2.3. Τυπική εικόνα ενός GeneChip® Array, μετά την υβριδοποίηση. Το επίπεδο της έκφρασης ενός μεταγράφου απεικονίζεται με πράσινο (μειωμένη) ή κόκκινο (αυξημένη) χρώμα.



2.13.5. Στατιστική ανάλυση

Η ανάλυση των γονιδίων των οποίων η έκφραση μεταβλήθηκε σημαντικά έγινε με Ανάλυση Ανταπόκρισης (COrrispondance Analysis, COA) και τα λογισμικά MeV (<http://mev.tm4.org>, (Saeed et al., 2003) και Ade4 (<http://biomserv.univ-lyon1.fr/ADE-4.html>, (Thioulouse et al., 1997)). Η ανάλυση των γονιδίων σύμφωνα με την συμμετοχή τους σε οδούς σηματοδότησης ή κυτταρικές και φυσιολογικές λειτουργίες έγινε με την βοήθεια του συστήματος ταξινόμησης Panther Classification system (Applied Biosystems, <http://www.pantherdb.org>).

Η μέθοδος COA εμφανίζει πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλες στατιστικές μεθόδους (Fellenberg et al., 2001; Wouters et al., 2003), διότι εξυπηρετεί την ποιοτική ανάλυση δειγμάτων μέσω του υπολογισμού της Αδράνειας (Inertia) μεταξύ των δειγμάτων, όσο και των επιμέρους γονιδίων. Ο υπολογισμός της Inertia εξαντλείται σε έναν αριθμό αξόνων (dimension reduction technique), ανάλογα με την πολυπλοκότητα του πειραματικού υλικού και επιτρέπει την ταυτόχρονη δισδιάστατη ή τρισδιάστατη απεικόνιση των γονιδίων και των δειγμάτων. Γονίδια ή δείγματα, τα οποία τοποθετούνται κοντά, εμφανίζουν κοινό πρότυπο γονιδιακής έκφρασης, ενώ γονίδια και δείγματα τα οποία απεικονίζονται μακριά, χαρακτηρίζονται από καταστολή της έκφρασής τους υπό τις αντίστοιχες πειραματικές συνθήκες. Όσο μακρύτερα τοποθετούνται τα γονίδια από την αρχή των αξόνων, τόσο πιο έντονος είναι ο συσχετισμός τους. Το γεγονός αυτό βοηθά στην ομαδοποίηση των δειγμάτων, παρά το ύψος του απόλυτου σήματος, χάριν στην παρουσία κοινών χαρακτηριστικών, αλλά και στην αποκάλυψη των τάσεων (trends) που οδηγούν σε διαφορετική γονιδιακή έκφραση. Στην παρούσα μελέτη, η χρήση της COA επιτρέπει την εκτίμηση της συμβολής δύο ανεξάρτητων παραμέτρων, του χρόνου και της προσθήκης της φλαβονόλης quercetin, στην ποιοτική και ποσοτική έκφραση των γονιδίων.

Η Ανάλυση Ανταποκρίσεως στηρίζεται στην «αποσύνθεση» μιας μήτρας τιμών X^2 , οι οποίες προκύπτουν από την ανάλυση των στηλών και των γραμμών ενός πίνακα δεδομένων (Culhane et al., 2002). Έστω N ένας πίνακας δεδομένων, όπου n το κανονικοποιημένο σήμα για κάθε γονίδιο, i ο αριθμός των γονιδίων και j ο αριθμός των δειγμάτων, κάθε στοιχείο του πίνακα ορίζεται ως n_{ij} .

Το άθροισμα των στοιχείων των σειρών και των στηλών αντιστοιχεί σε n_{i+} και n_{+j} , ενώ το σύνολο όλων των στοιχείων σε n_{++} .

Η σχετική συμβολή κάθε γονιδίου i , κάθε δείγματος j και κάθε στοιχείου n στην διαμόρφωση των αποτελεσμάτων αντιστοιχεί στις τιμές r_i , c_j και p_{ij} , σύμφωνα με τους τύπους: $r_i = n_{i+}/n_{++}$ (1), $c_j = n_{+j}/n_{++}$ (2) και $p_{ij} = n_{ij}/n_{++}$ (3). Βάσει αυτών υπολογίζονται δύο φορείς R και C , μήκους I και J και μια μήτρα διαστάσεων $I \times J$. Τα δεδομένα μετασχηματίζονται στην συνέχεια σε έναν πίνακα τιμών χ^2 ,

που προκύπτουν από τον τύπο:
$$x_{ij} = \frac{p_{ij} - r_i c_j}{\sqrt{r_i c_j}} \quad (4).$$

Η COA συνίσταται στην «αποσύνθεση» των τιμών χ^2 κατά μήκος K φορέων eigen, όπου το K αντιστοιχεί στο $\min(I - 1, J - 1)$. Οι φορείς τοποθετούνται ανάλογα με τις τιμές eigen, το σύνολο των οποίων ισούται με το άθροισμα του συνολικού χ^2 .

Ο υπολογισμός των φορέων eigen στηρίζεται σε μία δεύτερη μήτρα B (Doledec and Chessel, 1987), σύμφωνα με τον τύπο: $B = D_c^{1/2} \chi D_r \chi^t D_c^{1/2}$ (5). Οι τιμές $D_c^{1/2}$ αντιστοιχούν σε μία μήτρα ανάλογη της $J \times J$, που αποτελείται από τετραγωνικές ρίζες των στοιχείων C κατά μήκος της διαγωνίου και μηδενίζεται στα υπόλοιπα σημεία. Ανάλογα, η B είναι μία μήτρα $J \times J$, η οποία προκύπτει από τον φορέα R και παράγει J τιμές eigen κατά μήκος της διαγωνίου, εκ των οποίων τουλάχιστον μία πρέπει να είναι μηδενική, και φορείς eigen. Η ανάλυση με COA μπορεί να παρασταθεί γραφικά με την απεικόνιση των συντεταγμένων των γονιδίων και των δειγμάτων κατά μήκος του δευτέρου και τρίτου άξονα eigen.

2.14. Μέθοδος προσδιορισμού συγκέντρωσης πρωτεϊνών κατά Bradford

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών σε ένα διάλυμα με τη μέθοδο κατά Bradford (Bradford, 1976) βασίζεται στην αντίδραση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 με τις πρωτονιωμένες αμινομάδες των αμινοξέων της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, με αποτέλεσμα την μετατροπή της χρωστικής από κόκκινη σε μπλε και μέγιστο απορροφήσεως τα 595nm. Η ποσοτική εκτίμηση των πρωτεϊνών κάθε δείγματος γίνεται με τη χρήση πρότυπης καμπύλης BSA 5-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Το προς εκτίμηση δείγμα (160 μl) τοποθετείται σε πλάκα 96 οπών τύπου ELISA και προστίθενται 40 μl του διαλύματος χρωστικής (Bio-Rad Life Technologies). Μετά την ανάδευση τους τα δείγματα φωτομετρώνται στα 595nm, σε φωτόμετρο πλακών τύπου ELISA (Dynatech MicroElisa reader Chantilly, VA). Για μεγαλύτερη ακρίβεια οι αντιδράσεις γίνονται εις τριπλούν.

2.15. Ανάλυση πρωτεϊνών

2.15.1. Εκχύλιση πρωτεϊνών

Η απομόνωση ολικών πρωτεϊνών έγινε με την άμεση προσθήκη στα κύτταρα διαλύματος Laemmli's. Εναλλακτικά, τα κύτταρα διαλυτοποιήθηκαν σε διάλυμα RIPA (1% Nonidet P-40, 20 mM Tris pH 7,4, 137 mM NaCl, 1 mM PMSF, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin, 1 mM Na_3VO_4 και 50 mM NaF).

Η απομόνωση των μεμβρανικών πρωτεϊνών έγινε όπως περιγράφεται παρακάτω στις μελέτες ανταγωνιστικής πρόσδεσης (2.19.).

Για την απομόνωση των πυρηνικών πρωτεϊνών, τα κύτταρα εκπλύθηκαν αρχικά δις με παγωμένο διάλυμα PBS, επαναδιαλύθηκαν με ήπια ανάδευση σε διάλυμα 10 mM HEPES, pH 7,9, 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 0,5 mM DTT, 1 mM PMSF, 10 µg/ml leupeptin, 20 µg/ml aprotinin, 1 mM Na₃VO₄ και 50 mM NaF σε αναλογία 10⁸ κύτταρα/ml και επωάσθηκαν στον πάγο για 15 min. Κατόπιν, προστέθηκε 1/16 V 10% NP40 (τελική συγκέντρωση ~0,6%), προκειμένου να κατακρημνισθούν οι πυρήνες και ακολούθησε φυγοκέντριση στις 4000 rpm, στους 4°C για 1 min. Η διαδικασία επαναλήφθηκε και το τελικό ίζημα συλλέχθηκε και επαναδιαλύθηκε σε διάλυμα αποδιάταξης.

2.15.2. Ανοσοκατακρήμιση

Για τον υπολογισμό των ενεργοποιημένων-φωσφορυλιωμένων κινασών PI3K και FAK, τα κύτταρα επωάσθηκαν με τις προς μελέτη ουσίες, εκπλύθηκαν τρις με παγωμένο PBS και επωάσθηκαν με διάλυμα λύσης (1% Nonidet P-40, 20 mM Tris pH 7,4, 137 mM NaCl, 1 mM PMSF, 10 µg/ml leupeptin, 20 µg/ml aprotinin, 1 mM Na₃VO₄ και 50 mM NaF). Τα εκχυλίσματα προσροφήθηκαν σε σφαιρίδια Sepharose-Protein A (Amersham, Buckinghamshire, UK) για 1 h στους 4°C. Το υπερκείμενο επωάστηκε κατόπιν με αντίσωμα έναντι φωσφορυλιωμένων τυροσινών (PY20, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) και νέα σφαιρίδια, O/N στους 4°C και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση και ανοσοεντύπωμα με αντίσωμα έναντι της PI3K (p85, Upstate, Dundee, UK) ή έναντι της FAK (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany).

Για τον υπολογισμό του ακετυλιωμένου p53, κύτταρα HepG2 (10⁷) επιστρώθηκαν σε τριβλία Ø 10mm, επωάσθηκαν με quercetin για τον κατάλληλο χρόνο, εκπλύθηκαν γρήγορα με HBSS και λύθηκαν σε διάλυμα RIPA (1% Nonidet P-40, 20 mM Tris pH 7,4, 137 mM NaCl, 1 mM PMSF, 10 µg/ml leupeptin, 20 µg/ml aprotinin, 1 mM Na₃VO₄ και 50 mM NaF). Το πρωτεϊνικό εκχύλισμα επωάστηκε για 2 ώρες, στους 4°C, με 5µl αντίσωμα για acetyl (K373&K382)-p53 (ab4267; Abcam, Cambridge, UK). Τα ανοσο-σύμπλοκα προσδέθηκαν σε σφαιρίδια Protein G Sepharose® (17-0618-01; Amersham, Buckinghamshire, UK), με ήπια ανάδευση στους 4°C, για 18 ώρες. Αφότου εκπλύθηκαν τρις, τα σύμπλοκα διαχωρίστηκαν σε 8% πηκτές ακρυλαμίδης (SDS-PAGE) και μεταφέρθηκαν σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης. Οι μεμβράνες επωάστηκαν σε διάλυμα TBST, αρχικά με μονοκλωνικό αντίσωμα για το p53 (1:1000; ab280) και κατόπιν για mouse IgG-HRP (1:4000; ab6728), από την Abcam (Cambridge, UK). Οι προσδεδωμένες πρωτεΐνες ανιχνεύθηκαν με χημειοφωταύγεια με το σύστημα ECL (Amersham, Buckinghamshire, UK).

2.15.3. Υπολογισμός του λόγου πολυμερούς/μονομερούς ακτίνης

Για τον ποσοτικό υπολογισμό της G-(μονομερούς) και F- (πολυμερούς) ακτίνης, οι κυτταρικές πρωτεΐνες εκχυλίσθηκαν σταδιακά. Καταρχήν τα κύτταρα επωάσθηκαν με Triton-extraction buffer (0.3% Triton X-100, 5 mM Tris, pH 7.4, 2 mM EGTA, 300 mM sucrose, 2 µM phalloidin, 1 mM PMSF, 10 Ag/ml leupeptin, 20 Ag/ml aprotinin, 1 mM sodium orthovanadate, 50 mM NaF), για 5 min στους

4°C. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και συμπυκνώθηκε με την προσθήκη ίσου όγκου 6% PCA. Το ίζημα -οι αδιάλυτες πρωτεΐνες, μεταξύ των οποίων και η F-ακτίνη- κατακρημνίσθηκε 3% PCA και συλλέχθηκε από τα τριβλία με απόξεση. Όλα τα κλάσματα φυγοκεντρίθηκαν για 5 min στις 12.000 rpm και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 0.1 N NaOH. Μετά την προσθήκη ίσου όγκου διαλύματος Laemmli's ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμίδης και ανοσοεντύπωμα για την ακτίνη. Χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της ακτίνης (1:12000, Amersham-Pharmacia, Buckinghamshire, UK) και αντίσωμα για mouse IgG-HRP (1:4000, ab6728, Abcam, Cambridge, UK).

2.15.4. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών (PAGE) - Ανοσοεντύπωμα (Western)

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών ανάλογα με το μοριακό τους βάρος γίνεται συνήθως υπό αποδιατακτικές (denaturing και reducing) συνθήκες. Ανεξάρτητα από το διάλυμα στο οποίο συλλέγονται οι πρωτεΐνες, πριν την ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες προστίθεται διάλυμα μετουσίωσης (ή Laemmli's, 5x, 312,5 mM Tris, 10% SDS, 10% β-μερκαπτοαιθανόλη, 25% γλυκερόλη και 0,05% κυανού της βρωμοφανόλης, pH 6,8). Εναλλακτικά, η β-μερκαπτοαιθανόλη είναι δυνατόν να αντικατασταθεί με DTT τελικής συγκέντρωσης 100 mM, το οποίο όμως προστίθεται λίγο πριν την χρήση του διαλύματος. Τα δείγματα βράζονται για 5 min, με σκοπό την πλήρη αποδιάταξη των πρωτεϊνών και διαχωρίζονται σε πηκτή ακρυλαμίδης (200 Volt), αρχικά μέσα από την πηκτή επιστοιβαξής και κατόπιν στην πηκτή διαχωρισμού, σε συσκευή κατακόρυφης ηλεκτροφόρησης (Biorad, Hercules, CA). Η επιλογή της συγκέντρωσης της πηκτής διαχωρισμού σε ακρυλαμίδη καθορίζει και τον βέλτιστο διαχωρισμό πρωτεϊνών με συγγενές μοριακό βάρος (Πίν. 2.3) (Chrumbach and Rodbard, 1971).

Πίνακας 2.3. Σύσταση πηκτών ακρυλαμίδης.

Διάλυμα	Πηκτή επιστοιβαξής (5 ml)	Πηκτή Διαχωρισμού/ Μοριακό Βάρος πρωτεϊνών (10 ml)		
	4 %	8%	10%	12%
30% Ακρυλαμίδη (Ακρυλαμίδη: bis-ακρυλαμίδη 29:1)	667 μl	4710 μl	4045 μl	3345 μl
1,5 M Tris-base, pH 8,8	-	2500 μl	2500 μl	2500 μl
1 M Tris-base, pH 6,8	625 μl	-	-	-
20% SDS	25 μl	50 μl	50 μl	50 μl
10% NH ₄ S ₂ O ₈	50 μl	100 μl	100 μl	100 μl
TEMED	5 μl	5 μl	5 μl	5 μl

Στην περίπτωση όπου είναι αναγκαίο να διατηρήσουν οι πρωτεΐνες την αρχική τους διαμόρφωση, δεν χρησιμοποιούνται αποδιατακτικές συνθήκες και αποφεύγεται η χρήση SDS, μερκαπτοαιθανόλης και DTT σε όλα τα στάδια της απομονώσεως και ηλεκτροφορήσεώς τους.

Για το ανοσοεντύπωμα, μετά των διαχωρισμό τους, οι πρωτεΐνες μεταφέρονται παρουσία ηλεκτρικού πεδίου (100 Volt/350 mA, 1h) σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Οι μεμβράνες επωάζονται αρχικά με διάλυμα πρωτεΐνης (5% καζεΐνη-πρωτεΐνη αποβουτυρωμένου γάλακτος ή 2% αλβουμίνη ή 1% ζελατίνη χονδρική), για μία ώρα τουλάχιστον σε RT, ώστε να αποφευχθεί η μη ειδική προσδεση των αντισωμάτων. Στην συνέχεια, προστίθεται το κατάλληλο πρωτογενές (primary) αντίσωμα στην ενδεικνυόμενη αραιώση για 3 h σε RT (εναλλακτικά O/N, 4°C) και κατόπιν ένα δεύτερο, το οποίο αναγνωρίζει τις σταθερές (ειδικές για το είδος από το οποίο προέρχεται) περιοχές του πρώτου, για 1 h σε RT. Τα δεύτερα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη είναι σύμπλοκα μόρια με υπεροξειδάση horse radish (HRP). Σε όλη την διάρκεια του πειράματος οι μεμβράνες παραμένουν υγρές και κάθε αντιδραστήριο διαλύεται σε TBS-T (20 mM Tris pH 7,6, 137 mM NaCl, 0,05% Tween-20). Η ανίχνευση των προσδεσμένων αντισωμάτων γίνεται με χημειοφωταύγεια, όπου το μόριο της HRP καταλύει το υπόστρωμα ECL (Amersham Biosciences, Bucks, UK) και παράγει φωτόνια. Η τοποθέτηση ενός φιλμ (Kodak X-Omat AR, Rochester, NY) επάνω στην μεμβράνη έχει ως αποτέλεσμα την αμύρωση ζωνών στις ειδικές θέσεις πρόσδεσης των αντισωμάτων, οι οποίες μετρώνται με το πρόγραμμα Bio-Rad Imaging System.

Προκειμένου να υπολογισθούν οι ποσοτικές μεταβολές στην έκφραση ή την φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών κάθε δείγματος, αφαιρείται το προσδεμένο σύμπλοκο των αντισωμάτων με διάλυμα stripping (Chemicon, Temecula, CA) και οι μεμβράνες επανυβριδοποιούνται με αντίσωμα ενάντια σε συστατική πρωτεΐνη (ακτίνη) ή σε μη ενεργοποιημένα μόρια αντιστοίχως και ακολουθεί κανονικοποίηση.

2.16. Αλληλεπίδραση της quercetin με πρωτεΐνες

Παρασκευάσθηκαν εκχυλίσμα μεμβρανικών, πυρηνικών και ολικών πρωτεϊνών από κύτταρα HepG2, όπως περιγράφεται παραπάνω. Τα εκχυλίσματα (1mg/ml) επώαστηκαν παρουσία quercetin (10^{-2} - 10^{-5} M) για 30 min σε πάγο και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές ή μη συνθήκες. Μετά την ηλεκτροφόρηση, οι πηκτές παρατηρήθηκαν σε πλάκα UV ή στο ορατό και ακολούθησε χρώση με διάλυμα Coomassie Brilliant Blue (CBB, 0,5 %). Εναλλακτικά, οι πρωτεΐνες ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή ακρυλαμίδης και επώαστηκαν εκ των υστέρων με διαλύματα quercetin (10^{-2} - 10^{-5} M).

2.17. Μέτρηση των παραγόμενων ελευθέρων ριζών οξυγόνου (Reactive oxygen species, ROS)

Η ποσοτικοποίηση των ελεύθερων ριζών οξυγόνου που παράγονται μία δεδομένη στιγμή από τα κύτταρα στηρίζεται στην οξειδωση της Διϋδροροδαμίνης 123-υδρόφοβη- (Dihydrorhodamine 123, DHR123, Molecular Probes Eugene, USA) προς φθορίζουσα ροδαμίνη 123, η οποία είναι υδρόφιλη, παραμένει στα κύτταρα και μπορεί να ανιχνευθεί με κυτταρομετρία ροής ($\lambda_{em, max}=530nm$) (Rothe and Valet, 1994).

Τα κύτταρα καλλιεργούνται παρουσία των επιθυμητών παραγόντων και συνθηκών έως την ημέρα του πειράματος, κατά την οποία αποκολλώνται από τα δοχεία καλλιέργειας με απόξεση, ξεπλένονται και επαναδιαλύονται σε διάλυμα HBSS σε συγκέντρωση 10^6 κύτταρα/ml. Εναλλακτικά, οι ουσίες μπορεί να προστεθούν μετά την συλλογή των κυττάρων, ώστε να υπολογισθεί η άμεση αντιοξειδωτική τους δράση σε συστατικές συνθήκες. Επίσης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί παράλληλα ο παράγοντας PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate, 100nM), ο οποίος επάγει άμεσα τις οξειδωτικές διαδικασίες. Κατόπιν, τα κύτταρα επωάζονται με 1μM DHR123 για 5 min σε RT στο σκοτάδι, προκειμένου να την ενδοκυττώσουν, και στη συνέχεια υπολογίζεται η κινητική σχηματισμού της ροδαμίνης (δειγματοληψία ανά 2-5 min, μέχρι κορεσθεί η αντίδραση) με κυτταρομετρία ροής.

2.18. Μελέτη του συστήματος NO/NOS

2.18.1. Κυτταρομετρία ροής

Κατ'αναλογία με το πρωτόκολλο υπολογισμού των ελευθέρων ριζών οξυγόνου, μπορούν να υπολογισθούν οι ελεύθερες ρίζες αζώτου, με την βοήθεια της diaminofluorescein diacetate (DAF) (Kojima et al., 1998), μιας χρωστικής ανάλογης της DHR123. Παρουσία NO, η χρωστική μετατρέπεται σε φθορίζουσα 2',7'-diaminofluorescein, η οποία συσσωρεύεται στο κύτταρο και μπορεί να υπολογισθεί ποσοτικά με κυτταρομετρία ροής. Σε ουδέτερο περιβάλλον, όπως το ενδοκυττάριο, η DAF αντιδρά αποκλειστικά με το NO, όχι όμως και με τους οξειδωμένους μεταβολίτες του NO₂ και NO₃, ή ελεύθερες ρίζες.

Σε εναιώρημα κυττάρων (10^6 /ml), προστέθηκαν 0,1 mM DAF-2 DA (Sigma, St Louis, MO) και υπολογίστηκε η κινητική παραγωγής του NO στα 485 nm_{ex} (± 20 nm)/530 nm_{em} (± 25) με κυτταρομετρητή ροής (FACSArray apparatus, Beckton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Εκτός από κυτταρομετρία ροής, ο σχηματισμός NO στα κύτταρα μπορεί να υπολογισθεί με την βοήθεια φθορισμομέτρου (FLx100, BIOTEK instruments, Winooski, Vermont, US).

2.18.2. Υπολογισμός μεταβολιτών αζώτου σε υπερκείμενα κυτταροκαλλιέργειας

Ο υπολογισμός της συνολικής παραγωγής NO κατά την διάρκεια των επιδράσεων με πολυφαινόλες στα κύτταρα στηρίζεται στον υπολογισμό των μεταβολιτών αζώτου (NO₂⁻ και NO₃⁻) στα υπερκείμενα των κυτταροκαλλιεργειών. Τα μόρια NO₃⁻ μετατράπηκαν αρχικά σε NO₂⁻ με επώαση 100 μl υπερκειμένου σε διάλυμα αντίδρασης [12,5 mM HEPES (pH 7,4), 12,5 μM FAD, 0,25 mM NADPH] παρουσία της αναγωγάσης των νιτρικών (nitrate reductase) σε συνολικό όγκο 200 μl. Η περίσσεια NADPH αφαιρέθηκε με αγωγή με lactate dehydrogenase. Στην συνέχεια προστέθηκε 1 ml αντιδραστήριου Griess (0,5% N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride) και υπολογίστηκε η απορρόφηση των στα 543 nm. Ως τυφλό χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό μέσο καλλιέργειας, ενώ για τον

ακριβή ποσοτικό υπολογισμό των μεταβολιτών τους αζώτου χρησιμοποιήθηκε πρότυπη καμπύλη NaNO_2 , συγκεντρώσεως 0-100 μM .

2.18.3. Μέτρηση της ενεργότητας της συνθάσης του NO

Η μέτρηση της δραστηριότητας της συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου (NOS) βασίζεται στην αντίδραση την οποία καταλύει η NOS: L-Αργινίνη \rightarrow L-Υδροξυαργινίνη \rightarrow L-Κιτρουλλίνη + NO, παρουσία NADPH και των συμπαραγόντων FAD, FMN και BH4 (6-Τετραϋδρο-βιοπτερίνη). Για την ποσοτικοποίηση της δραστηριότητας της NOS χρησιμοποιείται ραδιοσημασμένη L-Αργινίνη, η οποία μεταβολίζεται από συγκεκριμένη ποσότητα πρωτεϊνικού εκχυλίσματος και σε συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, σε ραδιοσημασμένη L-κιτρουλλίνη, η οποία υπολογίζεται με μέτρηση της β-ακτινοβολίας (Bredt and Snyder, 1989).

Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε πλάκες 6 οπών ή σε φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας επιφάνειας 25cm^2 , εντός των οποίων γίνονται οι επιδράσεις με τις υπό μελέτη ουσίες. Στο τέλος των επιδράσεων, τα κύτταρα ξεπλένονται με PBS και συλλέγονται με απόξεση σε διάλυμα PBS/1mM EDTA. Στην συνέχεια ομογενοποιούνται σε 250 μl διαλύματος 250 mM Tris-EDTA, 10 mM EDTA, 10 mM EGTA. Οι πυρήνες και τα άθικτα κύτταρα απομακρύνονται με φυγοκέντρηση στις 2000 rpm για 10 min στους 4°C και συλλέγεται το υπερκείμενο και η πρωτεϊνική συγκέντρωση ρυθμίζεται στα 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Κάθε αντίδραση (0,5ml) περιλαμβάνει 10 μl πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, 10 μl [^3H] L-Αργινίνη (58Ci/mmol, Amersham, UK) σε διάλυμα αντίδρασης (25 mM Tris pH 7.4, 3 μM BH4, 1 μM FAD, 1 μM FMN, 1mM β-NADPH, 0,6 mM CaCl_2). Τα δείγματα τοποθετούνται σε υδατόλουτρο (37°C) για 1 ώρα. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιείται πρωτεϊνικό εκχύλισμα, του οποίου η ενζυμική δραστηριότητα έχει καταστραφεί με βρασμό. Η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη 400 μl παγωμένου διαλύματος 50mM HEPES (pH 5,5), 5mM EDTA. Η απομάκρυνση της μη μετασχηματισμένης [^3H]Αργινίνης επιτυγχάνεται με καθαρισμό του δείγματος με στήλη ιοντοανταλλακτικής ρητίνης AG-50W (Bio-Rad Life Science Technologies, USA), η οποία κατακρατεί την θετικά φορτισμένη σε pH5,5 [^3H]Αργινίνη, αλλά όχι την ουδέτερη [^3H]Κιτρουλλίνη. Το εκχύλισμα αναμειγνύεται στην συνέχεια με υγρό σπινθηρισμού και μετράται σε μετρητή β-ακτινοβολίας (TRI-CARB 4000Series με απόδοσης 60%, Packard, USA) για 2 λεπτά/δείγμα.

Η ποσότητα της παραγόμενης [^3H]Κιτρουλλίνης είναι ευθέως ανάλογη κι εκφράζει τη δραστηριότητα της NOS. Από τη μετρούμενη ραδιενέργεια (κρούσεις ανά λεπτό, cpm) της [^3H]Κιτρουλλίνης δύναται να υπολογισθεί η ταχύτητα της αντίδρασης, σύμφωνα με την εξίσωση:

$$V = \frac{\text{Radioactivity} - \text{Blank}}{e \times S.A. \times T \times [\text{protein}]}, \text{ όπου } V \text{ η ταχύτητα της αντίδρασης, Radioactivity η ποσότητα της}$$

[^3H]Κιτρουλλίνης (cpm), Blank η ποσότητα της ραδιενέργειας του μάρτυρα (cpm), e ο συντελεστής απόδοσης του μετρητή ακτινοβολίας (60%), S.A. η ειδική δραστηριότητα της [^3H]Αργινίνης (fmol/ml), T ο χρόνος της αντίδρασης (λεπτά) και [protein] η πρωτεϊνική συγκέντρωση του δείγματος (mg/ml).

2.18.4. Ημιποσοτικός προσδιορισμός της έκφρασης των NOS

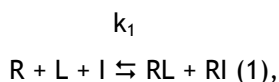
Ο ημιποσοτικός προσδιορισμός της έκφρασης των eNOS και iNOS έγινε με RT-PCR, όπως περιγράφεται στο Κεφ.2.11.

2.19. Μελέτη της πρόσδεσης των πολυφαινολών σε μεμβρανικούς υποδοχείς στεροειδών

2.19.1. Θεωρητικό υπόβαθρο

Κάθε υποδοχέας αποτελείται από τουλάχιστον δύο βασικά δομικά στοιχεία: μία μονάδα ελέγχου (Regulatory unit, R), η οποία είναι μία θέση δέσμησης, που αναγνωρίζει και προσδένει με αντιστρεπτό τρόπο ένα συγκεκριμένο μόριο προσδέτη και μία λειτουργική μονάδα (Effector unit, E), η οποία διαβιβάζει το σήμα του μορίου προσδέτη και μπορεί να είναι ένα ένζυμο, ένας μεταφορέας, ένα ιοντικό κανάλι ή να έχει άλλες λειτουργίες.

Για την ανίχνευση θέσεων πρόσδεσης ή υποδοχέων, καθώς και για τη μέτρηση και το χαρακτηρισμό της αλληλεπίδρασης μιας ή περισσότερων ουσιών με κάποια θέση δέσμησης ή κάποιο υποδοχέα, διεξάγονται μελέτες δέσμησης. Οι μελέτες δέσμησης κάνουν χρήση μιας ραδιοσημασμένης ουσίας, η οποία είναι ο ειδικός προσδέτης του υποδοχέα. Η κινητική της δέσμησης περιγράφεται από την χημική εξίσωση:



όπου

R : οι ελεύθερες (μη κατειλημμένες) θέσεις δέσμησης

L : ο ελεύθερος ραδιοσημασμένος προσδέτης

I : μια ελεύθερη μη ραδιοσημασμένη ουσία

RL : το σύμπλοκο υποδοχέα-ραδιοσημασμένου προσδέτη

RI : το σύμπλοκο υποδοχέα - μη ραδιοσημασμένης ουσίας

k_1 : η ταχύτητα σύνθεσης των συμπλόκων RL + RI

k_2 : η ταχύτητα διάσπασης των συμπλόκων RL + RI στα αντίστοιχα ελεύθερα μόρια R, L και I

Δέσμηση συμβαίνει όταν η ουσία και ο υποδοχέας έρχονται σε επαφή μέσω διάχυσης και οι ουσίες έχουν κατάλληλο προσανατολισμό και επαρκή ποσότητα ενέργειας. Εφόσον πραγματοποιηθεί η δέσμηση, η ουσία και ο υποδοχέας παραμένουν δεσμευμένοι για χρονικό διάστημα που εξαρτάται από τη συγγένεια του υποδοχέα για την ουσία και αντίστροφα. Η διαδικασία αυτή είναι αντιστρεπτή. Ισορροπία επιτυγχάνεται όταν ο ρυθμός σύνθεσης νέων συμπλόκων (RL + RI) ισούται με το ρυθμό διάσπασης των συμπλόκων σε ελεύθερα μόρια (R, L και I). Στην περίπτωση της χημικής ισορροπίας $k_1 = k_2$.

Στην πλειοψηφία των πειραμάτων δέσμησης μετράται ο παράγοντας RL, ο οποίος αντιστοιχεί στο ποσό της ειδικής δέσμησης.

Τα πειραματικά πρωτόκολλα δέσμησης διακρίνονται σε τρεις τύπους:

1. Μελέτες κορεσμού, όπου υπολογίζεται η συγκέντρωση του παράγοντα RL σε κατάσταση ισορροπίας, παρουσία κυμαινόμενης συγκέντρωσης του εξωγενούς ραδιενεργού προσδέτη. Στα πειράματα κορεσμού δεν προστίθεται ουσία I.
2. Μελέτες χημικής κινητικής, όπου χρησιμοποιείται σταθερή συγκέντρωση ραδιενεργού προσδέτη και υπολογίζεται η [RL] συναρτήσει του χρόνου.
3. Μελέτες ανταγωνιστικής δέσμησης (ή μελέτες δόσης-απόκρισης), στις οποίες η συγκέντρωση της προστιθέμενης ραδιενεργούς ουσίας διατηρείται σταθερή και μεταβάλλεται η συγκέντρωση της μη ραδιοσημασμένης ουσίας I.

Στην παρούσα μελέτη εφαρμόστηκαν μελέτες ανταγωνισμού, καθώς σκοπός ήταν η μελέτη της πιθανής πρόσδεσης των πολυφαινολών στις ήδη χαρακτηρισμένες θέσεις πρόσδεσης των ανδρογόνων και των οιστρογόνων στην πλασματική μεμβράνη των κυττάρων προστάτη και μαστού.

Στα πειράματα μελετών ανταγωνισμού, η αυξανόμενη συγκέντρωση της μη ραδιοσημασμένης ουσίας I, εφόσον αυτή εμφανίζει συγγένεια για τον υποδοχέα, οδηγεί σε μείωση της διαθεσιμότητας του L για τον R. Από την σχέση (1) προκύπτει

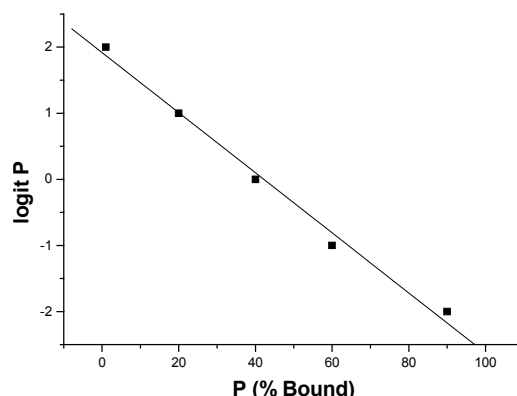
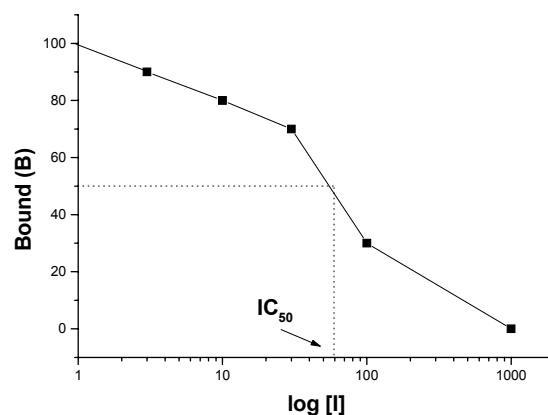
$$B = \frac{B_{\max} \cdot F}{F + KD \cdot (1 + I/KI)} \quad (2), \text{ όπου}$$

$KD = [R] \cdot [L] / [RL]$, η σταθερά διάστασης

του συμπλόκου προσδέτη-υποδοχέα, όπως προκύπτει από τις μελέτες κορεσμού, και

$KI = [R] \cdot [I] / [RI]$, η σταθερά ανταγωνισμού ή αναστολής (Inhibition constant).

Η συγγένεια του υποδοχέα για μία ουσία I περιγράφεται από την τιμή IC_{50} , η οποία ορίζεται ως η συγκέντρωση της ουσίας, στην οποία ο ραδιενεργός προσδέτης έχει καλύψει το 50% των υποδοχέων. Η σιγμοειδής καμπύλη του παραπάνω σχήματος μπορεί να μετατραπεί ευθεία, η οποία περιγράφεται από την σχέση: $\text{logit}(P) = \ln P/100 - P$, όπου P το % ποσοστό της ειδικά δεσμευμένης ουσίας (Bound, B).



Η σχέση μεταξύ των παραγόντων KI και IC₅₀ περιγράφεται από την εξίσωση: $KI = \frac{IC_{50}}{1 + F/KD}$, βάσει

της οποίας μπορεί να υπολογισθεί η σταθερά K_i, αφού έχει προσδιορισθεί πειραματικά η τιμή του IC₅₀.

Ο όρος B_{max} εκφράζεται σε Molarity, M, και συνήθως κυμαίνεται σε pM. Για να υπολογισθεί η συγκέντρωση (Molarity, M) από την ποσότητα ραδιενέργειας σε κρούσεις ανά λεπτό (counts per minute, cpm) γίνονται οι ακόλουθοι υπολογισμοί: $B_{max} = \frac{\text{ραδιενέργεια}(cpm)}{2,22 \times 10^{12} \text{ dpm/Ci} \times e \times S.A. \times V}$,

όπου e η απόδοση του μετρητή β-ακτινοβολίας (0,6 cpm/Ci), S.A (specific activity) η ειδική ενεργότητα της ραδιενεργούς ουσίας (σε Ci/mmol) και V ο όγκος της αντίδρασης (εκφρασμένος σε l).

Η μέγιστη πρόσδεση μπορεί να εκφρασθεί και ως ο αριθμός των θέσεων R_c πρόσδεσης ανά κύτταρο: $R_c = B_{max} \cdot V \cdot N/c$, όπου V ο όγκος της αντίδρασης (σε l), N ο αριθμός Avogadro (6,023 · 10²³ θέσεις/mol) και c ο αριθμός των κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση (συνήθως 5x10⁵).

2.19.2. Μελέτη της πρόσδεσης των πολυφαινολών σε μεμβρανικούς υποδοχείς στεροειδών σε απομονωμένες μεμβράνες

Τα κύτταρα αποκολλώνται από τις φλάσκες με απόξεση, αφού προηγηθεί έκπλυση με PBS, και συλλέγονται σε φρέσκο διάλυμα Tris 50mM (pH 7,4, 4°C), στο οποίο έχει προστεθεί 1 mM PMSF (SERVA, Germany) και 0,5 μg/ml απροτινίνη. Στη συνέχεια λύνονται με υπερήχους και ακολουθεί φυγοκέντριση (1000 g) για 10 min και 4°C, ώστε να απομακρυνθούν τα άθικτα κύτταρα και οι πυρήνες. Το υπερκείμενο φυγοκεντρείται κατόπιν σε 100.000g (ή 27.000 στροφές/λεπτό) για μία ώρα στους 4°C. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε διάλυμα Tris 50mM και γίνεται οξινοποίηση με ½ όγκο διαλύματος 50 mM γλυκίνης (pH 3) για 3 λεπτά στους 4°C, ώστε να απομακρυνθούν οι πιθανοί ενδογενείς προσδέτες (Hatzoglou et al., 1994). Η οξινοποίηση διακόπτεται με προσθήκη 10πλάσιου όγκου διαλύματος Tris 50mM pH 7,4. Επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρωση στα 100.000g για μία ώρα στους 4°C. Το ίζημα επαναδιαλύεται και προσδιορίζεται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford και ακολουθεί το πρωτόκολλο δέσμευσης.

Για κάθε αντίδραση χρησιμοποιούνται 2mg μεμβρανικών πρωτεϊνών/ml, παρουσία σταθερής συγκέντρωσης 2nM (~40000 cpm) του ραδιενεργού προσδέτη [³H]Οιστραδιόλη (Amersham-Pharmacia, Buckinghamshire, UK, specific activity 103 Ci/mmol) ή [³H]Τεστοστερόνη (Amersham-Pharmacia, Buckinghamshire, UK, specific activity 95 Ci/mmol) και μεταβλητής συγκέντρωσης πολυφαινολών (10⁻¹² έως 10⁻⁶ M) σε διάλυμα Tris 50mM pH 7,4. Οι αντιδράσεις παρασκευάζονται εις τριπλούν σε τελικό όγκο 0,1ml και τα δείγματα επωάζονται για 30 min στους 37°C ή O/N στους 4°C, με ανάδευση. Στη συνέχεια τα σύμπλοκα διηθούνται σε φίλτρα υάλου GF/B 25mm (Whatman, Maidstone, UK), τα οποία έχουν προηγουμένως υγρασθεί σε διάλυμα 0,5 % PEI, υπό κενό. Κατόπιν, ακολουθούν τρεις πλύσεις των φίλτρων με παγωμένο διάλυμα Tris 50mM pH 7,4, προκειμένου να

απομακρυνθούν τα μη δεσμευμένα ραδιοσημασμένα μόρια. Τέλος, τα φίλτρα τοποθετούνται σε ειδικά σωληνάρια με 3ml υγρό σπινθηρισμού (SigmaFluor, Sigma) και μετράται η ραδιενέργεια σε μετρητή β-ακτινοβολίας (Perkin Elmer, Foster City, CA· απόδοση 60% στο ^3H) για 2 min (Castanas et al., 1985a; Castanas et al., 1985b).

2.19.3. Μελέτη της πρόσδεσης των πολυφαινολών σε μεμβρανικούς υποδοχείς στεροειδών σε άθικτα κύτταρα με κυτταρομετρία ροής

Κατ'αναλογία με τις μελέτες δέσμευσης, τα ραδιοσημασμένα μόρια μπορεί να αντικατασταθούν με σύμπλοκα μόρια στεροειδών-αλβουμίνης-FITC, τα οποία δεν ενδοκυττώνονται και να μελετηθεί η κινητική εκτοπίσεώς τους από τις πολυφαινόλες στην πλασματική μεμβράνη ζωντανών κυττάρων. Επειδή η αναλογία των μορίων στεροειδούς:αλβουμίνη:FITC στα σύμπλοκα διαφέρει, η τεστοστερόνη-BSA-FITC (4 μόρια τεστοστερόνης ανά μόριο BSA, 4 μόρια FITC ανά μόριο BSA) και η οιστραδιόλη-BSA-FITC (6,7 μόρια οιστραδιόλης ανά μόριο BSA, 4,2 μόρια FITC ανά μόριο BSA) (4 μόρια DHEA ανά μόριο BSA, 4 μόρια FITC ανά μόριο BSA) χρησιμοποιήθηκαν σε συγκέντρωση 10^{-7} M, ενώ η BSA-FITC (12 μόρια FITC ανά μόριο BSA) σε συγκέντρωση 3×10^{-8} M. Η BSA-FITC χρησιμοποιείται ως ο αρνητικός μάρτυρας, εφόσον η δέσμευση της BSA-FITC οφείλεται σε φυσικοχημικές αλληλεπιδράσεις του μορίου της BSA κυρίως με τα λιπίδια της πλασματικής μεμβράνης, και όχι στην ειδική αλληλεπίδραση με θέσεις δέσμευσης ή υποδοχείς.

Πριν από κάθε πείραμα, τα στεροειδή-BSA-FITC επωάζονται για 30 λεπτά στους 4°C με ένα μείγμα ενεργού άνθρακα (3 % άνθρακας, 0,3 % δεξτράνη), ώστε να απομακρυνθούν μόρια με μοριακό βάρος < 3 kD. Τα κύτταρα αποκολλώνται με απόξεση, ξεπλένονται με PBS, επαναδιαλύονται σε συγκέντρωση 10^6 κύτταρα/ml και επωάζονται για 0-60 min στο σκοτάδι παρουσία των συμπλόκων στεροειδούς-BSA-FITC και πολυφαινολών (10^{-12} έως 10^{-6} M). Κατόπιν, υπολογίζεται με κυτταρομετρία ροής, η πρόσδεση των συμπλόκων FITC στην επιφάνεια των κυττάρων και η αναστολή της από τις πολυφαινόλες.

2.19.4. Μελέτη της πρόσδεσης των πολυφαινολών σε μεμβρανικούς υποδοχείς στεροειδών σε άθικτα κύτταρα με συνεστιακή μικροσκοπία

Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε καλυπτρίδες, οι οποίες έχουν προηγουμένως επιστρωθεί με πολυ-L-λυσίνη, εντός πλακών 6 οπών, για 24 h σε συγκέντρωση $1-3 \times 10^5$ κύτταρα/καλυπτρίδα. Στην συνέχεια, τα κύτταρα ξεπλένονται με PBS, επωάζονται για 30 min με διάλυμα ζελατίνης χονδρική 1%, προκειμένου να καλυφθούν οι μη ειδικές θέσεις δέσμευσης και κατόπιν με διάλυμα στεροειδούς-BSA-FITC, όπως και στην περίπτωση της κυτταρομετρίας ροής. Στο τέλος της επώασης τα κύτταρα ξεπλένονται τρεις φορές με PBS και οι καλυπτρίδες τοποθετούνται ανάποδα σε αντικειμενοφόρους με αντι-αποχρωματιστικό διάλυμα (anti-fading) και παρατηρούνται σε μικροσκόπιο συνεστίασης (Leica TCS SP confocal scanner system, Heidelberg GmbH, Germany).

2.20. Έλεγχος της *in vivo* αντικαρκινικής δράσεως των φλαβονοειδών σε πειραματικό μοντέλο αθυμικών επίμυων

Για τον περαιτέρω έλεγχο της αντιπολλαπλασιαστικής δράσεως των πολυφαινολών χρησιμοποιήθηκε ένα ετερόλογο σύστημα: ενήλικοι (10 εβδομάδων) αρσενικοί αθυμικοί επίμυες της σειράς BalbC/- (Harlan, Italy) ενοφθαλμίστηκαν υποδόρια με ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτου της σειράς DU-145. Η επιλογή των αθυμικών επίμυων έγινε λόγω της ανοσοανεπάρκειας που εμφανίζουν, ώστε να αποτραπεί η απόρριψη των καρκινικών κυττάρων. Προκειμένου να διασφαλισθεί η δημιουργία συμπαγών όγκων, τα κύτταρα είχαν προηγουμένως διαλυθεί σε υπόστρωμα Matrigel® (Sigma Hellas, Greece). Σε κάθε επίμυ ενοφθαλμίστηκαν συνολικά 5×10^6 κύτταρα με τέσσερις ισόποσες εγχύσεις εκατέρωθεν της ράχης του. Δύο εβδομάδες αργότερα (πειραματικό σημείο 0) οι επίμυες εμφάνισαν διακριτούς μακροσκοπικά όγκους στην ράχη τους. Τα πειραματόζωα χωρίστηκαν σε πέντε διαφορετικές ομάδες. Σε καθεμία χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά PBS (ομάδα μάρτυρας), 10^{-7} M τεστοστερόνη-BSA, 10^{-6} M τεστοστερόνη-BSA, 10^{-6} M B2 ή 10^{-6} M B5, ανά μία ημέρα, για ένα μήνα. Οι παραπάνω συγκεντρώσεις αντιστοιχούν στην τελική συγκέντρωση του φαρμάκου στο πλάσμα. Το μέσο σωματικό βάρος ενός επίμυ είναι 25g και ο όγκος του αίματος αντιστοιχεί σε 1,8 ml (Diehl et al., 2001). Σε κάθε ζώο χορηγήθηκαν 0,5ml διαλύματος φλαβονοειδών 3,6 μM.

Προκειμένου να υπολογίσουμε την εξέλιξη των όγκων, θεωρήσαμε την διατομή τους ως μία έλλειψη παράλληλη στην επιδερμίδα του ζώου και μετρήσαμε με παχύμετρο τους άξονες συμμετρίας της ανά εβδομάδα. Το μέγεθος των όγκων σε κάθε δειγματοληψία υπολογίστηκε με την βοήθεια του τύπου:

$W = \frac{a}{2} \cdot b^2$, όπου α ο μεγαλύτερος και β ο μικρότερος άξονας συμμετρίας (Wang et al., 2003). Ο ρυθμός αναστολής της ανάπτυξης των όγκων υπολογίστηκε με την βοήθεια του τύπου:

$$IR = \frac{C \cdot (W_1 - W_0) - T \cdot (W_1 - W_0)}{C \cdot (W_1 - W_0)}, \text{ όπου } C \text{ τα ζώα μάρτυρας, } T \text{ τα ζώα στα οποία χορηγήθηκε}$$

τεστοστερόνη-BSA ή φλαβονοειδή, W_1 το μέγεθος των όγκων μετά την χορήγηση των ουσιών και W_0 το μέγεθος των όγκων στο πειραματικό σημείο 0 (Zhou et al., 2005). Τα ζώα θυσιάστηκαν στο τέλος του πειράματος, οπότε αφαιρέθηκαν οι όγκοι και εκτιμήθηκαν περαιτέρω από παθολογοανατόμο με ανοσοϊστοχημικά πρωτόκολλα.

2.21. Υπολογισμός της αντιοξειδωτικής και οξειδωτικής ικανότητας του ορού

Η αντιοξειδωτική ικανότητα του ορού (TAC) υπολογίστηκε με το TAC assay kit (Medicon Hellas, Gerakas, GR). Η μέθοδος υπολογισμού της TAC στηρίζεται στην ικανότητα του ορού να παρεμποδίζει την οξείδωση της κροκίνης από το ABAP (2,2'-Azobis-(2-amidinopropane) dihydrochloride) και η συγκέντρωση του μη οξειδωμένου υποστρώματος στηρίζεται σε καμπύλη αναφοράς Trolox C (6-

hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) 0-10 µg/ml (1 u TAC=1 mM αναλόγων Trolox C).

Έχει αναφερθεί ότι οι ενδογενείς μεταβολίτες που συμμετέχουν στην αντιοξειδωτική ικανότητα του ορού, ευθύνονται για το 85% της TAC: το ουρικό οξύ, η χολερυθρίνη, οι λιποπρωτεΐνες και η αλβουμίνη συνεισφέρουν κατά 0,11 mmol/mg, 0,14 mmol/mg, 0,18 mmol/mg και 0,01 mmol/100 mg αντιστοίχως (Kampa et al., 2002; Malliaraki et al., 2003). Το υπόλοιπο 15% της TAC οφείλεται στην παρουσία αντιοξειδωτικών που προσλαμβάνονται μέσω της διατροφής. Για τον λόγο αυτό υπολογίστηκαν οι βιοχημικές παράμετροι του ορού (Olympus, Melville, NY, USA) και κατόπιν η «διορθωμένη» TAC (cTAC).

Ο υπολογισμός της TOC έγινε με βάση το τροποποιημένο πρωτόκολλο των Tatzber et al (Tatzber, Anal. Biochem., 2003). Εν συντομία, 10 µl H₂O₂ ή δείγματος αναμείχθηκαν με 200µl μείγματος υποστρώματος-ενζύμου [100 TMB solution (ελεύθερο υπεροξειδίου του υδρογόνου): 1 υπεροξειδάση χρένου (HRP: Horse Radish Peroxidase, 12.5 µu/µl], επώαστηκαν για 10 min σε RT, προστέθηκαν 50 µl H₂SO₄ 4N και μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στα 450 nm, σε φωτόμετρο πλακών τύπου ELISA. Η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων στηρίχθηκε σε πρότυπη καμπύλη 0-1000 µM H₂O₂.

2.22. Προσδιορισμός ιντερλευκινών ορού

Η μέτρηση των ιντερλευκινών που εκκρίνονται από διεγερμένα λευκοκύτταρα στο πλάσμα έγινε με την βοήθεια μίας νέας μεθόδου, η οποία στηρίζεται στην χρήση φθορίζοντων μικροσφαιριδίων, όπου είναι προσδεσμένα αντισώματα ενάντια στις ιντερλευκίνες σε συνδυασμό με κυτταρομετρία ροής. Ειδικότερα, ελέγχθηκε η έκκριση των ιντερλευκινών IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IFNγ, GM-CSF και TNFα (LINCO research, St Charles, Missouri) σε δείγματα πλάσματος εθελοντών, βάσει του πρωτοκόλλου της εταιρείας με τη βοήθεια του κυτταρομετρητού Luminex 100 (Luminex Corporation, Austin, TX).

3. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΣΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ ΚΑΙ ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ NO/NOS	81
3.1.1. Αντιπολλαπλασιαστική δράση	81
3.1.2. Ρόλος του συστήματος NO/NOS	84
3.1.3. Συζήτηση.....	92
3.1.4. Ενεργοποίηση ενδοκυττάρων μηχανισμών μεταγωγής σήματος.....	96

3.1. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΣΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ ΚΑΙ ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΝΟΙΝΟΣ

Η εκδήλωση του καρκίνου οφείλεται σε πληθώρα παραγόντων, όπως η γενετική προδιάθεση, οι λοιμώξεις και περιβαλλοντικές παράμετροι (Levi et al., 2004). Εντούτοις, μόλις 5% των περιπτώσεων σχετίζονται άμεσα με την ύπαρξη μιας μεταλλάξεως, καταδεικνύοντας τον ρόλο των τροφικών παραγόντων στην διαμόρφωση του κατάλληλου περιβάλλοντος για την εμφάνιση της νόσου (Steinmetz and Potter, 1991a; Steinmetz and Potter, 1991b). Επιδημιολογικές μελέτες συσχετίζουν μία δίαιτα πλούσια σε πολυφαινόλες με μείωση της πιθανότητας εκδήλωσης χρόνιων καταστάσεων και νόσων, όπως ο καρκίνος, η οστεοπόρωση και οι καρδιακές παθήσεις, ενώ τα αποτελέσματα αυτά έχουν επιβεβαιωθεί και από εργαστηριακές μελέτες (Πίν. 1.2-3.).

Αν και οι πολυφαινόλες απορροφώνται από το πεπτικό σύστημα, η βιοδιαθεσιμότητά τους είναι αρκετά μικρή, συνήθως <1% της συγκεντρώσεώς τους στην τροφή (Donovan et al., 2001). Συνεπώς, προκειμένου να εξακριβωθεί η δράση τους σε βιολογικά συστήματα, απαιτούνται συγκεντρώσεις ανάλογες με τις φυσιολογικές (10^{-12} - 10^{-6} M) μετά από μέτρια κατανάλωση οίνου (1-2 ποτήρια ημερησίως, περίπου 240 ml, οδηγούν σε μέγιστη συκέντρωση πολυφαινολών στο πλάσμα 5μM, (Miller and Rice-Evans, 1995)).

Στην παρούσα μελέτη ελέγξαμε την δράση τεσσάρων διαφορετικών μορίων πολυφαινολών, οι οποίες αποτελούν τα κυριότερα φαινολικά συστατικά του οίνου: του σιλιβενίου resveratrol, της φλαβονόλης quercetin και των φλαβανολών catechin και epicatechin στον πολλαπλασιασμό των κυτταρικών σειρών προστάτου LNCaP, μαστού T47D και ηπατοκαρκινώματος HepG2, σε συγκεντρώσεις ανάλογες με αυτές που απαντώνται στο πλάσμα μετά την κατανάλωση τροφών πλούσιων σε αυτές.

3.1.1. Αντιπολλαπλασιαστική δράση

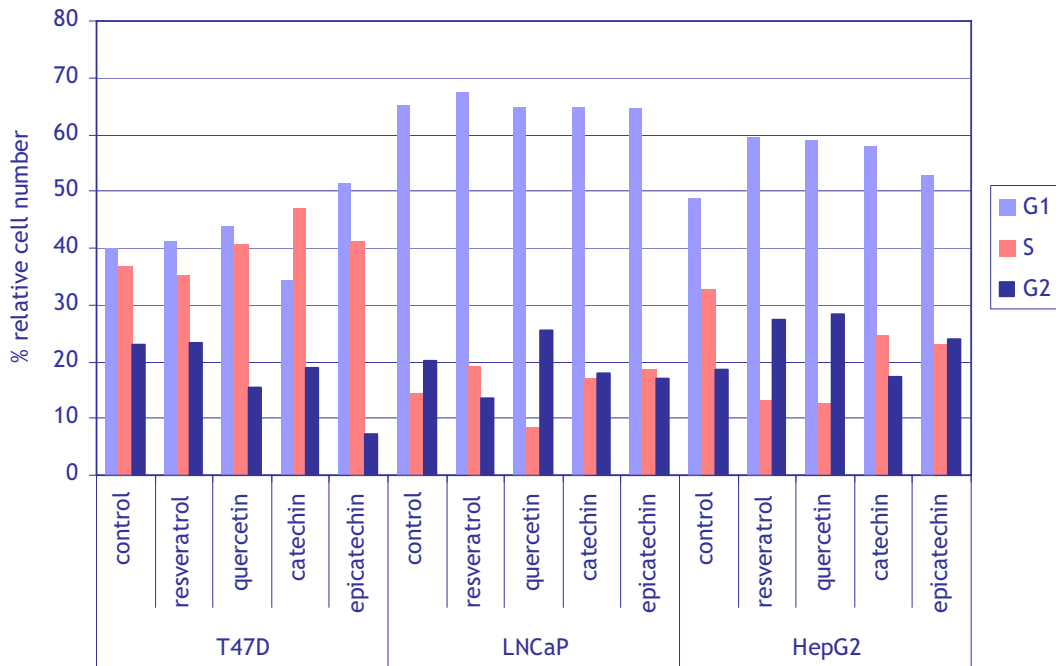
Η ομάδα μας έδειξε ότι οι προαναφερόμενες πολυφαινόλες αναστέλλουν με δόσο- και χρόνοεξαρτώμενο τρόπο τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων μαστού T47D (Damianaki et al., 2000), LNCaP (Kampa et al., 2000) και HepG2 (Notas et al., 2006).

Η δράση τους σε συγκεντρώσεις 10^{-12} - 10^{-6} M είναι εμφανής μετά από 6 ημέρες επώασης και οι αντίστοιχες IC₅₀ φαίνονται στον Πίνακα 3.1.1.. Η μέγιστη αναστολή παρατηρείται σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 10^{-7} M και κυμαίνεται μεταξύ 27 και 75%, ανάλογα με την κυτταρική σειρά.

Πίνακας 3.1.1. Επίδραση των πολυφαινολών στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, μετά από 6 ημέρες αγωγής.

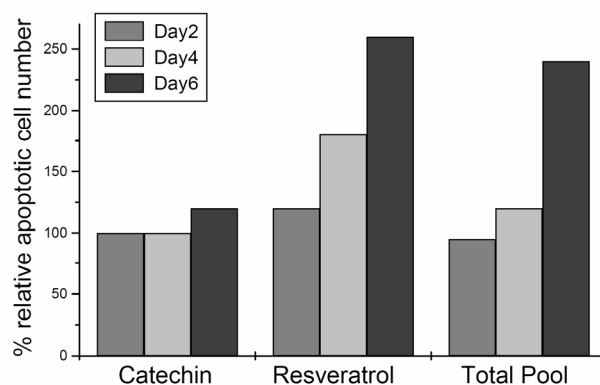
Κυτταρική σειρά	T47D		LNCaP		HepG2	
	IC ₅₀ (M)	Max inhibition	IC ₅₀ (M)	Max inhibition	IC ₅₀ (M)	Max inhibition
Resveratrol	5 x 10 ⁻¹³	56 %	10 ⁻¹¹	82 %	3 x 10 ⁻¹²	32 %
Quercetin	1 x 10 ⁻¹³	69 %	5,2 x 10 ⁻¹²	64 %	6,3 x 10 ⁻⁷	36 %
Catechin	1 x 10 ⁻¹³	73 %	10 ⁻⁶	27 %	9,6 x 10 ⁻¹³	30 %
Epicatechin	8 x 10 ⁻¹³	75 %	1,2 x 10 ⁻⁶	45 %	3 x 10 ⁻⁹	27 %

Η αντιπολλαπλασιαστική δράση των πολυφαινολών σχετίζεται με την τροποποίηση της διάρκειας των φάσεων του κυτταρικού κύκλου. Ανάλυση του κυτταρικού κύκλου μετά από χρώση των κυττάρων με ιωδιούχο προπίδιο και κυτταρομετρία ροής (Εικ. 3.1.1.) έδειξε ότι στα ηπατοκύτταρα οι πολυφαινόλες (κυρίως οι resveratrol και quercetin) επάγουν συσσώρευση των κυττάρων στις G₁/G₀ και G₂ φάσεις, και επακόλουθη μείωση των κυττάρων που βρίσκονται στην φάση S. Αν και στην περίπτωση της catechin οι διαφοροποιήσεις αυτές ήταν λιγότερο έντονες, κοινό χαρακτηριστικό της δράσης όλων των ουσιών είναι η αναστολή της μετάβασης των κυττάρων από την φάση G₁ στην S. Αντιθέτως, στις κυτταρικές σειρές μαστού και προστάτη δεν παρατηρήθηκαν ιδιαίτερες μεταβολές στο ποσοστό των κυττάρων στην φάση S. Στην σειρά T47D παρατηρήθηκε μία τάση αύξησης των κυττάρων στην φάση G₁ και αντίστοιχη μείωση αυτών στην φάση G₂. Οι κατεχίνες εμφανίζουν εντονότερη δράση σε σχέση με την resveratrol. Ιδιαίτερα η epicatechin αναστέλλει περίπου το 70% των κυττάρων που πρόκειται να διαιρεθούν (να εισέλθουν στην φάση G₂). Στην σειρά προστάτου LNCaP, διαφαίνεται μία τάση να συσσωρεύονται τα κύτταρα στην φάση S, εντούτοις οι μεταβολές αυτές δεν είναι μεγάλες. Εξαίρεση αποτελεί η quercetin, η οποία ευνοεί την μετάβαση S/G₂ και την κυττόσταση στην φάση G₂. Συμπεραίνουμε ότι η δράση καθεμιάς πολυφαινόλης στην εξέλιξη της κυτταρικής διαίρεσης/κύκλου εξαρτάται τόσο από την ουσία όσο και από την μελετώμενη κυτταρική σειρά.



Εικόνα 3.1.1. Κατανομή των κυττάρων στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου μετά από επίδραση με πολυφαινόλες (10^{-7} M) για 3 ημέρες σε κύτταρα μαστού (T47D), προστάτου (LNCaP) και ήπατος (HepG2).

Η επαγωγή της κυττόστασης σχετίζεται με περαιτέρω αποπτωτικές διαδικασίες, όπως επιβεβαιώθηκε μετά από χρώση των κυττάρων με Annexin-V-FITC και κυτταρομετρία ροής. Η απόπτωση αυξάνεται προοδευτικά με την ηλικία των κυττάρων και την συνεχή και μακροπρόθεσμη έκθεσή τους στις πολυφαινόλες: το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων είναι 1,5 φορές μεγαλύτερο σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρα μετά από 4 ημέρες επώασης και αυξάνει έως 2,5 φορές 6 ημέρες αργότερα, αντιστοιχώντας περίπου στο 30 % του κυτταρικού πληθυσμού (Εικ. 3.1.2.).



Εικόνα 3.1.2. Οι πολυφαινόλες επάγουν προοδευτική απόπτωση των κυττάρων HepG2.

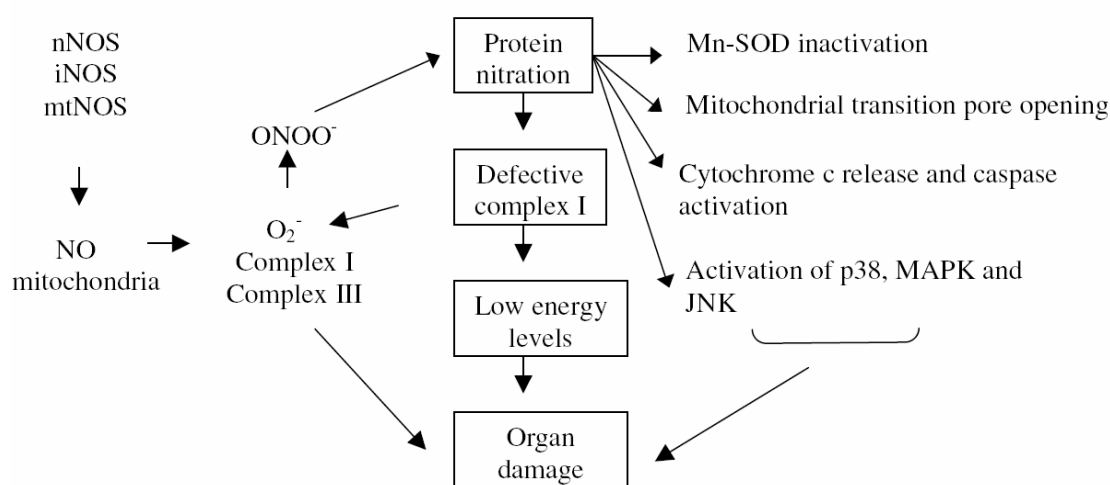
Στην συνέχεια, εξετάσαμε την συμμετοχή σηματοδοτικών μορίων στην κυττοστατική και αποπτωτική δράση των πολυφαινολών.

3.1.2. Ρόλος του συστήματος NO/NOS

Το μονοξείδιο του αζώτου (NO) είναι ένα υδρόφοβο διαχεόμενο μόριο, το οποίο λειτουργεί ως πρόδρομη ένωση ελευθέρων ριζών αζώτου (RNS) και προκύπτει από τον μεταβολισμό της L-αργινίνης σε L-κιτρουλλίνη από μία ομάδα NADPH-εξαρτώμενων ενζύμων, των συνθασών του NO (NOS) (Alderton et al., 2001). Η παραγωγή του από τα ενδοθηλιακά κύτταρα οδηγεί σε αγγειοδιαστολή, ενώ λειτουργεί και ως ανάδρομος νευροδιαβιβαστής. Επιπλέον, η δράση του περιλαμβάνει τροποποίηση της συστολικής ικανότητας των σκελετικών μυών και ρύθμιση της ανάπτυξής τους, ρύθμιση της συγκέντρωσης Na^+ στο σώμα και γενικότερα της ομοιόστασης, καθώς επίσης και τη ρύθμιση της ανάπτυξης του πυλωρικού σφιγκτήρα. Το NO λειτουργεί ακόμη ως αντιβακτηριδιακός, αντιπαρασιτικός και αντιϊικός παράγοντας. Τα επίπεδα του NO ελέγχονται από δύο διαφορετικούς τύπους συνθάσης: την μεμβρανική (nNOS και eNOS στα νευρικά και ενδοθηλιακά κύτταρα αντιστοίχως), και την επαγόμενη iNOS. Οι ισομορφές nNOS και eNOS εκφράζονται συστατικά στα νευρικά και ενδοθηλιακά κύτταρα αντιστοίχως και η ενεργότητά τους εξαρτάται από την ενδοκυττάρια συγκέντρωση Ca^{2+} . Αντιθέτως, η ισομορφή iNOS, επάγεται συνήθως από τις κυτοκίνες, δεν εξαρτάται από την παρουσία Ca^{2+} και μπορεί να καταλύει την σύνθεση NO για αρκετές ημέρες.

Το NO είναι απαραίτητο σε χαμηλές συγκεντρώσεις για την ομαλή φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων, καθώς μπορεί να ελέγξει τον αυξημένο πολλαπλασιασμό ή τον κυτταρικό θάνατο και κατ'επέκταση την εμφάνιση και εξέλιξη παθολογικών καταστάσεων, όπως η αθηροσκλήρωση, το εγκεφαλικό επεισόδιο, η νόσος Alzheimer και η ALS (amyotrophic lateral sclerosis). Επίσης, το NO προστατεύει έναντι της απόπτωσης σε περίπτωση ηπατικής ανεπάρκειας, ακτινοβόλησης και υποξίας (Chung et al., 2001). Υπό φυσιολογικές συνθήκες, το NO που παράγεται από τις συστατικά εκφραζόμενες eNOS και nNOS αλληλεπιδρά κατά την διαδρομή του έως το μιτοχόνδριο από την μυοσφαιρίνη, το NADH και την GSH. Η διάρκεια ενεργοποίησης των NOS και η ποσότητα του παραγωγομένου κατά κύματα NO, όπως επίσης και η αλληλεπίδραση των NOS με άλλες πρωτεΐνες (dystrophin ή caveolin III) επηρεάζουν την παραγωγή $\text{O}_2^{\cdot -}$, η οποία οδηγεί τα κύτταρα σε απόπτωση (Εικ. 3.1.3.) (Li and Wogan, 2005). Μεταξύ των μοριακών τροποποιήσεων που προκαλεί το NO, περιλαμβάνεται και η μετα-μεταφραστική S-νιτροσουλίωση ομάδων κυστεΐνης στο μόριο των πρωτεϊνών, η οποία σχετίζεται με την σηματοδότηση μέσω p21/gas και JNK2. Μέσω ενός ανάλογου μηχανισμού, η S-νιτροσουλίωση της caspase-8 αποτρέπει την απελευθέρωση του Bid και του κυττοχρώματος C και τις περαιτέρω αποπτωτικές διαδικασίες σε ηπατοκύτταρα αρουραίου (Jaffrey et al., 2001). Ανάλογες παρατηρήσεις έχουν γίνει για το μόριο της θειορεδοξίνης (Haendeler et al., 2002). Σε υψηλές συγκεντρώσεις το NO προκαλεί οξειδωτικές τροποποιήσεις στο DNA, το RNA, τα λιπίδια και τις πρωτεΐνες, με αποτέλεσμα

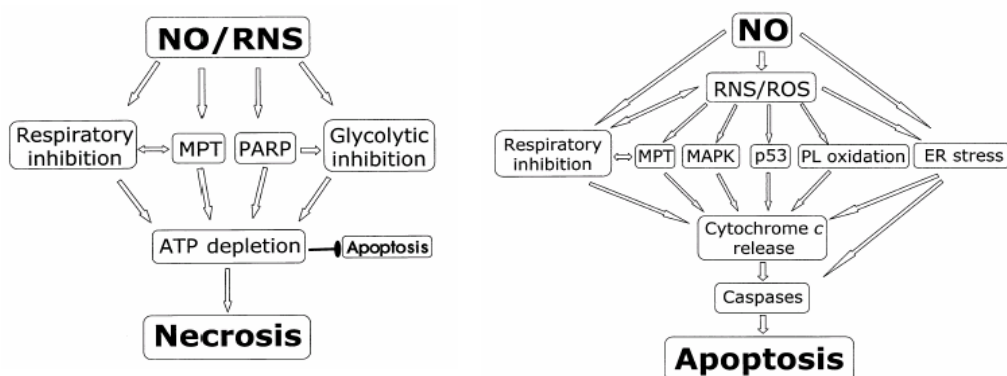
μεταλλάξεις και αλλοιώσεις στην δομή και την λειτουργία των πρωτεϊνών, γεγονός καθοριστικό για την ανάπτυξη του νεοπλασματικού φαινοτύπου (Ohshima et al., 2003; Patel et al., 1999). Για το λόγο αυτό ενδογενείς ή εξωγενείς παράγοντες όπως το Ca^{2+} , οι κυτοκίνες, η IFN- γ , ο TNF- α , οι IL-4, -8, και -10, ο TGF- α , τα κορτικοστεροειδή και τα οιστρογόνα ελέγχουν τοπικά και χρονικά τα επίπεδα της iNOS και κατ'επέκταση του NO, με αποτέλεσμα την απομάκρυνση των φλεγμονωδών παραγόντων και το ελάχιστο κόστος για τα κύτταρα. Ένας λεπτομερής μηχανισμός, μέσω του οποίου η συγκέντρωση του NO ([NO]) ρυθμίζεται και διατηρείται σε σχετικά σταθερά επίπεδα (συστατικό επίπεδο). Το τελικό αποτέλεσμα καθορίζει την τύχη των κυττάρων, καθώς διακυμάνσεις στην [NO] προκαλούν κυτταροτοξικότητα ή κυτταροστατικότητα (Colasanti and Suzuki, 2000).



Εικόνα 3.1.3. Μηχανισμός ενεργοποίησης του κυτταρικού θανάτου από το NO (Carreras et al., 2004).

Η δράση του NO εξαρτάται από πληθώρα παραγόντων, όπως τον ρυθμό παραγωγής και διακύσεώς του, την αλληλεπίδρασή του με άλλες ελεύθερες ρίζες, ιόντα μετάλλων και πρωτεΐνες, την παρουσία προστατευτικών ενζύμων (καταλάση και υπεροξειδική δισμουτάση), την ενδοκυττάρια συγκέντρωση γλουταθειόνης και τον κυτταρικό τύπο (Chen and Deen, 2001; Chen et al., 1998; Offer et al., 2002). Επιπλέον, η εξουδετέρωση των μορίων NO στον διακυτταρικό χώρο, η αυτοοξειδωσή του σε N_2O_3 και η μετατροπή του παρουσία ριζών υπεροξειδίου του υδρογόνου σε $ONOO_2^-$ καθορίζουν κατέχουν σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της δράσεώς του. Το NO και οι μεταβολίτες του ελέγχουν τόσο αποπτωτικές διαδικασίες, όπως επίσης μπορούν να λειτουργήσουν προστατευτικά, ανάλογα με την συγκέντρωσή τους και τον μελετώμενο κυτταρικό τύπο (Chung et al., 2001). Κύτταρα λεμφοβλαστώματος είναι πιο ευαίσθητα στην επαγωγή αποπτώσεως, σε αντίθεση με σειρές καρκίνου του ορθού, όπως η HCT116 (Li et al., 2002). Ακόμη, η απόκριση στο NO φαίνεται να είναι δοσοεξαρτώμενη: σε χαμηλές συγκεντρώσεις επάγει απόπτωση, ενώ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις νεκρωτικό θάνατο (Εικ. 3.1.4.), ενώ σε υπο-millimolar συγκεντρώσεις το NO είναι ικανό να επάγει απόπτωση σε μακροφάγα, αλλά όχι σε ηπατοκύτταρα (Brown and Borutaite, 2002; Cirino et al., 2003; Li and Billiar, 1999).

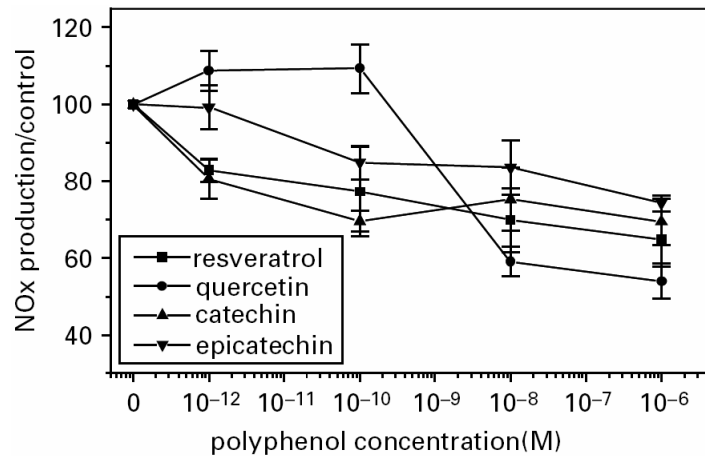
Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι το NO κατέχει σημαντικό ρόλο στην φυσιολογία των νεοπλασματικών κυττάρων, καθώς βοηθά τον μετασχηματισμό και τον πολλαπλασιασμό τους (Galli et al., 2003), ενώ ιδιαίτερα καθώς στους συμπαγείς όγκους έχει αναφερθεί αυξημένη έκφραση της ισομορφής iNOS. Η θετική συνεισφορά του NO στην ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων αποδίδεται στον χαμηλό ρυθμό μεταφοράς ηλεκτρονίων και την ατελή σύνθεση ATP από τα μιτοχόνδρια (Galli et al., 2003; Simonnet et al., 2002).



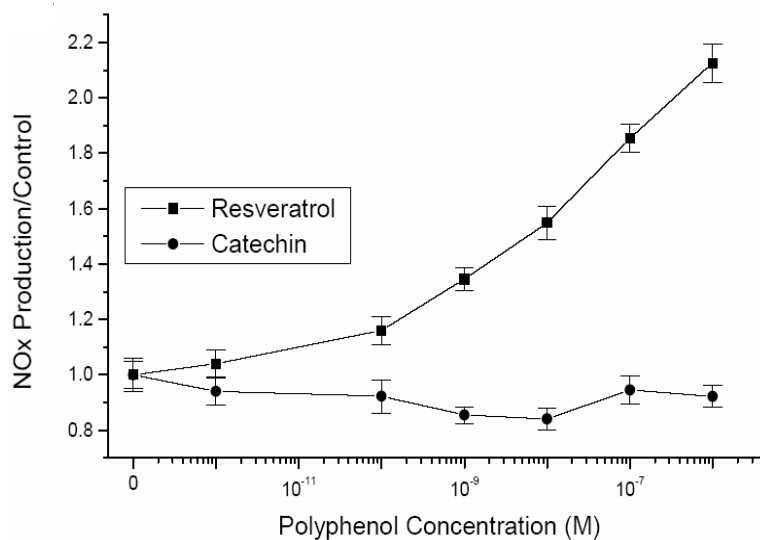
Εικόνα 3.1.4. Σχηματική παράσταση της επαγωγής κυτταρικού θανάτου, νεκρωτικού ή αποπτωτικού από το NO.

Δεδομένου ότι οι πολυφαινόλες εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση, ενώ παράλληλα μειώνουν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων, εξετάσαμε κατά πόσον είναι ικανές να αλληλεπιδρούν με το σύστημα NO/NOS.

Η ομάδα μας έχει δείξει ότι απλές φαινολικές ενώσεις (φαινολικά οξέα) έχουν την ιδιότητα να τροποποιούν το σύστημα NO/NOS και να μειώνουν μακροπρόθεσμα-μετά από 5 ημέρες-την παραγωγή NO_x (Καπρα et al., 2004). Εξετάσαμε αν οι πολυφαινόλες, παρά την πολυπλοκότερη χημική δομή τους, εμφανίζουν ανάλογη δράση. Στην κυτταρική σειρά T47D (Εικ. 3.1.5.), η catechin και η resveratrol αναστέλλουν την παραγωγή NO, ακόμη και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις (10⁻¹² M). Η μείωση αυτή είναι προοδευτική και εμφανίζεται μετά από 24 ώρες επώασης. Επώαση των κυττάρων με epicatechin είχε επίσης ως αποτέλεσμα την διατήρηση των επιπέδων του NO_x υπό τη βασική συγκέντρωση, αν και η δράση αυτή ήταν ασθενέστερη. Σε αντίθεση με τα υπόλοιπα μόρια, η quercetin φαίνεται να αυξάνει την παραγωγή NO_x σε συγκεντρώσεις 10⁻¹²-10⁻¹⁰ M. Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, ακολουθεί το πρότυπο των υπολοίπων πολυφαινολών, μειώνοντας έως και κατά 50% την παραγωγή νιτροομάδων.



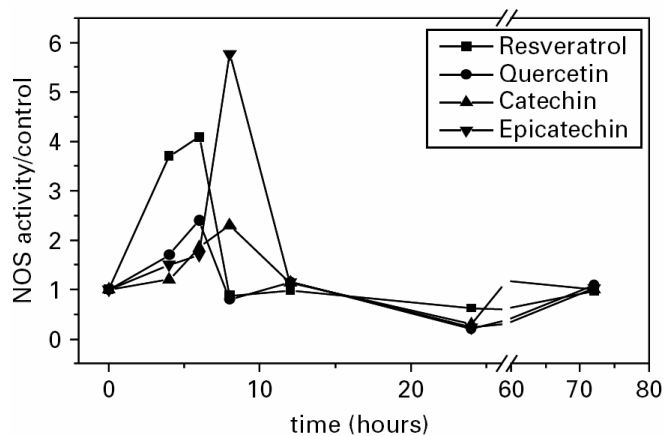
Εικόνα 3.1.5. Τροποποίηση της παραγωγής μεταβολιτών του NO από τα κύτταρα T47D, μετά από 3ήμερη επώαση με πολυφαινόλες.



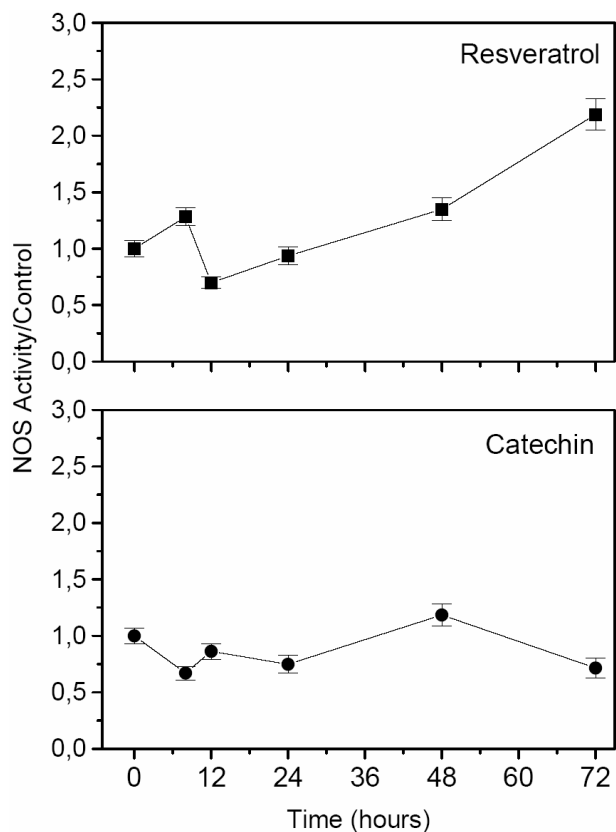
Εικόνα 3.1.6. Τροποποίηση της παραγωγής μεταβολιτών του NO από τα κύτταρα HepG2, μετά από 3ήμερη επώαση με πολυφαινόλες.

Αντιθέτως, στην σειρά ηπατώματος HepG2, παρατηρήθηκε αύξηση της παραγωγής NO (Εικ. 3.1.6.). Η παραγωγή NO_x φαίνεται ότι διαφοροποιείται στην πορεία του χρόνου, ανάλογα με την πολυφαινόλη. Το σιλβένιο resveratrol σε αντίθεση με τα φλαβονοειδή quercetin, catechin και epicatechin προκαλεί διαρκή αύξηση στην σύνθεση NO_x, με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Η αύξηση της παραγωγής του NO_x είναι αντιστρόφως ανάλογη του αριθμού των κυττάρων σε κάθε χρονική στιγμή και ακολουθεί το πρότυπο αναστολής του πολλαπλασιασμού των ηπατοκυττάρων στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις. Στην περίπτωση των φλαβονοειδών παρατηρούνται διακυμάνσεις στις συγκεντρώσεις των μεταβολιτών του NO: στις πρώτες 48 ώρες φαίνεται ότι επάγεται η σύνθεση NO_x, ενώ κατόπιν παρατηρείται πτώση των επιπέδων NO_x. Διακρίνουμε ότι η δράση των πολυφαινολών στο σύστημα του NO εξαρτάται όπως και στην περίπτωση της κυττόστασης από το μελετώμενο κυτταρικό σύστημα.

Οι διακυμάνσεις στην συγκέντρωση των μεταβολιτών του NO μπορεί να οφείλονται στην δράση των πολυφαινόλων τόσο σε ενζυμικό επίπεδο, όσο και στην μεταγραφική ενεργοποίηση ή καταστολή των συνθασών του NO (NOS). Για τον λόγο αυτό, ελέγξαμε καταρχήν την επίδραση των πολυφαινόλων στην συνολική ενζυμική δραστικότητα των NOS.



Εικόνα 3.1.7. Τροποποίηση της ενζυμικής δραστικότητας των NOS στα κύτταρα T47D, μετά από επώαση με πολυφαινόλες (10^{-7} M).



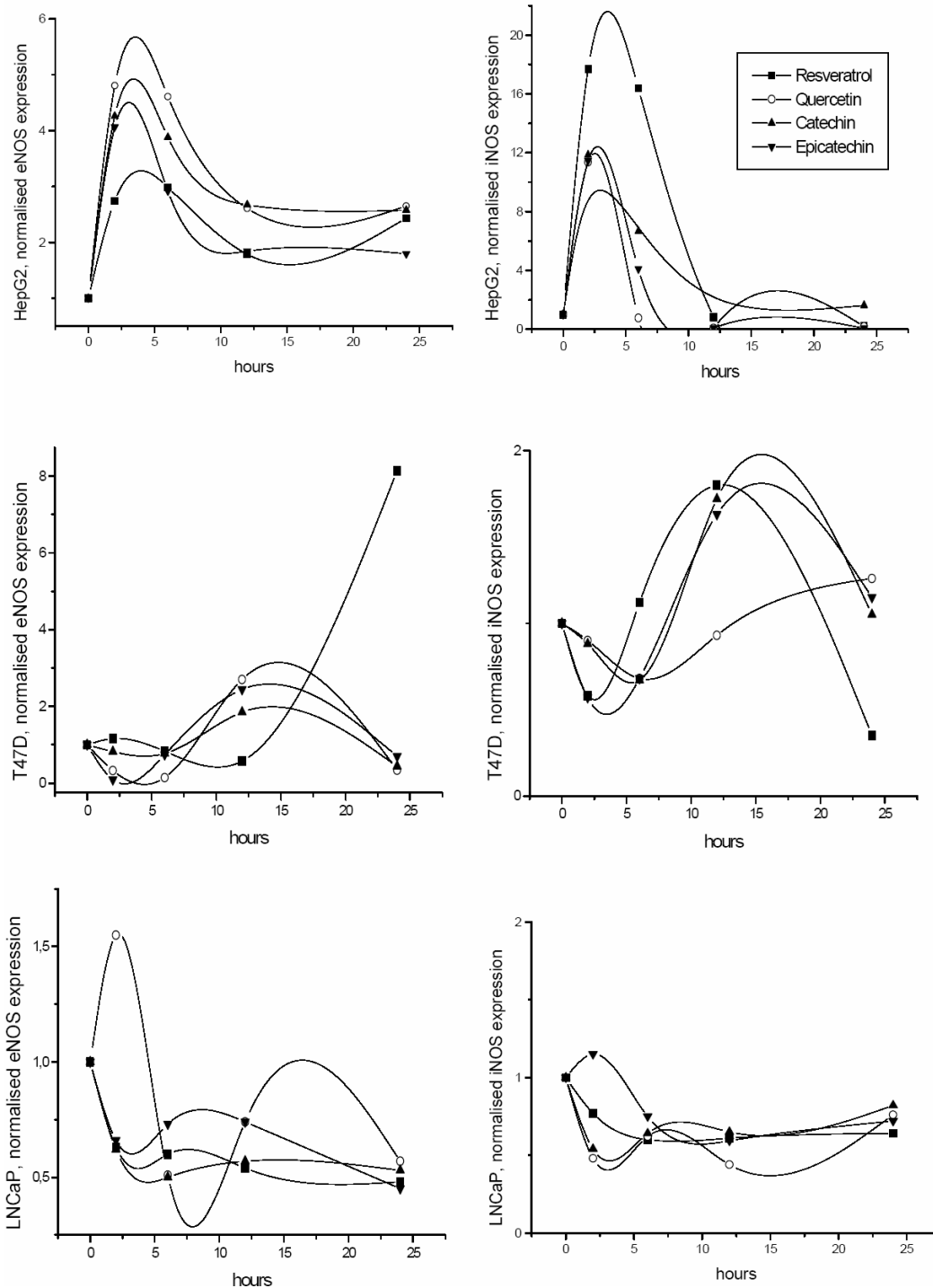
Εικόνα 3.1.8. Τροποποίηση της ενζυμικής δραστικότητας των NOS στα κύτταρα HepG2, μετά από επώαση με πολυφαινόλες (10^{-7} M).

Επίπωση των κυττάρων T47D με πολυφαινόλες (10^{-7} M) για χρονικό διάστημα άνω των 24 ωρών μειώνει την συνολική ενεργότητα των NOS (eNOS και iNOS) (Εικ. 3.1.7.). Βραχυπρόθεσμα όμως, όλες οι ουσίες βρέθηκε να επάγουν προσωρινά την δραστικότητα του συστήματος. Η resveratrol και η quercetin εμφάνισαν μέγιστη δράση μετά από 8 ώρες, ενώ οι φλαβανόλες μετά από 12 ώρες. Αντιθέτως, στην κυτταρική σειρά HepG2, οι πολυφαινόλες εμφανίζουν διφασική δράση στην ενεργότητα των NOS (Εικ. 3.1.8.). Το σιλιβένιο ενίσχυσε σημαντικά την δραστικότητά τους, αν και η δράση του δεν είναι συνεχής, καθώς εμφανίζονται δύο κορυφές στις 8 και 48 ώρες. Αντίθετα, τα φλαβονοειδή καταστέλλουν βραχυπρόθεσμα την δραστικότητα των συνθασών, η οποία επανέρχεται και υπερβαίνει τα βασικά επίπεδα μετά τις 48 ώρες. Τα αποτελέσματα αυτά δεν εξηγούν πλήρως τις διακυμάνσεις των NO_x στο υπερκείμενο των καλλιιεργειών. Για τον λόγο αυτό, εξετάσαμε περαιτέρω την πιθανή ρύθμιση των ισομορφών eNOS και iNOS σε μεταγραφικό επίπεδο.

Ημιποσοτική εκτίμηση της έκφρασης των eNOS και iNOS με RT-PCR, έδειξε ότι οι πολυφαινόλες επάγουν την μεταγραφή τους στη σειρά T47D κατά τις πρώτες 12 ώρες, ενώ αργότερα η έκφρασή τους επανέρχεται στα επίπεδα του μάρτυρα (Εικ. 3.1.9.), με κάποιες διαφοροποιήσεις. Στην περίπτωση του σιλιβενίου, παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης της eNOS, έως και οκταπλάσια σε σχέση με τον μάρτυρα, μετά από 24 ώρες.

Στην σειρά προστάτου, παρατηρήθηκε ασθενής επαγωγή της ενδοθηλιακής ισομορφής, 2 ώρες μετά την εφαρμογή της resveratrol. Στις υπόλοιπες περιπτώσεις, η μεταγραφή των δύο ενζύμων μειώθηκε υπό το συστατικό επίπεδο.

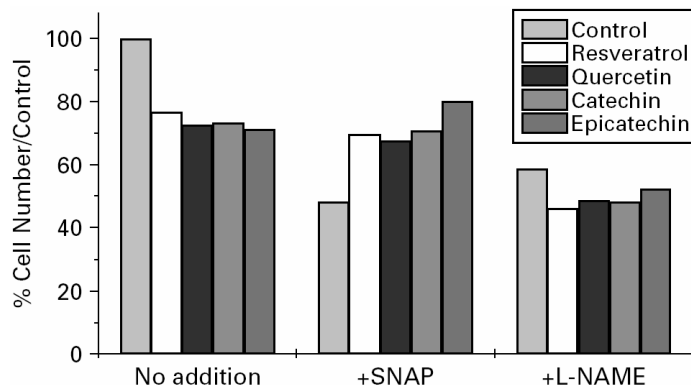
Στην κυτταρική σειρά HepG2, όλες οι πολυφαινόλες ενίσχυσαν παροδικά την έκφραση των ενζύμων, με μέγιστη απόκριση στις 2-4 ώρες. Μετά τις 12 ώρες, η έκφραση των NOS επανήλθε στο επίπεδο του μάρτυρα. Ειδικότερα, το σιλιβένιο resveratrol προκάλεσε ασθενέστερη, αλλά παρατεταμένη αύξηση της έκφρασης της eNOS και εντονότερη -και οξύτερη- επαγωγή της iNOS. Συγκριτικά, τα φλαβονοειδή ενίσχυσαν περισσότερο την έκφραση της eNOS σε σχέση με την iNOS.



Εικόνα 3.1.9. Τροποποίηση της έκφρασης των eNOS και iNOS στα κύτταρα μαστού (T47D), προστάτου (LNCaP) και ηπατώματος (HepG2), μετά από επώαση με πολυφαινόλες (10^{-7} M), για διάστημα 2-24 h.

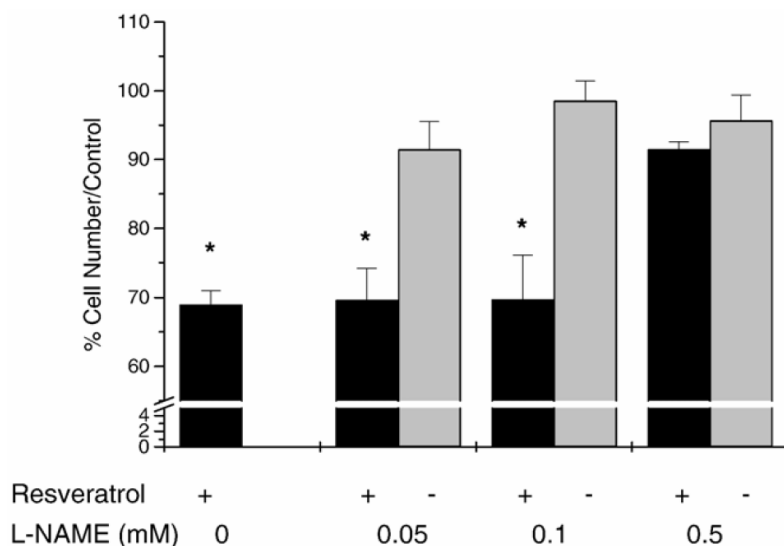
Στο επόμενο στάδιο ελέγξαμε την σημασία αυτής της δράσης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Επώασαμε ταυτόχρονα τα κύτταρα με ένα δότη NO⁻ το σταθερό ανάλογο των ενδογενών S-nitroso compounds, SNAP [(S)-Nitroso-N-acetylpenicillamine]- ή με έναν μη ειδικό αναστολέα των NOS - L-NAME [N^G-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride] - διατηρώντας την συγκέντρωση των πολυφαινολών στα 10^{-7} M. *Per se*, τόσο το SNAP, όσο και το L-NAME ανέστειλαν τον πολλαπλασιασμό των T47D. Σε ταυτόχρονη όμως χορήγησή

τους με τις πολυφαινόλες, η περίσσεια NO_x ανέστειλε την αντιπολλαπλασιαστική δράση των πολυφαινολών, ενώ η αναστολή των NOS την ενίσχυσε (Εικ. 3.1.10.). Κατά συνέπεια, αν και οι πολυφαινόλες ρυθμίζουν πολλαπλώς το σύστημα NO/NOS, καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των T47D μέσω μακροχρόνιας αναστολής της παραγωγής NO_x.



Εικόνα 3.1.10. Τροποποίηση της αντιπολλαπλασιαστικής δράσεως των πολυφαινολών (10^{-7} M) στα κύτταρα T47D, μετά από συνεπάωση με δότη NO (SNAP) ή μη ειδικό αναστολέα των NOS (L-NAME).

Στην περίπτωση της σειράς HepG2, οι πολυφαινόλες ενίσχυσαν την παραγωγή NO και βραχυπρόθεσμα την ενεργότητα και την μεταγραφή των συνθασών του. Καλλιέργεια των κυττάρων παρουσία του γενικού αναστολέα των NOS L-NAME, σε συγκεντρώσεις 0,05-0,5 mM, δεν επηρέασε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Αντιθέτως, συνεπάωση των κυττάρων με πολυφαινόλες (10^{-7} M) σε συνδυασμό με L-NAME (Εικ. 3.1.11.) είχε ως αποτέλεσμα την αναστροφή της δράσεως των πολυφαινολών. Συνεπώς, η αντιπολλαπλασιαστική δράση των πολυφαινολών στα κύτταρα HepG2 οφείλεται στην αυξημένη σύνθεση NO.



Εικόνα 3.1.11. Τροποποίηση της αντιπολλαπλασιαστικής δράσεως της resveratrol (10^{-7} M) στα κύτταρα HepG2, μετά από συνεπάωση με τον μη ειδικό αναστολέα των NOS L-NAME.

3.1.3. Συζήτηση

Εργαστηριακά και επιδημιολογικά δεδομένα συγκλίνουν στην αντιπολλαπλασιαστική δράση των διαιτητικών αντιοξειδωτικών πολυφαινολών (Arts and Hollman, 2005). Η αντίστοιχη δράση του κόκκινου κρασιού οφείλεται στις πολυφαινόλες που περιέχει, με κύρια την resveratrol και τα φλαβονοειδή catechin, epicatechin και quercetin. Τα φλαβονοειδή περιέχονται σε συγκεντρώσεις 160, 70 και 9πλάσιες σε σχέση με την resveratrol (Miller and Rice-Evans, 1995).

Η ομάδα μας έδειξε ότι οι ουσίες αυτές είναι ικανές να αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό ορμονοευαίσθητων καρκινικών κυττάρων μαστού T47D, σε συγκεντρώσεις ανάλογες με αυτές που παρατηρούνται στο πλάσμα μετά από μέτρια κατανάλωση κρασιού. Η αντιπολλαπλασιαστική δράση των πολυφαινολών σε υπομικρομοριακές συγκεντρώσεις, πιθανόν οφείλεται στην καθαρότητα των ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν. Ένας επιπλέον παράγοντας, ο οποίος πρέπει να αξιολογηθεί στην παρούσα μελέτη είναι η «μακροπρόθεσμη» εκδήλωση της αποπτώσεως (μετά από 3-6 ημέρες). Συνήθως, η δράση πληθώρας υποψηφίων αντινεοπλαστικών ουσιών, συμπεριλαμβανομένων και των πολυφαινολών, εξετάζεται βραχυπρόθεσμα. Πρόσφατα, οι Shioda et al. δημοσίευσαν ότι στην καρκινική σειρά μαστού MCF-7 τόσο τα οιστρογόνα όσο και τα φυτοοιστρογόνα (ισοφλαβανόνες) είναι ικανά να ρυθμίζουν μακροπρόθεσμα την μεταγραφική δραστηριότητα και να καθορίζουν στο αντίστοιχο χρονικό πλαίσιο την πορεία των κυττάρων (Shioda et al., 2006). Στην παρούσα μελέτη, οι πολυφαινόλες resveratrol, quercetin, catechin και epicatechin οδήγησαν τα κύτταρα T47D σε απόπτωση μέσω κυττόστασης στην φάση S. Ανάλογες παρατηρήσεις έχουν γίνει στην κυτταρική σειρά μαστού MCF-7 (Kim et al., 2004; Pozo-Guisado et al., 2002). Αντιθέτως, επώση των κυττάρων με μικρομοριακές συγκεντρώσεις πολυφαινολών, φαίνεται ότι προκαλεί κυττόσταση στις φάσεις G₁/G₀ ή G₂/M. Ο μοριακός μηχανισμός δράσης των πολυφαινολών δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί. Οι ουσίες που μελετήθηκαν έχουν την ικανότητα πρόσδεσης στους ενδοκυττάριους υποδοχείς οιστρογόνων (Damianaki et al., 2000; Gehm et al., 1997; Kuo, 1997), μέσω των οποίων ρυθμίζουν την απόκριση ορμονοευαίσθητων κυττάρων. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι έχουν την ιδιότητα να ενεργοποιούν παράλληλους μηχανισμούς, ανεξάρτητους από τον ER, που εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Levenson et al., 2003). Στις σειρές μαστού S30, T47D και LY2, η resveratrol εμφανίζει μικτή οιστρογονική δράση απουσία οιστραδιόλης, ενώ απουσία οιστρογόνων συμπεριφέρεται ως ανταγωνιστής (Bhat et al., 2001). Στα κύτταρα MCF-7, η resveratrol αναστέλλει την μετα-μεταγραφική τροποποίηση του p53 και την επακόλουθη απόπτωση παρουσία E₂ (Zhang et al., 2004) και ρυθμίζει την έκφραση μίας σειράς γονιδίων που αλληλεπιδρούν με την μεταγωγή σήματος μέσω του BRCA1(BRCA1, BRCA2, ERalpha, ERbeta, p53, p21(waf1/cip1), CBP/P300, RAD51, pS2 και Ki67) (Le Corre et al., 2004). Επίσης, η quercetin, κατ'αναλογία με την E₂, έχει την ικανότητα να ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που συνδέονται με την ανάπτυξη των

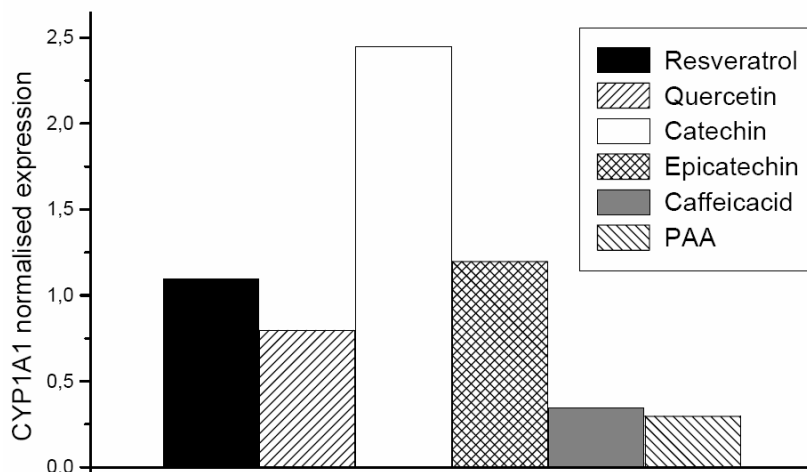
κυττάρων, όπως το c-fos, μέσω του ομολόγου του μεμβρανικού υποδοχέα GPR30 και της ενεργοποίησης πρωτεϊνών G (Maggiolini et al., 2004).

Η αντιπολλαπλασιαστική δράση των πολυφαινολών στον καρκίνο του μαστού πιθανόν να διαμεσολαβείται από το σύστημα NO/NOS (Kampa et al., 2000; Kawada et al., 1998; Visioli et al., 1998), το οποίο τροποποιεί πλήθος μεταγραφικών παραγόντων και συντονίζει την γονιδιακή έκφραση, ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο και την φάση των κυττάρων (Ahmad et al., 1997; Ho et al., 1997). Ο ρόλος του NO στον καρκίνο του μαστού είναι αμφιλεγόμενος (Wink and Mitchell, 1998; Wink et al., 1998). Έχει δειχθεί ότι αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, επάγει την διαφοροποίηση και μειώνει τον μεταστατικό δείκτη σε πληθώρα καρκινικών σειρών, ανάλογα με τον τύπο και την προέλευσή τους (Adami et al., 1998; Pance, 2006; Reveneau et al., 1999). Σε αρκετές νεοπλασίες παρατηρείται αυξημένη έκφραση των NOS (Ambs et al., 1998), η οποία σχετίζεται με υψηλή μεταστατικότητα και αγγειογένεση (Duenas-Gonzalez et al., 1997; Jenkins et al., 1995). Η επαγόμενη μορφή της NOS έχει επίσης συσχετισθεί με την επιθετικότητα των γυναικολογικών καρκίνων (Pance, 2006; Reveneau et al., 1999; Thomsen et al., 1994). Ωστόσο, σε άλλους τύπους κυττάρων η περίσσεια NO παρεμποδίζει την αγγειογένεση και αυξάνει την απόπτωση, ενώ χαμηλή συγκέντρωση NO επάγει την νεοαγγειογένεση. Ειδικότερα στον καρκίνο του μαστού, η επαγόμενη μορφή της συνθάσης του NO (iNOS) φαίνεται ότι παρεμποδίζει την μετάσταση σε πειραματικά μοντέλα, ενώ η έκφραση της συστατικής ισομορφής (eNOS) είναι ενδεικτική του σταδίου του καρκίνου (Tschugguel et al., 1999). Στο πειραματικό μοντέλο καρκίνου του μαστού σε επίμυς C3H/HeJ mice, η ενεργοποίηση του μονοπατιού NOS/GC/MAPK ευνοεί την μετανάστευση των κυττάρων C3L5, ενώ χορήγηση του αναστολέα των NOS L-NAME καταστέλλει το φαινόμενο (Jadeski et al., 2003). Στην κυτταρική σειρά μαστού MDA-MB-231, ο δότης NO DETA-NONONOate, επάγει κυττόσταση στην φάση G1, μέσω μείωσης της έκφρασης της κυκλίνης D1 και της υποφωσφορυλίωσης της Rb (Pervin et al., 2001). Στις σειρές BT-20 και MCF-7, το NO προκαλεί απόπτωση μέσω ενεργοποίησης των κασπασών 1,3 και 6 (Umansky et al., 2000).

Τα δεδομένα μας δείχνουν ότι τα κύτταρα της σειράς T47D είναι εξίσου ευαίσθητα στην περίσσεια ή έλλειψη NO, αφού τόσο ο δότης NO SNAP, όσο και ο αναστολέας των NOS L-NAME έχουν αντιπολλαπλασιαστική δράση. Εντούτοις, η αντίστοιχη δράση των πολυφαινολών σχετίζεται με την αναστολή της παραγωγής NO (Εικ. 3.1.11.). Το φαινόμενο αυτό θα μπορούσε να οφείλεται σε άμεση αλληλεπίδραση με το μόριο των NOS. Εντούτοις, όπως φαίνεται στην Εικ. 3.1.9., η παράλληλη ρύθμιση της έκφρασης των ισομορφών των συνθασών του NO, προϋποθέτει την ύπαρξη ενός πολυπλοκότερου μηχανισμού.

Οι πολυφαινόλες έχει επίσης βρεθεί ότι ρυθμίζουν την ενεργότητα διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων, όπως του ER και του AhR (Kampa et al., 2004). Σε αυτό το επίπεδο, έχει αναφερθεί ότι συγκλίνει και το σύστημα NO/NOS, καθώς καταστολή της παραγωγής NO οδηγεί σε επαγωγή και σταθεροποίηση του p53 και εντέλει σε αναστροφή του νεοπλαστικού

φαινοτύπου (Calmels et al., 1997). Προκαταρκτική ανάλυση της ενεργοποίησης του AhR, μέσω της ρύθμισης της μεταγραφής των γονιδίων-στόχων του (π.χ. CYP1A1) έδειξαν ότι οι πολυφαινόλες, σε αντίθεση με τα φαινολικά οξέα επάγουν την έκφραση του CYP1A1 (Εικ. 3.1.12.).



Εικόνα 3.1.12. Ρύθμιση της μεταγραφικής δραστηριότητας του AhR, μέσω της έκφρασης του CYP1A1 μετά από 24ωρη επίδραση με πολυφαινόλες ή φαινολικά οξέα (10^{-7} M) στα κύτταρα T47D (PAA: 3,4-dihydroxy-phenylacetic acid).

Η ενεργοποίηση ακόμη των κινασών AKT και MAPK από τις πολυφαινόλες έχει σχετισθεί με την μείωση της έκφρασης του παράγοντα HIFa (hypoxia-inducible factor-a) (Cao et al. 2004). Καθώς, η σταθερότητα του HIF-a εξαρτάται από μικρές διακυμάνσεις στις συγκεντρώσεις του NO και την πυκνότητα της καλιέργειας (Thomas et al. 2004), τα φλαβονοειδή θα μπορούσαν να καθορίσουν μέσω αυτού του μηχανισμού την τύχη των κυττάρων.

Σε αντίθεση με τις καρκινικές σειρές μαστού και προστάτου, ελάχιστα δεδομένα υπάρχουν σχετικά με την εμπλοκή των πολυφαινολών στον καρκίνου του ήπατος. Οι Carbo et al έδειξαν ότι χορήγηση resveratrol σε ασκίτες από μεταμοσχευμένα κύτταρα ηπατώματος σε αρουραίους ελάττωσε σημαντικά το μέγεθος των όγκων (Carbo et al., 1999), προκαλώντας κυττόσταση στην φάση G_2/M . Ανάλογη δράση είχε το σιλβένιο στην σειρά ηπατώματος H22, επάγοντας δοσο- και χρονοεξαρτώμενη απόπτωση (Sun et al., 2002), όπως επίσης στο ηπάτωμα αρουραίου (FaO) και στην ανθρώπινη σειρά HepG2, καθυστερώντας την είσοδο στην μίτωση (Delmas et al., 2000). Επιπροσθέτως, η resveratrol μειώνει την συσσωμάτωση και διήθηση των κυττάρων σε απόκριση στον HGF (Hepatocyte Growth Factor), ρυθμίζοντας την σηματοδότηση του υποδοχέα (De Ledinghen et al., 2001). Ακόμη, η προσθήκη ορού από αρουραίους, στους οποίους χορηγήθηκε resveratrol, στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας κυττάρων AH109A ανέστειλε την μετανάστευση των κυττάρων, δεν είχε όμως κανένα αποτέλεσμα στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (Kozuki et al., 2001).

Στην παρούσα εργασία, οι resveratrol, epicatechin, quercetin και σε μικρότερο βαθμό η catechin παρεμπόδισαν την είσοδο των κυττάρων HepG2 στην φάση S, προκαλώντας συσσώρευσή τους στην φάση G₁. Η κυτταροστατική δράση της resveratrol έχει περιγραφεί για διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου: στην G₁ (Kotha et al., 2006), την S (Estrova et al., 2003; Hsieh et al., 1999; Wolter et al., 2001) ή την G₂/M (Ahmad et al., 2001; Delmas et al., 2000; Liang et al., 2003). Η συγκέντρωση του στυλβενίου φαίνεται ότι καθορίζει το τελικό αποτέλεσμα. Οι Delmas έδειξαν ότι επάγει μείωση της φάσης S σε συγκεντρώσεις >50 μM (Delmas et al., 2000), γεγονός το οποίο παρατηρήθηκε και στην περίπτωση μας σε συγκέντρωση 10⁻⁷ M.

Η resveratrol έχει δειχθεί επίσης ότι καταστέλλει (Chung et al., 2003; Kageura et al., 2001) ή επάγει (Hattori et al., 2002; Holian et al., 2002; Hsieh et al., 1999; Wallerath et al., 2002) την παραγωγή NO. Στην παρούσα μελέτη, η αναστολή των NOS αναστρέφει την δράση των πολυφαινόλων, καταδεικνύοντας την άμεση εμπλοκή του NO στην ρύθμιση της απόπτωσης στα HepG2. Επιπροσθέτως, οι πολυφαινόλες φαίνεται ότι επηρεάζουν και την έκφραση των ενζύμων NOS. Προηγούμενες μελέτες αναφέρουν ότι τα φλαβονοειδή ρυθμίζουν την έκφραση της iNOS (Chan et al., 2000; Cho et al., 2002; Kampa et al., 2000; Tsai et al., 1999). Η αύξηση των NOS θα μπορούσε να ενεργοποιήσει περαιτέρω σηματοδοτικούς μηχανισμούς, οι οποίοι ελέγχουν την κυτταρική διαίρεση. Η αποπτωτική δράση της resveratrol έχει δειχθεί στα κύτταρα HepG2 (εκφράζουν p53), αλλά όχι στα HeP3B (αρνητικά για p53) και σχετίζεται με την ενεργοποίηση του p21 από το p53 και την κυττόσταση στην φάση G1 (Kuo et al., 2002). Η ενεργοποίηση του p53 θα μπορούσε να εμπλέκεται στην επαγόμενη από το NO απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα μαστού (Mortensen et al., 1999). Εναλλακτικά, η δράση των πολυφαινόλων θα μπορούσε να διαμεσολαβείται από τον NF-κB (Uchida et al., 2005), αν και στην περίπτωση των κυτταρικών σειρών μαστού και προστάτου, ο συγκεκριμένος μεταγραφικός παράγοντας δεν είναι λειτουργικός.

Παρά την επιβλαβή τους δράση, οι ελεύθερες ρίζες αζώτου (RNS) συμβάλλουν στην φυσιολογία και την ανάπτυξη των ηπατοκυττάρων. Υπερπαραγωγή τους προκαλεί νιτροσουλίωση του DNA, των λιπιδίων και των πρωτεϊνών, η έκταση των οποίων μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο (Yen and Lai, 2003). Εντούτοις, το τελικό αποτέλεσμα εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο, την παρουσία ριζών οξυγόνου (ROS), τα ιόντα μετάλλων και τις πρωτεΐνες που τις απενεργοποιούν (Hofseth et al., 2003). Σε καρκινικές σειρές παγκρέατος, ορθού, μαστού, στομάχου και ουροδόχου κύστεως η αυξημένη παραγωγή του NO αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Iishi et al., 1998), ενώ σε σειρές λεμφώματος ή παχέος εντέρου μετασχηματισμένες με το γονίδιο της iNOS επάγει την ανάπτυξη (Jenkins et al., 1995). Στο ήπαρ, υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα κύτταρα εκφράζουν σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις και τις δύο ισομορφές των NOS (McNaughton et al., 2002). Σε περίπτωση λοιμώξεων ή τραυματισμού, παρατηρείται αύξηση της

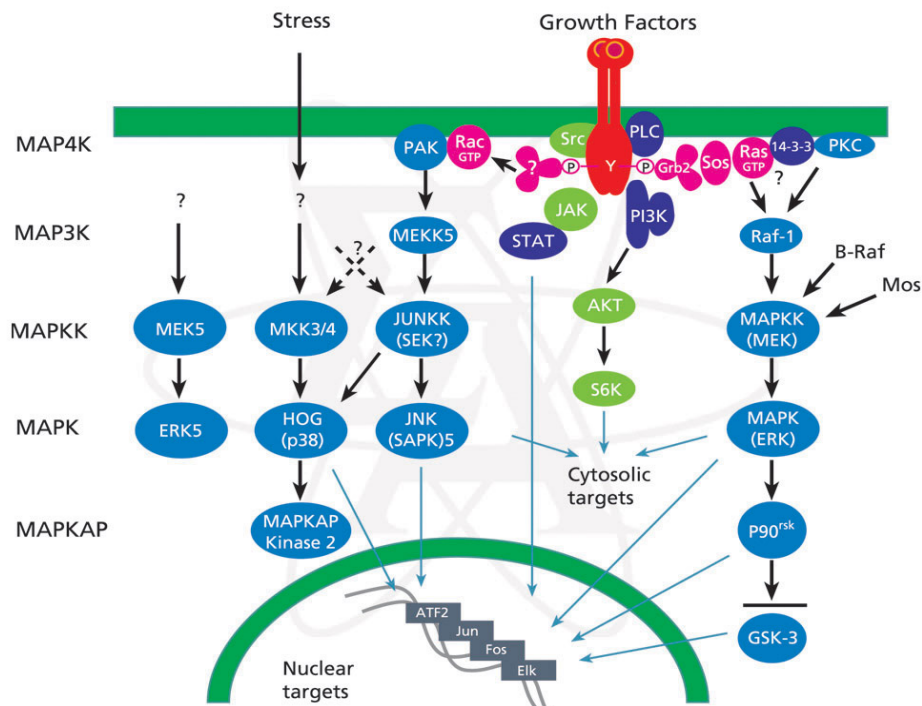
ενδοθηλιακής συνθάσης και επακόλουθη ενεργοποίηση της επαγόμενης μορφής του ενζύμου. Το γεγονός αυτό συνδέεται με την εκδήλωση ηπατοπάθειας (Martin-Sanz et al., 2002). Παρόλα ταύτα, μέτρια αύξηση των επιπέδων του NO μετά από ηπατεκτομή ή στο οξειδωτικό stress μπορεί να λειτουργήσει προστατευτικά (Vodovotz et al., 2004). Επώαση των κυττάρων HepG2 με δότες NO, έδειξε ότι το NO λειτουργεί ως αισθητήρας των επιπέδων των ελευθέρων ριζών και ρυθμίζει την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1 (Genius and Fandrey, 2000). Αντιθέτως, οι αναστολείς των NOS φαίνεται ότι προστατεύουν τα HepG2 από αποπτωτικό θάνατο (όπως δείξαμε στην παρούσα μελέτη), όταν συγκαλλιεργούνται με ακτινοβολημένα κύτταρα (Hirakawa et al., 2002). Ο μηχανισμός που διαμεσολαβεί την αποπτωτική δράση του NO περιλαμβάνει την αύξηση της μιτοχονδριακής διαπερατότητας (Jiang et al., 2004) ή μείωση της πρόσδεσης του HNF-4α στο DNA (Lucas Sd et al., 2004). Συνεπώς, το NO διαδραματίζει προ- ή αντιαποπτωτικό ρόλο, ανάλογα με την τοπική του συγκέντρωση (Jenkins et al., 1995).

Εν κατακλείδι, η δράση των πολυφαινολών στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό φαίνεται να διαμεσολαβείται από το σύστημα NO/NOS. Ωστόσο, καθώς οι διατροφικοί αυτοί παράγοντες επηρεάζουν τόσο σε ενζυμικό, όσο και σε μεταγραφικό επίπεδο την παραγωγή του NO, είναι πιθανόν να επηρεάζουν πολλαπλώς την ενδοκυττάρια σηματοδότηση. Κύριο χαρακτηριστικό της δράσεως των πολυφαινολών, σε σχέση με κλασσικούς κυττοτοξικούς παράγοντες, είναι η υστέρηση στην εμφάνιση της απόπτωσης. Η αντιπολλαπλασιαστική τους δράση είναι εμφανής μετά από δύο κυτταρικές διαιρέσεις, γεγονός το οποίο καταδεικνύει την ευαισθητοποίηση των κυττάρων μετά από παρατεταμένη έκθεση σε αυτές. Επιπλέον, οι διαφοροποιήσεις στην δραστηριότητα και την συγκέντρωση των συνθασών του NO και κατ'επέκταση στην παραγωγή του NO, αντικατοπτρίζουν τις μεταβολικές ιδιαιτερότητες κάθε κυτταρικής σειράς, παρά τις οποίες οι πολυφαινόλες είναι δραστικές και οδηγούν στο αυτό τελικό αποτέλεσμα. Συνεπώς, οι πολυφαινόλες θα μπορούσε να εμπλέκονται και στην ρύθμιση παράλληλων σηματοδοτικών μηχανισμών, οι οποίοι εξετάζονται στην συνέχεια.

3.1.4. Ενεργοποίηση ενδοκυττάρων μηχανισμών μεταγωγής σήματος

Η ενεργοποίηση των NOS, όπως επίσης η ρύθμιση της εκφράσεώς τους, αλλά και η σηματοδότηση μέσω αυτών περιλαμβάνει ενδοκυττάριας οδούς σηματοδοτήσεως, μέσω των οποίων ρυθμίζεται η κυτταρική ομοιόσταση και επιβίωση. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνεται το μονοπάτι μεταγωγής σήματος των MAP κινασών (Εικ. 3.1.13.), το οποίο ενεργοποιείται υπό

συνθήκες stress (Pearson and Cobb, 2002; Seger and Krebs, 1995; Tamura et al., 2002) και εμπλέκεται στην σηματοδότηση των αντιοξειδωτικών πολυφαινολών (Williams et al., 2004).



Εικόνα 3.1.13. Το μονοπάτι των MAP κινασών και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μελών του (SIGMA).

Στο παρόν σύστημα, προκαταρκτική ανάλυση της ενεργοποίησης σηματοδοτικών μορίων έδειξε ότι οι πολυφαινόλες ενεργοποιούν ταχέως μετά την εφαρμογή τους τα μόρια c-src (2 min), MEK1/2 (20 min) και PI3K (30 min). Αν και παρατηρείται υστέρηση στην διαδοχική φωσφορυλίωση των κινασών, τα δεδομένα μας υποστηρίζουν την ενεργοποίηση μεμβρανικών θέσεων από τις πολυφαινόλες και την εμπλοκή κινασών στην ενδοκυττάρια σηματοδότηση.

3.2 ΤΑΧΕΙΑ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΣΤΟ ΕΠΙΠΕΔΟ ΤΗΣ ΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ	101
3.2.1. ΚΥΤΤΑΡΟΣΚΕΛΕΤΟΣ ΑΚΤΙΝΗΣ	101
3.2.1.1. Δομή και λειτουργία	101
3.2.1.4. Δομές F-actin	104
3.2.1.4.1. Ινίδια και ίνες	104
3.2.1.4.2. Δέσμες	104
3.2.1.4.3. Λαμελλιπόδια-Λαμέλλα-Αψίδα	105
3.2.1.4.4. Φιλοπόδια-Μικροακίδες	106
3.2.1.5. Ρυθμιστικές πρωτεΐνες	106
3.2.2. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΜΕ ΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΟΣΚΕΛΕΤΟ ΑΚΤΙΝΗΣ	111
3.2.2.1. Μετανάστευση	111
3.2.2.2. Διήθηση και αγγειογένεση	114
3.2.3. ΣΤΕΡΟΕΙΔΗ	116
3.2.3.1. Μηχανισμοί δράσεως στεροειδών	116
3.2.3.2. Δομή μεμβρανικών υποδοχέων στεροειδών	117
3.2.3.3. Στεροειδικές δράσεις των πολυφαινολών	120
3.2.4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	124
3.2.5. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΗΣ ΤΑΧΕΙΑΣ ΔΡΑΣΕΩΣ ΤΩΝ ΟΛΙΓΟΜΕΡΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΑΝΔΡΟΓΟΝΩΝ	127
3.2.5.1. Πρώιμα αποτελέσματα	127
3.2.5.1.1. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός	127
3.2.5.1.2. Αντιοξειδωτική δράση	128
3.2.5.1.3. Τροποποίηση του κυτταροσκελετού της ακτίνης	129
3.2.5.2. Διαλογή μεμονωμένων πολυφαινολών	131
3.2.5.2.1. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός	131
3.2.5.2.2. Αντιοξειδωτική δράση	132
3.2.5.1.3. Τροποποίηση του κυτταροσκελετού της ακτίνης	136
3.2.6. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΜΕ ΤΙΣ ΜΕΜΒΡΑΝΙΚΕΣ ΘΕΣΕΙΣ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΤΩΝ ΑΝΔΡΟΓΟΝΩΝ	141
3.2.6.1. Μεμβρανικές θέσεις πρόσδεσης στεροειδών	141
3.2.6.1.1. Ανίχνευση	141
3.2.6.1.2. Βιολογική δράση	142
3.2.6.2. Ανταγωνιστική πρόσδεση των μονομερών και διμερών φλαβονολών στις μεμβρανικές θέσεις πρόσδεσης ανδρογόνων στα κύτταρα T47D	142
3.2.6.2.1. Πρόσδεση των πολυφαινολών σε μεμβρανικούς υποδοχείς ανδρογόνων	143
3.2.6.1.2. Επίδραση των μονομερών και διμερών φλαβονολών στον κυτταροσκελετό ακτίνης	144
Εκτίμηση της αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού με ανοσοφθορισμό	144
Ανοσοεντύπωμα ποσοτική εκτίμηση του πολυμερισμού της ακτίνης με ανοσοεντύπωμα	145
3.2.6.1.3. Αλληλεπίδραση των πολυφαινολών με σηματοδοτικούς μηχανισμούς	145
3.2.6.1.4. Φυσιολογικός ρόλος της αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού	147
3.2.6.1.5. Συζήτηση	148
3.2.7. IN VIVO ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΔΙΜΕΡΩΝ ΦΛΑΒΑΝΟΛΩΝ	152

3.2 ΤΑΧΕΙΑ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΣΤΟ ΕΠΙΠΕΔΟ ΤΗΣ ΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ

Οι πολυφαινόλες εκτός της μακροπρόθεσμης δράσεώς τους στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων (εμφανής μετά από 1-3 ημέρες), επηρεάζουν την μεταστατικότητα τους και την ικανότητα προσκόλλησής τους σε ποικιλία υποστρωμάτων. Η μετακίνηση και η αγκυροβόληση των κυττάρων εξαρτάται κυρίως από την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, η οποία πυροδοτείται από εξωγενή-εξωκυττάρια ερεθίσματα και διαμεσολαβείται από τους αντίστοιχους μεμβρανικούς υποδοχείς ή ιδιοδεκτικούς αισθητήρες και τις συνοδούς οδούς σηματοδότησεως. Για τον λόγο αυτό, εξετάσαμε την ταχεία επίδραση πολυφαινολικών εκχυλισμάτων στην συγκρότηση και ανακατανομή του δικτύου ακτίνης και τις πιθανές τροποποιήσεις που προκαλούν σε ενδοκυττάρια μόρια σηματοδότησεως.

3.2.1. ΚΥΤΤΑΡΟΣΚΕΛΕΤΟΣ ΑΚΤΙΝΗΣ

3.2.1.1. Δομή και λειτουργία

Ο κυτταροσκελετός ακτίνης συγκροτεί μαζί με τους μικροσωληνίσκους και τα ενδιάμεσα ινίδια, το δομικό υπόβαθρο των ευκαρυωτικών κυττάρων. Η ακτίνη, αποτελεί μία από τις πλέον συντηρημένες εξελικτικά πρωτεΐνες, με μοριακό βάρος στον άνθρωπο 45 kD. Αν και έχουν απομονωθεί αρκετές ισομορφές της, με μικρές διαφοροποιήσεις στην αλληλουχία τους, δεν τους έχουν αποδοθεί διακριτές δράσεις (dos Remedios et al., 2003; Roper et al., 2005). Ο κυτταροσκελετός της ακτίνης ελέγχει αρκετές κυτταρικές διαδικασίες, από την συστολή των μυών, έως την μεταγραφή γονιδίων (Clark and Hirst, 2002; Pederson and Aebi, 2005). Ο συνεχής πολυμερισμός και αποπολυμερισμός της οδηγεί στον σχηματισμό παροδικών ή στατικών δομών, ανάλογα με τα εξωκυττάρια ερεθίσματα, λειτουργώντας ως κινητήρια δύναμη. Δύο μηχανισμοί έχουν προταθεί. Ο πρώτος περιλαμβάνει τον τοπικό πολυμερισμό της ακτίνης, σε περιοχές εγγύς της πλασματικής μεμβράνης, προωθώντας εκ των έσω την μεμβράνη· το φαινόμενο αυτό έχει δειχθεί και σε τεχνητά σωματίδια (Pantaloni et al., 2001). Ο δεύτερος μηχανισμός στηρίζεται στην αλληλεπίδραση των ινιδίων μιοσίνης και ακτίνης, όπως συμβαίνει κατά την ενδοκυττάρια μεταφορά ουσιών (Krendel and Mooseker, 2005). Πέραν της συμβολής την ακτίνης στην κυτταροκίνηση, η πρωτεΐνη δημιουργεί σταθερές δέσμες ινιδίων προσδίδοντας σχήμα και λειτουργικότητα στα κύτταρα (Bartles, 2000). Βασικό ρόλο στον έλεγχο του πολυμερισμού και του αποπολυμερισμού διαδραματίζουν πρωτεΐνες της οικογένειας Rho, όπως οι μικρές GTPases Rho, Rac και Cdc42 (Bishop and Hall, 2000; Johndrow et al., 2004).

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, εκτός από τις διακριτές περιφερικές δομές, η ακτίνη σχηματίζει ένα χαλαρό δίκτυο, το οποίο καλύπτει μεγάλη έκταση της περιφέρειας του κυτταροπλάσματος και καλείται «φλοιϊκή» ακτίνη (cortical actin) (Heath and Holifield,

1993). Στα πολικά κύτταρα, διακρίνεται σε ραχιαία και κοιλιακή φλοιϊκή ακτίνη. Η κοιλιακή στοιβάδα διαμεσολαβεί την προσκόλληση του κυττάρου, ενώ η ραχιαία αποτελείται από πλήθος ινιδίων και δεσμών, διαταγμένων κάθετα στην περιφέρεια, οι οποίοι αντιστοιχούν στο ραχιαίο φλοιϊκό περίβλημα μικροϊνιδίων (Dorsal Cortical Microfilament Sheath, DCMS). Η ευρεία επίπεδη περιοχή, έμπροσθεν του πυρήνα, ονομάζεται οδηγός *λαμέλλα* και αποτελείται από διακριτές δομές *-λαμελλιπόδια-*, οι οποίες αποτελούν τις πρωτογενείς εκβλαστήσεις του κινούμενου κυττάρου και περιέχουν ένα διαπλεκόμενο δίκτυο ινιδίων ακτίνης και μικρές δέσμες ή ραβδώσεις.

Η *ανακύκλιση* ή αλλιώς *ροή της φλοιϊκής ακτίνης (cortical actin flow)* διαμεσολαβεί την κίνηση ή την αγκυροβόληση των κυττάρων ως απόκριση σε εξωκυττάρια ερεθίσματα. Η φλοιϊκή ροή αποτελεί συστατική διαδικασία στην πλειονότητα των κυτταρικών τύπων, όταν δραστηριοποιούνται. Στους ινοβλάστες, η συνεχής ροή από την κεντρική στεφάνη στη λαμέλλα και τα λαμελλιπόδια έχει ταχύτητα 0,1 $\mu\text{m}/\text{sec}$. Κάποιες από τις διακριτές δομές αναγκάζονται σε ανακύκλιση και σύμπτυξη με το DCMS, το οποίο κινείται όπισθεν με ρυθμό 1-5 $\mu\text{m}/\text{min}$. Τοπική διέγερση των κυττάρων έχει ως αποτέλεσμα την συμπίκνωση της κεντρικής στεφάνης F-ακτίνης και την προώθηση των ινιδίων προς το λαμελλιπόδιο και την λαμέλλα. Στην πορεία τους τα ινίδια σχηματίζουν συμπαγείς δομές, τις *ίνες stress*. Η δημιουργία των ινών *stress* προϋποθέτει την *εστιακή πρόσδεση (focal adhesion)* μεταξύ των ινιδίων F-ακτίνης των λαμελλιποδίων και του υποστρώματος. Στην συνέχεια, η ίνα μεγαλώνει περιμετρικά της περιοχής πρόσδεσης και επιμηκύνεται ακολουθώντας την ροή του DCMS. Η ροή της φλοιϊκής ακτίνης καταστέλλεται τοπικά στο απώτερο άκρο της νεοσχηματιζόμενης ίνας, οδηγώντας σε οδόντωση και αναδίπλωση των ινιδίων, δημιουργώντας την *«αψίδα»*.

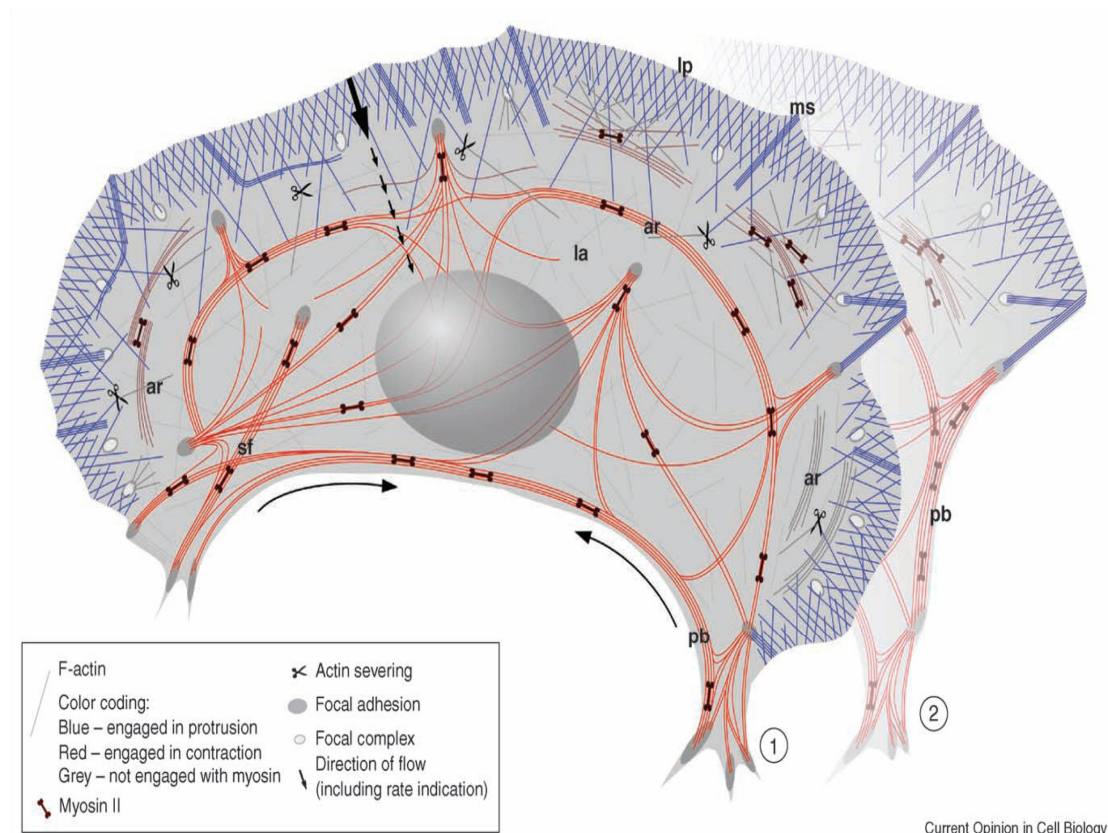
3.2.1.2. Πολυμερισμός της ακτίνης

Η ακτίνη υφίσταται ως σφαιρικά μονομερή (G-actin) ή ως ινίδια (F-actin). Κάθε μονομερές είναι προσδεμένο σε ένα νουκλεοτίδιο (ATP ή ADP) και ένα δισθενές κατιόν, συνήθως Mg^{2+} . Τα ινίδια ακτίνης είναι πολικές δομές και τα άκρα τους χαρακτηρίζονται ως «αγκαθωτό» (barbed) και «ακιδωτό» (pointed) άκρα. Ο πολυμερισμός γίνεται με την προσθήκη συμπλόκων ακτίνης-ATP στο αγκαθωτό άκρο, με ταυτόχρονη υδρόλυση του ATP προς ADP και αποβολή ενός συμπλόκου ακτίνης-ADP από το ακιδωτό άκρο. Ο κύκλος πολυμερισμού-αποπολυμερισμού ονομάζεται *treadmilling* και συμβαίνει αυθόρμητα υπό φυσιολογικές συνθήκες σε διάλυμα. Ο *in vivo* ρυθμός της ανακύκλωσης των μορίων ακτίνης στο ινίδιο είναι εξαιρετικά ταχύτερος, λόγω της παρουσίας ρυθμιστικών πρωτεϊνών (dos Remedios et al., 2003).

3.2.1.3. Συνοδές δομικές πρωτεΐνες

Θεμελιώδη ρόλο στην δημιουργία δικτύου ινιδίων διαδραματίζει το σύμπλοκο Arp2/3. Χάριν της δομικής του ομοιότητας με την ακτίνη, προσδένεται στα ήδη υπάρχοντα ινίδια και

προωθεί την δημιουργία πλευρικών διακλαδώσεων με κλίση 70°. Τέτοιες δομές παρατηρούνται εγγύς των λαμελιποδίων, στο οδηγό άκρο των μεταναστευόντων κυττάρων (Pollard and Beltzner, 2002). Μόρια όπως τα formins και Spire καλύπτουν τα άκρα των ινιδίων και συμμετέχουν στην δημιουργία μακρών, μη διακλαδιζόμενων ινιδίων (Quinlan et al., 2005; Wallar and Alberts, 2003). Άλλες πρωτεΐνες, όπως η τροπομοντουλίνη, η τροπομοσίνη, η ηκτωλυματίνη, οι ADF/coffilins (Actin Depolymerising Factor) και οι β -thymosins είτε παρεμποδίζουν άμεσα τον πολυμερισμό της ακτίνης είτε επιτείνουν τον αποπολυμερισμό ή ακόμη αποτρέπουν τον αυθόρμητο πολυμερισμό παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων ATP (dos Remedios et al., 2003; Paavilainen et al., 2004).



Εικόνα 3.2.1. Σχηματική αναπαράσταση του κυτταροσκελετού της ακτίνης σε μεταναστεύον κύτταρο μελανώματος της σειράς B16. Ένας νεοσύστατος υποπληθυσμός ινιδίων ακτίνης συγκροτεί το λαμελιπόδιο (lp), αποκόπτεται από την λαμέλλα (la) (ψαλίδια) και ενσωματώνεται σε συσταλτές μονάδες με την αρωγή μορίων μυοσίνης -αψίδες (ar), ίνες stress (sf) και περιφερειακές δεσμίδες (pb)- οι οποίες διασυνδέονται και στηρίζονται στις εστίες πρόσδεσης (Focal adhesion) . Η μετακίνηση του κυττάρου επιτυγχάνεται με την μετάπτωση μιας ενός λαμελιποδίου σε κοίλη περιφερειακή δεσμίδα (1→2). Η ανίχνευση του εξωκυττάρου χώρου επιτυγχάνεται με λεπτά ινίδια, τις μικροακίδες (Ms) (Small and Resch, 2005).

3.2.1.4. Δομές F-actin

3.2.1.4.1. Ινίδια και ίνες

Η δημιουργία ινιδίων ακτίνης (F-actin) επιτυγχάνεται με την συνεργασία των πρωτεϊνών που λειτουργούν ως πυρήνες πολυμερισμού και των μορίων που συμμετέχουν στην κάλυψη των άκρων των ινιδίων, καθορίζοντας το μήκος και τις διακλαδώσεις τους (Mejillano et al., 2004). Κατόπιν, τα ινίδια αλληλεπιδρούν και σχηματίζουν χαλαρές ή συμπαγείς δέσμες και δίκτυα, με τελικό αποτέλεσμα τον σχηματισμό τρισδιάστατων δομών ((Kureishy et al., 2002; Stossel et al., 2001; Winder and Ayscough, 2005). Οι παράλληλες δεσμίδες έχουν συνήθως δομικό ρόλο (Bartles, 2000), ενώ αντιπαράλληλα ινίδια ή δεσμίδες απαντώνται στις ίνες του stress και στους μυς, καθώς μπορούν να ολισθαίνουν μεταξύ τους, διευκολύνοντας την κίνηση (Clark and Hirst, 2002; Peterson et al., 2005).

Ο κυτταροσκελετός της ακτίνης αποκρίνεται σε εξωτερικά μηχανικά ερεθίσματα, τα οποία μπορεί να διαμεσολαβούνται από τους αντίστοιχους «αισθητήρες»-διαύλους ιόντων ή από αλλαγές στην διάταξη των σημείων διακυτταρικής επαφής ή επαφής με την εξωκυττάρια ουσία (Tamada et al., 2004; Tzima et al., 2000). Κύτταρα που υπόκεινται συνεχώς σε μηχανικό ερεθισμό προσανατολίζουν τις ίνες του stress κάθετα στην διεύθυνση της εξωτερικής πίεσης. Αντιθέτως, τα ενδοθηλιακά κύτταρα, υποκείμενα σε stress από ροή υγρού (fluid shear stress), προσανατολίζουν τα ινίδια παράλληλα με την εξωτερική δύναμη. Και στις δύο περιπτώσεις, απαραίτητη προϋπόθεση είναι η σηματοδότηση μέσω ιντεγκρινών και η παρουσία της *zyxin* (Yoshigi et al., 2005). Οι Rho GTPases και η *formin mDia* ρυθμίζουν τον ακριβή προσανατολισμό: ενεργοποίηση και των δύο οδηγεί σε παράλληλο διάταξη, ενώ απενεργοποίηση μιας από αυτές καθορίζει κάθετη διάταξη (Kaunas et al., 2005).

3.2.1.4.2. Δέσμες

Ένας τύπος περίπλοκων δομών ακτίνης είναι οι δέσμες ακτίνης, στις οποίες τα ινίδια είναι διαταγμένα παράλληλα και σχετικά πυκνά. Αποτελούν βασικά δομικά συστατικά του κυττάρου και υποστηρίζουν ή σταθεροποιούν τις κυτταρικές προεκβολές ή εγκολπώσεις ή καθορίζουν περιοχές της πλασματικής μεμβράνης (Furukawa and Fechheimer, 1997). Τέτοιου είδους δέσμες αποτελούν οι αισθητικές τρίχες (70-400 μm) στον θώρακα της νύμφης της *Drosophila*, οι οποίες σχηματίζονται από την συνένωση προϋπαρχόντων ινιδίων (end-to-end joining), με την βοήθεια των πρωτεϊνών *forked* και *singed* (Wulfkuhle et al., 1998). Ανάλογες και πυκνότερες δέσμες (1-5 μm, 25 ινίδια ακτίνης/δέσμη) συγκροτούν την ψηκτροειδή επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων (Heintzelman and Mooseker, 1992). Ο σχηματισμός τους εξαρτάται από τα μόρια *villin* και *fimbrin/plastin* και την συγκέντρωση Ca^{2+} , ενώ η σταθεροποίηση της κεντρικής δεσμίδος κάθε μικρολάχνης από την πρωτεΐνη μικρή *espin*, ομόλογη της *forked* (Bartles et al., 1998). Καταστροφή των μικρολαχνών παρατηρείται σε απόκριση σε ενδοφλέβια αγωγή με καρβαχόλη ή *p.o.* χορήγηση του

ιονοφόρου ασβεστίου A23187. Ειδικότερα, η villin, αν και δεν σχετίζεται *per se* με την δόμηση των ινιδίων, λειτουργεί ως αισθητήρας των διακυμάνσεων ασβεστίου, και ρυθμίζει τις αναδιατάξεις των μικρολαχνών σε περιπτώσεις μικροτραυματισμού (Ferrary et al., 1999), λοιμώξεων με εντεροβακτήρια (*Escherichia coli*) (Goosney et al., 1999) και νεφρική ισχαιμία ή απουσία ATP (Raman and Atkinson, 1999). Δακτυλοειδείς προεκβολές (1-10 μm, έως 900 ινίδια ακτίνης/βλεφαρίδα) εμφανίζονται επίσης στην εξωτερική επιφάνεια των τριχοειδών κυττάρων του έσω ωτός (Davies et al., 2001; Roberts et al., 1988), οι οποίες οργανώνονται και παρατάσσονται συμμετρικά με σταδιακές αλλαγές της θέσεως, του αριθμού, του μήκους και του πλάτους των δεσμίδων της ακτίνης στον πυρήνα καθεμιάς. Ο πολυμερισμός της ακτίνης ελέγχεται κατά βάση από την πρωτεΐνη fimbriin/plastin -όπως και στα ενδοθηλιακά κύτταρα-, ισομορφές της espin (Bartles et al., 1998) και ασυνήθης μυοσίνες (Hasson et al., 1997). Σχετικά πρόσφατα, ανιχνεύθηκε η πρωτεΐνη 2E4 (kartin) στις απολήξεις των «βλεφαρίδων», η οποία ταυτοποιήθηκε αρχικά σε λαμελλιπόδια αιμοπεταλίων (Beaer and Abraham, 1999). Τέλος, δέσμες ακτίνης συμμετέχουν στην διακυτταρική σύνδεση κυττάρων Sertoli και σπερματιδίων, κατά την σπερματογένεση (Beach and Vogl, 1999). Οι παράλληλες δέσμες ακτίνης των εκτοπλασμικών δεσμικών πλακών, αφενός προσφέρουν υποστήριξη, αφετέρου θεωρείται ότι συνδέουν την δεξαμενή του ενδοπλασματικού δικτύου με τον υποκείμενο σκελετό μικροσωληνίσκων στο σπερματογόνο επιθήλιο. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται και στα ωκύτταρα της *Drosophila*. Παράλληλες δέσμες ακτίνης εκτείνονται από τα συνοδά κύτταρα (nurse cells) προς τα ωκύτταρα, ώστε να εξασφαλίζεται η τροφική υποστήριξη μέσω των δακτυλιοειδών διαύλων (ring canals) (Guild et al., 1997). Οι πρωτεΐνες quail (ομόλογη της villin) και fascin (ομόλογη της singed) δημιουργούν δακτυλοειδείς βαθμίδες, οι οποίες εκτείνονται από την περιφέρεια του πυρήνα των ωκυττάρων έως την πλασματική μεμβράνη. Παρά την ομολογία της quail με την villin, φαίνεται ότι οι δίαυλοι που συγκροτούν είναι ανθεκτικοί σε υψηλές συγκεντρώσεις ασβεστίου (Matova et al., 1999).

3.2.1.4.3. Λαμελλιπόδια-Λαμέλλα-Αψίδα

Τα λαμελλιπόδια αποτελούν προεκβολές συστοιχιών συσταλών στοιχείων (1-5 μm) και δημιουργούν ένα μέτωπο προεκβάλλοντος κυττοπλάσματος (200nm) στην άκρη του κυττάρου. Εκτός, της οδηγού προεκβολής, τα λαμελλιπόδια προσφέρουν στην λαμέλλα ένα συσταλό δίκτυο, το οποίο είναι απαραίτητο για την έλξη και προώθηση των κυττάρων. Στα λαμελλιπόδια και την λαμέλλα παρατηρείται μετάβαση από την ανάδρομη γρήγορη ροή της F-ακτίνης, λόγω έντονου πολυμερισμού της, σε αργή, εξαιτίας της αλληλεπίδρασης με αντιπαράλληλα ινίδια μυοσίνης II, και επιτυγχάνεται αντιστοίχως η κυτταρική προώθηση ή συστολή (Small and Resch, 2005).

Τα τελευταία χρόνια, προκειμένου να μελετηθεί ο ακριβής μηχανισμός ανακύκλισης της ακτίνης και η συμμετοχή του στην κυτταρική κινητικότητα χρησιμοποιείται η τεχνική της μικροσκοπίας, σε συνδυασμό με μικροεγχύσεις φθορίζουσας φαλλοϊδίνης ή μετά από μετασηματισμό των κυττάρων με διαγονίδιο ακτίνης-GFP και επιλεκτικό αποχρωματισμό

(photobleaching). Παρατηρείται αρχικά ο σχηματισμός εστιών -κηλίδων πολυμερισμού, οι οποίες επεκτείνονται σε ινίδια και ακολουθούν την συστατική περιστροφική (rearward) κίνηση της ροής της ακτίνης, διαμέσου της λαμέλλας και των λαμελλιποδίων. Ελάχιστα, περίπου 2,5 %, από τα ινίδια, που δημιουργούνται στα λαμελλιπόδια, διασώζονται μέχρι την στρατολόγησή τους στις οπίσθιες συσταλτές δεσμίδες. Για τον λόγο αυτό είναι απαραίτητος ο αποπολυμερισμός των ινιδίων στο κέντρο του κυττάρου.

Συσταλτές δομές όπως η αψίδα, οι κοίλες περιφερικές δεσμίδες και οι γραμμικές ίνες stress συντονίζουν τις διαδικασίες προεκβολής και μετακίνησης. Οι αψίδες εμφανίζονται στην βάση των λαμελλιποδίων και μετακινούνται ανάδρομα (Heath and Holifield, 1993). Οι κοίλες περιφερικές δεσμίδες εμφανίζονται στην περιφέρεια της όπισθεν περιοχής του κυττάρου και αντιστοιχούν σε υπολείμματα ενός αποσυρμένου λαμελλιποδίου (Small and Resch, 2005). Το φαινόμενο αυτό εξηγεί πιθανόν και την δημιουργία διακυτταρικών συνδέσμων πρόσδεσης, όπου προηγείται η αλληλεπίδραση κυματοειδών κυτταρικών προεκβολών (Ehrlich et al., 2002).

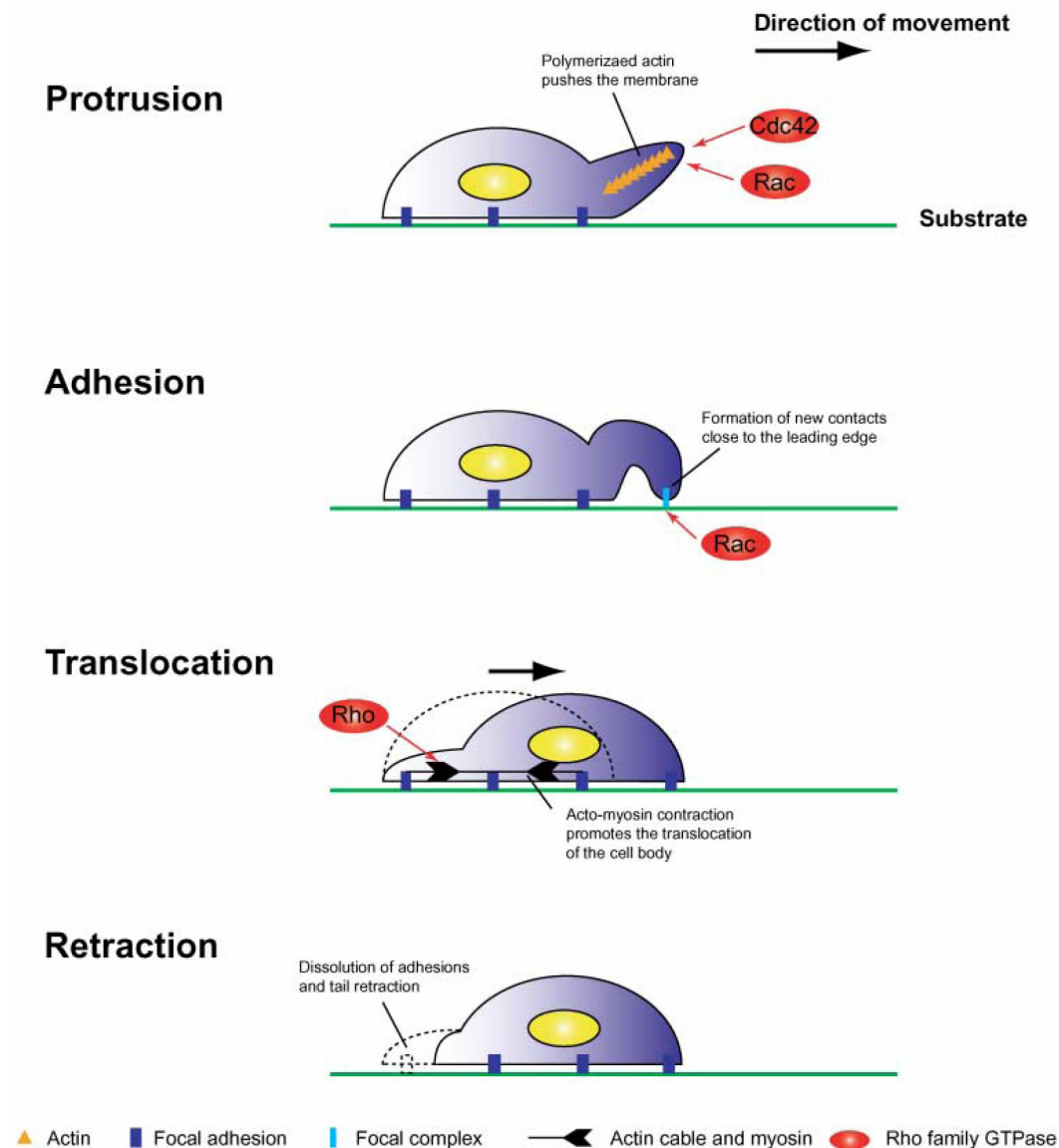
3.2.1.4.4. Φιλοπόδια-Μικροακίδες

Τα φιλοπόδια -λεπτές βελονοειδείς προεκβολές με αισθητήρια και «εξερευνητική» λειτουργία- αποτελούνται από παράλληλα ινίδια ακτίνης (Faix and Rottner, 2006). Εμφανίζονται μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με λαμελλιπόδια ή «ρυτιδώσεις» της μεμβράνης και απαντώνται κυρίως στους ινοβλάστες ή τους κώνους ανάπτυξης των νευρικών κυττάρων, αλλά και στο μέτωπο των μεταναστευόντων ιστών κατά την ανάπτυξη (Wood and Martin, 2002). Στα κύτταρα μελανώματος B16-F1 melanoma ή τους ινοβλάστες παρατηρούνται μικροσκοπικές απολήξεις, οι οποίες αντιστοιχούν σε φιλοπόδια εγκλωβισμένα σε λαμελλιπόδια και αποκαλούνται μικροακίδες (microspikes). Οι μικροακίδες είναι δισδιάστατες δομές, σε αντίθεση με τα φιλοπόδια, τα οποία αναπτύσσονται στις τρεις διαστάσεις (Svitkina et al., 2003). Ανάλυση της κινητικής των φιλοποδίων έδειξε ότι η ταχύτητα της δημιουργίας τους εξαρτάται από τον αριθμό και τον προσανατολισμό των μικροϊνιδίων του ή την πιθανή αγκυροβόλησή τους στην μεμβράνη, ενώ γειτονικά φιλοπόδια έχουν την ικανότητα να συντήκονται δημιουργώντας παχύτερες προεκβολές (Atilgan et al., 2006).

3.2.1.5. Ρυθμιστικές πρωτεΐνες

Κύριο ρόλο στον πολυμερισμό της ακτίνης διαδραματίζουν οι GTPases της οικογένειας Rho (Εικ. 3.2.2.) (Raftoroulou and Hall, 2004). Χρησιμεύουν ως μοριακοί διακόπτες και συμμετέχουν σε διαδικασίες κυττοκίνησης, φαγοκύττωσης, πινοκύτωσης, την κυτταρική μετανάστευση, την μορφογένεση και την καθοδήγηση νευραξόνων -κοινό χαρακτηριστικό των οποίων αποτελεί η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού ακτίνης-, σε βιοχημικά μονοπάτια τα οποία περιλαμβάνουν τους παράγοντες SRF (serum response elements transcription factors) (Bushel et al., 1995; Hill et al., 1995) και NF-κB (Perona et al., 1997), τις κινάσες JNK (c-jun N-terminal kinase) και p38 (Coso et al., 1995; Minden et al., 1995)

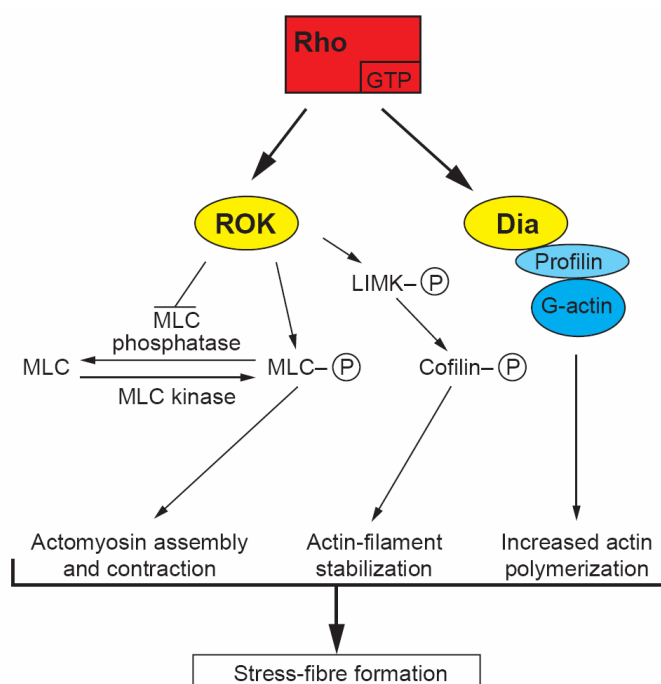
και το φαγοκυτικό οξειδωτικό σύμπλοκο της οξειδάσης NADPH (Abo et al., 1991). Τα θηλαστικά διαθέτουν ποικιλία ισομορφών των Rho GTPases. Μέχρι στιγμής έχουν κλωνοποιηθεί οι: Rho (A, B, C), Rac (1, 2, 3), Cdc42 (Cdc42Hs, G25K), Rnd1/Rho6, Rnd2/Rho7, Rnd3/RhoE, RhoD, RhoG, TC10 και TTF. Τα πλέον χαρακτηρισμένα μόρια είναι οι Rho, Rac και Cdc42, ενώ έχουν ταυτοποιηθεί περίπου 30 διαφορετικοί τελεστές, οι οποίοι διαμεσολαβούν την δράση τους (Bishop and Hall, 2000).



Εικόνα 3.2.2. Ρύθμιση του σχηματισμού και της απόσυρσης των κυτταρικών προεκβολών από την οικογένεια των Rho GTPases (Yamazaki et al., 2005).

Η ενεργοποίηση των ROK (Rho-associated kinase) από τις Rho, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.2.3., επάγει την δημιουργία ιών stress και εστιακών προσδέσεων. Έκφραση της καταλυτικής υπομονάδος της ROKα προκαλεί την δημιουργία αστεροειδών ινιδίων ακτινομοσίνης σε κύτταρα HeLa (Leung et al., 1996) και Swiss3T3 (Ishizaki et al., 1997), ενώ αναστολή τους αποτρέπει τον σχηματισμό ινιδίων stress. Ως υπόστρωμα της ROK

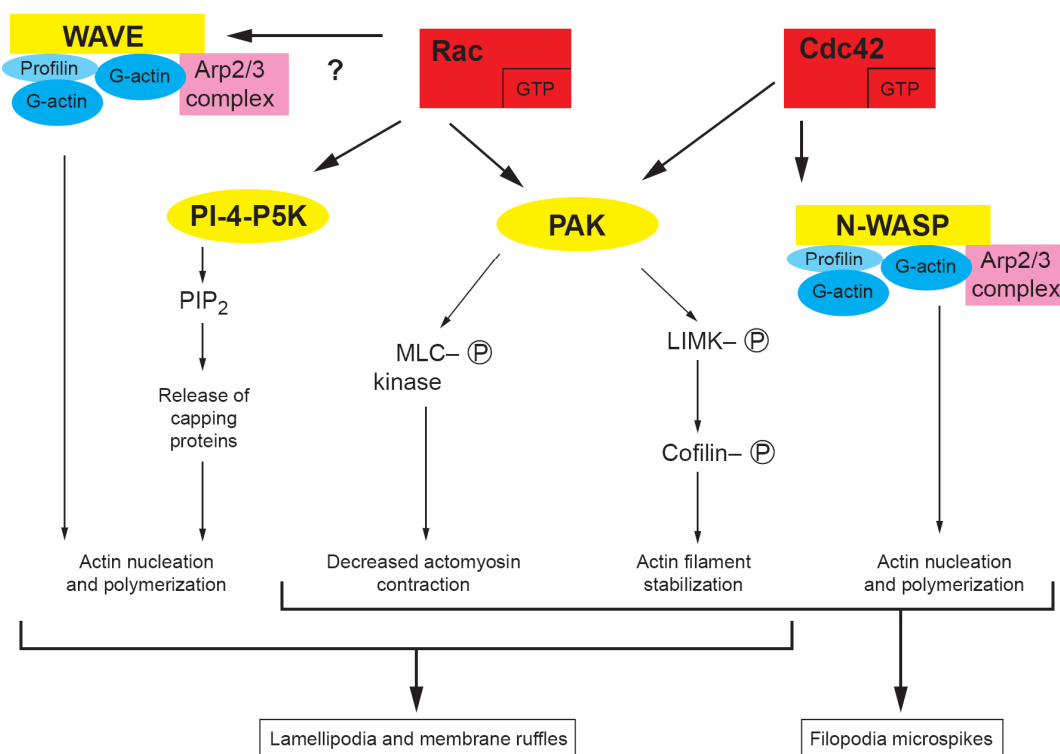
χρησιμεύουν η ελαφριά αλυσίδα της μυοσίνης και η φωσφατάση της (Kawano et al., 1999), καθώς και η κινάση LIM, η οποία μετά από ενεργοποίηση αναστέλλει την κοφιλλίνη, σταθεροποιώντας τα ινίδια ακτίνης (Maekawa et al., 1999). Έχει επίσης αναφερθεί ότι η ROK αλληλεπιδρά και φωσφορυλιώνει την adducin, σταθεροποιώντας τα σύμπλοκά της με την F-ακτίνη και τις πρωτεΐνες της οικογένειας ERM (ezrin/radixin/moesin), οι οποίες βοηθούν στην αγκυροβόληση της ακτίνης στην μεμβράνη (Matsui et al., 1998).



Εικόνα 3.2.3. Διαγραμματική απεικόνιση της σηματοδότησης μέσω Rho (Bishop and Hall, 2000).

Η Cdc42 εμπλέκεται στον σχηματισμό φιλοποδίων (Nobes and Hall, 1995), μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης με μέλη της υποοικογένειας WASP (Wiskott-Aldrich syndrome proteins, αιματοποιητικό WASP και N-WASP), οι οποίοι λειτουργούν ως ενεργοποιητές του συμπλόκου Arp2/3. Ενεργοποίηση της Cdc42 από βραδυκινίνη, όπως και καταστολή της Rac οδηγεί στον σχηματισμό μικροακίδων ή φιλοποδίων (Kozma et al., 1995). Η υπερέκφραση και των δύο πρωτεϊνών σε κύτταρα COS, οδήγησε στην δημιουργία ιδιαίτερα μακρών φιλοποδίων (Miki et al., 1998). Επιπλέον, η Cdc42 μπορεί να λειτουργεί συνεργατικά με το φωσφολιπίδιο PIP2 και να αναιρεί την αυτοκαταστολή της N-WASP (Stradal et al., 2004). Η N-WASP δεν φαίνεται να διαμεσολαβεί αποκλειστικά την δράση των GTPases της οικογένειας Rho. Πρόσφατα, βρέθηκε ότι η diaphanous related forming Drf3, (mDia2 στον επίμυ) αποτελεί τελεστή της Cdc42 αλλά όχι και των υπολοίπων Rho (Peng et al., 2003). Αν και η δράση της Cdc42 αναστέλλεται από την κινάση Kinase-dead MRCKa, σε περίπτωση υπερέκφρασή τους λειτουργούν συνεργατικά, σχηματίζοντας μεγάλα φιλοπόδια σε κύτταρα HeLa (Leung et al., 1998) · το ομόλογο της MRCK επίσης στην *Drosophila*, Genghis Khan, (GEK) ρυθμίζει τον κυτταροσκελετό κατά την ωογένεση.

Η Rac σχετίζεται κυρίως με την δημιουργία λαμελλιποδίων διαθέτει αντίστοιχους και «αποκλειστικούς» τελεστές, όπως η POR-1 (Partner Of Rac) (D'Souza-Schorey et al., 1997) και η p140Sra-1 (Specific Rac1-associated protein) (Kobayashi et al., 1998). Ενδείξεις υπάρχουν επίσης για την αλληλεπίδραση της Rac με την PI-4-P5K, ανεξάρτητα από την παρουσία GTP (Tolias et al., 1998).



Εικόνα 3.2.4. Διαγραμματική απεικόνιση της σηματοδότησης μέσω Rac και Cdc42 (Bishop and Hall, 2000).

Επίσης, η υπερικογένεια MIM/ABBA, μέλος της οποίας αποτελεί ο IRSp53 (insulin receptor substrate p53) /IRS-58, ο οποίος δεν εκφράζεται σε μεταστατικά κύτταρα, αλληλεπιδρά με μέλη της οικογένειας Epa/VASP και προάγει την δημιουργία ινιδίων ακτίνης (Yamagishi et al., 2004). Άλλες GTPases, όπως οι Wrch-1, RhoD και Rif φαίνεται ότι συμμετέχουν στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης και εμφανίζουν συμπληρωματικότητα στην δράση τους (Aspenstrom et al., 2004).

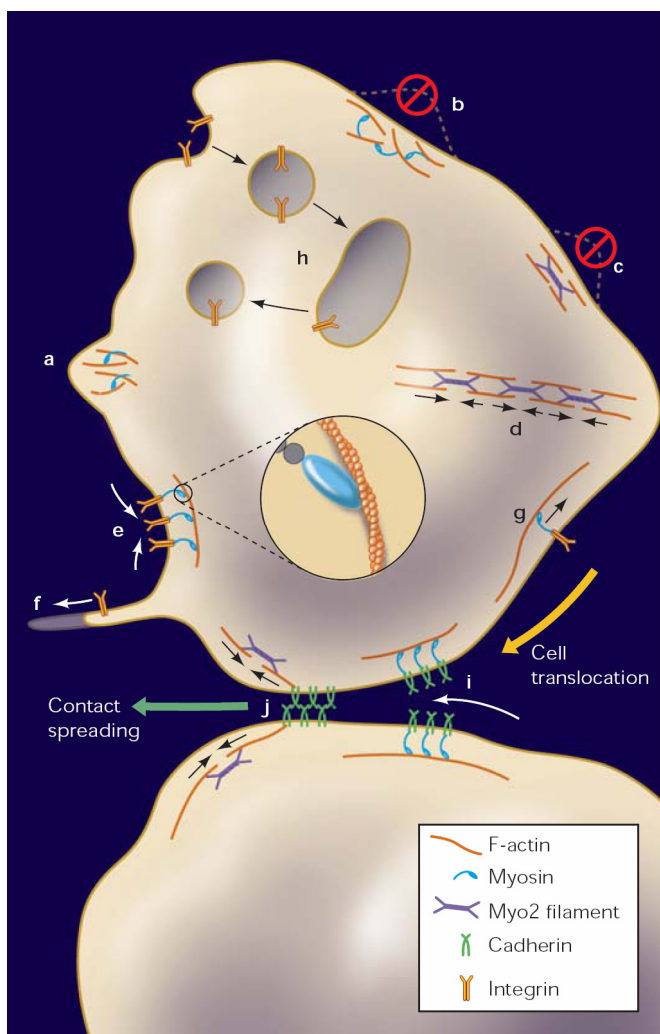
Κινάσες τυρονίνης, όπως η c-Abl σχετίζονται με παρατεταμένη δημιουργία φιλοποδίων και αυξημένη έκπτυξη νευριτών. Η δράση της είναι ανεξάρτητη από αυτή των GTPases και περιλαμβάνει την ενεργοποίηση της Dok1ν (p62 docking protein) και των συνοδών «προσαρμοστών» (adaptor) μορίων Nck1 ή Nck2 (Woodring et al., 2004).

Μεταξύ των κινασών σερίνης/θρεονίνης PAK, οι PAK1 και 3 bind προσδέονται εξίσου στις Cdc42 και Rac, ενώ η PAK2 αναστέλλει αποκλειστικά την εσωτερική δράση GTPase της Rac, αλλά όχι της Cdc42 (Zhang and Zheng, 1998). Η φωσφορυλίωση υποστρωμάτων της Src,

όπως η PAK1 (Robles et al., 2005) έχει επίσης εμπλακεί στην έναρξη του πολυμερισμού των ινιδίων, ωστόσο δεν έχει δειχθεί πλήρως η διαδοχή της στην σηματοδότηση.

Επίσης, το φωσφολιπίδιο PIP2, εκτός της αλληλεπιδράσεώς του με την Cdc42, προσδένεται σε πρωτεΐνες που καλύπτουν τα άκρα των ινιδίων, όπως η πηκτωλυματίνη, απελευθερώνει το αγκαθωτό άκρο και προάγει τον πολυμερισμό (Janmey and Stossel, 1987). Ακόμη, η PIP2 προσδένεται ακόμη στην βινκουλίνη, αυξάνοντας την συγγενεία της για την talin και προωθεί την δημιουργία των εστιακών προσδέσεων (Gilmore and Burridge, 1996). Τέλος, υπερέκφραση της κινάσης PI-4-P5K (phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase) προκαλεί εκτεταμένο πολυμερισμό της ακτίνης στα κύτταρα COS-7 (Shibasaki et al., 1997).

Αν και η μυοσίνη θεωρείται αποκλειστικά συστατικό των μυών, μη συμβατικές μυοσίνες έχουν ανιχνευθεί σε διάφορους τύπους ιστών, με διακριτό ρόλο κατά την κυτοκίνηση, την συστολή των δακτυλίων ακτίνης στους διακυτταρικούς συνδέσμους πρόσδεσης των πολικών επιθηλίων (Krendel and Mooseker, 2005), την κυτταρική μετανάστευση και την μεταφορά ουσιών. Η Myo2b συμμετέχει στην δημιουργία ιών stress και την κατευθυνόμενη μετανάστευση, παρεμποδίζοντας τον πλευρικό σχηματισμό ψευδο-ποδίων. Η απουσία της σε ινοβλάστες προκαλεί μετανάστευση των κυττάρων με μεγάλη ταχύτητα προς όλες τις κατευθύνσεις (Lo et al., 2004). Οι μυοσίνες μέσω της πρόσδεσής τους σε υποδοχείς μορίων συνάφειας δημιουργούν «συσσωματώματά» τους, ενισχύοντας την προσκόλληση



Εικόνα 3.2.5. Η μυοσίνη συμμετέχει στην τροποποίηση και συγκρότηση του κυτταροσκελετού της ακτίνης (Krendel and Mooseker, 2005).

(Miyamoto et al., 1995): Οι Myo7 και Myo10 διαθέτουν θέσεις πρόσδεσης για τις ezrin/radixin/moesin και διαμεσολαβούν την αγκυροβόληση των φιλοποδίων στην μεμβράνη (Zhang et al., 2004). Η Myo9 υπερεκφράζεται στα λευκοκύτταρα και μπορεί να λειτουργήσει ως ενεργοποιητής της Rho (Post et al., 1998), ενώ προσδένεται και στα μόρια

Arf και BIG1 που ρυθμίζουν την διαθεσιμότητα του GTP (GTP exchange factors, GEF). Η Myo3, έχει δράση κινάσης τυροσίνης και συμμετέχει στην φωτομεταγωγή στην *Drosophila* (Porter et al., 1993) καθορίζοντας τον εντοπισμό της καλμοδουλίνης. Ακόμη, η Myo5a προσδένεται στο προαποπτωτικό μόριο Bmf, προκαλεί συσσώρευση των ινιδίων ακτίνης και αποκόλληση των κυττάρων από το υπόστρωμά τους και απόπτωση (Puthalakath et al., 2001). Οι μιοσίνες επίσης εμπλέκονται στην μεταφορά ενδο- ή εξωκυτταρικών κυστιδίων, διαμέσου περιοχών πλούσιων σε ακτίνη, και την μεταφορά ή παγίδευση οργανιδίων σε διακριτές υποκυτταρικές θέσεις. Καθώς η πλειοψηφία των ινιδίων ακτίνης είναι προσανατολισμένα προς την πλασματική μεμβράνη, η αλληλεπίδραση με αντιπαράλληλα ινίδια μιοσίνης οδηγεί σε ενδοκύττωση, ενώ αυτή με παράλληλα σε εξωκύττωση. Επιπλέον, οι μιοσίνες προωθούν την μεταφορά κυστιδίων μέσω αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού ακτίνης και υποβοηθούν την σύσφιξη και αποκόλληση του λαιμού τους από τις μεμβρανικές εγκολπώσεις.

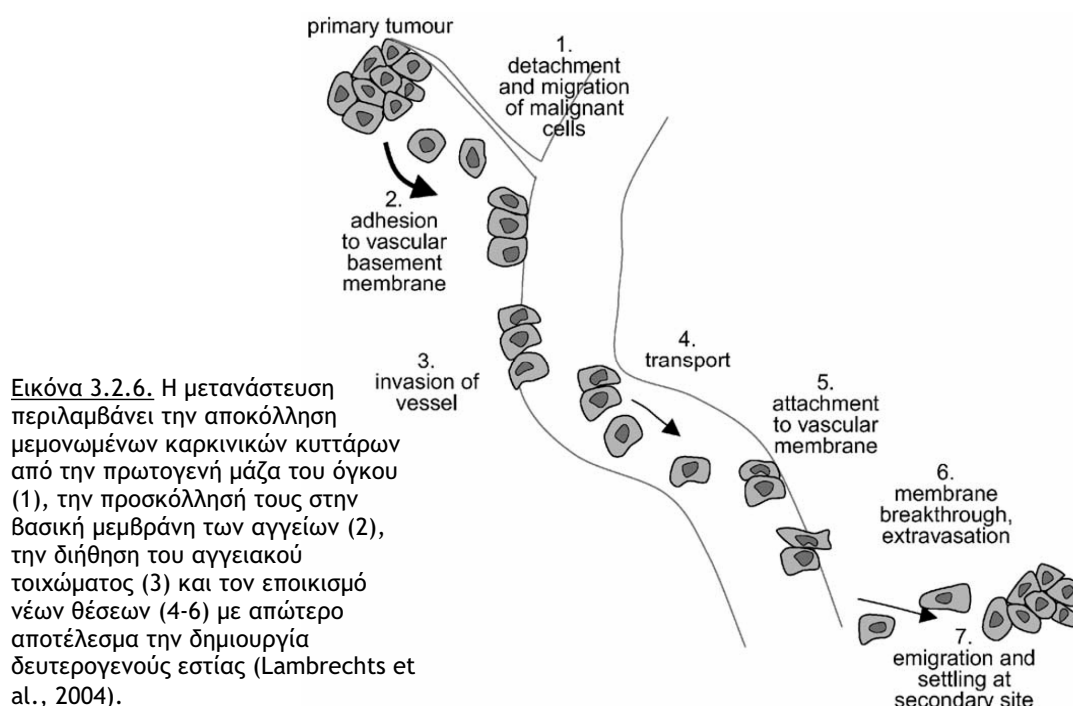
Τέλος, η Hic-5 είναι μία πρωτεΐνη ομόλογη της paxillin, η οποία εντοπίζεται στις εστιακές προσδέσεις και φωσφορυλιώνεται μετά από διέγερση με οσμωτικό stress, ορό, LPA ή ενδοθηλίνη. Η Hic-5 βρέθηκε πρόσφατα ότι καταστέλλει την δημιουργία λαμελλιποδίων ως απόκριση στον EGF, αναστέλλοντας την σηματοδότηση μέσω Rac (Hetey et al., 2005). Επιπλέον, η Hic-5, σε αντίθεση με την paxillin, αναστέλλει την πρώιμη πρόσφυση των κυττάρων στην εξωκυττάρια ουσία, μέσω αναστολής της κυριότερης κινάσης των εστιακών συνδέσεων FAK (Nishiya et al., 2001). Σε μετασχηματισμένους με Src ινοβλάστες, υπό οσμωτικό stress, παρατηρείται αλληλεπίδραση της Hic-5 με την περιοχή SH2 του αναστολέα της Src, Csk (carboxyl-terminal Src kinase) (Ishino et al., 2000). Αξίζει να σημειωθεί ότι η πρωτεΐνη Hic-5, είναι γνωστή και ως ARA55 (androgen receptor associated protein 55), έχει απομονωθεί από κύτταρα προστάτου και λειτουργεί ως συνενεργοποιητής του υποδοχέα ανδρογόνων (Fujimoto et al., 1999; Wang et al., 2002).

3.2.2. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΜΕ ΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΟΣΚΕΛΕΤΟ ΑΚΤΙΝΗΣ

3.2.2.1. Μετανάστευση

Εκτός της ανασταλτικής τους δράσης στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, οι πολυφαινόλες βρέθηκε ότι επηρεάζουν την μετανάστευση, διήθηση και εγκαθίδρυση των κακοήθων κυττάρων, δηλαδή την ικανότητά τους να αποκολλώνται από την πρωταρχική μάζα του όγκου, να μεταναστεύουν μέσω των γειτονικών ιστών προς τα τριχοειδή και τα λεμφαγγεία και να δημιουργούν δευτερογενείς βλάβες/εστίες (Εικ. 3.2.6.). Τα φαινόμενα αυτά προϋποθέτουν την απώλεια ομοτυπικών διακυτταρικών συνδέσεων, τον ανασχηματισμό της εξωκυττάριας ουσίας και την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού

ακτίνης. Αρκετές διαλυτές πρωτεΐνες, μόρια συνάφειας και κινάσες (λιπιδίων και τυροσίνης) εμπλέκονται στην διήθηση και μετανάστευση των κυττάρων (Brunton et al., 2004; Lambrechts et al., 2004).



Οι πολυφαινόλες έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν την έκφραση των μορίων συνάφειας. Η EGCG επάγει την έκφραση της β1 υπομονάδας της integrin σε κύτταρα μυελοβλαστώματος DAOY (Pilorget et al., 2003). Αντίθετα, οι kaempferol, chrysin, apigenin, και luteolin αναστέλλουν την έκφραση του μορίου συνάφειας ICAM-1 (InterCellular Adhesion Molecule-1) στα κυψελιδικά κύτταρα A549, όταν αυτά διεγερθούν με TNF. Η αντιφλεγμονώδης δράση των φλαβονοειδών επιτυγχάνεται μέσω ενεργοποίησης της κινάσης JNK, την επαγωγή της έκφρασης του c-jun mRNA και της ρύθμισης της μεταγραφικής δραστηριότητας των AP-1 και NF-κB (Chen et al., 2004). Επίσης, ενδοφλέβια χορήγηση pterostilbene και quercetin, σε πειραματικό μοντέλο μελανώματος σε επίμυες, ελάττωσε κατά 73% την μετάσταση B16M-F10 κυττάρων στο ήπαρ, μέσω της αναστολής σηματοδότησης του VCAM-1 (Vascular Adhesion Molecule-1) από το ημιτονοειδές ηπατικό ενδοθήλιο (Ferrer et al., 2005). Ακόμη, τα φλαβονοειδή είναι ικανά να ρυθμίζουν την μετάσταση των καρκινικών κυττάρων μέσω της έκφρασης μορίων με ικανότητα προσκόλλησης στις integrins. Η resveratrol επάγει την έκφραση της tensin σε ερυθρολευχαιμικά κύτταρα K562, με αποτέλεσμα αυξημένη κυτταρική πρόσδεση σε μόρια fibronectin, κυτταρική έκπτυξη και έντονο πολυμερισμό της ακτίνης. Αξίζει να σημειωθεί ότι ανάλογες μορφολογικές τροποποιήσεις παρατηρήθηκαν σε καρκινικά κύτταρα μαστού της σειράς MCF7-τα οποία δεν συνθέτουν tensin- και οδήγησαν σε καταστολή της οιστρογόνο-εξαρτώμενης μετανάστευσής τους (Rodrigue et al., 2005). Πρόσφατα, βρέθηκε ότι πρωτεΐνες των χασμοσυνδέσεων, όπως οι connexins, διαμεσολαβούν τις ετεροκυτταρικές αλληλεπιδράσεις και την δημιουργία λειτουργικών

κυτταρικών συσσωματωμάτων. Οι Czyz et al. έδειξαν ότι η arigenin αναστέλλει την σηματοδότηση μέσω connexins (Czyz et al., 2005). η arigenin ανέστειλε αφενός την μετανάστευση κυττάρων HeLa που υπερέκφραζαν connexin 43 σε σχέση με μη μετασχηματισμένα κύτταρα, αφετέρου την διηθητική τους ικανότητα σε συγκαλλιέργειες με καρδιακό ιστό όρνιθας. Επιπλέον, η arigenin βρέθηκε να αναστέλλει την σηματοδότηση του ογκογονιδίου *ras*, αναστρέφοντας τον νεοπλαστικό φαινότυπο, όπως στην περίπτωση των κυττάρων HCT116 (Klampfer et al., 2004), όπου αύξησε την έκφραση της πηκτωληματίνης, μιας πρωτεΐνης που απουσιάζει ή υποεκφράζεται στον καρκίνο του εντέρου. Αντίστοιχες τροποποιήσεις παρατηρήθηκαν σε ανθρώπινα κύτταρα μελανώματος, όπου το φλαβονοειδές C-3-G (cyanidin-3-O-beta-glucopyranoside) προκάλεσε την δημιουργία δενδριτικών προεκβολών, την αναδιάρθρωση του δικτύου μικροσωληνίσκων, την αύξηση των εστιακών προσδέσεων και την επαγωγή έκφρασης των «νευροειδικών» πρωτεϊνών NF-160 και NF-200 που συμβάλλουν στην δημιουργία νευροϊνιδίων. Παράλληλα, το C-3-G ενίσχυσε την σύνθεση της μελανίνης, την ωρίμανση των μελανοσωμάτων και την έκφραση του Melan-A/MART-1, ενός παράγοντα που σχετίζεται με την ανάπτυξη των μελανοκυττάρων, υποδεικνύοντας την μετάπτωση του φαινοτύπου των κυττάρων από έντονα διπλασιαζόμενα σε διαφοροποιημένα μελανοκύτταρα (Serafino et al., 2004).

Επιπλέον, πειραματικά δεδομένα έχουν καταδείξει τον σημαντικό ρόλο των κινασών τυροσίνης και της FAK στις αντιμεταστατικές ιδιότητες των φλαβονοειδών. Ο Liu et al. βρήκαν ότι οι catechins του πράσινου τσαγιού μπορούν να αναστέλλουν την *in vitro* μετανάστευση κυττάρων μελανώματος B16-F3m σε ποικιλία υποστρωμάτων, μέσω μακροπρόθεσμης αναστολής της FAK (Liu et al., 2001). *In vivo* χορήγηση EGCG σε επίμυες με B16-F3m μελάνωμα είχε ως αποτέλεσμα την ελάττωση του μεγέθους των όγκων και της μεταστατικής ικανότητας στους πνεύμονες, καθώς και αύξηση της βιωσιμότητας. Ανάλογα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν σε πειραματικό μοντέλο καρκίνου του εντέρου: χορήγηση (+)-catechin σε C57BL/6J-Min/+ επίμυες ανέστειλε την δημιουργία όγκων κατά 70%, μέσω αναστολής της FAK (Weyant et al., 2001). Ανάλογες μορφολογικές τροποποιήσεις παρατηρήθηκαν σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα μαστού MDA-MB-231, όπου το σιλιβένιο resveratrol ελάττωσε την σηματοδότηση μέσω EGF, προκαλώντας εκτεταμένο σχηματισμό φιλοποδίων, ενώ μείωσε την δραστικότητα της FAK και την δημιουργία focal adhesions (Azios and Dharmawardhane, 2005). Ακόμη, η resveratrol, μέσω τροποποίησης της σηματοδότησης Ca^{2+} και κινασών τυροσίνης, αύξησε τον πολυμερισμό ινιδίων ακτίνης και τουμπουλίνης, με τελικό αποτέλεσμα την μείωση του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων (Bruder et al., 2001). Επιπροσθέτως βρέθηκε ότι η φλαβονόλη quercetin αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων χολαγγειώματος HuCC-T1, τόσο υπό βασικές συνθήκες, όσο και σε υπερθερμία μέσω της τροποποίησης της έκφρασης των πρωτεϊνών θερμικού σοκ hsp27 και hsp90 και της αναστολής πολυμερισμού της ακτίνης και της συσσώρευσης μικρού μήκους ινιδίων της (Kudo et al., 1999; Loktionova and Kabakov, 1998).

Τέλος, έχει δειχθεί ότι οι πολυφαινόλες είναι ικανές να αλληλεπιδρούν άμεσα με πρωτεΐνες του πρωτεύοντος κυτταροσκελετού. Οι Tachibana et al. ταυτοποίησαν μία μεμβρανική πρωτεΐνη 67 kDa, η οποία λειτουργεί ως υποδοχέας της λαμίνης και διαμεσολαβεί την αντιμεταστατική δράση της EGCG (Tachibana et al., 2004). Πειράματα συγκατακρήμνισης έδειξαν επίσης ότι η EGCG προσδένεται άμεσα και αναστέλλει την φωσφορυλίωση της βιμεντίνης, μιας πρωτεΐνης η οποία είναι υπεύθυνη για την διατήρηση της κυτταρικής δομής και την αντίληψη μηχανικών ερεθισμάτων από τον εξωκυττάριο χώρο (Ermakova et al., 2005). Συνθετικά ανάλογα των πολυφαινολών, όπως αυτό της resveratrol [R3, (Z)-3,5,4-trimethoxystilbene] είναι μέχρι και 100 φορές περισσότερο αποτελεσματικά στην αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της μετανάστευσης. Το R3 ειδικότερα είναι ικανό αφενός να εξαλείφει τα ενδογενή επίπεδα πολυαμινών και αφετέρου να τροποποιεί των κυτταροσκελετό, μέσω πρόσδεσης στην τουμπουλίνη, κατ'αναλογία με την κολχικίνη (Schneider et al., 2003).

3.2.2.2. Διήθηση και αγγειογένεση

Μία παράπλευρη διαδικασία με την ανάπτυξη των όγκων είναι η αγγειογένεση, καθώς τα κακοήγη κύτταρα αναζητούν τροφικό εφοδιασμό. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει χημειοτακτική μετακίνηση των κυττάρων προς το υπάρχον δίκτυο αγγείων και την προσβολή του αγγειακού τοιχώματος με σκοπό την νεοαγγειογένεση. Διαλυτοί παράγοντες, όπως οι VEGF/VPF, bFGF, TGF-β, PDGF και endothelin-1, καθώς επίσης και ένζυμα που πρωτεολύουν την εξωκυττάρια ουσία ρυθμίζουν την νεοαγγειογένεση, ενώ οι μεταλλοπρωτεάσες (MMPs) και οι αντίστοιχοι αναστολείς τους (TIMPs) ελέγχουν τον χημειοτακτισμό και την αναδιοργάνωση του αγγειακού επιθηλίου. Έχει δειχθεί ότι τα φλαβονοειδή επηρεάζουν την μετανάστευση των κακοήθων κυττάρων και την έκφραση των εμπλεκόμενων μορίων. Η φλαβονόλη silibinin αναστέλλει με χρονο-εξαρτώμενο τρόπο την μεταστατικότητα και την κινητικότητα των κυττάρων A549 cells, μέσω ελάττωσης της έκφρασης των MMP-2 and u-PA, και αύξησης της ρυθμιστικής πρωτεΐνης TIMP-2 (Chu et al., 2004). Αξίζει να σημειωθεί ότι στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δεν παρατηρείται αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, αλλά ούτε και της προσκόλλησης των κυττάρων σε διάφορα υποστρώματα. Ακόμη, το silymarin, ένα ισομερές μείγμα silibinin, isosilibinin, silicristin και silidianin, έχει την ικανότητα να μειώνει, μέσω της αναστολής έκκρισης της MMP-2, την δημιουργία διαύλων (τυπικών κατασκευών αντιστοίχων των αγγείων) από ενδοθηλιακά κύτταρα HUVEC σε τεχνητά υποστρώματα (Jiang et al., 2000). Αντίστοιχη αντιαγγειογενετική δράση βρέθηκε σε κύτταρα προστάτου (DU-145) και μαστού (MCF-7 και MDA-MB-468), όπου προκαλεί μείωση της έκκρισης του VEGF μία ώρα μετά την εφαρμογή του. Ανάλογα δράση εμφάνισε η EGCG σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος U-87, όπου η αναστολή της πρόδρομης MMP-2 επιτυγχάνεται μέσω απενεργοποίησης της MT1-MMP, καταδεικνύοντας ότι τα φλαβονοειδή μπορούν να ρυθμίζουν τα επίπεδα των μεταλλοπρωτεϊνών τόσο μέσω μεταγραφικής ενεργοποίησης, όσο και μέσω μεταφραστικής τροποποίησης (Annabi et al., 2002).

Η ανασταλτική δράση των φλαβονοειδών έχει δειχθεί και σε *in vivo* πειράματα. Η luteolin βρέθηκε ότι αναστέλλει την αύξηση των όγκων και την αγγειογένεση σε αλλο-μοσχεύματα σε επίμυ, καθώς και την αγγειογένεση μέσω VEGF σε πειραματικό μοντέλο αμφιβληστροειδούς (Bagli et al., 2004). Επίσης, οι πολυφαινόλες του πράσινου τσαγιού ανέστειλαν σημαντικά την έκφραση των μεταστατικών δεικτών VEGF, uPA, και MMP-2 και -9 σε διαγονιδιακό μοντέλο αδενοκαρκινώματος προστάτου στον επίμυ (TRAMP) (Adhami et al., 2004), ενώ η μείωση έκκρισης του προ-MMP-2 βρέθηκε εξαιρετικά σημαντική για την αναστολή της αγγειογένεσης από την EGCG (Sartor et al., 2004). Ακόμη, η χορήγηση του φλαβονοειδούς nobiletin σε SCID πειραματικό μοντέλο επίμυ είχε ως αποτέλεσμα την μείωση του αριθμού και του μεγέθους των όζων, λόγω της μείωσης της ενεργότητας της MMP-9 (Minagawa et al., 2001). Τέλος, μορφολογική ανάλυση του κοκκώδους ιστού και του παρακείμενου αγγειακού επιθηλίου έδειξε ότι η χορήγηση isoliquiritigenin και isoliquiritin ελαττώνουν κατά 50% των σχηματισμό νέων αγγείων (Kobayashi et al., 1995).

Τα φλαβονοειδή λειτουργούν επίσης ως downstream ρυθμιστές των τροφικών παραγόντων, καθώς επηρεάζουν την δραστικότητα των κινασών και των μεταγραφικών παραγόντων. Η arigenin εμπλέκεται στην πρώιμη ρύθμιση σηματοδότησης μέσω VEGF, καθώς αναστέλλει την ανεργοποίηση των μονοπατιών PI3K/AKT/p70S6K1 και HDM2/p53 (Fang et al., 2005). Η nobiletin και η quercetin αναστέλλουν την έκκριση και την σύνθεση προ-MMP-7 στα κύτταρα HT-29 (colorectal cancer), μέσω ρύθμισης της πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα AP-1 στο DNA (Kawabata et al., 2005). Κατ'αναλογία, η nobiletin αύξησε την TIMP-1 και μείωσε τις MMP-1 και -9 τστα κύτταρα ινοσαρκώματος HT-1080, λόγω επενεργοποίησης του AP-1 και μείωσης φωσφορυλίωσης της PI-3K (Sato et al., 2002). Επίσης, η luteolin, μέσω καταστολής της δράσης της Akt, βρέθηκε να αναστρέφει την επαγόμενη από VEGF κυτταρική μετανάστευση (Bagli et al., 2004). Επίσης, έχει δειχθεί ότι η nobiletin είναι ικανή να καταστέλλει την έκφραση των MMPs, μέσω αναστολής των MEK1/2, και να αυξάνει αυτή της TIMP1, μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού PKCBII/ε-JNK (Miyata et al., 2004). Ακόμη, η *in vivo* αντι-αγγειογενετική δράση της delphinidin είναι συνδεδεμένη με την ρύθμιση της έκφρασης του αναστολέα των cdk p27 (kip1) και των κυκλινών D1 και A (Favot et al., 2003).

Ένας ακόμη μηχανισμός, ο οποίος εμπλέκεται στην κυτταρική διήθηση, είναι οι endothelins, μία οικογένεια αγγειοπεπτιδίων, και οι υποδοχείς τους (ET-A και ET-B). Στα κακοήθη κύτταρα δεν εκφράζονται οι υποδοχείς ET-B, ενώ απαντώνται υψηλά επίπεδα endothelin-1 (ET-1) (Kopetz et al., 2002; Salani et al., 2000). Η ET-1 αποτελεί έναν αυτοκρινή μιτογόνο τροφικό παράγοντα, ο οποίος δρα κυρίως συνεργατικά με παράγοντες όπως οι bFGF, IGF-1 και PDGF, προωθώντας την αγγειογένεση σε συνεργασία με τον VEGF. Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν πως ολικό πολυφαινολικό εκχύλισμα από κάρυα σταφυλής, πλούσια σε ολιγομερείς φλαβαν-3-όλες, προκαλούν αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού, ανάλογη με αυτή κατά την διάρκεια του lamina shear stress, και ρυθμίζουν την ενεργότητα των κινασών τυροσίνης. Επιπλέον, βρέθηκε ότι το ίδιο εκχύλισμα αναστέλλει την έκφραση της ET-1, υποβοηθώντας την αποκατάσταση της ενδοθηλιακής λειτουργίας, ενώ προτάθηκε

ένας αντίστοιχος μηχανισμός μέσω του οποίου οι προκυανίνες αποτρέπουν την διήθηση του ενδοθηλίου και την πόντιση και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων (Corder et al., 2001; Corder et al., 2004). Τέλος, τα φλαβονοειδή μπορούν να ελέγχουν την συνολική πορεία της αγγειογένεσης μέσω ρύθμισης της COX-2 και της επαγόμενης συνθάσης του NO (iNOS), καθώς επίσης και μέσω της ενεργότητας του ογκογονιδίου p53 (Chiarugi et al., 1998).

3.2.3. ΣΤΕΡΟΕΙΔΗ

3.2.3.1. Μηχανισμοί δράσεως στεροειδών

Οι στεροειδείς ορμόνες διαδραματίζουν ζωτικό ρόλο στην ανάπτυξη, αναπαραγωγή και διαμόρφωση της συμπεριφοράς στα ζώα. Βάσει της κλασσικής θεώρησης, η δράση τους διαμεσολαβείται από ενδοκυττάριους υποδοχείς. Τα στεροειδή, ως λιπόφιλα μόρια με ουδέτερο φορτίο, διαχέονται στο κυτταρόπλασμα και προσδένονται στους αντίστοιχους υποδοχείς, προκαλώντας την μετατόπισή τους στον πυρήνα και τον σχηματισμό ομοδιμερών ή ετεροδιμερών συμπλόκων, τα οποία κατόπιν προσκολλώνται σε ειδικές αλληλουχίες του γενετικού υλικού (Steroid Response Elements) και ρυθμίζουν την μεταγραφή. Η διαδικασία αυτή διαρκεί αρκετές ώρες μέχρι την εμφάνιση του τελικού αποτελέσματος και χαρακτηρίζεται ως *γενωμική* δράση (Mangelsdorf et al., 1995; McKenna et al., 1999). Εκτός αυτής, υπάρχουν αναφορές σχετικά με την γρήγορη (εντός δευτερολέπτων), *μη γενωμική* δράση των στεροειδών, η οποία δεν προϋποθέτει την ενδοκύττωση των μορίων και την εμπλοκή των ενδοκυττάριων υποδοχέων. Η μη γενωμική δράση περιλαμβάνει την ενεργοποίηση των συστημάτων σηματοδότησης κατ'αναλογία με τους υποδοχείς των πεπτιδικών ορμονών (Daufeldt et al., 2003; Levin, 2002; Sutter-Dub, 2002) και την πιθανή ενεργοποίηση «υποδοχέων» της πλασματικής μεμβράνης. Σε αντίθεση με την δομική ομολογία των πυρηνικών υποδοχέων στεροειδών, στην περίπτωση των μη γενωμικών δράσεων έχει περιγραφεί η ενεργοποίηση πληθώρας ετερογενών μορίων μεταξύ των οποίων εναλλακτικές μορφές των κλασσικών υποδοχέων στεροειδών και υποδοχείς που προσδένονται σε G πρωτεΐνες (Walters and Nemere, 2004). Ιστοί παραδοσιακά θεωρούμενοι ως «μη στόχοι» των στεροειδών φαίνεται ότι εμφανίζουν εντονότερες μη γενωμικές δράσεις. Στο κυκλοφορικό τα στεροειδή επάγουν την άμεση αγγειοδιαστολή, ενώ στο νευρικό σύστημα ρυθμίζουν την επιβίωση των νευρώνων, επηρεάζοντας την γενικότερη παθοφυσιολογία του οργανισμού. Τα ερευνητικά δεδομένα των τελευταίων χρόνων καταδεικνύουν ότι η δράση των ορμονών αυτών στους ιστούς ή τα όργανα-στόχους είναι αποτέλεσμα τόσο της γενωμικής, όσο και της μη γενωμικής τους δράσης.

Σε πειραματικό επίπεδο, οι μη γενωμικές δράσεις μπορούν να ταυτοποιηθούν λόγω της αμεσότητάς τους (συνήθως παρατηρούνται δευτερόλεπτα ή λεπτά μετά την εφαρμογή των στεροειδών) και της ανοχής τους σε αναστολή της μεταγραφής ή της μετάφρασης. Για τους λόγους αυτούς, μη γενωμικές δράσεις μπορούν να ελεγχθούν σε κύτταρα με συμπυκνωμένη χρωματίνη και ελάχιστη μεταγραφική δραστηριότητα, όπως τα σπερματοζώαρια, όπως επίσης και σε κύτταρα τα οποία είτε δεν εκφράζουν τους αντίστοιχους ενδοκυττάριους-πυρηνικούς υποδοχείς, είτε εκφράζουν μεταλλαγμένους και μη μεταγραφικά ενεργούς υποδοχείς. Ένα επιπλέον πειραματικό εργαλείο αποτελεί η χρήση μεγάλων σε μέγεθος συμπλόκων των στεροειδών, τα οποία δεν είναι δυνατόν να ενδοκυττώνονται. Έτσι, τα στεροειδή μπορούν να αντικατασταθούν σε ένα πειραματικό πρωτόκολλο με σύμπλοκα μόρια στεροειδούς-αλβουμίνης.

3.2.3.2. Δομή μεμβρανικών υποδοχέων στεροειδών

Αρκετές ομάδες έχουν προτείνει την εμπλοκή του υποδοχέα στεροειδών κλασσικού τύπου στην πρόκληση μη γενωμικών δράσεων, καθώς οι υποδοχείς αυτοί θα μπορούσαν να εντοπίζονται εκτός από το κυτταρόπλασμα και στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και να αλληλεπιδρούν άμεσα ή έμμεσα με ειδικές μεμβρανικές δομές (reviewed in Kampa and Castanas, 2006; Simoncini and Genazzani, 2003; Walters and Nemere, 2004). Οι Razandi et al. έδειξαν ότι οι υποδοχείς οιστρογόνων σχηματίζουν ομοδιμερή μεμβρανικά σύμπλοκα σε κύτταρα ενδοθηλίου και μαστού, γεγονός απαραίτητο για την ενεργοποίηση των πρωτεϊνών G (Razandi et al., 2004). Αντίστοιχη ετεροδιμεροποίηση απαιτείται για την ενεργοποίηση σε συνεργασία με τον EGFR. Η ετεροδιμεροποίηση ERα και ERβ, αν και σπάνια, φαίνεται ότι διευκολύνεται όταν υπερκφράζεται ο ERβ και σχετίζεται με κυττόσταση την φάση G₂. Μεμβρανικός εντοπισμός των ER έχει αναφερθεί και στον νευρικό ιστό μετά από μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις (Beyer et al., 2003). Χαρακτηριστικό είναι δε ότι σε διαγονιδιακούς επίμους, οι οποίοι δεν εξέφραζαν οιστρογονικούς υποδοχείς, δεν ανιχνεύθηκε πρόσδεση των οιστρογόνων σε μεμβρανικές θέσεις (Filardo et al., 2000; Razandi et al., 1999; Wyckoff et al., 2001), σε αντίθεση με αυτόν της προγεστερόνης (Zhu et al., 2003a; Zhu et al., 2003b). Πρόσφατα, δείχθηκε ότι η μορφή του ERα, ERα36, η οποία προκύπτει από εναλλακτικό μάτισμα, εντοπίζεται κυρίως στην πλασματική μεμβράνη και λειτουργεί ως αρνητικός τελεστής της οιστρογονοεξαρτώμενης ή μη ενεργοποίησης των ERα και ERβ, ενώ διαμεσολαβεί και την μη γενωμική δράση των οιστρογόνων (Wang et al., 2006).

Άλλοι ερευνητές υποστηρίζουν την ύπαρξη διακριτών υποδοχέων, με δομή διαφορετική από αυτή των ενδοκυττάρων υποδοχέων. Ακόμη, η μη γενωμική δράση των στεροειδών θα μπορούσε να οφείλεται στην πρόσδεσή τους στην SHBG (Sex Hormone-Binding Globulin), ενός υποδοχέα που συνδέεται με G πρωτεΐνες και εντοπίζεται στην πλασματική μεμβράνη οργάνων, όπως ο προστάτης, οι όρχεις, το ήπαρ και ο μαστός (Fortunati et al., 1999a; Fortunati et al., 1999b). Σε σπάνιες περιπτώσεις ανάλογες ταχείες δράσεις είναι δυνατό να παρατηρηθούν απουσία υποδοχέα λόγω μεταβολής της μεμβρανικής ρευστότητας (Brann et al., 1995). Σε μία συγκριτική μελέτη βρέθηκε ότι η προγεστερόνη και η 17β-οιστραδιόλη, αλλά όχι η 17α-οιστραδιόλη επηρεάζουν την ανισοτροπία τεχνητών μεμβρανικών κατασκευών, της συναπτικής μεμβράνης ή της μεμβράνης του ενδοπλασματικού δικτύου (την μειώνουν ή την αυξάνουν αντίστοιχα), παρουσία όμως χοληστερόλης η προγεστερόνη, η οιστραδιόλη και η τεστοστερόνη μειώνουν την ρευστότητα των λιπιδίων (Dicko et al., 1999; Whiting et al., 2000). Το γεγονός αυτό προϋποθέτει την εφαρμογή αρκετά μεγάλων (=μη φυσιολογικών) συγκεντρώσεων στεροειδών, ενώ επιπλέον η χοληστερόλη, αλλά και το είδος των λιπιδίων και των πρωτεϊνών που απαρτίζουν την μεμβράνη, δεν επιτρέπουν συνήθως την πρόσβαση στα στεροειδή.

Η ενεργοποίηση ενός κλασσικού υποδοχέα, ο οποίος εντοπίζεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, έχει αναφερθεί ότι προκαλεί την περαιτέρω ενεργοποίηση της κινάσης τυροσίνης Src. Η Src, σε ληθαργική κατάσταση, είναι αγκυροβολημένη στην εσωτερική πλευρά της

μεμβράνης μέσω των περιοχών SH2 και SH3. Αλληλεπίδραση αυτών των περιοχών με τον υποδοχέα των ανδρογόνων (Falkenstein et al., 2000), των οιστρογόνων ER α ή ER β (Migliaccio et al., 2000; Migliaccio et al., 1996) ή της προγεστερόνης (Migliaccio et al., 1998) προκαλεί ενεργοποίηση της Src. Στα κύτταρα προστάτου LNCaP, η ενεργοποίηση της Src παρατηρείται 1 min μετά την επίδραση με ανδρογόνα και οφείλεται στην αλληλεπίδραση του AR με την περιοχή SH3 (Boonyaratankornkit et al., 2001; Kousteni et al., 2001; Migliaccio et al., 2000). Αντίστοιχη δράση εμφάνισαν και τα οιστρογόνα σε κύτταρα φαιοχρωμοκυττώματος PC12 (Alexaki et al., 2006). Στην τελευταία περίπτωση, η δράση αυτή ήταν παρόμοια με αυτή του συμπλόκου στεροειδούς-αλβουίνης. Η ενεργοποίηση της Src έχει ως αποτέλεσμα την περαιτέρω ενεργοποίηση κινασών, όπως οι Ras, Raf, MEK και ERK. Ο ρόλος των κλασικών υποδοχέων διαφαίνεται καθώς παράλληλη χορήγηση ανταγωνιστών τους καταστέλλει την σηματοδότηση. Μέσω αυτού του μηχανισμού επηρεάζεται η μετανάστευση, ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση των κυττάρων. Στα LNCaP η ενεργοποίηση της Src επάγει την κυτταρική διαφοροποίηση (Migliaccio et al., 2000). Στους οστεοβλάστες, η ενεργοποίηση των MAPK προστατεύει έναντι αποπτωτικών ερεθισμάτων, ενώ ευαισθητοποιεί τα κύτταρα του μαστού, όταν αυτά αποστερούνται μακροχρόνια από οιστρογόνα (Kousteni et al., 2001), αν και το γεγονός αυτό αποδίδεται επιπλέον στην αλληλεπίδραση της σηματοδότησης των υποδοχέων οιστρογόνων και προγεστερόνης (Migliaccio et al., 1998). Τα ανδρογόνα και τα οιστρογόνα μπορούν επίσης να λειτουργήσουν συνεργατικά μέσω τριαδικών συμπλόκων c-Src, ER και AR (Kousteni et al., 2001; Migliaccio et al., 2000). Εναλλακτικά, η ενεργοποίηση των ERK1 και ERK2 μπορεί να επιτευχθεί ανεξάρτητα από την δράση των πρωτεϊνών G, μέσω πρόσδεσης σε υποδοχείς, όπως αυτός του EGF (Epidermal Growth Factor) (Filardo et al., 2000). Απουσία στεροειδών, οι υποδοχείς των EGF και IGF (Insulin Growth Factor), επάγουν την δραστηριότητα των MAPK και την φωσφορυλίωση του υποδοχέα οιστρογόνων (Kato et al., 1995). Επιπλέον, στην μη γενωμική σηματοδότηση των οιστρογόνων εμπλέκεται η κινάση JNK (c-Jun N-terminal kinase), ανάλογα με την παρουσία υποτύπων του ER: σε κύτταρα MCF7, τα οποία εκφράζουν φυσιολογικά τον ER α ή σε μετασχηματισμένα κύτταρα CHO, η οιστραδιόλη αναστέλλει την ενεργοποίηση της JNK, ενώ σε μετασχηματισμένα με ER β την επάγει. Καθώς η JNK σχετίζεται με την πρόκληση απόπτωσης ως απόκριση των κυττάρων στην υπερϊώδη ακτινοβολία ή την ταξόλη, φαίνεται ότι η οιστραδιόλη λειτουργεί προστατευτικά, καταστέλλοντας την φωσφορυλίωση των Bcl-2 και Bcl-xl και τον κυτταρικό θάνατο (Razandi et al., 2000).

Τα στεροειδή μπορεί να ενεργοποιήσουν επίσης κινάσες λιπιδίων, όπως η PI3K, μέσω της p85 υπομονάδος (Pleiman et al., 1994; Stein and Waterfield, 2000) και επακόλουθα την Akt. Τα ανδρογόνα, μέσω του μονοπατιού σηματοδότησης Src/PI3K/Akt και της φωσφορυλίωσης του μεταγραφικού παράγοντα FKHR-L1 (Forkhead in rhabdomyosarcoma) και του προαποπτωτικού μορίου Bad, επάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αλλά το αποτέλεσμα αυτό αναστρέφεται από το αντι-ανδρογόνο bicalutamide (Baron et al., 2004). Ανάλογη δράση της οιστραδιόλης στα κύτταρα MCF7 σχετίζεται με κυττόσταση την φάση S

και αύξηση της έκφρασης της κυκλίνης D (Castoria et al., 2001). Στα ενδοθηλιακά κύτταρα, ο ίδιος μηχανισμός (Src/PI3K/Akt) επάγει την ενεργότητα της eNOS (Simoncini et al., 2000), όπως επίσης και στους οστεοκλάστες (Dong et al., 1999), ενώ στα δενδριτικά κύτταρα και τους φλοϊκούς νευρώνες σχετίζεται με την προστασία των κυττάρων (Honda et al., 2000). Καθώς η πλειοψηφία των παραπάνω δράσεων αναστέλλονται παρουσία ανταγωνιστών των υποδοχέων στεροειδών, θεωρήθηκε ότι οφείλονται στους κλασσικούς ενδοκυττάριους υποδοχείς και σχετίζονται, ιδιαίτερα όσον αφορά στην οιστραδιόλη, με τον εντοπισμό των υποδοχέων στην πλασματική μεμβράνη και την σύνδεσή τους με G πρωτεΐνες (Kelly and Levin, 2001; Levin, 2002; Losel and Wehling, 2003; Wyckoff et al., 2001). Αντίθετα, η ομάδα μας έχει δείξει ότι η οιστραδιόλη προστατεύει από απόπτωση τα κύτταρα PC12 (Alexaki et al., 2004), ενεργοποιώντας καταρχήν (2-30 min μετά την προσθήκη E_2 στο θρεπτικό μέσο) την απελευθέρωση Ca^{2+} , κατόπιν τις PI3K/Akt και τέλος την παραγωγή NO, η δράση όμως αυτή δεν αναστέλλεται από ανταγωνιστές των κλασσικών υποδοχέων.

Η μη γενωμική δράση επίσης των στεροειδών, μέσω των πρωτεϊνών G, μπορεί να περιλαμβάνει την τροποποίηση του μονοπατιού σηματοδότησης PLC/DAG/IP₃ (Estrada et al., 2000; Le Mellay et al., 1999), την κίνηση PKC (Aronica et al., 1994), ή αυτό της αδενυλικής κυκλάσης/PKA (Kelly et al., 1999).

Ενδιαφέρον ακόμη παρουσιάζει, η ικανότητα των στεροειδών να επηρεάζουν την λειτουργία των μεμβρανικών διαύλων ιόντων. Η 17β-οιστραδιόλη αναστέλλει τους τύπου L διαύλους ασβεστίου (Nakajima et al., 1995) και ελέγχει την απελευθέρωση K^+ σε ενδοθηλιακά κύτταρα αγγείων λείων μυών, μέσω της φωσφορυλίωσης των Ca^{2+} - και των τασεο-εξαρτώμενων διαύλων K^+ (BKCa) από τις cGMP (White et al., 1995). Αν και δεν έχει επιβεβαιωθεί η εμπλοκή των ER, η 17β-οιστραδιόλη φαίνεται να προσδένεται και να ενεργοποιεί ανεξάρτητα τους διαύλους Maxi- K^+ (Valverde et al., 1999). Ανάλογα, η προγεστερόνη επάγει την απελευθέρωση Ca^{2+} σε σπερματοζώαρια μέσω άμεσης πρόσδεσης στους αντίστοιχους διαύλους και να συμμετέχει στην δημιουργία του ακροσώματος (Mendoza et al., 1995), ενώ παρόμοιες παρατηρήσεις έχουν γίνει και σε οστεοβλάστες (Grosse et al., 2000). Εντούτοις, η δράση της προγεστερόνης φαίνεται να εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο, καθώς στα ενδοθηλιακά κύτταρα αγγείων λείων μυών προκαλεί αντιστρεπτή αναστολή των διαύλων ασβεστίου τύπου L (Barbagallo et al., 2001), γεγονός το οποίο σχετίζεται με την *in vivo* αγγειοδιασταλτική της δράση. Γενικότερα, σε αυτό τον τύπο κυττάρων, τόσο η προγεστερόνη, όσο η οιστραδιόλη και η τεστοστερόνη μειώνουν την συσταλτικότητα και την απελευθέρωση Ca^{2+} , αν η τεστοστερόνη φαίνεται να είναι πιο αποτελεσματική, καθώς μπορεί παράλληλα να ενεργοποιεί τους διαύλους μεγάλης αγωγιμότητας BKCa (Deenadayalu et al., 2001).

Η ομάδα μας ανίχνευσε μεμβρανικές θέσεις πρόσδεσης ανδρογόνων τόσο σε άθικτα κύτταρα, όσο και σε απομονωμένες μεμβράνες στις κυτταρικές σειρές προστάτου LNCaP (Kampa et al., 2002) και DU-145 (Hatzoglou et al., 2005), όπως επίσης και στην σειρά μαστού T47D (Kampa et al., 2005). Μεμβρανικές θέσεις πρόσδεσης ανδρογόνων φαίνεται

επίσης να ανιχνεύονται ειδικά σε καρκινικά κύτταρα προστάτου σε σχέση με φυσιολογικά ή υπερπλαστικά κύτταρα (Stathopoulos et al., 2003) και η παρουσία τους σχετίζεται με την σοβαρότητα της ασθένειας και το στάδιό της νόσου, όπως εκφράζεται από την σταδιοποίηση κατά Gleason (Dambaki et al., 2005). Σε διαγονιδιακούς επίσης αρουραίους, οι οποίοι δεν εξέφραζαν τον AR, τα ανδρογόνα επάγουν αγγειοδιαστολή και ελαττώνουν την ισχαιμία του μυοκαρδίου (Jones et al., 2004). Οι άμεσες μη γενωμικές δράσεις της τεστοστερόνης, όπως η αύξηση του ενδοκυττάρου Ca^{2+} , παρεμποδίζονται από ανταγωνιστές των υποδοχέων που συνδέονται με πρωτεΐνες G, αλλά δεν επηρεάζονται από την παρουσία των ανταγωνιστών ανδρογόνων cyproterone acetate ή flutamide. Ειδικότερα, στα κύτταρα LNCaP η τεστοστερόνη επάγει αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού ακτίνης (Parakonstanti et al., 2003) και αυξάνει την έκκριση του προστατικού αντιγόνου PSA (Kampa et al., 2002). Η τεστοστερόνη, μέσω αυτών των αλλαγών μειώνει την μετανάστευση και την προσκόλληση των κυττάρων LNCaP και DU-145 και εντέλει τα οδηγεί σε απόπτωση, ενώ χορήγηση του συμπλόκου τεστοστερόνης-αλβουμίνης σε αθυμικούς επίμυες με αλλομοσχεύματα LNCaP οδηγεί σε μείωση του μεγέθους των όγκων και εν τέλει σε νέκρωση των όγκων (Hatzoglou et al., 2005).

Μεμβρανικές θέσεις πρόσδεσης οιστρογόνων έχουν βρεθεί στην μήτρα rabbit (Monje and Boland, 1999), στον εγκέφαλο και την υπόφυση (Kuroki et al., 2000), όπως και στις καρκινικές σειρές μαστού MCF7, MDA-MB-231 (Berthois et al., 1986) και την σειρά T47D (Kampa et al., 2005). Δεν έχει διευκρινισθεί αν πρόκειται για ένα διαφορετικό μόριο από τους κλασσικούς οιστρογονικούς υποδοχείς ή για κάποια πρωτεΐνη που εκφράζεται συστατικά σε διάφορους τύπους κυττάρων και ιστών, όπως και στα αρνητικά για τους ER κύτταρα MDA-MB-231. Σε αντίθεση με την τεστοστερόνη, η μη γενωμική δράση της οιστραδιόλης επάγει την κυτταρική επιβίωση μέσω των μορίων Bcl-2 και Bad και προστατεύει από απόπτωση (Kampa et al., 2005). Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται όταν τα κύτταρα αποστερούνται αυξητικών παραγόντων ή ακόμη και όταν καλλιεργούνται σε θρεπτικό μέσο που περιέχει τεστοστερόνη-αλβουμίνη.

Τέλος, κύτταρα τα οποία διαθέτουν μεμβρανικές θέσεις πρόσδεσης για προγεστερόνη είναι τα σπερματοκύτταρα (Tesarik et al., 1993), οι οστεοβλάστες (Grosse et al., 2000), διαφοροποιημένα κοκκοειδή (granulosa) καρκινικά κύτταρα ωθηκών (Machelon et al., 1996) και τα ωκύτταρα (Bagowski et al., 2001). Οι Thomas et al, στην προσπάθεια ταυτοποίησης του υποδοχέα της προγεστίνης σε ωκύτταρα ιχθύος, απομόνωσαν μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη που συνδέεται με G πρωτεΐνες και διαθέτει ομόλογα στους ανθρώπους και γενικότερα στα σπονδυλωτά (Thomas et al., 2002; Zhu et al., 2003a; Zhu et al., 2003b).

3.2.3.3. Στεροειδικές δράσεις των πολυφαινολών

Η στεροειδική δράση των πολυφαινολών, ιδίως των ισοφλαβονών, προτάθηκε βάσει της δομικής τους ομοιότητας με την οιστραδιόλη και την πρόσδεσή τους στους υποδοχείς ERα και β, λόγω της οποίας χαρακτηρίζονται ως φυτοοιστρογόνα. Αρκετές πολυφαινόλες,

μεταξύ των οποίων υδροξυλιωμένες χαλκόνες, φλαβονόνες και φλαβόνες έχουν την ικανότητα να μιμούνται την μεταγραφική δράση της 17β-οιστραδιόλης και να επάγουν τον πολλαπλασιασμό σε οιστρογονοεξαρτώμενα κύτταρα, όπως τα καρκινικά κύτταρα μαστού MCF-7. Φυτοοιστρογόνα, όπως οι genistein, coumestrol, zearalenone, daidzein, apigenin, phloretin, biochanin A, kaempferol, naringenin, formononetin, iriflavone, quercetin και chrysin διαθέτουν διαφορετική συγγένεια για του υποτύπους του υποδοχέα ERα και ERβ, ενώ πιθανόν να λειτουργούν ως αγωνιστές ή ανταγωνιστές, ή ακόμη και να εμφανίζουν μεικτή δράση (Kuiper et al., 1998; Miksicek, 1993).

Επιπλέον, η resveratrol βρέθηκε ότι εμφανίζει δράση παρόμοια με αυτήν της οιστραδιόλης σε ευρύ φάσμα ενδοθηλιακών κυττάρων, καθώς και τα δύο μόρια ενεργοποιούν ταχέως την σηματοδότηση μέσω κινασών MAPK και την ενεργότητα της eNOS και των μεταλλοπρωτεϊνών. Η ταχεία δράση της resveratrol είναι εφικτή σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις (nM) σε σχέση με αυτές που απαιτούνται για την εκδήλωση γενωμικών δράσεων. Ανάλογη ταχεία φωσφορύλιωση των MAPK προκαλεί και πολυφαινολικό εκκύλισμα κόκκινου κρασιού (αλλά όχι λευκού). Το αποτέλεσμα φαίνεται ότι διαμεσολαβείται από τον ER (Klinge et al., 2005).

Οι πολυφαινόλες έχουν αναφερθεί επίσης ότι είναι ικανές να επάγουν την έκφραση διαφορετικών ισομορφών του ER (Cappelletti et al., 2006). Σε συγκριτική μελέτη των σειρών μαστού T47D και BT20H, η 17β-οιστραδιόλη επάγει την έκφραση του υποδοχέα ERβ και ρυθμίζει την αναλογία των ισομορφών β2/β5, υπέρ της πρώτης. Αντιθέτως, η genistein επάγει την έκφραση των ERβ2 και ERβ1 στα κύτταρα T47D, με προεξάρχουσα την ισομορφή β2, ενώ εμφανίζει αντίστροφη δράση στην κυτταρική BT20H. Επιπλέον, η φλαβονόλη quercetin δεν είχε κανένα αποτέλεσμα στην διαφοροποίηση της έκφρασης των υποδοχέων οιστρογόνων. Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης φαίνεται ότι αποτελεί μέρος ενός αυτορυθμιζόμενου βρόγχου, ο οποίος περιορίζει μακροπρόθεσμα την πολλαπλασιαστική δράση των πολυφαινολών μέσω ERα.

Εκτός από την ρύθμιση της σηματοδότησεως μέσω των υποδοχέων οιστρογόνων, οι πολυφαινόλες αναστέλλουν την μετατροπή της ανδροστεδιόνης σε οιστρόνη, μέσω των αρωματασών. Σύμπλοκες πολυφαινόλες μαύρου τσαγιού (κλάσματα Toyopearl TF-1, TF-2 και TF-3) αναστέλλουν μέσω αυτού του μηχανισμού τον πολλαπλασιασμό κυττάρων μαστού MCF-7 υπό συστατικές συνθήκες ή παρουσία μιτογόνου διϋδροεπιανδροστερόνης (Way et al., 2004). Ανάλογη δράση εμφανίζουν και πολυφαινόλες του ζύθου (prenylflavonoids), όπως οι xanthohumol, isoxanthohumol και 8-prenylnaringenin (Monteiro et al., 2006). Οι παραπάνω μελέτες αφορούν τις δράσεις των πολυφαινολών σε μοριακό ή κυτταρικό επίπεδο. Σε οργανικό επίπεδο, έχει βρεθεί ότι δίαιτα πλούσια σε πολυφαινόλες μπορεί να επηρεάσει τον ορμονικό κύκλο. Η κατανάλωση συμπληρωμάτων σόγιας (περίπου 45 mg ισοφλαβονών) από προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της διάρκειας της παραγωγικής φάσεως του κύκλου ή/και την καθυστέρηση της εμμήνου ρύσεως, με ταυτόχρονη καταστολή της διακύμανσης θυλακιοτρόπου (FSH) και της ωχρινοποιητικής ορμόνης (LH). Οι μεταβολές της συγκεντρώσεως της οιστραδιόλης και της

χοληστερόλης στο πλάσμα ήταν ανάλογες με αυτές που παρατηρούνται μετά από χορήγηση ταμοξιφένης (Cassidy et al., 1994) και συσχετίζονται με την μειωμένη εμφάνιση καρκίνου του μαστού στον ασιατικό πληθυσμό.

Οι ισοφλαβόνες φαίνεται επίσης να επηρεάζουν τα επίπεδα των ανδρογόνων στο αίμα, καθώς και την ενεργότητα των ενζύμων που εμπλέκονται στην στεροειδογένεση. Χρόνια πρόσληψη ισοφλαβονών σόγιας μέσω της τροφής σε αρσενικούς αρουραίους της σειράς F1 έδειξε ότι η ενεργότητα της 3 β -HSD (3 β -hydroxysteroid δεϋδρογενάση) αυξάνει κατά 50% την 28^η ημέρα της ζωής τους (1046,6 mg ισοφλαβόνες/kg), ή ανάλογα της CYP17 (235,6 mg ισοφλαβόνες/kg) (McVey et al., 2004a). Επιπλέον, στους παραπάνω αρουραίους ελέχθηκαν τα επίπεδα ανδρογόνων στον ορό: στους αρουραίους μάρτυρες η συγκέντρωση της τεστοστερόνης ήταν σχετικά χαμηλή την 28^η μετεμβρυϊκή ημέρα (0,4 ng/ml), αυξήθηκε έως 2,5-3,0 ng/ml την 70^η και σταθεροποιήθηκε στο 1 ng/ml την 120^η. Αντιθέτως, στους αρουραίους που κατανάλωναν υψηλές ποσότητες ισοφλαβονών σόγιας τα επίπεδα τεστοστερόνης παρέμειναν υψηλά (3 ng/ml) μέχρι την 120^η ημέρα, όπως επίσης και η συγκέντρωση τεστοστερόνης στους όρχεις (McVey et al., 2004b). Αντίστοιχη μελέτη σε ενήλικες αρουραίους της σειράς Sprague-Dawley έδειξε ότι οι ισοφλαβόνες σχετίζονται με μείωση του σωματικού βάρους και του μεγέθους του προστάτου, αυξημένη κινητικότητα και μείωση της τεστοστερόνης και της ανδροστενεδιόνης στο πλάσμα, χωρίς ωστόσο να επηρεάζονται τα επίπεδα της LH ή της οιστραδιόλης, ούτε η δραστικότητα της 5 α -αναγωγής του προστάτου και τα επίπεδα του StAR (του οξέος ρυθμιστικού στεροειδογενετικού πεπτιδίου των όρχεων) (Weber et al., 2001). Οι παραπάνω αλλαγές σχετίζονται με τον προστατευτικό ρόλο των ισοφλαβονών στην αναπαραγωγική ενδοκρινολογία του άρρενος, και εμπλέκονται σε καταστάσεις όπως η άρχουσα υπερπλασία και ο καρκίνος του προστάτου.

Αξίζει να σημειωθεί επίσης, ότι η χορήγηση ginkgolide B σε αρουραίους ελαττώνει την πρόσδεση της χοληστερόλης στον περιφερειακό (μιτοχονδριακό) υποδοχέα των βενζοδιαζεπινών (PBR), καθώς και την μεταγραφή και την έκφραση του υποδοχέα στον φλοιό των επινεφριδίων, ενώ ελαττώνει και τα επίπεδα των ελεύθερων γλυκοκορτικοειδών. Ανάλογα, σε απομονωμένα κύτταρα φλοιού των επινεφριδίων το ginkgolide B κατατέλλει την σύνθεση του PBR και την σύνθεση κορτικοστερόνης μετά από συνεπίδραση με αδρενοκορτικοτροπίνη ACTH (Papadopoulos et al., 1998). Καθώς η έκφραση του PBR αποτελεί προαπαιτούμενο για την στεροειδογένεση (adrenocortical and luteal), τον έλεγχο των επιπέδων των γλυκοκορτικοειδών και την υπερευαισθησία των νεογνών στο stress, τα φλαβονοειδή θα μπορούσαν να παρατείνουν την περίοδο υποευαισθησίας των νεογνών.

Η κατανάλωση ισοφλαβονών κατά την εμβρυακή ηλικία, θα μπορούσε να έχει σημαντικές επιπτώσεις στην ανάπτυξη των νεογνών ή την μελλοντική τους υγεία. Τα υποκατάστατα βρεφικού γάλακτος με βάση την σόγια χρησιμοποιούνται ευρέως την τελευταία τριακονταετία και περιέχουν υψηλά ποσοστά ισοφλαβονών (32-47 mg/l), σε σχέση με το μητρικό γάλα (5,6 \pm 4,4 μ g/l). Αντίστοιχα, η συγκέντρωση των ισοφλαβονών στο πλάσμα βρεφών 4 μηνών που τρέφονται με γάλα σόγιας είναι 654-1775 μ g/l, κατά πολύ υψηλότερη

από αυτή σε βρέφη που τρέφονται με γάλα αγελάδος (10 μg/l) ή μητρικό γάλα (6 μg/l). Ο περιορισμένος μεταβολισμός των ισοφλαβονών στο έντερο - καθώς δεν ανιχνεύθηκε equol ή άλλοι μεταβολίτες- και η συνεχής κατανάλωσή τους από το νεογνό, οδηγεί σε συγκεντρώσεις στην κυκλοφορία 13.000-22.000 μεγαλύτερες από αυτή της οιστραδιόλης (Setchell et al., 1997). Η επίδραση της διατροφής στον ρυθμό σύνθεσης της χοληστερόλης (FSR) μετά από συγκριτική μελέτη 4 ομάδων νεογνών τα οποία κατανάλωναν τους πρώτους τέσσερις μήνες της ζωής τους μητρικό γάλα (υψηλή χοληστερόλη, λίγα φυτοοιστρογόνα), γάλα αγελάδος (χαμηλή χοληστερόλη, λίγα φυτοοιστρογόνα), γάλα σόγιας (καθόλου χοληστερόλη, υψηλά φυτοοιστρογόνα) ή τροποποιημένο γάλα σόγιας (χαμηλή χοληστερόλη, υψηλά φυτοοιστρογόνα) είχε ως αποτέλεσμα χαμηλό FSR στην πρώτη ομάδα, υψηλότερο στην τρίτη και ενδιάμεσο στις υπόλοιπες. Η αποβολή των ισοφλαβονών από τα ούρα ήταν αντιστρόφως ανάλογη της FSR, αλλά όχι της συγκέντρωσης της χοληστερόλης στον ορό (Cruz et al., 1994).

Λόγω της ποικιλομορφίας της δράσεώς τους στην σύνθεση, σηματοδότηση και κυκλοφορία των στεροειδών, αρκετές πολυφαινόλες εντάσσονται στις ουσίες που παρεμποδίζουν την ενδοκρινή δράση (endocrine-disrupting chemicals) (Henley and Korach, 2006). Αξίζει να σημειωθεί ότι στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται και αλογονωμένοι υδρογονάνθρακες, οι οποίοι χρησιμοποιούνται ως φυτοφάρμακα.

3.2.4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Προκειμένου να μελετήσουμε την δράση των πολυφαινολών στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, χρησιμοποιήσαμε εκχυλίσματα, τα οποία παρασκευάστηκαν από πολύ σταφυλιών (όπως περιγράφεται στο 2.2.3.). Τα εκχυλίσματα αυτά περιέχουν κυρίως σύμπλοκες πολυφαινολικές ενώσεις, οι οποίες σε αντίθεση με τις μονομερείς, αν και περιέχονται σε μεγάλη ποσότητα στις φυτικές διατροφικές πηγές, δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς.

Η απομόνωση των πολυμερών φλαβονοειδών έγινε για πρώτη φορά εργαστηριακά το 1951, από τον Jacques Masquelier (Université de Bordeaux). Σύμφωνα με την ναυτική παράδοση, το 1532 ένας Γάλλος εξερευνητής, παγιδευμένος στον ποταμό Saint Lawrence, χρησιμοποίησε αφέψημα από τις βελόνες και τον φλοιό του ενδημικού πεύκου για να αντιμετωπίσει το σκορβούτο, μετά την προτροπή ενός ιθαγενούς. Ο Masquelier απομόνωσε από το πεύκο ένα εκχύλισμα, το οποίο ονόμασε *pycnogenol* και είχε ιδιότητες ανάλογες με αυτές της βιταμίνης C. Μετέπειτα, οι ουσίες αυτές ονομάστηκαν προανθοκυανίνες, ολιγομερή σύμπλοκα προανθοκυανινών (OPCs) ή προκυανιδολικά ολιγομερή (PCO) και βρέθηκε ότι παράγονται από ποικιλία φυτών. Σήμερα, οι ολιγομερείς προανθοκυανίνες (oligomeric proanthocyanidins ή OPCs) παράγονται εμπορικά από κάρυα σταφυλής (grape seed extract, GSE) ή τον φλοιό του πεύκου *Pinus pinaster ssp. Atlantica* (*pycnogenol*). Το εκχύλισμα σταφυλής περιέχει 92-95% OPC σε αντίθεση με το *pycnogenol* (80-85%).

Οι ολιγομερείς πολυφαινόλες θεωρούνται ασφαλή μόρια. Χάριν των χρωμοφόρων ιδιοτήτων τους χρησιμοποιούνται ευρέως στην χημεία τροφίμων και ανήκουν στα μη επισφαλή μόρια της ομάδος E163. Μελέτες σε αρουραίους των σειρών Sprague-Dawley (Wren et al., 2002) και Fischer (Yamakoshi et al., 2002) έδειξαν την απουσία τοξικότητας.

Οι ολιγομερείς πολυφαινόλες έχουν κατ'αντιστοιχία με τις μονομερείς την ιδιότητα να απευαισθητοποιούν τα κύτταρα κατά την έκθεση σε ελεύθερες ρίζες ή οξειδωτικούς παράγοντες (Cu^{2+}), καταστέλλοντας την ανοσολογική απόκριση και την διαφοροποίηση των προ-μονοκυττάρων (THP-1) σε προσκολλησίμα μακροφάγα (Shafiee et al., 2003). Επίσης, η εκχύλιση με μεθανόλη φαίνεται ότι επιτρέπει την εκχύλιση συστατικών του GSE με την μεγαλύτερη *in vitro* ικανότητα εξουδετέρωσης των ελευθέρων ριζών θειοβαρβιτουρικού οξέος και υδροξυλίου έναντι των λιπιδίων. Το ίδιο εκχύλισμα (50 mg/kg σωματικού βάρους) βοηθά στην αποκατάσταση των επιπέδων της καταλάσης, της υπεροξειδικής δισμουτάσης και της υπεροξειδάσης σε αλφικούς αρουραίους της σειράς Wistar, μετά από χορήγηση χλωροφορμίου (1,25 ml/kg σωματικού βάρους), όπως επίσης αποτρέπει την επαγόμενη οξειδωση λιπιδίων. Ιστολογική παρατήρηση του ήπατος των πειραματοζώων έδειξε ότι αναστρέφουν επίσης τον παθολογικό φαινότυπο που προκαλείται από τις ρίζες $\text{CCl}_3\cdot$ και $\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$, καθώς δεν βρέθηκαν αιμορραγικές ή νεκρωτικές περιοχές (Chidambara Murthy et al., 2002).

Η αντινεοπλασματική δράση των ολιγομερών πολυφαινολών έχει δειχθεί σε καρκινικά κύτταρα εντέρου (Laurent et al., 2004), μαστού (Sharma et al., 2004) και προστάτου (Singh et al., 2004). Τα ολιγομερή εμφανίζουν αντιπολλαπλασιαστική δράση, όπως επίσης

ενισχύουν την δράση άλλων αντινεοπλαστικών φαρμάκων (doxorubicin) ή αναστέλλουν την αγγειογένεση επάγοντας την έκφραση της πρωτεΐνης IGFBP-3 (Insulin-like Growth Factor Binding Protein 3). Οι cyanidin και delphinidin βρέθηκε επίσης ότι αναστέλλουν ισχυρά την *in vitro* δράση του EGFR (Meiers et al., 2001). Η μεταστατική ικανότητα των όγκων εξαρτάται επίσης από την τροφική τους υποστήριξη. Οι Agrawal et al., έδειξαν ότι το GSE αποτρέπει την δημιουργία σωληνοειδών δομών από ενδοθηλιακά κύτταρα και κατ'επέκταση την νεοαγγειογένεση (Agarwal et al., 2004), ενώ οι Corder et al. έδειξαν ότι το ίδιο εκχύλισμα αναστέλλει την έκφραση της ET-1 και υποβοηθά την αποκατάσταση της φυσιολογικής ενδοθηλιακής λειτουργίας (Corder et al., 2004).

Σε πειραματικό μοντέλο αρουραίων με συγγενή καταρράκτη (αρουραίοι ICR/f) βρέθηκε ότι το GSE προλαμβάνει και καθυστερεί την εμφάνιση της νόσου. Σύγκριση διαφορετικών κλασμάτων του εκχυλίσματος (μόρια διμερή έως τετραμερή, πενταμερή έως επταμερή, ή άνω των δεκαμερών) έδειξε ότι η προστατευτική δράση του εκχυλίσματος είναι ανάλογη του μήκους των πολυμερών πολυφαινολών (Yamakoshi et al., 2002). Η δράση αυτή οφείλεται πιθανόν στην ρύθμιση της σύνθεσης και της έκκρισης πολυσακχαριτών. Σε *ex vivo* καλλιέργεια κερατοειδούς χιτώνα, τα προκυανιδολικά ολιμερή (1 mg/ml) ενίσχυσαν την σύνθεση εξοζαμινών και ουρονικών οξέων και σε μικρότερο βαθμό αυτή των εξοζών, 5-24 ώρες μετά την εφαρμογή τους, αποτρέποντας παράλληλα την υποκατάστασή τους με θειϊκές ομάδες και την πρωτεολυτική τους αποικοδόμηση. Ταυτόχρονα, το ίδιο εκχύλισμα αύξησε την έκκριση των γλυκοζαμινογλυκανών (υαλουρονίνη) στο θρεπτικό μέσο (Robert et al., 2005). Η δράση των PCOs θα μπορούσε να λειτουργήσει προστατευτικά για τα κύτταρα του κερατοειδούς, ελαττώνοντας την κατακράτηση ύδατος, όπως συμβαίνει σε αρκετές παθολογικές καταστάσεις. Ανάλογες παρατηρήσεις προέκυψαν και κατά την μελέτη του τοιχώματος της σαφήνους φλέβας (Drubaix et al., 1997). Μελέτη σε αρουραίους έδειξε ότι το Endotelon[®], ένα εμπορικό σκεύασμα που περιέχει OPCs (Sanofi-Labaz), προλαμβάνει το πειραματικό λεμφοίδημα (Doutremepuich et al., 1991). Η λεμφαγωγός δράση των πολυμερών φλαβονοειδών επιβεβαιώθηκε και σε ασθενείς που υπέστησαν μαστεκτομή: μετά από εξάμηνη χορήγηση 500mg Daflon[®] ημερησίως παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του οιδήματος του άνω άκρου, καθώς επίσης και της παραισθησίας (Pecking et al., 1997). Ακόμη, πειραματικές ενδείξεις υποστηρίζουν ότι οι OPCs έχουν την ικανότητα να ενισχύουν τις δομές που περιέχουν κολλαγόνο και ελαστίνη (χόνδροι, τένοντες, τοίχωμα των αγγείων, επιδερμίδα και μυς). Χορήγηση 100mg OPCs ημερησίως είχε ως αποτέλεσμα την ενίσχυση των τριχοειδών και την αποδυνάμωση των συμπτωμάτων της φλεβίτιδος (Delacroix, 1981; Thebaut et al., 1985).

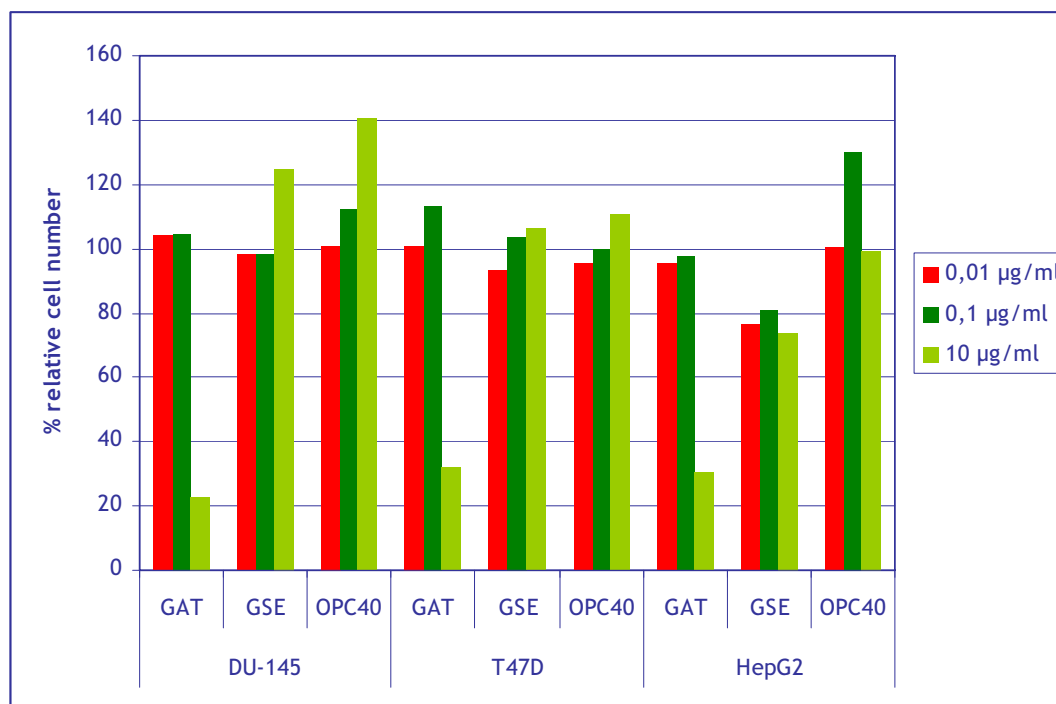
Επιπλέον, οι προκυανιδίνες είναι αποτελεσματικές στην αντιμετώπιση του χλοάσματος, αν και η απόκριση στην θεραπεία με αυτές εμφανίζει μέγιστο αποτέλεσμα μέχρι και έξι μήνες συνεχούς χορηγήσεως (Yamakoshi et al., 2004). Τέλος, οι Andriambeloston et al. (Andriambeloston et al., 1998) ανέφεραν επίσης ότι η delphinidin, αλλά όχι οι malvidin και cyanidin, διαθέτουν αγγειοχαλαρωτικές ιδιότητες.

3.2.5. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΗΣ ΤΑΧΕΙΑΣ ΔΡΑΣΕΩΣ ΤΩΝ ΟΛΙΓΟΜΕΡΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΑΝΔΡΟΓΟΝΩΝ

3.2.5.1. Πρώϊμα αποτελέσματα

3.2.5.1.1. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός

Καταρχήν, ελέγξαμε την επίδραση των εκκυλισμάτων στον πολλαπλασιασμό κυττάρων των καρκινικών σειρών μαστού (T47D), προστάτου (DU-145) και ήπατος (HepG2). Τα κύτταρα επωάστηκαν για τρεις ημέρες παρουσία των παραπάνω ουσιών σε συγκεντρώσεις 10^{-3} - 10^{-10} $\mu\text{g/ml}$. Ο αριθμός των κυττάρων υπολογίστηκε με την μέθοδο του MTT και η αύξηση ή μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού τους εκτιμήθηκε σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρα. Η δράση κάθε εκκυλίσματος διαφοροποιείται ανάλογα με την κυτταρική σειρά (Εικ. 3.2.7.). Σε γενικές γραμμές, το GAT μειώνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε συγκεντρώσεις >1 $\mu\text{g/ml}$ σε όλες τις κυτταρικές σειρές, είναι περισσότερο αποτελεσματικό στην σειρά DU-145 και λιγότερο στα HepG2. Αντίθετα, αντίστοιχη ποσότητα από τις πολυφαινόλες των μικροσφαιριδίων δεν είχαν καμία επίδραση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Τα εκκυλίσματα OPC80 και OPC40 δεν είχαν επίδραση στην σειρά T47D, σε συγκεντρώσεις όμως ≥ 1 $\mu\text{g/ml}$ ενίσχυσαν τον πολλαπλασιασμό των DU145, ενώ μόνο το OPC40 εμφάνισε παροδική θετική δράση στον αριθμό των κυττάρων HepG2. Ανάλογη αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού παρατηρήθηκε και μετά από επίδραση και με άλλες πολυφαινολικές ουσίες της αμπέλου (βινιφερίνες). Προκειμένου να διαπιστώσουμε πού οφείλεται το αποτέλεσμα αυτό, ελέγξαμε άλλες παραμέτρους τις κυτταρικής φυσιολογίας.

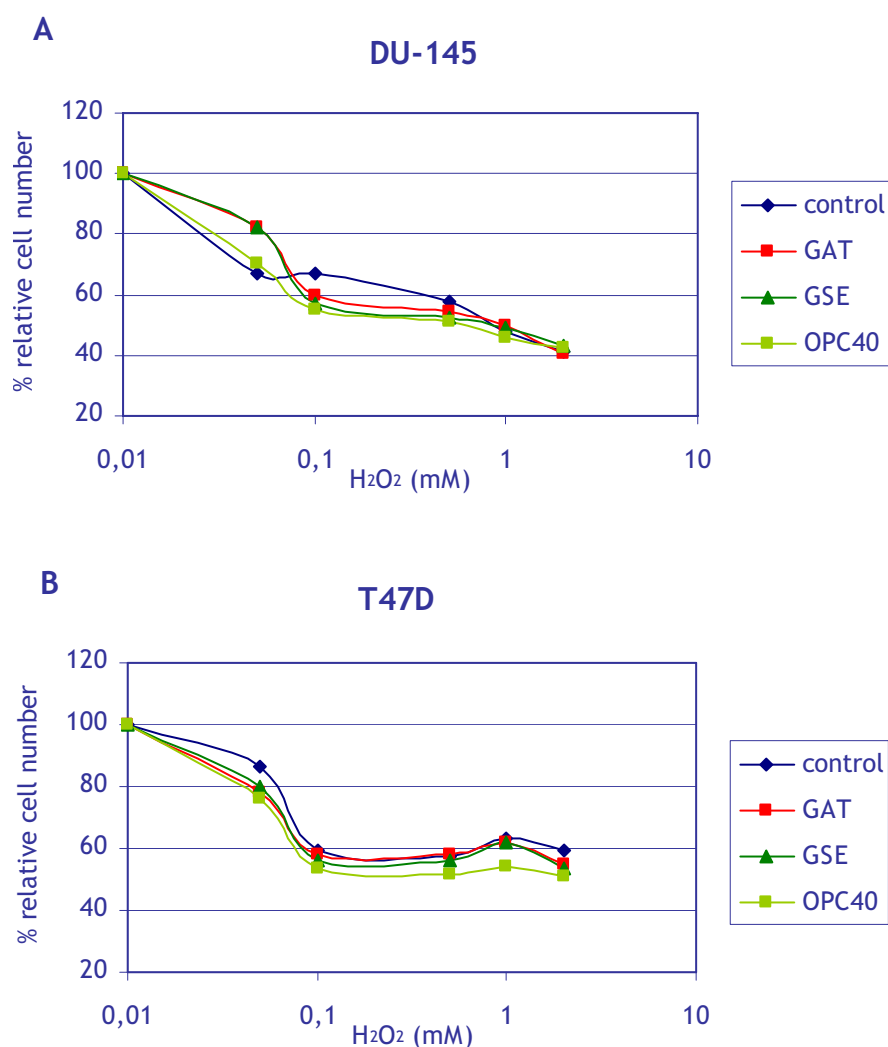


Εικόνα 3.2.7. Επίδραση των συμπλόκων πολυφαινολών στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

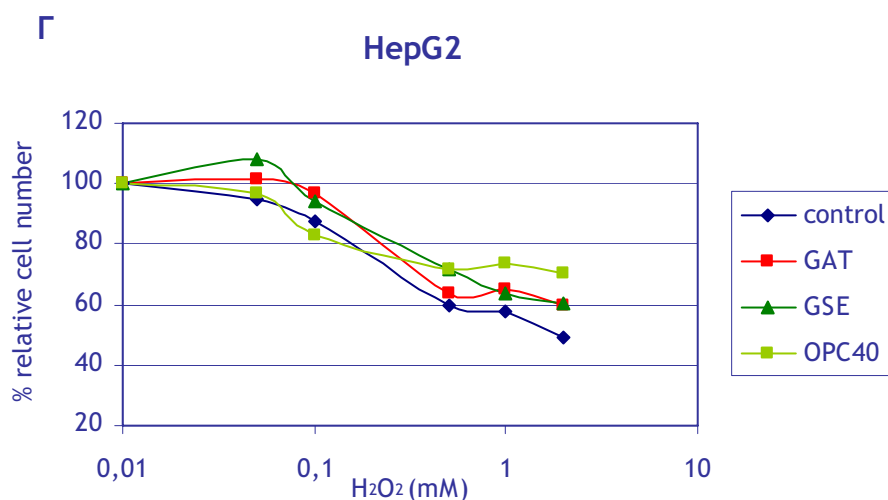
3.2.5.1.2. Αντιοξειδωτική δράση

Εξετάσαμε την ικανότητα των μειγμάτων ολιγομερών προανθοκυανινών να εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση, προστατεύοντας τα κύτταρα από τις ελεύθερες ρίζες που δημιουργούνται παρουσία H_2O_2 . Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε κυμαινόμενη συγκέντρωση H_2O_2 (0,01-2 mM) για 2 ώρες, μετά ή κατά την διάρκεια προσθήκης πολυφαινολών στο θρεπτικό μέσο. Οι πολυφαινόλες χρησιμοποιήθηκαν στην συγκέντρωση που εμφάνισε την εντονότερη επίδραση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (10 $\mu\text{g/ml}$).

Στις κυτταρικές σειρές μαστού και προστάτη, οι συγκεκριμένες πολυφαινολικές ενώσεις δεν είχαν θετικό αποτέλεσμα (Εικ. 3.2.8.). Αντιθέτως, στα κύτταρα ήπατος, οι προανθοκυανίνες εμφάνισαν αντιοξειδωτική δράση. Το αποτέλεσμα ήταν εντονότερο σε μεγάλες συγκεντρώσεις H_2O_2 . Το φαινόμενο αυτό πιθανόν οφείλεται στην αυξημένη μεταβολική δραστηριότητα των ηπατοκυττάρων, η οποία θα μπορούσε να ευθύνεται για την διάσπαση των ολιγομερών σε απλούστερες μονομερείς ενώσεις, όπως οι κατεχίνες και τα φαινολικά οξέα, με παγιωμένη αντιοξειδωτική δράση.



Εικόνα 3.2.8. Επίδραση των συμπλόκων πολυφαινολών στην εξουδετέρωση ROS, παρουσία H_2O_2 , στις κυτταρικές σειρές (A) DU-145 και (B) T47D.



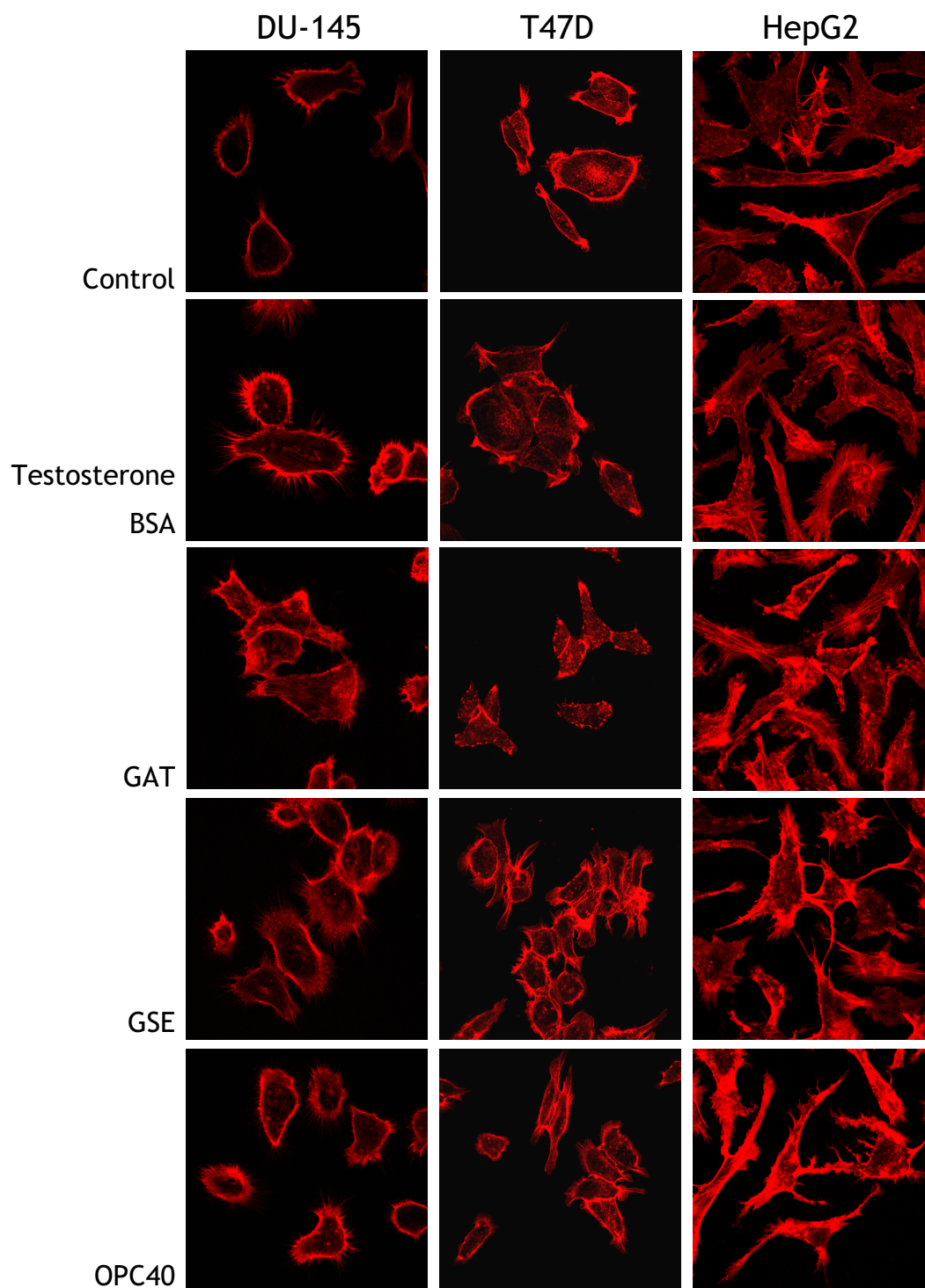
Εικόνα 3.2.8.(Γ) Επίδραση των συμπλόκων πολυφαινολών στην εξουδετέρωση ROS, παρουσία H₂O₂, στην σειρά HepG2.

3.2.5.1.3. Τροποποίηση του κυτταροσκελετού της ακτίνης

Ελέγξαμε κατά πόσον οι ολιγομερείς προανθοκυανίνες (10 μg/ml) δύνανται να προκαλέσουν αλλαγές στην διαμόρφωση του κυτταροσκελετού, σχετικά σύντομα μετά την εφαρμογή τους (1 h). Συγκρίναμε επίσης την δράση τους με αυτή του συμπλόκου τεστοστερόνη-BSA.

Μεταξύ των εκκυλισμάτων που χρησιμοποιήθηκαν, ισχυρότερη δράση είχε το πρωτογενές μείγμα GAT, προκαλώντας τον σχηματισμό ινιδίων stress ανεξαρτήτως κυτταρικής σειράς (Εικ. 3.2.9.). Επιπλέον, στις σειρές DU-145 και HepG2 εμφανίστηκαν επιπλέον μικροεστίες πολυμερισμού ακτίνης, ενδεικτικές της εκτεταμένης και ριζικής αναδιοργάνωσης του σκελετού. Η δράση αυτή θα μπορούσε να δικαιολογεί την αντιπολλαπλασιαστική ικανότητα του εκκυλίσματος, καθώς αλλαγές στο σχήμα και την προσκολλητική ικανότητα των κυττάρων μπορεί να επιφέρουν κυτταρικό θάνατο. Τα αποτελέσματα δεν είναι συγκρίσιμα με αυτά της τεστοστερόνης. Οι διαφορές πιθανόν οφείλονται στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν: 10⁻⁷M στην περίπτωση της τεστοστερόνης-BSA και 2x10⁻⁵ M κατά προσέγγιση για το GAT, αν θεωρήσουμε ότι αποτελείται από μονομερείς ενώσεις. Εναλλακτικά, τα επιμέρους φλαβονοειδή μπορεί να λειτουργούν συνεργατικά, προκαλώντας τόσο δραστικές αλλαγές στην δομή του κυτταροσκελετού.

Εντούτοις, η δράση της τεστοστερόνης, μέσω των μεμβρανικών θέσεων προσδέσεώς της ομοιάζει με αυτή των εκκυλισμάτων OPC80 και OPC40, όπως επίσης και με αυτή των μικροσφαιριδίων. Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε εκτεταμένη αναδιοργάνωση των περιφερειακών κυτταρικών προεκβολών, όπως φιλοπόδια, λαμελλιπόδια και εστίες προσφύσεως. Η τεστοστερόνη προκάλεσε την δημιουργία στεφάνης φιλοποδίων στα κύτταρα προστάτου και ήπατος, ενώ στα κύτταρα μαστού προώθησε την δημιουργία λαμελλιποδίων, καθώς τον έντονο και διακριτό πολυμερισμό της ακτίνης κοντά στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Επώαση με OPC80 ή OPC40 είχε ως αποτέλεσμα την



Εικόνα 3.2.9. Αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης παρουσία εκχυλισμάτων συμπλόκων πολυφαινολών ή τεστοστερόνης-BSA στις κυτταρικές σειρές προστάτου (DU-145), μαστού (T47D) και ήπατος (HepG2), 1 h μετά την εφαρμογή τους.

δημιουργία λεπτών συστοιχιών φιλοποδίων και σε μικρότερο βαθμό την ενίσχυση του δικτύου ακτίνης (actin mesh) στην περιφέρεια των κυττάρων T47D και DU-145. Το εκχύλισμα OPC80 ήταν περισσότερο αποτελεσματικό σε σχέση με το OPC40. Αντιθέτως, στα HepG2 τα OPC80 και OPC40 προώθησαν την δημιουργία προεκβολών με σύνθετη μορφολογία: αρχικά σχηματίστηκαν πλατείς προεκβολές (λαμελλιπόδια) και κατόπιν ακολούθησε μέσα από αυτές ο σχηματισμός παραφυάδων με την μορφή μικρότερων προεκβολών. Στην περίπτωση των ηπατοκυττάρων, είναι ιδιαίτερα εμφανές ότι τα επιμέρους συστατικά του GAT εμφανίζουν διακριτές δράσεις στην ρύθμιση του πολυμερισμού της ακτίνης.

3.2.5.2. Διαλογή μεμονωμένων πολυφαινολών

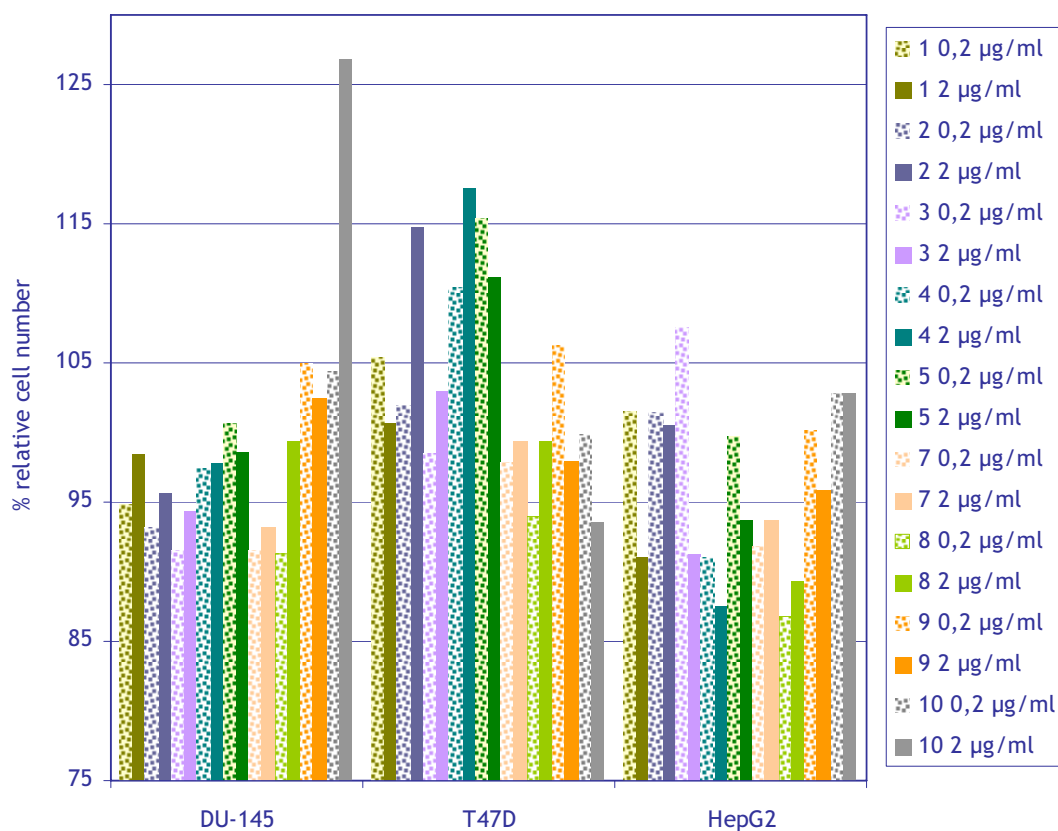
Αν και τα εκχυλίσματα πολυφαινολών σταφυλιών έχουν την ιδιότητα να προκαλούν αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, η εις βάθος μελέτη της δράσεως τέτοιων μειγμάτων δεν έχει επιστημονική αξία, λόγω της πολύπλοκης σύστασής τους, όπως επίσης και της διαφορετικής σύστασης της πρώτης ύλης και δεν προσφέρει το πλεονέκτημα της επαναληψιμότητας. Αφετέρου μεμονωμένα συστατικά των μειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν πιθανόν να εμφανίζουν αντίθετες δράσεις, ελαχιστοποιώντας την ανίχνευση ειδικών δράσεων. Για τον λόγο αυτό, χρησιμοποιήσαμε υποκλάσματα των μειγμάτων με την εφαρμογή διαφορετικών πρωτοκόλλων απομονώσεως και καθαρισμού (2.2.3.).

3.2.5.2.1. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός

Τα παραπάνω εκχυλίσματα ελέγχθηκαν σε συγκεντρώσεις 0,05-5 µg/ml, όσον αφορά την δράση τους στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στις ανθρώπινες καρκινικές σειρές μαστού (T47D), προστάτου (DU-145) και ήπατος (HepG2), κατ'αναλογία με το πρωτόκολλο ελέγχου των συμπλόκων εκχυλισμάτων OPC. Με εξαίρεση τα εκχυλίσματα 10 στην κυτταρική σειρά προστάτου DU-145, στις υπόλοιπες περιπτώσεις δεν παρατηρήθηκαν έντονες μεταβολές στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (Εικ. 3.2.10.).

Η χρήση των στηλών ρητίνης Sephadex LH20 για την κλασματοποίηση των εκχυλισμάτων 3-4 οδήγησε στα κλάσματα 7-10, καθένα από τα οποία έχει διαφορετική σύσταση. Σε γενικές γραμμές, η ενίσχυση των εκχυλισμάτων σε μονομερείς πολυφαινόλες δεν συμβαδίζει με αύξηση της αντιπολλαπλασιαστικής τους δράσης. Το εκχύλισμα 7, το οποίο περιέχει κυρίως επικατεχίνη, εμφανίζει ασθενή δράση στην ανάπτυξη των DU-145 και HepG2 (μείωση κατά 7%), ενώ το κλάσμα 8, αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των ηπατοκυττάρων κατά 11%. Τα κλάσματα συμπλόκων πολυφαινολών είναι πιο αποτελεσματικά και εμφανίζουν δοσοεξαρτώμενη δράση, κυρίως στις κυτταρικές σειρές μαστού και ήπατος. Στα ηπατοκύτταρα επίσης, η δράση των πολυφαινολών, με εξαίρεση τα εκχυλίσματα 2,7 και 10, τείνει προς μείωση του κυτταρικού πληθυσμού. Το φαινόμενο αυτό πιθανόν οφείλεται σε διαφορετικό μεταβολισμό των ουσιών μεταξύ των κυτταρικών σειρών. Επιπλέον, όπως

δείξαμε σε προηγούμενο κεφάλαιο, η απόκριση των κυτταρικών σειρών σε μόρια κατεχινών είναι συνήθως αργή και εκδηλώνεται μετά από 2-3 κύκλους διαίρεσης.



Εικόνα 3.2.10. Επίδραση των συμπλόκων πολυφαινολών στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

3.2.5.2.2. Αντιοξειδωτική δράση

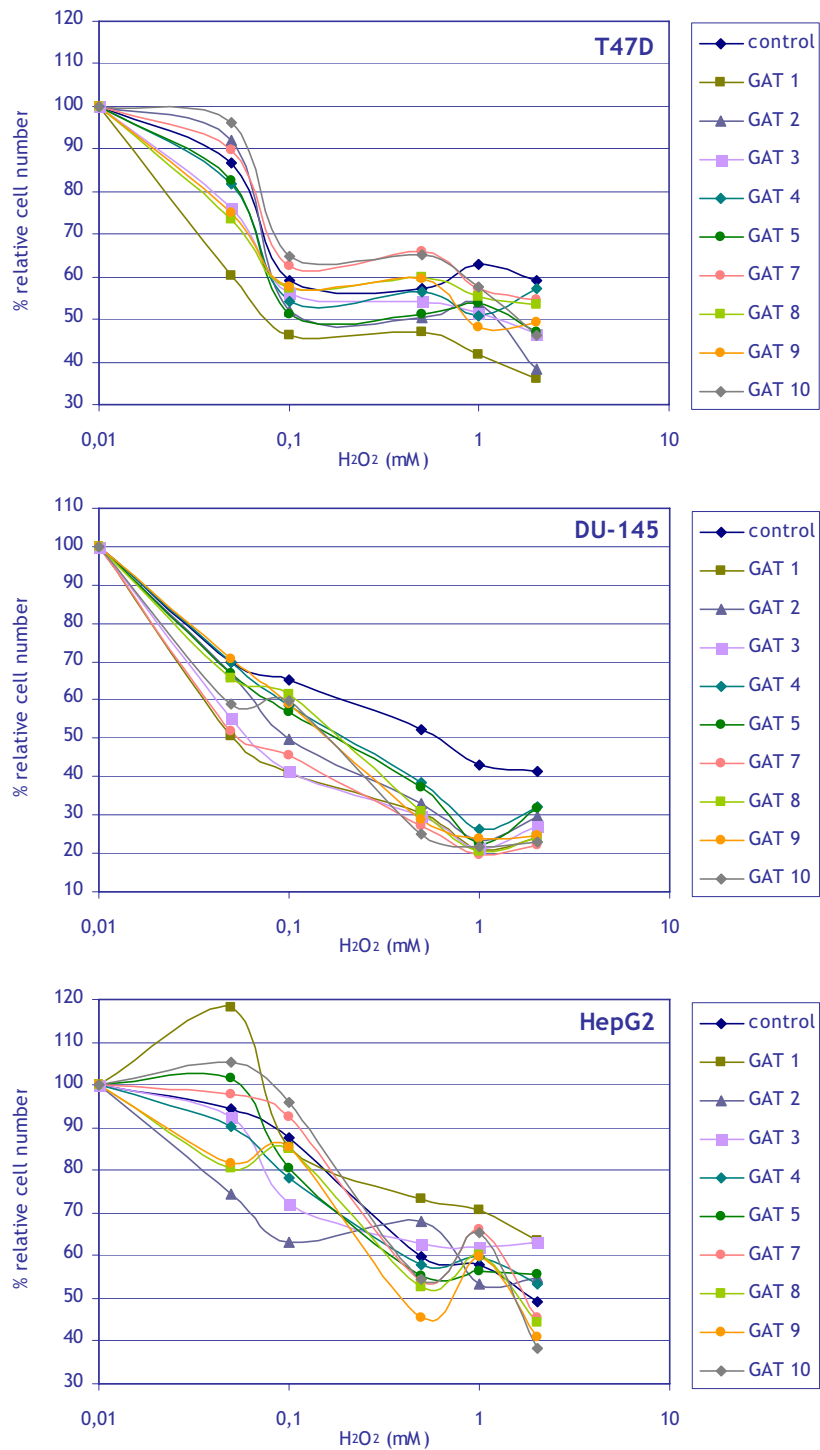
Προεπώση με τα εκκυλίσματα

Ελέγξαμε καταρχήν την ικανότητα των εκκυλισμάτων όσον αφορά στην μακροπρόθεσμη προστασία των κυττάρων από την τοξική δράση του H_2O_2 , μετά από 24ωρη προεπώση με πολυφαινόλες (10 µg/ml) (Εικ. 3.2.11.). Τα εκκυλίσματα εμφανίζουν διαφορετική αντιοξειδωτική ικανότητα: στα κύτταρα μαστού και τα ηπατοκύτταρα τα εκκυλίσματα 7 και 10 εμφάνισαν αντιοξειδωτική δράση, όπως επίσης και τα κλάσματα 2 και 10 αποκλειστικά στα ηπατοκύτταρα. Παραδόξως όλα τα κλάσματα εμφάνισαν προοξειδωτική δράση στα κύτταρα προστάτου.

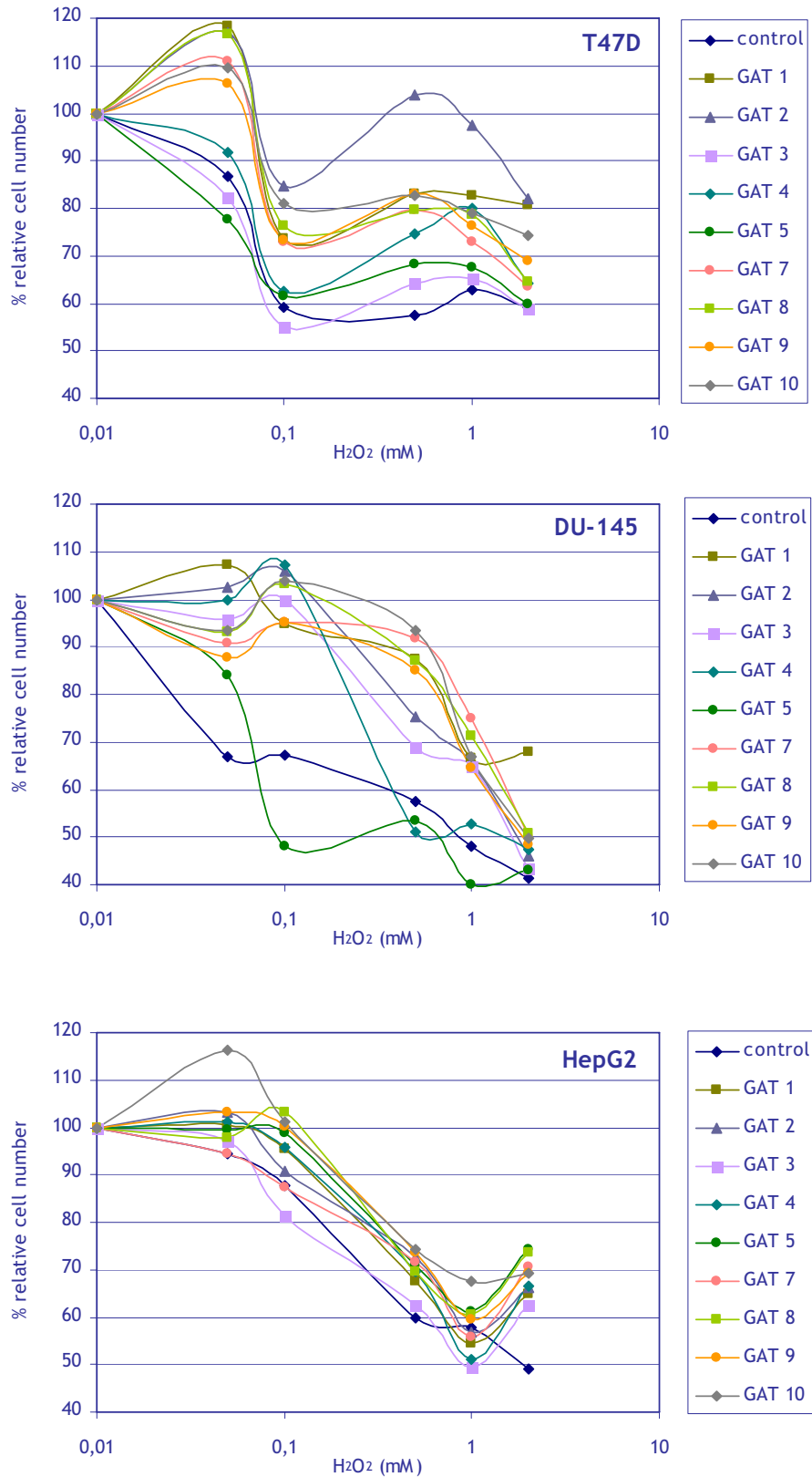
Άμεση εξουδετέρωση των ROS, παρουσία H_2O_2

Στην περίπτωση της ταυτόχρονης προσθήκης των πολυφαινολών και του H_2O_2 , όλα τα εκκυλίσματα ήταν αποτελεσματικά στην άμεση εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών (Εικ. 3.2.12.). Στα κύτταρα DU-145 εμφανίζουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση σε αντίθεση με τον προοξειδωτικό τους χαρακτήρα στο προηγούμενο πείραμα. Όλα επίσης τα κλάσματα

προστάτευσαν τα ηπατοκύτταρα από την οξειδωτική καταστροφή του H₂O₂. Επιπλέον, στα κύτταρα μαστού, αν και δεν παρατηρήθηκαν ανάλογα αποτελέσματα, η δράση των εκχυλισμάτων ήταν ισχυρότερη, σε σχέση με την προσθήκη των ουσιών 24 h πριν την αγωγή με H₂O₂. Συνολικά, τα αποτελέσματά μας καταδεικνύουν τον άμεσο προστατευτικό ρόλο των πολυφαινολών στην μονομερή ή σύμπλοκη μορφή τους, όταν χορηγούνται ταυτόχρονα με έναν δότη ελευθέρων ριζών. Αντιθέτως, η προθύτερη χορήγηση των φλαβονολών φαίνεται ότι ευαισθητοποιεί τα κύτταρα σε οξειδωτικούς παράγοντες. Επιπλέον, ο κυτταρικός μεταβολισμός, ο οποίος είναι ιδιαίτερα έντονος στα ηπατοκύτταρα, πιθανόν ενισχύει την βιοσύνθεση μονομερών παραγώγων με ισχυρότερες αντιοξειδωτικές ιδιότητες.



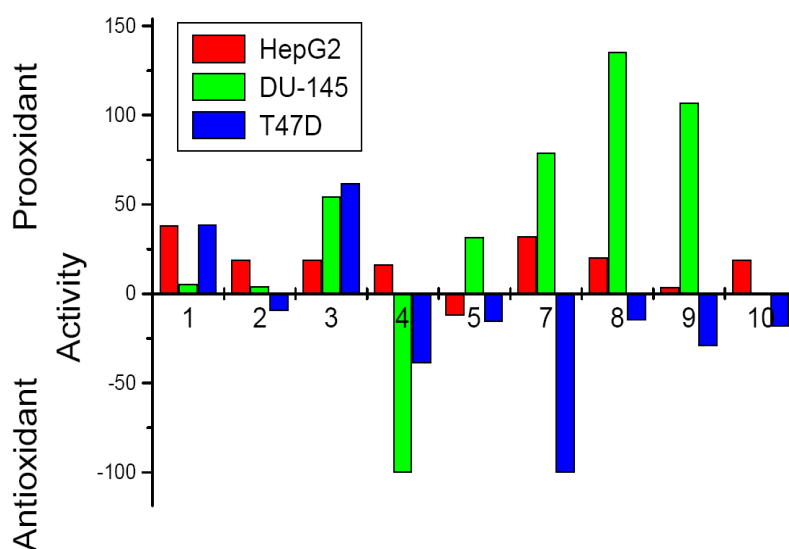
Εικόνα 3.2.11. Αντιοξειδωτική δράση των συμπλόκων πολυφαινολών έναντι του H₂O₂ μετά 24ωρη επώαση.



Εικόνα 3.2.12. Άμεση αντιοξειδωτική δράση των συμπλόκων πολυφαινολών έναντι του H₂O₂.

Επαγωγή των ROS με PMA

Ένας εναλλακτικός τρόπος ελέγχου της αντιοξειδωτικής ικανότητας των πολυφαινολών είναι η διέγερση των κυττάρων με PMA. Σε αντίθεση με την προσθήκη H_2O_2 στο θρεπτικό μέσο και την αναπόφευκτη απελευθέρωση ελευθέρων ριζών στο θρεπτικό μέσο, στην περίπτωση του PMA, οι ουσίες καλούνται να αντιμετωπίσουν τις ενδοκυττάρειες μεταβολικές οξειδωτικές διεργασίες, οι οποίες ενεργοποιούνται από αυτόν. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.2.13., τα περισσότερα εκχυλίσματα ευαισθητοποιούν τα κύτταρα στην επιβλαβή δράση του PMA: το φαινόμενο είναι εντονότερο στην περίπτωση των κυττάρων προστάτου, λιγότερο στα ηπατοκύτταρα, ενώ τα κύτταρα μαστού μάλλον ευνοούνται από τα φλαβονοειδή. Παρατηρούμε ότι κάποια εκχυλίσματα μπορεί να λειτουργούν ως προ- ή αντιοξειδωτικά ανάλογα με την κυτταρική σειρά στην οποία ελέγχθηκαν. Ειδικότερα, τα εκχυλίσματα 1-3 εντείνουν την παραγωγή ROS, ως απόκριση στον PMA, ενώ το εκχύλισμα 4 μειώνει την παραγωγή ελευθέρων ριζών και στις τρεις κυτταρικές σειρές. Οι παρατηρήσεις αυτές συμφωνούν με τον προοξειδωτικό ή ουδέτερο χαρακτήρα των κλασμάτων, όταν χορηγούνται 24 h πριν την επίδραση με H_2O_2 .



Εικόνα 3.2.13. Αναστολή (αρνητικές τιμές) ή επαγωγή (θετικές τιμές) της παραγωγή των ROS μετά από 24ωρη επώαση των κυττάρων με τα εκχυλίσματα πολυφαινολών και διέγερση με PMA. Τα αποτελέσματα αντιστοιχούν στην τιμή των ελευθέρων ριζών μετά από 20 min επώασης με διϋδροροδαμίνη 123. Ο οξειδωτικός ή προοξειδωτικός χαρακτήρας των πολυφαινολών εκφράζεται ως το % ROS σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρα.

3.2.5.1.3. Τροποποίηση του κυτταροσκελετού της ακτίνης

Η απουσία αντιοξειδωτικής δράσης, ή η κατά συνθήκη προ- ή αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών, πιθανόν να συνοδεύεται από άλλες δράσεις στην φυσιολογία των

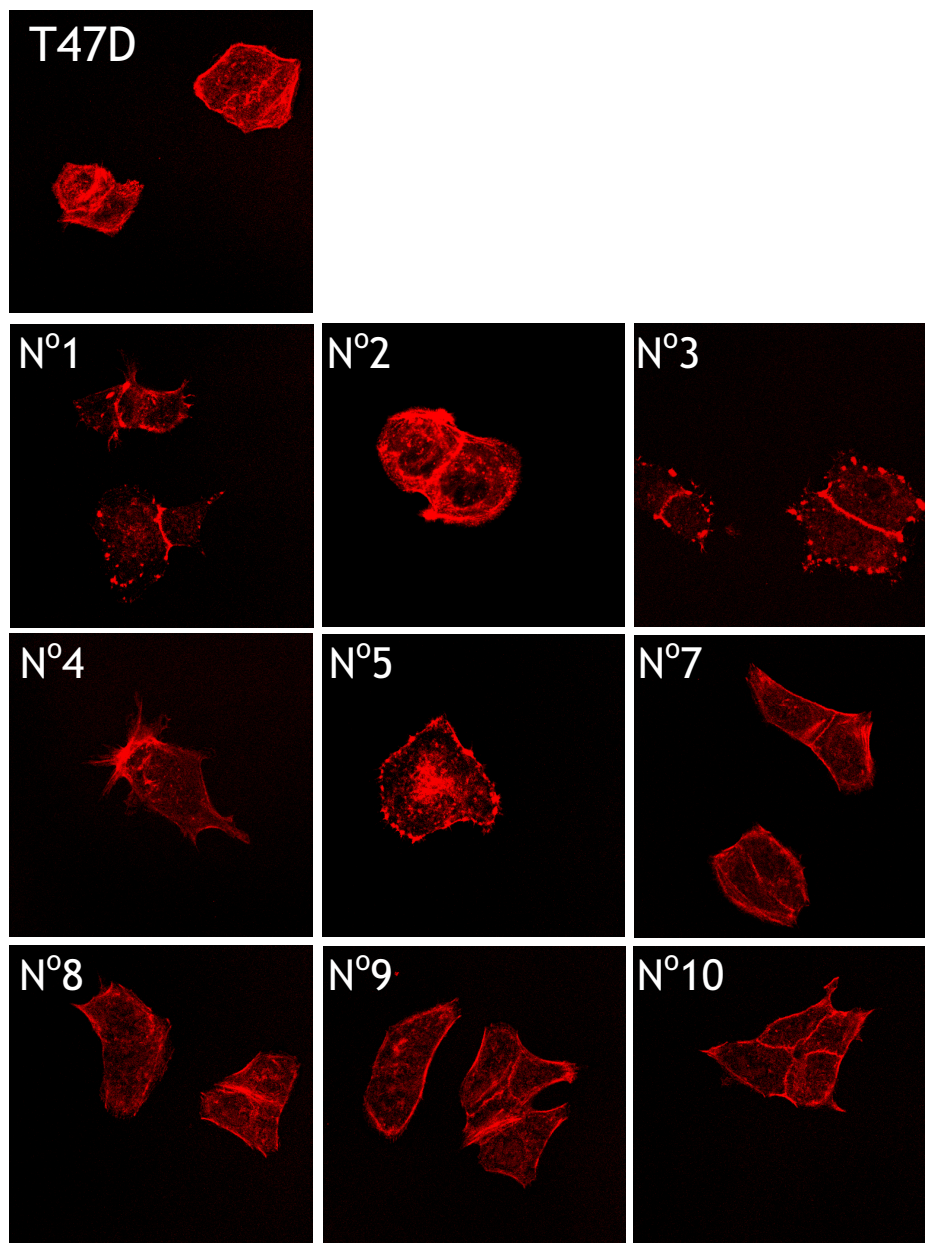
κυττάρων. Συγκρίναμε την δράση των εκκυλισμάτων σε σχέση με τα πρώτα εκκυλίσματα OPC στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού ακτίνης, μία ώρα μετά την εφαρμογή τους (10 $\mu\text{g/ml}$) (Εικ. 3.2.14-16.). Το κλάσμα 6 χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας, για τα εκκυλίσματα που απομονώθηκαν με την βοήθεια στήλης ρητίνης Sephadex LH20. Όπως αναμενόταν δεν είχε επίδραση στον πολυμερισμό της ακτίνης και συμπεριφέρεται όπως το συμβατικό θρεπτικό υλικό.

Στα κύτταρα DU-145 τα εκκυλίσματα 1,3 και 5 επάγουν σημαντικές τροποποιήσεις στον κυτταροσκελετό της ακτίνης, όπως την δημιουργία περιφερειακών δεσμίδων ινιδίων και ελαττώνουν ή καταστέλλουν το ενδοκυττάριο δίκτυο ακτίνης. Τα κλάσματα από την στήλη ρητίνης επάγουν σε μικρό βαθμό την περιφερειακή αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού, ενώ επιπλέον προκαλούν την δημιουργία φιλοποδίων.

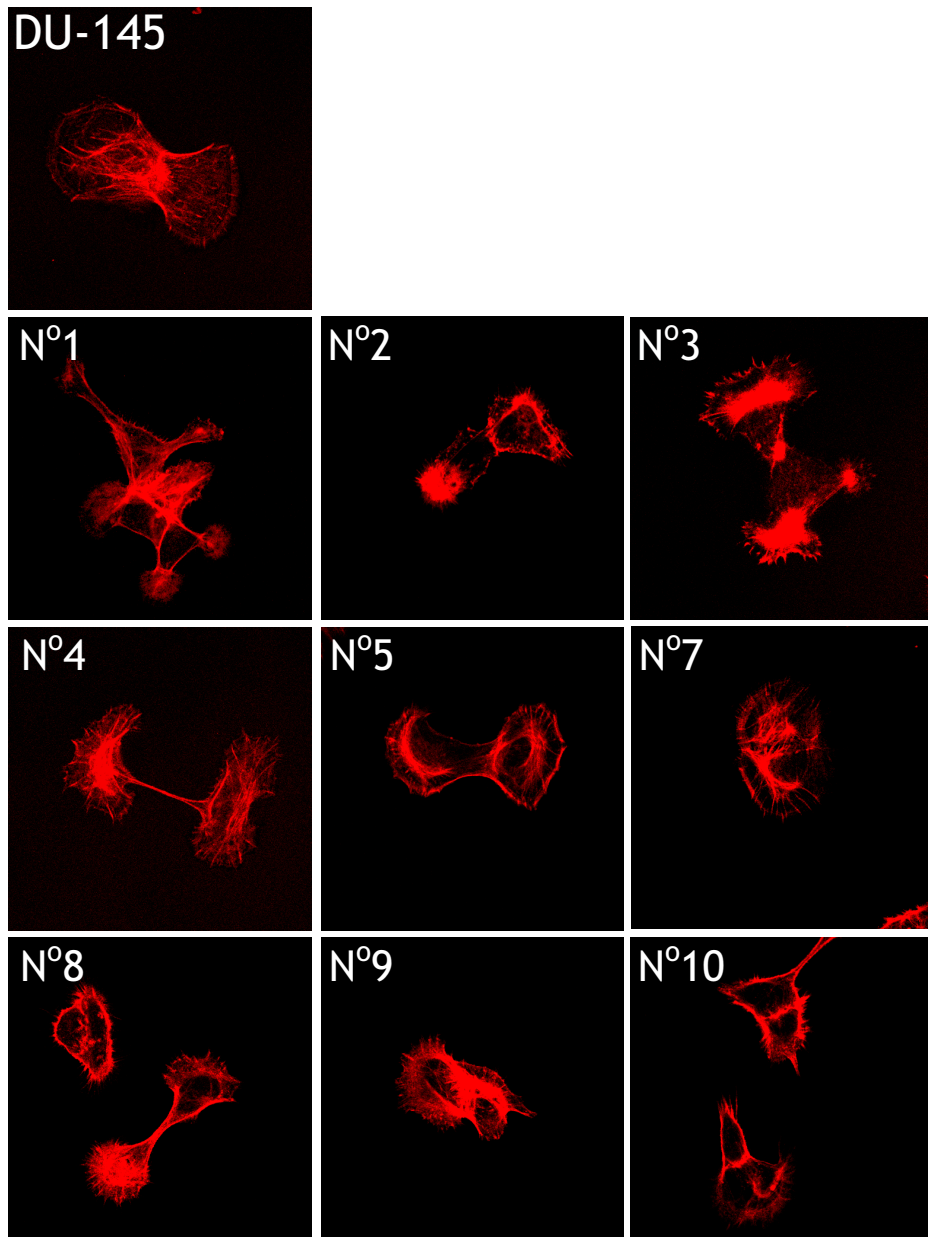
Στα κύτταρα μαστού T47D, τα εκκυλίσματα 1 και 3 επιφέρουν αποπολυμερισμό της ακτίνης και την σχηματισμό περιφερειακών εστιών πολυμερισμού. Ακόμη, τα εκκυλίσματα 1, 3 και 5 ενισχύουν την δημιουργία λαμελλιποδίων και ιδιαίτερα τον τοπικό πολυμερισμό της ακτίνης στο επίπεδο των διακυτταρικών συνδέσεων. Χαρακτηριστικό του εκκυλίσματος 4 είναι η δημιουργία δομών που προσομοιάζουν σε φιλοπόδια. Αντιθέτως, τα κλάσματα που προέκυψαν από την στήλη Sephadex δεν είχαν ιδιαίτερη δράση στην αναδόμηση του κυτταροσκελετού, περιορίζοντας τον πολυμερισμό της ακτίνης στην περιφέρεια των κυττάρων.

Τέλος, στα κύτταρα HepG2, ισχυρότερη δράση εμφάνισε το εκκύλισμα 3, το οποίο προκάλεσε έντονο πολυμερισμό της ακτίνης σε διακριτές περιφερειακές θέσεις, καθώς και την δημιουργία φιλοποδίων. Τα εκκυλίσματα 1 και 4, και σε μικρότερο βαθμό το 5 προκάλεσαν την δημιουργία λαμελλιποδίων, όπως επίσης και τα κλάσματα Sephadex 7, 8 και 10.

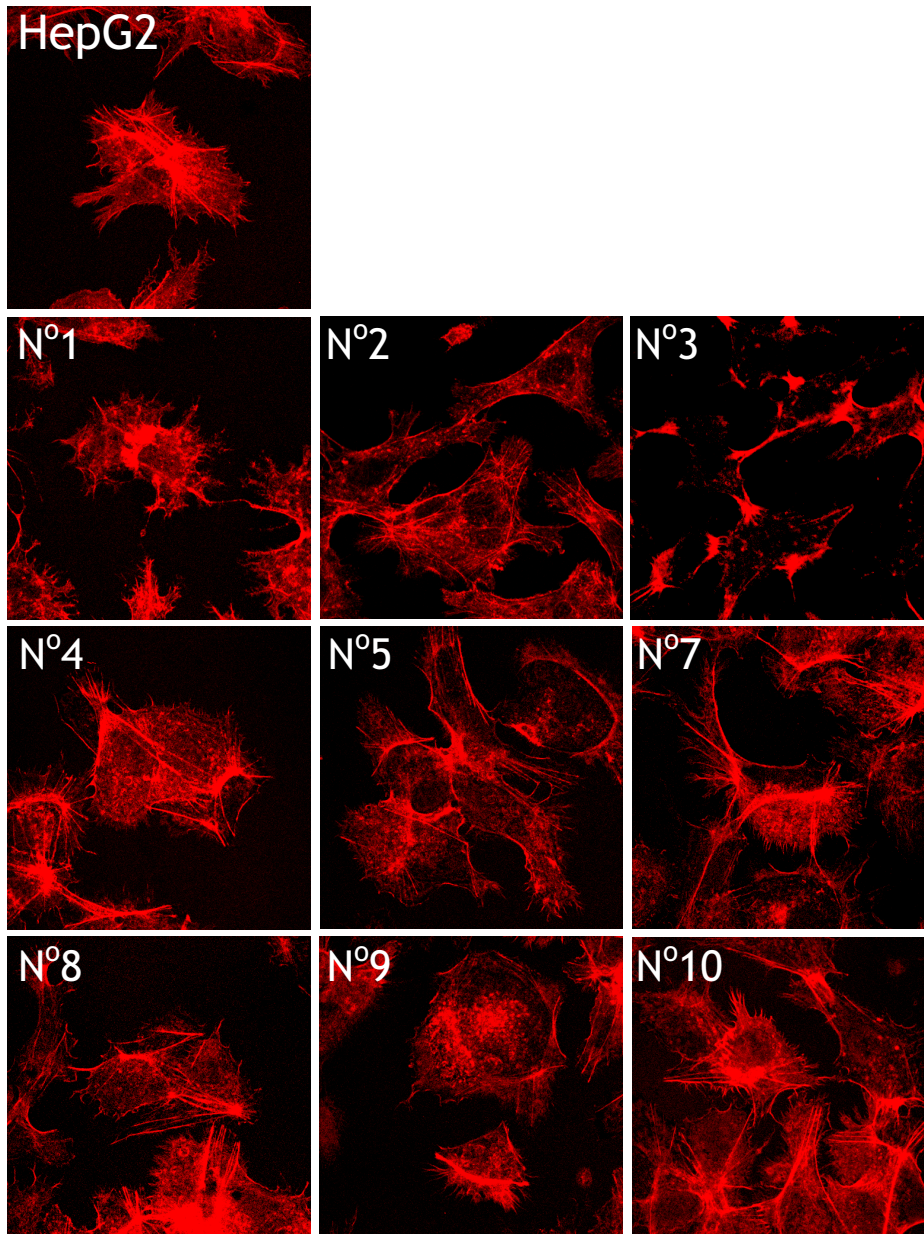
Σε γενικές γραμμές η δράση των επιμέρους κλασμάτων φαίνεται ότι προσομοιάζει αυτή των ολιγομερών προανθοκυανινών, αν και η δράση των μεμονωμένων πολυφαινολικών κλασμάτων είναι εντονότερη στα κύτταρα μαστού. Επιπλέον, παρατηρούμε πως η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού ακτίνης, αποτελεί μία πιο ευαίσθητη μέθοδο στην μελέτη των ταχέων δράσεων των πολυφαινολών.



Εικόνα 3.2.14. Επίδραση των εκχυλισμάτων πολυφαινολών στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης σε κύτταρα μαστού T47D, 1 h μετά την εφαρμογή τους.



Εικόνα 3.2.15. Επίδραση των εκχυλισμάτων πολυφαινολών στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης σε κύτταρα προστάτου DU-145, 1 h μετά την εφαρμογή τους.



Εικόνα 3.2.16. Επίδραση των εκχυλισμάτων πολυφαινολών στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης στα ηπατοκύτταρα HepG2, 1 h μετά την εφαρμογή τους.

3.2.6. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΜΕ ΤΙΣ ΜΕΜΒΡΑΝΙΚΕΣ ΘΕΣΕΙΣ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΤΩΝ ΑΝΔΡΟΓΟΝΩΝ

3.2.6.1. Μεμβρανικές θέσεις πρόσδεσης στεροειδών

3.2.6.1.1. Ανίχνευση

Οι θέσεις πρόσδεσης στεροειδών (οιστραδιόλης και τεστοστερόνης) στην μεμβράνη των κυττάρων μαστού T47D ανιχνεύθηκαν καταρχήν με μελέτες ανταγωνιστικής δέσμησης σε απομονωμένες πλασματικές κυτταρικές μεμβράνες. Τα ομόλογα μόρια ή σύμπλοκά τους με αλβουμίνη, κατέστειλλαν την πρόσδεση της [³H]οιστραδιόλης ή τεστοστερόνης. Η πρόσδεση της E2 στην μεμβράνη ήταν δοσοεξαρτώμενη, κορέσιμη με $K_D = 4,06 \pm 3,31$ nM. Στην περίπτωση της τεστερόνης, παρατηρήθηκε επίσης δοσοεξαρτώμενη και κορέσιμη πρόσδεση με $K_D = 7,64 \pm 3,15$ nM. Προσθήκη των ανταγωνιστών των ενδοκυττάρων υποδοχέων οιστρογόνων ή ανδρογόνων, ICI 182780 ή φλουταμίδης (10^{-6} M) αντιστοίχως, δεν έδειξε μετατόπιση των καμπυλών πρόσδεσης, καταδεικνύοντας ότι οι μεμβρανικές θέσεις πρόσδεσης των στεροειδών διαφέρουν, τουλάχιστον βιοχημικά, από τις αντίστοιχες ενδοκυττάριας.

Η παρουσία των θέσεων πρόσδεσης επιβεβαιώθηκε με κυτταρομετρία ροής, με τη βοήθεια των συμπλόκων μορίων στεροειδούς-3-(O-carboxymethyl)oxime-BSA-FITC: τα σύμπλοκα αυτά δεν ενδοκυττώνονται· ο βραχίονας (O-carboxymethyl)oxime επιτρέπει την ελεύθερη κίνηση του στεροειδούς και την ειδική του πρόσδεση παρουσία υποδοχέων του, ενώ το μόριο FITC βοηθά στην ανίχνευση της πρόσδεσης μέσω φθορισμού. Όπως και στην περίπτωση της πρόσδεσης ραδιενεργών αναλόγων, η παρουσία των φθοριζόντων αναλόγων των στεροειδών δεν επηρεάζεται από τα ICI 182780 και φλουταμίδα. Τέλος, ο μεμβρανικός εντοπισμός των «υποδοχέων» ανδρογόνων και οιστρογόνων επιβεβαιώθηκε μετά από επώαση με σύμπλοκα στεροειδούς-BSA-FITC και παρατήρηση των κυττάρων σε συνεστιακό μικροσκόπιο. Η ένταση του σήματος ήταν ανάλογη της επώασης (1-30 min) των κυττάρων με τα φθορίζοντα στεροειδή, ενώ δεν παρατηρήθηκε χρώση του κυτταροπλάσματος ή του πυρήνα. Καμία διαφορά επίσης δεν παρατηρήθηκε, μετά από ταυτόχρονη επώαση με μη φθορίζοντα ανάλογα και αντιοιστρογόνα ή αντιανδρογόνα (ICI 182780 ή φλουταμίδα).

Ανάλυση των κυττάρων T47D με ανοσοεντύπωμα έδειξε ότι τα αντισώματα που αναγνωρίζουν το καρβοξυτελικό και το αμινοτελικό άκρο των υποδοχέων ERα και β αναγνωρίζουν πρωτεΐνες τόσο σε εκκύλισμα πλασματικών μεμβρανών όσο και σε ολικό πρωτεϊνικό εκκύλισμα. Παρομοίως συμπεριφέρεται και το αντίσωμα για το αμινοτελικό άκρο του AR. Αντιθέτως, το αντίσωμα που αναγνωρίζει το καρβοξυτελικό άκρο του AR, έδωσε θετικό σήμα μόνο στην περίπτωση του ολικού κυτταρικού εκκυλίσματος. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τις βιβλιογραφικές αναφορές, σχετικά με μεμβρανικό εντοπισμό των ενδοκυττάρων υποδοχέων οιστρογόνων (Ascenzi et al., 2006).

3.2.6.1.2. Βιολογική δράση

Προκειμένου να εξακριβώσουμε αν η οιστραδιόλη ή η τεστοστερόνη εμφανίζουν φυσιολογικές δράσεις μέσω των μεμβρανικών θέσεων πρόσδεσης στην κυτταρική σειρά T47D, επώασαμε τα κύτταρα με σύμπλοκα στεροειδούς-BSA παρουσία ή απουσία ορού. Η καλλιέργεια των κυττάρων απουσία ορού επάγει απόπτωση έως 2,5 φορές μεγαλύτερη από τα φυσιολογικά επίπεδα. Παρουσία οιστραδιόλης-BSA το φαινόμενο αναστρέφεται, ενώ στην περίπτωση καλλιέργειας των κυττάρων υπό φυσιολογικές συνθήκες το σύμπλοκο δεν φαίνεται να επηρεάζει την κυτταρική επιβίωση ή τον πολλαπλασιασμό. Η προστατευτική δράση της οιστραδιόλης είναι δόσοεξαρτώμενη, με $IC_{50}=0.1 \pm 0.08$ nM, και οφείλεται στην αύξηση της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 και την μείωση της προαποπτωτικής Bad. Αντιθέτως, η τεστοστερόνη-BSA επάγει την απόπτωση με δόσοεξαρτώμενο τρόπο και $IC_{50}=0,2 \pm 0,04$ nM, σε κύτταρα τα οποία καλλιεργούνται παρουσία ορού. Συνεπώαση των κυττάρων με τεστοστερόνη-BSA στην συγκέντρωση που προκάλεσε την μέγιστη απόπτωση (1 μ M) και κυμαινόμενη συγκέντρωση οιστραδιόλης-BSA για 6 ώρες είχε ως αποτέλεσμα την αναστροφή της δράσης του ανδρογόνου. Η χρήση ειδικών αναστολέων της κυτταρικής σηματοδότησης έδειξε ότι η μεμβρανική δράση των στεροειδών διαμεσολαβείται από πρωτεΐνες G (ευαίσθητη σε Pertussis Toxin, PTX) και τις κινάσες PI3K (ευαίσθητη σε wortmannin, μερικώς στην περίπτωση της τεστοστερόνης), MEK (αναστρέφεται παρουσία PD 98059) και p38 (αναστρέφεται παρουσία SB 203580). Η αναστροφή αφορά τόσο την αποπτωτική δράση της τεστοστερόνης, όσο και την αντιαποπτωτική δράση της οιστραδιόλης. Εφόσον δεν παρατηρούνται διαφορές στην σηματοδότηση των μορίων σε αυτό το επίπεδο, πιθανόν καθένα από αυτά να επηρεάζει παράλληλα άλλους μηχανισμούς, οι οποίοι εντέλει ρυθμίζουν την αναλογία Bcl-2/Bad και την μοίρα των κυττάρων.

3.2.6.2. Ανταγωνιστική πρόσδεση των μονομερών και διμερών φλαβονολών στις μεμβρανικές θέσεις πρόσδεσης ανδρογόνων στα κύτταρα T47D

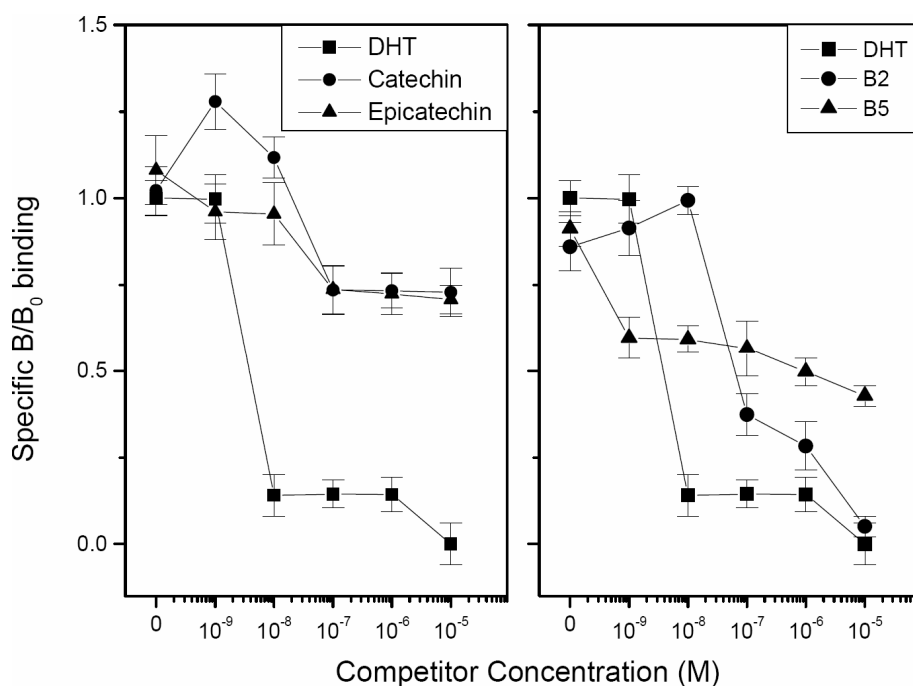
Όπως δείξαμε στο προηγούμενο κεφάλαιο, διάφορα εκχύλισματα πολυφαινόλων αμπέλου έχουν την ιδιότητα να προκαλούν αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Η εις βάθος μελέτη της δράσεως τέτοιων μειγμάτων δεν έχει επιστημονική αξία, λόγω της πολύπλοκης σύστασής τους, όπως επίσης και της διαφορεικής σύστασης της πρώτης ύλης και δεν προσφέρει το πλεονέκτημα της επαναληψιμότητας. Αφετέρου μεμονωμένα συστατικά των μειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν πιθανόν να εμφανίζουν αντίθετες δράσεις, ελαχιστοποιώντας την ανίχνευση ειδικών δράσεων. Για τον λόγο αυτό, χρησιμοποιήσαμε υποκλάσματα των μειγμάτων και εξετάσαμε την ειδικότητα των δράσεών τους. Τα πρώιμα αποτελέσματα μας καθοδήγησαν στις διμερείς πολυφαινόλες B2 και B5, οι οποίες αφενός προκύπτουν από τον πολυμερισμό απλούστερων μορίων, όπως οι φλαβονόλες (+)-catechin και (-)-epicatechin, αφετέρου μπορούν να μετατραπούν σε αυτές μέσω του κυτταρικού

μεταβολισμού.

Χρησιμοποιήσαμε την ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά μαστού T47D. Τα κύτταρα αυτά είναι ενδοθηλιακού τύπου, έχουν μικρή μεταστατικότητα. Επιπλέον, δείξαμε ότι διαθέτουν μεμβρανικούς υποδοχείς για τα οιστρογόνα και τα ανδρογόνα. Καθώς η σηματοδότηση μέσω των μεμβρανικών θέσεων πρόσδεσης ανδρογόνων επάγει απόπτωση και δεδομένου ότι τα πρώιμα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι οι ολογομερείς πολυφαινόλες προκαλούν αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού, ανάλογη με αυτή που προκαλεί η τεστοστερόνη-BSA, εστίασαμε στην κοινή σηματοδότηση των δύο ομάδων μορίων.

3.2.6.2.1. Πρόσδεση των πολυφαινολών σε μεμβρανικούς υποδοχείς ανδρογόνων

Τα κύτταρα T47D διαθέτουν μεμβρανικές θέσεις πρόσδεσης ανδρογόνων, καθώς η διϋδροτεστοστερόνη εκτοπίζει την [³H]-τεστοστερόνη από απομονωμένες μεμβράνες με δόσοεξαρτώμενο τρόπο και IC₅₀ 4,7 nM. Σε ανάλογο πείραμα, οι μονομερείς φλαβονόλες κατεχίνη και επικατεχίνη εκτοπίζουν μερικώς (περίπου κατά 30%) την [³H]-τεστοστερόνη σε εκχύλισμα μεμβρανών κυττάρων T47D με IC₅₀ 21,4 και 19,2 nM, αντιστοίχως. Αντιθέτως, οι διμερείς φλαβονόλες B2 και B5 είναι πιο αποτελεσματικές: η B2 συμπεριφέρεται ως ολικός αγωνιστής με IC₅₀ 82,2 nM, ενώ η B5 εκτοπίζει κατά 60% την [³H]-τεστοστερόνη με IC₅₀ 1.7 nM (Πίνακας 3.2.1.). Καθώς, τα φλαβονοειδή ανταγωνίζονται την πρόσδεση της τεστοστερόνης σε μεμβρανικές θέσεις στα T47D σε συγκεντρώσεις μικρότερες των 100 nM, στα πειράματα που ακολουθούν χρησιμοποιήθηκαν στη συγκέντρωση των 100 nM.



Εικόνα 3.2.17. Ανταγωνιστική πρόσδεση της διϋδροτεστοστερόνης και των μονομερών και διμερών φλαβονολών στις μεμβρανικές θέσεις πρόσδεσης της [³H]τεστοστερόνης.

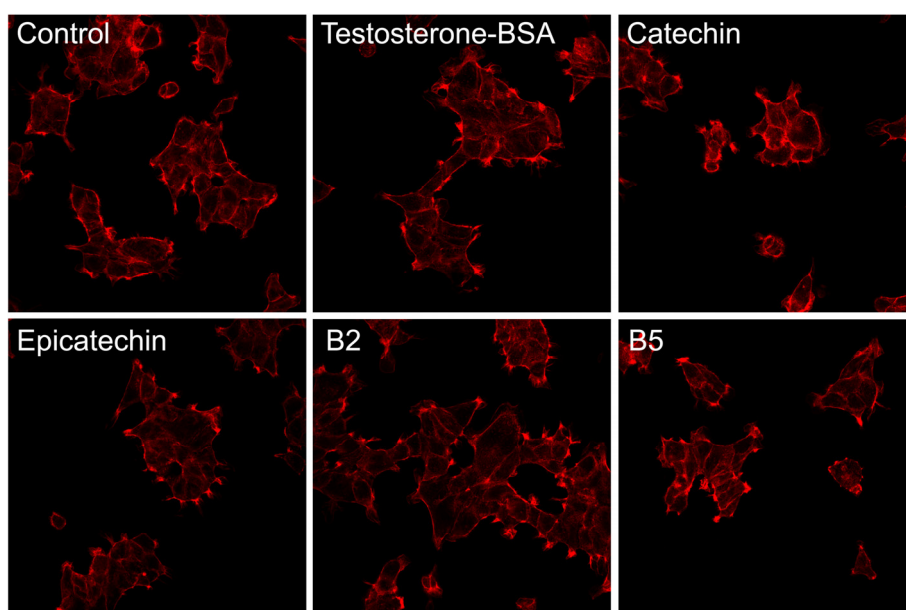
Πίνακας 3.2.1. Αποτελεσματικότητα των μονομερών και διμερών φλαβονολών να μετατοπίζουν την τεστοστερόνη από τις μεμβρανικές θέσεις πρόσδεσής της.

Προσδέτης	IC ₅₀ nM ±SEM (nM)	% Displacement±SEM
DHT	4.7 ±2.3	100±9%
Catechin	21.4±1.3	72±12%
Epicatechin	19.2±1.8	70±14%
B2	82.2±8.6	100±10%
B5	1.7±1.9	58±8%

3.2.6.1.2. Επίδραση των μονομερών και διμερών φλαβονολών στον κυτταροσκελετό ακτίνης

Εκτίμηση της αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού με ανοσοφθορισμό

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.2.18., οι πολυφαινόλες και το σύμπλοκο τεστοστερόνης-BSA προκαλούν την αναδιοργάνωση του σκελετού της ακτίνης, 1 ώρα μετά την χορήγησή τους ($10^{-7}M$) στα T47D κύτταρα. Όπως έχει ήδη δειχθεί (Kampa et al., 2002; Papakonstanti et al., 2003) η τεστοστερόνη επάγει τον σχηματισμό φιλοποδίων και λαμελιποδίων. Η κατεχίνη και η επικατεχίνη επάγουν σε μικρότερο βαθμό ανάλογες δομές. Αντιθέτως, η B2 και ιδιαίτερα η B5 επάγουν τον γενικό πολυμερισμό της ακτίνης, προκαλούν έντονη αναδιοργάνωση του περιφερικού σκελετού και εκτεταμένο σχηματισμό φιλοποδίων. Οι ομοιότητες της δράσης των διμερών φλαβονολών και της τεστοστερόνης καταδεικνύουν έναν κοινό μηχανισμό δράσης.

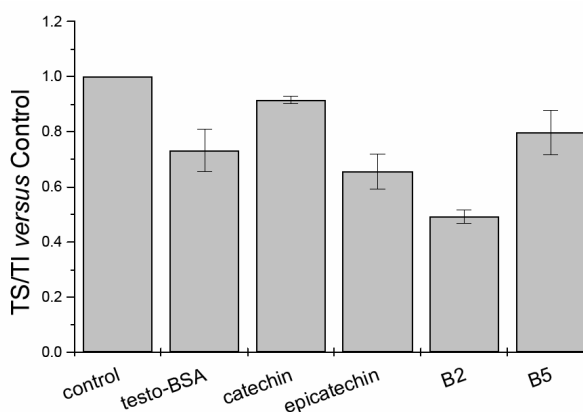


Εικόνα 3.2.18. Επίδραση των μονομερών και διμερών κατεχίνης στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης στα κύτταρα μαστού T47D, 1 h μετά την εφαρμογή τους.

Ποσοτική εκτίμηση του πολυμερισμού της ακτίνης με ανοσοεντύπωμα

Για να επιβεβαιώσουμε την δράση αυτή, προχωρήσαμε στην ποσοτική εκτίμηση του πολυμερισμού της ακτίνης με ανοσοεντύπωμα. Η τεστοστερόνη και οι πολυφαινόλες επάγουν τον πολυμερισμό της ακτίνης, αφού μειώνουν τον λόγο της μονομερούς (TS, διαλυτής σε Triton-X-100) προς την πολυμερή ακτίνη (TI, αδιάλυτη σε Triton-X-100), 1 ώρα μετά την εφαρμογή τους σε κύτταρα

T47D (Εικ. 3.2.19.). Πιο αποτελεσματική δράση εμφανίζει το μονομερές επικατεχίνη και οι διμερείς φλαβανόλες B2 και B5, ενώ η κατεχίνη δεν φαίνεται να επηρεάζει τον λόγο της G-ακτίνης προς τα ινίδια.



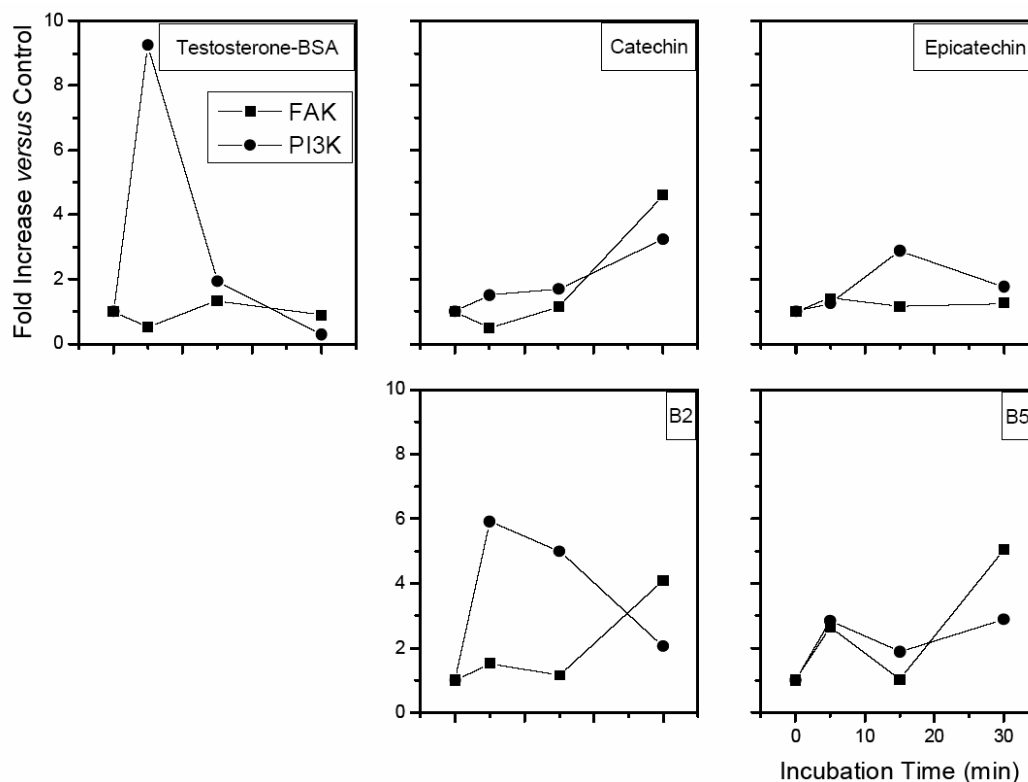
Οι διαφορές αυτές αντικατοπτρίζουν τις ποσοτικές διαφοροποιήσεις του κυτταροσκελετού της ακτίνης, δεν αποκλείουν όμως την εμφάνιση ποιοτικών διαφορών και την δημιουργία διακριτών δομών.

Εικόνα 3.2.19. Επίδραση των μονομερών και διμερών κατεχίνης στον πολυμερισμό της ακτίνης, όπως φαίνεται από τον λόγο G- (διαλυτή σε Triton-X-100, TS)/ F-ακτίνη (αδιάλυτη σε Triton-X-100, TI), στα κύτταρα μαστού T47D, 1 h μετά την εφαρμογή τους.

3.2.6.1.3. Αλληλεπίδραση των πολυφαινολών με σηματοδοτικούς μηχανισμούς

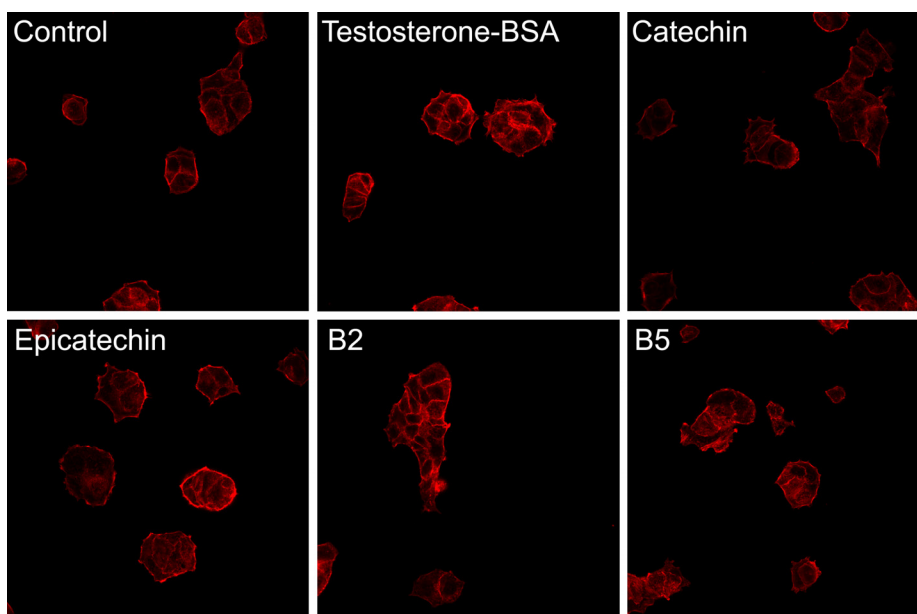
Η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού προϋποθέτει την ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μηχανισμών που εμπλέκονται στην διαμόρφωση επιμέρους κυτταροσκελετικών δομών και διαμεσολαβούν μεμβρανικά ερεθίσματα. Για τον λόγο αυτό, ελέγξαμε την βραχυπρόθεσμη ενεργοποίηση επιμέρους κινασών, μετά την επίδραση τεστοστερόνης ή πολυφαινολών στα κύτταρα T47D. Βρέθηκε ότι οι κινάσες FAK και PI-3K ενεργοποιούνται παροδικά, 30 min μετά από επώαση με τις παραπάνω ουσίες (Εικ. 3.2.20.). Οι μονομερείς φλαβονόλες εμφανίζουν υστέρηση στην απόκρισή τους σε σχέση με τις υπόλοιπες ουσίες. Οι διμερείς φλαβανόλες, όπως και η τεστοστερόνη, επάγουν την φωσφορυλίωση της PI3K μέσα στα πρώτα 5 min της εφαρμογής τους. Η διαφοροποίηση στο εύρος της απόκρισης πιθανόν οφείλεται στην συγγενειά τους για τις μεμβρανικές θέσεις πρόσδεσης ανδρογόνων. Στην περίπτωση της FAK, η τεστοστερόνη προκαλεί ασθενή φωσφορυλίωση, ενώ τα φλαβονοειδή, με εξαίρεση την επικατεχίνη, επάγουν μέχρι και 6πλάσια αύξηση της φωσφορυλίωσής της. Η δράση της κατεχίνης, της B2 και της B5 στην FAK φαίνεται να είναι διαβαθμιζόμενη και παρατεταμένη, σε αντίθεση με την συνήθη παροδική δράση των εξωκυττάρων σημάτων. Στην περίπτωση επίσης του διμερούς B5 η ενεργοποίηση της FAK

εμφανίζει δύο κορυφές. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται είτε στην κυκλική ενεργοποίηση του μορίου, είτε στην ενεργοποίηση ενός παράλληλου μηχανισμού, ο οποίος συγκλίνει στην FAK.



Εικόνα 3.2.20. Επίδραση των μονομερών και διμερών κατεχίνης στην φωσφορυλίωση των κινασών PI3K και FAK 5-30 min μετά την εφαρμογή τους στα κύτταρα μαστού T47D.

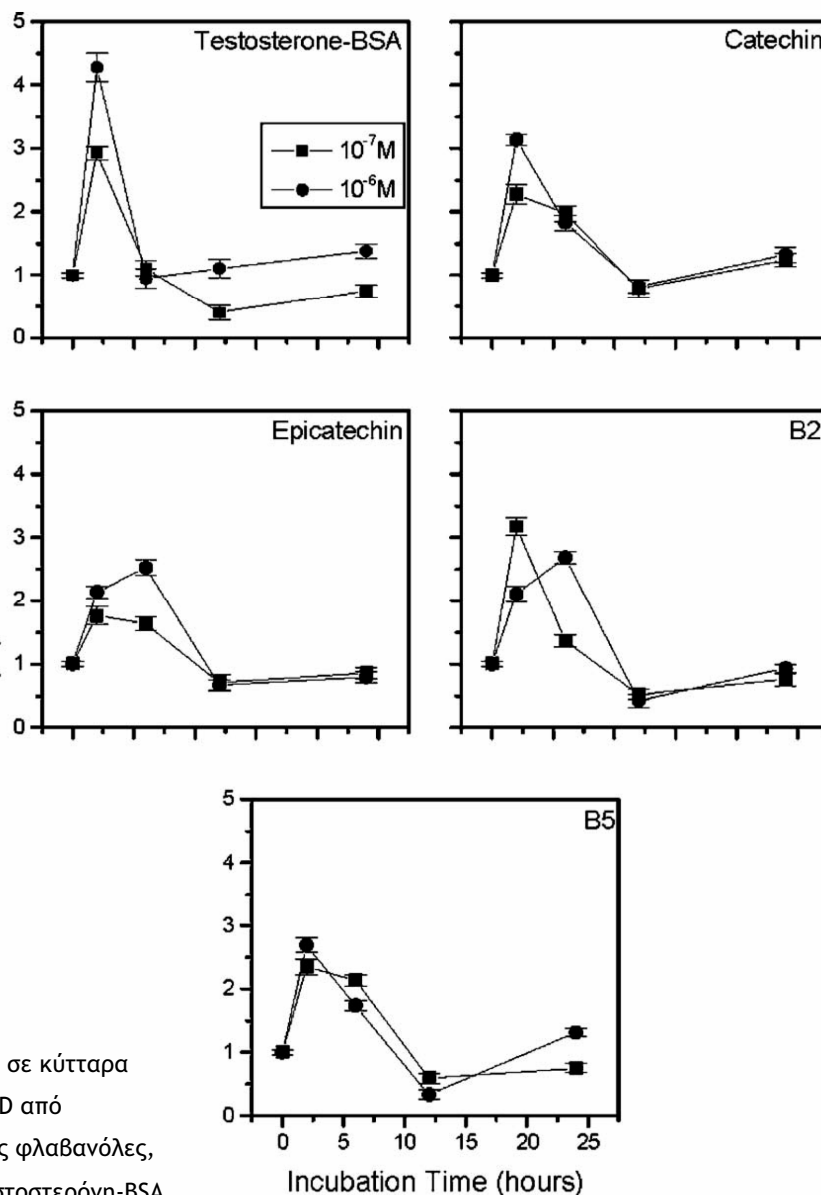
Κοινό χαρακτηριστικό της δράσεως της τεστοστερόνης και των μονομερών ή διμερών φλαβονολών είναι η ενεργοποίηση της κινάσης PI3K, η οποία έχει δειχθεί ότι προάγει τον πολυμερισμό της ακτίνης. Προκειμένου να διαπιστώσουμε αν το συγκεκριμένο μόριο μεταγωγής σήματος διαμεσολαβεί τον πολυμερισμό της ακτίνης παρουσία του ανδρογόνου ή των φλαβονοειδών, επώασαμε τα κύτταρα με τον ειδικό αναστολέα της PI3K wortmannin. Σε όλες τις περιπτώσεις η wortmannin ανέστειλε την επίδραση όλων των ουσιών στον πολυμερισμό της ακτίνης (Εικ. 3.2.21.). Συνεπώς, παρά την διαφορική (ποσοτική και χρονική) ενεργοποίηση της PI3K, φαίνεται να αποτελεί το μόριο κλειδί στην τροποποίηση του κυτταροσκελετού και την δημιουργία φιλοποδίων και λαμελιποδίων στα κύτταρα T47D, μετά από επίδραση με τεστοστερόνη ή φλαβονόλες.



Εικόνα 3.2.21. Αναστολή της επίδρασης των μονομερών και διμερών κατεχίνης στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης στα κύτταρα μαστού T47D από τον ειδικό αναστολέα της PI3K wortmannin.

3.2.6.1.4. Φυσιολογικός ρόλος της αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού

Έχει δειχθεί ότι η σύμπλοκη τεστοστερόνη-BSA μέσω μη γενωμικής σηματοδότησης επάγει απόπτωση στις καρκινικές σειρές μαστού T47D (Kampa et al., 2005) και προστάτου DU-145 (Hatzoglou et al., 2005) και LNCaP (Kampa et al., 2002). Δεδομένου ότι τα φλαβονοειδή κατεχίνη και επικατεχίνη, καθώς και τα διμερή τους B2 και B5 συμπεριφέρονται ως μερικοί ή ολικοί ανταγωνιστές των μεμβρανικών θέσεων πρόσδεσης ανδρογόνων, εξετάσαμε αν έχουν παρόμοια δράση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Επίδραση με τις φλαβονόλες (10^{-7} και 10^{-6} M) για διάστημα 2-24 ώρες είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή αποπτώσεως στα κύτταρα T47D. Το πειραματικό πρωτόκολλο περιλάμβανε την μέτρηση πρώιμων χαρακτηριστικών της απόπτωσης, όπως η αναστροφή των μεμβρανών και η έκθεση ομάδων φωσφατιδυλσερίνης. Η επαγωγή του φαινομένου είναι εμφανής μετά της 2 πρώτες ώρες μετά την επίδραση με τις ουσίες και εξασθενεί μετά τις 12 ώρες (Εικ. 3.2.22), οπότε τα κύτταρα εμφανίζουν άλλου τύπου μορφολογικές και δομικές αλλαγές, με κύρια την κατάτμηση του γενετικού υλικού. Η αποπτωτική δράση των φλαβονοειδών είναι δοσοεξαρτώμενη καθώς εμφανίζεται εντονότερη και παρατεταμένη στην συγκέντρωση 10^{-6} M. Το πρότυπο δράσης τους είναι παρόμοιο με αυτό της τεστοστερόνης, αν και το ανδρογόνο έχει οξύτερο αποτέλεσμα. Σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα που αφορούν την ενεργοποίηση ενδοκυττάρων κινασών, η υστέρηση στην εκδήλωση της αποπτώσεως από τα φλαβονοειδή, πιθανόν οφείλεται στην αντίστοιχη υστέρηση ενεργοποίησης της FAK.



Εικόνα 3.2.22.

Επαγωγή αποπτώσεως σε κύτταρα μαστού της σειράς T47D από μονομερείς και διμερείς φλαβανόλες, σε σύγκριση με την τεστοστερόνη-BSA.

3.2.6.1.5. Συζήτηση

Ο μηχανισμός που παρουσιάζουμε περιλαμβάνει την ταχεία δράση των πολυφαινολών, μέσω μεμβρανικών θέσεων-υποδοχέων, την άμεση τροποποίηση σηματοδοτικών μορίων και την επακόλουθη ρύθμιση του πολυμερισμού της ακτίνης, οδηγώντας τελικά τα καρκινικά κύτταρα σε αποπτωτικό θάνατο. Το γενικό πρότυπο δράσης των μονομερών και διμερών φλαβανολών προσομοιάζει σε αυτό του συμπλόκου τεστοστερόνη-BSA και φαίνεται να διαμεσολαβείται από τις μεμβρανικές θέσεις πρόσδεσης των ανδρογόνων. Βεβαίως, παρά την ομοιότητα των δράσεων της τεστοστερόνης και των επιλεγμένων πολυφαινολών, σε επίπεδο μεταγωγή σήματος και στην αναδιοργάνωση του πολυμερισμού της ακτίνης, δεν μπορεί να αποδοθεί η δράση τους αποκλειστικά σε έναν μοναδικό-κοινό μηχανισμό, λόγω της ελλείψεως ανταγωνιστών των μεμβρανικών θέσεων πρόσδεσης των ανδρογόνων.

Τόσο τα οιστρογόνα, όσο και τα ανδρογόνα, έχουν εμπλακεί στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και την επαγωγή αποπτωτικών διαδικασιών. Στον καρκίνο του μαστού (Razandi et al., 2000) και σε κύτταρα φαιοχρωμοκυττώματος αρουραίου (Alexaki et al., 2004), τα οιστρογόνα, μέσω μη γενωμικών μηχανισμών έχει δειχθεί ότι προστατεύουν από απόπτωση. Αντιθέτως, η ενεργοποίηση των μεμβρανικών ανδρογονικών θέσεων στις καρκινικές σειρές προστάτου LNCaP και DU-145 προκαλεί απόπτωση μέσω επαγωγής της προαποπτωτικής πρωτεΐνης Fas (Hatzoglou et al., 2005), ενώ παράλληλα επηρεάζει την προσκόλληση των κυττάρων σε υπόστρωμα κολλαγόνου ή την μετανάστευσή τους. Η δράση μέσω των μεμβρανικών «υποδοχών» ανδρογόνων δεν αναστέλλεται από την φλουταμίδη, ούτε από την καταστολή της έκφρασης των κλασικών υποδοχών με siRNA. Κατ' αναλογία με τις μεμβρανικές θέσεις πρόσδεσης των οιστρογόνων στον καρκίνο του μαστού, η παρουσία μεμβρανικών θέσεων πρόσδεσης τεστοστερόνης είναι εντονότερη σε καρκινικά κύτταρα προστάτου, σε σχέση με μη καρκινικά ή υπερπλαστικά κύτταρα (Stathopoulos et al., 2003), και σχετίζεται με τον δείκτη του Gleason και την επιθετικότητα του καρκίνου (Dambaki et al., 2005). Μεμβρανικές θέσεις πρόσδεσης των οιστρογόνων σε κύτταρα καρκίνου του μαστού έχουν αναφερθεί σε διάφορες μελέτες (Berthois et al., 1986; Clarke et al., 2004; Seo and Leclercq, 2002). Η ομάδα μας επιβεβαίωσε την παρουσία τους σε βιοψίες από καρκίνο του μαστού και την κυτταρική σειρά T47D (Kampa et al., 2005). Καρκινικοί ιστοί θετικοί για τους ER, εκφράζουν χαμηλότερα επίπεδα μεμβρανικών θέσεων πρόσδεσης για οιστρογόνα. Αντιθέτως, δείγματα αρνητικά για ER, εμφανίζουν εντονότερη περιφερειακή χρώση, μετά από επώαση με οιστραδιόλη- ή τεστοστερόνη-BSA· η παρουσία μεμβρανικών θέσεων είναι αυξημένη στις περιπτώσεις λιγότερο διαφοροποιημένων και επιθετικών όγκων μαστού. Καθώς η ενεργοποίησή τους από σύμπλοκα μόρια τεστοστερόνης-BSA σε νανομοριακές συγκεντρώσεις επάγει απόπτωση, ο μηχανισμός αυτός θα μπορούσε να αξιοποιηθεί περαιτέρω στον έλεγχο του καρκίνου του μαστού σε κλινικό επίπεδο. Επιπλέον, καθώς τα κύτταρα του μαστού μεταβολίζουν τα ανδρογόνα σε οιστρογόνα, ιδιαίτερη βαρύτητα έχει δοθεί τις τελευταίες δεκαετίες στην χρήση αναστολέων των αρωματάσων για την αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού, κυρίως σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (Bertelli and Paridaens, 2006; Spicer and Ellis, 2006). Η χρήση της σύμπλοκης τεστοστερόνης-αλβουμίνης εμφανίζει πλεονεκτήματα, εφόσον δεν ενδοκυττώνεται.

Η κατεχίνη και η επικατεχίνη, όπως δείξαμε, είναι παράγοντες που αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων (Damianaki et al., 2000; Kampa et al., 2000; Notas et al., 2006): ρυθμίζουν την παραγωγή NO, επάγουν κυττόσταση και οδηγούν εντέλει σε απόπτωση. Επίσης, η κατεχίνη και τα παράγωγά της βρέθηκε να εμφανίζουν επιλεκτικά τέτοιου είδους δράσεις σε καρκινικά, αλλά όχι σε φυσιολογικά κύτταρα (Ahmad et al., 2000; Chen et al., 1998; Yang et al., 1998) και να λειτουργούν συνεργατικά με χημειοθεραπευτικούς παράγοντες (π.χ. ταμοξιφένη) (Suganuma et al., 1999). Οι ταννίνες, κατ' αναλογία με τις μονομερείς πολυφαινόλες προστατεύουν από τις βλάβες που προκαλεί το οξειδωτικό stress (Bagchi et al., 2000) και καταστέλλουν την ανάπτυξη όγκων στην

επιδερμίδα επίμυων CD-1 μετά από επίδραση με TPA (Bomser et al., 1999). Ελάχιστα ωστόσο δεδομένα υπάρχουν σχετικά με την δράση των πολυφαινολών στον πολυμερισμό της ακτίνης. Η χορήγηση πολυφαινολών (lignins) από τον αμανίτη *Lentinus edodes* (shiitake) μετά την επαγωγή ηπατοτοξικότητας dimethylnitrosamine σε επίμυες είχε ως αποτέλεσμα μείωση των επιπέδων αμινοτρανσφεράσης του ασπαρτικού οξέος και της αλανίνης στο αίμα, καθώς και της συσσωρεύσεως ινιδίων κολλαγόνου και της έκφρασης του γονιδίου α-ακτίνης των λειών μυών (Akamatsu et al., 2004). Σε αντίστοιχο πειραματικό μοντέλο απόφραξης του χοληδόχου πόρου (bile duct ligation), οι πολυφαινόλες του τσαγιού μείωσαν την επαγόμενη έκφραση της α-ακτίνης (Zhong et al., 2003). Επιπλέον, πρόσφατα δεδομένα δείχνουν πως ολικό πολυφαινολικό εκχύλισμα από κάρυα σταφυλιών, πλούσια σε ολιγομερείς φλαβαν-3-όλες, προκαλούν αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού, ανάλογη με αυτή κατά την διάρκεια του laminar shear stress, και ρυθμίζουν την ενεργότητα των κινασών τυροσίνης. Ακόμη, βρέθηκε ότι το ίδιο εκχύλισμα αναστέλλει την έκφραση της ET-1, υποβοηθώντας την αποκατάσταση της ενδοθηλιακής λειτουργίας και αποτρέπει την διήθηση του ενδοθηλίου και την πόντιση και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων (Corder et al., 2001; Corder et al., 2004).

Η *in vivo* αντικαρκινική δράση του συμπλόκου τεστοστερόνης-BSA έχει ελεγχθεί από την ομάδα μας σε πειραματικό μοντέλο καρκίνου σε αθυμικούς επίμυες, οι οποίοι ενοφθαλμίστηκαν διαδερμικά με ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτου των σειρών LNCaP ή DU-145 (Hatzoglou et al., 2005; Kampa and Castanas, 2006). Η χορήγηση του ανδρογόνου με αυτή την μορφή σε συνδυασμό με paclitaxel βρέθηκε επίσης ότι επιτείνει την αντικαρκινική δράση της ταξάνης και μπορεί να μειώσει μέχρι μία τάξη μεγέθους την θεραπευτική της δόση.

Σε κλινικό επίπεδο, τα φλαβονοειδή εμφανίζουν πλεονεκτήματα έναντι των ανδρογόνων και του συμπλόκου τεστοστερόνης-BSA. Ιδιαίτερα το σύμπλοκο τεστοστερόνης-BSA, λόγω του μεγάλου μοριακού του βάρους, δεν είναι βιοδιαθέσιμο στον ίδιο βαθμό με τα ανδρογόνα, ενώ *p.o.* χορήγησή του πιθανόν να διευκολύνει την διάσπασή του και την απελευθέρωση της τεστοστερόνης στην κυκλοφορία. Οι σύμπλοκες πολυφαινόλες αποτελούν ασφαλείς ενώσεις, καθώς εμπεριέχονται ήδη σε μεγάλες ποσότητες στην διατροφή των ζώων και απορροφώνται εύκολα. Διαθέτουν επίσης αντιοξειδωτικές ιδιότητες, γεγονός που τους προσδίδει επιπλέον «θεραπευτικές» ιδιότητες, ενώ αρκετά από τα μόρια αυτά εμφανίζουν αντιοιστρογονική δράση (Way et al., 2004). Ακόμη, φαίνεται να καταστέλλουν την πολλαπλασιασμό και την μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων, όπως επίσης και την ανάπτυξη και μεταστατικότητα των όγκων, χωρίς να επηρεάζουν τα υγιή κύτταρα.

Ωστόσο, στα βιολογικά συστήματα εμφανίζονται περιορισμοί. Σε άνδρες με άρχουσα νεοπλασία του προστάτη, η απορρόφηση της genistein ήταν κατά πολύ μικρότερη σε σχέση με φυσιολογικά υποκείμενα, ενώ τα επίπεδα enterodiol και enterolactone στον ίδιο ιστό ήταν μεγαλύτερα από αυτά του πλάσματος (Hong et al., 2002). Αντίστοιχη μελέτη σε γυναίκες που κατανάλωσαν προϊόντα σόγιας, έδειξε ότι οι μεταβολίτες enterodiol και

enterolactone υπερτερούν στον μαστό σε σχέση με το πλάσμα, παρά την αύξηση της συγκέντρωσης των diadzein και equol στο πλάσμα (Maubach et al., 2003). Το γεγονός αυτό υποδεικνύει την μειωμένη ενδοκυττάρια βιοδιαθεσιμότητα των ισοφλαβονών σε συγκεκριμένους τύπους ιστών ή παθολογικές καταστάσεις.

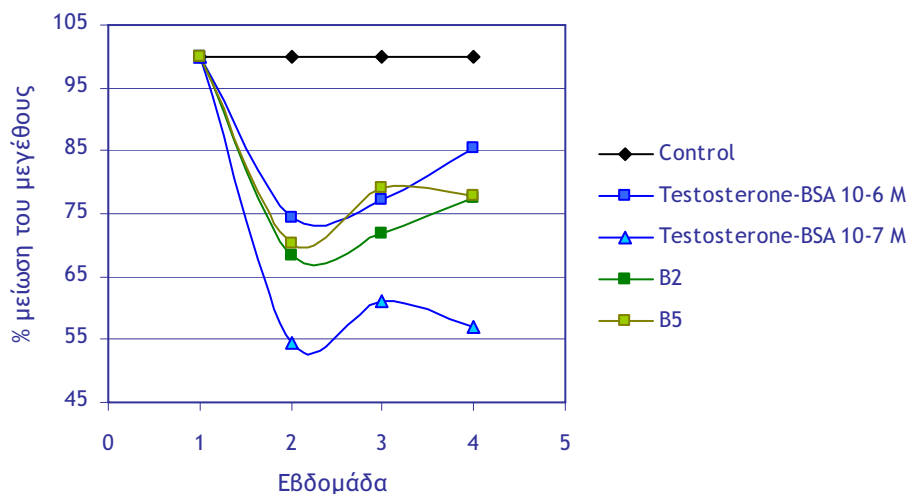
3.2.7. IN VIVO ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΔΙΜΕΡΩΝ ΦΛΑΒΑΝΟΛΩΝ

Για τον περαιτέρω έλεγχο της αντιπολλαπλασιαστικής δράσεως των ολιγομερών πολυφαινολών χρησιμοποιήθηκε ένα *in vivo* ετερόλογο πειραματικό σύστημα: ενήλικοι (10 εβδομάδων) αρσενικοί αθυμικοί επίμυες της σειράς BalbC-/- (Harlan, Italy) ενοφθαλμίστηκαν υποδόρια με ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτου της σειράς DU-145. Σε κάθε επίμυ ενοφθαλμίστηκαν συνολικά 5×10^6 κύτταρα με τέσσερις ισόποσες εγχύσεις εκατέρωθεν της ράχης του.



Εικόνα 3.2.23. Προκειμένου να ελέγξουμε την *in vivo* δράση των διμερών φλαβανολών χρησιμοποιήσαμε αθυμικούς επίμυες της σειράς BalbC-/-, στους οποίους προκαλέσαμε υποδερμικούς όγκους από κύτταρα προστάτου DU-145.

Δύο εβδομάδες αργότερα (πειραματικό σημείο 0) οι επίμυες εμφάνισαν διακριτούς μακροσκοπικά όγκους στην ράχη τους. Τα πειραματόζωα χωρίστηκαν σε πέντε διαφορετικές ομάδες. Σε καθεμία χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά PBS (ομάδα μάρτυρας), 10^{-7} M τεστοστερόνη-BSA, 10^{-6} M τεστοστερόνη-BSA, 10^{-6} M B2 ή 10^{-6} M B5, ανά μία ημέρα, για τρεις εβδομάδες. Ανά εβδομάδα μετρούνταν οι άξονες συμμετρίας κάθε όγκου και υπολογίστηκε το μέγεθος και ο ρυθμός αναστολής της ανάπτυξής τους σε σχέση με τα ζώα μάρτυρα.

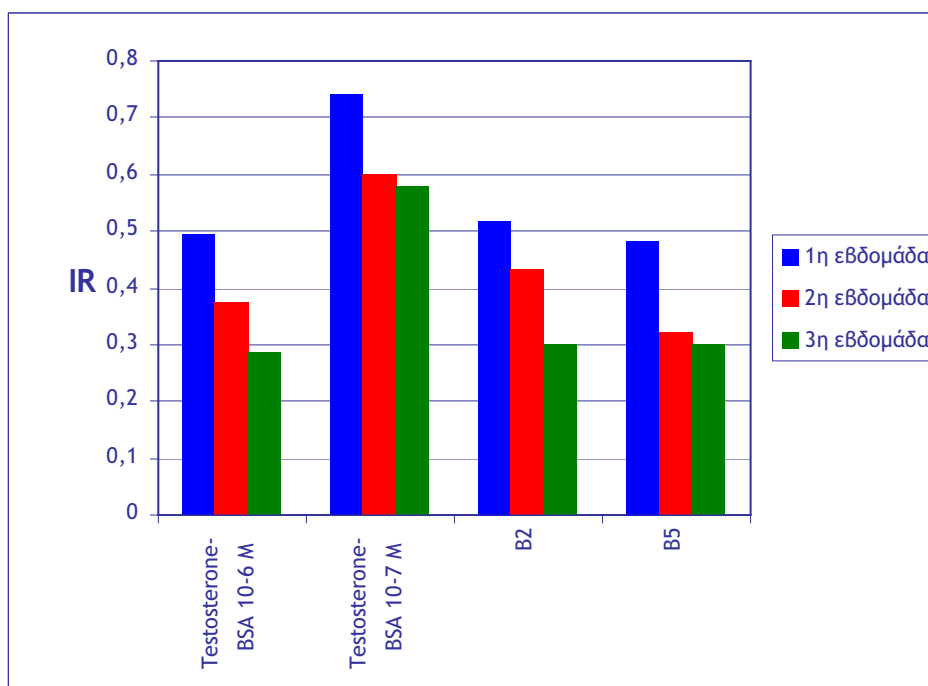


Εικόνα 3.2.24. Επίδραση των πολυφαινολών στην ανάπτυξη των ετερόλογων όγκων DU-145 σε αθυμικούς επίμυες της σειράς BalbC-/- . Το μέγεθος των όγκων (W) εκφράζεται % σε σχέση με τον μάρτυρα.

Η χορήγηση των πολυφαινολών είχε ως αποτέλεσμα την επιβράδυνση της ανάπτυξης των όγκων (% μείωση του μεγέθους των όγκων σε σχέση με τον μάρτυρα) (Εικ. 3.2.24.). Η δράση των B2 και B5 κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα με αυτή της συμπλόκου τεστοστερόνης. Ενδιαφέρον είναι, ότι αν και οι ουσίες διαθέτουν μικρότερη συγγένεια για τους μεμβρανικούς υποδοχείς ανδρογόνων σε σχέση με την τεστοστερόνη, η δράση τους στα ζώα δεν διαφοροποιείται, όταν εφαρμόζονται στην ίδια συγκέντρωση. Λαμβάνοντας υπ' όψιν την υστέρηση στην φωσφορυλίωση των κινασών PI3K και FAK από τις πολυφαινόλες, σε σύγκριση με την τεστοστερόνη-BSA, συμπεραίνουμε ότι το *in vivo* αποτέλεσμα μπορεί να επηρεάζεται από παράλληλες δράσεις των πολυφαινολικών ουσιών. Εναλλακτικά, λόγω του μεγάλου μεγέθους του, το σύμπλοκο τεστοστερόνη-BSA πιθανόν να μην είναι εξίσου βιοδιαθέσιμο με τα φλαβονοειδή. Επιπλέον, πιθανός μεταβολισμός των φλαβονοειδών είτε από τα κύτταρα του αίματος, είτε από τα κύτταρα στόχους να οδηγεί στην σύνθεση μεταβολιτών της επικατεχίνης, με διαφορετική και ισχυρότερη δράση στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Πράγματι, έχει αναφερθεί ότι οι κατεχίνες μπορούν να μεταβολίζονται σε 5-(3',4',5'-trihydroxyphenyl), 5-(3',4'-dihydroxyphenyl) και 5-(3',5'-dihydroxyphenyl) valerolactone. Τα παράγωγα αυτά αποτελούν το 6-39 % των μεταβολιτών των epigallocatechin και epicatechin στο πλάσμα, με συγκέντρωση έως 25-πλάσια σε σχέση με τα αρχικά μόρια. Ανιχνεύονται αργότερα και έχουν μεγαλύτερη διάρκεια ζωής, ενώ φαίνεται ότι παρατείνουν και την δράση των μητρικών μορίων φλαβανόλης (Manach et al., 2005). Πρέπει να σημειωθεί επίσης, ότι η αντιπολλαπλασιαστική δράση της τεστοστερόνης είναι εντονότερη στην συγκέντρωση 10^{-7} M.

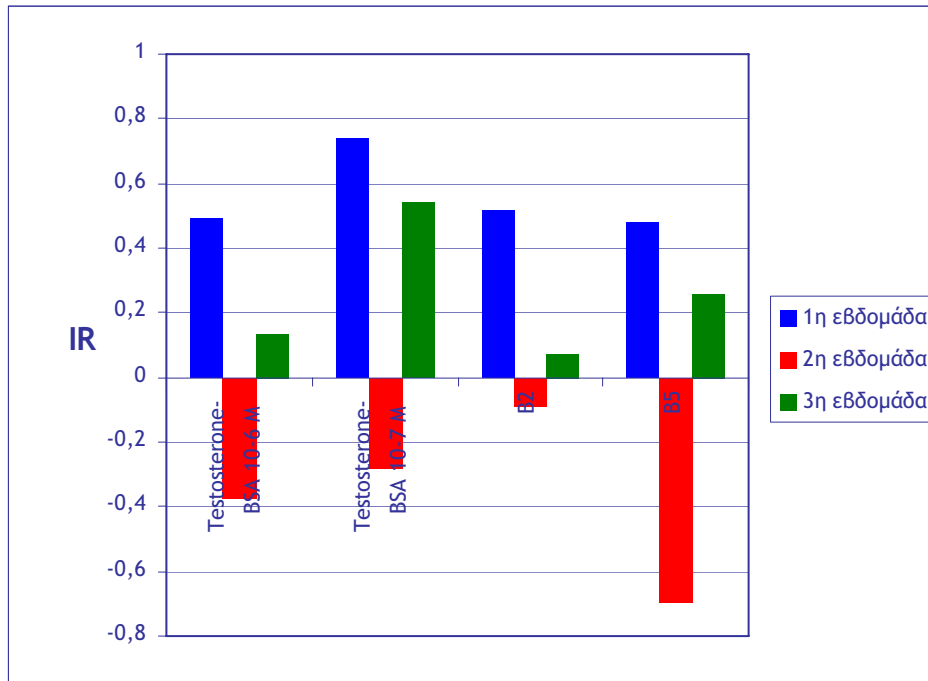
Υπολογίσαμε στην συνέχεια τον ρυθμό αναστολής της ανάπτυξης των όγκων I_R , σε σχέση με το μέγεθός τους στο πειραματικό σημείο 0. Όλες οι ουσίες εμφανίζουν αυξημένη ανασταλτική δράση την πρώτη εβδομάδα, η οποία φθίνει αργότερα (Εικ. 3.2.25).

Ισχυρότερη ανασταλτική δράση προκαλεί η τεστοστερόνη στην συγκέντρωση 10^{-7} M, ακολουθεί το B2, κατόπιν η τεστοστερόνη (10^{-6} M) και τέλος το διμερές B5. Η τεστοστερόνη (10^{-7} M) εμφανίζει παρατεταμένη δράση, σε αντίθεση με τις διμερείς φλαβονόλες και την τεστοστερόνη 10^{-6} M, όπου παρατηρείται ελάττωση της ανασταλτικής ικανότητας στην πορεία του χρόνου.



Εικόνα 3.2.25. Ρυθμός αναστολής ανάπτυξης των όγκων I_R , από την έναρξη της αγωγής. Ο υπολογισμός του στηρίζεται στην μεταβολή του μεγέθους του όγκου σε σχέση με τα ζώα μάρτυρες σε κάθε δειγματοληψία.

Υπολογίσαμε επιπλέον τον ρυθμό αναστολής της ανάπτυξης των όγκων σε σχέση με το μέγεθός τους μεταξύ των πειραματικών μετρήσεων (Εικ. 3.2.26.). Στην περίπτωση αυτή, οι τιμές του I_R διαφοροποιούνται αισθητά, αναδεικνύοντας την μη ομοιογενή δράση των μελετώμενων ουσιών στην ανάπτυξη των όγκων. Παρατηρούμε, ότι η δράση όλων των παραγόντων είναι εξαιρετικά έντονη την πρώτη εβδομάδα χορηγήσεώς τους. Κατόπιν, φαίνεται να ενισχύεται ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων (;) -κατά την διάρκεια της δεύτερης εβδομάδος, στα ζώα μάρτυρες η ανάπτυξη των όγκων υστερεί σε σύγκριση με αυτά που είναι υπό αγωγή-, ενώ την τρίτη εβδομάδα ο I_R ανακάμπτει. Το γεγονός αυτό πιθανόν οφείλεται στο πειραματικό μοντέλο που χρησιμοποιήσαμε, παρά στην καθεαυτό απουσία δράσεως του στεροειδούς ή των φλαβονοειδών. Οι ουσίες δεν καταστέλλουν απαραίτητα το σύνολο του πληθυσμού των καρκινικών κυττάρων. Μετά την αρχική ύφεση της ανάπτυξης είτε των λιγότερο επιθετικών από αυτά, είτε των κυττάρων που βρίσκονταν στην περιφέρεια του όγκου, πιθανόν να απαιτείται παρατεταμένη δράση του στεροειδούς ή των πολυφαινολών, προκειμένου να ελεγχθεί το υπόλοιπο του όγκου. Προτείναμε, ότι η



Εικόνα 3.2.26. Ρυθμός αναστολής ανάπτυξης των όγκων I_R , μεταξύ των δειγματοληψιών. Ο υπολογισμός του στηρίζεται στην μεταβολή του μεγέθους του όγκου σε σχέση με τα ζώα μάρτυρες σε κάθε δειγματοληψία.

δράση των ολιγομερών πολυφαινολών οφείλεται στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, κατά συνέπεια προϋποθέτει την τροποποίηση των διακυτταρικών συνδέσεων και είναι ανεξάρτητη από την κυτταροδιαίρεση. Έχουμε επίσης δείξει ότι η ανασταλτική επίδραση των μονομερών πολυφαινολών στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό εκδηλώνεται μετά από μερικούς κυτταρικούς κύκλους και σχετίζεται με την ευαισθητοποίησή τους μέσω του συστήματος NO/NOS. Τέλος, καθώς δεν υπάρχουν δεδομένα για την πρόσβαση των φλαβονοειδών στη συμπαγή μάζα του όγκου, εικάζουμε ότι είναι λιγότερο διαθέσιμες στο κεντρικό του τμήμα. Τα δεδομένα αυτά συνολικά μπορούν να εξηγήσουν την διαφορετική χρονικά απόκριση των νεοπλασματικών κυττάρων στις ουσίες, χωρίς όμως να προσδίδουν στις τελευταίες μιτογόνες ιδιότητες.

3.3. ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΣΤΟ ΠΛΑΣΜΑ.....	159
3.3.1. Μακροχρόνια χορήγηση	159
3.3.1.1. Εκκύλιση ελιάς	161
3.3.1.1.1. Πειραματικό υλικό.....	161
3.3.1.1.2. Αποτελέσματα.....	161
3.3.1.2. Εκκύλιση συμπλόκων πολυφαινολών αμπέλου	162
3.3.1.2.1. Πειραματικό υλικό.....	163
3.3.1.2.2. Αποτελέσματα.....	164
3.3.2. Βραχυχρόνια χορήγηση	164
3.3.2.1. Πειραματικό υλικό	164
3.3.2.2. Αποτελέσματα	165
3.3.3. Συζήτηση.....	166

3.3. ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΣΤΟ ΠΛΑΣΜΑ

3.3.1. Μακροχρόνια χορήγηση

Οι μελέτες που αφορούν την διαθεσιμότητα υπολογίζουν την συγκέντρωση όλων των μεταβολιτών μιας πολυφαινόλης στο πλάσμα μεταξύ 0-4 μΜ, μετά την κατανάλωση 50 mg αναλόγων του μη υποκατεστημένου μορίου (aglycone). Το ΕΥΚ, η μέγιστη συγκέντρωση στο πλάσμα και η μέτρηση των μεταβολιτών στα ούρα δείχνουν ότι η υποκατάσταση επηρεάζει την βιοδιαθεσιμότητα (π.χ. rutin vs quercetin glucosides και EGC vs epicatechin). Το γαλλικό οξύ, οι quercetin glucosides, οι catechins, τα ελεύθερα υδροξυκιναμικά οξέα και οι ανθοκυάνες, που απορροφώνται είτε από το στομάχι είτε από το έντερο, ανιχνεύονται στις μέγιστες συγκεντρώσεις τους 1,5 h μετά την κατανάλωσή τους. Αντίθετα οι rutin, hesperidin και naringin, που είναι απαραίτητο να υδρολυθούν από την εντερική μικροχλωρίδα φθάνουν την μέγιστη συγκέντρωση μετά από 5,5 h. Ανάλογα, η διατροφική πηγή ή ο συνδυασμός τροφών επηρεάζει την βιοδιαθεσιμότητα. Στην περίπτωση της τομάτας (τοματοπελέτες) όπου οι ίδιες ουσίες απαντώνται μη υποκατεστημένες, η μέγιστη συγκέντρωση παρατηρείται 2 h αργότερα (Bugianesi et al., 2002). Το χλωρογενικό οξύ, παραδείγματος χάριν, απορροφάται μετά από υδρόλυσή του. Όταν καταναλώνεται όμως με την μορφή ροφήματος (καφέ), η απορρόφησή του είναι ταχύτερη. Συγκριτικά, στον άνθρωπο καλύτερα απορροφώνται οι ισοφλαβόνες και το γαλλικό οξύ, ακολουθούμενες από τις φλαβονόνες και τις φλαβανόλες. Οι πολυφαινόλες που απορροφώνται σε μικρότερο βαθμό είναι οι προανθοκυανίνες, οι galloylated catechins και οι ανθοκυάνες. Οι πολυμερείς προανθοκυανίνες Β1 και Β2 στο πλάσμα έχουν αναφερθεί μόνο σε δύο μελέτες και σε εξαιρετικά χαμηλά επίπεδα (Holt et al., 2002; Sano et al., 2003). Οι Spencer et al πρότειναν ότι διασπώνται στα μονομερή τους στο στομάχι (Spencer et al., 2000; Spencer et al., 2001). Εντούτοις, οι Rios LY et al θεωρούν ότι το pH του βλωμού δεν είναι αρκετά όξινο, προκειμένου να υδρολυθούν οι ταννίνες (Rios et al., 2002).

Η μελέτη της βιοδιαθεσιμότητας των πολυφαινολών και ιδιαίτερα των συμπλόκων μορίων εμφανίζει αρκετές δυσκολίες, λόγω της μικρής ευαισθησίας των μεθόδων που χρησιμοποιούνται και του μεταβολισμού τους, ο οποίος καθιστά δυνατή την απορρόφηση ή την επαναπρόσληψή τους. Στους Πίνακες 3.3.1-3. παρουσιάζεται συνοπτικά η διαθεσιμότητα των φλαβονολών και των ανθοκυανινών (Manach et al., 2005).

Στα πλαίσια μιας φυσιολογικής δίαιτας, παρά τις διακυμάνσεις τους στο πλάσμα, οι πολυφαινόλες ανιχνεύονται σε σχετικά σταθερές συγκεντρώσεις μεταξύ των γευμάτων ή πριν από αυτά. Οι συνήθεις συγκεντρώσεις της quercetin (fasting plasma concentration) κυμαίνονται σε 50-80 nM. Η βασική συγκέντρωση μπορεί να αυξηθεί μετά από μακροχρόνια χορήγηση διατροφικών συμπληρωμάτων: 165 nM, μετά από 6 εβδομάδες κατανάλωσης 500 mg/ημέρα rutin (Boyle et al., 2000), 1,5 μΜ μετά από 28 ημέρες χορηγήσεως 1 g/ημέρα quercetin (Conquer et al., 1998) και 0,63 μΜ μετά την κατανάλωση τροφής ισοδύναμης με 80 mg/ημέρα quercetin για μία εβδομάδα (Moon et al., 2000).

Πίνακας 3.3.1. Βιοδιαθεσιμότητα των φλαβονολών και των φλαβανολών, ανάλογα με την οδό και την μορφή στην οποία χορηγούνται (Manach et al., 2005).

Bioavailability studies of flavonols or flavanol-containing foods ¹							
Source	No. of subjects	Dose	T _{max} plasma	Plasma concentration	AUC	Urinary excretion	Elimination half-life
			<i>h</i>	$\mu\text{mol/L}$	$\mu\text{mol} \cdot \text{h/L}$	<i>% of intake</i>	<i>h</i>
Pure quercetin	6	4 g		<0.33		<1	
Onions	9 ileostomized	89 mg quercetin eq				0.31/13h	
Pure rutin	9 ileostomized	100 mg quercetin eq				0.07/13h	
Pure quercetin	9 ileostomized	100 mg quercetin eq				0.12/13h	
Fried onions	2	64 mg quercetin eq	2.9	0.65			16.8
Onions	9	68 mg quercetin eq	0.7	0.74	7.7		28.0
Apples	9	107 mg quercetin eq	2.5	0.3	3.5		23.0
Pure rutin	9	100 mg quercetin eq	9.3	0.3	3.3		
Complete meal	10	87 mg quercetin eq		0.37 at 3 h			
Onions	5	186 mg quercetin eq	1.3–1.9	2.18		1.11	
Onions	5	50 mg quercetin eq	2	0.83			
Quercetin 4'-glucoside	9	150 mg	<0.5	3.5	18.8		21.6
Pure rutin	9	190 mg	6	0.18	3.7		28.1
Quercetin 3-glucoside	9	156 mg	0.6	5	19.1	3.6	18.5
Quercetin 4'-glucoside	9	160 mg	0.45	4.5	17.5	3.1	17.7
Pure rutin	3	500 mg	4–7	0.13–0.73			
Pure quercetin	16	8, 20, 50 mg	2, 2.7, 4.9	0.14, 0.22, 0.29	1.74, 2.92, 3.77		17, 17.7, 15
Pure rutin	16	8, 20, 50 mg quercetin eq	6.5, 7.4, 7.5	0.08, 0.16, 0.30	1.26, 2.10, 3.36		
Onions	12	100 mg quercetin eq	0.68	7.6	32.1	6.4	10.9
Pure quercetin 4'-glucoside	12	100 mg quercetin eq	0.7	7.0	27.8	4.5	11.9
Buckwheat tea	12	200 mg quercetin eq	4.3	2.1	12.6	1.0	10.3
Pure rutin	12	200 mg quercetin eq	7	1.1	8.3	0.9	11.8
Apple cider (1.1 L)	6	1.6 mg quercetin eq	0.66–1	0.14			
Pure quercetin	12	0.14 mg/kg bw	0.5	0.15–0.42		2.9–7	

¹ T_{max}, time to C_{max}; AUC, area under the curve; eq, equivalents; bw, body weight.

Πίνακας 3.3.2. Βιοδιαθεσιμότητα των ανθοκυανινών ανάλογα με την μορφή στην οποία χορηγούνται (Manach et al., 2005).

Bioavailability studies of anthocyanins or anthocyanin-containing foods ¹						
Source	No. of subjects	Dose	T _{max} plasma	Plasma concentration	T _{max} urine (h)	Urinary excretion
			<i>h</i>	<i>nmol/L</i>	<i>h</i>	<i>% of intake</i>
Black currant juice	17	20 or 12 mg total anth./kg bw	0.75	32–107 ²		0.045–0.072
Black currant juice (330 mL)	10	1 g total anth.	1	3.5–51 ³	1–1.5	0.032–0.046 ³
Black currant juice (200 mL)	4	153 mg total anth.			2	0.02–0.05/5 h ³
Black currant concentrate	8	3.58 mg total anth./kg bw	1.25–1.75 ³	115 (4–60 ³)	<4	0.06–0.11/8 h ³
Elderberry extract (12 g)	4	720 mg total anth.				0.077/4 h
Elderberry extract (12 g)	4	720 mg total anth.	1.1–1.2 ³	97		
Elderberry concentrate	16	1.9 g total anth.			1–2 ³	0.035/6 h
Spray-dried elderberry juice	7	500 mg total anth.			3–4 ³	0.01–0.04 ³
Freeze-dried blueberries	5	1.2 g total anth.	41	11–36 ²		
Lowbush blueberries (190 g)	6	690 mg total anth.				0.004/6 h
Red wine (300 mL)	6	218 mg total anth.			6	1.5–5.1/12 h
Red wine (500 mL)	6	68 mg malvidin 3-glc	0.83	1.4	<3	0.016/6 h
Red grape juice (500 mL)	6	117 mg malvidin 3-glc	2	2.8		0.019/6 h
Red fruit extract (1.6 g)	12	2.7 mg cyan 3-glc/kg bw	1	29		
Strawberries	6	77.3 mg pelargonidin 3-glc			2–4	1.8/24 h

¹ T_{max}, time to C_{max}; anth., anthocyanin; bw, body weight; glc, glucoside.
² Assuming average molecular weight of 465 g/mol for unit conversion.
³ Depending on the anthocyanin considered in the mixture.

Πίνακας 3.3.3. Συγκριτική βιοδιαθεσιμότητα των φλαβονοειδών (Manach et al., 2005).

	T _{max}		C _{max}		AUC		Urinary excretion		Elimination half-life	
	Mean	Range	Mean	Range	Mean	Range	Mean	Range	Mean	Range
	<i>h</i>		$\mu\text{mol/L}$		$\mu\text{mol h/L}$		% of intake		<i>h</i>	
Daidzin	6.3 ± 0.6	4.0–9.0	1.92 ± 0.25	0.36–3.14	21.4 ± 6.5	2.7–38.6	42.3 ± 3.0	21.4–62.0	5.3 ± 0.8	3.4–8.0
Daidzein	4.9 ± 1.0	3.0–6.6	1.57 ± 0.52	0.76–3.00	12.2 ± 2.9	7.5–17.4	27.5		8.5 ± 0.8	7.7–9.3
Genistin	6.5 ± 0.6	4.4–9.3	1.84 ± 0.27	0.46–4.04	23.7 ± 6.7	6.2–45.1	15.6 ± 1.8	6.8–29.7	7.8 ± 0.7	5.7–10.1
Genistein	4.1 ± 0.6	3.0–5.2	2.56 ± 1.00	1.26–4.50	19.8 ± 6.5	10.4–32.2	8.6		7.1 ± 0.3	6.8–7.5
Glycitin	5.0		1.88 ± 0.38	1.50–2.26	7.9		42.9 ± 12.0	19.0–55.3	8.9	
Hesperidin	5.5 ± 0.1	5.4–5.8	0.46 ± 0.21	0.21–0.87	2.7 ± 0.7	1.9–4.1	8.6 ± 4.0	3–24.4	2.2	
Naringin	5.0 ± 0.2	4.6–5.5	0.50 ± 0.33	0.13–1.50	3.7 ± 1.5	0.9–7.0	8.8 ± 3.17	1.1–30.2	2.1 ± 0.4	1.3–2.7
Quercetin glucosides	1.1 ± 0.3	0.5–2.9	1.46 ± 0.45	0.51–3.80	9.8 ± 1.9	5.7–16.0	2.5 ± 1.2	0.31–6.4	17.9 ± 2.2	10.9–28.0
Rutin	6.5 ± 0.7	4.3–9.3	0.20 ± 0.06	0.09–0.52	2.9 ± 0.9	1.6–5.5	0.7 ± 0.3	0.07–1.0	19.9 ± 8.1	11.8–28.1
(Epi)catechin	1.8 ± 0.1	0.5–2.5	0.40 ± 0.09	0.09–1.10	1.1 ± 0.3	0.5–2.0	18.5 ± 5.7	2.1–55.0	2.5 ± 0.4	1.1–4.1
EGC	1.4 ± 0.1	0.5–2.0	1.10 ± 0.40	0.30–2.70	2.0 ± 0.8	1.0–3.6	11.1 ± 3.5	4.2–15.6	2.3 ± 0.2	1.7–2.8
EGCG	2.3 ± 0.2	1.6–3.2	0.12 ± 0.03	0.03–0.38	0.5 ± 0.1	0.2–0.9	0.06 ± 0.03	0.0–0.1	3.5 ± 0.3	2.5–5.1
Gallic acid	1.6 ± 0.2	1.3–1.5	4.00 ± 0.57	2.57–4.70			37.7 ± 1.0	36.4–39.6	1.3 ± 0.1	1.1–1.5
Chlorogenic acid	1.0		0.26				0.3			
Caffeic acid	1.4 ± 0.6	0.7–2.0	0.96 ± 0.26	0.45–1.35			10.7			
Ferulic acid	2.0		0.03				27.6 ± 17.6	3.1–61.7		
Anthocyanins	1.5 ± 0.4	0.7–4.0	0.03 ± 0.02	0.001–0.20			0.4 ± 0.3	0.004–5.1		
Proanthocyanidin dimers	2.0		0.02 ± 0.01	0.008–0.03						

¹ All data were converted to correspond to a supply of 50 mg aglycone equivalent.

T_{max}, time to reach C_{max}; AUC, area under the plasma concentration-time curve EGC, epigallocatechin.

Προκειμένου να ελέγξουμε την *in vivo* βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών που χρησιμοποιήθηκαν στα *in vitro* πειραματικά πρωτόκολλα και στο πειραματικό μοντέλο επίμυων, χορηγήσαμε διατροφικά συμπληρώματα σε εθελοντές και εξετάσαμε την μακροπρόθεσμη ρύθμιση της οξειδωτικής (TOC) και αντιοξειδωτικής (cTAC) ικανότητας στο πλάσμα.

3.3.1.1. Εκχύλισμα ελιάς

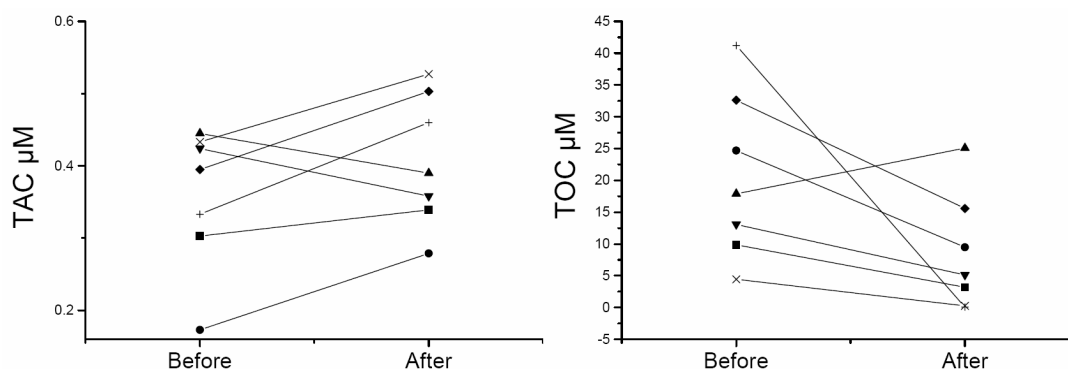
3.3.1.1.1. Πειραματικό υλικό

Χρησιμοποιήθηκε ένα μείγμα πολυφαινολών ελαιοκάρπου (357 μg), χυμού φύλλων ελιάς και αθέρμου ελαιολάδου (160 mg), εγκλεισμένο σε καψίδιο ζελατίνης. Το περίβλημα ζελατίνης προστατεύει το προϊόν από οξείδωση και επιτρέπει την σταδιακή απελευθέρωση του περιεχομένου στο στομάχι. Το σκεύασμα (2 κάψουλες, 714 μg πολυφαινολών) χορηγήθηκε σε 7 υγιείς εθελοντές, ηλικίας 23-53 ετών για μία εβδομάδα.

3.3.1.1.2. Αποτελέσματα

Η απορρόφηση των πολυφαινολών ελέγχθηκε έμμεσα. Δεδομένου ότι η πλειοψηφία των μορίων αυτών εμφανίζει αντιοξειδωτικές ιδιότητες, υπολογίσαμε τις τιμές των TAC και TOC στο πλάσμα των εθελοντών, πριν και μετά το πέρας της πειραματικής διαδικασίας. Παράλληλα, ελέγχθηκαν και οι βιοχημικές παράμετροι του ορού. Πρέπει να σημειωθεί, ότι επειδή οι ενδογενείς μεταβολίτες (ουρικό οξύ, χολερυθρίνη, λιποπρωτεΐνες και αλβουμίνη) συμμετέχουν στην αντιοξειδωτική ικανότητα του ορού κατά 85%, στην αξιολόγηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η cTAC (corrected TAC).

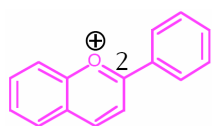
Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.3.1., η κατανάλωση του εκχυλίσματος ελιάς αύξησε την αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος ενώ παράλληλα μείωσε την οξειδωτική του ικανότητα. Τα δεδομένα αυτά καταδεικνύουν την βιοδιαθεσιμότητα των μονομερών πολυφαινολών και την ρύθμιση του οξειδοαναγωγικού δυναμικού των κυττάρων. Εφόσον, οι ουσίες δεν συσσωρεύονται στον οργανισμό, συμπεραίνουμε ότι μπορούν να προσφέρουν άμεση προστασία, λόγω της παροδικής αυξήσεως της συγκεντρώσεώς τους στο πλάσμα. Αφετέρου, είναι πιθανόν να επηρεάζουν έμμεσα την παραγωγή ελευθέρων ριζών, με τελικό αποτέλεσμα την μακροπρόθεσμη μείωση της οξειδωτικής ικανότητας των κυττάρων.



Εικόνα 3.3.1. Ρύθμιση της αντιοξειδωτικής (TAC) και της οξειδωτικής ικανότητας (TOC) του πλάσματος εθελοντών μετά από μία εβδομάδα κατανάλωσης εκχυλίσματος πολυφαινολών ελιάς.

3.3.1.2. Εκχύλισμα συμπλόκων πολυφαινολών αμπέλου

Τα δεδομένα σχετικά με την απορρόφηση των συμπλόκων (πολυμερών) πολυφαινολών δεν είναι επαρκή (Manach et al., 2005). Εφάπαξ κατανάλωση ανθοκυανών (0,15-2 g) έδειξε ότι φθάνουν στην μέγιστη συγκέντρωση στο πλάσμα 0,75-4 h αργότερα, ενώ ανιχνεύονται στα ούρα 2,5, h μετά. Η απορρόφηση τους αντιστοιχεί στο 0,004-0,1% της αρχικής ποσότητας, ανάλογα με την διατροφική πηγή (κόκκινο κρασί ή φρούτα) (Felgines et al., 2003; Lapidot et al., 1998) και φαίνεται να γίνεται στο στομάχι. Ενδιαφέρον είναι ότι οι ανθοκυανίνες, παρά την ταχεία απορρόφηση και απέκκρισή τους, βάσει της βιβλιογραφίας εμφανίζουν εξαιρετικά μικρή βιοδιαθεσιμότητα. Τα αποτελέσματα αυτά μπορούν να αμφισβητηθούν για τους εξής λόγους: α) δεν μελετήθηκαν όλοι οι πιθανοί μεταβολίτες τους και β) απαιτείται



ion "flavylium"
(2-phenyl-benzopyrylium)

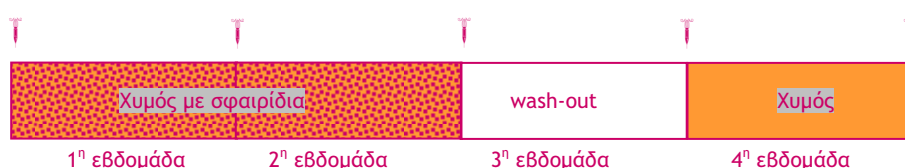
βελτιστοποίηση και αύξηση της ευαισθησίας των τεχνικών που χρησιμοποιήθηκαν. Η συνήθης μέθοδος προσδιορισμού των ανθοκυανών στηρίζεται στην μετατροπή τους με οξינוποίηση σε κατιόντα flavylium και την μέτρηση της απορρόφησης των παραγομένων μορίων στο υπεριώδες-ορατό. Αρκετές από τις μορφές

των ανθοκυανών όμως που απαντώνται σε ουδέτερο περιβάλλον, όπως είναι το πλάσμα, δεν μπορούν να μετατραπούν σε κατιόντα flavylium, λόγω της προσδέσεώς τους σε

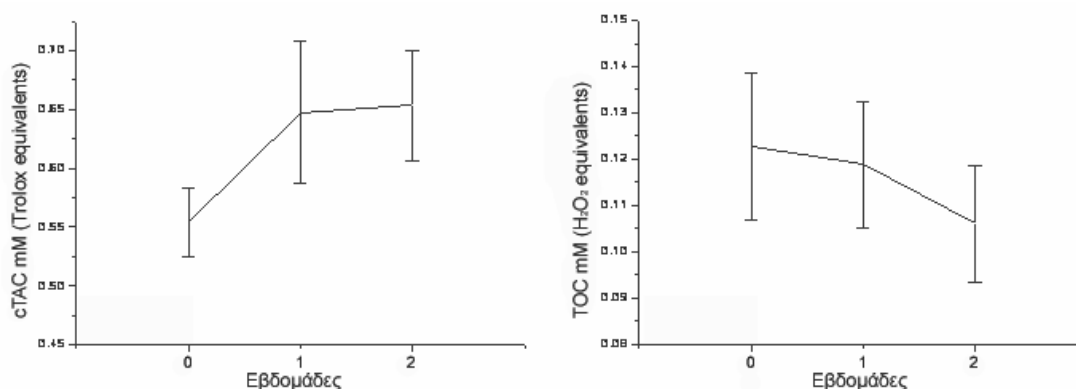
μακρομόρια. Επιπλέον, οι Felgines et al. (Felgines et al., 2003) φέρουν ότι οι μεταβολίτες των συμπλόκων πολυφαινόλων, με εξαίρεση τους φυσικούς γλυκοζίτες, είναι μόρια αρκετά ασταθή και συνήθως διασπώνται μετά την απόψυξη των δειγμάτων.

3.3.1.2.1. Πειραματικό υλικό

Χρησιμοποιήθηκε το εκχύλισμα ολιγομερών πολυφαινόλων GAT. Επιλέχθηκε μία ομάδα 9 υγιών εθελοντών, οι οποίοι κατανάλωσαν ημερησίως 500 ml χυμού που περιείχε ή όχι μικροσφαιρίδια (5 % v/v πολυφαινόλες), σύμφωνα με το σχήμα:



Σε αντίθεση με το προηγούμενο εκχύλισμα πρέπει να σημειώσουμε ότι η κατανάλωση χυμού ενισχύει την αντιοξειδωτική ικανότητα των υποκειμένων λόγω της υψηλής συγκεντρώσεως βιταμινών. Για τον λόγο αυτό, υπολογίσθηκε και η συμβολή του χυμού στις τιμές των TAC και TOC. Η τεχνολογία που χρησιμοποιήθηκε για τον εγκλεισμό των πολυφαινόλων σε μικροσφαιρίδια δεν περιλαμβάνει την χρήση γενετικά τροποποιημένων οργανισμών (GMO-free). Ο εγκλεισμός επιτυγχάνεται με χημικές διαδικασίες, χωρίς την προσθήκη υδατανθράκων και πρωτεϊνών. Για τον λόγο αυτό τα μικροσφαιρίδια είναι ανθεκτικά στην παστερίωση, στην μέθοδο UHT (ultra heat treatment), την ομογενοποίηση και την υψηλή θερμοκρασία ή την ξήρανση, προστατεύοντας το περιεχόμενό τους από οξείδωση ή αποικοδόμηση. Τα ενεργά συστατικά διαλύονται σε ένα μεικτό σύστημα (ύδατος και ελαίου) και εγκλείονται σε ένα κέλυφος φυσικών cross-linked πολυμερών (αραβικό κόμμι), με αποτέλεσμα την δημιουργία ελαστικών μικροσκοπικών σφαιριδίων, διαμέτρου 2 μm, τα οποία είναι σταθερά σε pH>3,6. Συνεπώς η κατανάλωσή τους επιτρέπει την ασφαλή διαδρομή τους μέχρι το στομάχι, όπου αποικοδομούνται και απελευθερώνεται το περιεχόμενό τους.



Εικόνα 3.3.2. Μεταβολή των τιμών cTAC και TOC στο πλάσμα υγιών εθελοντών κατά την διάρκεια 2 εβδομάδων μετά από κατανάλωση χυμού που περιείχε μικροσφαιρίδια πλούσια σε σύμπλοκες πολυφαινόλες.

3.3.1.2.2. Αποτελέσματα

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.3.2., οι τιμές TAC και cTAC δύο εβδομάδες μετά την κατανάλωση χυμού με μικροσφαιρίδια πολυφαινολών είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος. Αυτό διαφαίνεται εντονότερα από τις τιμές της cTAC, η οποία αντιστοιχεί στην εξωγενή αντιοξειδωτική ικανότητα. Επιπλέον, παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων του οξειδωτικού δυναμικού των κυττάρων (TOC) μετά την κατανάλωση του χυμού. Στην περίπτωση που οι εθελοντές κατανάλωσαν μόνο χυμό, δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές στο οξειδωτικό ή αντιοξειδωτικό δυναμικό του πλάσματος. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι οι ολιγομερείς πολυφαινόλες:

- αυξάνουν παροδικά την συγκέντρωση αντιοξειδωτικών, γεγονός το οποίο πιθανόν οφείλεται στην βιοδιαθεσιμότητά τους και την αύξηση της συγκέντρωσής τους στο πλάσμα
- μειώνουν την έκθεση των ιστών σε ελεύθερες ρίζες. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να οφείλεται είτε στην άμεση απενεργοποίηση των ριζών στο πλάσμα, είτε στην μεσοπρόθεσμη ρύθμιση των μηχανισμών άμυνας του κυττάρου, αυξάνοντας την σύνθεση ενδογενών αντιοξειδωτικών, τροποποιώντας βασικές μεταβολικές διαδικασίες και μειώνοντας τον ουδό ενεργοποίησης σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα.

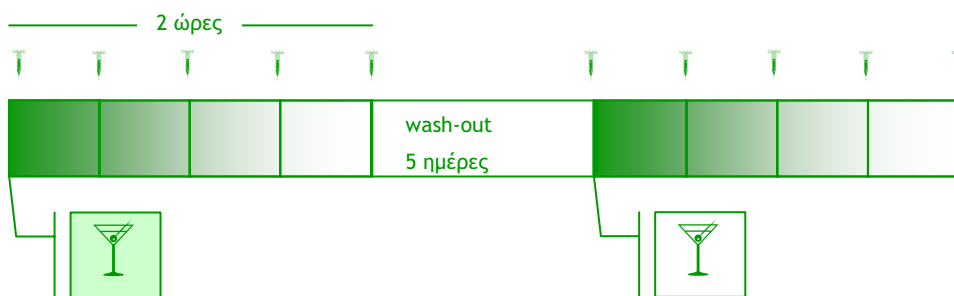
Πρέπει να σημειωθεί επίσης, ότι οι βιοχημικές παράμετροι στον ορό αίματος των εθελοντών δεν εμφάνισαν διακυμάνσεις, ενώ οι διαφοροποιήσεις στα επίπεδα των λιποπρωτεϊνών οφείλονται μάλλον στην δίαιτα του καθενός και όχι στην κατανάλωση του χυμού ή πολυφαινολών.

3.3.2. Βραχυχρόνια χορήγηση

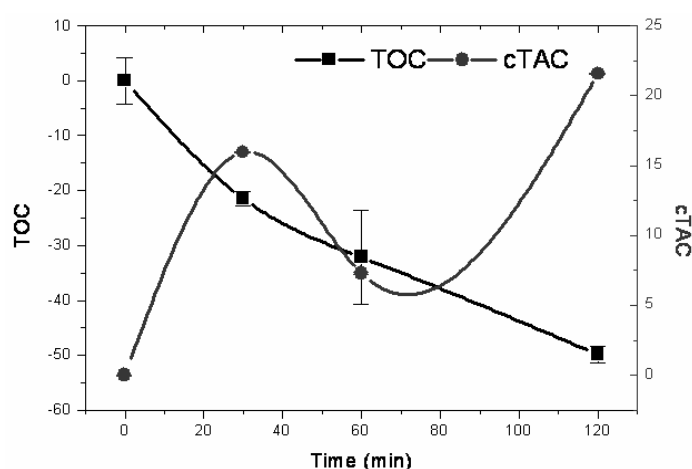
Τα παραπάνω δεδομένα δείχνουν ότι οι πολυφαινόλες, στην μονομερή ή ολιγομερή τους μορφή είναι βιοδιαθέσιμες και επηρεάζουν μακροπρόθεσμα την αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος. Παρά τις ενδείξεις για την ταχεία απορρόφηση των πολυφαινολών, ελάχιστα πειραματικά δεδομένα συσχετίζουν την παρουσία τους με βιολογική δράση και την πιθανή αλληλεπίδρασή τους με άλλα στοιχεία της διατροφής.

3.3.2.1. Πειραματικό υλικό

Υγιείς εθελοντές, ηλικίας 23-53 ετών, χωρίστηκαν σε δύο ομάδες. Σε καθεμία χορηγήθηκε αφρώδης οίνος (250 ml) από λευκά ή κόκκινα σταφύλια (Veuve A.Devaux, Domaine de Villeneuve, France) και μετά από μερικές ημέρες αλκοολούχο ύδωρ (12% αιθανόλη σε ανθρακούχο ύδωρ Perrier®), σύμφωνα με το σχήμα:



Στην περίπτωση αυτή λήφθηκαν δείγματα αίματος, μέχρι 2 h μετά την κατανάλωση του ποτού και υπολογίσθηκαν οι τιμές των TAC και TOC στο πλάσμα, καθώς και οι βιοχημικές παράμετροι του ορού.



Εικόνα 3.3.3. Μεταβολή των τιμών cTAC και TOC στο πλάσμα υγιών εθελοντών 2 ώρες μετά την κατανάλωση αφρώδους οίνου από κόκκινα σταφύλια.

3.3.2.2. Αποτελέσματα

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.3.3., κατ'αναλογία με την μακροχρόνια κατανάλωση πολυφαινόλων, οι πολυφαινόλες του αφρώδους οίνου επάγουν την αύξηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος και μειώνουν παράλληλα το οξειδωτικό του δυναμικό. Η δράση αυτή είναι εμφανής ακόμη και 30 min μετά την κατανάλωση του εκχυλίσματος. Επιπλέον, η αιθανόλη δεν φαίνεται να καταστέλλει την συμβολή των πολυφαινόλων στην αύξηση του αντιοξειδωτικού δυναμικού στον ορό.

Η κατανάλωση αιθανόλης έχει αναφερθεί ότι επάγει την φλεγμονή και την ανολογική απόκριση. Εξετάσαμε, αν η χορήγηση του αφρώδους οίνου ή του αλκοολούχου διαλύματος ενεργοποιεί τα λευκοκύτταρα και επάγει την έκκριση ιντερλευκινών. Η μέθοδος που χρησιμοποιήσαμε έχει εξαιρετικά μεγάλη ευαισθησία (0-5000 pg/ml), ωστόσο σε καμία περίπτωση δεν παρατηρήθηκε ανοσολογική απόκριση.

3.3.3. Συζήτηση

Οι ελεύθερες ρίζες (ROS) παράγονται φυσιολογικά κατά την διάρκεια του αερόβιου κυτταρικού μεταβολισμού. Η εξουδετέρωση ή/και απενεργοποίησή τους γίνεται από τα αντιοξειδωτικά. Οι ουσίες αυτές είναι ενεργές σε συγκεντρώσεις μικρότερες από αυτές των οξειδώσιμων υποστρωμάτων και λειτουργούν καθυστερώντας ή παρεμποδίζοντας την οξειδωσή των τελευταίων. Η σχετικά υψηλή ικανότητα ενός οργανισμού για απενεργοποίηση των ROS σχετίζεται με την αποφυγή του οξειδωτικού stress κατά την διάρκεια λοιμώξεων, στον διαβήτη, σε νευροεκφυλιστικές νόσους, στην στηθάγχη και τον καρκίνο. Η πρωτογενής ασπίδα εναντίον των ελευθέρων ριζών απαρτίζεται από αντιοξειδωτικά μόρια μικρού μοριακού βάρους, υδρόφιλα (π.χ. ασκορβικό οξύ) ή υδρόφοβα (π.χ. Βιταμίνη E), τα οποία κυκλοφορούν στο αίμα, ενώ επιπλέον προστασία προσφέρουν τα ενδοκυττάρια αντιοξειδωτικά. Αρκετές από τις αντιοξειδωτικές ουσίες (GSH, ουρικό οξύ, χολερυθρίνη, αλβουμίνη, θειόλες) παράγονται κατά την διάρκεια του κυτταρικού μεταβολισμού. Επιπρόσθετη και σημαντική προστασία παρέχεται από διατητικές αντιοξειδωτικές ουσίες, τις οποίες ο οργανισμός δεν δύναται να συνθέσει, όπως βιταμίνες και πολυφαινόλες.

Καθεμιά από τις αντιοξειδωτικές ουσίες διαθέτει διαφορετική ικανότητα απενεργοποίησης ελευθέρων ριζών οξυγόνου ή αζώτου, κατά συνέπεια η μέτρηση επιμέρους δεικτών/μεμονωμένων ουσιών δεν ανταποκρίνεται στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα ενός συστήματος. Ο υπολογισμός και των δύο παραμέτρων -TAC και TOC- οδηγεί σε αντικειμενικότερη εκτίμηση της κατάστασης ενός οργανισμού. Επιπλέον, οι τιμές της TAC στο πλάσμα παρουσιάζουν διακυμάνσεις, δεδομένων των αλυσιδωτών αντιδράσεων μεταξύ των κυκλοφορούντων αντιοξειδωτικών· οι ενδογενείς αντιοξειδωτικές ουσίες συνήθως ρυθμίζουν και εξασθενούν οξείες μεταβολές στο οξειδωτικό δυναμικό. Συνεπώς, η TAC αντιπροσωπεύει μία μεσοπρόθεσμη λειτουργική κατάσταση του πλάσματος, σε σχέση με την συνολική συνεισφορά των οξειδοαναγωγικών φαινομένων και την επιμέρους συγκέντρωση μεμονωμένων μορίων.

Στην παρούσα μελέτη δείξαμε ότι οι πολυφαινόλες έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν την οξειδωτική και αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος, τόσο βραχυπρόθεσμα, όσο και μετά από μακροχρόνια κατανάλωση, ανεξαρτήτως της συστάσεως του εκχυλίσματος σε μονομερή ή πολυμερή, ή της συγχορήγησης ουσιών που ελαττώνουν (χυμός) ή επάγουν (αιθανόλη) το οξειδωτικό stress. Μελέτες βιοδιαθεσιμότητας, αναφέρουν ότι η απορρόφηση των πολυφαινολών εξαρτάται από το είδος του μέσου στο οποίο διαλύονται (χυμός, έλαιο, νερό, ή αλκοολούχο διάλυμα), χωρίς όμως να επηρεάζεται η περαιτέρω βιολογική τους δράση (Goldberg et al., 2003). Η αντιοξειδωτική δράση των μονομερών πολυφαινολών συνήθως εκτιμάται μέσω της ρύθμισης των επιπέδων των λιποπρωτεϊνών και της προστασίας των κυττάρων του αίματος από οξειδωτικό θάνατο. Τα δεδομένα μας δείχνουν ότι όλα τα εκχυλίσματα, ανεξαρτήτως της μορφής στην οποία χορηγούνται και της επιμέρους συγκεντρώσεως μονομερών ή ολιγομερών μορίων, δεν επηρεάζουν τους κλασσικούς βιοχημικούς δείκτες. Πιθανές διαφορές οφείλονται στην διατροφή και την

ιδιοσυστασία κάθε υποκειμένου, παρά στην κατανάλωση των πολυφαινολών. Η δράση των πολυφαινολών αντικατοπτρίζεται, τουλάχιστον στο χρονικό διάστημα που διήρκεσε η μελέτη, στην ρύθμιση του οξειδοαναγωγικού δυναμικού του ορού. Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες των ανθοκυανινών, αν και είναι εξαιρετικά ασταθή μόρια σε ουδέτερο pH, διατηρούνται στο πλάσμα (Matsumoto et al., 2002). Ανάλογες παρατηρήσεις έγιναν και σε υγιείς καπνιστές, ηλικίας άνω των 50 ετών (Vigna et al., 2003), όπου κατανάλωση 150mg προκυανινών ημερησίως για τέσσερις εβδομάδες είχε ως αποτέλεσμα την μείωση της παραγωγής TBARS, ακόμη και τρεις εβδομάδες μετά την διακοπή της αγωγής, ενώ καμία διαφορά δεν παρατηρήθηκε στα επίπεδα της ολικής χοληστερόλης, των τριγλυκεριδίων ή των HDL και LDL. Επίσης, σε άλλη μελέτη λήψης διατροφικού συμπληρώματος OPCs (110 mg ημερησίως για 30 ημέρες) βρέθηκε ότι οι ολιγομερείς πολυφαινόλες αυξάνουν τα επίπεδα τοκοφερόλης (Βιταμίνη E) στα ερυθροκύτταρα, χωρίς όμως να παρατηρείται αντίστοιχη μεταβολή στο πλάσμα. Επιπλέον, το εκχύλισμα OPCs ρύθμιζε την λιπιδιακή σύσταση των ερυθρών αιμοσφαιρίων, αυξάνοντας την περιεκτικότητά τους σε πολυακόρεστα λιπίδια, καθώς επίσης μείωσε την ευαισθησία του DNA των λεμφοκυττάρων στην οξειδωση (μετατροπή της 2'-deoxyguanosine σε 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine) (Simonetti et al., 2002).

Ο μικροεγκλεισμός των αντιοξειδωτικών προλαμβάνει την αλληλεπίδρασή τους με το περιβάλλον (ιστούς και συστατικά της δίαιτας) και αποτρέπει την δράση τους μέχρι να προσεγγίσουν ένα προκαθορισμένο σημείο (όργανο ή ιστό). Το γεγονός αυτό επιτρέπει την αξιοποίησή τους στην τεχνολογία τροφίμων και την δημιουργία «λειτουργικών» προϊόντων. Ο πολτός των σταφυλιών και της ελιάς αποτελεί μία εξαιρετικά πλούσια πηγή πολυφαινολών και εξαιρετικά φθηνή πρώτη ύλη, χωρίς περαιτέρω οικονομική σημασία για τους παραγωγούς. Δεν είναι εύκολο να συντηρηθεί ως έχει, ενώ ελάχιστα βιομηχανικά προϊόντα έχουν προκύψει από αυτόν, όπως η θρεψίνη (σταφυλοσάκχαρα) ή ο μούστος. Δεδομένων των αναγκών της μεταμοντέρνας κοινωνίας σε «έξυπνα» τρόφιμα, αλλά και της ελλείψεως συγκεκριμένων ομάδων τροφίμων σε διάφορες περιοχές της υδρογείου λόγω των κλιματικών συνθηκών, η χρήση των μικροσφαιριδίων πολυφαινολών θα μπορούσε να προσφέρει μία πλούσια και λειτουργική διαιτητική πηγή αντιοξειδωτικών, σε σχέση με τα συμβατικά διατροφικά συμπληρώματα. Αφετέρου, λόγω των επιπροσθέτων ευεργετικών ιδιοτήτων τους όσον αφορά σε παθολογικές καταστάσεις (άνοια, αυτοάνοσες νόσοι, υπερχοληστερολαιμία) ή νόσους (αθηροσκλήρωση, καρκίνος), θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν εναλλακτικά στο πλαίσιο μίας προσαρμοσμένης δίαιτας ή ενός θεραπευτικού σχήματος.

Επιπλέον, η κατανάλωση των πολυφαινολών μέσω αλκοολούχων παρασκευασμάτων, δεν επηρεάζει την αντιοξειδωτική τους δράση και όπως έχει ήδη δειχθεί, η παρουσία τους αναστρέφει τις επιπτώσεις της αιθανόλης, όταν κυμαίνεται σε φυσιολογικά επίπεδα (2-4 ποτήρια ημερησίως). Η αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα είναι εμφανής

ακόμη και 30 min μετά την κατανάλωση του αφρώδους οίνου. Το γεγονός αυτό προϋποθέτει την ταχεία απορρόφηση τόσο των μονομερών, όσο και των oligομερών φλαβονοειδών. Πράγματι, παρά την κρατούσα αντίληψη για την μικρή απορρόφηση των πολυφαινόλων και ειδικότερα των πολυμερών τους, οι Passamonti et al. έδειξαν ότι οι προανθοκυανίνες εμφανίζονται στο πλάσμα και τον εγκέφαλο, λίγα λεπτά μετά από ενδογαστρική χορήγηση εκχυλίσματος σταφυλιών (Passamonti et al., 2005). Οι πολυφαινόλες φαίνεται να διαπερνούν εύκολα τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, ενώ η παρουσία τους καθιστά τα τριχοειδή του εγκεφάλου περισσότερο ανθεκτικά στην υδρολυτική δράση των κολλαγενασών (Robert et al., 2001). Η άμεση απορρόφηση των πολυμερών αντιοξειδωτικών, θα μπορούσε να λειτουργήσει ευνοϊκά στην αντιμετώπιση του οξειδωτικού stress που παρατηρείται μεταξύ και πριν των γευμάτων (Ursini and Sevanian, 2002), σε αντίθεση με τα υπόλοιπα φλαβονοειδή που φαίνεται να απορροφώνται με υστέρηση από το λεπτό έντερο.

3.4. ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ.....	171
3.4.1. Διαθέσιμες μέθοδοι-εργαλεία.....	171
3.4.2. Παρατηρήσεις σε <i>in vitro</i> συστήματα.....	174
3.4.3. <i>Quercetin</i> (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone)	175
3.4.3.1. Φθορισμός.....	175
3.4.3.1.1. Η <i>quercetin</i> εμφανίζει συγκεκριμένες φθορίζουσες ιδιότητες σε κυτταρικό περιβάλλον.....	176
3.4.3.1.2. Αλληλεπιδράσεις της <i>quercetin</i> με νουκλεϊκά οξέα.....	178
3.4.3.1.3. Αλληλεπιδράσεις της <i>quercetin</i> με αλβουμίνη.....	181
3.4.3.1.4. Αλληλεπιδράσεις της <i>quercetin</i> με ακτίνη.....	182
3.4.3.1.5. Αλληλεπιδράσεις της <i>quercetin</i> με άλλες ενδοκυττάρειες πρωτεΐνες	183
3.4.3.2. Ενδοκύττωση	184
3.4.3.3. Εξωκύττωση	188
3.4.3.4. Πυρηνική μεταφορά	190
3.4.3.5. Μεταβολισμός.....	191
3.4.3.5. Υποκυτταρικός εντοπισμός	194

3.4. ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ

3.4.1. Διαθέσιμες μέθοδοι-εργαλεία

Τα φλαβονοειδή παρά τις εκτεταμένες υποκαταστάσεις που μπορεί να υποστούν, χαρακτηρίζονται όλα από την δομική τους ομοιότητα με το μητρικό μόριο φλαβόνης 2-φαινυλβενζοπυρόνη (2-phenyl benzopyrone). Λόγω του αρωματικού τους χαρακτήρα, η απομόνωση και η ταυτοποίησή τους γίνεται με αναλυτικές μεθόδους χρωματογραφίας, όπως αέριος χρωματογραφία (Gas chromatography, GC), υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης ανάστροφης φάσεως (reverse-phase High-Pressure Liquid Chromatography, HPLC) και τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (Capillary Electrophoresis, CE) σε συνδυασμό με την απορρόφηση των ουσιών στο υπεριώδες, φθορισμομετρία, ηλεκτροχημική ανίχνευση και φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry, MS) ή με μη χρωματογραφικές μεθόδους, όπως η Matrix-Assisted Laser Desorption Time-Of-Light Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS) και ανοσοϊστοχημικά πρωτόκολλα (reviewed in Prasain et al., 2004) Η φασματομετρία ροής ειδικότερα αποτελεί τον πλέον διαδεδομένο και αποδοτικό τρόπο χαρακτηρισμού των πολυφαινολών σε μείγματα, είτε αυτά προέρχονται από την πρωτογενή τους πηγή (φυτό), είτε εμπεριέχονται σε βιολογικά δείγματα (αίμα, ούρα, ιστοί) καθώς διαθέτει υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα και επιτρέπει την παράλληλη χρήση χρωματογραφικών τεχνικών. Βεβαίως, ο ποσοτικός και ποιοτικός χαρακτηρισμός των φλαβονοειδών και των μεταβολιτών τους σε βιολογικά δείγματα παρουσιάζει αρκετές δυσκολίες, αφενός λόγω της εξαιρετικά χαμηλής συγκεντρώσεώς τους, αφετέρου λόγω της πολύπλοκης συστάσεως του υποστρώματος. Επιπλέον, αρκετοί υποκατεστημένοι μεταβολίτες, όπως β-glucuronides και sulfates έχουν πολικό χαρακτήρα, άρα δεν είναι δυνατόν να εκχυλισθούν ή να κλασματοποιηθούν με κλασσικές μεθόδους. Νεώτερες μέθοδοι, όπως η κατακρήμνιση πρωτεϊνών, βοηθούν στην διάσωση τέτοιων μορίων. Κατά περίπτωση χρησιμοποιούνται οι παρακάτω μέθοδοι, τα πλεονεκτήματα των οποίων παρακάτω μεθόδων φαίνονται στον Πίνακα 3.4.1.:

- Αέριος χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (Gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)
- Ταχύς βομβαρδισμός με άτομα (Fast-Atom Bombardment, FAB) και φασματομετρία υγρής φάσης δευτερευόντων ιόντων (Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry, LSIMS)
- Ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό (ElectroSpray Ionization, ESI)-MS ή χημικός ψεκασμός υποβοηθούμενος από ατμοσφαιρική πίεση (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI)-MS
- Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry, CE-MS)
- Διέγερση με μονοχρωματική ακτινοβολία (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight-Mass Spectrometry, MALDI-TOF-MS) και

- Ανάλυση Fourier σε συνδυασμό με ιονικό συντονισμό (Fourier Transform-Ion Cyclotron Resonance-Mass Spectrometry, FT-ICR-MS).

Πίνακας 3.4.1. Κύριες μέθοδοι απομονώσεως και ταυτοποίησης πολυφαινολών.

Μέθοδος ιονισμού	Κύριες εφαρμογές	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
EI (Ιονισμός με ηλεκτρόνια)	Ποιοτικός και ποσοτικός χαρακτηρισμός μη γλυκοζυλιωμένων μορίων	Ευκολία στην περαιτέρω χρήση χρωματογραφίας ροής Μεγάλη ευαισθησία Ταυτοποίηση αγνώστων-νέων μορίων	Χρονοβόρος εκκύλιση και τροποποίηση (derivatization) κατά την δημιουργία πτητικών παραγώγων Χαμηλό όριο μάζας δυνατότητα Θερμική αποικοδόμηση Υψηλή κατάτμηση
FAB (Ταχύς βομβαρδισμός με άτομα)	Χαρακτηρισμός γλυκοζυλιωμένων φλαβονοειδών σε φυτικά εκχυλίσματα	Δυνατότητα ταυτοποίησης μορίων με μάζα έως 7000 Da Ελαφράς μορφής ιονισμός	Δημιουργία μη ανιχνεύσιμων ιόντων Χαμηλή ευαισθησία Απαραίτητη προϋπόθεση η διαλυτότητα των δειγμάτων στην μήτρα (matrix) Υψηλός θόρυβος
MALDI-TOF (Διέγερση με μονοχρωματική ακτινοβολία)	Χαρακτηρισμός μη γλυκοζυλιωμένων φλαβονοειδών, προανθοκυανινών και συμπυκνωμένων ταννινών	Υψηλό όριο μάζας Ανθεκτικότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων (mM) Ταχεία μέθοδος	Χαμηλή ευκρίνεια Υψηλός θόρυβος Αδυναμία ταυτοποίησης μικρών μορίων Αδυναμία ταυτοποίησης μορίων ευαίσθητων σε ακτινοβολία υψηλής ενέργειας
APCI (Χημικός ψεκασμός υποβοηθούμενος από ατμοσφαιρική πίεση)	Χαρακτηρισμός μη γλυκοζυλιωμένων φλαβονοειδών	Δυνατότητα ταυτοποίησης μορίων με μάζα έως 2000 Da Υψηλή ευαισθησία (femtomole) Δυνατότητα περαιτέρω χρήσεως HPLC/MS	Θερμική αποικοδόμηση
ESI (Ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό)	Ποιοτικός και ποσοτικός χαρακτηρισμός ευρέως φάσματος φλαβονοειδών	Υψηλό όριο μάζας Δυνατότητα περαιτέρω χρήσεως HPLC/MS Υψηλή ευκρίνεια σε πολλαπλό φορτίο (περίπου 2000) Υψηλή ευαισθησία (femtomole έως picomole)	Μικρή ανθεκτικότητα σε άλατα Συγκεχυμένη εμφάνιση πολλαπλών φορτίων σε μείγματα Δυσκολία ανάλυσης μη ιονιζόμενων μορίων Απουσία ή ελάχιστη ευκρίνεια σε ετερογενή μείγματα

Οι μέθοδοι ιονισμού είτε με την βοήθεια ηλεκτρισμού (ESI-MS) είτε με την βοήθεια πίεσεως (APCI-MS), καθώς και ο προσφάτως προτεινόμενος φωτοϊονισμός (Kaupilla et al., 2004) αποτελούν τον πιο αποτελεσματικό τρόπο ταυτοποίησης των πολυφαινολών, χωρίς να απαιτούν προηγούμενη τροποποίησή τους (derivatization) και διαθέτουν τουλάχιστον διπλάσια ευαισθησία σε σχέση με τις τεχνικές FAB και LSIMS. Επιπλέον, τα παραγόμενα ιόντα είναι αρκετά σταθερά, ενώ παρατηρείται μικρότερος θόρυβος, ιδιαίτερα στην περιοχή <300 amu, όπου ανιχνεύονται τα φλαβονοειδή, γεγονός που τις καθιστά τεχνικές εκλογής.

Επειδή ο ιονισμός καταστέλλεται όταν χρησιμοποιούνται συνήθεις διαλύτες του HPLC, όπως το τριφλουοροοξικό οξύ ή φωσφορικά άλατα (Na_2PO_4 ή K_2PO_4), εναλλακτικά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί φορμικό οξύ, οξικό αμμώνιο ή μυρμηγκικό αμμώνιο. Και με τις δύο τεχνικές ιοντισμού, η ανίχνευση των φλαβονοειδών μπορεί να γίνει με θετικό ή αρνητικό πλαίσιο (mode), αν και τα περισσότερα φλαβονοειδή ανιχνεύονται ως αρνητικά ιόντα. Περαιτέρω χρήση φασματομετρίας επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό μιας ουσίας, ενώ το συνολικό φάσμα δίνει πληροφορίες για την λεπτομερή χημική δομή της. Ειδικότερα, για τον ποσοτικό προσδιορισμό μιας ενώσεως, αξιοποιείται η μέθοδος multiple reaction ion monitoring (MRM), συγκρίνοντας σε σύνθετα μείγματα τα αρχικά ιόντα με τα προϊόντα του και υπολογίζεται ο λόγος των κορυφών των αναλυτών σε σχέση με έναν εσωτερικό μάρτυρα.

Η χρήση διαφορετικών μεθόδων ιοντισμού, διαλυτών και θετικού ή αρνητικού πλαισίου αποκλείει σε αρκετές περιπτώσεις την ανίχνευση υποκατεστημένων μεταβολιτών. Η χρήση παραδείγματος χάριν LC-ESI-MS και collision induced dissociation (C/D) επιτρέπει τον δομικό χαρακτηρισμό ακυλιωμένων O-glycosides των φλαβονολών (Cuyckens et al., 2003). Η χρήση επίσης ζεύγους φασματογράφων μάζας (Tandem mass spectrometric methods) βοηθά στην διάκριση και τον χαρακτηρισμό των διασακχαρικών δεσμών των ισομερών O-diglycosides εξοζών και πεντοζών (Cuyckens et al., 2002). Ακόμη, η μέθοδος ESI-MS/MS βοηθά στην ανίχνευση των μεθυλιωμένων ισομερών των φλαβονοειδών, όπως της glycetin και της biochanin A (Justesen, 2001) Στην προσπάθειά τους να βελτιστοποιήσουν την απόδοση των μεθόδων οι Cuyckens and Claeys αναφέρουν ότι η χρήση όξινης μεθανόλης (1% οξικό οξύ) βοηθά στην ανίχνευση θετικά φορτισμένων ιόντων με ESI-MS, ενώ η κινητή φάση acetonitrile/ H_2O /0,5% μυρμηγκικό οξύ προσδίδει μεγαλύτερη ευαισθησία στην τεχνική LC/ESI MS/UV-DAD (Cuyckens et al., 2002). Στην ανίχνευση αρνητικών ιόντων, η οποία ενδείκνυται στην ανάλυση των φλαβονοειδών σε βιολογικά δείγματα, μεγαλύτερη ευαισθησία παρατηρείται παρουσία 0,1% μυρμηγκικού οξέος. Εντούτοις, σε αρνητικά φορτισμένα ιόντα μη υποκατεστημένων φλαβονών, φλαβονολών και φλαβανονών έχει αναφερθεί η απώλεια ομάδων CO , CO_2 , και C_3O_2 (Fabre et al., 2001). Τέλος, η ανίχνευση C-glycosides, όπου η σύνδεση του μορίου του σακχάρου είναι ανθεκτική σε όξινο περιβάλλον, είναι εφικτή είτε σε θετικό ή αρνητικό πλαίσιο (Waridel et al., 2001).

Οι Spencer et al. μελέτησαν με ESI-MS-MS την βιοδιαθεσιμότητα της quercetin και των *in vivo* μεταβολιτών της 3'-O-β-methyl quercetin, 4'-O-methyl quercetin, και quercetin 7-O-β-d-glucuronide σε ινοβλάστες δέρματος (Spencer et al., 2003). Στην περίπτωση της quercetin ανιχνεύθηκαν δύο νέοι μεταβολίτες: ένα 2' σύμπλοκο με γλουταθειόνη και μία κινόνη ή μεθιδίο της. Παρόμοια προϊόντα ταυτοποιήθηκαν όταν τα κύτταρα επωάστηκαν με 3'-O-methyl quercetin. Παρουσία 4'-O-methyl quercetin παρατηρήθηκε ο σχηματισμός μόνο οξειδωτικών μεταβολιτών, ενώ οι ινοβλάστες δεν ενδοκύττωσαν την quercetin 7-O-β-d-glucuronide. Η παραγωγή 3'-O-methyl quercetin (ή αλλιώς isorhamnetin, m/z 317 σε θετικό mode ESI) έχει δειχθεί και σε κύτταρα φακού (Cornish et al., 2002) και φαίνεται να τα προστατεύει από θόλωση και κατ'επέκταση να προλαμβάνει την εμφάνιση καταρράκτη. Στο ίδιο κυτταρικό σύστημα που χρησιμοποιήσαμε (HepG2) προκειμένου να μελετήσουμε την

βιοκινητική της quercetin, οι O'Leary et al. έδειξαν ότι υφίσταται μεθυλίωση του κατεχολικού δακτυλίου, ενώ τα γλυκοσυλιωμένα παράγωγά της καταρχήν υδρολύονται από τις ενδογενείς β-γλυκορουινιδάσες και κατόπιν μετατρέπονται σε quercetin-3'-sulfate (O'Leary et al., 2003). Οι μεταβολίτες αυτοί ανιχνεύθηκαν με LC-ESI-MS στα 303 (quercetin), 317 (3'-O-methyl quercetin), 383 (quercetin-3'-sulfate), 397 (methylquercetin sulfate), 479 (quercetin-7-glucuronide) και 493 (3'-methylquercetin-7-glucuronide ή 4'-methylquercetin-7-glucuronide) m/z. Εκτός από τους παραπάνω μεταβολίτες, έχουν αναφερθεί και άλλοι *in vivo* μεταβολίτες της quercetin, όπως 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid (167 [M-H]⁻), m-hydroxyphenylacetic acid, (151 [M-H]⁻) και 4-hydroxy-3-methoxyphenyl acetic acid (181 [M-H]⁻) (Gross et al., 1996).

Οι Moridani et al χρησιμοποιώντας την τεχνική ESI-MS σε συνδυασμό με φασματομετρία UV-vis έδειξαν ότι η φλαβανόνη catechin οξειδώνεται ενζυματικά από τις τυροσινάσες, παρουσία GSH, ενώ σχηματίζονται επίσης και σύμπλοκες ενώσεις οι οποίες περιέχουν από 1-3 μόρια γλουταθειόνης (Moridani et al., 2001). Οι Hong et al. μελέτησαν την πρόσληψη της EGCG στην σειρά αδενοκαρκινώματος παχέος εντέρου HT-29 με την βοήθεια LC-MS-MS. Το φλαβονοειδές δεν είναι σταθερό σε αλκαλικό ή ουδέτερο περιβάλλον, με αποτέλεσμα να οξειδώνεται ή να διμερίζεται. Η πρόσληψή του από τα κύτταρα ακολουθείται από τον σχηματισμό μεθυλιωμένων και γλυκοσυλιωμένων παραγώγων (Hong et al., 2002).

3.4.2. Παρατηρήσεις σε *in vitro* συστήματα

Στο προηγούμενο κεφάλαιο δείξαμε ότι οι πολυφαινόλες ρυθμίζουν την αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται μετά από βραχύβια ή μακροχρόνια κατανάλωσή τους και μπορεί να μετρηθεί ακόμη και 30 min από την λήψη τους, γεγονός που προϋποθέτει την άμεση απορρόφησή τους.

Όπως αναφέραμε, μόνο ένα μικρό μέρος των ελεύθερων (βιολογικά ενεργών) πολυφαινολών περνάει στην κυκλοφορία· περίπου 75% απεκκρίνεται (Walle et al., 2001), (Wenzel and Somoza, 2005). Οι πολυφαινόλες εισέρχονται στην κυκλοφορία μέσω των λαχνών του πεπτικού συστήματος, ωστόσο η παρουσία ή προσθήκη υποκαταστατών ρυθμίζει την ακριβή θέση προσρόφησης· π.χ. η quercetin και τα γλυκοσυλιωμένα παράγωγά της προσροφώνται από το δωδεκαδάκτυλο, ενώ η quercetin-3-rutinoside από το ορθό (Erlund, 2004). Τέλος, μετά την απορρόφησή τους φαίνεται ότι προσεγγίζουν καταρχήν τα ενδοθήλια (Schramm et al., 1999).

Για την μελέτη της απορρόφησης των πολυφαινολών σε κυτταρικό επίπεδο έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς δύο κυτταρικές σειρές: η Caco-2 (κακοήθη κύτταρα εντέρου, πολικά) και HepG2 (καρκινικά κύτταρα ήπατος, μη πολικά), καθώς αντιστοιχούν στους κύριους τελεστές του μεταβολισμού των πολυφαινολών στο ανθρώπινο σώμα. Τα Caco-2

έχει δειχθεί ότι είναι ικανά να συσσωρεύουν την quercetin -πιο αποτελεσματικά από την quercetin 3-glucoside- και να την υδρολύουν (Boyer et al., 2004). Ανάλογα παρατηρήσεις έχουν γίνει και στα HepG2 (Boulton et al., 1999), όπου βραχυπρόθεσμα παρατηρείται η σύνθεση ενός Ο-μεθυλιωμένου μεταβολίτη (isorhamnetin), ενώ μετά από 8 h η quercetin υφίσταται οξειδωτική αποικοδόμηση σε καρβοξυλικά οξέα, κυρίως protocatechuic acid. Ακόμη στα ηπατοκύτταρα έχει δειχθεί και η δημιουργία πολυμερών προϊόντων. Αντίθετα, σε ανθρώπινα κύτταρα λευχαιμίας (HL-60) παρατηρήθηκε μόνο σύνθεση γλυκοσυλιωμένων παραγώγων (Ludwig-Muller et al., 2005). Επίσης, σε απομονωμένα μικροσώματα ηπατοκυττάρων, έχει δειχθεί ότι τα κυττοχρώματα επάγουν επιλεκτικά την οξείδωση των πολυφαινολών, όπως του στιλβενίου trans-resveratrol σε piceatannol και tetrahydroxystilbene M1 (Piver et al., 2004), αλλά όχι των φλαβονών arigenin και chrysin, οι οποίες υφίστανται κυρίως σουλφο- ή γλυκοζυλίωση (Galijatovic et al., 1999).

Αν και αρκετές μελέτες σε ζώα δείχνουν την απορρόφηση των πολυφαινολών τουλάχιστον 1 h μετά την κατανάλωσή τους, σε όλα τα κυτταρικά συστήματα η απορρόφηση και η διακυτταρική μεταφορά των πολυφαινολών αναφέρεται ότι διαρκεί πολύ περισσότερο (2-16 h).

Στην παρούσα μελέτη εξετάσαμε κατά πόσον οι πολυφαινόλες είναι δυνατόν να ενδοκυττώνονται και να μεταβολίζονται από κύτταρα ενδοθηλιακού τύπου (ήπατος, μαστού και προστάτη), σε συμφωνία με τα δεδομένα από τις μελέτες βιοδιαθεσιμότητας.

3.4.3. Quercetin (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone)

3.4.3.1. Φθορισμός

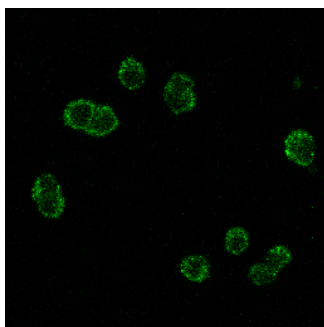
Μέχρι σήμερα, για την μελέτη της quercetin και των μεταβολιτών της σε κυτταρικά συστήματα χρησιμοποιούνται αναλυτικές μέθοδοι (HPLC-NMR) (Moon et al., 2000; Spencer et al., 2003) ή ραδιοσημασμένα ανάλογα (Graf et al., 2005; Kaldas et al., 2005; Mullen et al., 2002; Ueno et al., 1983; Walle et al., 2003). Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήσαμε τον φθορισμό της φλαβονόλης, προκειμένου να μελετήσουμε τον εντοπισμό και την κινητική μεταφοράς της σε ενδοθηλιακά κύτταρα.

Ελάχιστες μελέτες έχουν αξιοποιήσει τις φθορίζουσες ιδιότητες των φλαβονοειδών με σκοπό τον ενδοκυττάριο εντοπισμό τους. Οι Lancon et al. αναφέρουν ότι η resveratrol απορροφάται από τα ηπατοκύτταρα (HepG2), όταν αυτά επωάζονται για 2 h με 30 μM resveratrol σε PBS (Lancon et al., 2004). Η ενδοκύττωσή της θεωρήθηκε ότι επιτελείται μέσω της πρόσδεσής της στην αλβουμίνη, και κατ' επέκταση της ενδοκύττωσης του συμπλόκου, χωρίς να αποκλείεται όμως η παθητική διάχυση του στιλβενίου. Ανάλογα, οι Kuo SM et al. (Kuo, 1996) και Gutzeit et al. (Gutzeit et al., 2004) έδειξαν ότι η φλαβονόλη quercetin απορροφάται από κύτταρα εντέρου Caco-2 και έμβρυα *Drosophila* αντιστοίχως.

Και οι δύο ομάδες αναφέρουν ότι η quercetin συσσωρεύεται στον πυρήνα, και εντοπίζεται είτε διάχυτη είτε σε διακριτές υποκυτταρικές δομές. Η Kuo SM έδειξε την απορρόφηση της φλαβονόλης σε συγκεντρώσεις 10-100μΜ, μετά από επώαση των κυττάρων για 40 min σε διάλυμα HANK's, ενώ παρατήρησε ότι η προσρόφηση ήταν δυνατή και σε κύτταρα προμονιμοποιημένα με μεθανόλη. Οι Gutzeit et al., παρατήρησαν την συσσώρευση της quercetin μετά από εμβάπτιση των εμβρύων σε διάλυμα quercetin ή myricetin 100 μΜ για 10 min. Καθώς η φλαβονόλη εντοπίστηκε και στους συνοδούς δακτυλιοειδείς αυλούς, οι οποίοι υποστηρίζουν τροφικά τα γονιμοποιημένα ωοκύτταρα, προτάθηκε ότι προσδένεται στην ακτίνη. Η ανίχνευση του φθορισμού στις παραπάνω μελέτες έγινε με συμβατικό μικροσκόπιο φθορισμού, μετά από διέγερση των κυττάρων με υπεριώδη ακτινοβολία και συλλογή του εκπεμπόμενου σήματος με κόκκινο φίλτρο ή σε συνεστιακό μικροσκόπιο στα 345nm_{ex} /420nm_{em}. Τα φλαβονοειδή rutin και genistein βρέθηκε επίσης να φθορίζουν στις ίδιες συνθήκες, το φθορίζον σήμα όμως είχε ασθενέστερη ένταση.

3.4.3.1.1. Η quercetin εμφανίζει συγκεκριμένες φθορίζουσες ιδιότητες σε κυτταρικό περιβάλλον

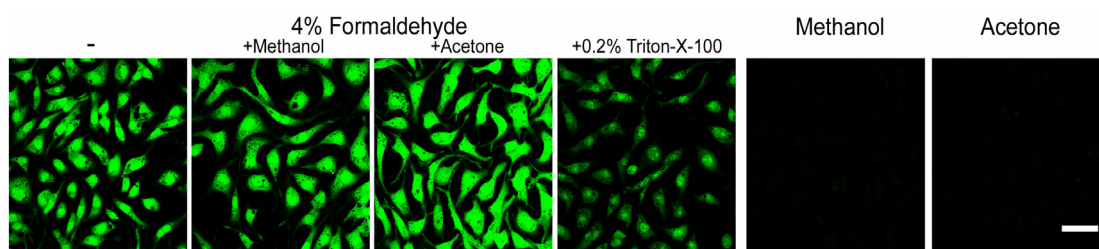
Εξετάσαμε καταρχήν, αν κάποιο από τα εκχυλίσματα που χρησιμοποιήθηκαν στις μελέτες βιοδιαθεσιμότητας, έχει την ικανότητα να φθορίζει μετά την ενδοκύττωσή του από ενδοθηλιακά κύτταρα. Βρέθηκε, ότι επώαση με εκχύλισμα αφρώδους οίνου προσδίδει στα κύτταρα κίτρινο-πράσινο χρώμα μετά την έκθεση στο υπεριώδες σε συμβατικό μικροσκόπιο φθορισμού (Εικ. 3.4.1.).



Εικόνα 3.4.1. Επώαση κυττάρων PC12 παρουσία πυκνού (1 mM) διαλύματος πολυφαινολών αφρώδους οίνου για 1 h.

Επειδή, το σήμα ήταν εξαιρετικά ασθενές, επώασαμε κατόπιν τα κύτταρα με καθαρές πολυφαινολικές ουσίες (στιλβένια, φλαβονοειδή και προανθοκυανίνες). Μεταξύ όλων των ουσιών, μόνο η φλαβονόλη quercetin προκάλεσε φθορίζουσα χρώση των κυττάρων (3 μΜ σε διάλυμα PBS για 30 min). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.4.2., η χρώση είναι ανιχνεύσιμη με την βοήθεια μονοχρωματικής διέγερσης στα 488nm με Laser Ar/Kr και σάρωση του εκπεμπόμενου σήματος στα 500-540 nm, με τη βοήθεια συνεστιακού μικροσκοπίου.

Ο φθορισμός διατηρείται μετά την μονιμοποίηση των κυττάρων με κλασσικούς μονιμοποιητές πρωτεϊνών, όπως η φορμαλδεΰδη. Αντιθέτως, μονιμοποίηση με πολικούς διαλύτες, όπως η μεθανόλη και η ακετόνη, έχει ως αποτέλεσμα την απόσβεση του σήματος, λόγω έκλυσης του φλαβονοειδούς. Πρέπει να σημειωθεί ότι όταν οι πολικοί διαλύτες εφαρμόζονται μετά την μονιμοποίηση με φορμαλδεΰδη, δεν παρατηρείται απώλεια, αλλά

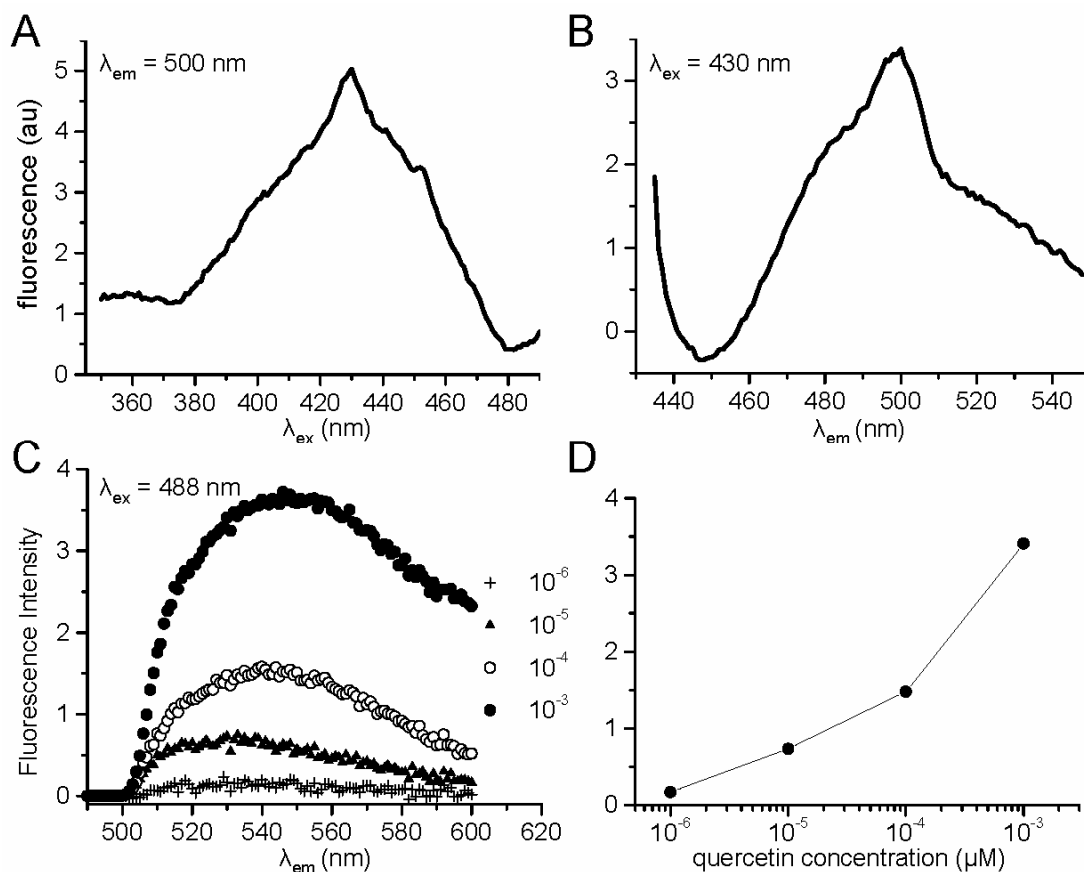


Εικόνα 3.4.2. Ανίχνευση της quercetin με συνεστιακή μικροσκοπία ως φθορίζων σήμα στα 488 nm_{ex}/500-540 nm_{em}, μετά από επώαση κυττάρων HepG2 με φλαβονόλη (3 μM σε PBS) για 30 min. Εναλλακτικές συνθήκες μονιμοποίησης έχουν ως αποτέλεσμα την απόσβεση ή διάλυση του φθορισμού (scale bar=25 μM).

διάχυση του φθορισμού. Επώαση επίσης με το μη ιοντικό απορρυπαντικό Triton-X-100, προκαλεί «καθαρισμό» του σήματος. Οι παρατηρήσεις αυτές μας οδήγησαν στο συμπέρασμα, ότι η quercetin, κατά την ενδοκύττωσή της αλληλεπιδρά μέσω ιοντικών και αντιστρεπτών δεσμών με συστατικά του κυττάρου.

Πράγματι, επώαση των κυττάρων με quercetin έχει ως αποτέλεσμα την ανίχνευση σήματος στην περιοχή 500-540 nm, μετά από μονοχρωματική διέγερση στα 488 nm, όμως τα δεδομένα αυτά δεν ταυτίζονται με τις φθορίζουσες ιδιότητες της φλαβονόλης σε διάλυμα. Το φάσμα απορρόφησης της quercetin (3 μM σε PBS) αντιστοιχεί σε δύο κορυφές στα 310 nm και 335 nm. Περαιτέρω μονοχρωματική ανάλυση της φλαβονόλης με φθορισμόμετρο έδειξε ότι διεγείρεται ιδανικά στα 430 nm και εκπέμπει στα 500 nm (Εικ. 3.4.3., A&B). Συμπεράναμε, πως η μετατόπιση του φθορίζοντος σήματος σε κυτταρικό περιβάλλον οφείλεται πιθανόν σε φαινόμενα μεταφοράς ενέργειας, καθώς η φλαβονόλη συγκεντρώνεται στα κύτταρα, ή στην πρόσδεσή της σε μακρομόρια, όπως έχει ήδη δειχθεί (Solimani, 1996); (Sengupta and Sengupta, 2002). Εντούτοις, συνεπώαση της quercetin με νουκλεϊκά οξέα ή αλβουμίνη, είχε ως αποτέλεσμα απόσβεση του σήματος. Τουναντίον, συνεπώασή της με κυτταρικό εκχύλισμα ηπατοκυττάρων, σε ουδέτερο pH, είχε ως αποτέλεσμα την ενίσχυση του εκπεμπόμενου φθορισμού στην περιοχή 500-600 nm, μετά από διέγερση στα 488 nm (Εικ. 3.4.3.C&D). Η εκπομπή του φθορισμού ήταν εκθετικά ανάλογη της συγκέντρωσης της quercetin (=δοσοεξαρτώμενη).

Συνεπώς, ο φθορισμός της φλαβονόλης (488 nm_{ex}/500-540 nm_{em}) απαντάται αποκλειστικά σε ενδοκυτταρικό περιβάλλον και εμπλέκει την αλληλεπίδρασή της με μακρομόρια. Η ιδιότητα αυτή αποτελεί ένα εξαιρετικό εργαλείο, το οποίο αξιοποιήσαμε στην συνέχεια με σκοπό τον υποκυτταρικό εντοπισμό της φλαβονόλης και την μελέτη της κινητικής της.



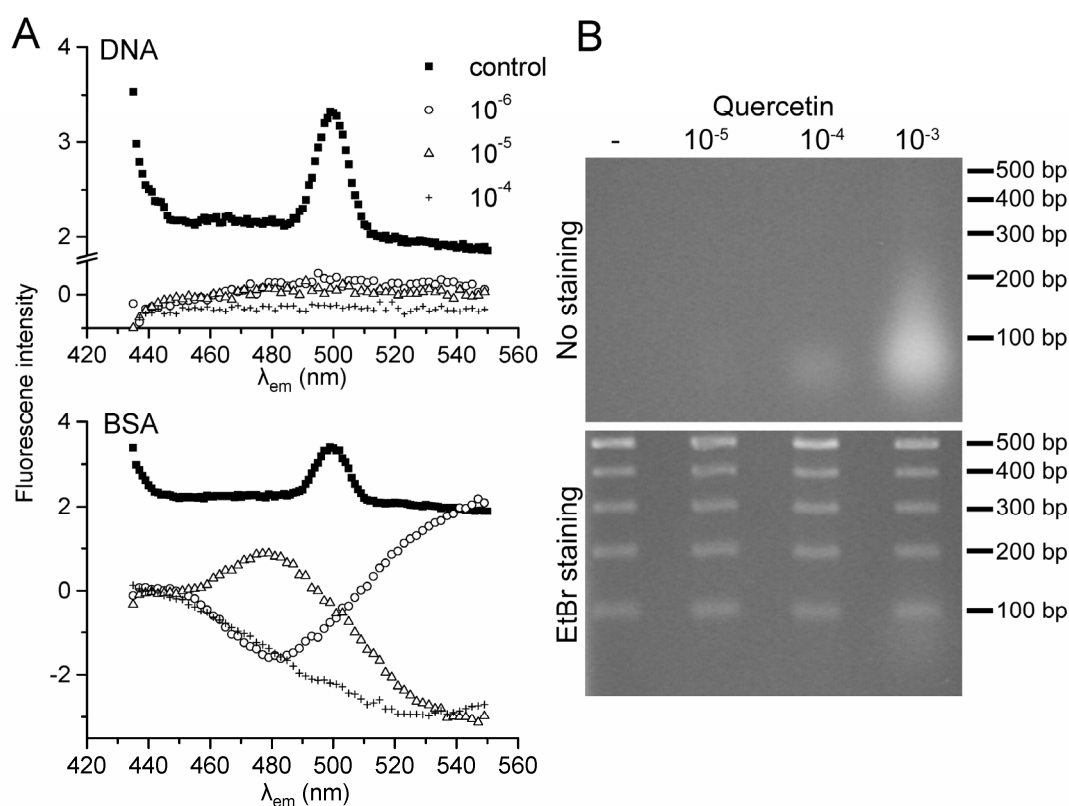
Εικόνα 3.4.3. Μονοχρωματική ανάλυση του φθορισμού της quercetin. Η φλαβονόλη διεγείρεται ιδανικά στα 430 nm (A) και εκπέμπει στα 500 nm (B). Συνεπώαση με εκκύλισμα κυττάρων HepG2 έχει ως αποτέλεσμα την μετατόπιση του φθορισμού, όπως φαίνεται στα φάσματα εκπομπής (C, $\lambda_{ex} = 488$ nm). Τα φάσματα έχουν διορθωθεί με βάση τις καμπύλες των αντιστοίχων αραιώσεων quercetin. Η ένταση του σήματος φθορισμού στα 488 nm_{ex}/530 nm_{em} στο μείγμα quercetin-κυτταρικού εκκυλίσματος είναι ανάλογη των συγκεντρώσεων φλαβονόλης (D).

3.4.3.1.2. Αλληλεπιδράσεις της quercetin με νουκλεϊκά οξέα

Οι πρώτες ενδείξεις σχετικά με την αλληλεπίδραση quercetin-DNA παρουσιάστηκαν από τον Alvi et al., (Alvi et al., 1986)· η φλαβονόλη προσωρινά βρέθηκε να σταθεροποιεί την δευτεροταγή δομή του DNA, εντούτοις παρατεταμένη έκθεση οδήγησε σε εκτεταμένη κατάτμηση της διπλής έλικας. Εκτός από την quercetin και η curcumin έχει δείχθει να αλληλεπιδρά με μονόκλωνο και δίκλωνο DNA (Rahman et al., 1990; Zaidi and Hadi, 1992), επάγοντας σχάση των αλυσίδων του, μέσω του οξειδωτικού ζεύγους Cu(II)-Cu(I) (Annapraj et al., 2005). Η quercetin βρέθηκε να αλληλεπιδρά επίσης με λανθανίδες (σπάνιες γαίες) (Zhou et al., 2001), απορρυθμίζοντας την σταθερότητα των νουκλεϊκών οξέων· στο φαινόμενο αυτό αποδόθηκε η αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε αρκετές καρκινικές σειρές. Η πρόσδεση της quercetin στο DNA ανιχνεύθηκε ως μετατόπιση της εκπομπής

φθορισμού στα 395 nm (Ahmed et al., 1994), ενώ η αλληλεπίδραση της φλαβονόλης με ιόντα μετάλλων επάγει την εκπομπή φθορισμού στα 400-600 nm (Chang et al., 2003).

Ελέγξαμε αν η συνεπάωση της quercetin με νουκλεϊκά οξέα, επηρεάζει τις φθορίζουσες ιδιότητές της. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.4.4., τόσο η φλαβονόλη, όσο και τα νουκλεϊκά οξέα εκπέμπουν στα 500nm (430nm_{ex}), τα ιδανικά *settings* του φλαβονοειδούς σε διάλυμα φωσφορικών PBS. Εντούτοις, σε μείγματά τους, η παρουσία της quercetin φαίνεται να εξουδετερώνει το εκπεμπόμενο φθορίζον σήμα. Η δράση αυτή ήταν ανεξάρτητη της φύσεως των νουκλεϊκών οξέων (κυκλικά ή γραμμικά). Αν και τα δεδομένα αυτά δεν αποκλείουν πιθανή αλληλεπίδραση των μορίων, δεν συνάδουν με τις παρατηρήσεις μικροσκοπίας.



Εικόνα 3.4.4. (Α) Φάσμα εκπομπής μειγμάτων quercetin-DNA και quercetin-αλβουμίνης, $\lambda_{\text{ex}} = 430 \text{ nm}$. (Β) Ηλεκτροφόρηση των μειγμάτων quercetin-DNA σε πηκτή αгарόζης. Η φλαβονόλη μετατοπίζεται στο μέτωπο των δειγμάτων και δεν κατακρατείται από τα μόρια του DNA. Επώαση εκ των υστέρων με την χρωστική EtBr δεν αναστέλλει την χρώση των νουκλεϊκών οξέων, καταδεικνύοντας ότι η πιθανή πρόσδεση ελαχίστων μορίων quercetin είναι αντιστρεπτή.

Καθώς το βρωμιούχο εθίδιο (EtBr) μπορεί να εκτοπίζει την quercetin από τα σύμπλοκα με DNA, θεωρήθηκε ότι η φλαβονόλη δρα ως παρενθέτης (intercalator) (Ahmed et al., 1994). Συγκριτική μελέτη της quercetin (υδρόφοβη) και του «μη επίπεδου» (non-planar) υδρόφιλου αναλόγου της dihydroquercetin έδειξε ότι η αλληλεπίδραση με το DNA οφείλεται στον υδρόφοβο πυρήνα του μορίου, ο οποίος επιτρέπει στην ουσία να διαπερνά την διπλή έλικα και να τοποθετείται παράλληλα με τις παρακαίμενες βάσεις αζώτου (Solimani, 1996).

Εντούτοις, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η πρόσδεση των φλαβονοειδών quercetin, morin και rutin οφείλεται σε ηλεκτροστατικούς δεσμούς (Kang et al., 2004) και ευνοείται σε υψηλές συγκεντρώσεις DNA (Solimani, 1997). Παρά την διάσταση απόψεων σχετικά με την φύση των δεσμών πολυφαινολών και DNA, φαίνεται ότι τα φλαβονοειδή καλύπτουν την πολυανιονική επιφάνεια των πυρηνικών οξέων, χωρίς ωστόσο να επηρεάζουν την ευκαμψία και την υδροδυναμική συμπεριφορά του μορίου, γεγονός το οποίο τους προσδίδει μάλλον προστατευτικό ρόλο. Συγκριτική μελέτη έδειξε επίσης ότι οι quercetin, kaempferol και delphinidin προσδένονται ασθενώς στην αδενίνη και την γουανίνη (πρωτεύουσα αύλακα) και την θυμίνη (δευτερεύουσα αύλακα), όπως επίσης και στις φωσφορικές ομάδες του σκελετού του DNA. Η προανθοκυανίνη delphinidin, η οποία είναι θετικά φορτισμένη, προωθεί αποτελεσματικότερα την σταθερότητα της διπλής έλικας, σε σχέση με τις quercetin και kaempferol, ενώ προκαλεί μερική μετάπτωση από β-έλασμα σε α-έλικα (Kanakakis et al., 2005). Η παρουσία β-κατεχολικού δακτυλίου και η απουσία σακχάρων υποκαταστατών στις σύμπλοκες πολυφαινόλες ενισχύουν περαιτέρω αυτή την δράση (Mas et al., 2000). Αντίθετα, η curcumin προσδένεται μόνο στην δευτερεύουσα αύλακα, ανάλογα με το pH και τις συγκεντρώσεις αλάτων (Zsila et al., 2004). Η baicalein βρέθηκε επίσης να παρεμβάλλεται στην διπλή έλικα, με αποτέλεσμα την δημιουργία μη αντιστρεπτών δεσμών μεταξύ των αλυσίδων του DNA (Rossi et al., 2001). Ακόμη, οι resveratrol και genistein είναι ικανές να παρεμβάλλονται στις βάσεις και τις φωσφορικές ομάδες του DNA και του RNA (Usha et al., 2005)). Τέλος, επώαση κυττάρων HepG2 and Caco-2 με ραδιενεργό quercetin, έδειξε ότι η πρόσδεση της φλαβονόλης στο DNA είναι μη αντιστρεπτή (Walle et al., 2003).

Προκειμένου να ελέγξουμε αν η φλαβανόλη λειτουργεί ως παρενθέτης (intercalator), την συνεπώασαμε με νουκλεϊκά οξέα και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αгарόζης (Εικ. 3.4.4.B). Η quercetin φαίνεται να μετατοπίζεται κατά μήκος του ηλεκτρικού πεδίου, στην ίδια φορά με τα νουκλεϊκά οξέα και ταχύτητα μεγαλύτερη από αυτή των μορίων του μάρτυρα (<100bp). Ανιχνεύεται ως μία διάχυτη κηλίδα στο μέτωπο των δειγμάτων μετά από παρατήρηση στο υπεριώδες, ενώ δεν παρατηρείται καθόλου σήμανση των νουκλεϊκών οξέων. Ακολούθησε χρώση της πηκτής με EtBr· η εφαρμογή διαβαθμισμένης συγκεντρώσεως φλαβονοειδούς, εφόσον προτάθηκε ότι συμπεριφέρεται ως παρενθέτης, θα έπρεπε να προκαλέσει ανάλογη προοδευτική αναστολή της χρώσης του DNA από το EtBr. Αντιθέτως, αναδείχθηκαν οι ζώνες του μάρτυρα, ενώ παράλληλα παρατηρήθηκε έκλυση της quercetin από την πηκτή. Οι θέσεις όπου ανιχνεύθηκε η φλαβανόλη δεν καλύφθηκαν από μόρια EtBr. Κατά συνέπεια, ο «διαχωρισμός» της quercetin στην πηκτή οφείλεται στις ηλεκτροχημικές της ιδιότητες και όχι στην αλληλεπίδραση με νουκλεϊκά οξέα.

Πρέπει να επισημάνουμε ότι το ιωδιούχο προπίδιο (ανάλογο του EtBr), το οποίο χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα μικροσκοπίας, με σκοπό την χρώση των πυρήνων (Εικ. 3.4.13-14.), δεν έχει επίσης την ιδιότητα να εκτοπίζει ή να εκτοπίζεται από την quercetin.

Καθώς η πλειοψηφία των πειραμάτων, που συσχετίζουν την αντικαρκινική δράση της quercetin με την ικανότητά της να προσδένεται στα νουκλεϊκά οξέα και να υποβοηθά την οξειδωτική τους αποικοδόμηση, έχουν πραγματοποιηθεί σε διάλυμα, δεν υπάρχει άμμος παραλληλισμός με τις δράσεις σε κυτταρικά συστήματα. Πράγματι, στα HepG2 η quercetin προλαμβάνει την κατάτμηση του DNA, καταδεικνύοντας ότι η αντιοξειδωτική της δράση υπερβαίνει την προοξειδωτική της σε κυτταρικά συστήματα (Musonda and Chipman, 1998).

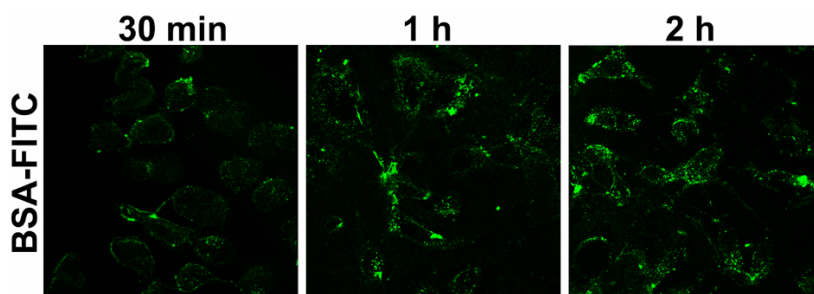
3.4.3.1.3. Αλληλεπιδράσεις της quercetin με αλβουμίνη

Οι πολυφαινόλες ανιχνεύονται στο πλάσμα κυρίως ως σύμπλοκα με την αλβουμίνη. Η συγγένειά τους κυμαίνεται σε millimolar επίπεδα· οι φλαβόνες και οι φλαβονόλες έχουν την μεγαλύτερη συγγένεια (Dufour and Dangles, 2005) ενώ η προσθήκη υποκαταστατών, όπως η σουλφο- και η γλυκοζυλίωση μείωνουν κατά μία τουλάχιστον τάξη μεγέθους την δυνατότητα πρόσδεσης. Μεταξύ των πολυφαινολών, ισχυρή συγγένεια εμφανίζει η quercetin, η πρόσδεση της οποίας επάγει την εκπομπή φθορισμού στα 538 nm_{em} / 295 nm_{ex} (Sengupta and Sengupta, 2002). Ανάλυση με FRET και συναγωνισμός με γνωστούς προσδέτες, οι οποίοι αλληλεπιδρούν με διαφορετικές θέσεις του μορίου της αλβουμίνης έδειξαν ότι η quercetin προσδένεται κυρίως στην τρυπτοφάνη 214 της HSA (subdomain IIA) (Dufour and Dangles, 2005), χωρίς αυτό να αποκλείει την αλληλεπίδραση με άλλες θέσεις· διαφορετική συγγένεια έδειξε επίσης η φλαβονόλη για αντίστοιχες θέσεις στην ανθρώπινη και την βόεια αλβουμίνη. Κινητική κορεσμού έδειξε επίσης ότι τα σύμπλοκα είναι ευαίσθητα στο pH και είναι δυνατό να ανιχνευθούν στα 530-550 nm_{em} / 485 nm_{ex}. Η απόσβεση του φθορισμού της τρυπτοφάνης κατέδειξε ότι η αλληλεπίδραση δεν μεταβάλλει την στερεοχημεία της αλβουμίνης και οφείλεται στην ανάπτυξη δεσμών υδρογόνου, ιοντικών και υδρόφοβων δυνάμεων (Paradopolou et al., 2005). Οι Kitson et al. έδειξαν ότι σε ουδέτερο περιβάλλον τα σύμπλοκα quercetin-αλβουμίνης ανιχνεύονται στα 425 nm, ενώ η αύξηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης παρεμποδίζει τον σχηματισμό του συμπλόκου (Kitson, 2004). Κατ'αναλογία με τις αλληλεπιδράσεις τους με το DNA, οι πολυφαινόλες επάγουν αποικοδόμηση της αλβουμίνης, παρουσία μετάλλων (Ahmed et al., 1994). Μόνο οι οξειδωμένες μορφές έχουν την ικανότητα μη αντιστρεπτής πρόσδεσης, είτε σε κυτταρικά εκχυλίσματα, είτε σε απομονωμένα συστήματα, καθώς το φαινόμενο εξασθενεί παρουσία ανηγμένης L-γλουταθειόνης (Kaldas et al., 2005).

Προκειμένου να διαπιστώσουμε την συμβολή των παραπάνω αλληλεπιδράσεων στον φθορισμό της φλαβονόλης, συνεπώασαμε την quercetin με καθαρή αλβουμίνη βοός (fraction V). Όπως και στην περίπτωση του DNA, στα settings στα οποία η φλαβονόλη φθορίζει, παρατηρείται απόσβεση του φθορισμού (Εικ. 3.4.4.A). Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή του φθορισμού στα 488 nm_{ex}/500-540 nm_{em}, όπου μελετήθηκε η πρόσληψη της quercetin με την βοήθεια μικροσκοπίας.

Η πρόσδεση των φλαβονοειδών στην αλβουμίνη φαίνεται να παρεμποδίζει την απορρόφησή τους (Boulton et al., 1998). Για τον λόγο αυτό, ελέγξαμε κατά πόσον η παρουσία της

αλβουμίνης επηρεάζει τον ενδοκυττάριο φθορισμό. Συνεπώαση ζωντανών κυττάρων με διάλυμα quercetin (3 μM σε PBS για διάστημα μέχρι 1h) και ίση έως δεκαπλάσια συγκέντρωση αλβουμίνης, είχε ως αποτέλεσμα την ελάττωση του ενδοκυττάρου σήματος quercetin: το σήμα ήταν μη ανιχνεύσιμο κατά την διάρκεια των πρώτων 30 min. Η αλβουμίνη, δεν ενδοκυττώνεται με την ίδια ταχύτητα, σε σχέση με μικρά μόρια και όπως δείξαμε σε προηγούμενο κεφάλαιο χρησιμοποιείται σε σύμπλοκες ενώσεις, ώστε να αποτρέψει την προσρόφησή τους. Συγκρίναμε στη συνέχεια την κατανομή του μορίου αλβουμίνη-FITC (Εικ. 3.4.5.) με αυτή της quercetin (Εικ. 3.4.7-8.). Στην περίπτωση της αλβουμίνης-FITC παρατηρήθηκε χρώση της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων για τα πρώτα 30 min και κατόπιν κοκκιώδης χρώση του κυτταροπλάσματος, η οποία αντιστοιχεί στα μόρια που ενδοκυττώθηκαν. Η κατανομή αυτή δεν συμπίπτει με αυτή της φλαβονόλης, όπως περιγράφεται στη συνέχεια (3.4.3.5.). Συμπεραίνουμε ότι η ενδοκύττωση της quercetin και της αλβουμίνης είναι δύο ανεξάρτητα φαινόμενα. Ο ρόλος της αλβουμίνης περιορίζεται στην «αποθήκευση» της φλαβονόλης στα εξωκυττάρια υγρά και πιθανώς στην σταδιακή απελευθέρωσή της εγγύς της πλασματικής μεμβράνης. Στους πολυκύτταρους οργανισμούς, η αλβουμίνη μπορεί να έχει και περαιτέρω προστατευτικό ρόλο κατά την μεταφορά των πολυφαινολών στο αίμα.



Εικόνα 3.4.5. Απορρόφηση του συμπλόκου αλβουμίνης-FITC από κύτταρα HepG2.

Η ενδοκυττάρια κατανομή της δεν συμπίπτει με αυτήν της quercetin και ανιχνεύεται μετά την 1h ώρα.

3.4.3.1.4. Αλληλεπιδράσεις της quercetin με ακτίνη

Η quercetin βρέθηκε επίσης ότι μπορεί να αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες, όπως η ακτίνη (Gutzeit et al., 2004), σε διάλυμα. Η πρόσδεση αυτή ενισχύεται από την συσσώρευσή της στα ωκύτταρα της *Drosophila*, γνωστές και ως δακτυλιοειδείς δίαυλοι (ring canals).

Οι δακτυλιοειδείς δίαυλοι είναι κυτταροπλασματικές γέφυρες, που αποτελούνται από δύο στοιβάδες: η εξωτερική σχηματίζεται αμέσως μετά το τέλος της μείωσης, όπου συσσωρεύονται οι πρωτεΐνες Orbit/Mast και Pavarotti (σχετίζονται με μικροσωληνίσκους), η Anillin και η γλυκοπρωτεΐνη Mucin-D. Στο στάδιο της κυστοκύστης δημιουργείται η εσωτερική στοιβάδα από F-ακτίνη (Warn et al., 1985), το προϊόν του γονιδίου *hu-li-tai-shao* gene (Hts-RC) και φιλαμίνη (*cheerio*) (Robinson et al., 1994). Στο τρίτο στάδιο της ωογένεσης η πρωτεΐνη Kelch αντικαθιστά την Anillin, διατηρώντας ανοικτό των αγωγό των διαύλων, προκειμένου να διευκολύνεται η ανταλλαγή θρεπτικών μεταξύ του κυτταροπλάσματος των συνοδών κυττάρων και του ωοκυττάρου.

Επώαση των κυττάρων με quercetin (3 μM σε PBS για 1h), μονιμοποίησή τους και άμεσος ανοσοφθορισμός για τον εντοπισμό της ακτίνης, έδειξε ότι η φλαβονόλη δεν συνεντοπίζεται με την F-ακτίνη (ινίδια), παρά τις αλλαγές που προκαλεί στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού (Εικ. 3.4.13.).

3.4.3.1.5. Αλληλεπιδράσεις της quercetin με άλλες ενδοκυττάρια πρωτεΐνες

Τα παραπάνω πειράματα επιβεβαιώνουν ότι μετά την είσοδό της στα κύτταρα η quercetin προσδένεται σε μακρομόρια, με αποτέλεσμα την μετατόπιση του φθορισμού της στα 488 nm_{ex}/500-540 nm_{em}. Ωστόσο, η τροποποίηση των ιδιοτήτων της δεν φαίνεται να οφείλεται στην αλληλεπίδραση της φλαβονόλης με νουκλεϊκά οξέα ή τις πρωτεΐνες αλβουμίνη και ακτίνη. Προκειμένου να ταυτοποιήσουμε τους ενδοκυττάρια πρωτεϊνικούς στόχους της, την επώασαμε με κυτταρικά εκχυλίσματα, τα οποία περιείχαν κυτταροπλασματικές, πυρηνικές ή ολικές πρωτεΐνες, σε ουδέτερο pH. Χρησιμοποιήσαμε επίσης αντίστοιχα εκχυλίσματα από κύτταρα τα οποία είχαν προεπωασθεί με quercetin. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των «συμπλόκων» σε πηκτή ακρυλαμίδης υπό αποδιατακτικές ή μη συνθήκες. Σε καμία περίπτωση δεν παρατηρήθηκε κατακράτηση της φλαβονόλης από κυτταρικές πρωτεΐνες. Κατά την ανάστροφη διαδικασία (ηλεκτροφόρηση των εκχυλισμάτων και εμβάπτιση των πηκτών σε διάλυμα quercetin) δεν παρατηρήθηκε επίσης πρόσδεση. Η ανίχνευση της quercetin έγινε είτε με παρατήρηση των πηκτών στο υπεριώδες και στο ορατό.

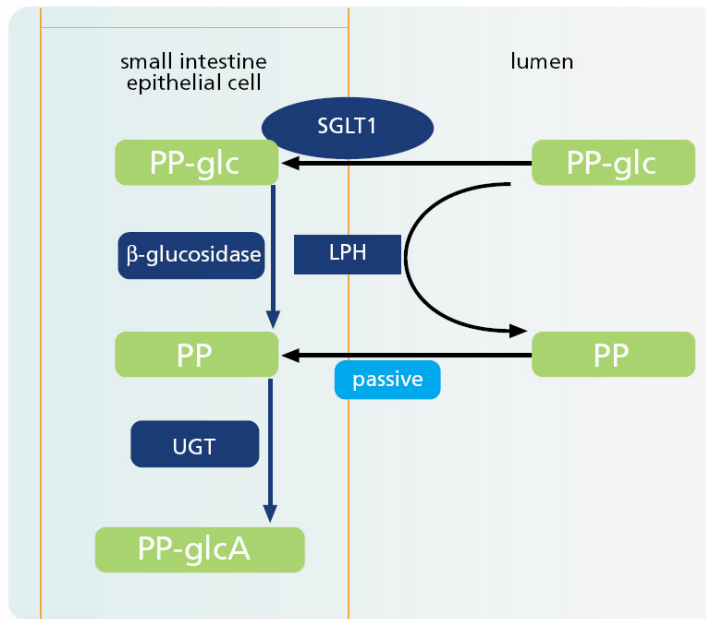
Οι Walle et al χρησιμοποίησαν μία ανάλογη μέθοδο και έδειξαν πρόσδεση της ραδιοσημασμένης φλαβονόλης (20 μM) σε πρωτεΐνες μοριακού βάρους ≤ 60 kD (Walle et al., 2003). Η μέθοδος αυτή επιτρέπει την ανίχνευση μικρών ποσοτήτων του φλαβονοειδούς. Πρέπει να σημειωθεί, ότι η quercetin ήταν προσδεμένη μη αντιστρεπτά στα κυτταρικά εκχυλίσματα, άρα οξειδωμένη, γεγονός το οποίο δεν συμφωνεί με τις δικές μας παρατηρήσεις. Επιπλέον, η φλαβονόλη όταν χορηγήθηκε σε συγκέντρωση 5 μM σε κύτταρα Caco-2 ή HepG2, έφθασε την μέγιστη ενδοκυττάρια συγκέντρωση μετά από 2 h. Η συμβατική ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών δεν αποτελεί την πλέον ενδεδειγμένη μέθοδο για την μελέτη αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών και μικρών μορίων, καθώς απαιτεί την διάσπαση των συμπλόκων μακρομορίων. Επίσης, υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες, η επιλογή των διαλυμάτων καθορίζει την διαλυτότητα των πρωτεϊνών, αλλά και περιορίζει ή ευνοεί πιθανές αλληλεπιδράσεις. Λόγω της έλλειψης πληροφοριών, σχετικά την συμπεριφορά της quercetin εντός των κυττάρων, αλλά και των φυσικοχημικών της ιδιοτήτων, είναι εξαιρετικά δύσκολο να προσεγγίσει κανείς τα ενδοκυττάρια μόρια-στόχους της.

Τα δεδομένα μας καταδεικνύουν την παροδική και αντιστρεπτή πρόσδεση της φυσικής quercetin με στοιχεία του κυττάρου, η οποία μπορεί να ανιχνευθεί στα 488 nm_{ex}/500-540 nm_{em}. Χρησιμοποιώντας αυτήν την ιδιότητα, μπορέσαμε να μελετήσουμε την μεταφορά και τον εντοπισμό της quercetin εντός των κυττάρων, όπως περιγράφεται κατωτέρω.

3.4.3.2. Ενδοκύττωση

Καθώς οι πολυφαινόλες εκχυλίζονται στην υδατική φάση σε μεικτά υδατικά/λιπιδιακά συστήματα θεωρήθηκε ότι είναι «υδρόφιλα» μόρια. Μεμονωμένες πολυφαινόλες, όπως η φλαβονόλη quercetin μπορεί να διαχέεται σε λιπιδιακές κατασκευές, λόγω της επίπεδης (planar) στερεοχημείας της (Ollila et al., 2002). Σε φυσιολογικό pH, οι πολυφαινόλες (flavan-3-ols και προκυανίνες) προσδένονται στις κεφαλές των φωσφολιπιδίων, μέσω των υδροξυλίων τους (Verstraeten et al., 2003), παρά στην διάμεση φάση λιπιδίων-ύδατος (Scheidt et al., 2004). Παρομοίως το στιλβένιο resveratrol συνδέεται κυρίως σε σύμπλοκα λιπιδίων-λιποπρωτεϊνών (Belguendouz et al., 1998). Χάριν σε αυτές τις ιδιότητες, θεωρήθηκε ότι οι πολυφαινόλες μπορούν να διαχέονται παθητικά στα κύτταρα, όπως έχει δειχθεί για την quercetin σε ερυθροκύτταρα (Fiorani et al., 2003).

Εντούτοις, τόσο η quercetin όσο και η resveratrol βρέθηκε να προσδένονται στην αλβουμίνη και στις λιποπρωτεΐνες του ορού (Jannin et al., 2004), καταδεικνύοντας την πιθανή ύπαρξη μηχανισμών υποβοηθούμενης μεταφοράς στα ηπατοκύτταρα (Lancon et al., 2004). Επίσης, η quercetin δεν βρέθηκε να αλληλεπιδρά με πραγματικές μεμβράνες, καθώς δεν μετέβαλε την διαεπιθηλιακή αντίσταση σε κύτταρα εντέρου Caco-2 και HT-29 και σε μη μετασχηματισμένα κύτταρα IEC-6 από εντερικές κρύπτες αρουραίου (Κuo, 1996). Αντίστοιχοι μηχανισμοί ταχείας και ενεργούς μεταφοράς της morphin και οξειδωμένων πολυφαινολών παρατηρήθηκαν και σε ενδοθηλιακά κύτταρα αορτής (Schramm et al., 1999). Σε μονόστοιβα επιθήλια Caco-2, τα φλαβονοειδή μεταφέρονται από την κορυφαία στην βασική μεμβράνη (Boyer et al., 2004; Murota et al., 2002; Oitate et al., 2001). Ειδικότερα, τα μη υποκατεστήμενα μόρια κατευθύνονται στην βασική μεμβράνη, ενώ τα σουλφο- ή γλυκοσυλιωμένα παράγωγα μπορεί να απεκκρίνονται και από την κορυφαία πλευρά. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι αρκετά παράγωγα των πολυφαινολών μπορεί να επιστρέφουν στον αυλό του εντέρου. Ακόμη, ο Walle et al. έδειξαν ότι στα κύτταρα Caco-2 η μη υποκατεστημένη chrysin αν και μπορεί να μεταφέρεται και προς τις δύο κατευθύνσεις, η μεταφορά της από την βασική στην κορυφαία πλευρά είναι εντονότερη (Walle et al., 1999). Σε μία ανάλογη μελέτη, ο Tammela et al. ανέφεραν ότι τα φλαβονοειδή μπορεί να προσροφώνται μέσω κυστιδίων και να υδροξυλιώνονται, αλλά δεν απεκκρίνονται (Tammela et al., 2004). Σε αντίθεση με τα παραπάνω δεδομένα για παράλληλο μεταβολισμό και εξωκύττωση των πολυφαινολών μέσω της βασικής ή κορυφαίας μεμβράνης, το ellagic acid προσροφάται μεν, αλλά δεν βρέθηκε να αποβάλλεται, καθώς η ενδοκυττάρια οξειδωσή του προκαλεί μόνιμη πρόσδεσή του σε πρωτεΐνες και πυρηνικά οξέα (Whitley et al., 2003).

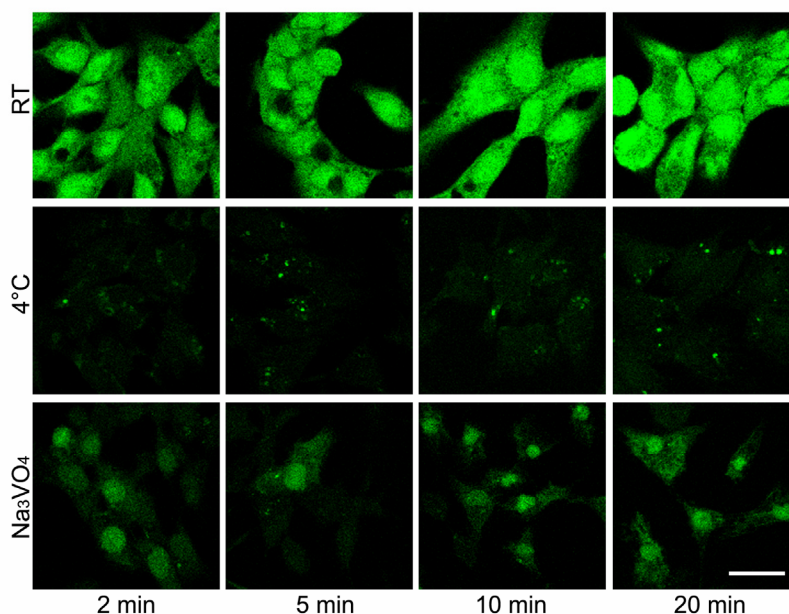


Εικόνα 3.4.6. Τα γλυκοσυλιωμένα φλαβονοειδή χρησιμοποιούν τους μηχανισμούς μεταφοράς των σακχάρων και μεταβολίζονται από την phloridzin lactase του ψηκτροειδούς εντερικού επιθηλίου, καθώς και από τις ενδοκυττάριας β-γλυκοσιδάσες.

Τα φλαβονοειδή θα μπορούσαν να χρησιμοποιούν τους μεταφορείς μορίων που απαντώνται στην μεμβράνη των πολικών κυττάρων και να ανταγωνίζονται τους φυσικούς τους προσδέτες τόσο για την είσοδο, όσο και για την έξοδό τους. Με αυτό το σκεπτικό, προτάθηκε ότι τα γλυκοσυλιωμένα παράγωγα των φλαβονοειδών χρησιμοποιούν τους μηχανισμούς ενδοκύττωσης της γλυκόζης. Πράγματι, οι phloridzin (Walle et al., 2003), quercetin-3-O-glucoside, 4'-O-glucoside (Cermak et al., 2004; Walgren et al., 2000) και trans-ricoid acid (Henry et al., 2005) βρέθηκε να ανταγωνίζονται την Na^+ -εξαρτώμενη μεταφορά της γλυκόζης από τον μεταφορέα SGLT1. Επιπρόσθετα, μη γλυκοσυλιωμένα μόρια, όπως quercetin, myricetin catechin, catechin gallate και gallic acid βρέθηκε να αναστέλλουν την μεταφορά της μεθυλ-γλυκόζης στα λιποκύτταρα μέσω των μεταφορέων GLUT (Strobel et al., 2005). Αντίστοιχα, αρκετά φλαβονοειδή αναστέλλουν την απορρόφηση της γλυκόζης σε κύτταρα U937 (myelocytic leukemia) και Jurkat (lymphocytic leukemia) (Park, 1999). Επίσης, έχει προταθεί ότι οι phloretin, το βενζοϊκό οξύ και η ECG χρησιμοποιούν τον μεταφορέα μονοκαρβοξυλομάδων (MCT) (Vaidyanathan and Walle, 2003), ενώ οι πολυφαινόλες του γκρέϊπφρουτ τον πολυπεπτιδικό μεταφορέα οργανικών ανιόντων (OATP) (Dresser et al., 2002). Ακόμη, σε *ex vivo* σύστημα δωδεκαδακτύλου αρουραίου (everted intestinal sacs) έχει περιγραφεί ενεργητική Na^+ -εξαρτώμενη μεταφορά για το φερουλικό και το κινναμικό οξύ (Ader et al., 1996).

Στην παρούσα μελέτη διαπιστώσαμε, ότι παρά τις βιβλιογραφικές αναφορές για παθητική διάχυση των πολυφαινόλων διαμέσω των μεμβρανών, η quercetin εισέρχεται στα κύτταρα ενεργητικά. Επώαση κυττάρων της σειράς HepG2 έδειξε ότι η πρόσληψη της φλαβονόλης είναι ταχεία, δόσο-, χρονο- και θερμο-εξαρτώμενη. Η ένταση του κυτταρικού φθορισμού βρέθηκε ανάλογη της συγκέντρωσης της quercetin (0,03-30 μM σε PBS), μετά από επώαση για 2-10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Επώαση των κυττάρων παρουσία σταθερής συγκεντρώσεως quercetin (3 μM σε PBS) σε αυξανόμενη θερμοκρασία, ευνόησε την

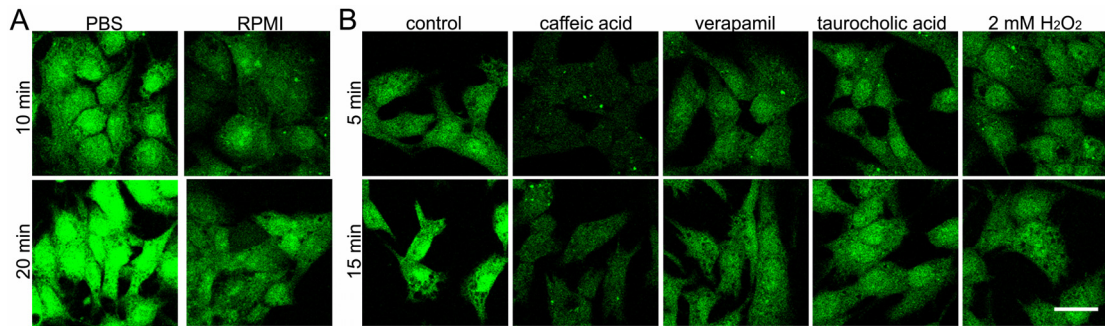
απορρόφηση της φλαβονόλης. Τα δεδομένα αυτά συγκλίνουν στην ενεργητική μεταφορά της ουσίας. Όπως φαίνεται στην Εικ. 3.4.7., επώαση για 2-20 min στους 4°C, οδηγεί σε μηδενικό φθορισμό, σε σχέση με τα αντίστοιχα δείγματα στους 25°C. Προσθήκη του αναστολέα των ATPases (Na_3VO_4) μειώνει και καθυστερεί τον ενδοκυττάριο φθορισμό και κατ'επέκταση την πρόσληψη της quercetin. Ανάλογες παρατηρήσεις έγιναν και στην καρκινική σειρά μαστού T47D.



Εικόνα 3.4.7. Η ενδοκύττωση της quercetin (3 μM , σε PBS) γίνεται ενεργητικά, καθώς καταστέλλεται σε χαμηλή θερμοκρασία (4°C), όπως επίσης και από αναστολείς των ATPases (Na_3VO_4). Η πρόσληψη του φλαβονοειδούς είναι ταχεία και ανιχνεύεται αμέσως μετά την προσθήκη της στα κύτταρα (scale bar = 25 μm).

Προκειμένου να διαπιστώσουμε το είδος των μεταφορέων που ευθύνονται για την ενεργητική ενδοκύττωση της quercetin, χρησιμοποιήσαμε αντί για PBS, το συμβατικό θρεπτικό μέσο RPMI, το οποίο περιέχει πληθώρα διατροφικών μικρού μεγέθους μορίων. Συνεπώς με άλλες πολυφαινόλες (resveratrol, κατεχίνες και φαινολικά οξέα, όπως το καφεϊκό οξύ, Εικ. 3.4.8.) είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή της πρόσληψης της quercetin. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι οι πολυφαινολικές ουσίες μοιράζονται από κοινού τον ίδιο μηχανισμό ενδοκύττωσης. Πράγματι, οι Silberberg ανέφεραν την μείωση της συγκέντρωσης των quercetin και catechin στο πλάσμα αρουραίων, όταν συγχορηγούνται, χωρίς όμως να μεταβάλλεται το συνολικό τους άθροισμα (Silberberg et al., 2005).

Επιπλέον, συνεπώς με οργανικά ανιόντα (nigaramil, χολικό οξύ, δεοξυχολικά οξύ και ταυροχολικό οξύ) είχε ως αποτέλεσμα την ελάττωση και υστέρηση του ενδοκυττάριου φθορισμού, υποδεικνύοντας την συμμετοχή των μεταφορέων οργανικών ανιόντων (OATPs) στην πρόσληψη της quercetin. Ο διαφορικός βαθμός αναστολής κάθε ανταγωνιστή οφείλεται στην συγγένεια καθενός για τους υποδοχείς. Καθώς οι μεταφορείς OATP είναι



Εικόνα 3.4.8. (Α) Η ενδοκύττωση της quercetin στα HepG2 παρεμποδίζεται και υστερεί, όταν χορηγείται σε θρεπτικό μέσο καλλιιεργειών (RPMI) σε σχέση με το διάλυμα φωσφορικών. (Β) Άλλα φλαβονοειδή (καφφεϊκό οξύ) και υποστρώματα των μεταφορέων οργανικών ανιόντων (300 μ M) ανταγωνίζονται την πρόσληψη της quercetin. Προεπίσωση των κυττάρων με H_2O_2 , προκειμένου αποστραγγισθούν οι ενδοκυττάρια αποθήκες γλουταθειόνης μειώνει επίσης την απορρόφηση του φλαβονοειδούς. Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν την διαμεσολάβηση ενός μεταφορέα οργανικών ανιόντων, πιθανότατα του OATP (scale bar = 25 μ m).

ταυτοχρόνως ανταλλάκτες GSH-X, επιβεβαιώσαμε την μερική συμμετοχή τους στην πρόσληψη της quercetin προκαλώντας εξάλειψη της ενδοκυττάριας GSH (Wang and Ballatori, 1998) με H_2O_2 (2 mM, 1 h) (Εικ. 3.4.8.Β). Η απόσβεση του ενδοκυττάριας φθορισμού δεν ήταν πλήρης, πιθανόν λόγω του ενδοκυττάριας HCO_3^- , το οποίο την υποκαθιστά. Πράγματι, οι Cermak et al παρατήρησαν την επαγωγή της έκκρισης HCO_3^- από το εντερικό επιθήλιο παρουσία quercetin (Cermak et al., 1998).

Αντίθετα, συνεπίσωση με διάφορα σάκχαρα (γλυκόζη, δεξτρόζη, μαλτόζη και σουκρόζη) δεν επηρέασε την ενδοκύττωση της quercetin, υποδηλώνοντας πως οι μεταφορείς σακχάρων δεν επηρεάζουν την ενδοκύττωση της ουσίας.

Τέλος, παρά την κρατούσα αντίληψη σχετικά με υστερημένη απορρόφηση των πολυφαινόλων από τα επιθήλια, στην παρούσα μελέτη βρήκαμε ότι η ενεργητική πρόσληψη της quercetin είναι ταχεία και ανιχνεύεται σε χρόνο μικρότερο από 2 min, ανάλογα με το εξωκυττάρια υγρό. Σχετικά πρόσφατα, ολιγομερή φλαβονοειδή ανιχνεύθηκαν 15 min μετά την ενδογαστρική τους χορήγηση στον εγκέφαλο αρουραίων (Passamonti et al., 2005). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι τα φλαβονοειδή, ακόμη και στην πολυμερή τους μορφή, δεν είναι μόνο ικανά να διασχίζουν ταχύως την πλασματική μεμβράνη, αλλά και τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό.

Οι μεταφορείς OATP, μέσω των οποίων ενδοκυττώνεται ενεργητικά η φλαβονόλη, συγκροτούν μία οικογένεια μορίων που μεταφέρουν αμφίφιλες ενώσεις, όπως μη συζευγμένα χολικά άλατα και στεροειδή, χολερυθρίνη, λευκοτριένια, ολιγοπεπτίδια και σε μικρότερο βαθμό οργανικά κατιόντα (Trauner et al., 1999). Υπό αυτό το πρίσμα, η quercetin και πιθανόν άλλες πολυφαινόλες θα μπορούσαν να ρυθμίσουν την απορρόφηση

των χολικών οξέων και να χρησιμοποιηθούν συμπληρωματικά στην θεραπεία της υπερχοληστερολαιμίας. Έχει βρεθεί επίσης ότι οι πολυφαινόλες εμφανίζουν επιπρόσθετες ωφέλιμες δράσεις, καθώς έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στην ομοίωση της χοληστερόλης, όπως αυτή των μεταφορέων χοληστερόλης και φωσφολιπιδίων ABCA1 και ABCG1, της μεταθετάσης CD36/λιπαρών οξέων και της fatty acid binding protein 1 (Peschel et al., 2006). Η υποχοληστερολαιμική δράση της curcumin έχει επιβεβαιωθεί σε αρουραίους, μετά από δίαιτα υψηλή σε λιπαρά (Arafa, 2005).

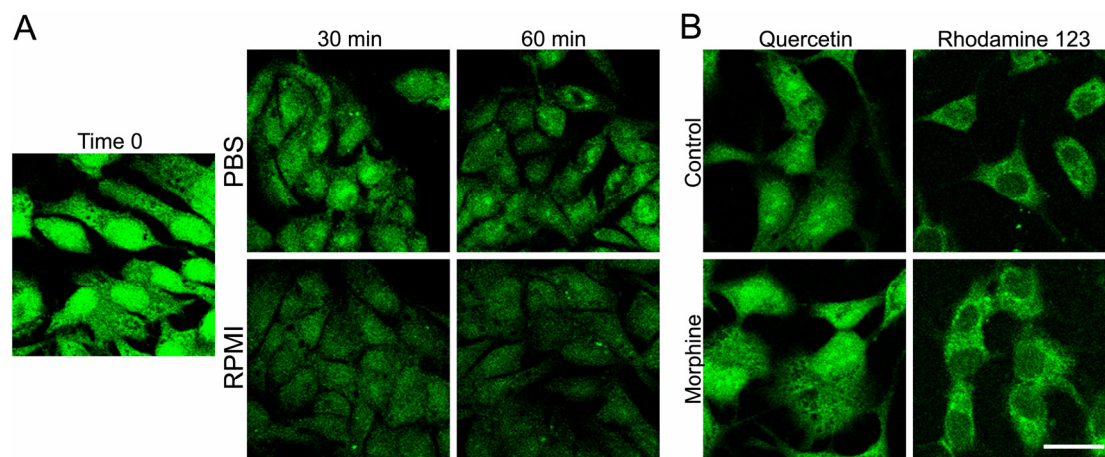
Τέλος, καθώς οι μεταφορείς OATP είναι συγχρόνως ανταλλάκτες γλουταθειόνης (GSH), οι πολυφαινόλες θα μπορούσαν να επάγουν μέσω της προσλήψεώς τους από τα κύτταρα την αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας στο εξωκυττάριο περιβάλλον. Σε ενδοκυττάριο επίπεδο, διεγείρουν παράλληλα τους μηχανισμούς που συμβάλλουν στην αναγέννηση της GSH. Καθώς, η quercetin εμφανίζει *per se* αντιοξειδωτικές ιδιότητες, η προσωρινή μείωση της γλουταθειόνης δεν προκαλεί αύξηση του κυτταροπλασματικού οξειδωτικού φορτίου.

3.4.3.3. Εξωκύττωση

Η αλληλεπίδραση της quercetin με νουκλεϊκά οξέα ή πρωτεΐνες, θεωρείται ότι έχει μη αντιστρεπτό χαρακτήρα και σχετίζεται με την οξειδωτική αποκοδόμηση των μακρομορίων-στόχων και κατ'επέκταση με την επαγωγή αποπτώσεως. Συνεπώς, η φλαβονόλη μετά την ενδοκύττωσή της, αναμένεται να συσσωρεύεται στα κύτταρα μέχρι τον θάνατό τους. Ωστόσο, προεπάση των κυττάρων με quercetin για 30 min και μεταφορά τους σε καινούργιο θρεπτικό μέσο χωρίς φλαβονόλη, έδειξε ότι η ουσία δεν κατακρατείται ούτε στον πυρήνα, αλλά ούτε και στο κυτταρόπλασμα (Εικ. 3.4.9.A). Η εξωκύττωση της quercetin είναι χρονοεξαρτώμενη και σε αντίθεση με την ταχεία ενδοκύττωσή της απαιτεί περίπου 1-2 ώρες. Η διαδικασία αυτή ευνοείται όταν τα κύτταρα μεταφέρονται σε θρεπτικό μέσο (RPMI), αντί διαλύματος φωσφορικών (PBS), καταδεικνύοντας ότι τα μικροστοιχεία του εξωκυττάρου περιβάλλοντος μπορούν να ανταγωνίζονται εκτός από την πρόσληψη και την απέκκρισή της.

Τα φλαβονοειδή έχει προταθεί ότι αποβάλλονται από τα κύτταρα, μέσω των αντλιών της οικογένειας ABC, οι οποίοι απεκκρίνουν ξενοβιοτικά και ευνοούν την εκδήλωση ανοχής σε αντικαρκινικούς παράγοντες. Η quercetin χρησιμοποιεί τις αντλίες MDR1 και αναστέλλει την λειτουργία της MRP1 (Wang et al., 2004), αλλά όχι της MRP2 (van Zanden et al., 2004), σε αντίθεση με την 4'-β-γλυκοζυλιωμένη μορφή της (Walgren et al., 2000). Επίσης, οι trans-resveratrol, trans-piceid acid και chrysin, καθώς και οι μεταβολίτες τους βρέθηκε να αποβάλλονται από την κορυφαία μεμβράνη των κυττάρων Caco2 μέσω της MRP2 (Henry et al., 2005; Kaldas et al., 2005; Walle et al., 1999). Πρόσφατα, βρέθηκε ότι τα φλαβονοειδή silymarin, hesperetin, quercetin και daidzein, και το σιλιβένιο resveratrol αποτελούν υποστρώματα της BCRP/ABCG2, μιας αντίστοιχης αντλίας που υπερεκφράζεται σε καρκίνο

του μαστού (Cooray et al., 2004), ενώ σε μοντέλο αιματοεγκεφαλικού φραγμού η αποβολή των quercetin και naringenin διαμεσολαβείται από τις BCRP και MDR1 (Youdim et al., 2004). Σε διαγονιδιακούς αρουραίους, βρέθηκε ότι η αντλία BCRP1 ρυθμίζει την καθαρή πρόσληψη της quercetin από το έντερο, καθώς υποβοηθά την απέκκριση των γλυκοζυλιωμένων μεταβολιτών της (Sesink et al., 2005).



Εικόνα 3.4.9. (Α) Η quercetin δεν κατακρατείται μετά την ενδοκύττωσή της. Κύτταρα HepG2 επώασθησαν με quercetin (3 μM σε PBS) για 30 min (θεωρήθηκε ως χρονική στιγμή 0) και κατόπιν μεταφέρθηκαν σε μέσο χωρίς φλαβονόλη. Ο ενδοκυττάριος φθορισμός εξαλείφθηκε 30-60 min αργότερα. Το θρεπτικό μέσο RPMI ευνοεί την απελευθέρωση της quercetin, σε σύγκριση με το PBS, υποδεικνύοντας ότι τα στοιχεία του θρεπτικού ανταγωνίζονται την απέκκρισή της. (Β) Η αποβολή της quercetin διαμεσολαβείται από τις αντλίες MDR, καθώς αναστρέφεται παρουσία μορφίνης, ενός υποστρώματος των MDR1 και MRP1, 2, 3 μεταφορέων. Η Rhodamine123 χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας για την λειτουργική μελέτη των MDRs: εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα (μιτοχόνδρια) και κατακρατείται επίσης παρουσία μορφίνης (scale bar = 25 μm).

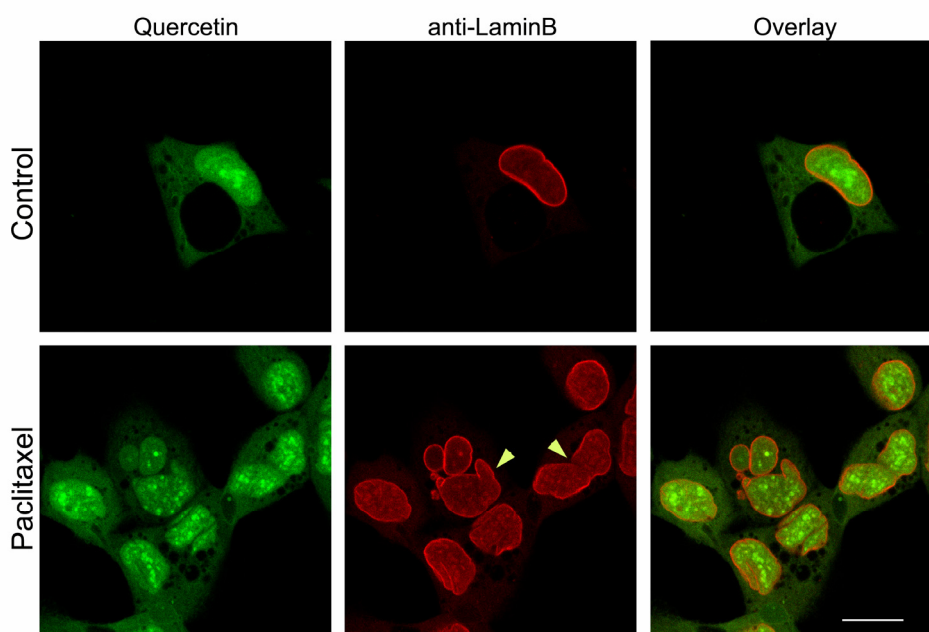
Καθώς τα ηπατοκύτταρα εκφράζουν πληθώρα μεταφορέων μικρών μορίων που ανήκουν στην υπερικογένεια των ABC πρωτεϊνών (Cho et al., 2000; Lee et al., 2001; Zhao et al., 1993), προσπαθήσαμε να αναστείλλουμε την λειτουργία τους, χρησιμοποιώντας μεγάλες συγκεντρώσεις υποστρωμάτων (verapamil, paclitaxel, vincristine, vinblastine, doxorubicin και dacarbazine, 300 μM). Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η ροδαμίνη 123. Αν και όλες οι ουσίες ανεξάρτητα προκάλεσαν την ενδοκυττάρια κατακράτηση ροδαμίνης 123 (3 μM) (όπως έχει ήδη δημοσιευθεί (O'Leary et al., 2003)), δεν ήταν ικανές να αναστείλουν την έξοδο της quercetin. Αντιθέτως, η μορφίνη (Zelcer et al., 2005) ήταν ικανή να παρατείνει την κατακράτηση της quercetin (Εικ. 3.4.9.Β), καταδεικνύοντας ότι η φλαβονόλη έχει πολύ υψηλή συγγένεια για τις αντλίες ABC. Πράγματι, η quercetin, όπως και οι galangin, kaempferol, eriodictyol, luteolin και taxifolin θεωρούνται ισχυροί αναστολείς των ανταλλακτών GS-X (van Zanden et al., 2004)

Η συγγένεια της quercetin και των πολυφαινολών γενικότερα για τις αντλίες της οικογένειας ABC, θα μπορούσε να υποβοηθήσει την δράση ενός μεγάλου φάσματος

θεραπευτικών ουσιών, όπως τα αντιβιοτικά και οι αντικαρκινικοί παράγοντες. Λειτουργώντας ως υποστρώματα ή αναστολείς της δράσης των πρωτεϊνών ABC, αυξάνουν την ενδοκυττάρια βιοδιαθεσιμότητα μορίων με χαμηλότερη συγγένεια για τις συγκεκριμένες αντλίες. Ειδικότερα, οι πρωτεΐνες MDR και MRP έχει βρεθεί ότι υπερεκφράζονται στα νεοπλαστικά κύτταρα, δυσχεραίνοντας την εφαρμογή οποιασδήποτε θεραπευτικής αγωγής. Η διαφορική συγγένεια των πολυφαινόλων, όπως της γλυκοσυλιωμένης quercetin για το μόριο των BCRP, σε αντίθεση με την μη υποκατεστημένη φλαβονόλη (Sesink et al., 2005), μπορούν να επιτύχουν τον εστιασμένο έλεγχο της χορήγησης ενός φαρμάκου σε έναν κυτταρικό τύπο, ή ιστό. Στους αρουραίους ελέγχθηκε η δράση εκχυλίσματος *Ginkgo biloba* και κρεμμυδιών (πλουσίων σε quercetin και γλυκοζυλ-quercetin) στην απορρόφηση και βιοδιαθεσιμότητα της κυκλοσπορίνης. Σε αντίθεση με την ενδοφλέβια χορήγηση, η *p.o.* χορήγηση είχε ως αποτέλεσμα την μείωση της μέγιστης συγκέντρωσης του αντιβιοτικού στο πλάσμα κατά 60%. Τα δεδομένα αυτά συνηγορούν στην ύπαρξη ενός κοινού μηχανισμού εντερικής απορρόφησης και επιβάλλουν μεθοδευμένη διαιτητική προσέγγιση κατά την χορήγηση των θεραπευτικών παραγόντων (Yang et al., 2006).

3.4.3.4. Πυρηνική μεταφορά

Η μικροσκοπική παρατήρηση των κυττάρων που έχουν επωαστεί με quercetin, σε συνδυασμό με συμπληρωματική χρώση για νουκλεϊκά οξέα, έδειξε ότι η φλαβονόλη εντοπίζεται ταχέως στον πυρήνα. Το γεγονός αυτό, προϋποθέτει την μεταφορά της quercetin διαμέσω του πυρηνικού φακέλλου.



Εικόνα 3.4.10. Η πρόσληψη της quercetin δεν φαίνεται να επηρεάζεται από αλλαγές στην οργάνωση του πυρηνικού φακέλλου, οι οποίες μπορούν να ελεγχθούν με ανοσοϊστοχημική χρώση της Lamin B (κόκκινο, βέλη). Σε σχέση με τον μάρτυρα (επάνω), το paclitaxel δεν επηρεάζει την ένταση του σήματος φθορισμού, όπως επίσης και τον υποκυτταρικό εντοπισμό της φλαβονόλης (scale bar = 25μm).

Προκειμένου να διαπιστώσουμε αν η μεταφορά της quercetin είναι υποβοηθούμενη από πρωτεΐνες (πιθανότητα μεταγραφικούς παράγοντες) και διαμεσολαβείται από τα σύμπλοκα των πυρηνικών πόρων (NPC), επώασαμε τα κύτταρα με paclitaxel. Η ταξάνη προκαλεί αλλοιώσεις του πυρηνικού ελάσματος και έκτοπο εντοπισμό των NPCs, με αποτέλεσμα την ελάττωση της κυττοπλασματο-πυρηνικής μεταφοράς (Theodoropoulos et al., 1999).

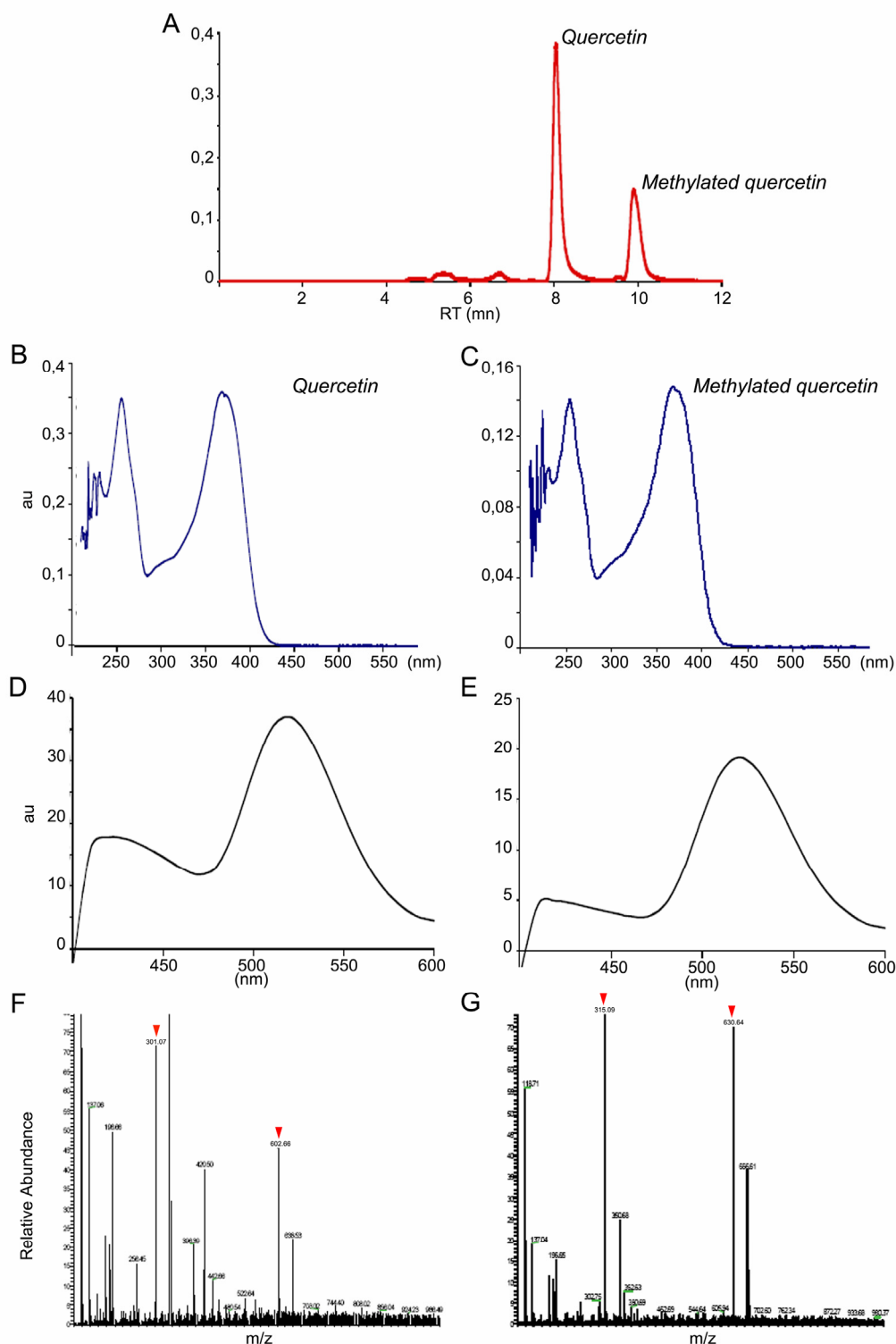
Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.4.10., το paclitaxel προκαλεί αλλαγές στο σχήμα και την οργάνωση του πυρηνικού φακέλλου, οι οποίες μπορούν να εντοπιστούν με ανοσοϊστοχημική χρώση για την πρωτεΐνη Lamin B. Εντούτοις, δεν παρατηρούνται διαφορές στον εντοπισμό της φλαβονόλης σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρα. Για τον λόγο αυτό, θεωρήσαμε πως η λειτουργικότητα των NPCs δεν επηρεάζει την κυττοπλασματο-πυρηνική μεταφορά της quercetin.

Προκειμένου να διασφαλίσουμε τον ρόλο των υποδοχέων στεροειδών στην μεταφορά της quercetin στον πυρήνα, συνεπώασαμε τα κύτταρα με quercetin (3 μM) και αγωνιστές ή ανταγωνιστές υποδοχέων στεροειδών (30-300 μM). Χρησιμοποιήσαμε τους ανταγωνιστές των AR flutamide και cyproterone acetate, τον ανταγωνιστή των ER ICI 182780, τον ανταγωνιστή των PR RU486 και τους αντίστοιχους αγωνιστές διϋδροτεστοστερόνη, διαιθυλσιλβεστρόλη και ORG 2058, καθώς και συνδυασμούς τους. Παρά τις δημοσιευμένες αλληλεπιδράσεις της quercetin με τους υποδοχείς στεροειδών (Kampa et al., 2000; van der Woude et al., 2005), δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην μεταφορά και τον υποκυτταρικό εντοπισμό της φλαβονόλης.

Συμπεραίνουμε, πως η quercetin δεν εισέρχεται υποβοηθούμενη στον πυρήνα, καθώς η συσσώρευση της δεν επηρεάζεται από τον έκτοπο εντοπισμό των πυρηνικών πόρων (NPCs), αλλά ούτε και από αγωνιστές ή ανταγωνιστές των υποδοχέων στεροειδών. Εναλλακτικά, η quercetin, χάριν στο μικρό της μέγεθος ($\varnothing < 30 \text{ nm}$), θα μπορούσε να διαχέεται στον πυρήνα και να διαπερνά παθητικά τους NPCs, ενώ παράλληλα να κατακρατείται από πυρηνικές πρωτεΐνες-στόχους, όπως έχει ήδη προταθεί για άλλα μακρομόρια (Rout et al., 2003).

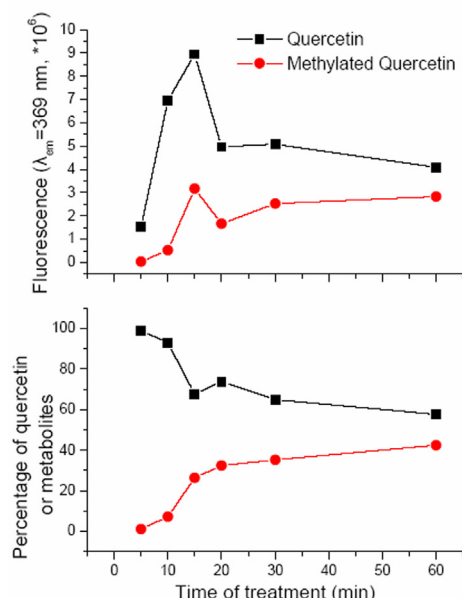
3.4.3.5. Μεταβολισμός

Προκειμένου να διαπιστώσουμε αν η quercetin ενδοκυττώνεται στην φυσική της μορφή ή μεταβολίζεται, επώασαμε τα κύτταρα για διάφορους χρόνους (5-60 min) και εκυλίσαμε τις ενδοκυττάριας φλαβονόλες με όξινη μεθανόλη. Ανάλυση των δειγμάτων με HPLC-ESI-MS (Εικ. 3.4.11.), έδειξε ότι η ενδοκυττάρια συγκέντρωση quercetin αυξάνεται συναρτήσει του χρόνου, κατ'αναλογία με τα μικροσκοπικά μας ευρήματα (Εικ. 3.4.12., επάνω), κατά τα πρώτα 15 min. Στη συνέχεια, η συγκέντρωση της φλαβονόλης ελαττώνεται και σταθεροποιείται. Η εξισσορόπηση της ενδοκυττάριας συγκεντρώσεως της quercetin οφείλεται στην συνεργατική δράση των μηχανισμών ενδοκυττώσεως και εξωκυττώσεως της.



Εικόνα 3.4.11. HPLC-ESI-MS ανάλυση των μεταβολιτών της ενδοκυττωμένης quercetin, μετά από 30 min επώασης κυττάρων HepG2 με 3μM φλαβονόλης. (A) HPLC χρωματογράμμο σε απορρόφηση DAD στα 369 nm. (B-C) Φάσματα απορρόφησης στο UV που αντιστοιχούν στις κορυφές της HPLC στα 8,03 mn (quercetin) RT 9,9 mn (methylated quercetin). (D-E) Φάσματα φθορισμού που αντιστοιχούν στις κορυφές του HPLC στα 8,03 και 9,9 mn. (F-G) Φάσμα μάζας από 100-1000 m/z μετά από αρνητικό ιονισμό. (F) Ανάλυση του φάσματος με TIC 7,94-8,22 mn, (quercetin, $[M-H]^- = 301.07$ m/z). (G) Ανάλυση του φάσματος με TIC 9,83-10.09 mn (methylated quercetin, $[M-H]^- = 315.09$ m/z). Τα ιόντα των διμερών εμφανίζονται στα 602.66 m/z και 630.64 m/z, αντιστοίχως (βέλη).

Επιπλέον, εξαρτάται και από τον μεταβολισμό της, καθώς παρατηρείται ο σταδιακός σχηματισμός ενός μεθυλιωμένου παραγώγου. Μετά από μία ώρα επώασης, η quercetin αντιστοιχεί στο 60% των συνολικών πολυφαινολών του κυτταρικού εκχυλίσματος, ενώ η μεθυλιωμένη quercetin στο 40% (Εικ. 3.4.12.). Πρέπει να σημειωθεί ότι δεν ανιχνεύθηκαν οξειδωμένοι μεταβολίτες.



Εικόνα 3.4.12. Επάνω: HPLC-MS ανάλυση των κυτταρικών εκχυλισμάτων στους αντίστοιχους χρόνους επιβεβαίωσε την ενδοκυττάρια πρόσληψη της φλαβονόλης από τα HepG2 cells και την σταδιακή σύνθεση ενός μεθυλιωμένου μεταβολίτη. Κάτω: κινητική της σχετικής συσσώρευσης της quercetin και του σχηματισμού του μεθυλιωμένου παραγώγου (quercetin+methyl-quercetin=100% σε κάθε χρονική στιγμή).

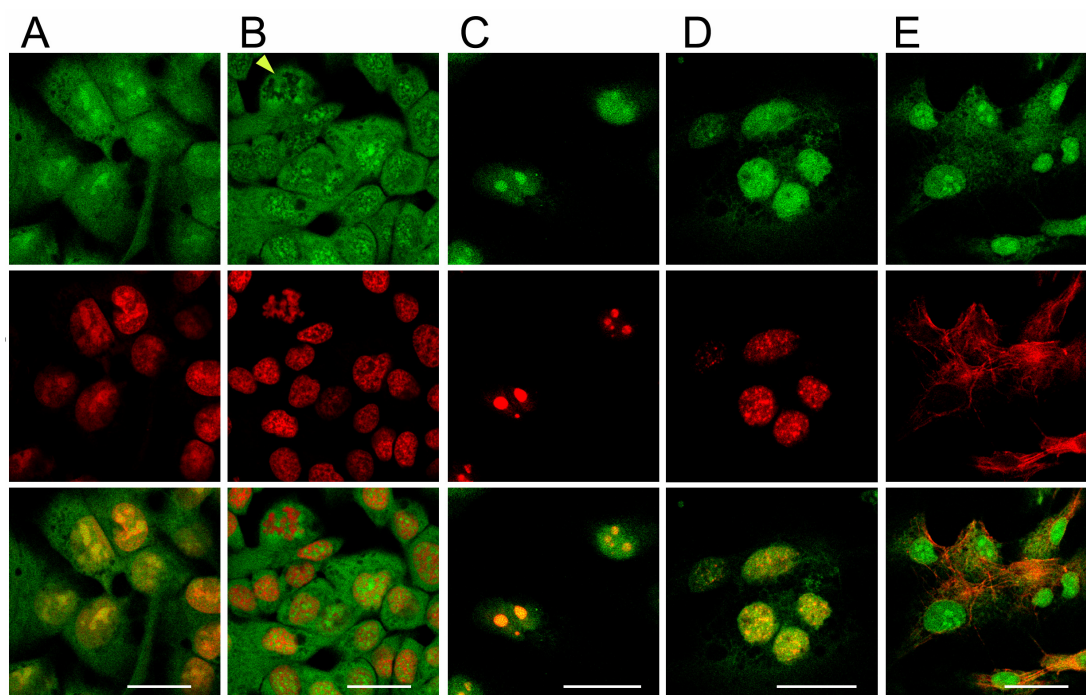
Συνεπώς, η quercetin ενδοκυττώνεται στην φυσική της μορφή, τουλάχιστον κατά την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, και σε αυτήν θα έπρεπε κύρια να αποδίδεται οποιοδήποτε κυτταρική δράση.

Στην παρούσα μελέτη αναφέρουμε για πρώτη φορά την ταχεία ενδοκύττωση της quercetin σε μονόστοιβα επιθήλια και τον ταυτόχρονο μεταβολισμό της, ο οποίος είναι ανιχνεύσιμος 10 min μετά την προσθήκη της φλαβονόλης στα κύτταρα. Σε ανάλογες μελέτες στα κύτταρα Caco-2 βρέθηκε ότι η quercetin συσσωρεύεται και υδρολύεται (Boyer et al., 2004), ενώ στη σειρά HepG2 παρατηρήθηκε η σύνθεση ενός *O*-μεθυλιωμένου μεταβολίτη (isorhamnetin) μετά από 8 hrs και στην συνέχεια οξειδωτική αποικοδόμηση της φλαβονόλης σε καρβοξυλικά οξέα, κυρίως protocatechuic acid (Boulton et al., 1999). Η παραγωγή 3'-*O*-methyl quercetin έχει δειχθεί επίσης σε κύτταρα φακού (Cornish et al., 2002) και στο πλάσμα αρουραίων, 30 min μετά από παρεντερική χορήγηση (Sesink et al., 2005). Ωστόσο, δεν έχει αναφερθεί παραγωγή πολυμερισμένων μορίων. Στο σύστημά μας ανιχνεύθηκαν διμερή τόσο της quercetin, όσο και του παραγώγου της, κατά την διάρκεια της επώασης (Εικ.3.4.11.). Ο πολυμερισμός των πολυφαινολών σε κυτταρικά συστήματα έχει αποδοθεί στην αστάθειά τους σε ουδέτερο ή αλκαλικό περιβάλλον και έχει επιβεβαιωθεί στην σειρά αδενοκαρκινώματος παχέος εντέρου HT-29, μετά από επώαση με την κατεχίνη EGCG (Hong et al., 2002). Η μεθυλίωση της quercetin επιτελείται από το ένζυμο COMT, για το οποίο

εμφανίζει πολύ μεγαλύτερη συγγένεια σε σχέση με τα οιστρογόνα ή τις κατεχολαμίνες (Zhu et al., 1994). Η COMT εκφράζεται φυσιολογικά στον νευρικό ιστό, το ήπαρ, τα ερυθροκύτταρα και τους νεφρούς (Doyle et al., 2004), ενώ μεταλλάξεις της σχετίζονται με παθολογικές καταστάσεις και νευρολογικές νόσους. Στις περιπτώσεις αυτές αναμένεται αύξηση της συγκεντρώσεως των μη υποκατεστημένων φλαβονοειδών και κατά συνέπεια αύξηση της διαθεσιμότητά τους.

3.4.3.5. Υποκυτταρικός εντοπισμός

Αξιοποιήσαμε τις προαναφερθείσες φθορίζουσες ιδιότητες της quercetin, προκειμένου να μελετήσουμε την ενδοκυττάρια κατανομή της. Η φλαβονόλη εντοπίζεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις στο κυτταρόπλασμα και συσσωρεύεται στον πυρήνα, εντός λεπτών. Συμπληρωματική χρώση με DAPI, PI, rhodamine-phalloidin και αντίσωμα έναντι της fibrillarlin, έδειξε πως στην μεσόφαση η quercetin συγκεντρώνεται αποκλειστικά σε διακριτά πυρηνικά σωμάτια και ιδιαίτερα στους πυρηνίσκους (Εικ. 3.4.13.).



Εικόνα 3.4.13. Υποκυτταρικός εντοπισμός της quercetin. Κύτταρα HepG2 cells επωάσθησαν με quercetin (3 μM in PBS, επάνω σειρά, πράσινο) για 30 min, μονιμοποιήθηκαν και έγινε συμπληρωματική χρώση (κόκκινο, μεσαία σειρά) με PI (A-B), αντίσωμα έναντι της fibrillarlin (C-D) και rhodamine-phalloidin (E), υπό συστατικές συνθήκες (A, C και E) ή μετά από αγωγή με 1 μM Ακτινομυκίνη D (B και D). Ο συνεντοπισμός φαίνεται ως κίτρινο χρώμα στην κάτω σειρά. Η quercetin συσσωρεύεται στον πυρήνα (A), κυρίως στους πυρηνίσκους (A, C) και δεν συνεντοπίζεται με ινίδια ακτίνης (E) ή συμπυκνωμένη χρωματίνη (B, βέλος). Αποικοδόμηση των πυρηνίσκων με Ακτινομυκίνη D οδηγεί σε στικτή κατανομή (B), η οποία επικαλύπτεται με την πρωτεΐνη fibrillarlin (D) (scale bar = 25 μm).

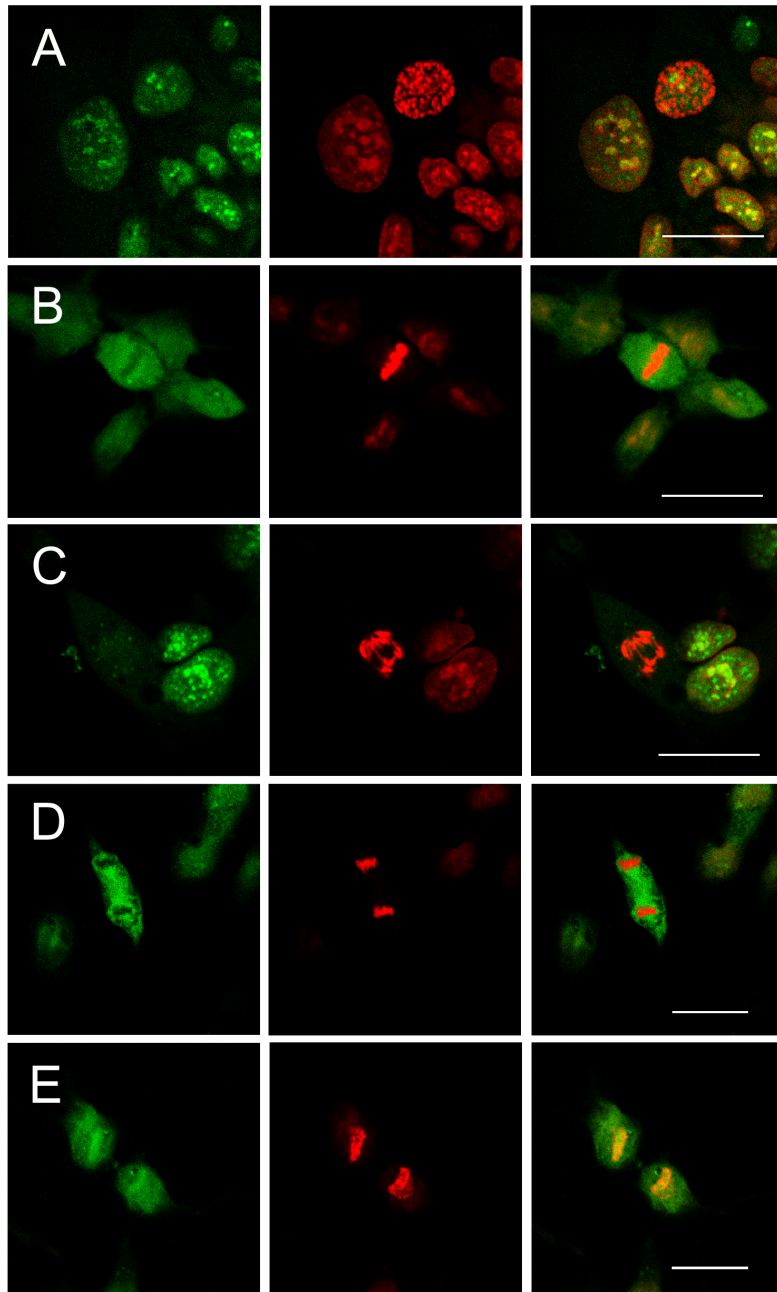
Στην πρόφαση, κατά την συμπύκνωση της χρωματίνης, η quercetin συγκεντρώνεται σε μικρά σωμάτια στην περιφέρεια των χρωμοσωμάτων (Εικ. 3.4.14.). Κατά την διάρκεια της μετάφασης και της ανάφασης οι χρωμοσωμικές περιοχές δεν παρουσιάζουν φθορισμό ειδικό για την quercetin, ενώ στα τελευταία στάδια της τελόφασης (κυττοκίνηση) η ουσία επανασυγκεντρώνεται στους θυγατρικούς πυρηνίσκους. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν την απουσία αλληλεπίδρασης της quercetin με το DNA. Πρέπει ακόμη να σημειωθεί ότι δεν ήταν δυνατή η απορρόφηση και ανίχνευση της quercetin σε προμονιμοποιημένα κύτταρα, αν και το φαινόμενο αυτό έχει αναφερθεί σε υψηλές συγκεντρώσεις της (100μM) (Kuo, 1996). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει την ανάγκη ενός άθικτου και λειτουργικού μηχανισμού μεταφοράς και προσδέσεώς της.

Επιπροσθέτως, προεπάση των κυττάρων με Ακτινομυκίνη D (1μM, 24 hrs) και μετέπειτα προσθήκη του φλαβονοειδούς, είχε ως αποτέλεσμα την τροποποίηση της υποκυτταρικής κατανομής της quercetin στα μη διαιρούμενα κύτταρα: η φλαβονόλη συσσωρεύτηκε σε μικρότερα και πολυπληθέστερα πυρηνικά σωμάτια, θετικά για την πρωτεΐνη-δείκτη των πυρηνίσκων, fibrillarlin (Εικ. 3.4.13.D). Συνεπώς, ο υποκυτταρικός εντοπισμός της quercetin σχετίζεται με την σύνθεση και ωρίμανση του RNA και πιθανότατα με την συνάθροιση των συναφών ρυθμιστικών πρωτεϊνών.

Ακόμη, στις περιπτώσεις που χρησιμοποιήθηκαν αναστολείς των μεταφορέων της πλασματικής μεμβράνης ή υποστρώματά τους, δεν παρατηρήθηκε αναστολή του υποκυτταρικού εντοπισμού της φλαβονόλης. Καθώς ο πυρήνας αποτελεί ένα διακριτό υποκυτταρικό διαμέρισμα, αν η quercetin μεταφέρονταν με παθητική διάχυση, θα αναμενόταν εντονότερη συσώρευσή της στο κυτταρόπλασμα και ασθενέστερη στον πυρήνα.

Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η quercetin αλληλεπιδρά με συγκεκριμένα μακρομόρια, τα οποία εκφράζονται κυρίως σε μη διαιρούμενα κύτταρα και εντοπίζονται στους νεοσχηματιζόμενους ή ώριμους πυρηνίσκους.

Φθορισμό παρόμοιο με αυτόν της quercetin εμφάνισε και το εκχύλισμα από μονομερείς και σύμπλοκες πολυφαινόλες αφρώδους οίνου. Ωστόσο, επώση των κυττάρων είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση φθοριζόντων κοκκίων στο κυτταρόπλασμα, 1 h μετά την προσθήκη του εκχυλίσματος (Εικ. 3.4.1.). Αν και ασθενές, το σήμα ακολουθεί την πορεία του ενδοπλασματικού δικτύου, ενώ δεν παρατηρήθηκε πυρηνική χρώση. Το γεγονός αυτό αναδεικνύει την ειδικότητα της φλαβονόλης, ως προς την αλληλεπίδρασή της με διακριτές υποκυτταρικές δομές και τα αντίστοιχα μακρομόρια, καθώς και την ύπαρξη και πληθώρας μορίων στόχων για την οικογένεια των πολυφαινολών.



Εικόνα 3.4.14. Υποκυτταρικός εντοπισμός της quercetin κατά την διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης. Κύτταρα HepG2 επωάσθηκαν για 30 min με quercetin (3 μ M in PBS, πράσινο) και ακολούθησε χρώση των νουκλεϊκών οξέων με PI (κόκκινο). Ο συνεντοπισμός εμφανίζεται ως κίτρινο χρώμα. (A) Στην πρόφαση, η quercetin συσσωρεύεται ακόμη σε διακριτά πράσινα φθορίζοντα σωμάτια στον πυρήνα. Κατά την (B) μετάφαση, (C) την ανάφαση και (D) την τελόφαση οι χρωμοσωμικές περιοχές στερούνται φθορισμού. (E) Κατά την κυτοκίνηση, η quercetin επανασυσσωρεύεται στους θυγατρικούς πυρήνες (scale bar = 25 μ m).

Οι περισσότερες ουσίες εντοπίζουν τους στόχους τους εντός του πυρήνα μέσω τυχαίας διερεύνησης του χώρου και συνεχούς μη ειδικής-ειδικής αλληλεπίδρασης με πυρηνικά μακρομόρια (Gorski et al., 2006). Η σταθερά διάχυσης μικρών μορίων, τα οποία δεν προσδένονται στην χρωματίνη ή πυρηνικές δομές, όπως το GFP ή οι δεξτράνες είναι $\sim 10^{-10}$

100/ $\mu\text{m}^2 \cdot \text{sec}$, ανάλογα με το μέγεθος και το σχήμα τους (Gorisch et al., 2005; Seksek et al., 1997). Δεδομένης της τυχαίας κίνησης ενός μορίου στις τρεις διαστάσεις, μπορεί να διασχίσει έναν τυπικό πυρήνα εντός λίγων δευτερολέπτων και να τον εξευρενήσει ολόκληρο σε λιγότερο από ένα λεπτό. Σε αντίθεση με τα αδρανή μόρια, όσα διαθέτουν πυρηνικούς στόχους έχουν υποδεκαπλάσια έως υποεκατονταπλάσια κινητικότητα (Phair et al., 2004). Τα διαχεόμενα μόρια κατά την αλληλεπίδραση με τους στόχους τους ακινητοποιούνται για μικρό χρονικό διάστημα, κατά την διάρκεια του οποίου ασκούν τις βιολογικές τους δράσεις. Ακόμη και δομικά μόρια, όπως οι ιστόνες H1 και HP1, παραμένουν προσδεμένες στην χρωματίνη για λίγα δευτερόλεπτα. Αντιθέτως, οι ιστόνες H3, H4 και H2B, οι λαμίνες και οι πρωτεΐνες του NPCs παραμένουν ακινητοποιημένες (Kimura and Cook, 2001; Rabut et al., 2004). Κατά την μελέτη της κινητικής της quercetin, παρατηρήσαμε ότι ο φθορισμός είναι εντονότερος και παρατεταμένος στον πυρήνα, ανεξαρτήτως από την ενδοκυττάρια συγκέντρωση της φλαβονόλης ή την προσθήκη ανταγωνιστών της ενδοκυττώσεως ή εξωκυττώσεώς της. Τα δεδομένα μας συγκλίνουν στην ύπαρξη ενός μακρομορίου ή ενός συμπλόκου μακρομορίων, που υποβοηθά την συσσώρευσή της στους πυρηνίσκους. Το ερώτημα που προκύπτει είναι ποιο μόριο κατακρατεί την φλαβονόλη, μετά την είσοδό της στον πυρήνα.

3.5. ΤΑΧΕΙΑ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ QUERCETIN ΣΤΟΝ ΠΥΡΗΝΑ	201
3.5.1. Υποακετυλίωση του ογκογονιδίου p53	202
3.5.2. Ρύθμιση της μεταμεταγραφικής τροποποίησης των πυρηνικών πρωτεϊνών....	204
3.5.3. Ρύθμιση της γονιδιακής μεταγραφής	206
3.5.4. Συζήτηση.....	208

3.5. ΤΑΧΕΙΑ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ QUERCETIN ΣΤΟΝ ΠΥΡΗΝΑ

Δείξαμε, ότι η φλαβονόλη quercetin ενδοκυττώνεται ταχέως από τα επιθηλιακά κύτταρα και εντοπίζεται στους νεοσχηματιζόμενους ή ώριμους πυρηνίσκους. Εντούτοις, ο υποκυτταρικός της εντοπισμός κατά την διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης δεν αντιστοιχεί σε αυτόν καλά χαρακτηρισμένων πρωτεϊνών του πυρηνίσκου: οι τελευταίες μεταφέρονται από τα μητρικά στα θυγατρικά κύτταρα ως παροδικές δομές, όπως το περιχρωματινικό έλυτρο ή τα προπυρηνισκικά σωμάτια (Angelier et al., 2005; Dimario, 2004; Van Hooser et al., 2005), ενώ η quercetin διαχέεται στις εξωχρωματινικές περιοχές. Συνεπώς, η φλαβονόλη πιθανόν να σχετίζεται με την έναρξη της μεταγραφικής διαδικασίας και την συγκρότηση των σχετικών συμπλόκων πρωτεϊνών.

Πράγματι, η ανασταλτική δράση των πολυφαινολών στην ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων έχει αποδοθεί στην αλληλεπίδραση με τους μηχανισμούς αντιγραφής, ανασυνδυασμού, επιδιόρθωσης και μεταγραφής, όπως επίσης και τα αντίστοιχα ένζυμα ή το DNA. Μεταξύ των πρωτεϊνών, οι οποίες προτάθηκαν ως στόχοι της quercetin, συμπεριλαμβάνονται οι τοποϊσομεράσες I (εντοπίζεται κυρίως στους πυρηνίσκους) και II, η p19^{INK4} και η απακετυλάση SIRT1.

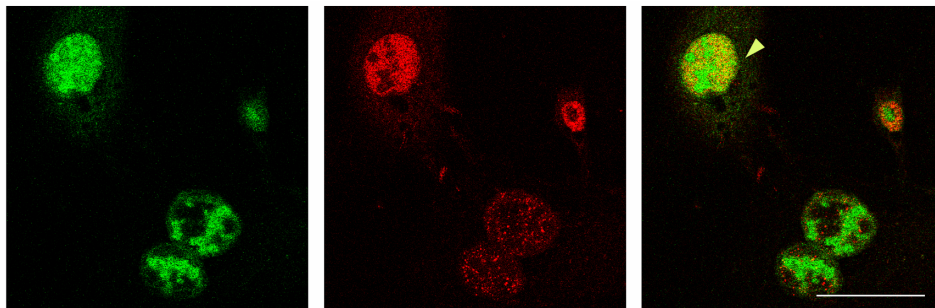
In vitro συγκριτικές μελέτες έδειξαν ότι τα φλαβονοειδή, μεταξύ των οποίων και η quercetin αποτελούν ισχυρούς αναστολείς των τοποϊσομερασών I ή/και II, είτε μέσω αναστολής της χάλυσης του DNA, είτε μέσω μονιμοποίησης του συμπλόκου σχάσης (poisoning) (Austin et al., 1992; Constantinou et al., 1995; Yamashita et al., 1990). Μόρια, τα οποία προσδένονται στην καταλυτική υπομονάδα των ενζύμων προλαμβάνουν τις βλάβες στο γενετικό υλικό, ενώ αυτά που παρεμβάλλονται στο DNA, όπως οι fisetin και quercetin, βρέθηκε να επάγουν την κατάτμηση των αλυσίδων του και κατ'επέκταση την δημιουργία μεταλλάξεων. Εντούτοις, εκτενής χάλυση ή σχάση του DNA δεν συμπεριλαμβάνονται στις πρώιμες δράσεις της quercetin σε κυτταρικά συστήματα, ούτε ανιχνεύθηκαν στην παρούσα εργασία. Επιπλέον, η δράση της φλαβονόλης στις τοποϊσομεράσες οφείλεται σε μόνιμη πρόσδεσή της στο DNA, γεγονός το οποίο αποδίδεται στην οξειδωμένη μορφή, κάτι το οποίο επίσης δεν παρατηρήθηκε στο δικό μας πειραματικό σύστημα.

Η quercetin έχει επίσης περιγραφεί ως υπόστρωμα της p19^{INK4} (Adams and Jia, 2005). Η p19^{INK4} είναι μία πυρηνική πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με την Bcl-2 και αναστέλλει την σηματοδότηση μέσω NFκB (Wendler et al., 1997). Εμφανίζει δομικές ομοιότητες με την φυτική 2,3-διοξυγενάση της quercetin και μπορεί να μεταβολίζει την φλαβονόλη σε 2-protocatechuoyl-phloro-glucinol carboxylic acid και CO (Adams and Jia, 2005). Εντούτοις, δεν ανιχνεύσαμε τέτοιους μεταβολίτες (Εικ. 3.4.11.), τουλάχιστον κατά την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.

3.5.1. Υποακετυλίωση του ογκογονιδίου p53

Πρόσφατα, προτάθηκε επίσης η αλληλεπίδραση ενός φάσματος πολυφαινολών (resveratrol, butein, isoliquiritigenin, fisetin, quercetin και riceatannol) με την NAD(+)-εξαρτώμενη (μη αποκρινόμενη σε TSA) απακετυλάση SIRT1, η οποία μιμείται την έλλειψη θρεπτικών (ενέργειας/θερμίδων) και επάγει την μακροβιότητα στον *C. elegans* (Howitz et al., 2003). Ιδιαίτερα η resveratrol ήταν εξίσου αποτελεσματική, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, στην ενίσχυση της ενεργότητας της SIRT1 και της απακετυλίωσης του ογκογονιδίου p53, αυξάνοντας την σταθερότητα του DNA και προωθώντας την κυτταρική επίβιωση.

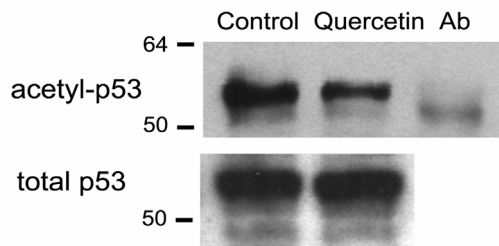
Εξετάσαμε καταρχήν, αν η quercetin συνεντοπίζεται στο πειραματικό μας σύστημα με την πρωτεΐνη SIRT1. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.5.1., σε αντίθεση με την πλειοψηφία των κυτταρικών σειρών, όπου η SIRT1 εντοπίζεται στους πυρηνίσκους, στα HepG2 ανιχνεύεται σε διακριτές δομές, οι οποίες προσομοιάζουν σε σωματίδια PML (Vaquero et al., 2004). Εντούτοις, σε κάποια κύτταρα, παρατηρείται μερικός συνεντοπισμός της απακετυλάσης και της φλαβονόλης.



Εικόνα 3.5.1. Κύτταρα HepG2 προεπώασθησαν με quercetin (3 μ M, πράσινο) για 20 min, μονιμοποιήθηκαν και υποβλήθηκαν σε άμεσο ανοσοφθορισμό με αντίσωμα έναντι της SIRT1 (κόκκινο). Ο συνεντοπισμός εμφανίζεται ως κίτρινο χρώμα. Η SIRT1 ανιχνεύεται σε υποπυρηνικά κοκκία και συνεντοπίζεται ελάχιστα (βέλος) με την φλαβονόλη (scale bar = 25 μ m).

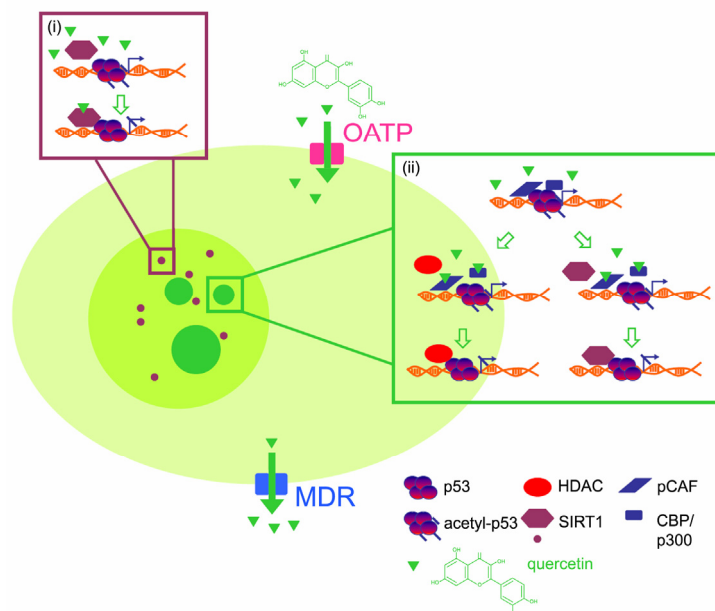
Εξετάσαμε στη συνέχεια, αν η quercetin επηρεάζει την ακετυλίωση του p53, ενός γνωστού υποστρώματος της SIRT1. Καλλιεργήσαμε τα ηπατοκύτταρα σε θρεπτικό με ορό, παρουσία quercetin (3 μ M), για 1 h και υπολογίσαμε τα επίπεδα του ακετυλιωμένου και ολικού p53 σε κυτταρικό εκχύλισμα. Παρά τον μερικό συνεντοπισμό της φλαβονόλης και της απακετυλάσης, η quercetin μείωσε αισθητά την απακετυλίωση του p53 (Εικ. 3.5.2.).

Η συνεργατική δράση της quercetin και της SIRT1 περιγράφονται συνοπτικά στην Εικόνα 3.5.3.: η φλαβονόλη θα μπορούσε να μειώσει τα επίπεδα ακετυλίωσης του p53 μέσω άμεσης ενεργοποίησης της SIRT1 (i), όπως έχει περιγραφεί για αρκετές πολυφαινόλες σε ανθρώπινα κύτταρα μετασχηματισμένα με αγρίου τύπου ή θετικά υπολειπόμενη μορφή (dominant-negative) της SIRT1 (Howitz et al., 2003). Τα ομόλογα της *sir2* εντοπίζονται



Εικόνα 3.5.2. Η quercetin (3 μM) επάγει μερική απακετυλίωση του p53, 1 h μετά την προσθήκη της σε κύτταρα HepG2.

στους πυρηνίσκους και ρυθμίζουν την επιγενετική απενεργοποίηση των επαναλαμβανόμενων rDNA, ελαττώνοντας την παραγωγή αντιγράφων τους, και αυξάνουν την διάρκεια ζωής των κυττάρων. Ένας τρόπος δράσης τους είναι η αντιστροφή της σηματοδότησης μέσω FOXO, από αποπτωτικές διαδικασίες προς διαδικασίες ανοχής παρουσία παραγόντων stress (Giannakou and Partridge, 2004). Πράγματι, ενεργοποίηση των sirtuins από την resveratrol είχε ως αποτέλεσμα την πυρηνική μετατόπιση του FoxO1 (Frescas et al., 2005). Επιπροσθέτως, η SIRT1 θα μπορούσε να επηρεάσει την ακετυλίωση του p53, όπως παρουσιάζεται εδώ και να τροποποιήσει περαιτέρω εξωγενείς ή ενδογενείς αποπτωτικές διαδικασίες (Yu and Zhang, 2005). Εναλλακτικά, η quercetin θα μπορούσε να αλληλεπιδρά με άλλους μετα-μεταγραφικούς συν-ενεργοποιητές του p53, όπως οι ακετυλάσες CBP/p300 και PML (Bernardi et al., 2004) (Εικ. 3.5.3.ii). Στην περίπτωση αυτή, η quercetin θα μπορούσε να υποβοηθή την απομάκρυνση του p53 από τους πυρηνίσκους και να αυξάνει την διαθεσιμότητά του για την SIRT1 (Langley et al., 2002).



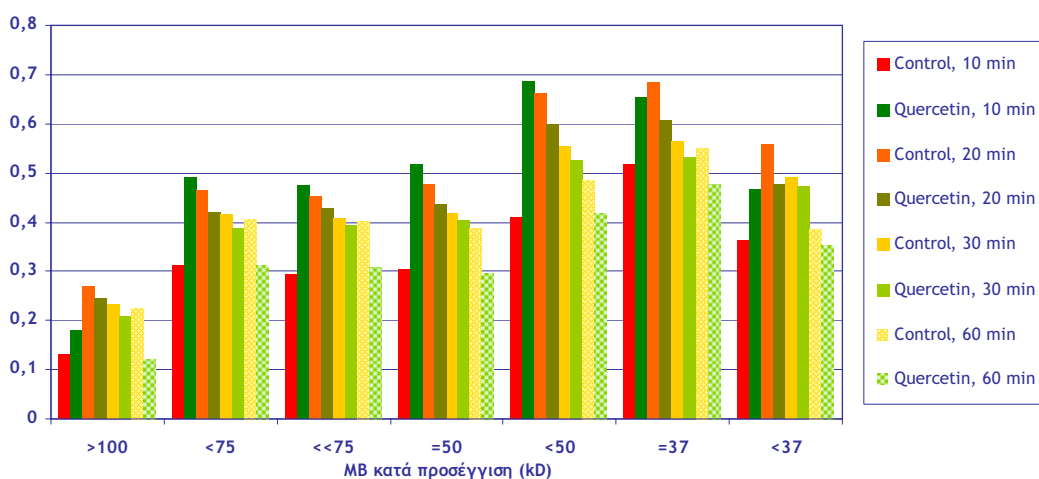
Εικόνα 3.5.3. Πιθανοί μηχανισμοί δράσης της quercetin στην μετα-μεταγραφική τροποποίηση του p53: (i) η quercetin θα μπορούσε να αλληλεπιδρά άμεσα με την SIRT1 και να ενεργοποιεί την υποακετυλίωση του p53. (ii) εναλλακτικά, η quercetin θα μπορούσε να αναστρέψει την δράση του PML, απελευθερώνοντας τα σύμπλοκα ακετυλοτρανσφερασών από την έλικα του DNA και διευκολύνοντας την πρόσβαση των απακετυλασών στο σημείο της μεταγραφής.

Λαμβάνοντας υπόψιν τον ρόλο της μετα-μεταγραφικής τροποποίησης του p53 στον καθορισμό της πορείας των κυττάρων, υποθέσαμε ότι η επαγωγή της υποακετυλίωσής του από την quercetin θα οδηγούσε σε επαγωγή της επιβίωσης των κυττάρων. Εντούτοις, μακροχρόνια επώαση (3 μέρες) των κυττάρων με quercetin οδήγησε όπως δείξαμε σε απόπτωση (Εικ. 3.1.2). Πρόσφατα, ανακοινώθηκε ότι οι απακετυλάσες HDACs (αποκρινόμενες σε TSA) αλληλεπιδρούν με την SIRT1 (μη αποκρινόμενη σε TSA) για την ρύθμιση της κυτταρικής επιβίωσης (Solomon et al., 2006). Οι πολυφαινόλες, μέσω οξειδοαναγωγικών μηχανισμών, εμπλέκονται στην ενεργοποίηση των απακετυλασών HDAC (Rahman et al., 2004), γεγονός το οποίο θα μπορούσε να αξιοποιηθεί στην αντιμετώπιση χρόνιας φλεγμονής, την αναστροφή του οξειδωτικού stress και την διάσωση μεταλλαγμένων φαινοτύπων (Parker et al., 2005). Παρατηρήσαμε ότι η quercetin, μετά από βραχύβια επώαση, αναστρέφει την επαγόμενη από TSA απόπτωση στα HepG2. Καθώς η SIRT1 και το υπόστρωμά της p53 έχουν εμπλακεί εκτενώς στην απόκριση σε στρες, συμπεράναμε ότι η quercetin θα μπορούσε να επάγει την κυτταρική επιβίωση στις περιπτώσεις όπου τα κύτταρα εκτίθενται σε οξύ ή χρόνιο στρες. Στην δράση αυτή εμπλέκεται και η πρωτεΐνη Ref-1, μία ενδονουκλεάση (A/P), η οποία ελέγχει την ενεργοποίηση λανθανόντων μορίων p53, όπως επίσης και του ενεργοποιημένου ογκογονιδίου, ανάλογα με το οξειδοαναγωγικό δυναμικό (Gaiddon et al., 1999).

3.5.2. Ρύθμιση της μεταμεταγραφικής τροποποίησης των πυρηνικών πρωτεϊνών

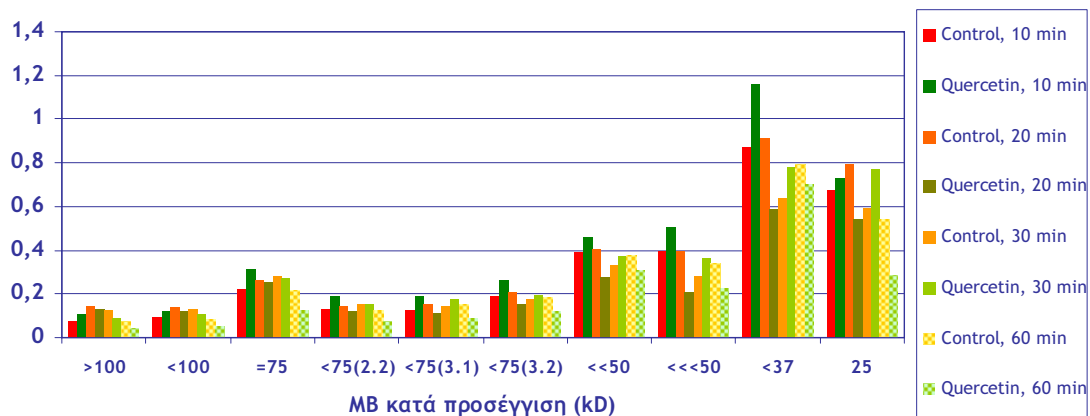
Εκτός από την ταχεία υποακετυλίωση του p53, η quercetin βρέθηκε να τροποποιεί ταχύτητα μετά την εφαρμογή της την φωσφορυλίωση ή ακετυλίωση πυρηνικών πρωτεϊνών.

Κύτταρα HepG2 καλλιεργήθηκαν για 2 hrs σε θρεπτικό RPMI και κατόπιν επωάστηκαν σε θρεπτικό RPMI με 10% FBS, παρουσία quercetin 3 μ M ή 0,3 % αιθανόλη για 10-60 min. Στην συνέχεια, εκκυλίστηκαν οι πυρηνικές πρωτεΐνες, διαχωρίστηκαν σε πηκτή ακρυλαμίδης, ακολούθησε ανοσοεντύπωμα για φωσφορυλιωμένες ομάδες τυροσίνης ή ακετυλιωμένες ομάδες και υπολογίστηκε η σχετική ένταση κάθε ζώνης. Επειδή, τα αντισώματα αναγνωρίζουν πληθώρα πρωτεϊνών, επιλέξαμε να αναλύσουμε τις πλέον διακριτές ζώνες-πρωτεΐνες. Σε γενικές γραμμές, η quercetin φαίνεται να επάγει τόσο την ακετυλίωση, όσο και την φωσφορυλίωση των τυροσινών. Ανάλογο αποτέλεσμα έχει και η προσθήκη ορού στα κύτταρα, η δράση της φλαβονόλης όμως φαίνεται να προηγείται. Όσον αφορά στην φωσφορυλίωση, παρουσία quercetin παρατηρείται ενεργοποίηση εντός των πρώτων 10 min και επαναφορά στα βασικά επίπεδα μετά την 1 h (Εικ. 3.5.4.).



Εικόνα 3.5.4. Επαγωγή της φωσφορυλίωσης τυροσινών, μετά από επώαση κυττάρων HepG2 με 3 μ M quercetin για 10-60 min.

Στην περίπτωση της ακετυλίωσης, κάποιες πρωτεΐνες με μοριακό βάρος < 75 kD, φαίνεται να υφίστανται δύο κύκλους ακετυλίωσης-απακετυλίωσης κατά την διάρκεια της πρώτης ώρας εφαρμογής του φλαβονοειδούς. Με το πέρας της πρώτης ώρας, παρατηρείται χαμηλότερη απακετυλίωση σε σχέση με τα βασικά επίπεδα (Εικ. 3.5.5.).



Εικόνα 3.5.5. Επαγωγή της ακετυλίωσης, μετά από επώαση κυττάρων HepG2 με 3 μ M quercetin για 10-60 min.

Βάσει των γενικών αυτών παρατηρήσεων, υποθέσαμε ότι η quercetin επηρεάζει αμέσως μετά την είσοδο της πληθώρα μορίων, εκτός του p53.

3.5.3. Ρύθμιση της γονιδιακής μεταγραφής

Δείξαμε ότι η quercetin συσσωρεύεται στον πυρήνα, ελάχιστα λεπτά μετά την προσθήκη της στα κύτταρα, όπου και ρυθμίζει την κυτταρική σηματοδότηση. Η δράση αυτή είναι δυνατό να ρυθμίζει περαιτέρω την γονιδιακή μεταγραφή και ενισχύεται από τον εντοπισμό της φλαβονόλης στους πυρηνίσκους, το ενεργότερο μεταγραφικά σημείο του κυττάρου.

Προκειμένου να διαπιστώσουμε αν η παρουσία της quercetin έχει επιπρόσθετο λειτουργικό ρόλο στην γονιδιακή ρύθμιση, μελετήσαμε την ποιοτική και ποσοτική έκφραση του γονιδιώματος με την βοήθεια συστοιχιών μικροανιχνευτών (microarrays). Χρησιμοποιήθηκε ολικό εκκύλισμα RNA από κύτταρα HepG2, τα οποία καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό RPMI/10% FBS, παρουσία 3 μM quercetin ή 0,3 % αιθανόλης, για 2, 4 και 8 hrs. Μετά την υβριδοποίηση των δειγμάτων, ακολούθησε ανάλυση του σήματος φθορισμού και κανονικοποίηση.

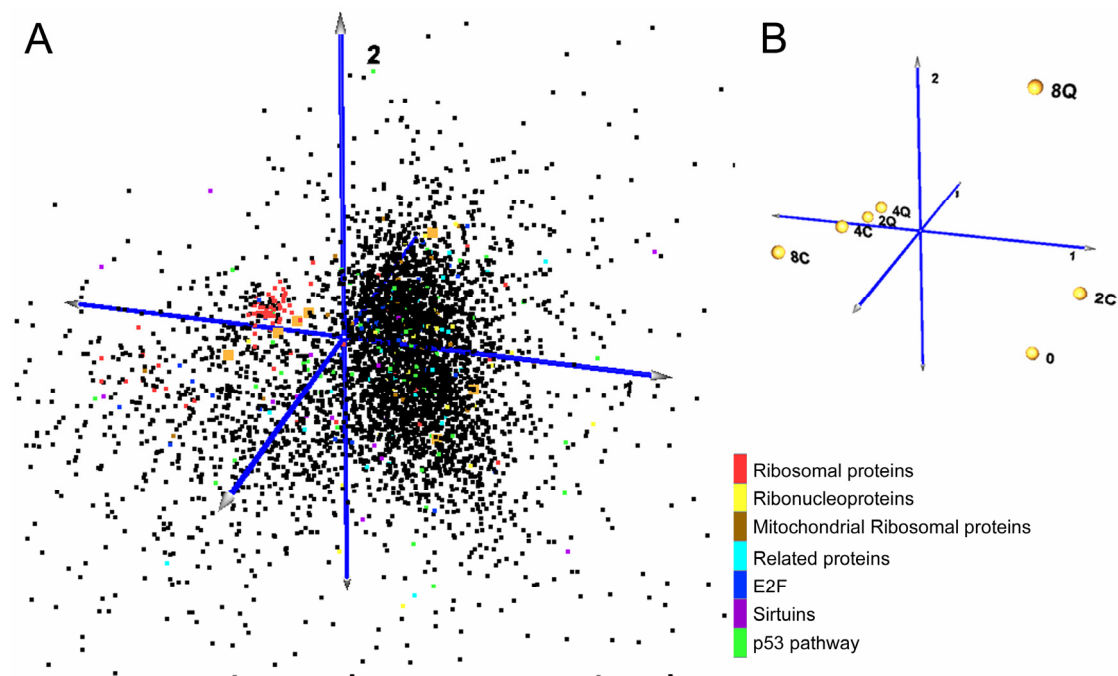
Εστίασαμε καταρχήν στην ανάλυση των γονιδίων που σχετίζονται με το p53, καθώς η quercetin επάγει ταχεία απακετυλίωσή του, 1 h μετά την εφαρμογή της. Με την βοήθεια του συστήματος ταξινόμησης Panther (Applied Biosystems, <http://www.pantherdb.org>) αναλύσαμε τα γονίδια που έχουν περιγραφεί ότι επάγονται ή καταστέλλονται σε απόκριση στο ογκογονίδιο p53. Κατά την διάρκεια των 8 πρώτων ωρών δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην έκφρασή τους. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει τις προηγούμενες παρατηρήσεις μας: η ενεργοποίηση αυτού του μονοπατιού από την quercetin φαίνεται ότι διαμεσολαβεί την διάσωση των κυττάρων μόνον υπό ακραίες συνθήκες.

Τα γονίδια, των οποίων η μεταβολή ήταν στατιστικά σημαντική, αναλύθηκαν με την βοήθεια Ανάλυσης Ανταπόκρισης (COrrrespondance Analysis, COA) και υπολογίσθηκε η αδράνεια (Inertia) του συστήματος (Πίν. 3.5.1.).

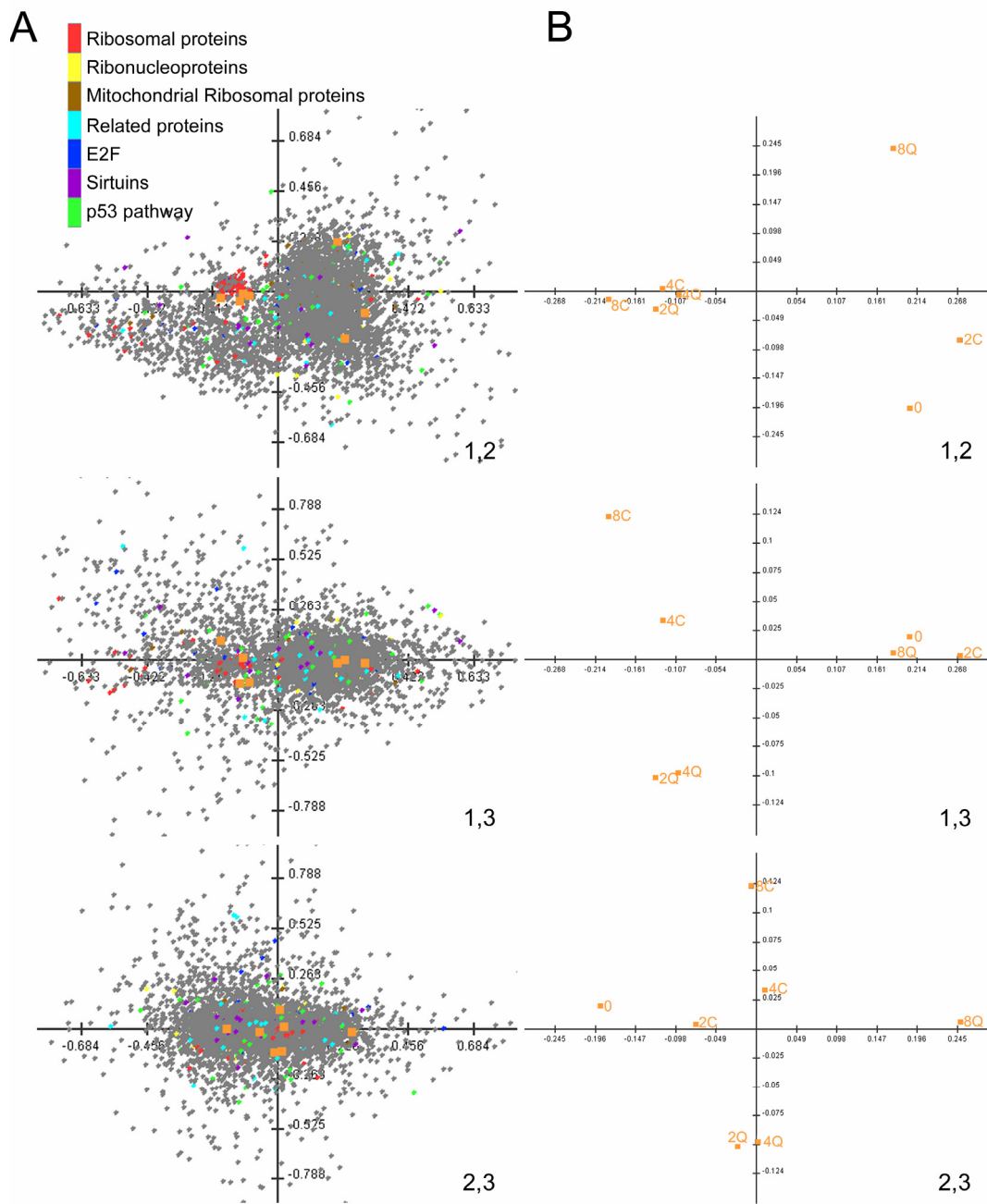
Πίνακας 3.5.1. Αδράνεια του «συστήματος» κυττάρων HepG2, τα οποία καλλιεργήθηκαν παρουσία quercetin (3 μM) ή μάρτυρα για 2-8 h.

Άξονας	Inertia (%)	Cumulative Inertia (%)
1	51.247068860432314	51.247068860432314
2	23.56669613337981	74.81376499381213
3	8.684335148260798	83.49810014207293
4	6.155636607682385	89.65373674975531
5	5.494896069961541	95.14863281971685
6	4.851367180283147	100.0
7	1.3872506506134373E-28	100.0

Οι συσχετίσεις μεταξύ των δειγμάτων εξαντλούνται σε 6 άξονες eigen. Οι τρεις πρώτοι χρησιμοποιήθηκαν για την απεικόνιση των συσχετισμών, μεταξύ των δειγμάτων και των γονιδίων, ανάλογα με τον χρόνο και την παρουσία της φλαβονόλης (Εικ. 3.5.6.). Ενδιαφέρον είναι ότι η quercetin επάγει παροδικά την έκφραση μεγάλου αριθμού ριβοσωμικών πρωτεϊνών, κατά την διάρκεια των πρώτων 4 ωρών εφαρμογής της. Μάλιστα, η συνολική εικόνα των δειγμάτων δείχνει ότι η φλαβονόλη μετατοπίζει την κυτταρική απόκριση, συμπεριφερόμενη ως τροφικός παράγων· το μεταγραφικό πρότυπο των κυττάρων που έχουν εκτεθεί σε quercetin προηγείται αυτό των κυττάρων μάρτυρων: 2Q, 4C, 4Q και 8C ομαδοποιούνται (Εικ. 3.5.7. και 3.5.8., επίπεδο 1,2).



Εικόνα 3.5.7. Ανάλυση με COA της επίδρασης της quercetin (3 μ M) στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης στα HepG2, μετά από 2-8 h αγωγής. (A) Τρισδιάστατη απεικόνιση των δειγμάτων (πορτοκαλί) και των γονιδίων (υπόμνημα) βάσει των τιμών αδράνειας (inertia). Αναλύθηκαν τα γονίδια των οποίων η έκφραση διαφοροποιείται (αυξάνεται ή μειώνεται) σημαντικά ($p < 0,01$) σε σχέση με τον μάρτυρα. (B) Τρισδιάστατη απεικόνιση των δειγμάτων βάσει της αδράνειας. Το πρότυπο έκφρασης των ριβοσωμικών πρωτεϊνών (κόκκινο) ομαδοποιείται με τα δείγματα από κύτταρα που έχουν εκτεθεί σε φλαβονόλη για 2-4 h (2Q και 4Q, αντιστοίχως) και τα δείγματα μάρτυρα (4-8 h, 4C και 8C αντιστοίχως). Ο συσχετισμός είναι μεγαλύτερος για τα δείγματα 2Q, 4Q και 4C.



Εικόνα 3.5.8. Ανάλυση με COA της επίδρασης της quercetin (3 μM) στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης στα HepG2, μετά από 2-8 h αγωγής. (A) Δισδιάστατη απεικόνιση των δειγμάτων (πορτοκαλί) και των γονιδίων (υπόμνημα) βάσει των τιμών αδράνειας (inertia). Αναλύθηκαν τα γονίδια των οποίων η έκφραση διαφοροποιείται (αυξάνεται ή μειώνεται) σημαντικά ($p < 0,01$) σε σχέση με τον μάρτυρα. (B) Δισδιάστατη απεικόνιση των δειγμάτων.

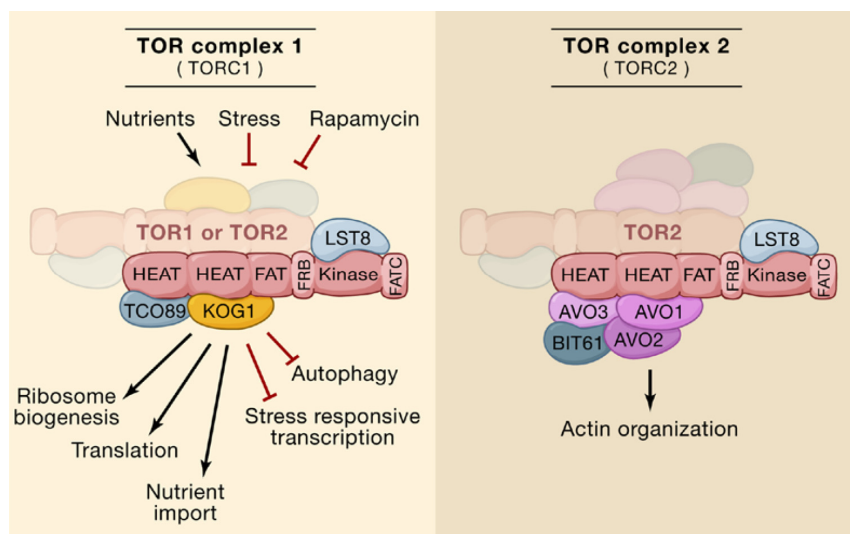
3.5.4. Συζήτηση

Ανάλογες πρόσφατες μελέτες έδειξαν με τη βοήθεια μικροσυστοιχιών, ότι η quercetin ρυθμίζει μακροπρόθεσμα την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, την κυτταρική διαφοροποίηση, την απόπτωση και την προσκόλληση σε συγκεντρώσεις 5-50 μM , μετά από 48ωρη επώαση κυττάρων Caco-2 (van Erk et al., 2005). Αντίστοιχες μεταβολές παρατηρήθηκαν στην σειρά αδενοκαρκινώματος παχέος εντέρου CO115, μετά από επίδραση με 100 μM quercetin για 24 και 48 hrs (Murtaza et al., 2006). Στις σειρές προστάτου PC-3, DU-145 και LNCaP, η φλαβονόλη (25 μM , 24 hrs), ανέστειλε την έκφραση των πρωτεϊνών που ελέγχουν την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου (Nair et al., 2004), με εξαίρεση το γονίδιο CUL4B, το οποίο σχετίζεται με την αποικοδόμηση μέσω ουβικουϊτίνης και υπερεκφράζεται σε καρκινικούς ιστούς (Hori et al., 1999). Τα δεδομένα που αφορούν στην βραχυπρόθεσμη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης από τις πολυφαινόλες είναι ελάχιστα. Συγκριτική ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης με μικροσυστοιχείες σε καρκινικές σειρές μαστού, θετικές (MCF-7, T47-D και ZR-75-1) ή αρνητικές (MDA-MB-231, MDA-MB-435 και Hs578T) για τον ER, μετά από επώαση με οιστρογόνα για 2-48 hrs, έδειξε την ταχεία επαγωγή των γονιδίων E2IG4, IGFBP4, SLC2A1, XBP1, B4GALT1, AFG3L1 και EEIG1 (Wang et al., 2004). Εντούτοις, τα παραπάνω γονίδια εμφάνισαν ασθενή απόκριση στα φυτοοιστρογόνα genistein και β -sitosterol (100 μM). Τα αποτελέσματα αυτά πιθανόν να οφείλονται στην δόση και την διάρκεια των επιδράσεων (Shioda et al., 2006). Πράγματι, απόκριση αντίστοιχη με αυτή της E_2 (10 nM) παρατηρήθηκε μετά από 72 hrs επώασης με 10 μM genistein, daidzein, glycitein, biochanin A, ipriflavone, chrysin, luteolin, apigenin, kaempferol, quercetin, coumestrol, naringenin και phloretin σε κύτταρα μαστού MCF-7 (Ise et al., 2005).

Στην παρούσα μελέτη, η φλαβονόλη quercetin χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 5 μM , συμβατή με αυτή στην οποία απαντάται στα βιολογικά υγρά και ικανή να καταστέλλει μακροπρόθεσμα (6 ημέρες αργότερα) τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων της σειράς HepG2. Στην συγκέντρωση αυτή, η φλαβονόλη μετέβαλε την έκφραση γονιδίων που επηρεάζουν την σηματοδότηση, την κυτταρική ομοιόσταση, την επιβίωση και την μετανάστευση (περίπου 4500 ικνηθέτες) κατά την διάρκεια των πρώτων 8 hrs. Ανάλυση των δεδομένων με COA έδειξε ότι η βραχυπρόθεσμη δράση της quercetin χαρακτηρίζεται από μαζική επαγωγή της έκφρασης των ριβοσωμικών πρωτεϊνών (Εικ. 3.5.7-8.).

Η βιογένεση των ριβοσωμάτων αποτελεί θεμελιώδη διαδικασία κατά την διάρκεια της κυτταρικής ανάπτυξης, είτε πρόκειται για το μέγεθος ενός μεμονωμένου κυττάρου είτε το «μέγεθος»-αριθμό ενός κυτταρικού πληθυσμού. Η σύνθεση ριβοσωμικών πρωτεϊνών καλύπτει περίπου το ήμισυ της δραστηριότητας της RNA πολυμεράσης Pol II και ελέγχεται από την σηματοδότηση μέσω TOR (Target Of Rapamycin) και την στρατολόγηση των μεταγραφικών παραγόντων Rap1, Fhl1 και Ifh1 (Schawalder et al., 2004).

Η σηματοδότηση μέσω TOR περιλαμβάνει δύο διακριτές κινάσες σερίνης/θρεονίνης, τις TOR1 (ευαίσθητη σε rapamycin) και TOR2, οι οποίες ρυθμίζουν αντιστοίχως την μεταβολική ομοίωση (ριβογένεση, μεταγραφή, μεταφορά θρεπτικών) ή την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης ((Wullschlegler et al., 2006), Εικ. 3.5.9.). Οι TOR εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα και αποκρίνονται σε παράγοντες ανάπτυξης (growth factors), όπως ο IGF, η περίσσεια θρεπτικών, κυρίως αμινοξέων, και η διαθεσιμότητα ATP/AMP. Περιβαλλοντικοί στρεσογόνοι παράγοντες, ιδίως η υποξία και η έλλειψη ενέργειας, αναστρέφουν προσωρινά την σηματοδότηση και οδηγούν μακροπρόθεσμα σε αυτοφαγία. Για τον λόγο αυτό, κατά την διάρκεια του stress, παρατηρείται ταυτόχρονη και ισχυρή καταστολή της σύνθεσης όλων των ριβοσωμικών πρωτεϊνών.



Εικόνα 3.5.9. Σηματοδότηση μέσω TOR (Wullschlegler et al., 2006).

Ωστόσο, ο θερμιδικός περιορισμός βρέθηκε να αναστρέφει την επαγωγή γονιδίων που σχετίζονται με την γήρανση στους σκελετικούς μύες· η αναπροσαρμογή της μεταγραφικής ρύθμισης χαρακτηρίζεται από προώθηση του κυτταρικού μεταβολισμού, αυξημένη βιοσύνθεση και ανακύκλιση των πρωτεϊνών (reviews in Park and Prolla, 2005). Επιπροσθέτως, στην *Drosophila*, εξάλειψη της ιστόνης H1 ή της ριβοσωμικής πρωτεΐνης L11 από την ετεροχρωματίνη επάγει καθολική αύξηση της έκφρασης των ριβοσωμικών πρωτεϊνών (Ni et al., 2006), ενώ υπό συνθήκες stress, η αναίρεση της αναστολής της RNA πολυμεράσης Pol I διεγείρει την ενεργοποίηση της Pol II (Laferte et al., 2006). Σε κύτταρα θηλαστικών, η SIRT1 επάγει την απακετυλίωση των ιστονών και την συσσώρευση της H1 στην ευχρωματίνη, με τελικό αποτέλεσμα την ετεροχρωματινοποίηση (Vaquero et al., 2004). Εντούτοις, δεν έχει διεκρινισθεί αν και κατά πόσον η quercetin θα μπορούσε να αλληλεπιδράσει με τους ενδοκυττάριους αισθητήρες διαθεσιμότητας τροφής και ενεργειακού δυναμικού και να προκαλέσει αντίστοιχες τροποποιήσεις. Η quercetin, αν και βρέθηκε να ενισχύει την δραστικότητα της SIRT1, δεν είχε θετική επίδραση στην

χρονολογική γήρανση των κυττάρων (chronological aging) (Howitz et al., 2003). Η αλληλεπίδραση των μονοπατιών SIRT1 και TOR θα μπορούσε να εξηγήσει την υπό συνθήκες δράση της quercetin, όπως επίσης και την πιθανή εμπλοκή της στην «αντιγραφική» γήρανση (replicative aging).

Οι ανώτεροι οργανισμοί έχουν εκτεθεί πολλαπλώς στις πολυφαινόλες, ενώ οι επιδημιολογικές μελέτες συγκλίνουν στην ευεργετική τους δράση, ανεξαρτήτως της ασθένειας ή της κατάστασης που μελετάται. Δείξαμε, ότι ο σύντομος ενδοκυττάριος κύκλος ζωής της quercetin σε βιολογικά σημαντικές (=φυσιολογικές) συγκεντρώσεις, περιλαμβάνει την προσωρινή παραμονή τους στους πυρηνίσκους, όπου ρυθμίζει τον μεταβολισμό του RNA. Δεδομένης της συνεχούς παρουσίας των πολυφαινολών στα βιολογικά υγρά, είναι εξαιρετικά ενδιαφέρον, το γεγονός ότι ένα μικρό μόριο έχει την ικανότητα να συμπεριφέρεται ως τροφικός παράγων και να υπερκεράζει την αυξημένη διαθεσιμότητα θρεπτικών, ή ακόμη και να παραπλανά ένα βιολογικό σύστημα σε περίπτωση στερήσεώς τους. Τα δεδομένα μας καταδεικνύουν τον ενεργό ρόλο των πολυφαινολών στην διαμόρφωση του κυτταρικού μεταβολισμού, χωρίς να αποκλείουν την ταυτόχρονη ρύθμιση των μηχανισμών που ελέγχουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

3.6. Επίδραση των πολυφαινολών σε μη νεοπλαστικά κύτταρα	215
3.6.1. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός	215
3.6.2. Αντιοξειδωτική δράση.....	216
3.6.3. Προστασία από την υπεριώδη ακτινοβολία	217
3.6.4. Αλκάλωση.....	219
3.6.5. Κυτταρική μετανάστευση	219

3.6. Επίδραση των πολυφαινολών σε μη νεοπλαστικά κύτταρα

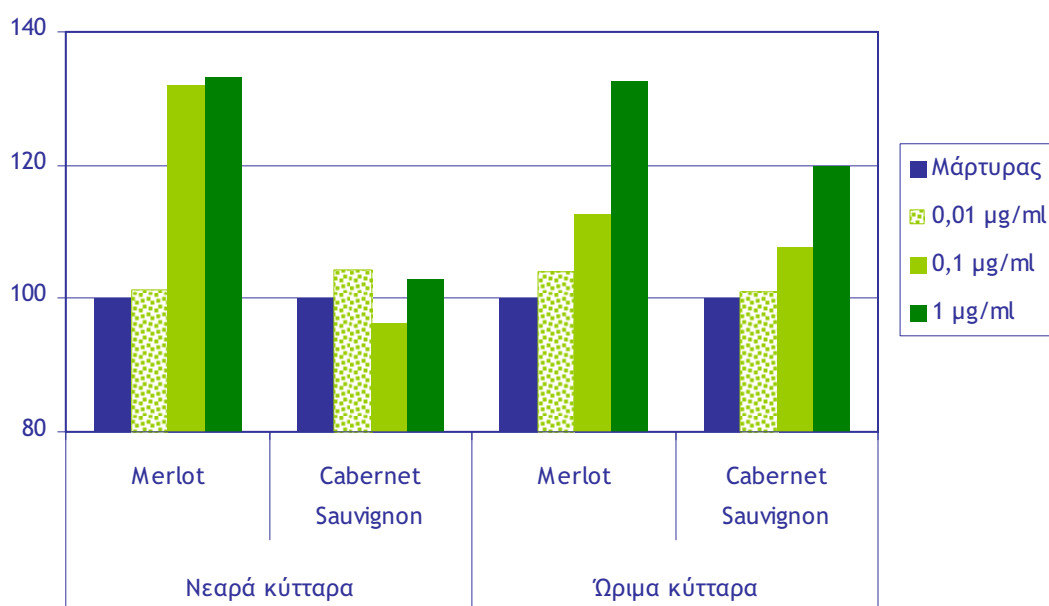
Οι πολυφαινόλες έχει αναφερθεί ότι ευνοούν την ανάπτυξη των φυσιολογικών κυττάρων και ιστών σε αντίθεση με τα νεοπλασματικά κύτταρα. Προκειμένου, να διαπιστώσουμε τον διττό τους ρόλο, μελετήσαμε την δράση τους σε «φυσιολογικά» κύτταρα.

Επιλέξαμε την ανθρώπινη κυτταρική σειρά HaCaT. Πρόκειται για αυθορμήτως αθανатоποιημένα κερατινοκύτταρα, τα οποία αν και εμφανίζουν ανευπλοειδίες, συμπεριφέρονται ανάλογα με τα φυσιολογικά, τόσο σε *in vitro* καλλιέργειες (Boukamp et al., 1988), όσο και σε μεταμοσχεύσεις τους σε αθυμικούς επίμυες (Breitkreutz et al., 1998), χωρίς να εξελίσσονται σε νεοπλασματικά. Αν και δεν έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται και να οργανώνουν *in vitro* πολύστοιβα επιθήλια, αποτελούν ένα από τα πλέον αξιόπιστα συστήματα μελέτης ευαισθησίας ή τοξικότητας σε περιβαλλοντικούς παράγοντες.

Χρησιμοποιήσαμε επίσης διαφορετικά εκχυλίσματα ολικών πολυφαινολών από δύο διαφορετικές ποικιλίες σταφυλιών: α) Merlot και β) Cabernet Sauvignon σε συγκεντρώσεις 0,1-10 µg/ml.

3.6.1. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός

Όπως δείξαμε οι πολυφαινόλες επηρεάζουν την γονιδιακή ρύθμιση και πιθανόν ρυθμίζουν την ενδοκυττάρια σηματοδότηση η οποία σχετίζεται με την κυτταρική γήρανση. Για τον λόγο αυτό, ελέγξαμε την δράση των εκχυλισμάτων ολικών πολυφαινολών σε νεαρά και ώριμα (γηρασμένα) κερατινοκύτταρα.



Εικόνα 3.6.1. Επίδραση πολυφαινολικών εκχυλισμάτων σταφυλιών στον πολλαπλασιασμό κερατινοκυττάρων της σειράς HaCaT.

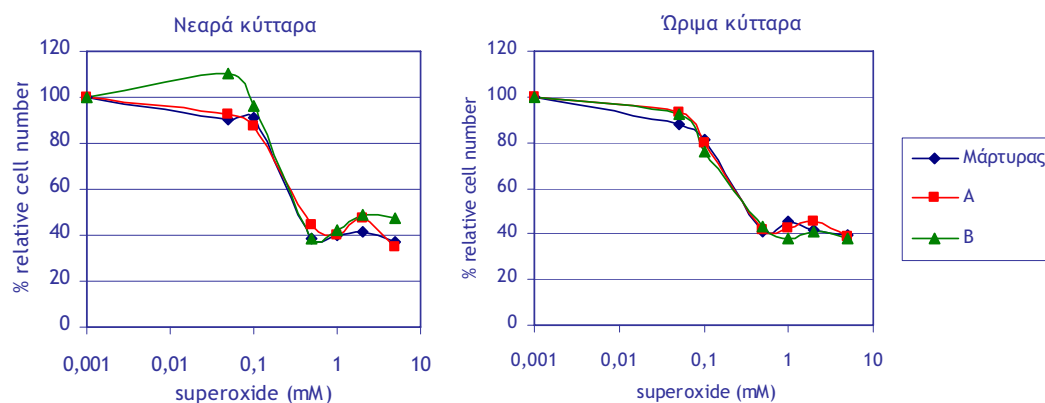
Όπως φαίνεται στην Εικ. 3.6.1., μόνο το εκκύλισμα Α ευνόησε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των νεαρών κερατινοκυττάρων σε συγκεντρώσεις > 0,1 µg/ml. Η απόκριση των κυττάρων στην συγκέντρωση 1 µg/ml ήταν η μέγιστη, ενώ δεν παρατηρήθηκαν διαφοροποιήσεις στα 10 µg/ml. Αντιθέτως, στην περίπτωση των ωρίμων κερατινοκυττάρων και τα δύο εκκυλίσματα προώθησαν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Το εκκύλισμα Α προκάλεσε δόσοεξαρτώμενη απόκριση στις συγκεντρώσεις 0,1-10 µg/ml. Το εκκύλισμα Β, αν και «ανενεργό» στις χαμηλές συγκεντρώσεις, είχε το ίδιο αποτέλεσμα στα 10 µg/ml. Σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρα, η μέγιστη αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού κυμάνθηκε στο 60% και ήταν εντονότερη σε σχέση με αυτή που παρατηρήθηκε σε νεαρά κερατινοκύτταρα (40%).

Τα δεδομένα μας καταδεικνύουν την θετική συμβολή των εκκυλισμάτων στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ιδίως σε αυτόν των ωρίμων κερατινοκυττάρων.

3.6.2. Αντιοξειδωτική δράση

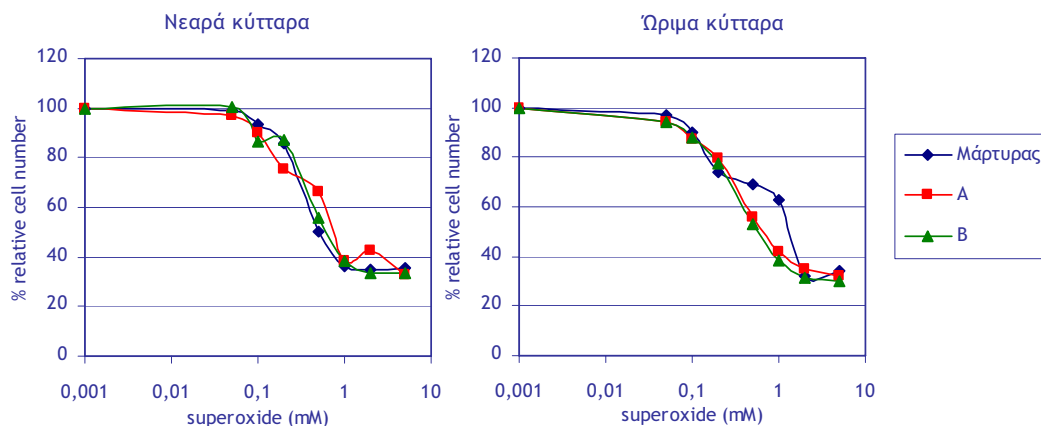
Ελέγξαμε στην συνέχεια την αντιοξειδωτική-προστατευτική δράση των εκκυλισμάτων (10 µg/ml) στην επιβίωση των κερατινοκυττάρων μετά την εφαρμογή κυμαινόμενης συγκεντρώσεως H₂O₂ (0,05-5 mM).

Στην περίπτωση που προηγήθηκε 24ωρη προεπάση με τα εκκυλίσματα πολυφαινολών, δεν παρατηρήθηκε αντιοξειδωτική δράση, με εξαίρεση το εκκύλισμα Β, στα νεαρά κερατινοκύτταρα (Εικ. 3.6.2.).



Εικόνα 3.6.2. Αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών μετά από 24ωρη επώαση.

Ανάλογα, στην περίπτωση της ταυτόχρονης προσθήκης των πολυφαινολών και του H₂O₂, δεν παρατηρήθηκε αντιοξειδωτική δράση (Εικ. 3.6.3.). Χαρακτηριστικό είναι ότι τα γηρασμένα κερατινοκύτταρα στα οποία χορηγήθηκαν πολυφαινόλες ήταν πιο ευπαθή στην οξειδωτική δράση του H₂O₂.

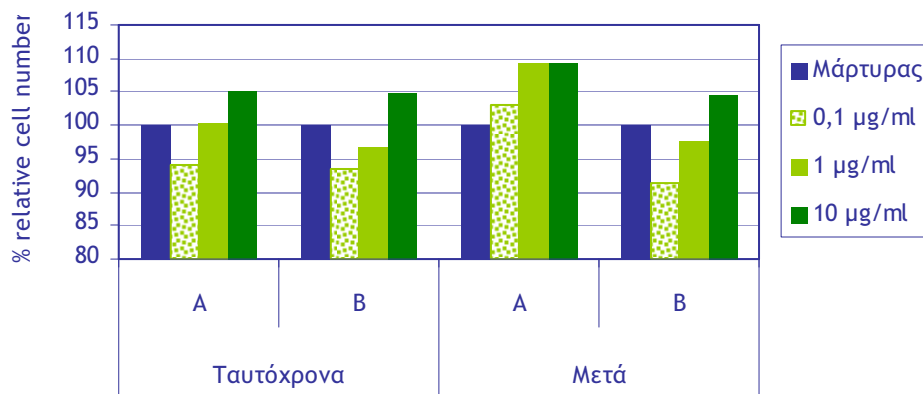


Εικόνα 3.6.3. Άμεση αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών παρουσία H_2O_2 .

3.6.3. Προστασία από την υπεριώδη ακτινοβολία

Εξετάσαμε επιπλέον, αν τα εκχυλίσματα πολυφαινολών προστατεύουν τα κερατινοκύτταρα μετά την εφαρμογή υπεριώδους ακτινοβολίας. Οι ουσίες προστέθηκαν στα κύτταρα είτε πριν είτε μετά την έκθεση σε UV, προκειμένου να ελεγχθεί η άμεση ή μακροπρόθεσμη δράση τους αντιστοίχως.

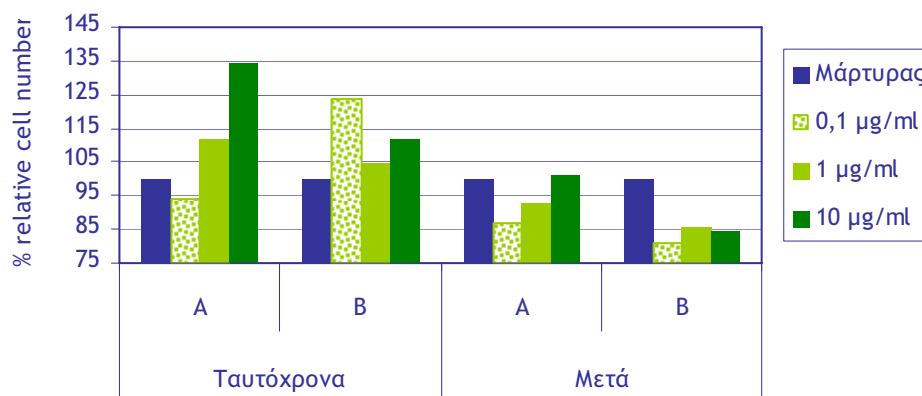
Στα νεαρά κερατινοκύτταρα, οι πολυφαινόλες δεν εμφάνισαν άμεση προστατευτική δράση. Εντούτοις, όταν τα εκχυλίσματα προστέθηκαν μετά την επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας το εκχύλισμα A ευνόησε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Εικ. 3.6.4.).



Εικόνα 3.6.4. Επίδραση των πολυφαινολών στην ανάκαμψη των νεαρών κερατινοκυττάρων ανάλογα με την εφαρμογή τους ταυτόχρονα ή μετά την έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία.

Αντιθέτως, στα γηραδιά κερατινοκύτταρα και τα δύο εκχυλίσματα εμφάνισαν άμεση δράση (Εικ. 3.6.5.). Η εφαρμογή του εκχυλίσματος A προκάλεσε δοσοεξαρτώμενη απόκριση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Το εκχύλισμα από σταφύλια Cabernet Sauvignon ευνόησε ελαφρώς την κυτταρική επιβίωση, αν και η δράση του ήταν εντονότερη στην μικρότερη συγκέντρωση (0,1 µg/ml). Η εφαρμογή των εκχυλισμάτων μετά την επίδραση της

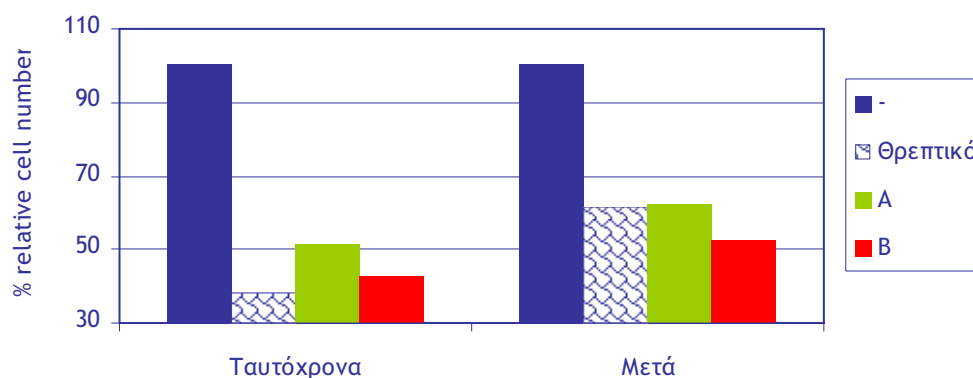
υπεριώδους ακτινοβολίας δεν ευνόησε την επιβίωση των γηραιών κυττάρων, τουναντίον είχε μάλλον συνεργατικό αποτέλεσμα στην επαγωγή της κυτταρικής απόπτωσης.



Εικόνα 3.6.5. Επίδραση των πολυφαινολών στην ανάκαμψη των γηραιών κερατινοκυττάρων ανάλογα με την εφαρμογή τους ταυτόχρονα ή μετά την έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία.

Στο σύνολό τους, τα δεδομένα μας περιγράφουν την θετική δράση του ολικού πολυφαινολικού εκχυλίσματος όταν αυτό χορηγείται μετά την επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας στα νεαρά κερατινοκύτταρα ή άμεσα στα γηραιά.

Πρέπει να σημειωθεί ότι η επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας ελάττωσε κατά 60% τον αριθμό των κυττάρων σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρα, στην περίπτωση όπου εξετάστηκε η άμεση δράση, και κατά 40%, όταν ελέγχθηκε η μακροπρόθεσμη δράση (Εικ. 3.6.6.), κατά συνέπεια το σύνηθες θρεπτικό μέσο μπορεί μέχρις ένα βαθμό (~20%) να βοηθήσει στην κυτταρική ανάκαμψη.



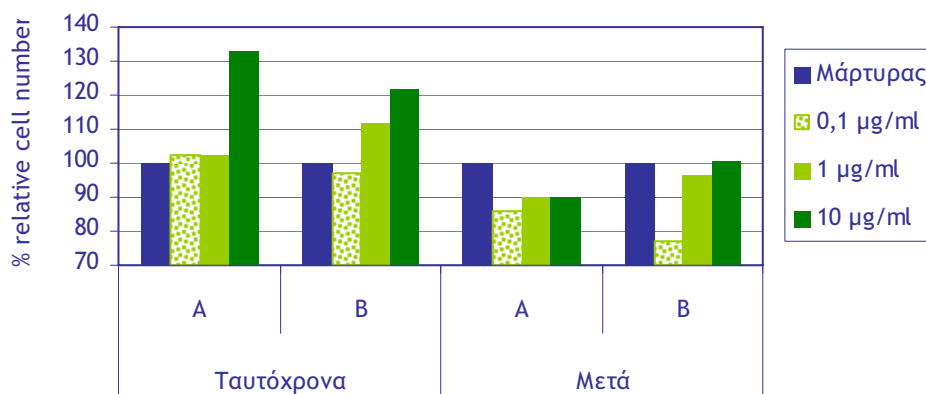
Εικόνα 3.6.6. Συγκριτική δράση των πολυφαινολών και του συμβατικού θρεπτικού καλλιέργειας στην ανάκαμψη των κερατινοκυττάρων ανάλογα με την εφαρμογή τους ταυτόχρονα ή μετά την έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (-, κύτταρα τα οποία δεν έχουν εκτεθεί σε UV).

Η προσθήκη ολικών πολυφαινολικών εκχυλισμάτων ταυτόχρονα με την ακτινοβολία πιθανόν υποκαθιστά την απουσία-καταστροφή στοιχείων του θρεπτικού. Επιπλέον, καθώς οι σύμπλοκες πολυφαινόλες απορροφούν την ακτινοβολία, πιθανόν η δράση των εκχυλισμάτων οφείλεται σε αυτή την ιδιότητα και όχι στην απενεργοποίηση των παραγομένων ελευθέρων ριζών.

3.6.4. Αλκάλωση

Η αλκάλωση αποτελεί μία μορφή οξειδωτικού stress, καθώς σχετίζεται με αυξημένη διαθεσιμότητα O₂. Πειραματικά, η κατάσταση αυτή μπορεί να επιτευχθεί με την καλλιέργεια των κερατινοκυττάρων σε ατμοσφαιρικό αέρα χωρίς την προσθήκη CO₂. Η διαφοροποίηση της παροχής O₂/CO₂ οδηγεί σε αλλαγή του εκχυλίσματος pH και οξειδωτικό stress.

Σε αυτό το πειραματικό μοντέλο, τα πολυφαινολικά εκχυλίσματα εμφάνισαν αντιοξειδωτική δράση, όταν χορηγήθηκαν λίγο πριν την έκθεση σε περιβάλλον χωρίς CO₂, ενώ δεν είχαν κανένα αποτέλεσμα μετά το οξειδωτικό stress (Εικ. 3.6.7.). Το εκχύλισμα Merlot (A) ήταν εξαιρετικά αποτελεσματικό μόνο σε υψηλή συγκέντρωση (10 µg/ml), ενώ η δράση του Cabernet Sauvignon στην κυτταρική ανάκαμψη ήταν δόσοεξαρτώμενη.

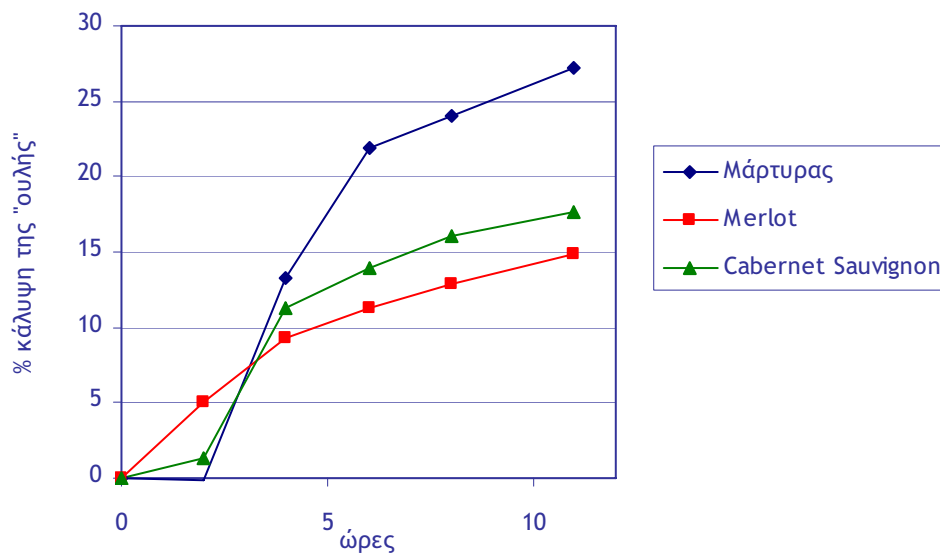


Εικόνα 3.6.7. Επίδραση των πολυφαινολών στην ανάκαμψη των κερατινοκυττάρων ανάλογα με την εφαρμογή τους ταυτόχρονα ή μετά την έκθεση σε αλκαλικό περιβάλλον (περίσσεια O₂).

3.6.5. Κυτταρική μετανάστευση

Η κυτταρική μετανάστευση είναι προαπαιτούμενο κατά την επούλωση των τραυμάτων. Καθώς οι πολυφαινόλες ενίσχυσαν σε γενικές γραμμές τον πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων, εξετάσαμε κατά πόσον ευνοούν και την μετανάστευσή τους. Χρησιμοποιήθηκαν στοιβάδες κερατινοκυττάρων, όπου δημιουργήθηκε μία λεπτή ασυνέχεια και υπολογίστηκε ο χρόνος καλύψεώς της από τα γειτονικά κύτταρα. Τόσο στα νεαρά όσο και στα γηραιά κύτταρα, και τα δύο εκχυλίσματα καθυστέρησαν την «επούλωση» της ασυνέχειας, αν και το εκχύλισμα A φαίνεται να ευνόησε παροδικά (2 h) την μετανάστευση των γηραιών κερατινοκυττάρων (Εικ. 3.6.8.). Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε αντιδιαστολή και την επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Συνολικά, παρατηρούμε ότι οι πολυφαινόλες είναι ικανές να προάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ενώ μειώνουν την μεταστατικότητα. Σε ένα φυσιολογικό σύστημα, η ισορροπία των φαινομένων αυτών ρυθμίζει και αποτρέπει την δημιουργία ουλών. Επιπλέον, τα εκχυλίσματα σταφυλιών δεν ήταν ικανά να αποτρέψουν την αντιοξειδωτική δράση του H₂O₂, προστάτευσαν όμως από την αλκάλωση του θρεπτικού. Τα δεδομένα μας υποστηρίζουν την ήπια αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών, καθώς η παραγωγή των οξειδωτικών ριζών κατά την μεταφορά των κυττάρων σε περιβάλλον μειωμένου CO₂, είναι



Εικόνα 3.6.8. Επίδραση των πολυφαινολών στην μετανάστευση των κερατινοκυττάρων.

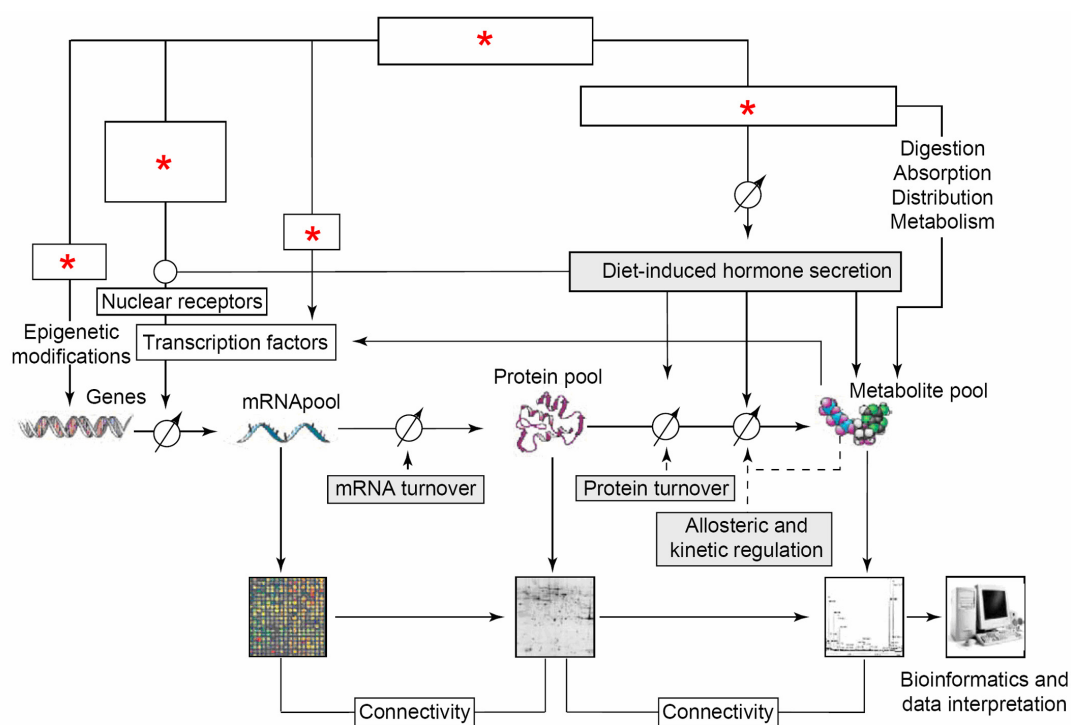
βραδύτερη και λιγότερο επιβλαβής σε σχέση με τις οξειδωτικές βλάβες του H_2O_2 . Η ευεργετική δράση των πολυφαινολών σε κύτταρα επιδερμίδος κατά την έκθεση σε UVB έχει δειχθεί *in vivo* και σχετίζεται με μείωση της φλεγμονής και ελαττωμένο κυτταρικό θάνατο (Katiyar et al., 1999). Επίσης, πρόσφατα δείχθηκε ότι τέτοιου είδους δράσεις διαμεσολαβούνται από τις NOS και την ελαττωμένη παραγωγή NO (Song et al., 2006), κατ'αντιστοιχία με την αποτελέσματά μας στις κυτταρικές σειρές μαστού και προστάτου.

Η σημαντικότερη παρατήρηση αφορά στην διαφορετική δράση των πολυφαινολών σε νεαρά και γηραιά κερατινοκύτταρα. Τα νεαρά κύτταρα εμφανίζουν υψηλότερο δείκτη ανάπτυξης και πιθανόν τον μέγιστο στις συνθήκες που καλλιεργούνται. Για τον λόγο αυτό, οι πολυφαινόλες, ευνοούν περισσότερο, υπό συστατικές συνθήκες, την ανάπτυξη των ωρίμων κυττάρων. Αντιθέτως, τόσο το οξειδωτικό stress, όσο και η υπεριώδης ακτινοβολία φαίνεται να λειτουργούν συνεργατικά με την ηλικία των κυττάρων, ώστε να επιτείνουν την ευαισθησία τους. Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω αποτελέσματα, αλλά και τις βιοχημικές αλλαγές που προκύπτουν μετά την επίδραση με μεμονωμένες πολυφαινόλες, προτείνουμε ότι οι πολυφαινολικές ουσίες είναι δυνατόν να ελέγχουν την κατάσταση-δυναμικό ενός κυττάρου και μέσω διαλογής να επάγουν επιλεκτικά την κυτταρική απόπτωση ή επιβίωση. Κατά συνέπεια, η δράση τους σε έναν κυτταρικό πληθυσμό δεν είναι ομοιόμορφη.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι πολυφαινόλες αποτελούν μία πολυπληθή οικογένεια διατροφικών παραγόντων φυτικής προελεύσεως. Πέραν των αντιοξειδωτικών τους ικανοτήτων, εμφανίζουν μία σειρά δράσεων, όπως αναστολή των κινασών και των τοποϊσομερασών, ενεργοποίηση των απακετυλασών και ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, μέσω των αλληλουχιών πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων NFκappaB ή AP-1, καθώς και αλληλουχιών απόκρισης σε ξενοβιοτικά. Εντούτοις, η μελέτη τους εμφανίζει τρία βασικά προβλήματα. Καταρχήν, οι πολυφαινόλες εμφανίζουν μικρή βιοδιαθεσιμότητα σε ανθρώπους ή ζώα, θέτοντας εν αμφιβόλω την βιολογική σημασία της *in vitro* πειραματικής τους δράσης σε υψηλές συγκεντρώσεις. Δεύτερον, ορισμένες δράσεις σε απομονωμένα συστήματα (υποδοχείς, ένζυμα ή μεταγραφικούς παράγοντες) δεν επιβεβαιώνονται απολύτως σε κύτταρα και τέλος, λόγω της έλλειψης τεχνικών, είναι δύσκολο να διεκρινισθεί, αν αφενός οι ουσίες αυτές εισέρχονται στα κύτταρα και κατ'έπείτασιν αν συνεντοπίζονται με τα μόρια-στόχους τους.

Στην παρούσα μελέτη, εξετάσαμε την δράση μονομερών και συμπλόκων πολυφαινολών σε συγκεντρώσεις (10^{-6} - 10^{-12} M) που απαντώνται φυσιολογικά στο πλάσμα μετά την κατανάλωση τροφών πλουσίων σε αυτές. Δεδομένης της πολυπλοκότητας της δράσης των πολυφαινολών και εν γένει των διατροφικών παραγόντων, η πειραματική προσέγγιση περιελάμβανε τον έλεγχο της επίδρασης των ουσιών στην λειτουργικότητα *in vitro* και *in vivo* συστημάτων σε διαφορετικά επίπεδα, όπως φαίνεται στο ακόλουθο σχήμα (Rist et al., 2006):



Καταρχήν, παρατηρήσαμε ότι τόσο οι μονομερείς, όσο και οι σύμπλοκες πολυφαινόλες, απορροφώνται άμεσα μετά την κατανάλωσή τους σε υγιή υποκείμενα ή κυτταρικές σειρές ενδοθηλιακού τύπου (προστάτου, μαστού, ήπατος και φαιοχρωμοκυττώματος), όπου

μπορούν να ανιχνευθούν αντιστοίχως μέσω της αυξήσεως της αντιοξειδωτικής ικανότητας του ορού ή με την βοήθεια αναλυτικών τεχνικών και μικροσκοπίας. Τα δεδομένα μας συμφωνούν με πρόσφατες αναφορές σχετικά με ταχεία απορρόφηση πολυφαινολών και την ανίχνυσή τους στον εγκέφαλο ακόμη και 15 min μετά την ενδογαστρική χορήγησή τους (Passamonti et al., 2005). Ιδιαίτερα σε ότι αφορά στην κατανομή των πολυφαινολών σε υποκυτταρικό επίπεδο, η ανίχνυσή τους γίνεται άμεσα με αναλυτικές τεχνικές ή ραδιοσημασμένα ανάλογα, ή έμμεσα με την παρατήρηση ενζυμικών ή βιολογικών δράσεων. Στην παρούσα εργασία, αξιοποιήσαμε τον φθορισμό μεμονωμένων πολυφαινολών, προκειμένου να μελετήσουμε αναλυτικά τον υποκυτταρικό τους εντοπισμό και τον συσχετισμό του με πιθανές βιολογικές δράσεις. Μεταξύ των μορίων που ελέγχθηκαν, η φλαβονόλη quercetin (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone) εμφανίζει φθορίζουσες ιδιότητες, ειδικές για την ενδοκυττωμένη και μη υποκατεστημένη μορφή της. Ο φθορισμός αυτός (485 nm_{ex}/500-540 nm_{em}) μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο για την ενδοκυττάρια ανίχνυσή της. Επιπροσθέτως, σε αντίθεση με προηγούμενες μελέτες (Bohl et al., 2005; Kuo, 1996; Lancon et al., 2004), δείξαμε ότι οι πολυφαινόλες ενδοκυττώνονται σε υπομικρομοριακές συγκεντρώσεις από μονόστοιβα επιθήλια, όπου και συσσωρεύονται προσωρινά.

✓ Η απορρόφηση των πολυφαινολών είναι ταχεία, ανεξαρτήτως από την *in vitro* ή *in vivo* χορήγησή τους και υποδηλώνει την ύπαρξη αντιστοίχων βραχυπρόθεσμων δράσεων, πέραν της μακροπρόθεσμης ρύθμισης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Παρά τις υπάρχουσες *in vitro* παρατηρήσεις για μη αντιστρεπτή πρόσδεση των πολυφαινολών σε μακρομόρια, περαιτέρω πειράματα έδειξαν ότι η quercetin δεν λειτουργεί ως παρενθέτης (intercalator), αλλά συσσωρεύεται προσωρινά στα κύτταρα. Η ενδοκύττωση της quercetin συνοδεύεται από την άμεση συσσώρεσή της στους πυρηνίσκους.

✓ Κατά την διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης, η φλαβονόλη δεν συνεντοπίζεται με συμπυκνωμένη χρωματίνη.

✓ Κατά την μεσόφαση εντοπίζεται αποκλειστικά στους νεοσχηματισμένους ή ώριμους πυρηνίσκους. Το φαινόμενο παρατηρείται σε όλες τις κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

✓ Σύμπλοκες πολυφαινόλες αφρώδους οίνου εμφανίζουν επίσης φθορίζουσες ιδιότητες, αλλά εντοπίζονται αποκλειστικά ως κυτταροπλασματικά κοκκία (Εικ. 3.4.1.). Το γεγονός αυτό αναδεικνύει την διαφορετική συμπεριφορά των πολυφαινολών, μετά την ενδοκύττωσή τους, και την ύπαρξη πληθώρας μακρομορίων τα οποία μπορούν να χρησιμεύσουν ως ενδοκυττάρια στόχοι-σηματοδότες σε απόκριση σε αυτές.

✓ Ακόμη, η πρόσδεση των πολυφαινολών στην αλβουμίνη δεν σχετίζεται με την διαμεμβρανική μεταφορά τους, αλλά με την προστασία τους στα βιολογικά υγρά.

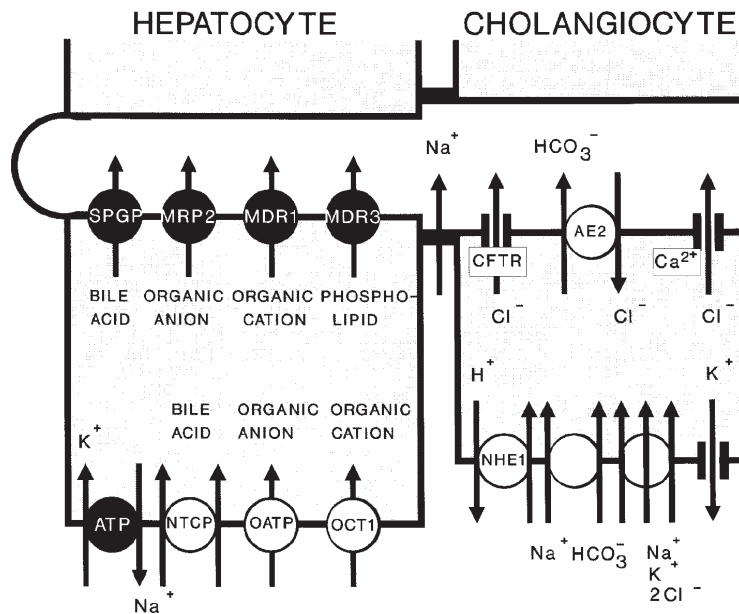
Σε ανάλογες μελέτες στα κύτταρα Caco-2 βρέθηκε ότι η quercetin συσσωρεύεται και υδρολύεται (Boyer et al., 2004), ενώ στην σειρά HepG2 παρατηρήθηκε η σύνθεση ενός *O*-μεθυλιωμένου μεταβολίτη (isorhamnetin) μετά από 8 hrs και στην συνέχεια οξειδωτική αποικοδόμηση της φλαβονόλης σε καρβοξυλικά οξέα, κυρίως protocatechuic acid (Boulton et al., 1999). Η παραγωγή 3'-*O*-methyl quercetin έχει δειχθεί επίσης σε κύτταρα φακού (Cornish et al., 2002) και στο πλάσμα αρουραίων, 30 min μετά από παρεντερική χορήγηση (Sesink et al., 2005). Ωστόσο, δεν έχει αναφερθεί παραγωγή πολυμερισμένων μορίων. Στο σύστημά μας, δεν παρατηρήθηκε οξείδωση, αλλά διμερισμός και εκτεταμένη μεθυλίωση του φλαβονοειδούς (έως 40% της προσλαμβανόμενης ποσότητας). Σύμφωνα με τα δεδομένα αυτά, οποιαδήποτε ταχεία δράση θα πρέπει να αποδοθεί στην μη οξειδωμένη και μη υποκατεστημένη μορφή του μορίου.

Η μεταφορά της quercetin είναι ενεργητική και διαμεσολαβείται από συστατικά εκφραζόμενους μεμβρανικούς διαύλους (Εικ. 4.1.), οι οποίοι ευθύνονται για την ενδοκύττωση των οργανικών ανιόντων και για την εξωκύττωση των ξενοβιοτικών.

✓ Η ενδοκύττωση της quercetin μέσω των αντλιών OATP -μία οικογένεια μορίων που μεταφέρουν αμφίφιλες ενώσεις, όπως μη συζευγμένα χολικά άλατα και στεροειδή, χολερυθρίνη, λευκοτριένια, ολιγοπεπτίδια και σε μικρότερο βαθμό οργανικά κατιόντα- θα μπορούσε να αξιοποιηθεί στην ρύθμιση της απορροφήσεως των χολικών οξέων και στην θεραπεία της υπερχοληστερολαιμίας.

✓ Η κινητική της φλαβανόλης τροποποιείται παρουσία άλλων πολυφαινολικών μορίων, γεγονός το οποίο υποδηλώνει ότι μοιράζονται από κοινού τους ίδιους μηχανισμούς μεταφοράς. Κατά συνέπεια, και άλλα μόρια της υπεροικογένειας των πολυφαινολών θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν σε κλινικό επίπεδο.

✓ Η αυξημένη συγγένεια της quercetin για τις αντλίες της οικογένειας ABC θα μπορούσε να υποβοηθήσει την δράση ενός μεγάλου φάσματος θεραπευτικών ουσιών, όπως τα αντιβιοτικά και οι αντικαρκινικοί παράγοντες, αυξάνοντας την βιοδιαθεσιμότητά τους, καθώς επίσης και την ενδοκυττάρια συγκέντρωσή τους. Ιδιαίτερη σημασία έχει η δράση των πολυφαινολών σε καρκινικά κύτταρα, καθώς τα πλέον επιθετικά και μεταστατικά υπερεκφράζουν τις συγκεκριμένες αντλίες και είναι εξαιρετικά ανθεκτικά στα συνήθη θεραπευτικά σχήματα.



Εικόνα 4.1. Τα ηπατοκύτταρα εκφράζουν στην βασική και κορυφαία τους μεμβράνη υποδοχείς που διαμεσολαβούν αντιστοίχως την απελευθέρωση και την πρόσληψη οργανικών ανιόντων, κατιόντων και ξενοβιοτικών (Zsembery et al., 2000). Τα κύτταρα HepG2 εκφράζουν τις ισομορφές OATP-A, OATP-D, OATP-E, OATP-8, MRP1, MRP2 και MRP3 (Lee et al., 2001).

Η quercetin συγκεντρώνει εξαιρετικό ενδιαφέρον στην μελέτη των πολυφαινολών, καθώς απαντάται σε υψηλές συγκεντρώσεις στην πλειοψηφία των εδωδιμών φυτών και εκχυλισμάτων τους. Για το λόγο αυτό μελετήσαμε τις ταχείες δράσεις που μπορεί να επιφέρει. Οι πιθανοί πυρηνικοί της στόχοι δεν είναι γνωστοί, ωστόσο προεπίσχεση των κυττάρων με Ακτινομυκίνη D (Εικ. 3.4.13.B&D) έχει ως αποτέλεσμα την ανίχνευση της φλαβονόλης σε μικρότερα πυρηνικά σωμάτια, θετικά για τον δείκτη των πυρηνίσκων φιβριλλαρίνη, επιβεβαιώνοντας την εκλεκτικότητά της. Μεταξύ των πρωτεϊνών που έχουν περιγραφεί ως στόχοι της quercetin είναι η απακετυλάση SIRT1 (δεν καταστέλλεται από την TSA).

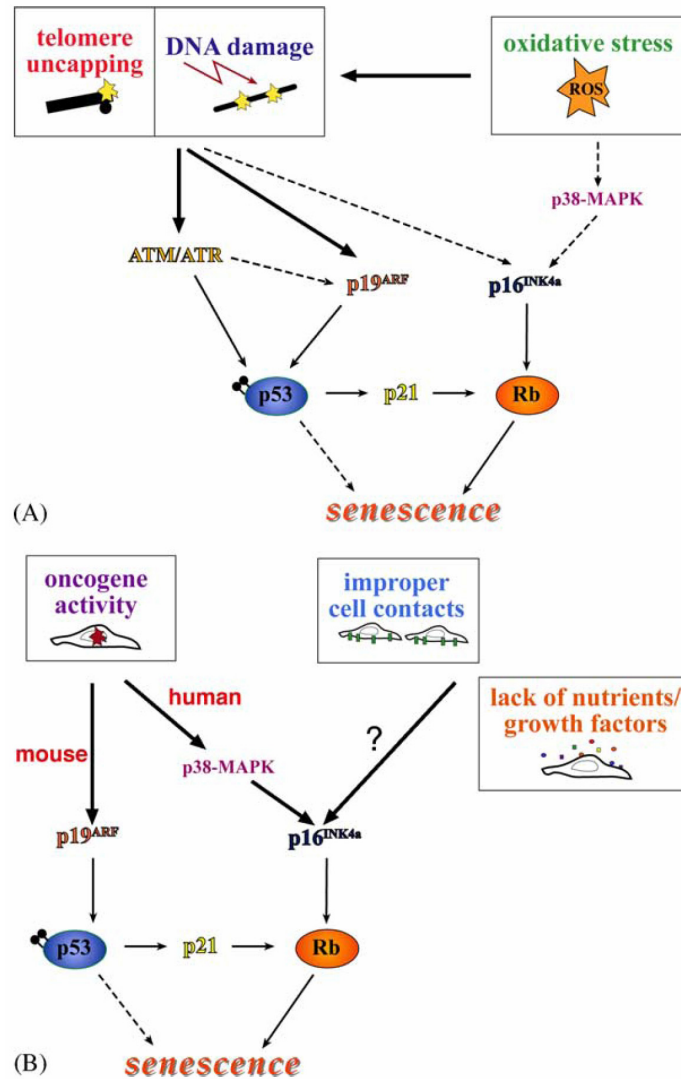
✓ Αν και τα δύο μόρια δεν συνεντοπίζονται πλήρως (Εικ. 3.5.1.), επώαση των ηπατοκυττάρων για 1 h με την φλαβονόλη επάγει ισχυρά την απακετυλίωση του p53, του κυριότερου ενδοκυττάρου στόχου της SIRT1. Η απακετυλίωση του p53 πιθανόν να εμπλέκει και άλλα ένζυμα (Εικ. 3.5.3.), καθώς η φλαβονόλη αναστρέφει την δράση του γενικού αναστολέα της απακετυλίωσης TSA (Trichostatin A). Εντούτοις, παρά την εκτεταμένη εμπλοκή της SIRT1 και του p53 στην απόκριση σε στρες, η quercetin μακροπρόθεσμα προκάλεσε μακροπρόθεσμα μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Πίν. 3.1.1.), κατ'αναλογία με τις resveratrol, catechin και epicatechin, αλλά και τις διμερείς φλαβονόλες B2 και B5. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η συμμετοχή του υποακετυλιωμένου p53 στην σηματοδότηση της quercetin αποτελεί την μία όψη της δράσης της και πιθανόν σχετίζεται με την διάσωση ή την ανάκαμψη των κυττάρων, όταν εκτίθενται σε ακραίες συνθήκες. Πράγματι, τα πειραματικά δεδομένα σχετικά με την δράση των

πολυφαινολών σε αθανατοποιημένα κερατινοκύτταρα (μη νεοπλασματικά) έδειξε ότι επάγουν ή αποτρέπουν κατά περίπτωση την διάσωση των νεαρών και γηραιών κυττάρων ή τον πολλαπλασιασμό.

Η πρωτεΐνη p53 σε συνδυασμό με την Rb ενεργοποιούνται στα πρώιμα στάδια της κυτταρικής γήρανσης. Το p53 σταθεροποιείται και ενεργοποιεί περαιτέρω το p21CIP1/WAF1 (Kulju and Lehman, 1995), ενώ το Rb απαντάται στην ενεργή (υποφωσφορυλιωμένη του μορφή) και αναστέλλει την έκδραση των γονιδίων στόχων των μεταγραφικών παραγόντων E2F (Narita et al., 2003). Πειραματικές μελέτες σε ανθρώπινους ινοβλάστες έδειξαν ότι για την πρόληψη της γήρανσης είναι απαραίτητη η απενεργοποίηση και των δύο μορίων (p53 και Rb) (Smogorzewska and de Lange, 2002) · απενεργοποίηση ενός εκ των δύο, καθυστερεί απλώς την διαδικασία. Η συμπληρωματικότητα που παρατηρείται στο ανθρώπινο είδος (σε αντίθεση με την γραμμική ενεργοποίηση των μορίων στον επίμου) προσφέρει επιπλέον προστασία, σε περίπτωση παράκαμψης της κυτταρικής γήρανσης και της αναστροφής του κυτταρικού φαινοτύπου. Ακόμη, η απενεργοποίηση του p53 σε κύτταρα τα οποία βρίσκονται σε όψιμη γήρανση, επιτρέπει την ανάκαμψή τους, την αύξηση και διαίρεση (Beausejour et al., 2003). Η δράση αυτή προσομοιάζει στο αποτέλεσμα των εκχυλισμάτων σταφυλιών στα γηραιά κερατινοκύτταρα.

Η κυτταρική γήρανση συνοδεύεται επίσης από αυξημένη προσκόλληση των κυττάρων στην εξωκυττάρια ουσία και απώλεια των διακυτταρικών συνδέσμων. Τα κύτταρα μπορούν να παραμείνουν για αρκετό καιρό στην κατάσταση αυτή, χωρίς όμως να διαιρούνται. Μέχρις ένα βαθμό, το φαινόμενο μπορεί να παραλληλισθεί με την αποπτωτική διαδικασία και αποκρίνεται σε πληθώρα ερεθισμάτων (Εικ. 4.2.) (Ben-Porath and Weinberg, 2005).

✓ Οι πολυφαινόλες (nM) εμφανίζουν μακροπρόθεσμη ανασταλτική δράση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και προκαλούν εκτεταμένες τροποποιήσεις στον πολυμερισμό της ακτίνης. Το ογκογονίδιο p53 έχει επίσης δειχθεί ότι επηρεάζει την σηματοδότηση μέσω των Rho και την μεταστατικότητα των καρκινικών κυττάρων (Roger et al., 2006). Πιθανόν, η αποακετυλίωσή του από τις πολυφαινόλες να ενισχύει περαιτέρω την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού. Συνεπώς, τα φλαβονοειδή, μέσω της υστέρησης της ανάπτυξης σε συνδυασμό με την ήπια αντιοξειδωτική προστασία, ελέγχουν την «ηλικία» των κυττάρων και αποτρέπουν ή ενισχύουν την συσώρευση βλαβών.

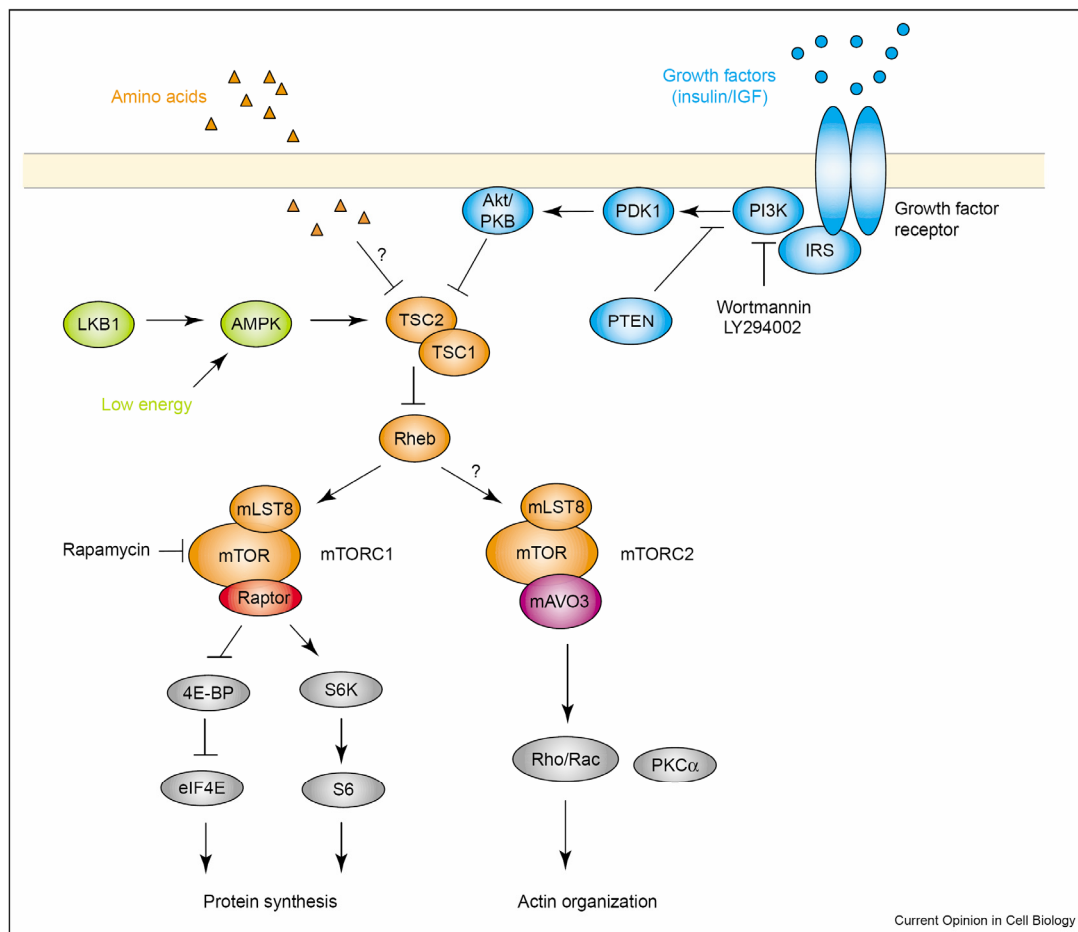


Εικόνα 4.2. Σχηματική απεικόνιση της συμμετοχής των πρωτεϊνών Rb και p53 στην εκδήλωση της γήρανσης παρουσία επιβλαβών περιβαλλοντικών παραγόντων.

Μελέτη της μεταγραφικής δραστηριότητας με την βοήθεια μικροσυστοιχειών ανιχνευτών ανέδειξε την συνολική επαγωγή της έκφρασης των ριβosomalικών πρωτεϊνών παρουσία quercetin (3 μM) 2 ώρες μετά την προσθήκη της στα κύτταρα. Ανάλογη απόκριση έδειξαν τα κύτταρα μάρτυρας στο θρεπτικό μέσο, με υστέρηση 2 ωρών. Είναι η πρώτη φορά όπου ένα φλαβονοειδές εμπλέκεται στην διαδικασία αυτή. Το φαινόμενο πιθανόν να διαμεσολαβείται από την TOR1, αν και δεν έχει αναφερθεί μέχρι στιγμής άμεση αλληλεπίδραση. Είναι επίσης παράδοξο το γεγονός ότι η quercetin δεν έχει *per se* συμμετοχή στην αύξηση του ενεργειακού δυναμικού των κυττάρων, σε αντίθεση με τα μόρια που ενεργοποιούν την TOR1 (Εικ. 4.3. (Martin and Hall, 2005)).

✓ Υπό αυτό το πρίσμα, η φλαβονόλη θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως το ανάλογο ενός παράγοντα ανάπτυξης (growth factor), καθώς δημιουργεί την ψευδαίσθηση περίσσειας θρεπτικών στο περιβάλλον. Όπως και στην περίπτωση υποακετυλίωσης του p53, η δράση

αυτή είναι σημαντικότερη κατά την αποστέρηση θρεπτικών ουσιών, καθώς εισάγει τα κύτταρα σε «ληθαργική» κατάσταση, ενώ ταυτόχρονα αποτρέπει την αυτοφαγοκύτωση.



Εικόνα 4.3. Σχηματική απεικόνιση της σηματοδότησης μέσω TOR (Martin and Hall, 2005).

Η σηματοδότηση μέσω TOR1 και 2 ελέγχεται σε μεμβρανικό επίπεδο από την κινάση PI3K και ρυθμίζει, εκτός από την αύξηση της έκφρασης των ριβοσωμικών πρωτεϊνών, τον πολυμερισμό της ακτίνης σε απόκριση στην διαθεσιμότητα θρεπτικών ή την παρουσία ινσουλίνης. Οι TOR ρυθμίζουν επιπλέον την ενεργότητα των κινασών PI3K και Akt και κατ'επέκταση την απενεργοποίηση του αντιαποπτωτικού μορίου Bcl-2. Με τον τρόπο αυτό, ελέγχουν την απόπτωση σε δύο σημεία του κυτταρικού κύκλου: άμεσα στην φάση G₁ (ευνοούν την διάσωση των κυττάρων) και έμμεσα στην φάση G₂-M (επάγουν κυτταρικό θάνατο) (Asnaghi et al., 2004). Δείξαμε ότι οι μονομερείς και διμερείς φλαβανόλες προκαλούν την δημιουργία λαμελλιποδίων και αυξάνουν τον πολυμερισμό της ακτίνης, μέσω επαγωγής των PI3K/FAK, άρα δεν αποκλείεται η συνεργασία των δύο οδών σηματοδότησεως σε αυτό το επίπεδο.

Αμφότερες οι οδοί SIRT1 και TOR έχει αναφερθεί ότι ελέγχουν την κυτταρική επιβίωση, την εκδήλωση του ωρίμου φαινοτύπου και την επιμήκυνση της ζωή των κυττάρων. Μάλιστα, και

στα δύο μόρια αποδίδεται η ευεργετική δράση της υποθερμιδικής διαίτας στην επιμήκυνση της ζωής. Η σηματοδότηση μέσω *sirtuins* περιλαμβάνει την ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων FOXO (Forkhead Box O). Πρόσφατα βρέθηκε ότι η δράση των FOXO ελέγχεται και αναστέλλεται μέσω φωσφορυλίωσης από την κινάση Akt: σε στελέχη *Drosophila* που φέρουν την μετάλλαξη *melted* παρατηρείται αύξηση της δραστηριότητας των FOXO και μείωση αυτής των TOR, κατ'αναλογία με τα αγρίου τύπου άτομα, τα οποία υπόκεινται σε υποθερμιδική διαίτα (Teleman et al., 2005). Πιθανόν οι πολυφαινόλες να ρυθμίζουν την ενεργότητα του συστήματος SIRT1 και TOR μέσω μεμβρανικών δράσεων (αναστολή ή ενεργοποίηση κινασών), είτε μέσω πρόσδεσης σε κάποιο από τα μόρια που συμμετέχουν από κοινού στις δύο οδούς μεταγωγής σήματος.

Δείξαμε ακόμη, ότι η αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στις σειρές μαστού, προστάτου και ηπατώματος σχετίζεται με την τροποποίηση της έκφρασης και της δραστηριότητας των συνθασών του μονοξειδίου του αζώτου. Τόσο η rapamycin (ειδικός αναστολέας της TOR1) (Tunon et al., 2003), όσο και η υποθερμιδική διαίτα (Nisoli et al., 2005) βρέθηκε να επηρεάζουν την έκφραση των NOS. Επιπλέον, οι μεταγραφικοί παράγοντες FOXO1 και FOXO3a (Potente et al., 2005), όπως και η φωσφορυλίωση της Rho αναστέλλουν την έκφραση της eNOS (Rikitake and Liao, 2005). Ειδικότερα, οι Radisavljevic et al. δημοσίευσαν ότι το NO επηρεάζει μέσω δύο διαφορετικών οδών την εξέλιξη του καρκίνου του μαστού: η ρύθμιση της σηματοδότησης μέσω VEGF/PI3K/AKT/NO/ICAM-1 σχετίζεται με την μετανάστευση των κυττάρων και την αγγειογένεση, ενώ η απόπτωση δρομολογείται μέσω του μονοπατιού NO/ROCK/FOXO3a (Radisavljevic, 2003; Radisavljevic, 2004). Η αλληλεπίδραση των πολυφαινολών τόσο με το σύστημα NO/NOS καθώς και με πρόδρομες κινάσες πιθανόν να ελέγχει την σηματοδότηση σε διάφορα σημεία των παραπάνω αλυσίδων και να επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό και την προσκολλητική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων. Τέλος, ανεξάρτητα από τον παραπάνω μηχανισμό, οι πολυφαινόλες θα μπορούσαν να επάγουν την κυτταρική γήρανση, μέσω φωσφορυλίωσης της PI3K, αύξησης της iNOS και επακόλουθης νιτροσυλίωσης και πρωτεασωμικής αποικοδόμησης του IRS-1 (insulin receptor substrate protein-1) (Sugita et al., 2005).

Παράλληλα, έχει αναφερθεί ότι η υποθερμιδική διαίτα -και κατ'επέκταση η ενεργοποίηση της SIRT1- ελέγχουν την βιογένεση των μιτοχονδρίων και την λειτουργικότητα της αναπνευστικής διαδικασίας μέσω μακροπρόθεσμης επαγωγής της ενδοθηλιακής συνθάσης του NO (Nisoli et al., 2005). Το φαινόμενο αυτό οδηγεί σε περαιτέρω ενεργοποίηση της SIRT1. Τα δεδομένα μας από την κυτταρική σειρά HepG2, υποστηρίζουν την άμεση επαγωγή της απακετυλάσης από την φλαβονόλη quercetin. Σε συνδυασμό με την άμεση επαγωγή της έκφρασης της eNOS και την προοδευτική αύξηση της συγκεντρώσεως του NO, μπορούμε να υποθέσουμε την κυκλική ενεργοποίηση του μηχανισμού, παρουσία των πολυφαινολών. Η αδυναμία των γηρασμένων κυττάρων να διαιρεθούν περαιτέρω εξαρτάται από το «αναπνευστικό» τους δυναμικό (Piper et al., 2006). Τα δεδομένα μας αναδεικνύουν τον

ρόλο-κλειδί των πολυφαινολών στην πορεία ζωής των καρκινικών κυττάρων, ιδιαίτερα αν λάβουμε υπόψιν την αυξημένη αναπνευστική-μεταβολική τους δραστηριότητα.

Συνοψίζοντας, στην παρούσα μελέτη παρουσιάζουμε νέα δεδομένα σχετικά με την ταχεία απορρόφηση των πολυφαινολών, τον υποκυτταρικό τους εντοπισμό και την εκδήλωση βιολογικών δράσεων σε συγκεντρώσεις ανάλογες με αυτές που απαντώνται φυσιολογικά μετά από κατανάλωσή τους στον εξωκυτταρικό χώρο. Οι πολυφαινόλες εμφανίζουν ποικιλία δράσεων στην κυτταρική ανάπτυξη και μετανάστευση, οι οποίες εκδηλώνονται βραχυπρόθεσμα έως μεσοπρόθεσμα και εξαρτώνται καταρχήν από καθεαυτές τις ουσίες και κατόπιν από το μελετώμενο σύστημα. Τα πειραματικά αποτελέσματα παρουσιάζουν νέες ενδείξεις σχετικά με την δράση των πολυφαινολών στην κυτταρική «γήρανση» και τον επακόλουθο αποπτωτικό ή αυτοφαγικό θάνατο.

Τα υπάρχοντα επιδημιολογικά δεδομένα σε συνδυασμό με τις παρατηρήσεις μας υποδεικνύουν τον ρυθμιστικό ρόλο των πολυφαινολών στον καθορισμό της τύχης των κυττάρων και την δυνητική προστατευτική τους δράση. Οι ιδιότητες αυτές θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν σε κλινικό επίπεδο, για την πρόληψη και αντιμετώπιση παθολογικών καταστάσεων ή νόσων.-

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abo, A., E. Pick, A. Hall, N. Totty, C.G. Teahan, and A.W. Segal. 1991. Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21rac1. *Nature*. 353:668-70.
- Adami, A., F. Crivellente, A.C. De Prati, E. Cavalieri, L. Cuzzolin, M. Tommasi, H. Suzuki, and G. Benoni. 1998. Biotransformation and cytotoxic properties of NO-donors on MCF7 and U251 cell lines. *Life Sci*. 63:2097-105.
- Adams, M., and Z. Jia. 2005. Structural and biochemical analysis reveal pirins to possess quercetinase activity. *J Biol Chem*. 280:28675-82.
- Adebamowo, C.A., E. Cho, L. Sampson, M.B. Katan, D. Spiegelman, W.C. Willett, and M.D. Holmes. 2005. Dietary flavonols and flavonol-rich foods intake and the risk of breast cancer. *Int J Cancer*. 114:628-33.
- Ader, P., B. Grenacher, P. Langguth, E. Scharrer, and S. Wolfram. 1996. Cinnamate uptake by rat small intestine: transport kinetics and transepithelial transfer. *Exp Physiol*. 81:943-55.
- Adhami, V.M., I.A. Siddiqui, N. Ahmad, S. Gupta, and H. Mukhtar. 2004. Oral consumption of green tea polyphenols inhibits insulin-like growth factor-I-induced signaling in an autochthonous mouse model of prostate cancer. *Cancer Res*. 64:8715-22.
- Agarwal, C., R.P. Singh, S. Dhanalakshmi, and R. Agarwal. 2004. Anti-angiogenic efficacy of grape seed extract in endothelial cells. *Oncol Rep*. 11:681-5.
- Ahmad, N., R.C. Srivastava, R. Agarwal, and H. Mukhtar. 1997. Nitric oxide synthase and skin tumor promotion. *Biochem Biophys Res Commun*. 232:328-31.
- Ahmad, N., S. Gupta, and H. Mukhtar. 2000. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate differentially modulates nuclear factor kappaB in cancer cells versus normal cells. *Arch Biochem Biophys*. 376:338-46.
- Ahmad, N., V.M. Adhami, F. Afaq, D.K. Feyes, and H. Mukhtar. 2001. Resveratrol causes WAF-1/p21-mediated G(1)-phase arrest of cell cycle and induction of apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Clin Cancer Res*. 7:1466-73.
- Ahmed, M.S., V. Ramesh, V. Nagaraja, J.H. Parish, and S.M. Hadi. 1994. Mode of binding of quercetin to DNA. *Mutagenesis*. 9:193-7.
- Akamatsu, S., A. Watanabe, M. Tamesada, R. Nakamura, S. Hayashi, D. Kodama, M. Kawase, and K. Yagi. 2004. Hepatoprotective effect of extracts from *Lentinus edodes* mycelia on dimethylnitrosamine-induced liver injury. *Biol Pharm Bull*. 27:1957-60.
- Alderton, W.K., C.E. Cooper, and R.G. Knowles. 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*. 357:593-615.
- Alexaki, V.I., I. Charalampopoulos, M. Kampa, A.P. Nifli, A. Hatzoglou, A. Gravanis, and E. Castanas. 2006. Activation of membrane estrogen receptors induce pro-survival kinases. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 98:97-110.
- Alexaki, V.I., I. Charalampopoulos, M. Kampa, H. Vassalou, P. Theodoropoulos, E.N. Stathopoulos, A. Hatzoglou, A. Gravanis, and E. Castanas. 2004. Estrogen exerts neuroprotective effects via membrane estrogen receptors and rapid Akt/NOS activation. *FASEB J*. 18:1594-6.
- Alvi, N.K., R.Y. Rizvi, and S.M. Hadi. 1986. Interaction of quercetin with DNA. *Biosci Rep*. 6:861-8.
- Ambs, S., M.O. Ogunfusika, W.G. Merriam, W.P. Bennett, T.R. Billiar, and C.C. Harris. 1998. Up-regulation of inducible nitric oxide synthase expression in cancer-prone p53 knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:8823-8.
- Ameer, B., R.A. Weintraub, J.V. Johnson, R.A. Yost, and R.L. Rouseff. 1996. Flavanone absorption after naringin, hesperidin, and citrus administration. *Clin Pharmacol Ther*. 60:34-40.
- Andlauer, W., J. Kolb, K. Siebert, and P. Furst. 2000. Assessment of resveratrol bioavailability in the perfused small intestine of the rat. *Drugs Exp Clin Res*. 26:47-55.
- Andriambelouson, E., C. Magnier, G. Haan-Archipoff, A. Lobstein, R. Anton, A. Beretz, J.C. Stoclet, and R. Andriantsitohaina. 1998. Natural dietary polyphenolic compounds cause endothelium-dependent vasorelaxation in rat thoracic aorta. *J Nutr*. 128:2324-33.
- Angelier, N., M. Tramier, E. Louvet, M. Coppey-Moisand, T.M. Savino, J.R. De Mey, and D. Hernandez-Verdun. 2005. Tracking the interactions of rRNA processing proteins during nucleolar assembly in living cells. *Mol Biol Cell*. 16:2862-71.
- Annabi, B., M.P. Lachambre, N. Bousquet-Gagnon, M. Page, D. Gingras, and R. Beliveau. 2002. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin 3-gallate inhibits MMP-2 secretion and MT1-MMP-driven migration in glioblastoma cells. *Biochim Biophys Acta*. 1542:209-20.
- Annaraj, J., S. Srinivasan, K.M. Ponvel, and P. Athappan. 2005. Mixed ligand copper(II) complexes of phenanthroline/bipyridyl and curcumin diketimines as DNA intercalators and their electrochemical behavior under Nafion and clay modified electrodes. *J Inorg Biochem*. 99:669-76.
- Arafa, H.M. 2005. Curcumin attenuates diet-induced hypercholesterolemia in rats. *Med Sci Monit*. 11:BR228-234.
- Aronica, S.M., W.L. Kraus, and B.S. Katzenellenbogen. 1994. Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91:8517-21.
- Arts, I.C., and P.C. Hollman. 2005. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr*. 81:3175-3255.
- Arts, I.C., B. van de Putte, and P.C. Hollman. 2000a. Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. 1. Fruits, vegetables, staple foods, and processed foods. *J Agric Food Chem*. 48:1746-51.
- Arts, I.C., B. van De Putte, and P.C. Hollman. 2000b. Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. 2. Tea, wine, fruit juices, and chocolate milk. *J Agric Food Chem*. 48:1752-7.
- Arts, I.C., D.R. Jacobs, Jr., M. Gross, L.J. Harnack, and A.R. Folsom. 2002. Dietary catechins and cancer incidence among postmenopausal women: the Iowa Women's Health Study (United States). *Cancer Causes Control*. 13:373-82.
- Arts, I.C., P.C. Hollman, H.B. Bueno De Mesquita, E.J. Feskens, and D. Kromhout. 2001. Dietary catechins and epithelial cancer incidence: the Zutphen elderly study. *Int J Cancer*. 92:298-302.
- Ascenzi, P., A. Bocedi, and M. Marino. 2006. Structure-function relationship of estrogen receptor alpha and beta: impact on human health. *Mol Aspects Med*. 27:299-402.

- Asensi, M., I. Medina, A. Ortega, J. Carretero, M.C. Bano, E. Obrador, and J.M. Estrela. 2002. Inhibition of cancer growth by resveratrol is related to its low bioavailability. *Free Radic Biol Med.* 33:387-98.
- Asnaghi, L., P. Bruno, M. Priulla, and A. Nicolini. 2004. mTOR: a protein kinase switching between life and death. *Pharmacol Res.* 50:545-9.
- Aspenstrom, P., A. Fransson, and J. Saras. 2004. Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system. *Biochem J.* 377:327-37.
- Atilgan, E., D. Wirtz, and S.X. Sun. 2006. Mechanics and dynamics of actin-driven thin membrane protrusions. *Biophys J.* 90:65-76.
- Atkinson, C., R.M. Warren, E. Sala, M. Dowsett, A.M. Dunning, C.S. Healey, S. Runswick, N.E. Day, and S.A. Bingham. 2004. Red-clover-derived isoflavones and mammographic breast density: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial [ISRCTN42940165]. *Breast Cancer Res.* 6:R170-9.
- Aumont, V., S. Krisa, E. Battaglia, P. Netter, T. Richard, J.M. Merillon, J. Magdalou, and N. Sabolovic. 2001. Regioselective and stereospecific glucuronidation of trans- and cis-resveratrol in human. *Arch Biochem Biophys.* 393:281-9.
- Austin, C.A., S. Patel, K. Ono, H. Nakane, and L.M. Fisher. 1992. Site-specific DNA cleavage by mammalian DNA topoisomerase II induced by novel flavone and catechin derivatives. *Biochem J.* 282 (Pt 3):883-9.
- Azios, N.G., and S.F. Dharmawardhane. 2005. Resveratrol and estradiol exert disparate effects on cell migration, cell surface actin structures, and focal adhesion assembly in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Neoplasia.* 7:128-40.
- Aziz, A.A., C.A. Edwards, M.E. Lean, and A. Crozier. 1998. Absorption and excretion of conjugated flavonols, including quercetin-4'-O-beta-glucoside and isorhamnetin-4'-O-beta-glucoside by human volunteers after the consumption of onions. *Free Radic Res.* 29:257-69.
- Baba, S., N. Osakabe, M. Natsume, and J. Terao. 2002. Absorption and urinary excretion of procyanidin B2 [epicatechin-(4beta-8)-epicatechin] in rats. *Free Radic Biol Med.* 33:142-8.
- Baba, S., T. Furuta, M. Horie, and H. Nakagawa. 1981. Studies on drug metabolism by use of isotopes XXVI: Determination of urinary metabolites of rutin in humans. *J Pharm Sci.* 70:780-2.
- Bachmann, K.A. 2002. Genotyping and phenotyping the cytochrome p-450 enzymes. *Am J Ther.* 9:309-16.
- Bagchi, D., M. Bagchi, S.J. Stohs, D.K. Das, S.D. Ray, C.A. Kuszynski, S.S. Joshi, and H.G. Pruess. 2000. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology.* 148:187-97.
- Bagli, E., M. Stefanidou, L. Morbidelli, M. Ziche, K. Psillas, C. Murphy, and T. Fotsis. 2004. Luteolin inhibits vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis; inhibition of endothelial cell survival and proliferation by targeting phosphatidylinositol 3'-kinase activity. *Cancer Res.* 64:7936-46.
- Bagowski, C.P., J.W. Myers, and J.E. Ferrell, Jr. 2001. The classical progesterone receptor associates with p42 MAPK and is involved in phosphatidylinositol 3-kinase signaling in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem.* 276:37708-14.
- Bailey, R., H. Nursten, and I. McDowell. 1992. Isolation and analysis of a polymeric thearubigin fraction from tea. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 59:365-375.
- Balas, L., J. Vercauteren, and M. Laguerre. 1995. 2D NMR structure elucidation of proanthocyanidins: the special case of the catechin-(4a-8)-catechin-(4a-8)-catechin trimer. *Magn Reson Chem.* 33:85-94.
- Baliga, M.S., S. Meleth, and S.K. Katiyar. 2005. Growth inhibitory and antimetastatic effect of green tea polyphenols on metastasis-specific mouse mammary carcinoma 4T1 cells in vitro and in vivo systems. *Clin Cancer Res.* 11:1918-27.
- Barbagallo, M., L.J. Dominguez, G. Licata, R. Ruggiero, R.Z. Lewanczuk, P.K. Pang, and L.M. Resnick. 2001. Effect of testosterone on intracellular Ca⁺⁺ in vascular smooth muscle cells. *Am J Hypertens.* 14:1273-5.
- Baron, J.A., M. Gerhardsson de Verdier, and A. Ekblom. 1994. Coffee, tea, tobacco, and cancer of the large bowel. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 3:565-70.
- Baron, S., M. Manin, C. Beaudoin, L. Leotoing, Y. Communal, G. Veyssiere, and L. Morel. 2004. Androgen receptor mediates non-genomic activation of phosphatidylinositol 3-OH kinase in androgen-sensitive epithelial cells. *J Biol Chem.* 279:14579-86.
- Bartles, J.R. 2000. Parallel actin bundles and their multiple actin-bundling proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 12:72-8.
- Bartles, J.R., L. Zheng, A. Li, A. Wierda, and B. Chen. 1998. Small espin: a third actin-bundling protein and potential forked protein ortholog in brush border microvilli. *J Cell Biol.* 143:107-19.
- Bastianetto, S., C. Ramassamy, S. Dore, Y. Christen, J. Poirier, and R. Quirion. 2000. The Ginkgo biloba extract (EGb 761) protects hippocampal neurons against cell death induced by beta-amyloid. *Eur J Neurosci.* 12:1882-90.
- Bates, N., G. Volans, and J. Roper. 1997. Paediatric Toxicology: Handbook of Poisoning in Children. Grove's Dictionaries, Inc., Williston, VT.
- Beach, S.F., and A.W. Vogl. 1999. Spermatid translocation in the rat seminiferous epithelium: coupling membrane trafficking machinery to a junction plaque. *Biol Reprod.* 60:1036-46.
- Bearer, E.L., and M.T. Abraham. 1999. 2E4 (kaptin): a novel actin-associated protein from human blood platelets found in lamellipodia and the tips of the stereocilia of the inner ear. *Eur J Cell Biol.* 78:117-26.
- Beausejour, C.M., A. Krtolica, F. Galimi, M. Narita, S.W. Lowe, P. Yaswen, and J. Campisi. 2003. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *Embo J.* 22:4212-22.
- Belguendouz, L., L. Fremont, and M.T. Gozzelino. 1998. Interaction of transresveratrol with plasma lipoproteins. *Biochem Pharmacol.* 55:811-6.
- Ben-Porath, I., and R.A. Weinberg. 2005. The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol.* 37:961-76.
- Bernardi, R., P.P. Scaglioni, S. Bergmann, H.F. Horn, K.H. Vousden, and P.P. Pandolfi. 2004. PML regulates p53 stability by sequestering Mdm2 to the nucleolus. *Nat Cell Biol.* 6:665-72.
- Bertelli, A.A., L. Giovannini, R. Stradi, A. Bertelli, and J.P. Tillement. 1996a. Plasma, urine and tissue levels of trans- and cis-resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene) after short-term or prolonged administration of red wine to rats. *Int J Tissue React.* 18:67-71.

- Bertelli, A.A., L. Giovannini, R. Stradi, S. Urien, J.P. Tillement, and A. Bertelli. 1996b. Kinetics of trans- and cis-resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene) after red wine oral administration in rats. *Int J Clin Pharmacol Res.* 16:77-81.
- Bertelli, A.A., L. Giovannini, R. Stradi, S. Urien, J.P. Tillement, and A. Bertelli. 1998. Evaluation of kinetic parameters of natural phytoalexin in resveratrol orally administered in wine to rats. *Drugs Exp Clin Res.* 24:51-5.
- Bertelli, G., and R. Paridaens. 2006. Optimal sequence of hormonotherapy in advanced breast cancer. *Curr Opin Oncol.* 18:572-7.
- Berthois, Y., N. Pourreau-Schneider, P. Gandilhon, H. Mitre, N. Tubiana, and P.M. Martin. 1986. Estradiol membrane binding sites on human breast cancer cell lines. Use of a fluorescent estradiol conjugate to demonstrate plasma membrane binding systems. *J Steroid Biochem.* 25:963-72.
- Beyer, C., J. Pawlak, and M. Karolczak. 2003. Membrane receptors for oestrogen in the brain. *J Neurochem.* 87:545-50.
- Bhat, K.P., D. Lantvit, K. Christov, R.G. Mehta, R.C. Moon, and J.M. Pezzuto. 2001. Estrogenic and antiestrogenic properties of resveratrol in mammary tumor models. *Cancer Res.* 61:7456-63.
- Bianchi, G.D., J.R. Cerhan, A.S. Parker, S.D. Putnam, W.A. See, C.F. Lynch, and K.P. Cantor. 2000. Tea consumption and risk of bladder and kidney cancers in a population-based case-control study. *Am J Epidemiol.* 151:377-83.
- Bishop, A.L., and A. Hall. 2000. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J.* 348 Pt 2:241-55.
- Blot, W.J., W.H. Chow, and J.K. McLaughlin. 1996. Tea and cancer: a review of the epidemiological evidence. *Eur J Cancer Prev.* 5:425-38.
- Bohl, M., C. Czupalla, S.V. Tokalov, B. Hoflack, and H.O. Gutzeit. 2005. Identification of actin as quercetin-binding protein: an approach to identify target molecules for specific ligands. *Anal Biochem.* 346:295-9.
- Boido, E., C. Alcalde-Eon, F. Carrau, E. Dellacassa, and J.C. Rivas-Gonzalo. 2006. Aging effect on the pigment composition and color of *Vitis vinifera* L. Cv. Tannat wines. Contribution of the main pigment families to wine color. *J Agric Food Chem.* 54:6692-704.
- Boileau, T.W., Z. Liao, S. Kim, S. Lemeshow, J.W. Erdman, Jr., and S.K. Clinton. 2003. Prostate carcinogenesis in N-methyl-N-nitrosourea (NMU)-testosterone-treated rats fed tomato powder, lycopene, or energy-restricted diets. *J Natl Cancer Inst.* 95:1578-86.
- Bomser, J.A., K.W. Singletary, M.A. Wallig, and M.A. Smith. 1999. Inhibition of TPA-induced tumor promotion in CD-1 mouse epidermis by a polyphenolic fraction from grape seeds. *Cancer Lett.* 135:151-7.
- Boonyaratanakornkit, V., M.P. Scott, V. Ribon, L. Sherman, S.M. Anderson, J.L. Maller, W.T. Miller, and D.P. Edwards. 2001. Progesterone receptor contains a proline-rich motif that directly interacts with SH3 domains and activates c-Src family tyrosine kinases. *Mol Cell.* 8:269-80.
- Bosetti, C., L. Spertini, M. Parpinel, P. Gnagnarella, P. Lagioui, E. Negri, S. Franceschi, M. Montella, J. Peterson, J. Dwyer, A. Giacosa, and C. La Vecchia. 2005. Flavonoids and breast cancer risk in Italy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 14:805-8.
- Boukamp, P., R.T. Petrussevska, D. Breitkreutz, J. Hornung, A. Markham, and N.E. Fusenig. 1988. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol.* 106:761-71.
- Boulton, D.W., U.K. Walle, and T. Walle. 1998. Extensive binding of the bioflavonoid quercetin to human plasma proteins. *J Pharm Pharmacol.* 50:243-9.
- Boulton, D.W., U.K. Walle, and T. Walle. 1999. Fate of the flavonoid quercetin in human cell lines: chemical instability and metabolism. *J Pharm Pharmacol.* 51:353-9.
- Boyer, J., D. Brown, and R.H. Liu. 2004. Uptake of quercetin and quercetin 3-glucoside from whole onion and apple peel extracts by Caco-2 cell monolayers. *J Agric Food Chem.* 52:7172-9.
- Boyle, S.P., V.L. Dobson, S.J. Duthie, D.C. Hinselwood, J.A. Kyle, and A.R. Collins. 2000. Bioavailability and efficiency of rutin as an antioxidant: a human supplementation study. *Eur J Clin Nutr.* 54:774-82.
- Bradford, M.M. 1976. A refined and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Brann, D.W., L.B. Hendry, and V.B. Mahesh. 1995. Emerging diversities in the mechanism of action of steroid hormones. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 52:113-33.
- Bredt, D.S., and S.H. Snyder. 1989. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86:9030-3.
- Breitkreutz, D., V.M. Schoop, N. Mirancea, M. Baur, H.J. Stark, and N.E. Fusenig. 1998. Epidermal differentiation and basement membrane formation by HaCaT cells in surface transplants. *Eur J Cell Biol.* 75:273-86.
- Brouillard, R., and A. Cheminat. 1988. Flavonoids and plant color. *Prog Clin Biol Res.* 280:93-106.
- Brouillard, R., F. George, and A. Fougousse. 1997. Polyphenols produced during red wine ageing. *Biofactors.* 6:403-10.
- Brown, G.C., and V. Borutaite. 2002. Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell death. *Free Radic Biol Med.* 33:1440-50.
- Bruder, J.L., T. Hsieh Tc, K.M. Lerea, S.C. Olson, and J.M. Wu. 2001. Induced cytoskeletal changes in bovine pulmonary artery endothelial cells by resveratrol and the accompanying modified responses to arterial shear stress. *BMC Cell Biol.* 2:1.
- Brunton, V.G., I.R. MacPherson, and M.C. Frame. 2004. Cell adhesion receptors, tyrosine kinases and actin modulators: a complex three-way circuitry. *Biochim Biophys Acta.* 1692:121-44.
- Bueno de Mesquita, H.B., P. Maisonneuve, C.J. Moerman, S. Runia, and P. Boyle. 1992. Lifetime consumption of alcoholic beverages, tea and coffee and exocrine carcinoma of the pancreas: a population-based case-control study in The Netherlands. *Int J Cancer.* 50:514-22.
- Bugianesi, R., G. Catasta, P. Spigno, A. D'Uva, and G. Maiani. 2002. Naringenin from cooked tomato paste is bioavailable in men. *J Nutr.* 132:3349-52.
- Buiatti, E., D. Palli, A. Decarli, D. Amadori, C. Avellini, S. Bianchi, C. Bonaguri, F. Cipriani, P. Cocco, A. Giacosa, and et al. 1990. A case-control study of gastric cancer and diet in Italy: II. Association with nutrients. *Int J Cancer.* 45:896-901.

- Bushel, P., J.H. Kim, W. Chang, J.J. Catino, H.E. Ruley, and C.C. Kumar. 1995. Two serum response elements mediate transcriptional repression of human smooth muscle alpha-actin promoter in ras-transformed cells. *Oncogene*. 10:1361-70.
- Bylund, A., J.X. Zhang, A. Bergh, J.E. Damber, A. Widmark, A. Johansson, H. Adlercreutz, P. Aman, M.J. Shepherd, and G. Hallmans. 2000. Rye bran and soy protein delay growth and increase apoptosis of human LNCaP prostate adenocarcinoma in nude mice. *Prostate*. 42:304-14.
- Cacace, J.E., and G. Mazza. 2002. Extraction of anthocyanins and other phenolics from black currants with sulfured water. *J Agric Food Chem*. 50:5939-46.
- Calmels, S., P. Hainaut, and H. Ohshima. 1997. Nitric oxide induces conformational and functional modifications of wild-type p53 tumor suppressor protein. *Cancer Res*. 57:3365-9.
- Caltagirone, S., C. Rossi, A. Poggi, F.O. Ranelletti, P.G. Natali, M. Brunetti, F.B. Aiello, and M. Piantelli. 2000. Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potential. *Int J Cancer*. 87:595-600.
- Canter, P.H., and E. Ernst. 2004. Anthocyanosides of *Vaccinium myrtillus* (bilberry) for night vision--a systematic review of placebo-controlled trials. *Surv Ophthalmol*. 49:38-50.
- Cao, G., and R.L. Prior. 1999. Anthocyanins are detected in human plasma after oral administration of an elderberry extract. *Clin Chem*. 45:574-6.
- Cappelletti, V., P. Miodini, G. Di Fronzo, and M.G. Daidone. 2006. Modulation of estrogen receptor-beta isoforms by phytoestrogens in breast cancer cells. *Int J Oncol*. 28:1185-91.
- Carbo, N., P. Costelli, F.M. Baccino, F.J. Lopez-Soriano, and J.M. Argiles. 1999. Resveratrol, a natural product present in wine, decreases tumour growth in a rat tumour model. *Biochem Biophys Res Commun*. 254:739-43.
- Carreras, M.C., M.C. Franco, J.G. Peralta, and J.J. Poderoso. 2004. Nitric oxide, complex I, and the modulation of mitochondrial reactive species in biology and disease. *Mol Aspects Med*. 25:125-39.
- Cassidy, A., S. Bingham, and K.D. Setchell. 1994. Biological effects of a diet of soy protein rich in isoflavones on the menstrual cycle of premenopausal women. *Am J Clin Nutr*. 60:333-40.
- Castanas, E., N. Bourhim, P. Giraud, F. Boudouresque, P. Cantau, and C. Oliver. 1985a. Interaction of opiates with opioid binding sites in the bovine adrenal medulla: I. Interaction with delta and mu sites. *J Neurochem*. 45:677-87.
- Castanas, E., N. Bourhim, P. Giraud, F. Boudouresque, P. Cantau, and C. Oliver. 1985b. Interaction of opiates with opioid binding sites in the bovine adrenal medulla: II. Interaction with kappa sites. *J Neurochem*. 45:688-99.
- Castellarin, S.D., G. Di Gaspero, R. Marconi, A. Nonis, E. Peterlunger, S. Paillard, A.F. Adam-Blondon, and R. Testolin. 2006. Colour variation in red grapevines (*Vitis vinifera* L.): genomic organisation, expression of flavonoid 3'-hydroxylase, flavonoid 3',5'-hydroxylase genes and related metabolite profiling of red cyanidin-/blue delphinidin-based anthocyanins in berry skin. *BMC Genomics*. 7:12.
- Castoria, G., A. Migliaccio, A. Bilancio, M. Di Domenico, A. de Falco, M. Lombardi, R. Fiorentino, L. Varricchio, M.V. Barone, and F. Auricchio. 2001. PI3-kinase in concert with Src promotes the S-phase entry of oestradiol-stimulated MCF-7 cells. *Embo J*. 20:6050-9.
- Cerhan, J.R., S.D. Putnam, G.D. Bianchi, A.S. Parker, C.F. Lynch, and K.P. Cantor. 2001. Tea consumption and risk of cancer of the colon and rectum. *Nutr Cancer*. 41:33-40.
- Cermak, R., S. Landgraf, and S. Wolffram. 2003. The bioavailability of quercetin in pigs depends on the glycoside moiety and on dietary factors. *J Nutr*. 133:2802-7.
- Cermak, R., S. Landgraf, and S. Wolffram. 2004. Quercetin glucosides inhibit glucose uptake into brush-border-membrane vesicles of porcine jejunum. *Br J Nutr*. 91:849-55.
- Cermak, R., U. Follmer, and S. Wolffram. 1998. Dietary flavonol quercetin induces chloride secretion in rat colon. *Am J Physiol*. 275:G1166-72.
- Chan, M.M., J.A. Mattiacci, H.S. Hwang, A. Shah, and D. Fong. 2000. Synergy between ethanol and grape polyphenols, quercetin, and resveratrol, in the inhibition of the inducible nitric oxide synthase pathway. *Biochem.Pharmacol*. 60:1539-1548.
- Chang, W.S., Y.J. Lee, F.J. Lu, and H.C. Chiang. 1993. Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase. *Anticancer Res*. 13:2165-70.
- Chang, X., S. Wang, H. Luo, and G. Gong. 2003. Study on Fluorescence Characteristic of Quercetin-Nanoporous Anodic Aluminum Oxide Composites. *Journal of Fluorescence*. 13:421-425.
- Chao, S.H., and D.H. Price. 2001. Flavopiridol inactivates P-TEFb and blocks most RNA polymerase II transcription in vivo. *J Biol Chem*. 276:31793-9.
- Chatenoud, L., A. Tavani, C. La Vecchia, D.R. Jacobs, Jr., E. Negri, F. Levi, and S. Franceschi. 1998. Whole grain food intake and cancer risk. *Int J Cancer*. 77:24-8.
- Checkoway, H., K. Powers, T. Smith-Weller, G.M. Franklin, W.T. Longstreth, Jr., and P.D. Swanson. 2002. Parkinson's disease risks associated with cigarette smoking, alcohol consumption, and caffeine intake. *Am J Epidemiol*. 155:732-8.
- Chen, B., and W.M. Deen. 2001. Analysis of the effects of cell spacing and liquid depth on nitric oxide and its oxidation products in cell cultures. *Chem Res Toxicol*. 14:135-47.
- Chen, B., M. Keshive, and W.M. Deen. 1998. Diffusion and reaction of nitric oxide in suspension cell cultures. *Biophys J*. 75:745-54.
- Chen, C.C., M.P. Chow, W.C. Huang, Y.C. Lin, and Y.J. Chang. 2004. Flavonoids inhibit tumor necrosis factor-alpha-induced up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in respiratory epithelial cells through activator protein-1 and nuclear factor-kappaB: structure-activity relationships. *Mol Pharmacol*. 66:683-93.
- Chen, J.J., Z.Q. Ye, and M.W. Koo. 2004. Growth inhibition and cell cycle arrest effects of epigallocatechin gallate in the NBT-II bladder tumour cell line. *BJU Int*. 93:1082-6.
- Chen, Z.P., J.B. Schell, C.T. Ho, and K.Y. Chen. 1998. Green tea epigallocatechin gallate shows a pronounced growth inhibitory effect on cancerous cells but not on their normal counterparts. *Cancer Lett*. 129:173-9.

- Chiarugi, V., L. Magnelli, and O. Gallo. 1998. Cox-2, iNOS and p53 as play-makers of tumor angiogenesis. *Int J Mol Med.* 2:715-9.
- Chidambara Murthy, K.N., G.K. Jayaprakasha, and R.P. Singh. 2002. Studies on antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel extract using in vivo models. *J Agric Food Chem.* 50:4791-5.
- Cho, C.W., Y. Liu, X. Yan, T. Henthorn, and K.Y. Ng. 2000. Carrier-mediated uptake of rhodamine 123: implications on its use for MDR research. *Biochem Biophys Res Commun.* 279:124-30.
- Cho, D.I., N.Y. Koo, W.J. Chung, T.S. Kim, S.Y. Ryu, S.Y. Im, and K.M. Kim. 2002. Effects of resveratrol-related hydroxystilbenes on the nitric oxide production in macrophage cells: structural requirements and mechanism of action. *Life Sci.* 71:2071-82.
- Chow, W.H., C.A. Swanson, J. Lissowska, F.D. Groves, L.H. Sobin, A. Nasierowska-Guttmejer, J. Radziszewski, J. Regula, A.W. Hsing, S. Jagannatha, W. Zatonski, and W.J. Blot. 1999. Risk of stomach cancer in relation to consumption of cigarettes, alcohol, tea and coffee in Warsaw, Poland. *Int J Cancer.* 81:871-6.
- Chrambach, A., and D. Rodbard. 1971. Polyacrylamide gel electrophoresis. *Science.* 172:440-51.
- Chu, S.C., H.L. Chiou, P.N. Chen, S.F. Yang, and Y.S. Hsieh. 2004. Silibinin inhibits the invasion of human lung cancer cells via decreased productions of urokinase-plasminogen activator and matrix metalloproteinase-2. *Mol Carcinog.* 40:143-9.
- Chung, E.Y., B.H. Kim, M.K. Lee, Y.P. Yun, S.H. Lee, K.R. Min, and Y. Kim. 2003. Anti-inflammatory effect of the oligomeric stilbene alpha-Viniferin and its mode of the action through inhibition of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase. *Planta Med.* 69:710-4.
- Chung, H.T., H.O. Pae, B.M. Choi, T.R. Billiar, and Y.M. Kim. 2001. Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 282:1075-9.
- Ciolino, H.P., and G.C. Yeh. 1999a. The flavonoid galangin is an inhibitor of CYP1A1 activity and an agonist/antagonist of the aryl hydrocarbon receptor. *Br J Cancer.* 79:1340-6.
- Ciolino, H.P., and G.C. Yeh. 1999b. Inhibition of aryl hydrocarbon-induced cytochrome P-450 1A1 enzyme activity and CYP1A1 expression by resveratrol. *Mol Pharmacol.* 56:760-7.
- Ciolino, H.P., P.J. Daschner, and G.C. Yeh. 1999. Dietary flavonols quercetin and kaempferol are ligands of the aryl hydrocarbon receptor that affect CYP1A1 transcription differentially. *Biochem J.* 340 (Pt 3):715-22.
- Cipriani, F., E. Buiatti, and D. Palli. 1991. Gastric cancer in Italy. *Ital J Gastroenterol.* 23:429-35.
- Cirino, G., S. Fiorucci, and W.C. Sessa. 2003. Endothelial nitric oxide synthase: the Cinderella of inflammation? *Trends Pharmacol Sci.* 24:91-5.
- Clark, M.A., and B.H. Hirst. 2002. Expression of junction-associated proteins differentiates mouse intestinal M cells from enterocytes. *Histochem Cell Biol.* 118:137-47.
- Clarke, R.B., E. Anderson, and A. Howell. 2004. Steroid receptors in human breast cancer. *Trends Endocrinol Metab.* 15:316-23.
- Clifford, A.J., S.E. Ebeler, J.D. Ebeler, N.D. Bills, S.H. Hinrichs, P.L. Teissedre, and A.L. Waterhouse. 1996. Delayed tumor onset in transgenic mice fed an amino acid-based diet supplemented with red wine solids. *Am J Clin Nutr.* 64:748-56.
- Clifford, M.N., E.L. Copeland, J.P. Bloxidge, and L.A. Mitchell. 2000. Hippuric acid as a major excretion product associated with black tea consumption. *Xenobiotica.* 30:317-26.
- Cohen-Boulakia, F., P.E. Valensi, H. Boulahdour, R. Lestrade, J.F. Dufour-Lamartinie, C. Hort-Legrand, and A. Behar. 2000. In vivo sequential study of skeletal muscle capillary permeability in diabetic rats: effect of anthocyanosides. *Metabolism.* 49:880-5.
- Colasanti, M., and H. Suzuki. 2000. The dual personality of NO. *Trends Pharmacol Sci.* 21:249-52.
- Commenges, D., V. Scotet, S. Renaud, H. Jacqmin-Gadda, P. Barberger-Gateau, and J.F. Dartigues. 2000. Intake of flavonoids and risk of dementia. *Eur J Epidemiol.* 16:357-63.
- Conney, A.H., T. Lysz, T. Ferraro, T.F. Abidi, P.S. Manchand, J.D. Laskin, and M.T. Huang. 1991. Inhibitory effect of curcumin and some related dietary compounds on tumor promotion and arachidonic acid metabolism in mouse skin. *Adv Enzyme Regul.* 31:385-96.
- Conquer, J.A., G. Maiani, E. Azzini, A. Raguzzini, and B.J. Holub. 1998. Supplementation with quercetin markedly increases plasma quercetin concentration without effect on selected risk factors for heart disease in healthy subjects. *J Nutr.* 128:593-7.
- Constantinou, A., R. Mehta, C. Runyan, K. Rao, A. Vaughan, and R. Moon. 1995. Flavonoids as DNA topoisomerase antagonists and poisons: structure-activity relationships. *J Nat Prod.* 58:217-25.
- Cooray, H.C., T. Janvilisri, H.W. van Veen, S.B. Hladky, and M.A. Barrand. 2004. Interaction of the breast cancer resistance protein with plant polyphenols. *Biochem Biophys Res Commun.* 317:269-75.
- Corder, R., J.A. Douthwaite, D.M. Lees, N.Q. Khan, A.C. Viseu Dos Santos, E.G. Wood, and M.J. Carrier. 2001. Endothelin-1 synthesis reduced by red wine. *Nature.* 414:863-4.
- Corder, R., R.C. Warburton, N.Q. Khan, R.E. Brown, E.G. Wood, and D.M. Lees. 2004. The procyanidin-induced pseudo laminar shear stress response: a new concept for the reversal of endothelial dysfunction. *Clin Sci (Lond).* 107:513-7.
- Cornish, K.M., G. Williamson, and J. Sanderson. 2002. Quercetin metabolism in the lens: role in inhibition of hydrogen peroxide induced cataract. *Free Radic Biol Med.* 33:63-70.
- Corvazier, E., and J. Maclouf. 1985. Interference of some flavonoids and non-steroidal anti-inflammatory drugs with oxidative metabolism of arachidonic acid by human platelets and neutrophils. *Biochim Biophys Acta.* 835:315-21.
- Coso, O.A., M. Chiariello, J.C. Yu, H. Teramoto, P. Crespo, N. Xu, T. Miki, and J.S. Gutkind. 1995. The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell.* 81:1137-46.
- Crespy, V., C. Morand, C. Besson, C. Manach, C. Demigne, and C. Remesy. 2002. Quercetin, but not its glycosides, is absorbed from the rat stomach. *J Agric Food Chem.* 50:618-21.
- Cruz, M.L., W.W. Wong, F. Mimouni, D.L. Hachey, K.D. Setchell, P.D. Klein, and R.C. Tsang. 1994. Effects of infant nutrition on cholesterol synthesis rates. *Pediatr Res.* 35:135-40.
- Culhane, A.C., G. Perriere, E.C. Considine, T.G. Cotter, and D.G. Higgins. 2002. Between-group analysis of microarray data. *Bioinformatics.* 18:1600-8.

- Cuyckens, F., A.A. Shahat, H. Van den Heuvel, K.A. Abdel-Shafeek, M.M. El-Messiry, M.M. Seif-El Nasr, L. Pieters, A.J. Vlietinck, and M. Claeys. 2003. The application of liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry and collision-induced dissociation in the structural characterization of acylated flavonol O-glycosides from the seeds of *Carrichtera annua*. *Eur J Mass Spectrom (Chichester, Eng)*. 9:409-20.
- Cuyckens, F., A.A. Shahat, L. Pieters, and M. Claeys. 2002. Direct stereochemical assignment of hexose and pentose residues in flavonoid O-glycosides by fast atom bombardment and electrospray ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom*. 37:1272-9.
- Czyz, J., Z. Madeja, U. Irmer, W. Korohoda, and D.F. Hulser. 2005. Flavonoid apigenin inhibits motility and invasiveness of carcinoma cells in vitro. *Int J Cancer*. 114:12-8.
- Dai, Q., X.O. Shu, F. Jin, J.D. Potter, L.H. Kushi, J. Teas, Y.T. Gao, and W. Zheng. 2001. Population-based case-control study of soyfood intake and breast cancer risk in Shanghai. *Br J Cancer*. 85:372-8.
- Dambaki, C., C. Kogia, M. Kampa, K. Darivianaki, M. Nomikos, P. Anezinis, P.A. Theodoropoulos, E. Castanas, and E.N. Stathopoulos. 2005. Membrane testosterone binding sites in prostate carcinoma as a potential new marker and therapeutic target: study in paraffin tissue sections. *BMC Cancer*. 5:148.
- Damianaki, A., E. Bakogeorgou, M. Kampa, G. Notas, A. Hatzoglou, S. Panagiotou, C. Gemetzi, E. Kouroumalis, P.M. Martin, and E. Castanas. 2000. Potent inhibitory action of red wine polyphenols on human breast cancer cells. *J Cell Biochem*. 78:429-41.
- Daufeldt, S., R. Lanz, and A. Allera. 2003. Membrane-initiated steroid signaling (MISS): genomic steroid action starts at the plasma membrane. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 85:9-23.
- Davies, C., D. Tingley, B. Kachar, R.J. Wenthold, and R.S. Petralia. 2001. Distribution of members of the PSD-95 family of MAGUK proteins at the synaptic region of inner and outer hair cells of the guinea pig cochlea. *Synapse*. 40:258-68.
- Day, A.J., F.J. Canada, J.C. Diaz, P.A. Kroon, R. McLauchlan, C.B. Faulds, G.W. Plumb, M.R. Morgan, and G. Williamson. 2000b. Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Lett*. 468:166-70.
- Day, A.J., M.S. DuPont, S. Ridley, M. Rhodes, M.J. Rhodes, M.R. Morgan, and G. Williamson. 1998. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity. *FEBS Lett*. 436:71-5.
- Day, A.J., Y. Bao, M.R. Morgan, and G. Williamson. 2000a. Conjugation position of quercetin glucuronides and effect on biological activity. *Free Radic Biol Med*. 29:1234-43.
- De Fabiani, E., M. Crestani, M. Marrapodi, A. Pinelli, V. Golfieri, and G. Galli. 2000. Identification and characterization of cis-acting elements conferring insulin responsiveness on hamster cholesterol 7alpha-hydroxylase gene promoter. *Biochem J*. 347 Pt 1:147-54.
- de Freitas, V., and N. Mateus. 2001. Structural features of procyanidin interactions with salivary proteins. *J Agric Food Chem*. 49:940-5.
- De Jong, U.W., N. Breslow, J.G. Hong, M. Sridharan, and K. Shanmugaratnam. 1974. Aetiological factors in oesophageal cancer in Singapore Chinese. *Int J Cancer*. 13:291-303.
- De Ledinghen, V., A. Monvoisin, V. Neaud, S. Krisa, B. Payrastra, C. Bedin, A. Desmouliere, P. Bioulac-Sage, and J. Rosenbaum. 2001. Trans-resveratrol, a grapevine-derived polyphenol, blocks hepatocyte growth factor-induced invasion of hepatocellular carcinoma cells. *Int J Oncol*. 19:83-8.
- de Santi, C., A. Pietrabissa, F. Mosca, and G.M. Pacifici. 2000a. Glucuronidation of resveratrol, a natural product present in grape and wine, in the human liver. *Xenobiotica*. 30:1047-54.
- de Santi, C., A. Pietrabissa, R. Spisni, F. Mosca, and G.M. Pacifici. 2000b. Sulphation of resveratrol, a natural compound present in wine, and its inhibition by natural flavonoids. *Xenobiotica*. 30:857-66.
- de Vries, J.H., P.C. Hollman, S. Meyboom, M.N. Buysman, P.L. Zock, W.A. van Staveren, and M.B. Katan. 1998. Plasma concentrations and urinary excretion of the antioxidant flavonols quercetin and kaempferol as biomarkers for dietary intake. *Am J Clin Nutr*. 68:60-5.
- Deenadayalu, V.P., R.E. White, J.N. Stallone, X. Gao, and A.J. Garcia. 2001. Testosterone relaxes coronary arteries by opening the large-conductance, calcium-activated potassium channel. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 281:H1720-7.
- Delacroix, P. 1981. Etude en Double Aveugle de l'Endotelon® dans l'Insuffisance Veineuse Chronique. *Therapeutique, la Revue de Medicine*. 22:1793-1802.
- Delaunay, J.C., C. Castagnino, C. Cheze, and J. Vercauteren. 2002. Preparative isolation of polyphenolic compounds from *Vitis vinifera* by centrifugal partition chromatography. *J Chromatogr A*. 964:123-8.
- Delgado-Vargas, F., A.R. Jimenez, and O. Paredes-Lopez. 2000. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains--characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 40:173-289.
- Delgado-Vargas, F., and O. Paredes-Lopez. 2003. Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses. CRC Press LLC, Boca Raton, FL. 344 pp.
- Della Ragione, F., V. Cucciolla, V. Criniti, S. Indaco, A. Borriello, and V. Zappia. 2002. Antioxidants induce different phenotypes by a distinct modulation of signal transduction. *FEBS Lett*. 532:289-94.
- Delmas, D., B. Jannin, M. Cherkaoui Malki, and N. Latruffe. 2000. Inhibitory effect of resveratrol on the proliferation of human and rat hepatic derived cell lines. *Oncol Rep*. 7:847-52.
- den Tonkelaar, I., L. Keinan-Boker, P.V. Veer, C.J. Arts, H. Adlercreutz, J.H. Thijssen, and P.H. Peeters. 2001. Urinary phytoestrogens and postmenopausal breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 10:223-8.
- Denizot, F., and R. Lang. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods*. 89:271-7.
- Deprez, S., C. Brezillon, S. Rabot, C. Philippe, I. Mila, C. Lapiere, and A. Scalbert. 2000. Polymeric proanthocyanidins are catabolized by human colonic microflora into low-molecular-weight phenolic acids. *J Nutr*. 130:2733-8.
- Dicko, A., M. Morissette, S. Ben Ameer, M. Pezolet, and T. Di Paolo. 1999. Effect of estradiol and tamoxifen on brain membranes: investigation by infrared and fluorescence spectroscopy. *Brain Res Bull*. 49:401-5.

- Diehl, K.H., R. Hull, D. Morton, R. Pfister, Y. Rabemampianina, D. Smith, J.M. Vidal, and C. van de Vorstenbosch. 2001. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *J Appl Toxicol.* 21:15-23.
- Dimario, P.J. 2004. Cell and molecular biology of nucleolar assembly and disassembly. *Int Rev Cytol.* 239:99-178.
- Dok-Go, H., K.H. Lee, H.J. Kim, E.H. Lee, J. Lee, Y.S. Song, Y.H. Lee, C. Jin, Y.S. Lee, and J. Cho. 2003. Neuroprotective effects of antioxidative flavonoids, quercetin, (+)-dihydroquercetin and quercetin 3-methyl ether, isolated from *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. *Brain Res.* 965:130-6.
- Doledec, S., and D. Chessel. 1987. Rhythmes saisonniers et composantes stationnelles en milieu aquatique-Description d'un plan d'observations complet par projection de variables. *Acta Oecologica Oecologica Generalis.* 8:403-426.
- Dong, S.S., J.P. Williams, S.E. Jordan, T. Cornwell, and H.C. Blair. 1999. Nitric oxide regulation of cGMP production in osteoclasts. *J Cell Biochem.* 73:478-87.
- Donovan, J.L., C. Manach, L. Rios, C. Morand, A. Scalbert, and C. Remesy. 2002. Procyanidins are not bioavailable in rats fed a single meal containing a grape seed extract or the procyanidin dimer B3. *Br J Nutr.* 87:299-306.
- Donovan, J.L., V. Crespy, C. Manach, C. Morand, C. Besson, A. Scalbert, and C. Remesy. 2001. Catechin is metabolized by both the small intestine and liver of rats. *J Nutr.* 131:1753-7.
- Doostdar, H., M.D. Burke, and R.T. Mayer. 2000. Bioflavonoids: selective substrates and inhibitors for cytochrome P450 CYP1A and CYP1B1. *Toxicology.* 144:31-8.
- dos Remedios, C.G., D. Chhabra, M. Kekic, I.V. Dedova, M. Tsubakihara, D.A. Berry, and N.J. Nosworthy. 2003. Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev.* 83:433-73.
- Doutremepuich, J.D., A. Barbier, and F. Lacheretz. 1991. Effect of Endotelon (procyanidolic oligomers) on experimental acute lymphedema of the rat hindlimb. *Lymphology.* 24:135-9.
- Doyle, A.E., J.E. Goodman, P.M. Silber, and J.D. Yager. 2004. Catechol-O-methyltransferase low activity genotype (COMTLL) is associated with low levels of COMT protein in human hepatocytes. *Cancer Lett.* 214:189-95.
- Dresser, G.K., D.G. Bailey, B.F. Leake, U.I. Schwarz, P.A. Dawson, D.J. Freeman, and R.B. Kim. 2002. Fruit juices inhibit organic anion transporting polypeptide-mediated drug uptake to decrease the oral availability of fexofenadine. *Clin Pharmacol Ther.* 71:11-20.
- Drubaix, I., L. Robert, M. Maraval, and A.M. Robert. 1997. Synthesis of glycoconjugates by human diseased veins: modulation by procyanidolic oligomers. *Int J Exp Pathol.* 78:117-21.
- D'Souza-Schorey, C., R.L. Boshans, M. McDonough, P.D. Stahl, and L. Van Aelst. 1997. A role for POR1, a Rac1-interacting protein, in ARF6-mediated cytoskeletal rearrangements. *Embo J.* 16:5445-54.
- Duenas-Gonzalez, A., C.M. Isales, M. del Mar Abad-Hernandez, R. Gonzalez-Sarmiento, O. Sanguenza, and J. Rodriguez-Commes. 1997. Expression of inducible nitric oxide synthase in breast cancer correlates with metastatic disease. *Mod Pathol.* 10:645-9.
- Dufour, C., and O. Dangles. 2005. Flavonoid-serum albumin complexation: determination of binding constants and binding sites by fluorescence spectroscopy. *Biochim Biophys Acta.* 1721:164-73.
- Ehrlich, J.S., M.D. Hansen, and W.J. Nelson. 2002. Spatio-temporal regulation of Rac1 localization and lamellipodia dynamics during epithelial cell-cell adhesion. *Dev Cell.* 3:259-70.
- Eiro, M.J., and M. Heinonen. 2002. Anthocyanin color behavior and stability during storage: effect of intermolecular copigmentation. *J Agric Food Chem.* 50:7461-6.
- Ellison, L.F. 2000. Tea and other beverage consumption and prostate cancer risk: a Canadian retrospective cohort study. *Eur J Cancer Prev.* 9:125-30.
- Erlund, I. 2004. Chemical analysis and pharmacokinetics of the flavonoids quercetin, hesperetin and naringenin in humans. In Faculty of Agriculture and Forestry. University of Helsinki, Helsinki.
- Erlund, I., J. Marniemi, P. Hakala, G. Alfthan, E. Meririnne, and A. Aro. 2003. Consumption of black currants, lingonberries and bilberries increases serum quercetin concentrations. *Eur J Clin Nutr.* 57:37-42.
- Erlund, I., R. Freese, J. Marniemi, P. Hakala, and G. Alfthan. 2006. Bioavailability of quercetin from berries and the diet. *Nutr Cancer.* 54:13-7.
- Ermakova, S., B.Y. Choi, H.S. Choi, B.S. Kang, A.M. Bode, and Z. Dong. 2005. The intermediate filament protein vimentin is a new target for epigallocatechin gallate. *J Biol Chem.* 280:16882-90.
- Estrada, M., J.L. Liberona, M. Miranda, and E. Jaimovich. 2000. Aldosterone- and testosterone-mediated intracellular calcium response in skeletal muscle cell cultures. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 279:E132-9.
- Estrov, Z., S. Shishodia, S. Faderl, D. Harris, Q. Van, H.M. Kantarjian, M. Talpaz, and B.B. Aggarwal. 2003. Resveratrol blocks interleukin-1beta-induced activation of the nuclear transcription factor NF-kappaB, inhibits proliferation, causes S-phase arrest, and induces apoptosis of acute myeloid leukemia cells. *Blood.* 102:987-95.
- Fabre, N., I. Rustan, E. de Hoffmann, and J. Quetin-Leclercq. 2001. Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom.* 12:707-15.
- Faix, J., and K. Rottner. 2006. The making of filopodia. *Curr Opin Cell Biol.* 18:18-25.
- Falkenstein, E., H.C. Tillmann, M. Christ, M. Feuring, and M. Wehling. 2000. Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev.* 52:513-56.
- Fan, C.L., X.D. Wo, and Y. Luo. 2005b. [Effect of curcumin on expression of human low density lipoprotein receptors in *Xenopus laevis* oocytes]. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi.* 25:432-5.
- Fan, C.L., Y. Qian, X.D. Wo, J. Yan, and L.P. Gao. 2005a. [Effect of curcumin on the gene expression of low density lipoprotein receptors.]. *Chin J Integr Med.* 11:201-4.
- Fang, J., C. Xia, Z. Cao, J.Z. Zheng, E. Reed, and B.H. Jiang. 2005. Apigenin inhibits VEGF and HIF-1 expression via PI3K/AKT/p70S6K1 and HDM2/p53 pathways. *Faseb J.* 19:342-53.
- Favot, L., S. Martin, T. Keravis, R. Andriantsitohaina, and C. Lugnier. 2003. Involvement of cyclin-dependent pathway in the inhibitory effect of delphinidin on angiogenesis. *Cardiovasc Res.* 59:479-87.
- Felgines, C., S. Talavera, M.P. Gonthier, O. Texier, A. Scalbert, J.L. Lamaison, and C. Remesy. 2003. Strawberry anthocyanins are recovered in urine as glucuro- and sulfoconjugates in humans. *J Nutr.* 133:1296-301.

- Fellenberg, K., N.C. Hauser, B. Brors, A. Neutzner, J.D. Hoheisel, and M. Vingron. 2001. Correspondence analysis applied to microarray data. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:10781-6.
- Feng, G.K., B.F. Xie, Z.C. Liu, X.F. Zhu, and Y.L. Ye. 2002. [Tea polyphenol inhibit on growth of human nasopharyngeal carcinoma cell and xenograft in nude mice]. *Ai Zheng*. 21:392-4.
- Ferrary, E., M. Cohen-Tannoudji, G. Pehau-Arnaudet, A. Lapillonne, R. Athman, T. Ruiz, L. Boulouha, F. El Marjou, A. Doye, J.J. Fontaine, C. Antony, C. Babinet, D. Louvard, F. Jaisser, and S. Robine. 1999. In vivo, villin is required for Ca(2+)-dependent F-actin disruption in intestinal brush borders. *J Cell Biol*. 146:819-30.
- Ferrell, J.E., J.R. Peter, D. Chang Sing, G. Loew, R. King, J.M. Mansour, and T.E. Mansour. 1979. Structure/Activity Studies of Flavonoids As Inhibitors of Cyclic AMP Phosphodiesterase and Relationship to Quantum Chemical Indices. *Molec Pharmac*. 16:556-568.
- Ferrer, P., M. Asensi, R. Segarra, A. Ortega, M. Benlloch, E. Obrador, M.T. Varea, G. Asensio, L. Jorda, and J.M. Estrela. 2005. Association between pterostilbene and quercetin inhibits metastatic activity of B16 melanoma. *Neoplasia*. 7:37-47.
- Filardo, E.J., J.A. Quinn, K.I. Bland, and A.R. Frackelton, Jr. 2000. Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol Endocrinol*. 14:1649-60.
- Fiorani, M., A. Accorsi, and O. Cantoni. 2003. Human red blood cells as a natural flavonoid reservoir. *Free Radic Res*. 37:1331-8.
- Fisher, M.B., M. Vandenbranden, K. Findlay, B. Burchell, K.E. Thummel, S.D. Hall, and S.A. Wrighton. 2000. Tissue distribution and interindividual variation in human UDP-glucuronosyltransferase activity: relationship between UGT1A1 promoter genotype and variability in a liver bank. *Pharmacogenetics*. 10:727-39.
- Fortunati, N., F. Fissore, A. Fazzari, F. Piovano, M.G. Catalano, M. Becchis, L. Berta, and R. Frairia. 1999b. Estradiol induction of cAMP in breast cancer cells is mediated by foetal calf serum (FCS) and sex hormone-binding globulin (SHBG). *J Steroid Biochem Mol Biol*. 70:73-80.
- Fortunati, N., M. Becchis, M.G. Catalano, A. Comba, P. Ferrera, M. Raineri, L. Berta, and R. Frairia. 1999a. Sex hormone-binding globulin, its membrane receptor, and breast cancer: a new approach to the modulation of estradiol action in neoplastic cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 69:473-9.
- Franceschi, S., A. Favero, C. La Vecchia, E. Negri, L. Dal Maso, S. Salvini, A. Decarli, and A. Giacosa. 1995. Influence of food groups and food diversity on breast cancer risk in Italy. *Int J Cancer*. 63:785-9.
- Frankel, E.N., J. Kanner, J.B. German, E. Parks, and J.E. Kinsella. 1993. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet*. 341:454-7.
- Frescas, D., L. Valenti, and D. Accili. 2005. Nuclear trapping of the forkhead transcription factor FoxO1 via Sirt-dependent deacetylation promotes expression of glucogenetic genes. *J Biol Chem*. 280:20589-95.
- Fuhr, U., and A.L. Kummert. 1995. The fate of naringin in humans: a key to grapefruit juice-drug interactions? *Clin Pharmacol Ther*. 58:365-73.
- Fujimoto, N., S. Yeh, H.Y. Kang, S. Inui, H.C. Chang, A. Mizokami, and C. Chang. 1999. Cloning and characterization of androgen receptor coactivator, ARA55, in human prostate. *J Biol Chem*. 274:8316-21.
- Furukawa, R., and M. Fechheimer. 1997. The structure, function, and assembly of actin filament bundles. *Int Rev Cytol*. 175:29-90.
- Gaiddon, C., N.C. Moorthy, and C. Prives. 1999. Ref-1 regulates the transactivation and pro-apoptotic functions of p53 in vivo. *Embo J*. 18:5609-21.
- Galijatovic, A., Y. Otake, U.K. Walle, and T. Walle. 1999. Extensive metabolism of the flavonoid chrysin by human Caco-2 and Hep G2 cells. *Xenobiotica*. 29:1241-56.
- Galli, S., M.I. Labato, E. Bal de Kier Joffe, M.C. Carreras, and J.J. Poderoso. 2003. Decreased mitochondrial nitric oxide synthase activity and hydrogen peroxide relate persistent tumoral proliferation to embryonic behavior. *Cancer Res*. 63:6370-7.
- Galvano, F., L. La Fauci, G. Lazzarino, V. Fogliano, A. Ritieni, S. Ciappellano, N.C. Battistini, B. Tavazzi, and G. Galvano. 2004. Cyanidins: metabolism and biological properties. *J Nutr Biochem*. 15:2-11.
- Gao, C.M., T. Takezaki, J.H. Ding, M.S. Li, and K. Tajima. 1999. Protective effect of allium vegetables against both esophageal and stomach cancer: a simultaneous case-referent study of a high-epidemic area in Jiangsu Province, China. *Jpn J Cancer Res*. 90:614-21.
- Gao, X., Y.X. Xu, G. Divine, N. Janakiraman, R.A. Chapman, and S.C. Gautam. 2002. Disparate in vitro and in vivo antileukemic effects of resveratrol, a natural polyphenolic compound found in grapes. *J Nutr*. 132:2076-81.
- Gao, Y.T., J.K. McLaughlin, W.J. Blot, B.T. Ji, Q. Dai, and J.F. Fraumeni, Jr. 1994. Reduced risk of esophageal cancer associated with green tea consumption. *J Natl Cancer Inst*. 86:855-8.
- Garcia-Closas, R., A. Agudo, C.A. Gonzalez, and E. Riboli. 1998. Intake of specific carotenoids and flavonoids and the risk of lung cancer in women in Barcelona, Spain. *Nutr Cancer*. 32:154-8.
- Gee, J.M., M.S. DuPont, A.J. Day, G.W. Plumb, G. Williamson, and I.T. Johnson. 2000. Intestinal transport of quercetin glycosides in rats involves both deglycosylation and interaction with the hexose transport pathway. *J Nutr*. 130:2765-71.
- Gee, J.M., M.S. DuPont, M.J. Rhodes, and I.T. Johnson. 1998. Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway. *Free Radic Biol Med*. 25:19-25.
- Gehm, B.D., J.M. McAndrews, P.Y. Chien, and J.L. Jameson. 1997. Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:14138-43.
- Gemma, C., M.H. Mesches, B. Sepesi, K. Choo, D.B. Holmes, and P.C. Bickford. 2002. Diets enriched in foods with high antioxidant activity reverse age-induced decreases in cerebellar beta-adrenergic function and increases in proinflammatory cytokines. *J Neurosci*. 22:6114-20.
- Genius, J., and J. Fandrey. 2000. Nitric oxide affects the production of reactive oxygen species in hepatoma cells: implications for the process of oxygen sensing. *Free Radic Biol Med*. 29:515-21.
- Georgatos, S.D., A. Pyrpasopoulou, and P.A. Theodoropoulos. 1997. Nuclear envelope breakdown in mammalian cells involves stepwise lamina disassembly and microtubule-drive deformation of the nuclear membrane. *J Cell Sci*. 110 (Pt 17):2129-40.
- Giannakou, M.E., and L. Partridge. 2004. The interaction between FOXO and SIRT1: tipping the balance towards survival. *Trends Cell Biol*. 14:408-12.

- Gil, M.I., F.A. Tomas-Barberan, B. Hess-Pierce, D.M. Holcroft, and A.A. Kader. 2000. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J Agric Food Chem.* 48:4581-9.
- Gil-Izquierdo, A., M.I. Gil, F.A. Tomas-Barberan, and F. Ferreres. 2003. Influence of industrial processing on orange juice flavanone solubility and transformation to chalcones under gastrointestinal conditions. *J Agric Food Chem.* 51:3024-8.
- Gilmore, A.P., and K. Burrige. 1996. Regulation of vinculin binding to talin and actin by phosphatidylinositol-4-5-bisphosphate. *Nature.* 381:531-5.
- Giusti, M.M., L.E. Rodriguez-Saona, and R.E. Wrolstad. 1999. Molar absorptivity and color characteristics of acylated and non-acylated pelargonidin-based anthocyanins. *J Agric Food Chem.* 47:4631-7.
- Glatt, H. 2000. Sulfotransferases in the bioactivation of xenobiotics. *Chem Biol Interact.* 129:141-70.
- Glatt, H., C.E. Engelke, U. Pabel, W. Teubner, A.L. Jones, M.W. Coughtrie, U. Andrae, C.N. Falany, and W. Meinel. 2000. Sulfotransferases: genetics and role in toxicology. *Toxicol Lett.* 112-113:341-8.
- Goldberg, D.M., J. Yan, and G.J. Soleas. 2003. Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. *Clin Biochem.* 36:79-87.
- Goldbohm, R.A., M.G. Hertog, H.A. Brants, G. van Poppel, and P.A. van den Brandt. 1996. Consumption of black tea and cancer risk: a prospective cohort study. *J Natl Cancer Inst.* 88:93-100.
- Goosney, D.L., M. de Grado, and B.B. Finlay. 1999. Putting E. coli on a pedestal: a unique system to study signal transduction and the actin cytoskeleton. *Trends Cell Biol.* 9:11-4.
- Gorisch, S.M., P. Lichter, and K. Rippe. 2005. Mobility of multi-subunit complexes in the nucleus: accessibility and dynamics of chromatin subcompartments. *Histochem Cell Biol.* 123:217-28.
- Gorski, S.A., M. Dundr, and T. Misteli. 2006. The road much traveled: trafficking in the cell nucleus. *Curr Opin Cell Biol.* 18:284-90.
- Gosse, F., S. Guyot, S. Roussi, A. Lobstein, B. Fischer, N. Seiler, and F. Raul. 2005. Chemopreventive properties of apple procyanidins on human colon cancer-derived metastatic SW620 cells and in a rat model of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 26:1291-5.
- Graefe, E.U., J. Wittig, S. Mueller, A.K. Riethling, B. Uehleke, B. Drewelow, H. Pforte, G. Jacobasch, H. Derendorf, and M. Veit. 2001. Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. *J Clin Pharmacol.* 41:492-9.
- Graf, B.A., W. Mullen, S.T. Caldwell, R.C. Hartley, G.G. Duthie, M.E. Lean, A. Crozier, and C.A. Edwards. 2005. Disposition and metabolism of [2-14C]quercetin-4'-glucoside in rats. *Drug Metab Dispos.* 33:1036-43.
- Groenewoud, G., and H.K. Hundt. 1984. The microbial metabolism of (+)-catechin to two novel diarylpropan-2-ol metabolites in vitro. *Xenobiotica.* 14:711-7.
- Gross, M., M. Pfeiffer, M. Martini, D. Campbell, J. Slavin, and J. Potter. 1996. The quantitation of metabolites of quercetin flavonols in human urine. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 5:711-20.
- Grosse, B., M. Kachkache, V. Le Mellay, and M. Lieberherr. 2000. Membrane signalling and progesterone in female and male osteoblasts. I. Involvement Of intracellular Ca(2+), inositol trisphosphate, and diacylglycerol, but not cAMP. *J Cell Biochem.* 79:334-45.
- Grotewold, E. 2006. The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annu Rev Plant Biol.* 57:761-80.
- Gryglewski, R.J., R. Korbut, J. Robak, and J. Swies. 1987. On the mechanism of antithrombotic action of flavonoids. *Biochem Pharmacol.* 36:317-22.
- Gu, L., M.A. Kelm, J.F. Hammerstone, G. Beecher, J. Holden, D. Haytowitz, S. Gebhardt, and R.L. Prior. 2004. Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption. *J Nutr.* 134:613-7.
- Guild, G.M., P.S. Connelly, M.K. Shaw, and L.G. Tilney. 1997. Actin filament cables in Drosophila nurse cells are composed of modules that slide passively past one another during dumping. *J Cell Biol.* 138:783-97.
- Gullo, L., R. Pezzilli, and A.M. Morselli-Labate. 1995. Coffee and cancer of the pancreas: an Italian multicenter study. The Italian Pancreatic Cancer Study Group. *Pancreas.* 11:223-9.
- Gupta, S., K. Hastak, N. Ahmad, J.S. Lewin, and H. Mukhtar. 2001. Inhibition of prostate carcinogenesis in TRAMP mice by oral infusion of green tea polyphenols. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:10350-5.
- Gutzeit, H.O., Y. Henker, B. Kind, and A. Franz. 2004. Specific interactions of quercetin and other flavonoids with target proteins are revealed by elicited fluorescence. *Biochem Biophys Res Commun.* 318:490-5.
- Haendeler, J., J. Hoffmann, V. Tischler, B.C. Berk, A.M. Zeiher, and S. Dimmeler. 2002. Redox regulatory and anti-apoptotic functions of thioredoxin depend on S-nitrosylation at cysteine 69. *Nat Cell Biol.* 4:743-9.
- Hakkinen, S., and S. Auriola. 1998. High-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry and diode array ultraviolet detection in the identification of flavonol aglycones and glycosides in berries. *J Chromatogr A.* 829:91-100.
- Hanasaki, Y., S. Ogawa, and S. Fukui. 1994. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic Biol Med.* 16:845-50.
- Hansson, L.E., O. Nyren, R. Bergstrom, A. Wolk, A. Lindgren, J. Baron, and H.O. Adami. 1993. Diet and risk of gastric cancer. A population-based case-control study in Sweden. *Int J Cancer.* 55:181-9.
- Harborne, J.B., and C.A. Williams. 2001. Anthocyanins and other flavonoids. *Nat Prod Rep.* 18:310-33.
- Hartman, T.J., J.A. Tangrea, P. Pietinen, N. Malila, M. Virtanen, P.R. Taylor, and D. Albanes. 1998. Tea and coffee consumption and risk of colon and rectal cancer in middle-aged Finnish men. *Nutr Cancer.* 31:41-8.
- Hasson, T., P.G. Gillespie, J.A. Garcia, R.B. MacDonald, Y. Zhao, A.G. Yee, M.S. Mooseker, and D.P. Corey. 1997. Unconventional myosins in inner-ear sensory epithelia. *J Cell Biol.* 137:1287-307.
- Hattori, R., H. Otani, N. Maulik, and D.K. Das. 2002. Pharmacological preconditioning with resveratrol: role of nitric oxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 282:H1988-95.
- Hatzoglou, A., M. Kampa, C. Kogia, I. Charalampopoulos, P.A. Theodoropoulos, P. Anezinis, C. Dambaki, E.A. Papakonstanti, E.N. Stathopoulos, C. Stournaras, A. Gravanis, and E. Castanas. 2005. Membrane androgen receptor activation induces apoptotic regression of human prostate cancer cells in vitro and in vivo. *J Clin Endocrinol Metab.* 90:893-903.

- Hatzoglou, A., S. Romain, H. Dalapascha, and E. Castanas. 1994. Acidification reveals a greater number of epidermal growth factor receptors in human placental and breast cancer membranes. *Clin Chim Acta*. 227:97-109.
- He, J. 2004. Absorption, excretion and transformation of individual anthocyanins in rats. *In Nutrition and Food Science*. University of Maryland, Maryland. 107.
- Heaney, R.P. 2001. Constructive interactions among nutrients and bone-active pharmacologic agents with principal emphasis on calcium, phosphorus, vitamin D and protein. *J Am Coll Nutr*. 20:403S-409S; discussion 417S-420S.
- Heath, J.P., and B.F. Holifield. 1993. On the mechanisms of cortical actin flow and its role in cytoskeletal organisation of fibroblasts. *Symp Soc Exp Biol*. 47:35-56.
- Hebert, J.R., T.G. Hurley, B.C. Olendzki, J. Teas, Y. Ma, and J.S. Hampl. 1998. Nutritional and socioeconomic factors in relation to prostate cancer mortality: a cross-national study. *J Natl Cancer Inst*. 90:1637-47.
- Heijnen, C.G., G.R. Haenen, F.A. van Acker, W.J. van der Vijgh, and A. Bast. 2001. Flavonoids as peroxynitrite scavengers: the role of the hydroxyl groups. *Toxicol In Vitro*. 15:3-6.
- Heilbrun, L.K., A. Nomura, and G.N. Stemmermann. 1986. Black tea consumption and cancer risk: a prospective study. *Br J Cancer*. 54:677-83.
- Heinonen, M. 1991. Food groups as the source of retinoids, carotenoids, and vitamin A in Finland. *Int J Vitam Nutr Res*. 61:3-9.
- Heintzelman, M.B., and M.S. Mooseker. 1992. Assembly of the intestinal brush border cytoskeleton. *Curr Top Dev Biol*. 26:93-122.
- Henley, D.V., and K.S. Korach. 2006. Endocrine-disrupting chemicals use distinct mechanisms of action to modulate endocrine system function. *Endocrinology*. 147:S25-32.
- Henry, C., X. Vitrac, A. Decendit, R. Ennamany, S. Krisa, and J.M. Merillon. 2005. Cellular uptake and efflux of trans-piceid and its aglycone trans-resveratrol on the apical membrane of human intestinal Caco-2 cells. *J Agric Food Chem*. 53:798-803.
- Her, C., C. Szumlanski, I.A. Aksoy, and R.M. Weinshilboum. 1996. Human jejunal estrogen sulfotransferase and dehydroepiandrosterone sulfotransferase: immunochemical characterization of individual variation. *Drug Metab Dispos*. 24:1328-35.
- Hertog, M.G., D. Kromhout, C. Aravanis, H. Blackburn, R. Buzina, F. Fidanza, S. Giampaoli, A. Jansen, A. Menotti, S. Nedeljkovic, and et al. 1995. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Intern Med*. 155:381-6.
- Hertog, M.G., E.J. Feskens, P.C. Hollman, M.B. Katan, and D. Kromhout. 1993a. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*. 342:1007-11.
- Hertog, M.G., P.C. Hollman, M.B. Katan, and D. Kromhout. 1993b. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutr Cancer*. 20:21-9.
- Hetey, S.E., D.P. Lalonde, and C.E. Turner. 2005. Tyrosine-phosphorylated Hic-5 inhibits epidermal growth factor-induced lamellipodia formation. *Exp Cell Res*. 311:147-56.
- Hijova, E. 2006. Bioavailability of chalcones. *Bratisl Lek Listy*. 107:80-4.
- Hill, C.S., J. Wynne, and R. Treisman. 1995. The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell*. 81:1159-70.
- Hirakawa, M., M. Oike, K. Masuda, and Y. Ito. 2002. Tumor cell apoptosis by irradiation-induced nitric oxide production in vascular endothelium. *Cancer Res*. 62:1450-7.
- Hirose, K., K. Tajima, N. Hamajima, M. Inoue, T. Takezaki, T. Kuroishi, M. Yoshida, and S. Tokudome. 1995. A large-scale, hospital-based case-control study of risk factors of breast cancer according to menopausal status. *Jpn J Cancer Res*. 86:146-54.
- Hirvonen, T., J. Virtamo, P. Korhonen, D. Albanes, and P. Pietinen. 2001. Flavonol and flavone intake and the risk of cancer in male smokers (Finland). *Cancer Causes Control*. 12:789-96.
- Hirvonen, T., L.I. Mennen, A. de Bree, K. Castetbon, P. Galan, S. Bertrais, N. Arnault, and S. Hercberg. 2006. Consumption of Antioxidant-Rich Beverages and Risk for Breast Cancer in French Women. *Ann Epidemiol*.
- Ho, Y.S., H.M. Lee, T.C. Mou, Y.J. Wang, and J.K. Lin. 1997. Suppression of nitric oxide-induced apoptosis by N-acetyl-L-cysteine through modulation of glutathione, bcl-2, and bax protein levels. *Mol Carcinog*. 19:101-13.
- Hofseth, L.J., S.P. Hussain, G.N. Wogan, and C.C. Harris. 2003. Nitric oxide in cancer and chemoprevention. *Free Radic Biol Med*. 34:955-968.
- Holian, O., S. Wahid, M.J. Atten, and B.M. Attar. 2002. Inhibition of gastric cancer cell proliferation by resveratrol: role of nitric oxide. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 282:G809-G816.
- Hollman, P.C., and M.B. Katan. 1997. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomed Pharmacother*. 51:305-10.
- Hollman, P.C., and M.B. Katan. 1999. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food Chem Toxicol*. 37:937-42.
- Hollman, P.C., J.H. de Vries, S.D. van Leeuwen, M.J. Mengelers, and M.B. Katan. 1995. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am J Clin Nutr*. 62:1276-82.
- Hollman, P.C., J.M. van Trijp, M.J. Mengelers, J.H. de Vries, and M.B. Katan. 1997b. Bioavailability of the dietary antioxidant flavonol quercetin in man. *Cancer Lett*. 114:139-40.
- Hollman, P.C., J.M. van Trijp, M.N. Buysman, M.S. van der Gaag, M.J. Mengelers, J.H. de Vries, and M.B. Katan. 1997a. Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Lett*. 418:152-6.
- Hollman, P.C., K.H. Van Het Hof, L.B. Tijburg, and M.B. Katan. 2001. Addition of milk does not affect the absorption of flavonols from tea in man. *Free Radic Res*. 34:297-300.
- Hollman, P.C., M. vd Gaag, M.J. Mengelers, J.M. van Trijp, J.H. de Vries, and M.B. Katan. 1996. Absorption and disposition kinetics of the dietary antioxidant quercetin in man. *Free Radic Biol Med*. 21:703-7.
- Holt, R.R., S.A. Lazarus, M.C. Sullards, Q.Y. Zhu, D.D. Schramm, J.F. Hammerstone, C.G. Fraga, H.H. Schmitz, and C.L. Keen. 2002. Procyanidin dimer B2 [epicatechin-(4beta-8)-epicatechin] in human plasma after the consumption of a flavanol-rich cocoa. *Am J Clin Nutr*. 76:798-804.

- Honda, K., H. Sawada, T. Kihara, M. Urushitani, T. Nakamizo, A. Akaike, and S. Shimohama. 2000. Phosphatidylinositol 3-kinase mediates neuroprotection by estrogen in cultured cortical neurons. *J Neurosci Res.* 60:321-7.
- Hong, J., H. Lu, X. Meng, J.H. Ryu, Y. Hara, and C.S. Yang. 2002. Stability, cellular uptake, biotransformation, and efflux of tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Cancer Res.* 62:7241-6.
- Hong, S.J., S.I. Kim, S.M. Kwon, J.R. Lee, and B.C. Chung. 2002. Comparative study of concentration of isoflavones and lignans in plasma and prostatic tissues of normal control and benign prostatic hyperplasia. *Yonsei Med J.* 43:236-41.
- Hori, T., F. Osaka, T. Chiba, C. Miyamoto, K. Okabayashi, N. Shimbara, S. Kato, and K. Tanaka. 1999. Covalent modification of all members of human cullin family proteins by NEDD8. *Oncogene.* 18:6829-34.
- Horie, T., T. Mizuma, S. Kasai, and S. Awazu. 1988. Conformational change in plasma albumin due to interaction with isolated rat hepatocyte. *Am J Physiol.* 254:G465-70.
- Horn-Ross, P.L., E.M. John, M. Lee, S.L. Stewart, J. Koo, L.C. Sakoda, A.C. Shiau, J. Goldstein, P. Davis, and E.J. Perez-Stable. 2001. Phytoestrogen consumption and breast cancer risk in a multiethnic population: the Bay Area Breast Cancer Study. *Am J Epidemiol.* 154:434-41.
- Horn-Ross, P.L., K.J. Hoggatt, and M.M. Lee. 2002. Phytoestrogens and thyroid cancer risk: the San Francisco Bay Area thyroid cancer study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 11:43-9.
- Hoshiyama, Y., and T. Sasaba. 1992. A case-control study of stomach cancer and its relation to diet, cigarettes, and alcohol consumption in Saitama Prefecture, Japan. *Cancer Causes Control.* 3:441-8.
- Hou, D.X. 2003. Potential mechanisms of cancer chemoprevention by anthocyanins. *Curr Mol Med.* 3:149-59.
- Howitz, K.T., K.J. Bitterman, H.Y. Cohen, D.W. Lamming, S. Lavu, J.G. Wood, R.E. Zipkin, P. Chung, A. Kisielewski, L.L. Zhang, B. Scherer, and D.A. Sinclair. 2003. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature.* 425:191-6.
- Hsieh, C.Y., R.C. Santell, S.Z. Haslam, and W.G. Helferich. 1998. Estrogenic effects of genistein on the growth of estrogen receptor-positive human breast cancer (MCF-7) cells in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 58:3833-8.
- Hsieh, T.C., G. Juan, Z. Darzynkiewicz, and J.M. Wu. 1999. Resveratrol increases nitric oxide synthase, induces accumulation of p53 and p21(WAF1/CIP1), and suppresses cultured bovine pulmonary artery endothelial cell proliferation by perturbing progression through S and G2. *Cancer Res.* 59:2596-601.
- Hu, J., O. Nyren, A. Wolk, R. Bergstrom, J. Yuen, H.O. Adami, L. Guo, H. Li, G. Huang, X. Xu, and et al. 1994. Risk factors for oesophageal cancer in northeast China. *Int J Cancer.* 57:38-46.
- Hu, M., K. Krausz, J. Chen, X. Ge, J. Li, H.L. Gelboin, and F.J. Gonzalez. 2003. Identification of CYP1A2 as the main isoform for the phase I hydroxylated metabolism of genistein and a prodrug converting enzyme of methylated isoflavones. *Drug Metab Dispos.* 31:924-31.
- Huang, M.T., H.L. Newmark, and K. Frenkel. 1997. Inhibitory effects of curcumin on tumorigenesis in mice. *J Cell Biochem Suppl.* 27:26-34.
- Huang, M.T., Y.R. Lou, J.G. Xie, W. Ma, Y.P. Lu, P. Yen, B.T. Zhu, H. Newmark, and C.T. Ho. 1998. Effect of dietary curcumin and dibenzoylmethane on formation of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary tumors and lymphomas/leukemias in Sencar mice. *Carcinogenesis.* 19:1697-700.
- Huang, S.Y., C. Jeng, S.C. Kao, J.J. Yu, and D.Z. Liu. 2004. Improved haemorrhological properties by Ginkgo biloba extract (Egb 761) in type 2 diabetes mellitus complicated with retinopathy. *Clin Nutr.* 23:615-21.
- Hunter, D. 1998. Biochemical indicators of dietary intake. Oxford University Press, Oxford, New York. 174-243 pp.
- Ishii, H., M. Tatsuta, M. Baba, R. Yamamoto, H. Uehara, and A. Nakaizumi. 1998. Inhibition of experimental gastric carcinogenesis, induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in rats, by sodium nitroprusside, a nitric oxide generator. *Eur. J. Cancer.* 34:554-557.
- Ikeda, I., Y. Imasato, E. Sasaki, M. Nakayama, H. Nagao, T. Takeo, F. Yayabe, and M. Sugano. 1992. Tea catechins decrease micellar solubility and intestinal absorption of cholesterol in rats. *Biochim Biophys Acta.* 1127:141-6.
- Il'yasova, D., C. Martin, and R.S. Sandler. 2003. Tea intake and risk of colon cancer in African-Americans and whites: North Carolina colon cancer study. *Cancer Causes Control.* 14:767-72.
- Ingram, D., K. Sanders, M. Kolybaba, and D. Lopez. 1997. Case-control study of phyto-oestrogens and breast cancer. *Lancet.* 350:990-4.
- Inoue, M., K. Tajima, K. Hirose, N. Hamajima, T. Takezaki, T. Kuroishi, and S. Tominaga. 1998. Tea and coffee consumption and the risk of digestive tract cancers: data from a comparative case-referent study in Japan. *Cancer Causes Control.* 9:209-16.
- Ise, R., D. Han, Y. Takahashi, S. Terasaka, A. Inoue, M. Tanji, and R. Kiyama. 2005. Expression profiling of the estrogen responsive genes in response to phytoestrogens using a customized DNA microarray. *FEBS Lett.* 579:1732-40.
- Ishii, K., T. Furuta, and Y. Kasuya. 1997. Determination of naringin and naringenin in human urine by high-performance liquid chromatography utilizing solid-phase extraction. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 704:299-305.
- Ishii, K., T. Furuta, and Y. Kasuya. 2000. Mass spectrometric identification and high-performance liquid chromatographic determination of a flavonoid glycoside naringin in human urine. *J Agric Food Chem.* 48:56-9.
- Ishino, M., H. Aoto, H. Sasasaki, R. Suzuki, and T. Sasaki. 2000. Phosphorylation of Hic-5 at tyrosine 60 by CAKbeta and Fyn. *FEBS Lett.* 474:179-83.
- Ishizaki, T., M. Naito, K. Fujisawa, M. Maekawa, N. Watanabe, Y. Saito, and S. Narumiya. 1997. p160ROCK, a Rho-associated coiled-coil forming protein kinase, works downstream of Rho and induces focal adhesions. *FEBS Lett.* 404:118-24.
- Jacobsen, B.K., S.F. Knutsen, and G.E. Fraser. 1998. Does high soy milk intake reduce prostate cancer incidence? The Adventist Health Study (United States). *Cancer Causes Control.* 9:553-7.
- Jadeski, L.C., C. Chakraborty, and P.K. Lala. 2003. Nitric oxide-mediated promotion of mammary tumour cell migration requires sequential activation of nitric oxide synthase, guanylate cyclase and mitogen-activated protein kinase. *Int J Cancer.* 106:496-504.

- Jaffrey, S.R., H. Erdjument-Bromage, C.D. Ferris, P. Tempst, and S.H. Snyder. 2001. Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. *Nat Cell Biol.* 3:193-7.
- Jain, M.G., G.T. Hislop, G.R. Howe, J.D. Burch, and P. Ghadirian. 1998. Alcohol and other beverage use and prostate cancer risk among Canadian men. *Int J Cancer.* 78:707-11.
- Jakes, R.W., S.W. Duffy, F.C. Ng, F. Gao, E.H. Ng, A. Seow, H.P. Lee, and M.C. Yu. 2002. Mammographic parenchymal patterns and self-reported soy intake in Singapore Chinese women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 11:608-13.
- Jang, I.S., and D.H. Kim. 1996. Purification and characterization of alpha-L-rhamnosidase from *Bacteroides* JY-6, a human intestinal bacterium. *Biol Pharm Bull.* 19:1546-9.
- Jang, J.H., and Y.J. Surh. 2003. Protective effect of resveratrol on beta-amyloid-induced oxidative PC12 cell death. *Free Radic Biol Med.* 34:1100-10.
- Jankowski, A., B. Jankowska, and J. Niedworok. 2000. The effect of anthocyanin dye from grapes on experimental diabetes. *Folia Med Cracov.* 41:5-15.
- Janmey, P.A., and T.P. Stossel. 1987. Modulation of gelsolin function by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Nature.* 325:362-4.
- Jannin, B., M. Menzel, J.P. Berlot, D. Delmas, A. Lancon, and N. Latruffe. 2004. Transport of resveratrol, a cancer chemopreventive agent, to cellular targets: plasmatic protein binding and cell uptake. *Biochem Pharmacol.* 68:1113-8.
- Javed, S., N.K. Mehrotra, and Y. Shukla. 1998. Chemopreventive effects of black tea polyphenols in mouse skin model of carcinogenesis. *Biomed Environ Sci.* 11:307-13.
- Jenkins, D.C., I.G. Charles, L.L. Thomsen, D.W. Moss, L.S. Holmes, S.A. Baylis, P. Rhodes, K. Westmore, P.C. Emson, and S. Moncada. 1995. Roles of nitric oxide in tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:4392-6.
- Jensen, O.M., J. Wahrendorf, J.B. Knudsen, and B.L. Sorensen. 1986. The Copenhagen case-control study of bladder cancer. II. Effect of coffee and other beverages. *Int J Cancer.* 37:651-7.
- Jessup, W., S.M. Rankin, C.V. De Whalley, J.R. Houtt, J. Scott, and D.S. Leake. 1990. Alpha-tocopherol consumption during low-density-lipoprotein oxidation. *Biochem J.* 265:399-405.
- Ji, B.T., W.H. Chow, A.W. Hsing, J.K. McLaughlin, Q. Dai, Y.T. Gao, W.J. Blot, and J.F. Fraumeni, Jr. 1997. Green tea consumption and the risk of pancreatic and colorectal cancers. *Int J Cancer.* 70:255-8.
- Ji, B.T., W.H. Chow, G. Yang, J.K. McLaughlin, R.N. Gao, W. Zheng, X.O. Shu, F. Jin, J.F. Fraumeni, Jr., and Y.T. Gao. 1996. The influence of cigarette smoking, alcohol, and green tea consumption on the risk of carcinoma of the cardia and distal stomach in Shanghai, China. *Cancer.* 77:2449-57.
- Jia, X., C. Han, and J. Chen. 2002. Effects of tea on preneoplastic lesions and cell cycle regulators in rat liver. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 11:1663-7.
- Jiang, C., R. Agarwal, and J. Lu. 2000. Anti-angiogenic potential of a cancer chemopreventive flavonoid antioxidant, silymarin: inhibition of key attributes of vascular endothelial cells and angiogenic cytokine secretion by cancer epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 276:371-8.
- Jiang, X.M., D.L. Zheng, and J.Y. Lin. 2004. [Effects of nitric oxide on mitochondrial permeability transition and cytochrome C of human hepatocellular carcinoma cell lines]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao.* 26:519-23.
- Johndrow, J.E., C.R. Magie, and S.M. Parkhurst. 2004. Rho GTPase function in flies: insights from a developmental and organismal perspective. *Biochem Cell Biol.* 82:643-57.
- Jones, R.D., K.M. English, T.H. Jones, and K.S. Channer. 2004. Testosterone-induced coronary vasodilatation occurs via a non-genomic mechanism: evidence of a direct calcium antagonism action. *Clin Sci (Lond).* 107:149-58.
- Joseph, J.A., N.A. Denisova, G. Arendash, M. Gordon, D. Diamond, B. Shukitt-Hale, and D. Morgan. 2003. Blueberry supplementation enhances signaling and prevents behavioral deficits in an Alzheimer disease model. *Nutr Neurosci.* 6:153-62.
- Justesen, U. 2001. Collision-induced fragmentation of deprotonated methoxylated flavonoids, obtained by electrospray ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* 36:169-78.
- Kaamanen, M., H. Adlercreutz, M. Jauhainen, and M.J. Tikkanen. 2003. Accumulation of genistein and lipophilic genistein derivatives in lipoproteins during incubation with human plasma in vitro. *Biochim Biophys Acta.* 1631:147-52.
- Kadowaki, M., E. Ootani, N. Sugihara, and K. Furuno. 2005. Inhibitory effects of catechin gallates on o-methyltranslation of protocatechuic acid in rat liver cytosolic preparations and cultured hepatocytes. *Biol Pharm Bull.* 28:1509-13.
- Kageura, T., H. Matsuda, T. Morikawa, I. Toguchida, S. Harima, M. Oda, and M. Yoshikawa. 2001. Inhibitors from rhubarb on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in macrophages: structural requirements of stilbenes for the activity. *Bioorg Med Chem.* 9:1887-93.
- Kaldas, M.I., U.K. Walle, H. van der Woude, J.M. McMillan, and T. Walle. 2005. Covalent binding of the flavonoid quercetin to human serum albumin. *J Agric Food Chem.* 53:4194-7.
- Kammerer, D., A. Claus, R. Carle, and A. Schieber. 2004. Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. *J Agric Food Chem.* 52:4360-7.
- Kampa, M., A. Hatzoglou, G. Notas, A. Damianaki, E. Bakogeorgou, C. Gemetzi, E. Kouroumalis, P.M. Martin, and E. Castanas. 2000. Wine antioxidant polyphenols inhibit the proliferation of human prostate cancer cell lines. *Nutr Cancer.* 37:223-33.
- Kampa, M., A. Nistikaki, V. Tsaousis, N. Maliaraki, G. Notas, and E. Castanas. 2002. A new automated method for the determination of the Total Antioxidant Capacity (TAC) of human plasma, based on the crocin bleaching assay. *BMC Clin Pathol.* 2:3.
- Kampa, M., A.P. Nifli, I. Charalampopoulos, V.I. Alexaki, P.A. Theodoropoulos, E.N. Stathopoulos, A. Gravanis, and E. Castanas. 2005. Opposing effects of estradiol- and testosterone-membrane binding sites on T47D breast cancer cell apoptosis. *Exp Cell Res.* 307:41-51.
- Kampa, M., and E. Castanas. 2006. Membrane steroid receptor signaling in normal and neoplastic cells. *Mol Cell Endocrinol.* 246:76-82.

- Kampa, M., E.A. Papakonstanti, A. Hatzoglou, E.N. Stathopoulos, C. Stournaras, and E. Castanas. 2002. The human prostate cancer cell line LNCaP bears functional membrane testosterone receptors that increase PSA secretion and modify actin cytoskeleton. *Faseb J.* 16:1429-31.
- Kampa, M., V.I. Alexaki, G. Notas, A.P. Nifli, A. Nistikaki, A. Hatzoglou, E. Bakogeorgou, E. Kouimtzooglou, G. Blekas, D. Boskou, A. Gravanis, and E. Castanas. 2004. Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action. *Breast Cancer Res.* 6:R63-74.
- Kanakis, C.D., P.A. Tarantilis, M.G. Polissiou, S. Diamantoglou, and H.A. Tajmir-Riahi. 2005. DNA interaction with naturally occurring antioxidant flavonoids quercetin, kaempferol, and delphinidin. *J Biomol Struct Dyn.* 22:719-24.
- Kanner, J., J.E. Frankel, R. Granit, B. German, and J.E. Kinsella. 1994. Natural Antioxidants in Grapes and Wines. *J Agric Food Chem.* 42:64-69.
- Kapoor, G.S., B.A. Atkins, and K.D. Mehta. 2002. Activation of Raf-1/MEK-1/2/p42/44(MAPK) cascade alone is sufficient to uncouple LDL receptor expression from cell growth. *Mol Cell Biochem.* 236:13-22.
- Katiyar, S.K., M.S. Matsui, C.A. Elmets, and H. Mukhtar. 1999. Polyphenolic antioxidant (-)-epigallocatechin-3-gallate from green tea reduces UVB-induced inflammatory responses and infiltration of leukocytes in human skin. *Photochem Photobiol.* 69:148-53.
- Katiyar, S.K., R. Agarwal, and H. Mukhtar. 1993. Protective effects of green tea polyphenols administered by oral intubation against chemical carcinogen-induced forestomach and pulmonary neoplasia in A/J mice. *Cancer Lett.* 73:167-72.
- Kato, S., H. Endoh, Y. Masuhiro, T. Kitamoto, S. Uchiyama, H. Sasaki, S. Masushige, Y. Gotoh, E. Nishida, H. Kawashima, D. Metzger, and P. Chambon. 1995. Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science.* 270:1491-4.
- Katula, K.S., J.A. McCain, and A.T. Radewicz. 2005. Relative ability of dietary compounds to modulate nuclear factor-kappaB activity as assessed in a cell-based reporter system. *J Med Food.* 8:269-74.
- Kaunas, R., P. Nguyen, S. Usami, and S. Chien. 2005. Cooperative effects of Rho and mechanical stretch on stress fiber organization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:15895-900.
- Kauppi, T.J., T. Kotiaho, R. Kostianen, and A.P. Bruins. 2004. Negative ion-atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom.* 15:203-11.
- Kawabata, K., A. Murakami, and H. Ohigashi. 2005. Nobiletin, a citrus flavonoid, down-regulates matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) expression in HT-29 human colorectal cancer cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* 69:307-14.
- Kawada, N., S. Seki, M. Inoue, and T. Kuroki. 1998. Effect of antioxidants, resveratrol, quercetin, and N-acetylcysteine, on the functions of cultured rat hepatic stellate cells and Kupffer cells. *Hepatology.* 27:1265-74.
- Kawaii, S., Y. Tomono, E. Katase, K. Ogawa, and M. Yano. 1999. Quantitation of flavonoid constituents in citrus fruits. *J Agric Food Chem.* 47:3565-71.
- Kawano, Y., Y. Fukata, N. Oshiro, M. Amano, T. Nakamura, M. Ito, F. Matsumura, M. Inagaki, and K. Kaibuchi. 1999. Phosphorylation of myosin-binding subunit (MBS) of myosin phosphatase by Rho-kinase in vivo. *J Cell Biol.* 147:1023-38.
- Keinan-Boker, L., Y.T. van Der Schouw, D.E. Grobbee, and P.H. Peeters. 2004. Dietary phytoestrogens and breast cancer risk. *Am J Clin Nutr.* 79:282-8.
- Kelly, M.J., A.H. Lagrange, E.J. Wagner, and O.K. Ronnekleiv. 1999. Rapid effects of estrogen to modulate G protein-coupled receptors via activation of protein kinase A and protein kinase C pathways. *Steroids.* 64:64-75.
- Kelly, M.J., and E.R. Levin. 2001. Rapid actions of plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol Metab.* 12:152-6.
- Key, T.J., G.B. Sharp, P.N. Appleby, V. Beral, M.T. Goodman, M. Soda, and K. Mabuchi. 1999. Soya foods and breast cancer risk: a prospective study in Hiroshima and Nagasaki, Japan. *Br J Cancer.* 81:1248-56.
- Kilkinen, A., J. Virtamo, E. Vartiainen, R. Sankila, M.J. Virtanen, H. Adlercreutz, and P. Pietinen. 2004. Serum enterolactone concentration is not associated with breast cancer risk in a nested case-control study. *Int J Cancer.* 108:277-80.
- Kilkinen, A., J. Virtamo, M.J. Virtanen, H. Adlercreutz, D. Albanes, and P. Pietinen. 2003. Serum enterolactone concentration is not associated with prostate cancer risk in a nested case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 12:1209-12.
- Kim, H., P. Hall, M. Smith, M. Kirk, J.K. Prasain, S. Barnes, and C. Grubbs. 2004. Chemoprevention by grape seed extract and genistein in carcinogen-induced mammary cancer in rats is diet dependent. *J Nutr.* 134:3445S-3452S.
- Kim, Y.A., B.T. Choi, Y.T. Lee, D.I. Park, S.H. Rhee, K.Y. Park, and Y.H. Choi. 2004. Resveratrol inhibits cell proliferation and induces apoptosis of human breast carcinoma MCF-7 cells. *Oncol Rep.* 11:441-6.
- Kimura, H., and P.R. Cook. 2001. Kinetics of core histones in living human cells: little exchange of H3 and H4 and some rapid exchange of H2B. *J Cell Biol.* 153:1341-53.
- Kinlen, L.J., and K. McPherson. 1984. Pancreas cancer and coffee and tea consumption: a case-control study. *Br J Cancer.* 49:93-6.
- Kitson, T.M. 2004. Spectrophotometric and kinetic studies on the binding of the bioflavonoid quercetin to bovine serum albumin. *Biosci Biotechnol Biochem.* 68:2165-70.
- Klampfer, L., J. Huang, T. Sasazuki, S. Shirasawa, and L. Augenlicht. 2004. Oncogenic Ras promotes butyrate-induced apoptosis through inhibition of gelsolin expression. *J Biol Chem.* 279:36680-8.
- Klinge, C.M., K.A. Blankenship, K.E. Risinger, S. Bhatnagar, E.L. Noisin, W.K. Sumanasekera, L. Zhao, D.M. Brey, and R.S. Keynton. 2005. Resveratrol and estradiol rapidly activate MAPK signaling through estrogen receptors alpha and beta in endothelial cells. *J Biol Chem.* 280:7460-8.
- Knekt, P., J. Kumpulainen, R. Jarvinen, H. Rissanen, M. Heliovaara, A. Reunanen, T. Hakulinen, and A. Aromaa. 2002. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr.* 76:560-8.

- Kobayashi, K., S. Kuroda, M. Fukata, T. Nakamura, T. Nagase, N. Nomura, Y. Matsuura, N. Yoshida-Kubomura, A. Iwamatsu, and K. Kaibuchi. 1998. p140Sra-1 (specifically Rac1-associated protein) is a novel specific target for Rac1 small GTPase. *J Biol Chem*. 273:291-5.
- Kobayashi, S., T. Miyamoto, I. Kimura, and M. Kimura. 1995. Inhibitory effect of isoliquiritin, a compound in licorice root, on angiogenesis in vivo and tube formation in vitro. *Biol Pharm Bull*. 18:1382-6.
- Kohlmeier, L. 1991. Problems and pitfalls of food-to-nutrient conversion. *WHO Reg Publ Eur Ser*. 34:73-84.
- Kojima, H., K. Sakurai, K. Kikuchi, S. Kawahara, Y. Kirino, H. Nagoshi, Y. Hirata, and T. Nagano. 1998. Development of a fluorescent indicator for nitric oxide based on the fluorescein chromophore. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 46:373-5.
- Kondratskaya, E.L., A.I. Fisyunov, S.S. Chatterjee, and O.A. Krishtal. 2004. Ginkgolide B preferentially blocks chloride channels formed by heteromeric glycine receptors in hippocampal pyramidal neurons of rat. *Brain Res Bull*. 63:309-14.
- Kong, J.M., L.S. Chia, N.K. Goh, T.F. Chia, and R. Brouillard. 2003. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*. 64:923-33.
- Kono, S., M. Ikeda, S. Tokudome, and M. Kuratsune. 1988. A case-control study of gastric cancer and diet in northern Kyushu, Japan. *Jpn J Cancer Res*. 79:1067-74.
- Kopetz, E.S., J.B. Nelson, and M.A. Carducci. 2002. Endothelin-1 as a target for therapeutic intervention in prostate cancer. *Invest New Drugs*. 20:173-82.
- Kotha, A., M. Sekharam, L. Cilenti, K. Siddiquee, A. Khaled, A.S. Zervos, B. Carter, J. Turkson, and R. Jove. 2006. Resveratrol inhibits Src and Stat3 signaling and induces the apoptosis of malignant cells containing activated Stat3 protein. *Mol Cancer Ther*. 5:621-9.
- Kousteni, S., T. Bellido, L.I. Plotkin, C.A. O'Brien, D.L. Bodenner, L. Han, K. Han, G.B. DiGregorio, J.A. Katzenellenbogen, B.S. Katzenellenbogen, P.K. Roberson, R.S. Weinstein, R.L. Jilka, and S.C. Manolagas. 2001. Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell*. 104:719-30.
- Kozma, R., S. Ahmed, A. Best, and L. Lim. 1995. The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol*. 15:1942-52.
- Kozuki, Y., Y. Miura, and K. Yagasaki. 2001. Resveratrol suppresses hepatoma cell invasion independently of its anti-proliferative action. *Cancer Lett*. 167:151-6.
- Krause, M., and R. Galensa. 1991. Analysis of enantiomeric flavanones in plant extracts by high-performance liquid chromatography on a cellulose triacetate based chiral stationary phase. *Chromatographia*. 32:69-72.
- Krendel, M., and M.S. Mooseker. 2005. Myosins: tails (and heads) of functional diversity. *Physiology (Bethesda)*. 20:239-51.
- Kudo, M., Z. Naito, M. Yokoyama, and G. Asano. 1999. Effects of quercetin and sunphenon on responses of cancer cells to heat shock damage. *Exp Mol Pathol*. 66:66-75.
- Kuhnau, J. 1976. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet*. 24:117-91.
- Kuhnle, G., J.P. Spencer, G. Chowrimootoo, H. Schroeter, E.S. Debnam, S.K. Srari, C. Rice-Evans, and U. Hahn. 2000. Resveratrol is absorbed in the small intestine as resveratrol glucuronide. *Biochem Biophys Res Commun*. 272:212-7.
- Kuiper, G.G., J.G. Lemmen, B. Carlsson, J.C. Corton, S.H. Safe, P.T. van der Saag, B. van der Burg, and J.A. Gustafsson. 1998. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*. 139:4252-63.
- Kulju, K.S., and J.M. Lehman. 1995. Increased p53 protein associated with aging in human diploid fibroblasts. *Exp Cell Res*. 217:336-45.
- Kundu, J.K., and Y.J. Surh. 2004. Molecular basis of chemoprevention by resveratrol: NF-kappaB and AP-1 as potential targets. *Mutat Res*. 555:65-80.
- Kuo, P.L., L.C. Chiang, and C.C. Lin. 2002. Resveratrol-induced apoptosis is mediated by p53-dependent pathway in Hep G2 cells. *Life Sci*. 72:23-34.
- Kuo, S.M. 1996. Antiproliferative potency of structurally distinct dietary flavonoids on human colon cancer cells. *Cancer Lett*. 110:41-8.
- Kuo, S.M. 1997. Dietary flavonoid and cancer prevention: evidence and potential mechanism. *Crit Rev Oncog*. 8:47-69.
- Kureishy, N., V. Sapountzi, S. Prag, N. Anilkumar, and J.C. Adams. 2002. Fascins, and their roles in cell structure and function. *Bioessays*. 24:350-61.
- Kuroki, Y., K. Fukushima, Y. Kanda, K. Mizuno, and Y. Watanabe. 2000. Putative membrane-bound estrogen receptors possibly stimulate mitogen-activated protein kinase in the rat hippocampus. *Eur J Pharmacol*. 400:205-9.
- La Vecchia, C., E. Negri, S. Franceschi, B. D'Avanzo, and P. Boyle. 1992. Tea consumption and cancer risk. *Nutr Cancer*. 17:27-31.
- Laferte, A., E. Favry, A. Sentenac, M. Riva, C. Carles, and S. Chedin. 2006. The transcriptional activity of RNA polymerase I is a key determinant for the level of all ribosome components. *Genes Dev*. 20:2030-40.
- Lagiou, P., E. Samoli, A. Lagiou, J. Peterson, A. Tzonou, J. Dwyer, and D. Trichopoulos. 2004b. Flavonoids, vitamin C and adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Causes Control*. 15:67-72.
- Lagiou, P., E. Samoli, A. Lagiou, K. Katsouyanni, J. Peterson, J. Dwyer, and D. Trichopoulos. 2004a. Flavonoid intake in relation to lung cancer risk: case-control study among women in Greece. *Nutr Cancer*. 49:139-43.
- Lambert, J.D., and C.S. Yang. 2003. Mechanisms of cancer prevention by tea constituents. *J Nutr*. 133:3262S-3267S.
- Lambrechts, A., M. Van Troys, and C. Ampe. 2004. The actin cytoskeleton in normal and pathological cell motility. *Int J Biochem Cell Biol*. 36:1890-909.
- Lancon, A., D. Delma, H. Osman, J.P. Thenot, B. Jannin, and N. Latruffe. 2004. Human hepatic cell uptake of resveratrol: involvement of both passive diffusion and carrier-mediated process. *Biochem Biophys Res Commun*. 316:1132-7.

- Landau, J.M., Z.Y. Wang, G.Y. Yang, W. Ding, and C.S. Yang. 1998. Inhibition of spontaneous formation of lung tumors and rhabdomyosarcomas in A/J mice by black and green tea. *Carcinogenesis*. 19:501-7.
- Landolfi, R., R.L. Mower, and M. Steiner. 1984. Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. Structure-activity relations. *Biochem Pharmacol*. 33:1525-30.
- Langley, E., M. Pearson, M. Faretta, U.M. Bauer, R.A. Frye, S. Minucci, P.G. Pelicci, and T. Kouzarides. 2002. Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence. *Embo J*. 21:2383-96.
- Lapidot, T., S. Harel, R. Granit, and J. Kanner. 1998. Bioavailability of red wine anthocyanins as detected in human urine. *J Agric Food Chem*. 46:4297-4302.
- Laurent, C., P. Besancon, C. Auger, J.M. Rouanet, and B. Caporiccio. 2004. Grape seed extract affects proliferation and differentiation of human intestinal Caco-2 cells. *J Agric Food Chem*. 52:3301-8.
- Le Corre, L., P. Fustier, N. Chalabi, Y.J. Bignon, and D. Bernard-Gallon. 2004. Effects of resveratrol on the expression of a panel of genes interacting with the BRCA1 oncosuppressor in human breast cell lines. *Clin Chim Acta*. 344:115-21.
- Le Mellay, V., F. Lasmoles, and M. Lieberherr. 1999. Galpha(q/11) and gbetagamma proteins and membrane signaling of calcitriol and estradiol. *J Cell Biochem*. 75:138-46.
- Lee, H.P., L. Gourley, S.W. Duffy, J. Esteve, J. Lee, and N.E. Day. 1991. Dietary effects on breast-cancer risk in Singapore. *Lancet*. 337:1197-200.
- Lee, H.P., L. Gourley, S.W. Duffy, J. Esteve, J. Lee, and N.E. Day. 1992. Risk factors for breast cancer by age and menopausal status: a case-control study in Singapore. *Cancer Causes Control*. 3:313-22.
- Lee, M.M., S.L. Gomez, J.S. Chang, M. Wey, R.T. Wang, and A.W. Hsing. 2003. Soy and isoflavone consumption in relation to prostate cancer risk in China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 12:665-8.
- Lee, T.K., C.L. Hammond, and N. Ballatori. 2001. Intracellular glutathione regulates taurocholate transport in HepG2 cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 174:207-15.
- Lee, Y.S., and M.M. Reidenberg. 1998. A method for measuring naringenin in biological fluids and its disposition from grapefruit juice by man. *Pharmacology*. 56:314-7.
- Lemeshow, S., L. Letenneur, J.F. Dartigues, S. Lafont, J.M. Orgogozo, and D. Commenges. 1998. Illustration of analysis taking into account complex survey considerations: the association between wine consumption and dementia in the PAQUID study. *Personnes Ages Quid*. *Am J Epidemiol*. 148:298-306.
- Lesser, S., R. Cermak, and S. Wolffram. 2004. Bioavailability of quercetin in pigs is influenced by the dietary fat content. *J Nutr*. 134:1508-11.
- Leung, T., X.Q. Chen, E. Manser, and L. Lim. 1996. The p160 RhoA-binding kinase ROK alpha is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton. *Mol Cell Biol*. 16:5313-27.
- Leung, T., X.Q. Chen, I. Tan, E. Manser, and L. Lim. 1998. Myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase acts as a Cdc42 effector in promoting cytoskeletal reorganization. *Mol Cell Biol*. 18:130-40.
- Levenson, A.S., B.D. Gehm, S.T. Pearce, J. Horiguchi, L.A. Simons, J.E. Ward, 3rd, J.L. Jameson, and V.C. Jordan. 2003. Resveratrol acts as an estrogen receptor (ER) agonist in breast cancer cells stably transfected with ER alpha. *Int J Cancer*. 104:587-96.
- Levi, F., C. Pasche, F. Lucchini, R. Ghidoni, M. Ferraroni, and C. La Vecchia. 2005. Resveratrol and breast cancer risk. *Eur J Cancer Prev*. 14:139-42.
- Levi, F., F. Lucchini, E. Negri, and C. La Vecchia. 2004. Trends in mortality from major cancers in the European Union, including acceding countries, in 2004. *Cancer*. 101:2843-50.
- Levin, E.R. 2002. Cellular functions of plasma membrane estrogen receptors. *Steroids*. 67:471-5.
- Levites, Y., T. Amit, S. Mandel, and M.B. Youdim. 2003. Neuroprotection and neurorescue against Abeta toxicity and PKC-dependent release of nonamyloidogenic soluble precursor protein by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Faseb J*. 17:952-4.
- Li, C.Q., and G.N. Wogan. 2005. Nitric oxide as a modulator of apoptosis. *Cancer Lett*. 226:1-15.
- Li, C.Q., L.J. Trudel, and G.N. Wogan. 2002. Nitric oxide-induced genotoxicity, mitochondrial damage, and apoptosis in human lymphoblastoid cells expressing wild-type and mutant p53. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:10364-9.
- Li, J., and T.R. Billiar. 1999. Nitric Oxide. IV. Determinants of nitric oxide protection and toxicity in liver. *Am J Physiol*. 276:G1069-73.
- Li, N., X. Chen, J. Liao, G. Yang, S. Wang, Y. Josephson, C. Han, J. Chen, M.T. Huang, and C.S. Yang. 2002. Inhibition of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced oral carcinogenesis in hamsters by tea and curcumin. *Carcinogenesis*. 23:1307-13.
- Li, X., B. Guan, S. Maghami, and C.J. Bieberich. 2006. NKX3.1 is regulated by protein kinase CK2 in prostate tumor cells. *Mol Cell Biol*. 26:3008-17.
- Liakopoulos, G., D. Nikolopoulos, A. Klouvatou, K.A. Vekkos, Y. Manetas, and G. Karabourniotis. 2006. The photoprotective role of epidermal anthocyanins and surface pubescence in young leaves of grapevine (*Vitis vinifera*). *Ann Bot (Lond)*. 98:257-65.
- Liang, Y.C., S.H. Tsai, L. Chen, S.Y. Lin-Shiau, and J.K. Lin. 2003. Resveratrol-induced G2 arrest through the inhibition of CDK7 and p34CDC2 kinases in colon carcinoma HT29 cells. *Biochem Pharmacol*. 65:1053-60.
- Liggins, J., A. Mulligan, S. Runswick, and S.A. Bingham. 2002. Daidzein and genistein content of cereals. *Eur J Clin Nutr*. 56:961-6.
- Lin, J.H., and A.Y. Lu. 2001. Interindividual variability in inhibition and induction of cytochrome P450 enzymes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 41:535-67.
- Lin, Z., Y. Yan, D. Zhu, B. Yu, and Q. Wang. 2005. Protective effects of FBD--an experimental Chinese traditional medicinal formula on memory dysfunction in mice induced by cerebral ischemia-reperfusion. *J Ethnopharmacol*. 97:477-83.
- Lindahl, M., and C. Tagesson. 1993. Selective inhibition of group II phospholipase A2 by quercetin. *Inflammation*. 17:573-82.
- Liu, C.S., Y.S. Song, K.J. Zhang, J.C. Ryu, M. Kim, and T.H. Zhou. 1995. Gas chromatographic/mass spectrometric profiling of luteolin and its metabolites in rat urine and bile. *J Pharm Biomed Anal*. 13:1409-14.
- Liu, J.D., S.H. Chen, C.L. Lin, S.H. Tsai, and Y.C. Liang. 2001. Inhibition of melanoma growth and metastasis by combination with (-)-epigallocatechin-3-gallate and dacarbazine in mice. *J Cell Biochem*. 83:631-42.

- Lo, C.M., D.B. Buxton, G.C. Chua, M. Dembo, R.S. Adelstein, and Y.L. Wang. 2004. Nonmuscle myosin IIb is involved in the guidance of fibroblast migration. *Mol Biol Cell*. 15:982-9.
- Loktionova, S.A., and A.E. Kabakov. 1998. Protein phosphatase inhibitors and heat preconditioning prevent Hsp27 dephosphorylation, F-actin disruption and deterioration of morphology in ATP-depleted endothelial cells. *FEBS Lett*. 433:294-300.
- Losel, R., and M. Wehling. 2003. Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 4:46-56.
- Lu, C.M., S.J. Lan, Y.H. Lee, J.K. Huang, C.H. Huang, and C.C. Hsieh. 1999. Tea consumption: fluid intake and bladder cancer risk in Southern Taiwan. *Urology*. 54:823-8.
- Lu, L.J., K.E. Anderson, J.J. Grady, F. Kohen, and M. Nagamani. 2000. Decreased ovarian hormones during a soya diet: implications for breast cancer prevention. *Cancer Res*. 60:4112-21.
- Lucas Sd, S., J.M. Lopez-Alcorocho, J. Bartolome, and V. Carreno. 2004. Nitric oxide and TGF-beta1 inhibit HNF-4alpha function in HEPG2 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 321:688-94.
- Ludden, T.M. 1991. Nonlinear pharmacokinetics: clinical Implications. *Clin Pharmacokinet*. 20:429-46.
- Ludwig-Muller, J., S.V. Tokalov, A. Franz, and H.O. Gutzeit. 2005. Quercetin metabolism in vital and apoptotic human leukaemia cells. *Biol Chem*. 386:279-83.
- Ma, M.K., M.H. Woo, and H.L. McLeod. 2002. Genetic basis of drug metabolism. *Am J Health Syst Pharm*. 59:2061-9.
- MacDonald, I.A., R.G. Bussard, D.M. Hutchison, and L.V. Holdeman. 1984. Rutin-induced beta-glucosidase activity in *Streptococcus faecium* VGH-1 and *Streptococcus* sp. strain FRP-17 isolated from human feces: formation of the mutagen, quercetin, from rutin. *Appl Environ Microbiol*. 47:350-5.
- Macheix, J. 1990. Fruit Phenolics. CRC Press LLC, Boca Raton, Florida.
- Machelon, V., F. Nome, B. Grosse, and M. Lieberherr. 1996. Progesterone triggers rapid transmembrane calcium influx and/or calcium mobilization from endoplasmic reticulum, via a pertussis-insensitive G-protein in granulosa cells in relation to luteinization process. *J Cell Biochem*. 61:619-28.
- Mack, W.J., S. Preston-Martin, L. Bernstein, and D. Qian. 2002. Lifestyle and other risk factors for thyroid cancer in Los Angeles County females. *Ann Epidemiol*. 12:395-401.
- Mack, W.J., S. Preston-Martin, L. Dal Maso, R. Galanti, M. Xiang, S. Franceschi, A. Hallquist, F. Jin, L. Kolonel, C. La Vecchia, F. Levi, A. Linos, E. Lund, A. McTiernan, K. Mabuchi, E. Negri, G. Wingren, and E. Ron. 2003. A pooled analysis of case-control studies of thyroid cancer: cigarette smoking and consumption of alcohol, coffee, and tea. *Cancer Causes Control*. 14:773-85.
- Maekawa, M., T. Ishizaki, S. Boku, N. Watanabe, A. Fujita, A. Iwamatsu, T. Obinata, K. Ohashi, K. Mizuno, and S. Narumiya. 1999. Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science*. 285:895-8.
- Maffei Facino, R., M. Carini, G. Aldini, F. Berti, G. Rossoni, E. Bombardelli, and P. Morazzoni. 1996. Procyanidines from *Vitis vinifera* seeds protect rabbit heart from ischemia/reperfusion injury: antioxidant intervention and/or iron and copper sequestering ability. *Planta Med*. 62:495-502.
- Maggiolini, M., A. Vivacqua, G. Fasanella, A.G. Recchia, D. Sisci, V. Pezzi, D. Montanaro, A.M. Musti, D. Picard, and S. Ando. 2004. The G protein-coupled receptor GPR30 mediates c-fos up-regulation by 17beta-estradiol and phytoestrogens in breast cancer cells. *J Biol Chem*. 279:27008-16.
- Malliaraki, N., D. Mpliamplias, M. Kampa, K. Perakis, A.N. Margioris, and E. Castanas. 2003. Total and corrected antioxidant capacity in hemodialyzed patients. *BMC Nephrol*. 4:4.
- Manach, C., C. Morand, C. Demigne, O. Texier, F. Regerat, and C. Remesy. 1997. Bioavailability of rutin and quercetin in rats. *FEBS Lett*. 409:12-6.
- Manach, C., C. Morand, O. Texier, M.L. Favier, G. Agullo, C. Demigne, F. Regerat, and C. Remesy. 1995. Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin. *J Nutr*. 125:1911-22.
- Manach, C., C. Morand, V. Crespy, C. Demigne, O. Texier, F. Regerat, and C. Remesy. 1998. Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. *FEBS Lett*. 426:331-6.
- Manach, C., G. Williamson, C. Morand, A. Scalbert, and C. Remesy. 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr*. 81:230S-242S.
- Mandel, S.A., Y. Avramovich-Tirosh, L. Reznichenko, H. Zheng, O. Weinreb, T. Amit, and M.B. Youdim. 2005. Multifunctional activities of green tea catechins in neuroprotection. Modulation of cell survival genes, iron-dependent oxidative stress and PKC signaling pathway. *Neurosignals*. 14:46-60.
- Mangelsdorf, D.J., C. Thummel, M. Beato, P. Herrlich, G. Schutz, K. Umeson, B. Blumberg, P. Kastner, M. Mark, P. Chambon, and R.M. Evans. 1995. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*. 83:835-9.
- Marambaud, P., H. Zhao, and P. Davies. 2005. Resveratrol promotes clearance of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *J Biol Chem*. 280:37377-82.
- Marier, J.F., P. Vachon, A. Gritsas, J. Zhang, J.P. Moreau, and M.P. Ducharme. 2002. Metabolism and disposition of resveratrol in rats: extent of absorption, glucuronidation, and enterohepatic recirculation evidenced by a linked-rat model. *J Pharmacol Exp Ther*. 302:369-73.
- Martin, D.E., and M.N. Hall. 2005. The expanding TOR signaling network. *Curr Opin Cell Biol*. 17:158-66.
- Martin-Sanz, P., S. Hortelano, N.A. Callejas, N. Goren, M. Casado, M. Zeini, and L. Bosca. 2002. Nitric oxide in liver inflammation and regeneration. *Metab Brain Dis*. 17:325-34.
- Mas, T., J. Susperregui, B. Berke, C. Cheze, S. Moreau, A. Nuhlich, and J. Vercauteren. 2000. DNA triplex stabilization property of natural anthocyanins. *Phytochemistry*. 53:679-87.
- Matova, N., S. Mahajan-Miklos, M.S. Mooseker, and L. Cooley. 1999. Drosophila quail, a villin-related protein, bundles actin filaments in apoptotic nurse cells. *Development*. 126:5645-57.
- Matsui, T., M. Maeda, Y. Doi, S. Yonemura, M. Amano, K. Kaibuchi, and S. Tsukita. 1998. Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association. *J Cell Biol*. 140:647-57.
- Matsumoto, H., H. Inaba, M. Kishi, S. Tominaga, M. Hirayama, and T. Tsuda. 2001. Orally administered delphinidin 3-rutinoside and cyanidin 3-rutinoside are directly absorbed in rats and humans and appear in the blood as the intact forms. *J Agric Food Chem*. 49:1546-51.

- Matsumoto, H., Y. Nakamura, M. Hirayama, Y. Yoshiki, and K. Okubo. 2002. Antioxidant activity of black currant anthocyanin aglycons and their glycosides measured by chemiluminescence in a neutral pH region and in human plasma. *J Agric Food Chem.* 50:5034-7.
- Mattila, P., J. Astola, and J. Kumpulainen. 2000. Determination of flavonoids in plant material by HPLC with diode-array and electro-array detections. *J Agric Food Chem.* 48:5834-41.
- Mattivi, F., R. Guzzon, U. Vrhovsek, M. Stefanini, and R. Velasco. 2006. Metabolite profiling of grape: Flavonols and anthocyanins. *J Agric Food Chem.* 54:7692-702.
- Maubach, J., M.E. Bracke, A. Heyerick, H.T. Depypere, R.F. Serreyn, M.M. Mareel, and D. De Keukeleire. 2003. Quantitation of soy-derived phytoestrogens in human breast tissue and biological fluids by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 784:137-44.
- Mazur, W. 1998. Phytoestrogen content in foods. *Baillieres Clin Endocrinol Metab.* 12:729-42.
- Mazza, G. 1995. Anthocyanins in grapes and grape products. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 35:341-71.
- Mazzuca, P., P. Ferranti, G. Picariello, L. Chianese, and F. Addeo. 2005. Mass spectrometry in the study of anthocyanins and their derivatives: differentiation of *Vitis vinifera* and hybrid grapes by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry and tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* 40:83-90.
- McGhie, T.K., G.D. Ainge, L.E. Barnett, J.M. Cooney, and D.J. Jensen. 2003. Anthocyanin glycosides from berry fruit are absorbed and excreted unmetabolized by both humans and rats. *J Agric Food Chem.* 51:4539-48.
- McKenna, N.J., J. Xu, Z. Nawaz, S.Y. Tsai, M.J. Tsai, and B.W. O'Malley. 1999. Nuclear receptor coactivators: multiple enzymes, multiple complexes, multiple functions. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 69:3-12.
- McNaughton, L., L. Puttagunta, M.A. Martinez-Cuesta, N. Kneteman, I. Mayers, R. Moqbel, Q. Hamid, and M.W. Radomski. 2002. Distribution of nitric oxide synthase in normal and cirrhotic human liver. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:17161-6.
- McVey, M.J., G.M. Cooke, and I.H. Curran. 2004a. Altered testicular microsomal steroidogenic enzyme activities in rats with lifetime exposure to soy isoflavones. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 92:435-46.
- McVey, M.J., G.M. Cooke, and I.H. Curran. 2004b. Increased serum and testicular androgen levels in F1 rats with lifetime exposure to soy isoflavones. *Reprod Toxicol.* 18:677-85.
- Meech, R., and P.I. Mackenzie. 1997. Structure and function of uridine diphosphate glucuronosyltransferases. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 24:907-15.
- Meiers, S., M. Kemeny, U. Weyand, R. Gastpar, E. von Angerer, and D. Marko. 2001. The anthocyanidins cyanidin and delphinidin are potent inhibitors of the epidermal growth-factor receptor. *J Agric Food Chem.* 49:958-62.
- Mejillano, M.R., S. Kojima, D.A. Applewhite, F.B. Gertler, T.M. Svitkina, and G.G. Borisy. 2004. Lamellipodial versus filopodial mode of the actin nanomachinery: pivotal role of the filament barbed end. *Cell.* 118:363-73.
- Mendoza, C., A. Soler, and J. Tesarik. 1995. Nongenomic steroid action: independent targeting of a plasma membrane calcium channel and a tyrosine kinase. *Biochem Biophys Res Commun.* 210:518-23.
- Meng, X., P. Maliakal, H. Lu, M.J. Lee, and C.S. Yang. 2004. Urinary and plasma levels of resveratrol and quercetin in humans, mice, and rats after ingestion of pure compounds and grape juice. *J Agric Food Chem.* 52:935-42.
- Meselhy, M.R., N. Nakamura, and M. Hattori. 1997. Biotransformation of (-)-epicatechin 3-O-gallate by human intestinal bacteria. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 45:888-93.
- Messina, M., W. McCaskill-Stevens, and J.W. Lampe. 2006. Addressing the soy and breast cancer relationship: review, commentary, and workshop proceedings. *J Natl Cancer Inst.* 98:1275-84.
- Michels, K.B., L. Holmberg, L. Bergkvist, and A. Wolk. 2002. Coffee, tea, and caffeine consumption and breast cancer incidence in a cohort of Swedish women. *Ann Epidemiol.* 12:21-6.
- Migliaccio, A., D. Piccolo, G. Castoria, M. Di Domenico, A. Bilancio, M. Lombardi, W. Gong, M. Beato, and F. Auricchio. 1998. Activation of the Src/p21ras/Erk pathway by progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor. *Embo J.* 17:2008-18.
- Migliaccio, A., G. Castoria, M. Di Domenico, A. de Falco, A. Bilancio, M. Lombardi, M.V. Barone, D. Ametrano, M.S. Zannini, C. Abbondanza, and F. Auricchio. 2000. Steroid-induced androgen receptor-oestradiol receptor beta-Src complex triggers prostate cancer cell proliferation. *Embo J.* 19:5406-17.
- Migliaccio, A., M. Di Domenico, G. Castoria, A. de Falco, P. Bontempo, E. Nola, and F. Auricchio. 1996. Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *Embo J.* 15:1292-300.
- Miki, H., T. Sasaki, Y. Takai, and T. Takenawa. 1998. Induction of filopodium formation by a WASP-related actin-depolymerizing protein N-WASP. *Nature.* 391:93-6.
- Miksicek, R.J. 1993. Commonly occurring plant flavonoids have estrogenic activity. *Mol Pharmacol.* 44:37-43.
- Miller, N.J., and C.A. Rice-Evans. 1995. Antioxidant activity of resveratrol in red wine. *Clin Chem.* 41:1789.
- Minagawa, A., Y. Otani, T. Kubota, N. Wada, T. Furukawa, K. Kumai, K. Kameyama, Y. Okada, M. Fujii, M. Yano, T. Sato, A. Ito, and M. Kitajima. 2001. The citrus flavonoid, nobiletin, inhibits peritoneal dissemination of human gastric carcinoma in SCID mice. *Jpn J Cancer Res.* 92:1322-8.
- Minden, A., A. Lin, F.X. Claret, A. Abo, and M. Karin. 1995. Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. *Cell.* 81:1147-57.
- Miyamoto, S., S.K. Akiyama, and K.M. Yamada. 1995. Synergistic roles for receptor occupancy and aggregation in integrin transmembrane function. *Science.* 267:883-5.
- Miyata, Y., T. Sato, M. Yano, and A. Ito. 2004. Activation of protein kinase C beta1/epsilon-c-Jun NH2-terminal kinase pathway and inhibition of mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation in antitumor invasive activity induced by the polymethoxy flavonoid, nobiletin. *Mol Cancer Ther.* 3:839-47.
- Miyazawa, T., K. Nakagawa, M. Kudo, K. Muraishi, and K. Someya. 1999. Direct intestinal absorption of red fruit anthocyanins, cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3,5-diglucoside, into rats and humans. *J Agric Food Chem.* 47:1083-91.

- Monje, P., and R. Boland. 1999. Characterization of membrane estrogen binding proteins from rabbit uterus. *Mol Cell Endocrinol.* 147:75-84.
- Monteiro, R., H. Becker, I. Azevedo, and C. Calhau. 2006. Effect of hop (*Humulus lupulus* L.) flavonoids on aromatase (estrogen synthase) activity. *J Agric Food Chem.* 54:2938-43.
- Moon, J.H., R. Nakata, S. Oshima, T. Inakuma, and J. Terao. 2000. Accumulation of quercetin conjugates in blood plasma after the short-term ingestion of onion by women. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 279:R461-7.
- Morazzoni, P., and E. Bombardelli. 1996. *Vaccinium myrtillus* L. *Fitoterapia.* 67:3-29.
- Morazzoni, P., S. Livio, A. Scilingo, and S. Malandrino. 1991. *Vaccinium myrtillus* anthocyanosides pharmacokinetics in rats. *Arzneimittelforschung.* 41:128-31.
- Moridani, M.Y., H. Scobie, and P.J. O'Brien. 2002. Metabolism of caffeic acid by isolated rat hepatocytes and subcellular fractions. *Toxicol Lett.* 133:141-51.
- Moridani, M.Y., H. Scobie, P. Salehi, and P.J. O'Brien. 2001. Catechin metabolism: glutathione conjugate formation catalyzed by tyrosinase, peroxidase, and cytochrome p450. *Chem Res Toxicol.* 14:841-8.
- Morse, M.A., L.A. Kresty, V.E. Steele, G.J. Kelloff, C.W. Boone, D.A. Balentine, M.E. Harbowy, and G.D. Stoner. 1997. Effects of theaflavins on N-nitrosomethylbenzylamine-induced esophageal tumorigenesis. *Nutr Cancer.* 29:7-12.
- Mortensen, K., J. Skouv, D.M. Hougaard, and L.I. Larsson. 1999. Endogenous endothelial cell nitric-oxide synthase modulates apoptosis in cultured breast cancer cells and is transcriptionally regulated by p53. *J Biol Chem.* 274:37679-84.
- Morton, M.S., O. Arisaka, N. Miyake, L.D. Morgan, and B.A. Evans. 2002. Phytoestrogen concentrations in serum from Japanese men and women over forty years of age. *J Nutr.* 132:3168-71.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 65:55-63.
- Moyer, R.A., K.E. Hummer, C.E. Finn, B. Frei, and R.E. Wrolstad. 2002. Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: *vaccinium*, *rubus*, and *ribes*. *J Agric Food Chem.* 50:519-25.
- Mu, L.N., X.F. Zhou, B.G. Ding, R.H. Wang, Z.F. Zhang, Q.W. Jiang, and S.Z. Yu. 2003. [Study on the protective effect of green tea on gastric, liver and esophageal cancers]. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi.* 37:171-3.
- Mukhtar, H., Z.Y. Wang, S.K. Katiyar, and R. Agarwal. 1992. Tea components: antimutagenic and anticarcinogenic effects. *Prev Med.* 21:351-60.
- Mulleder, U., M. Murkovic, and W. Pfannhauser. 2002. Urinary excretion of cyanidin glycosides. *J Biochem Biophys Methods.* 53:61-6.
- Mullen, W., B.A. Graf, S.T. Caldwell, R.C. Hartley, G.G. Duthie, C.A. Edwards, M.E. Lean, and A. Crozier. 2002. Determination of flavonol metabolites in plasma and tissues of rats by HPLC-radiocounting and tandem mass spectrometry following oral ingestion of [2-(14)C]quercetin-4'-glucoside. *J Agric Food Chem.* 50:6902-9.
- Murota, K., S. Shimizu, S. Miyamoto, T. Izumi, A. Obata, M. Kikuchi, and J. Terao. 2002. Unique uptake and transport of isoflavone aglycones by human intestinal caco-2 cells: comparison of isoflavonoids and flavonoids. *J Nutr.* 132:1956-61.
- Murtaza, I., G. Marra, R. Schlapbach, A. Patrignani, M. Kunzli, U. Wagner, J. Sabates, and A. Dutt. 2006. A preliminary investigation demonstrating the effect of quercetin on the expression of genes related to cell-cycle arrest, apoptosis and xenobiotic metabolism in human CO115 colon-adenocarcinoma cells using DNA microarray. *Biotechnol Appl Biochem.* 45:29-36.
- Musonda, C.A., and J.K. Chipman. 1998. Quercetin inhibits hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced NF-kappaB DNA binding activity and DNA damage in HepG2 cells. *Carcinogenesis.* 19:1583-9.
- Naczki, M., and F. Shahidi. 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *J Chromatogr A.* 1054:95-111.
- Nagano, J., S. Kono, D.L. Preston, and K. Mabuchi. 2001. A prospective study of green tea consumption and cancer incidence, Hiroshima and Nagasaki (Japan). *Cancer Causes Control.* 12:501-8.
- Nagano, J., S. Kono, D.L. Preston, H. Moriwaki, G.B. Sharp, K. Koyama, and K. Mabuchi. 2000. Bladder-cancer incidence in relation to vegetable and fruit consumption: a prospective study of atomic-bomb survivors. *Int J Cancer.* 86:132-8.
- Nagata, C. 2000. Ecological study of the association between soy product intake and mortality from cancer and heart disease in Japan. *Int J Epidemiol.* 29:832-6.
- Nagata, C., N. Takatsuka, N. Kawakami, and H. Shimizu. 2002. A prospective cohort study of soy product intake and stomach cancer death. *Br J Cancer.* 87:31-6.
- Nair, H.K., K.V. Rao, R. Aalinkeel, S. Mahajan, R. Chawda, and S.A. Schwartz. 2004. Inhibition of prostate cancer cell colony formation by the flavonoid quercetin correlates with modulation of specific regulatory genes. *Clin Diagn Lab Immunol.* 11:63-9.
- Nair, M.P., C. Kandaswami, S. Mahajan, H.N. Nair, R. Chawda, T. Shanahan, and S.A. Schwartz. 2002. Grape seed extract proanthocyanidins downregulate HIV-1 entry coreceptors, CCR2b, CCR3 and CCR5 gene expression by normal peripheral blood mononuclear cells. *Biol Res.* 35:421-31.
- Nakagawa, Y., M.R. Shetlar, and S.H. Wender. 1965. Urinary Products from Quercetin in Neomycin-Treated Rats. *Biochim Biophys Acta.* 97:233-41.
- Nakaishi, H., H. Matsumoto, S. Tominaga, and M. Hirayama. 2000. Effects of black current anthocyanoside intake on dark adaptation and VDT work-induced transient refractive alteration in healthy humans. *Altern Med Rev.* 5:553-62.
- Nakajima, T., T. Kitazawa, E. Hamada, H. Hazama, M. Omata, and Y. Kurachi. 1995. 17beta-Estradiol inhibits the voltage-dependent L-type Ca²⁺ currents in aortic smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol.* 294:625-35.
- Narita, M., S. Nunez, E. Heard, A.W. Lin, S.A. Hearn, D.L. Spector, G.J. Hannon, and S.W. Lowe. 2003. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell.* 113:703-16.
- Nepka, C., E. Sivridis, O. Antonoglou, A. Kortsaris, A. Georgellis, I. Taitzoglou, P. Hytioglou, C. Papadimitriou, I. Zintzaras, and D. Kouretas. 1999. Chemopreventive activity of very low dose dietary tannic acid administration in hepatoma bearing C3H male mice. *Cancer Lett.* 141:57-62.

- Ni, J.Q., L.P. Liu, D. Hess, J. Rietdorf, and F.L. Sun. 2006. Drosophila ribosomal proteins are associated with linker histone H1 and suppress gene transcription. *Genes Dev.* 20:1959-73.
- Nishiya, N., K. Tachibana, M. Shibamura, J.I. Mashimo, and K. Nose. 2001. Hic-5-reduced cell spreading on fibronectin: competitive effects between paxillin and Hic-5 through interaction with focal adhesion kinase. *Mol Cell Biol.* 21:5332-45.
- Nisoli, E., C. Tonello, A. Cardile, V. Cozzi, R. Bracale, L. Tedesco, S. Falcone, A. Valerio, O. Cantoni, E. Clementi, S. Moncada, and M.O. Carruba. 2005. Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science.* 310:314-7.
- Nobes, C.D., and A. Hall. 1995. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell.* 81:53-62.
- Nomura, A.M., J.H. Hankin, J. Lee, and G.N. Stemmermann. 2004. Cohort study of tofu intake and prostate cancer: no apparent association. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 13:2277-9.
- Noroozi, M., J. Burns, A. Crozier, I.E. Kelly, and M.E. Lean. 2000. Prediction of dietary flavonol consumption from fasting plasma concentration or urinary excretion. *Eur J Clin Nutr.* 54:143-9.
- Notas, G., A.P. Nifli, M. Kampa, J. Vercauteren, E. Kouroumalis, and E. Castanas. 2006. Resveratrol exerts its antiproliferative effect on HepG2 hepatocellular carcinoma cells, by inducing cell cycle arrest, and NOS activation. *Biochim Biophys Acta.* 1760:1657-66.
- Offer, H., N. Erez, I. Zurer, X. Tang, M. Milyavsky, N. Goldfinger, and V. Rotter. 2002. The onset of p53-dependent DNA repair or apoptosis is determined by the level of accumulated damaged DNA. *Carcinogenesis.* 23:1025-32.
- Ohno, Y., K. Wakai, K. Genka, K. Ohmine, T. Kawamura, A. Tamakoshi, R. Aoki, M. Senda, Y. Hayashi, K. Nagao, and et al. 1995. Tea consumption and lung cancer risk: a case-control study in Okinawa, Japan. *Jpn J Cancer Res.* 86:1027-34.
- Ohshima, H., M. Tatemichi, and T. Sawa. 2003. Chemical basis of inflammation-induced carcinogenesis. *Arch Biochem Biophys.* 417:3-11.
- Oitate, M., R. Nakaki, N. Koyabu, H. Takanaga, H. Matsuo, H. Ohtani, and Y. Sawada. 2001. Transcellular transport of genistein, a soybean-derived isoflavone, across human colon carcinoma cell line (Caco-2). *Biopharm Drug Dispos.* 22:23-9.
- Oken, B.S., D.M. Storzbach, and J.A. Kaye. 1998. The efficacy of Ginkgo biloba on cognitive function in Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 55:1409-15.
- O'Leary, K.A., A.J. Day, P.W. Needs, F.A. Mellon, N.M. O'Brien, and G. Williamson. 2003. Metabolism of quercetin-7- and quercetin-3-glucuronides by an in vitro hepatic model: the role of human beta-glucuronidase, sulfotransferase, catechol-O-methyltransferase and multi-resistant protein 2 (MRP2) in flavonoid metabolism. *Biochem Pharmacol.* 65:479-91.
- Ollila, F., K. Halling, P. Vuorela, H. Vuorela, and J.P. Slotte. 2002. Characterization of flavonoid-biomembrane interactions. *Arch Biochem Biophys.* 399:103-8.
- Olsen, J., and O. Kronborg. 1993. Coffee, tobacco and alcohol as risk factors for cancer and adenoma of the large intestine. *Int J Epidemiol.* 22:398-402.
- Ono, K., H. Nakane, M. Fukushima, J.C. Chermann, and F. Barre-Sinoussi. 1989. Inhibition of reverse transcriptase activity by a flavonoid compound, 5,6,7-trihydroxyflavone. *Biochem Biophys Res Commun.* 160:982-7.
- Ono, K., H. Nakane, M. Fukushima, J.C. Chermann, and F. Barre-Sinoussi. 1990. Differential inhibitory effects of various flavonoids on the activities of reverse transcriptase and cellular DNA and RNA polymerases. *Eur J Biochem.* 190:469-76.
- Ono, K., Y. Yoshiike, A. Takashima, K. Hasegawa, H. Naiki, and M. Yamada. 2003. Potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects of polyphenols in vitro: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 87:172-81.
- Osborne, T.F. 2000. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): key regulators of nutritional homeostasis and insulin action. *J Biol Chem.* 275:32379-82.
- Otake, Y., and T. Walle. 2002. Oxidation of the flavonoids galangin and kaempferide by human liver microsomes and CYP1A1, CYP1A2, and CYP2C9. *Drug Metab Dispos.* 30:103-5.
- Owen, R.W., W. Mier, A. Giacosa, W.E. Hull, B. Spiegelhalder, and H. Bartsch. 2000. Identification of lignans as major components in the phenolic fraction of olive oil. *Clin Chem.* 46:976-88.
- Paavilainen, V.O., E. Bertling, S. Falck, and P. Lappalainen. 2004. Regulation of cytoskeletal dynamics by actin-monomer-binding proteins. *Trends Cell Biol.* 14:386-94.
- Pace-Asciak, C.R., S. Hahn, E.P. Diamandis, G. Soleas, and D.M. Goldberg. 1995. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease. *Clin Chim Acta.* 235:207-19.
- Paganga, G., and C.A. Rice-Evans. 1997. The identification of flavonoids as glycosides in human plasma. *FEBS Lett.* 401:78-82.
- Paganga, G., N. Miller, and C.A. Rice-Evans. 1999. The polyphenolic content of fruit and vegetables and their antioxidant activities. What does a serving constitute? *Free Radic Res.* 30:153-62.
- Pan, Y.A., T. Misgeld, J.W. Lichtman, and J.R. Sanes. 2003. Effects of neurotoxic and neuroprotective agents on peripheral nerve regeneration assayed by time-lapse imaging in vivo. *J Neurosci.* 23:11479-88.
- Pance, A. 2006. Nitric oxide and hormones in breast cancer: allies or enemies? *Future Oncol.* 2:275-88.
- Pantaloni, D., C. Le Clainche, and M.F. Carlier. 2001. Mechanism of actin-based motility. *Science.* 292:1502-6.
- Papadopoulos, V., E.P. Widmaier, H. Amri, A. Zilt, H. Li, M. Culty, R. Castello, G.H. Philip, R. Sridaran, and K. Drieu. 1998. In vivo studies on the role of the peripheral benzodiazepine receptor (PBR) in steroidogenesis. *Endocr Res.* 24:479-87.
- Papadopoulou, A., R.J. Green, and R.A. Frazier. 2005. Interaction of flavonoids with bovine serum albumin: a fluorescence quenching study. *J Agric Food Chem.* 53:158-63.
- Papakonstanti, E.A., M. Kampa, E. Castanas, and C. Stournaras. 2003. A rapid, nongenomic, signaling pathway regulates the actin reorganization induced by activation of membrane testosterone receptors. *Mol Endocrinol.* 17:870-81.
- Park, J.B. 1999. Flavonoids are potential inhibitors of glucose uptake in U937 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 260:568-74.

- Park, S.K., and T.A. Prolla. 2005. Lessons learned from gene expression profile studies of aging and caloric restriction. *Ageing Res Rev.* 4:55-65.
- Parker, J.A., M. Arango, S. Abderrahmane, E. Lambert, C. Tourette, H. Catoire, and C. Neri. 2005. Resveratrol rescues mutant polyglutamine cytotoxicity in nematode and mammalian neurons. *Nat Genet.* 37:349-50.
- Parkinson, T.M., and J.P. Brown. 1981. Metabolic fate of food colorants. *Annu Rev Nutr.* 1:175-205.
- Parry, J., L. Su, J. Moore, Z. Cheng, M. Luther, J.N. Rao, J.Y. Wang, and L.L. Yu. 2006. Chemical compositions, antioxidant capacities, and antiproliferative activities of selected fruit seed flours. *J Agric Food Chem.* 54:3773-8.
- Passamonti, S., U. Vrhovsek, A. Vanzo, and F. Mattivi. 2005. Fast access of some grape pigments to the brain. *J Agric Food Chem.* 53:7029-34.
- Patel, R.P., J. McAndrew, H. Sellak, C.R. White, H. Jo, B.A. Freeman, and V.M. Darley-Usmar. 1999. Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochim Biophys Acta.* 1411:385-400.
- Pearson, G.W., and M.H. Cobb. 2002. Cell condition-dependent regulation of ERK5 by cAMP. *J Biol Chem.* 277:48094-8.
- Pecking, A.P., B. Fevrier, C. Wargon, and G. Pillion. 1997. Efficacy of Daflon 500 mg in the treatment of lymphedema (secondary to conventional therapy of breast cancer). *Angiology.* 48:93-8.
- Pederson, T., and U. Aebi. 2005. Nuclear actin extends, with no contraction in sight. *Mol Biol Cell.* 16:5055-60.
- Peng, J., B.J. Wallar, A. Flanders, P.J. Swiatek, and A.S. Alberts. 2003. Disruption of the Diaphanous-related formin Drf1 gene encoding mDia1 reveals a role for Drf3 as an effector for Cdc42. *Curr Biol.* 13:534-45.
- Perez-Magarino, S., and M.L. Gonzalez-San Jose. 2004. Evolution of flavanols, anthocyanins, and their derivatives during the aging of red wines elaborated from grapes harvested at different stages of ripening. *J Agric Food Chem.* 52:1181-9.
- Perona, R., S. Montaner, L. Saniger, I. Sanchez-Perez, R. Bravo, and J.C. Lacal. 1997. Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins. *Genes Dev.* 11:463-75.
- Pervin, S., R. Singh, and G. Chaudhuri. 2001. Nitric oxide-induced cytoskeleton and cell cycle arrest of a human breast cancer cell line (MDA-MB-231): potential role of cyclin D1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:3583-8.
- Peschel, D., R. Koerting, and N. Nass. 2006. Curcumin induces changes in expression of genes involved in cholesterol homeostasis. *J Nutr Biochem.*
- Peterson, J., P. Lagiou, E. Samoli, A. Lagiou, K. Katsouyanni, C. La Vecchia, J. Dwyer, and D. Trichopoulos. 2003. Flavonoid intake and breast cancer risk: a case-control study in Greece. *Br J Cancer.* 89:1255-9.
- Peterson, M.D., E. Vlasova, C. Di Ciano-Oliveira, G.P. Downey, M.I. Cybulsky, A. Kapus, and T.K. Waddell. 2005. Monocyte-induced endothelial calcium signaling mediates early xenogeneic endothelial activation. *Am J Transplant.* 5:237-47.
- Phair, R.D., P. Scaffidi, C. Elbi, J. Vecerova, A. Dey, K. Ozato, D.T. Brown, G. Hager, M. Bustin, and T. Misteli. 2004. Global nature of dynamic protein-chromatin interactions in vivo: three-dimensional genome scanning and dynamic interaction networks of chromatin proteins. *Mol Cell Biol.* 24:6393-402.
- Pietinen, P., K. Stumpf, S. Mannisto, V. Kataja, M. Uusitupa, and H. Adlercreutz. 2001. Serum enterolactone and risk of breast cancer: a case-control study in eastern Finland. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 10:339-44.
- Pietta, P.G. 2000. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod.* 63:1035-42.
- Pilorget, A., V. Berthet, J. Luis, A. Moghrabi, B. Annabi, and R. Beliveau. 2003. Medulloblastoma cell invasion is inhibited by green tea (-)epigallocatechin-3-gallate. *J Cell Biochem.* 90:745-55.
- Piper, P.W., N.L. Harris, and M. MacLean. 2006. Preadaptation to efficient respiratory maintenance is essential both for maximal longevity and the retention of replicative potential in chronologically ageing yeast. *Mech Ageing Dev.* 127:733-40.
- Piskula, M.K., J. Yamakoshi, and Y. Iwai. 1999. Daidzein and genistein but not their glucosides are absorbed from the rat stomach. *FEBS Lett.* 447:287-91.
- Piver, B., M. Fer, X. Vitrac, J.M. Merillon, Y. Dreano, F. Berthou, and D. Lucas. 2004. Involvement of cytochrome P450 1A2 in the biotransformation of trans-resveratrol in human liver microsomes. *Biochem Pharmacol.* 68:773-82.
- Pleiman, C.M., C. Abrams, L.T. Gauen, W. Bedzyk, J. Jongstra, A.S. Shaw, and J.C. Cambier. 1994. Distinct p53/56lyn and p59fyn domains associate with nonphosphorylated and phosphorylated Ig-alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:4268-72.
- Pollard, T.D., and C.C. Beltzner. 2002. Structure and function of the Arp2/3 complex. *Curr Opin Struct Biol.* 12:768-74.
- Porter, J.A., M. Yu, S.K. Doberstein, T.D. Pollard, and C. Montell. 1993. Dependence of calmodulin localization in the retina on the NINAC unconventional myosin. *Science.* 262:1038-42.
- Post, P.L., G.M. Bokoch, and M.S. Mooseker. 1998. Human myosin-IXb is a mechanochemically active motor and a GAP for rho. *J Cell Sci.* 111 (Pt 7):941-50.
- Potente, M., C. Urbich, K. Sasaki, W.K. Hofmann, C. Heeschen, A. Aicher, R. Kollipara, R.A. DePinho, A.M. Zeiher, and S. Dimmeler. 2005. Involvement of Foxo transcription factors in angiogenesis and postnatal neovascularization. *J Clin Invest.* 115:2382-92.
- Pozo-Guisado, E., A. Alvarez-Barrientos, S. Mulero-Navarro, B. Santiago-Josefat, and P.M. Fernandez-Salguero. 2002. The antiproliferative activity of resveratrol results in apoptosis in MCF-7 but not in MDA-MB-231 human breast cancer cells: cell-specific alteration of the cell cycle. *Biochem Pharmacol.* 64:1375-86.
- Prasain, J.K., C.C. Wang, and S. Barnes. 2004. Mass spectrometric methods for the determination of flavonoids in biological samples. *Free Radic Biol Med.* 37:1324-50.
- Prasain, J.K., K. Jones, M. Kirk, L. Wilson, M. Smith-Johnson, C. Weaver, and S. Barnes. 2003. Profiling and quantification of isoflavonoids in kudzu dietary supplements by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem.* 51:4213-8.
- Prior, R.L., and G. Cao. 1999. Antioxidant capacity and polyphenolic components of teas: implications for altering in vivo antioxidant status. *Proc Soc Exp Biol Med.* 220:255-61.
- Prior, R.L., and X. Wu. 2006. Anthocyanins: structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities. *Free Radic Res.* 40:1014-28.

- Proteggente, A.R., S. Basu-Modak, G. Kuhnle, M.J. Gordon, K. Youdim, R. Tyrrell, and C.A. Rice-Evans. 2003. Hesperetin glucuronide, a photoprotective agent arising from flavonoid metabolism in human skin fibroblasts. *Photochem Photobiol.* 78:256-61.
- Provinciali, M., F. Re, A. Donnini, F. Orlando, B. Bartozzi, G. Di Stasio, and A. Smorlesi. 2005. Effect of resveratrol on the development of spontaneous mammary tumors in HER-2/neu transgenic mice. *Int J Cancer.* 115:36-45.
- Puthalakath, H., A. Villunger, L.A. O'Reilly, J.G. Beaumont, L. Coultas, R.E. Cheney, D.C. Huang, and A. Strasser. 2001. Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science.* 293:1829-32.
- Quinlan, M.E., J.E. Heuser, E. Kerkhoff, and R.D. Mullins. 2005. Drosophila Spire is an actin nucleation factor. *Nature.* 433:382-8.
- Rabin, B.M., K.L. Carrihill-Knoll, A. Carey, B. Shukitt-Hale, and J.A. Joseph. 2005. Effect of diet on the disruption of operant responding at different ages following exposure to Fe particles. *AGE.* 27:69-73.
- Rabut, G., V. Doye, and J. Ellenberg. 2004. Mapping the dynamic organization of the nuclear pore complex inside single living cells. *Nat Cell Biol.* 6:1114-21.
- Radisavljevic, Z. 2003. Nitric oxide suppression triggers apoptosis through the FKHRL1 (FOXO3A)/ROCK kinase pathway in human breast carcinoma cells. *Cancer.* 97:1358-63.
- Radisavljevic, Z. 2004. Inactivated tumor suppressor Rb by nitric oxide promotes mitosis in human breast cancer cells. *J Cell Biochem.* 92:1-5.
- Raftopoulou, M., and A. Hall. 2004. Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol.* 265:23-32.
- Rahman, A., Shahabuddin, S.M. Hadi, and J.H. Parish. 1990. Complexes involving quercetin, DNA and Cu(II). *Carcinogenesis.* 11:2001-3.
- Rahman, I., J. Marwick, and P. Kirkham. 2004. Redox modulation of chromatin remodeling: impact on histone acetylation and deacetylation, NF-kappaB and pro-inflammatory gene expression. *Biochem Pharmacol.* 68:1255-67.
- Raman, N., and S.J. Atkinson. 1999. Rho controls actin cytoskeletal assembly in renal epithelial cells during ATP depletion and recovery. *Am J Physiol.* 276:C1312-24.
- Ramassamy, C., D. Averill, U. Beffert, L. Theroux, S. Lussier-Cacan, J.S. Cohn, Y. Christen, A. Schoofs, J. Davignon, and J. Poirier. 2000. Oxidative insults are associated with apolipoprotein E genotype in Alzheimer's disease brain. *Neurobiol Dis.* 7:23-37.
- Rao, C.V., A. Rivenson, B. Simi, and B.S. Reddy. 1995. Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary curcumin, a naturally occurring plant phenolic compound. *Cancer Res.* 55:259-66.
- Raucy, J.L. 2003. Regulation of CYP3A4 expression in human hepatocytes by pharmaceuticals and natural products. *Drug Metab Dispos.* 31:533-9.
- Raucy, J.L., and S.W. Allen. 2001. Recent advances in P450 research. *Pharmacogenomics J.* 1:178-86.
- Razandi, M., A. Pedram, and E.R. Levin. 2000. Plasma membrane estrogen receptors signal to antiapoptosis in breast cancer. *Mol Endocrinol.* 14:1434-47.
- Razandi, M., A. Pedram, G.L. Greene, and E.R. Levin. 1999. Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ERalpha and ERbeta expressed in Chinese hamster ovary cells. *Mol Endocrinol.* 13:307-19.
- Razandi, M., A. Pedram, I. Merchenthaler, G.L. Greene, and E.R. Levin. 2004. Plasma membrane estrogen receptors exist and functions as dimers. *Mol Endocrinol.* 18:2854-65.
- Rechner, A.R., J.P. Spencer, G. Kuhnle, U. Hahn, and C.A. Rice-Evans. 2001. Novel biomarkers of the metabolism of caffeic acid derivatives in vivo. *Free Radic Biol Med.* 30:1213-22.
- Repa, J.J., G. Liang, J. Ou, Y. Bashmakov, J.M. Lobaccaro, I. Shimomura, B. Shan, M.S. Brown, J.L. Goldstein, and D.J. Mangelsdorf. 2000. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Dev.* 14:2819-30.
- Reveanu, S., L. Arnould, G. Jolimoy, S. Hilpert, P. Lejeune, V. Saint-Giorgio, C. Belichard, and J.F. Jeannin. 1999. Nitric oxide synthase in human breast cancer is associated with tumor grade, proliferation rate, and expression of progesterone receptors. *Lab Invest.* 79:1215-25.
- Rikitake, Y., and J.K. Liao. 2005. Rho GTPases, statins, and nitric oxide. *Circ Res.* 97:1232-5.
- Rios, L.Y., R.N. Bennett, S.A. Lazarus, C. Remesy, A. Scalbert, and G. Williamson. 2002. Cocoa procyanidins are stable during gastric transit in humans. *Am J Clin Nutr.* 76:1106-10.
- Rist, M.J., U. Wenzel, and H. Daniel. 2006. Nutrition and food science go genomic. *Trends Biotechnol.* 24:172-8.
- Robards, K., and M. Antolovich. 1997. Analytical chemistry of fruit bioflavonoids. *Analyst.* 122:11-35.
- Robert, A.M., J.M. Tixier, L. Robert, J.M. Legeais, and G. Renard. 2001. Effect of procyanidolic oligomers on the permeability of the blood-brain barrier. *Pathol Biol (Paris).* 49:298-304.
- Robert, A.M., L. Robert, and G. Renard. 2005. Effect of procyanidolic oligomers of *Vitis vinifera* on the biosynthesis and excretion of corneal glycosaminoglycans. *Pathol Biol (Paris).* 53:411-5.
- Roberts, W.M., J. Howard, and A.J. Hudspeth. 1988. Hair cells: transduction, tuning, and transmission in the inner ear. *Annu Rev Cell Biol.* 4:63-92.
- Robinson, D.N., K. Cant, and L. Cooley. 1994. Morphogenesis of *Drosophila* ovarian ring canals. *Development.* 120:2015-25.
- Robles, E., S. Woo, and T.M. Gomez. 2005. Src-dependent tyrosine phosphorylation at the tips of growth cone filopodia promotes extension. *J Neurosci.* 25:7669-81.
- Rodrigue, C.M., F. Porteu, N. Navarro, E. Bruyneel, M. Bracke, P.H. Romeo, C. Gespach, and M.C. Garel. 2005. The cancer chemopreventive agent resveratrol induces tensin, a cell-matrix adhesion protein with signaling and antitumor activities. *Oncogene.* 24:3274-84.
- Roger, L., G. Gadea, and P. Roux. 2006. Control of cell migration: a tumour suppressor function for p53? *Biol Cell.* 98:141-52.
- Roper, K., Y. Mao, and N.H. Brown. 2005. Contribution of sequence variation in *Drosophila* actins to their incorporation into actin-based structures in vivo. *J Cell Sci.* 118:3937-48.
- Rosenblatt, K.A., D.B. Thomas, L.M. Jimenez, B. Fish, A. McTiernan, H. Stalsberg, A. Stemhagen, W.D. Thompson, M.G. Curnen, W. Satariano, D.F. Austin, R.S. Greenberg, C. Key, L.N. Kolonel, and D.W. West. 1999. The relationship between diet and breast cancer in men (United States). *Cancer Causes Control.* 10:107-13.

- Rossi, M., R. Meyer, P. Constantinou, F. Caruso, D. Castelbuono, M. O'Brien, and V. Narasimhan. 2001. Molecular structure and activity toward DNA of baicalein, a flavone constituent of the Asian herbal medicine "Sho-saiko-to". *J Nat Prod.* 64:26-31.
- Rothe, G., and G. Valet. 1994. Flow cytometric assays of oxidative burst activity in phagocytes. *Methods Enzymol.* 233:539-48.
- Rout, M.P., J.D. Aitchison, M.O. Magnasco, and B.T. Chait. 2003. Virtual gating and nuclear transport: the hole picture. *Trends Cell Biol.* 13:622-8.
- Ruckstuhl, M., A. Beretz, R. Anton, and Y. Landry. 1979. Flavonoids are selective cyclic GMP phosphodiesterase inhibitors. *Biochem Pharmacol.* 28:535-8.
- Saeed, A., V. Sharov, J. White, J. Li, W. Liang, N. Bhagabati, J. Braisted, M. Klapa, T. Currier, M. Thiagarajan, A. Sturn, M. Snuffin, A. Rezantsev, D. Popov, A. Ryltsov, E. Kostukovich, I. Borisovsky, Z. Liu, A. Vinsavich, V. Trush, and J. Quackenbush. 2003. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques.* 34:374-8.
- Salani, D., V. Di Castro, M.R. Nicotra, L. Rosano, R. Tecce, A. Venuti, P.G. Natali, and A. Bagnato. 2000. Role of endothelin-1 in neovascularization of ovarian carcinoma. *Am J Pathol.* 157:1537-47.
- Sano, A., J. Yamakoshi, S. Tokutake, K. Tobe, Y. Kubota, and M. Kikuchi. 2003. Procyanidin B1 is detected in human serum after intake of proanthocyanidin-rich grape seed extract. *Biosci Biotechnol Biochem.* 67:1140-3.
- Sartor, L., E. Pezzato, M. Dona, I. Dell'Aica, F. Calabrese, M. Morini, A. Albini, and S. Garbisa. 2004. Prostate carcinoma and green tea: (-)epigallocatechin-3-gallate inhibits inflammation-triggered MMP-2 activation and invasion in murine TRAMP model. *Int J Cancer.* 112:823-9.
- Sato, T., L. Koike, Y. Miyata, M. Hirata, Y. Mimaki, Y. Sashida, M. Yano, and A. Ito. 2002. Inhibition of activator protein-1 binding activity and phosphatidylinositol 3-kinase pathway by nobiletin, a polymethoxy flavonoid, results in augmentation of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 production and suppression of production of matrix metalloproteinases-1 and -9 in human fibrosarcoma HT-1080 cells. *Cancer Res.* 62:1025-9.
- Scalbert, A., and G. Williamson. 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr.* 130:2073S-85S.
- Schaefer, H.M., and G. Rolshausen. 2006. Plants on red alert: do insects pay attention? *Bioessays.* 28:65-71.
- Schawalder, S.B., M. Kabani, I. Howald, U. Choudhury, M. Werner, and D. Shore. 2004. Growth-regulated recruitment of the essential yeast ribosomal protein gene activator Ifh1. *Nature.* 432:1058-61.
- Scheidt, H.A., A. Pampel, L. Nissler, R. Gebhardt, and D. Huster. 2004. Investigation of the membrane localization and distribution of flavonoids by high-resolution magic angle spinning NMR spectroscopy. *Biochim Biophys Acta.* 1663:97-107.
- Scheline, R.R. 1970. The metabolism of (+)-catechin to hydroxyphenylvaleric acids by the intestinal microflora. *Biochim Biophys Acta.* 222:228-30.
- Schneider, Y., P. Chabert, J. Stutzmann, D. Coelho, A. Fougousse, F. Gosse, J.F. Launay, R. Brouillard, and F. Raul. 2003. Resveratrol analog (Z)-3,5,4'-trimethoxystilbene is a potent anti-mitotic drug inhibiting tubulin polymerization. *Int J Cancer.* 107:189-96.
- Schramm, D.D., H.E. Collins, and J.B. German. 1999. Flavonoid transport by mammalian endothelial cells. *J Nutr Biochem.* 10:193-7.
- Scott, B.C., J. Butler, B. Halliwell, and O.I. Aruoma. 1993. Evaluation of the antioxidant actions of ferulic acid and catechins. *Free Radic Res Commun.* 19:241-53.
- Seger, R., and E.G. Krebs. 1995. The MAPK signaling cascade. *Faseb J.* 9:726-35.
- Seksek, O., J. Biwersi, and A.S. Verkman. 1997. Translational diffusion of macromolecule-sized solutes in cytoplasm and nucleus. *J Cell Biol.* 138:131-42.
- Sengupta, B., and P.K. Sengupta. 2002. The interaction of quercetin with human serum albumin: a fluorescence spectroscopic study. *Biochem Biophys Res Commun.* 299:400-3.
- Seo, H.S., and G. Leclercq. 2002. Evaluation of potential implication of membrane estrogen binding sites on ERE-dependent transcriptional activity and intracellular estrogen receptor-alpha regulation in MCF-7 breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 80:109-23.
- Serafino, A., P. Sinibaldi-Vallebona, G. Lazzarino, B. Tavazzi, G. Rasi, P. Pierimarchi, F. Andreola, G. Moroni, G. Galvano, F. Galvano, and E. Garaci. 2004. Differentiation of human melanoma cells induced by cyanidin-3-O-beta-glucopyranoside. *Faseb J.* 18:1940-2.
- Sesink, A.L., I.C. Arts, V.C. de Boer, P. Breedveld, J.H. Schellens, P.C. Hollman, and F.G. Russel. 2005. Breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) limits net intestinal uptake of quercetin in rats by facilitating apical efflux of glucuronides. *Mol Pharmacol.* 67:1999-2006.
- Sesink, A.L., K.A. O'Leary, and P.C. Hollman. 2001. Quercetin glucuronides but not glucosides are present in human plasma after consumption of quercetin-3-glucoside or quercetin-4'-glucoside. *J Nutr.* 131:1938-41.
- Setchell, K.D., L. Zimmer-Nechemias, J. Cai, and J.E. Heubi. 1997. Exposure of infants to phyto-oestrogens from soy-based infant formula. *Lancet.* 350:23-7.
- Setchell, K.D., N.M. Brown, and E. Lydeking-Olsen. 2002. The clinical importance of the metabolite equol—a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *J Nutr.* 132:3577-84.
- Setiawan, V.W., Z.F. Zhang, G.P. Yu, Q.Y. Lu, Y.L. Li, M.L. Lu, M.R. Wang, C.H. Guo, S.Z. Yu, R.C. Kurtz, and C.C. Hsieh. 2001. Protective effect of green tea on the risks of chronic gastritis and stomach cancer. *Int J Cancer.* 92:600-4.
- Severson, R.K., A.M. Nomura, J.S. Grove, and G.N. Stemmermann. 1989. A prospective study of demographics, diet, and prostate cancer among men of Japanese ancestry in Hawaii. *Cancer Res.* 49:1857-60.
- Shafiee, M., M.A. Carbonneau, N. Urban, B. Descamps, and C.L. Leger. 2003. Grape and grape seed extract capacities at protecting LDL against oxidation generated by Cu²⁺, AAPH or SIN-1 and at decreasing superoxide THP-1 cell production. A comparison to other extracts or compounds. *Free Radic Res.* 37:573-84.
- Shahidi, F., and M. Naczk. 2003. Phenolics in Food and Nutraceuticals. CRC Press LLC, Boca Raton, Florida.

- Sharma, G., A.K. Tyagi, R.P. Singh, D.C. Chan, and R. Agarwal. 2004. Synergistic anti-cancer effects of grape seed extract and conventional cytotoxic agent doxorubicin against human breast carcinoma cells. *Breast Cancer Res Treat.* 85:1-12.
- Sharp, G.B., F. Lagarde, T. Mizuno, C. Sauvaget, T. Fukuhara, N. Allen, G. Suzuki, and S. Tokuoka. 2005. Relationship of hepatocellular carcinoma to soya food consumption: a cohort-based, case-control study in Japan. *Int J Cancer.* 115:290-5.
- Shen, P., M.H. Liu, T.Y. Ng, Y.H. Chan, and E.L. Yong. 2006. Differential effects of isoflavones, from *Astragalus membranaceus* and *Pueraria thomsonii*, on the activation of PPARalpha, PPARgamma, and adipocyte differentiation in vitro. *J Nutr.* 136:899-905.
- Shibasaki, Y., H. Ishihara, N. Kizuki, T. Asano, Y. Oka, and Y. Yazaki. 1997. Massive actin polymerization induced by phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase in vivo. *J Biol Chem.* 272:7578-81.
- Shibata, A., T.M. Mack, A. Paganini-Hill, R.K. Ross, and B.E. Henderson. 1994. A prospective study of pancreatic cancer in the elderly. *Int J Cancer.* 58:46-9.
- Shimoi, K., N. Saka, K. Kaji, R. Nozawa, and N. Kinae. 2000. Metabolic fate of luteolin and its functional activity at focal site. *Biofactors.* 12:181-6.
- Shioda, T., J. Chesnes, K.R. Coser, L. Zou, J. Hur, K.L. Dean, C. Sonnenschein, A.M. Soto, and K.J. Isselbacher. 2006. Importance of dosage standardization for interpreting transcriptomal signature profiles: evidence from studies of xenoestrogens. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:12033-8.
- Shu, X.O., F. Jin, Q. Dai, W. Wen, J.D. Potter, L.H. Kushi, Z. Ruan, Y.T. Gao, and W. Zheng. 2001. Soyfood intake during adolescence and subsequent risk of breast cancer among Chinese women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 10:483-8.
- Silberberg, M., C. Morand, C. Manach, A. Scalbert, and C. Remesy. 2005. Co-administration of quercetin and catechin in rats alters their absorption but not their metabolism. *Life Sci.* 77:3156-67.
- Simoncini, T., A. Hafezi-Moghadam, D.P. Brazil, K. Ley, W.W. Chin, and J.K. Liao. 2000. Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature.* 407:538-41.
- Simoncini, T., and A.R. Genazzani. 2003. Non-genomic actions of sex steroid hormones. *Eur J Endocrinol.* 148:281-92.
- Simonetti, P., S. Ciappellano, C. Gardana, L. Bramati, and P. Pietta. 2002. Procyanidins from *Vitis vinifera* seeds: in vivo effects on oxidative stress. *J Agric Food Chem.* 50:6217-21.
- Simonnet, H., N. Alazard, K. Pfeiffer, C. Gallou, C. Beroud, J. Demont, R. Bouvier, H. Schagger, and C. Godinot. 2002. Low mitochondrial respiratory chain content correlates with tumor aggressiveness in renal cell carcinoma. *Carcinogenesis.* 23:759-68.
- Singh, R.P., A.K. Tyagi, S. Dhanalakshmi, R. Agarwal, and C. Agarwal. 2004. Grape seed extract inhibits advanced human prostate tumor growth and angiogenesis and upregulates insulin-like growth factor binding protein-3. *Int J Cancer.* 108:733-40.
- Singletary, K., C. MacDonald, M. Wallig, and C. Fisher. 1996. Inhibition of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced mammary tumorigenesis and DMBA-DNA adduct formation by curcumin. *Cancer Lett.* 103:137-41.
- Singleton, V., and J. Rossi Jr. 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J Enol Vitic.* 16:144-158.
- Skehan, P., R. Storeng, D. Scudiero, A. Monks, J. McMahon, D. Vistica, J.T. Warren, H. Bokesch, S. Kenney, and M.R. Boyd. 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst.* 82:1107-12.
- Small, J.V., and G.P. Resch. 2005. The comings and goings of actin: coupling protrusion and retraction in cell motility. *Curr Opin Cell Biol.* 17:517-23.
- Smith, D.M., K.G. Daniel, Z. Wang, W.C. Guida, T.H. Chan, and Q.P. Dou. 2004. Docking studies and model development of tea polyphenol proteasome inhibitors: applications to rational drug design. *Proteins.* 54:58-70.
- Smogorzewska, A., and T. de Lange. 2002. Different telomere damage signaling pathways in human and mouse cells. *Embo J.* 21:4338-48.
- Soleas, G.J., M. Angelini, L. Grass, E.P. Diamandis, and D.M. Goldberg. 2001. Absorption of trans-resveratrol in rats. *Methods Enzymol.* 335:145-54.
- Solimani, R. 1996. Quercetin and DNA in solution: analysis of the dynamics of their interaction with a linear dichroism study. *Int J Biol Macromol.* 18:287-95.
- Solimani, R. 1997. The flavonols quercetin, rutin and morin in DNA solution: UV-vis dichroic (and mid-infrared) analysis explain the possible association between the biopolymer and a nucleophilic vegetable-dye. *Biochim Biophys Acta.* 1336:281-94.
- Solomon, J.M., R. Pasupuleti, L. Xu, T. McDonagh, R. Curtis, P.S. DiStefano, and L.J. Huber. 2006. Inhibition of SIRT1 catalytic activity increases p53 acetylation but does not alter cell survival following DNA damage. *Mol Cell Biol.* 26:28-38.
- Song, X.Z., Z.G. Bi, and A.E. Xu. 2006. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits the expression of nitric oxide synthase and generation of nitric oxide induced by ultraviolet B in HaCaT cells. *Chin Med J (Engl).* 119:282-7.
- Sonoda, T., Y. Nagata, M. Mori, N. Miyanaga, N. Takashima, K. Okumura, K. Goto, S. Naito, K. Fujimoto, Y. Hirao, A. Takahashi, T. Tsukamoto, T. Fujioka, and H. Akaza. 2004. A case-control study of diet and prostate cancer in Japan: possible protective effect of traditional Japanese diet. *Cancer Sci.* 95:238-42.
- Spencer, J.P., F. Chaudry, A.S. Pannala, S.K. Srail, E. Debnam, and C. Rice-Evans. 2000. Decomposition of cocoa procyanidins in the gastric milieu. *Biochem Biophys Res Commun.* 272:236-41.
- Spencer, J.P., G. Chowrimootoo, R. Choudhury, E.S. Debnam, S.K. Srail, and C. Rice-Evans. 1999. The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids. *FEBS Lett.* 458:224-30.
- Spencer, J.P., G.G. Kuhnle, R.J. Williams, and C. Rice-Evans. 2003. Intracellular metabolism and bioactivity of quercetin and its in vivo metabolites. *Biochem J.* 372:173-81.
- Spencer, J.P., H. Schroeter, A.J. Crosssthaiwe, G. Kuhnle, R.J. Williams, and C. Rice-Evans. 2001. Contrasting influences of glucuronidation and O-methylation of epicatechin on hydrogen peroxide-induced cell death in neurons and fibroblasts. *Free Radic Biol Med.* 31:1139-46.

- Spencer, J.P., H. Schroeter, A.R. Rechner, and C. Rice-Evans. 2001. Bioavailability of flavan-3-ols and procyanidins: gastrointestinal tract influences and their relevance to bioactive forms in vivo. *Antioxid Redox Signal.* 3:1023-39.
- Spencer, J.P., M.M. Abd-el-Mohsen, and C. Rice-Evans. 2004. Cellular uptake and metabolism of flavonoids and their metabolites: implications for their bioactivity. *Arch Biochem Biophys.* 423:148-61.
- Spicer, J., and P. Ellis. 2006. Towards optimal endocrine therapy for hormone-sensitive breast cancer: Initial versus sequential adjuvant aromatase inhibition. *Cancer Lett.*
- Sprygin, V., and N. Kushnerova. 2002. A Method for Evaluation and Standardization of Oligomeric Proanthocyanidin Complexes Isolated from Various Raw Plant Materials. *Pharmaceutical Chemistry Journal.* 36:139-143.
- Stathopoulos, E.N., C. Dambaki, M. Kampa, P.A. Theodoropoulos, P. Anezinis, D. Delakas, G.S. Delides, and E. Castanas. 2003. Membrane androgen binding sites are preferentially expressed in human prostate carcinoma cells. *BMC Clin Pathol.* 3:1.
- Stein, R.C., and M.D. Waterfield. 2000. PI3-kinase inhibition: a target for drug development? *Mol Med Today.* 6:347-57.
- Steinmetz, K.A., and J.D. Potter. 1991a. Vegetables, fruit, and cancer. I. Epidemiology. *Cancer Causes Control.* 2:325-57.
- Steinmetz, K.A., and J.D. Potter. 1991b. Vegetables, fruit, and cancer. II. Mechanisms. *Cancer Causes Control.* 2:427-42.
- Steinmetz, K.A., L.H. Kushi, R.M. Bostick, A.R. Folsom, and J.D. Potter. 1994. Vegetables, fruit, and colon cancer in the low Women's Health Study. *Am J Epidemiol.* 139:1-15.
- Stoner, G.D., and M.A. Morse. 1997. Isothiocyanates and plant polyphenols as inhibitors of lung and esophageal cancer. *Cancer Lett.* 114:113-9.
- Stossel, T.P., J. Condeelis, L. Cooley, J.H. Hartwig, A. Noegel, M. Schleicher, and S.S. Shapiro. 2001. Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2:138-45.
- Stradal, T.E., K. Rottner, A. Disanza, S. Confalonieri, M. Innocenti, and G. Scita. 2004. Regulation of actin dynamics by WASP and WAVE family proteins. *Trends Cell Biol.* 14:303-11.
- Strobel, P., C. Allard, T. Perez-Acle, R. Calderon, R. Aldunate, and F. Leighton. 2005. Myricetin, quercetin and catechin-gallate inhibit glucose uptake in isolated rat adipocytes. *Biochem J.* 386:471-8.
- Strom, S.S., Y. Yamamura, C.M. Duphorne, M.R. Spitz, R.J. Babaian, P.C. Pillow, and S.D. Hursting. 1999. Phytoestrogen intake and prostate cancer: a case-control study using a new database. *Nutr Cancer.* 33:20-5.
- Suganuma, M., S. Okabe, Y. Kai, N. Sueoka, E. Sueoka, and H. Fujiki. 1999. Synergistic effects of (–)-epigallocatechin gallate with (–)-epicatechin, sulindac, or tamoxifen on cancer-preventive activity in the human lung cancer cell line PC-9. *Cancer Res.* 59:44-7.
- Sugita, H., M. Fujimoto, T. Yasukawa, N. Shimizu, M. Sugita, S. Yasuhara, J.A. Martyn, and M. Kaneki. 2005. Inducible nitric-oxide synthase and NO donor induce insulin receptor substrate-1 degradation in skeletal muscle cells. *J Biol Chem.* 280:14203-11.
- Sun, C.L., J.M. Yuan, K. Arakawa, S.H. Low, H.P. Lee, and M.C. Yu. 2002a. Dietary soy and increased risk of bladder cancer: the Singapore Chinese Health Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 11:1674-7.
- Sun, C.L., J.M. Yuan, M.J. Lee, C.S. Yang, Y.T. Gao, R.K. Ross, and M.C. Yu. 2002b. Urinary tea polyphenols in relation to gastric and esophageal cancers: a prospective study of men in Shanghai, China. *Carcinogenesis.* 23:1497-503.
- Sun, C.L., J.M. Yuan, W.P. Koh, and M.C. Yu. 2005. Green tea, black tea and breast cancer risk: a meta-analysis of epidemiological studies. *Carcinogenesis.*
- Sun, C.L., J.M. Yuan, X.L. Wang, Y.T. Gao, R.K. Ross, and M.C. Yu. 2004. Dietary soy and increased risk of bladder cancer: a prospective cohort study of men in Shanghai, China. *Int J Cancer.* 112:319-23.
- Sun, Z.J., C.E. Pan, H.S. Liu, and G.J. Wang. 2002. Anti-hepatoma activity of resveratrol in vitro. *World J Gastroenterol.* 8:79-81.
- Sutter-Dub, M.T. 2002. Rapid non-genomic and genomic responses to progestogens, estrogens, and glucocorticoids in the endocrine pancreatic B cell, the adipocyte and other cell types. *Steroids.* 67:77-93.
- Suzuki, Y., Y. Tsubono, N. Nakaya, Y. Koizumi, and I. Tsuji. 2004. Green tea and the risk of breast cancer: pooled analysis of two prospective studies in Japan. *Br J Cancer.* 90:1361-3.
- Svitkina, T.M., E.A. Bulanova, O.Y. Chaga, D.M. Vignjevic, S. Kojima, J.M. Vasiliev, and G.G. Borisy. 2003. Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. *J Cell Biol.* 160:409-21.
- Sweeney, M.I., W. Kalt, S.L. MacKinnon, J. Ashby, and K.T. Gottschall-Pass. 2002. Feeding rats diets enriched in lowbush blueberries for six weeks decreases ischemia-induced brain damage. *Nutr Neurosci.* 5:427-31.
- Tachibana, H., K. Koga, Y. Fujimura, and K. Yamada. 2004. A receptor for green tea polyphenol EGCG. *Nat Struct Mol Biol.* 11:380-1.
- Tajima, K., and S. Tominaga. 1985. Dietary habits and gastro-intestinal cancers: a comparative case-control study of stomach and large intestinal cancers in Nagoya, Japan. *Jpn J Cancer Res.* 76:705-16.
- Tamada, M., M.P. Sheetz, and Y. Sawada. 2004. Activation of a signaling cascade by cytoskeleton stretch. *Dev Cell.* 7:709-18.
- Tammela, P., L. Laitinen, A. Galkin, T. Wennberg, R. Heczko, H. Vuorela, J.P. Slotte, and P. Vuorela. 2004. Permeability characteristics and membrane affinity of flavonoids and alkyl gallates in Caco-2 cells and in phospholipid vesicles. *Arch Biochem Biophys.* 425:193-9.
- Tamura, S., M. Hanada, M. Ohnishi, K. Katsura, M. Sasaki, and T. Kobayashi. 2002. Regulation of stress-activated protein kinase signaling pathways by protein phosphatases. *Eur J Biochem.* 269:1060-6.
- Teleman, A.A., Y.W. Chen, and S.M. Cohen. 2005. Drosophila Melted modulates FOXO and TOR activity. *Dev Cell.* 9:271-81.
- Terry, P., and A. Wolk. 2001. Tea consumption and the risk of colorectal cancer in Sweden. *Nutr Cancer.* 39:176-9.
- Tesarik, J., J. Moos, and C. Mendoza. 1993. Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by a progesterone receptor on the cell surface of human sperm. *Endocrinology.* 133:328-35.
- Tewes, F.J., L.C. Koo, T.J. Meisgen, and R. Rylander. 1990. Lung cancer risk and mutagenicity of tea. *Environ Res.* 52:23-33.

- Thebaut, J.F., P. Thebaut, and F. Vin. 1985. Etude de l'Endotelon dans les Manifestations Fonctionnelles de l'Insuffisance Veineuse Peripherique-Resultats d'une Etude en Double Aveugle Portant sur 92 Patients. *Gazette Medicale*. 92: 96-100.
- Theodoropoulos, P.A., H. Polioudaki, O. Kostaki, S.P. Derdas, V. Georgoulas, C. Dargemont, and S.D. Georgatos. 1999. Taxol affects nuclear lamina and pore complex organization and inhibits import of karyophilic proteins into the cell nucleus. *Cancer Res*. 59:4625-33.
- Thioulouse, J., D. Chessel, S. Doledec, and J.M. Olivier. 1997. ADE-4: a multivariate analysis and graphical display software. *Statistics and Computing*. 7:75-83.
- Thomas, P., Y. Zhu, and M. Pace. 2002. Progesterone membrane receptors involved in the meiotic maturation of teleost oocytes: a review with some new findings. *Steroids*. 67:511-7.
- Thomsen, L.L., F.G. Lawton, R.G. Knowles, J.E. Beesley, V. Riveros-Moreno, and S. Moncada. 1994. Nitric oxide synthase activity in human gynecological cancer. *Cancer Res*. 54:1352-1354.
- Timberlake, C.F., and B.S. Henry. 1988. Anthocyanins as natural food colorants. *Prog Clin Biol Res*. 280:107-21.
- Tolias, K.F., L.E. Rameh, H. Ishihara, Y. Shibasaki, J. Chen, G.D. Prestwich, L.C. Cantley, and C.L. Carpenter. 1998. Type I phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinases synthesize the novel lipids phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate and phosphatidylinositol 5-phosphate. *J Biol Chem*. 273:18040-6.
- Trauner, M., P.J. Meier, and J.L. Boyer. 1999. Molecular regulation of hepatocellular transport systems in cholestasis. *J Hepatol*. 31:165-78.
- Trichopoulos, D., G. Ouranos, N.E. Day, A. Tzonou, O. Manousos, C. Papadimitriou, and A. Trichopoulos. 1985. Diet and cancer of the stomach: a case-control study in Greece. *Int J Cancer*. 36:291-7.
- Triggiani, M., M. Gentile, A. Secondo, F. Granata, A. Oriente, M. Tagliatela, L. Annunziato, and G. Marone. 2001. Histamine induces exocytosis and IL-6 production from human lung macrophages through interaction with H1 receptors. *J Immunol*. 166:4083-91.
- Tsai, S.H., S.Y. Lin-Shiau, and J.K. Lin. 1999. Suppression of nitric oxide synthase and the down-regulation of the activation of NFkappaB in macrophages by resveratrol. *Br.J.Pharmacol*. 126:673-680.
- Tschugguel, W., C. Schneeberger, G. Unfried, K. Czerwenka, W. Weninger, M. Mildner, D.M. Gruber, M.O. Sator, T. Waldhor, and J.C. Huber. 1999. Expression of inducible nitric oxide synthase in human breast cancer depends on tumor grade. *Breast Cancer Res Treat*. 56:145-51.
- Tsubono, Y., Y. Nishino, S. Komatsu, C.C. Hsieh, S. Kanemura, I. Tsuji, H. Nakatsuka, A. Fukao, H. Satoh, and S. Hisamichi. 2001. Green tea and the risk of gastric cancer in Japan. *N Engl J Med*. 344:632-6.
- Tsuda, T., F. Horio, and T. Osawa. 1999b. Absorption and metabolism of cyanidin 3-O-beta-D-glucoside in rats. *FEBS Lett*. 449:179-82.
- Tsuda, T., F. Horio, J. Kitoh, and T. Osawa. 1999a. Protective effects of dietary cyanidin 3-O-beta-D-glucoside on liver ischemia-reperfusion injury in rats. *Arch Biochem Biophys*. 368:361-6.
- Tsuda, T., F. Horio, K. Uchida, H. Aoki, and T. Osawa. 2003. Dietary cyanidin 3-O-beta-D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. *J Nutr*. 133:2125-30.
- Tunon, M.J., S. Sanchez-Campos, B. Gutierrez, J.M. Culebras, and J. Gonzalez-Gallego. 2003. Effects of FK506 and rapamycin on generation of reactive oxygen species, nitric oxide production and nuclear factor kappa B activation in rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol*. 66:439-45.
- Tzima, E., P.J. Trotter, M.A. Orchard, and J.H. Walker. 2000. Annexin V relocates to the platelet cytoskeleton upon activation and binds to a specific isoform of actin. *Eur J Biochem*. 267:4720-30.
- Tzonou, A., L. Lipworth, A. Kalandidi, A. Trichopoulou, I. Gamatsi, C.C. Hsieh, V. Notara, and D. Trichopoulos. 1996. Dietary factors and the risk of endometrial cancer: a case-control study in Greece. *Br J Cancer*. 73:1284-90.
- Uchida, Y., H. Yamazaki, S. Watanabe, K. Hayakawa, Y. Meng, N. Hiramatsu, A. Kasai, K. Yamauchi, J. Yao, and M. Kitamura. 2005. Enhancement of NF-kappaB activity by resveratrol in cytokine-exposed mesangial cells. *Clin Exp Immunol*. 142:76-83.
- Ueno, I., N. Nakano, and I. Hirono. 1983. Metabolic fate of [¹⁴C] quercetin in the ACI rat. *Jpn J Exp Med*. 53:41-50.
- Umansky, V., A. Ushmorov, F. Ratter, K. Chlichlia, M. Bucur, A. Lichtenauer, and M. Rocha. 2000. Nitric oxide-mediated apoptosis in human breast cancer cells requires changes in mitochondrial functions and is independent of CD95 (APO-1/Fas). *Int J Oncol*. 16:109-17.
- Ursini, F., and A. Sevanian. 2002. Postprandial oxidative stress. *Biol Chem*. 383:599-605.
- Usha, S., I.M. Johnson, and R. Malathi. 2005. Interaction of resveratrol and genistein with nucleic acids. *J Biochem Mol Biol*. 38:198-205.
- Vaidyanathan, J.B., and T. Walle. 2003. Cellular uptake and efflux of the tea flavonoid (-)epicatechin-3-gallate in the human intestinal cell line Caco-2. *J Pharmacol Exp Ther*. 307:745-52.
- Valverde, M.A., P. Rojas, J. Amigo, D. Cosmelli, P. Orio, M.I. Bahamonde, G.E. Mann, C. Vergara, and R. Latorre. 1999. Acute activation of Maxi-K channels (hSlo) by estradiol binding to the beta subunit. *Science*. 285:1929-31.
- van der Woude, H., M.G. Ter Veld, N. Jacobs, P.T. van der Saag, A.J. Murk, and I.M. Rietjens. 2005. The stimulation of cell proliferation by quercetin is mediated by the estrogen receptor. *Mol Nutr Food Res*. 49:763-71.
- van Erk, M.J., P. Roepman, T.R. van der Lende, R.H. Stierum, J.M. Aarts, P.J. van Bladeren, and B. van Ommen. 2005. Integrated assessment by multiple gene expression analysis of quercetin bioactivity on anticancer-related mechanisms in colon cancer cells in vitro. *Eur J Nutr*. 44:143-56.
- Van Hooser, A.A., P. Yuh, and R. Heald. 2005. The perichromosomal layer. *Chromosoma*. 114:377-88.
- van Zanden, J.J., L. Geraets, H.M. Wortelboer, P.J. van Bladeren, I.M. Rietjens, and N.H. Cnubben. 2004. Structural requirements for the flavonoid-mediated modulation of glutathione S-transferase P1-1 and GS-X pump activity in MCF7 breast cancer cells. *Biochem Pharmacol*. 67:1607-17.
- Vaquero, A., M. Scher, D. Lee, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and D. Reinberg. 2004. Human SirT1 interacts with histone H1 and promotes formation of facultative heterochromatin. *Mol Cell*. 16:93-105.
- Vercauteren, J. 2005. Cours de Pharmacognosie. Université Montpellier I.
- Vercauteren, J., J.P. Lecoupeau, and P. Troplin. 2001. Procède d'obtention d'extraits a base de composés polyphénoliques a partir de feves de cacao, les extraits obtenus et leurs applications.

- Verstraeten, S.V., C.L. Keen, H.H. Schmitz, C.G. Fraga, and P.I. Oteiza. 2003. Flavan-3-ols and procyanidins protect liposomes against lipid oxidation and disruption of the bilayer structure. *Free Radic Biol Med.* 34:84-92.
- Vian, M.A., V. Tomao, P.O. Coulomb, J.M. Lacombe, and O. Dangles. 2006. Comparison of the anthocyanin composition during ripening of Syrah grapes grown using organic or conventional agricultural practices. *J Agric Food Chem.* 54:5230-5.
- Vigna, G.B., F. Costantini, G. Aldini, M. Carini, A. Catapano, F. Schena, A. Tangerini, R. Zanca, E. Bombardelli, P. Morazzoni, A. Mezzetti, R. Fellin, and R. Maffei Facino. 2003. Effect of a standardized grape seed extract on low-density lipoprotein susceptibility to oxidation in heavy smokers. *Metabolism.* 52:1250-7.
- Vignes, M., T. Maurice, F. Lante, M. Nedjar, K. Thethi, J. Guiramand, and M. Recasens. 2006. Anxiolytic properties of green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate (EGCG). *Brain Res.* 1110:102-15.
- Vinson, J.A., J. Jang, Y.A. Dabbagh, M.M. Serry, and S. Cai. 1995. Plant Polyphenols Exhibit Lipoprotein-Bound Antioxidant Activity Using an In Vitro Oxidation Model for Heart Disease. *J Agric Food Chem.* 43:2798-2799.
- Visioli, F., S. Bellosta, and C. Galli. 1998. Oleuropein, the bitter principle of olives, enhances nitric oxide production by mouse macrophages. *Life Sci.* 62:541-6.
- Vitrac, X., A. Desmouliere, B. Brouillaud, S. Krisa, G. Deffieux, N. Barthe, J. Rosenbaum, and J.M. Merillon. 2003. Distribution of [¹⁴C]-trans-resveratrol, a cancer chemopreventive polyphenol, in mouse tissues after oral administration. *Life Sci.* 72:2219-33.
- Vodovotz, Y., P.K. Kim, E.Z. Bagci, G.B. Ermentrout, C.C. Chow, I. Bahar, and T.R. Billiar. 2004. Inflammatory modulation of hepatocyte apoptosis by nitric oxide: in vivo, in vitro, and in silico studies. *Curr Mol Med.* 4:753-62.
- Wagner, D., H. Spahn-Langguth, A. Hanafy, A. Koggel, and P. Langguth. 2001. Intestinal drug efflux: formulation and food effects. *Adv Drug Deliv Rev.* 50 Suppl 1:S13-31.
- Walgren, R.A., J.T. Lin, R.K. Kinne, and T. Walle. 2000. Cellular uptake of dietary flavonoid quercetin 4'-beta-glucoside by sodium-dependent glucose transporter SGLT1. *J Pharmacol Exp Ther.* 294:837-43.
- Walker, E.H., M.E. Pacold, O. Perisic, L. Stephens, P.T. Hawkins, M.P. Wymann, and R.L. Williams. 2000. Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine. *Mol Cell.* 6:909-19.
- Wallar, B.J., and A.S. Alberts. 2003. The formins: active scaffolds that remodel the cytoskeleton. *Trends Cell Biol.* 13:435-46.
- Walle, T., A.M. Browning, L.L. Steed, S.G. Reed, and U.K. Walle. 2005. Flavonoid glucosides are hydrolyzed and thus activated in the oral cavity in humans. *J Nutr.* 135:48-52.
- Walle, T., F. Hsieh, M.H. DeLegge, J.E. Oatis, Jr., and U.K. Walle. 2004. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab Dispos.* 32:1377-82.
- Walle, T., T.S. Vincent, and U.K. Walle. 2003. Evidence of covalent binding of the dietary flavonoid quercetin to DNA and protein in human intestinal and hepatic cells. *Biochem Pharmacol.* 65:1603-10.
- Walle, T., U.K. Walle, and P.V. Halushka. 2001. Carbon dioxide is the major metabolite of quercetin in humans. *J Nutr.* 131:2648-52.
- Walle, T., Y. Otake, J.A. Brubaker, U.K. Walle, and P.V. Halushka. 2001a. Disposition and metabolism of the flavonoid chrysin in normal volunteers. *Br J Clin Pharmacol.* 51:143-6.
- Walle, U.K., A. Galijatovic, and T. Walle. 1999. Transport of the flavonoid chrysin and its conjugated metabolites by the human intestinal cell line Caco-2. *Biochem Pharmacol.* 58:431-8.
- Wallerath, T., G. Deckert, T. Ternes, H. Anderson, H. Li, K. Witte, and U. Forstermann. 2002. Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation.* 106:1652-8.
- Walters, M.R., and I. Nemere. 2004. Receptors for steroid hormones: membrane-associated and nuclear forms. *Cell Mol Life Sci.* 61:2309-21.
- Wang, D.Y., R. Fulthorpe, S.N. Liss, and E.A. Edwards. 2004. Identification of estrogen-responsive genes by complementary deoxyribonucleic acid microarray and characterization of a novel early estrogen-induced gene: EEIG1. *Mol Endocrinol.* 18:402-11.
- Wang, H., D. Yu, S. Agrawal, and R. Zhang. 2003. Experimental therapy of human prostate cancer by inhibiting MDM2 expression with novel mixed-backbone antisense oligonucleotides: in vitro and in vivo activities and mechanisms. *Prostate.* 54:194-205.
- Wang, H., E.J. Race, and A.J. Shrikhande. 2003. Anthocyanin transformation in Cabernet Sauvignon wine during aging. *J Agric Food Chem.* 51:7989-94.
- Wang, Q., A. Simonyi, W. Li, B.A. Sisk, R.L. Miller, R.S. Macdonald, D.E. Lubahn, G.Y. Sun, and A.Y. Sun. 2005. Dietary grape supplement ameliorates cerebral ischemia-induced neuronal death in gerbils. *Mol Nutr Food Res.* 49:443-51.
- Wang, W., and N. Ballatori. 1998. Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions. *Pharmacol Rev.* 50:335-56.
- Wang, X., Y. Yang, X. Guo, E.R. Sampson, C.L. Hsu, M.Y. Tsai, S. Yeh, G. Wu, Y. Guo, and C. Chang. 2002. Suppression of androgen receptor transactivation by Pyk2 via interaction and phosphorylation of the ARA55 coregulator. *J Biol Chem.* 277:15426-31.
- Wang, Y., J. Cao, and S. Zeng. 2004. Establishment of a P-glycoprotein substrate screening model and its preliminary application. *World J Gastroenterol.* 10:1365-8.
- Wang, Z., X. Zhang, P. Shen, B.W. Loggie, Y. Chang, and T.F. Deuel. 2006. A variant of estrogen receptor- α , hER- α 36: transduction of estrogen- and antiestrogen-dependent membrane-initiated mitogenic signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:9063-8.
- Wang, Z.Y., M.T. Huang, T. Ferraro, C.Q. Wong, Y.R. Lou, K. Reuhl, M. Iatropoulos, C.S. Yang, and A.H. Conney. 1992. Inhibitory effect of green tea in the drinking water on tumorigenesis by ultraviolet light and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in the skin of SKH-1 mice. *Cancer Res.* 52:1162-70.
- Wang, Z.Y., M.T. Huang, Y.R. Lou, J.G. Xie, K.R. Reuhl, H.L. Newmark, C.T. Ho, C.S. Yang, and A.H. Conney. 1994. Inhibitory effects of black tea, green tea, decaffeinated black tea, and decaffeinated green tea on

- ultraviolet B light-induced skin carcinogenesis in 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-initiated SKH-1 mice. *Cancer Res.* 54:3428-35.
- Waridel, P., J.L. Wolfender, K. Ndjoko, K.R. Hobby, H.J. Major, and K. Hostettmann. 2001. Evaluation of quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry and ion-trap multiple-stage mass spectrometry for the differentiation of C-glycosidic flavonoid isomers. *J Chromatogr A.* 926:29-41.
- Warn, R.M., H.O. Gutzzeit, L. Smith, and A. Warn. 1985. F-actin rings are associated with the ring canals of the *Drosophila* egg chamber. *Exp Cell Res.* 157:355-63.
- Waterhouse, A.L. 2002. Wine phenolics. *Ann N Y Acad Sci.* 957:21-36.
- Way, T.D., H.H. Lee, M.C. Kao, and J.K. Lin. 2004. Black tea polyphenol theaflavins inhibit aromatase activity and attenuate tamoxifen resistance in HER2/neu-transfected human breast cancer cells through tyrosine kinase suppression. *Eur J Cancer.* 40:2165-74.
- Weber, K.S., K.D. Setchell, D.M. Stocco, and E.D. Lephart. 2001. Dietary soy-phytoestrogens decrease testosterone levels and prostate weight without altering LH, prostate 5 α -reductase or testicular steroidogenic acute regulatory peptide levels in adult male Sprague-Dawley rats. *J Endocrinol.* 170:591-9.
- Weinstein, S.J., M.E. Wright, P. Pietinen, I. King, C. Tan, P.R. Taylor, J. Virtamo, and D. Albanes. 2005. Serum alpha-tocopherol and gamma-tocopherol in relation to prostate cancer risk in a prospective study. *J Natl Cancer Inst.* 97:396-9.
- Weisburger, J.H., A. Rivenson, K. Garr, and C. Aliaga. 1997. Tea, or tea and milk, inhibit mammary gland and colon carcinogenesis in rats. *Cancer Lett.* 114:323-7.
- Wendler, W.M., E. Kremmer, R. Forster, and E.L. Winnacker. 1997. Identification of pirin, a novel highly conserved nuclear protein. *J Biol Chem.* 272:8482-9.
- Wenzel, E., and V. Somoza. 2005. Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. *Mol Nutr Food Res.* 49:472-81.
- Weyant, M.J., A.M. Carothers, A.J. Dannenberg, and M.M. Bertagnolli. 2001. (+)-Catechin inhibits intestinal tumor formation and suppresses focal adhesion kinase activation in the min/+ mouse. *Cancer Res.* 61:118-25.
- White, R.E., D.J. Darkow, and J.L. Lang. 1995. Estrogen relaxes coronary arteries by opening BKCa channels through a cGMP-dependent mechanism. *Circ Res.* 77:936-42.
- Whiting, K.P., C.J. Restall, and P.F. Brain. 2000. Steroid hormone-induced effects on membrane fluidity and their potential roles in non-genomic mechanisms. *Life Sci.* 67:743-57.
- Whitley, A.C., G.D. Stoner, M.V. Darby, and T. Walle. 2003. Intestinal epithelial cell accumulation of the cancer preventive polyphenol ellagic acid--extensive binding to protein and DNA. *Biochem Pharmacol.* 66:907-15.
- Williams, C.A., A.L. Toscano De Brito, J.B. Harborne, J. Eagles, and P.G. Waterman. 1994. Methylated C-glycosylflavones as taxonomic markers in orchids of the subtribe Ornithocephalinae. *Phytochemistry.* 37:1045-53.
- Williams, C.A., and R.J. Grayer. 2004. Anthocyanins and other flavonoids. *Nat Prod Rep.* 21:539-73.
- Williams, R.J., J.P. Spencer, and C. Rice-Evans. 2004. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radic Biol Med.* 36:838-49.
- Winder, S.J., and K.R. Ayscough. 2005. Actin-binding proteins. *J Cell Sci.* 118:651-4.
- Wink, D.A., and J.B. Mitchell. 1998. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med.* 25:434-56.
- Wink, D.A., Y. Vodovotz, J. Laval, F. Laval, M.W. Dewhirst, and J.B. Mitchell. 1998. The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. *Carcinogenesis.* 19:711-21.
- Wolter, F., B. Akoglu, A. Clausnitzer, and J. Stein. 2001. Downregulation of the cyclin D1/Cdk4 complex occurs during resveratrol-induced cell cycle arrest in colon cancer cell lines. *J Nutr.* 131:2197-203.
- Wood, W., and P. Martin. 2002. Structures in focus--filopodia. *Int J Biochem Cell Biol.* 34:726-30.
- Woodring, P.J., J. Meisenhelder, S.A. Johnson, G.L. Zhou, J. Field, K. Shah, F. Bladt, T. Pawson, M. Niki, P.P. Pandolfi, J.Y. Wang, and T. Hunter. 2004. c-Abl phosphorylates Dok1 to promote filopodia during cell spreading. *J Cell Biol.* 165:493-503.
- Wouters, L., H.W. Gohlmann, L. Bijmens, S.U. Kass, G. Molenberghs, and P.J. Lewi. 2003. Graphical exploration of gene expression data: a comparative study of three multivariate methods. *Biometrics.* 59:1131-9.
- Wren, A.F., M. Cleary, C. Frantz, S. Melton, and L. Norris. 2002. 90-day oral toxicity study of a grape seed extract (IH636) in rats. *J Agric Food Chem.* 50:2180-92.
- Wright, M.E., S.T. Mayne, C.A. Swanson, R. Sinha, and M.C. Alavanja. 2003. Dietary carotenoids, vegetables, and lung cancer risk in women: the Missouri women's health study (United States). *Cancer Causes Control.* 14:85-96.
- Wu, A.H., C.C. Tseng, D. Van Den Berg, and M.C. Yu. 2003a. Tea intake, COMT genotype, and breast cancer in Asian-American women. *Cancer Res.* 63:7526-9.
- Wu, A.H., M.C. Yu, C.C. Tseng, J. Hankin, and M.C. Pike. 2003b. Green tea and risk of breast cancer in Asian Americans. *Int J Cancer.* 106:574-9.
- Wu, A.H., M.C. Yu, C.C. Tseng, N.C. Twaddle, and D.R. Doerge. 2004. Plasma isoflavone levels versus self-reported soy isoflavone levels in Asian-American women in Los Angeles County. *Carcinogenesis.* 25:77-81.
- Wu, A.H., R.G. Ziegler, P.L. Horn-Ross, A.M. Nomura, D.W. West, L.N. Kolonel, J.F. Rosenthal, R.N. Hoover, and M.C. Pike. 1996. Tofu and risk of breast cancer in Asian-Americans. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 5:901-6.
- Wu, J., J. Oka, M. Higuchi, I. Tabata, T. Toda, M. Fujioka, N. Fuku, T. Teramoto, T. Okuhira, T. Ueno, S. Uchiyama, K. Urata, K. Yamada, and Y. Ishimi. 2006. Cooperative effects of isoflavones and exercise on bone and lipid metabolism in postmenopausal Japanese women: a randomized placebo-controlled trial. *Metabolism.* 55:423-33.
- Wu, X., G. Cao, and R.L. Prior. 2002. Absorption and metabolism of anthocyanins in elderly women after consumption of elderberry or blueberry. *J Nutr.* 132:1865-71.
- Wu, X., H.E. Pittman, 3rd, and R.L. Prior. 2004. Pelargonidin is absorbed and metabolized differently than cyanidin after marionberry consumption in pigs. *J Nutr.* 134:2603-10.

- Wulfkühle, J.D., N.S. Petersen, and J.J. Otto. 1998. Changes in the F-actin cytoskeleton during neurosensory bristle development in *Drosophila*: the role of singed and forked proteins. *Cell Motil Cytoskeleton*. 40:119-32.
- Wullschleger, S., R. Loewith, and M.N. Hall. 2006. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*. 124:471-84.
- Wyckoff, M.H., K.L. Chambliss, C. Mineo, I.S. Yuhanna, M.E. Mendelsohn, S.M. Mumby, and P.W. Shaul. 2001. Plasma membrane estrogen receptors are coupled to endothelial nitric-oxide synthase through Galpha(i). *J Biol Chem*. 276:27071-6.
- Wyke, S.M., S.T. Russell, and M.J. Tisdale. 2004. Induction of proteasome expression in skeletal muscle is attenuated by inhibitors of NF-kappaB activation. *Br J Cancer*. 91:1742-50.
- Xia, M., M. Hou, H. Zhu, J. Ma, Z. Tang, Q. Wang, Y. Li, D. Chi, X. Yu, T. Zhao, P. Han, X. Xia, and W. Ling. 2005. Anthocyanins induce cholesterol efflux from mouse peritoneal macrophages: the role of the peroxisome proliferator-activated receptor {gamma}-liver X receptor {alpha}-ABCA1 pathway. *J Biol Chem*. 280:36792-801.
- Xie, H.G., R.B. Kim, A.J. Wood, and C.M. Stein. 2001. Molecular basis of ethnic differences in drug disposition and response. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 41:815-50.
- Xu, H.X., M. Wan, H. Dong, P.P. But, and L.Y. Foo. 2000. Inhibitory activity of flavonoids and tannins against HIV-1 protease. *Biol Pharm Bull*. 23:1072-6.
- Yamagishi, A., M. Masuda, T. Ohki, H. Onishi, and N. Mochizuki. 2004. A novel actin bundling/filopodium-forming domain conserved in insulin receptor tyrosine kinase substrate p53 and missing in metastasis protein. *J Biol Chem*. 279:14929-36.
- Yamakoshi, J., A. Sano, S. Tokutake, M. Saito, M. Kikuchi, Y. Kubota, Y. Kawachi, and F. Otsuka. 2004. Oral intake of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds improves chloasma. *Phytother Res*. 18:895-9.
- Yamakoshi, J., M. Saito, S. Kataoka, and M. Kikuchi. 2002. Safety evaluation of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. *Food Chem Toxicol*. 40:599-607.
- Yamamoto, S., T. Sobue, M. Kobayashi, S. Sasaki, and S. Tsugane. 2003. Soy, isoflavones, and breast cancer risk in Japan. *J Natl Cancer Inst*. 95:906-13.
- Yamashita, Y., S. Kawada, and H. Nakano. 1990. Induction of mammalian topoisomerase II dependent DNA cleavage by nonintercalative flavonoids, genistein and orobol. *Biochem Pharmacol*. 39:737-44.
- Yamazaki, D., S. Kurisu, and T. Takenawa. 2005. Regulation of cancer cell motility through actin reorganization. *Cancer Sci*. 96:379-86.
- Yan, Q., and A. Bennick. 1995. Identification of histatins as tannin-binding proteins in human saliva. *Biochem J*. 311 (Pt 1):341-7.
- Yang, C.S., and Z.Y. Wang. 1993. Tea and cancer. *J Natl Cancer Inst*. 85:1038-49.
- Yang, C.S., G.Y. Yang, J.M. Landau, S. Kim, and J. Liao. 1998. Tea and tea polyphenols inhibit cell hyperproliferation, lung tumorigenesis, and tumor progression. *Exp Lung Res*. 24:629-39.
- Yang, C.S., J.Y. Chung, G.Y. Yang, C. Li, X. Meng, and M.J. Lee. 2000. Mechanisms of inhibition of carcinogenesis by tea. *Biofactors*. 13:73-9.
- Yang, C.S., P. Maliakal, and X. Meng. 2002. Inhibition of carcinogenesis by tea. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 42:25-54.
- Yang, C.Y., P.D. Chao, Y.C. Hou, S.Y. Tsai, K.C. Wen, and S.L. Hsiu. 2006. Marked decrease of cyclosporin bioavailability caused by coadministration of ginkgo and onion in rats. *Food Chem Toxicol*. 44:1572-8.
- Yang, G., Z.Y. Wang, S. Kim, J. Liao, D.N. Seril, X. Chen, T.J. Smith, and C.S. Yang. 1997. Characterization of early pulmonary hyperproliferation and tumor progression and their inhibition by black tea in a 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced lung tumorigenesis model with A/J mice. *Cancer Res*. 57:1889-94.
- Yang, G.Y., J. Liao, K. Kim, E.J. Yurkow, and C.S. Yang. 1998. Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by tea polyphenols. *Carcinogenesis*. 19:611-6.
- Yen, G.C., and H.H. Lai. 2003. Inhibition of reactive nitrogen species effects in vitro and in vivo by isoflavones and soy-based food extracts. *J Agric Food Chem*. 51:7892-7900.
- Yilmazer, M., J.F. Stevens, and D.R. Buhler. 2001. In vitro glucuronidation of xanthohumol, a flavonoid in hop and beer, by rat and human liver microsomes. *FEBS Lett*. 491:252-6.
- Yoshigi, M., L.M. Hoffman, C.C. Jensen, H.J. Yost, and M.C. Beckerle. 2005. Mechanical force mobilizes zyxin from focal adhesions to actin filaments and regulates cytoskeletal reinforcement. *J Cell Biol*. 171:209-15.
- Youdim, K.A., M.S. Dobbie, G. Kuhnle, A.R. Prottogente, N.J. Abbott, and C. Rice-Evans. 2003. Interaction between flavonoids and the blood-brain barrier: in vitro studies. *J Neurochem*. 85:180-92.
- Youdim, K.A., M.Z. Qaiser, D.J. Begley, C.A. Rice-Evans, and N.J. Abbott. 2004. Flavonoid permeability across an in situ model of the blood-brain barrier. *Free Radic Biol Med*. 36:592-604.
- Yu, G.P., and C.C. Hsieh. 1991. Risk factors for stomach cancer: a population-based case-control study in Shanghai. *Cancer Causes Control*. 2:169-74.
- Yu, G.P., C.C. Hsieh, L.Y. Wang, S.Z. Yu, X.L. Li, and T.H. Jin. 1995. Green-tea consumption and risk of stomach cancer: a population-based case-control study in Shanghai, China. *Cancer Causes Control*. 6:532-8.
- Yu, J., and L. Zhang. 2005. The transcriptional targets of p53 in apoptosis control. *Biochem Biophys Res Commun*. 331:851-8.
- Yu, L., Z.J. Sun, S.L. Wu, and C.E. Pan. 2003. Effect of resveratrol on cell cycle proteins in murine transplantable liver cancer. *World J Gastroenterol*. 9:2341-3.
- Yu, Y., J. Hu, P.P. Wang, Y. Zou, Y. Qi, P. Zhao, and R. Xe. 1997. Risk factors for bladder cancer: a case-control study in northeast China. *Eur J Cancer Prev*. 6:363-9.
- Yuan, J.M., Q.S. Wang, R.K. Ross, B.E. Henderson, and M.C. Yu. 1995. Diet and breast cancer in Shanghai and Tianjin, China. *Br J Cancer*. 71:1353-8.
- Yuan, J.M., W.P. Koh, C.L. Sun, H.P. Lee, and M.C. Yu. 2005. Green tea intake, ACE gene polymorphism and breast cancer risk among Chinese women in Singapore. *Carcinogenesis*. 26:1389-94.
- Zaidi, R., and S.M. Hadi. 1992. Strand scission in DNA by gossypol and Cu(II): role of Cu(I) and oxygen-free radicals. *J Biochem Toxicol*. 7:213-7.

- Zeegers, M.P., E. Dorant, R.A. Goldbohm, and P.A. van den Brandt. 2001. Are coffee, tea, and total fluid consumption associated with bladder cancer risk? Results from the Netherlands Cohort Study. *Cancer Causes Control*. 12:231-8.
- Zeegers, M.P., F.E. Tan, R.A. Goldbohm, and P.A. van den Brandt. 2001. Are coffee and tea consumption associated with urinary tract cancer risk? A systematic review and meta-analysis. *Int J Epidemiol*. 30:353-62.
- Zelcer, N., K. van de Wetering, M. Hillebrand, E. Sarton, A. Kuil, P.R. Wielinga, T. Tephly, A. Dahan, J.H. Beijnen, and P. Borst. 2005. Mice lacking multidrug resistance protein 3 show altered morphine pharmacokinetics and morphine-6-glucuronide antinociception. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:7274-9.
- Zhang, B., and Y. Zheng. 1998. Negative regulation of Rho family GTPases Cdc42 and Rac2 by homodimer formation. *J Biol Chem*. 273:25728-33.
- Zhang, H., J.S. Berg, Z. Li, Y. Wang, P. Lang, A.D. Sousa, A. Bhaskar, R.E. Cheney, and S. Stromblad. 2004. Myosin-X provides a motor-based link between integrins and the cytoskeleton. *Nat Cell Biol*. 6:523-31.
- Zhang, J., and S. Kashket. 1998. Inhibition of salivary amylase by black and green teas and their effects on the intraoral hydrolysis of starch. *Caries Res*. 32:233-8.
- Zhang, M., A.H. Lee, C.W. Binns, and X. Xie. 2004a. Green tea consumption enhances survival of epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer*. 112:465-9.
- Zhang, M., C.W. Binns, and A.H. Lee. 2002. Tea consumption and ovarian cancer risk: a case-control study in China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 11:713-8.
- Zhang, M., X. Xie, A.H. Lee, and C.W. Binns. 2004b. Soy and isoflavone intake are associated with reduced risk of ovarian cancer in southeast china. *Nutr Cancer*. 49:125-30.
- Zhang, Q., X. Tang, Q.Y. Lu, Z.F. Zhang, J. Brown, and A.D. Le. 2005. Resveratrol inhibits hypoxia-induced accumulation of hypoxia-inducible factor-1alpha and VEGF expression in human tongue squamous cell carcinoma and hepatoma cells. *Mol Cancer Ther*. 4:1465-74.
- Zhang, S., H.J. Cao, F.B. Davis, H.Y. Tang, P.J. Davis, and H.Y. Lin. 2004. Oestrogen inhibits resveratrol-induced post-translational modification of p53 and apoptosis in breast cancer cells. *Br J Cancer*. 91:178-85.
- Zhao, J.Y., M. Ikeguchi, T. Eckersberg, and M.T. Kuo. 1993. Modulation of multidrug resistance gene expression by dexamethasone in cultured hepatoma cells. *Endocrinology*. 133:521-8.
- Zheng, W., T.J. Doyle, L.H. Kushi, T.A. Sellers, C.P. Hong, and A.R. Folsom. 1996. Tea consumption and cancer incidence in a prospective cohort study of postmenopausal women. *Am J Epidemiol*. 144:175-82.
- Zhong, Z., M. Froh, M. Lehnert, R. Schoonhoven, L. Yang, H. Lind, J.J. Lemasters, and R.G. Thurman. 2003. Polyphenols from *Camellia sinensis* attenuate experimental cholestasis-induced liver fibrosis in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 285:G1004-13.
- Zhou, H.B., J.J. Chen, W.X. Wang, J.T. Cai, and Q. Du. 2005. Anticancer activity of resveratrol on implanted human primary gastric carcinoma cells in nude mice. *World J Gastroenterol*. 11:280-4.
- Zhou, J., L.F. Wang, J.Y. Wang, and N. Tang. 2001. Synthesis, characterization, antioxidative and antitumor activities of solid quercetin rare earth(III) complexes. *J Inorg Biochem*. 83:41-8.
- Zhu, B.T. 2004. CNS dopamine oxidation and catechol-O-methyltransferase: importance in the etiology, pharmacotherapy, and dietary prevention of Parkinson's disease. *Int J Mol Med*. 13:343-53.
- Zhu, B.T., E.L. Ezell, and J.G. Liehr. 1994. Catechol-O-methyltransferase-catalyzed rapid O-methylation of mutagenic flavonoids. Metabolic inactivation as a possible reason for their lack of carcinogenicity in vivo. *J Biol Chem*. 269:292-9.
- Zhu, Y., C.D. Rice, Y. Pang, M. Pace, and P. Thomas. 2003b. Cloning, expression, and characterization of a membrane progesterin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:2231-6.
- Zhu, Y., J. Bond, and P. Thomas. 2003a. Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progesterin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:2237-42.
- Zsembery, A., T. Thalhammer, and J. Graf. 2000. Bile Formation: a Concerted Action of Membrane Transporters in Hepatocytes and Cholangiocytes. *News Physiol Sci*. 15:6-11.
- Zsila, F., Z. Bikadi, and M. Simonyi. 2004. Circular dichroism spectroscopic studies reveal pH dependent binding of curcumin in the minor groove of natural and synthetic nucleic acids. *Org Biomol Chem*. 2:2902-10.

