

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di ricerca in Biologia e Patologia Molecolare

Ciclo XXV

ATTIVITA' CHEMIOPROTETTIVA DI ESTRATTI DI SPINACIO
(*Spinacia oleracea* L.)

Coordinatore:

Chiar.ma Prof.ssa Valeria Dall'Asta

Tutori:

Chiar.mo Prof. Ovidio Bussolati

Chiar.ma Prof.ssa Annamaria Buschini

Dottorando: Dott. Francesco Milano

Sommario

1. Introduzione	6
1.1. Alimentazione e salute	6
1.2 Genomica nutrizionale	7
1.3 Carcinogenesi	8
1.4 Chemioprevenzione.....	8
1.4.1 Prodotti naturali nei processi chemiopreventivi	9
1.5 Il cancro coloretale (CRC)	10
1.6 Ruolo fisiologico e patologico dei radicali liberi	13
1.7 Il duplice ruolo della vitamina C	22
1.8 Un vegetale ricco di antiossidanti: lo spinacio (Spinacia oleracea L.)	25
2. Scopo della ricerca.....	27
3. Materiali e metodi	28
3.1 Colture cellulari	28
3.1.1 Procedura di mantenimento delle cellule	29
3.2 Campioni vegetali	29
3.2.1 Trattamento e raccolta dei campioni	29
3.3 Preparazione degli estratti liofilizzati e del succo	31
3.4 Analisi della composizione chimica mediante High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy (HPLC-MS)	33
3.4.1 Tipi di estratti sottoposti all'analisi chimica mediante HPLC-MS	33
3.5 Test di proliferazione cellulare (MTS).....	34
3.6 Test di bioluminescenza per la vitalità cellulare.....	34
3.7 Saggio di vitalità cellulare con Trypan blue	35
3.8 Comet assay.....	36
3.8.1 Analisi statistica	38
3.9 Tunel assay	38

3.10 Protocollo di isolamento di cellule epiteliali di colon murino	39
4. Risultati	42
4.1 Livelli di ossigeno nel sistema sperimentale per l'induzione di ipossia nelle piante di spinacio	42
4.2 Definizione della composizione chimica degli estratti mediante analisi HPLC-MS	43
4.3 Valutazione dell'attività antiproliferativa	46
4.4 Valutazione dell'attività genotossica e antiossidante	60
4.5 Valutazione dell'apoptosi mediante Tunel assay	73
4.6 Isolamento di cellule epiteliali di colon murino	74
5. Discussione	77
6. Conclusioni	81
7. Report dell'attività di ricerca svolta presso il laboratorio MILPAT- UFR-de Medecine – Caen France	83
7.1. Introduction	83
7.2. Material and Methods	83
7.2.1. Cell lines	83
7.2.2. Drug	84
7.2.3. Trypan blue exclusion cell viability assay	84
7.2.4. MTS assay	84
7.2.5. Analysis of apoptosis with flow cytometry	85
7.2.6. Western Blot	86
7.3. Result and Discussion	87
7.3.1. DNZep induces cell death in some MM cell lines assayed by Trypan blue exclusion cell viability assay	87
7.3.2. DNZep decreases the metabolic activity of some MM cells	88
7.3.3. Analysis of cell cycle and apoptosis with flow cytometry	89
7.3.4. Western Blot	95
7.4. Conclusion	98
Ringraziamenti	101

Bibliografia..... 102

ABSTRACT

It is well known that Spinach (*Spinacia oleracea* L.) has a variety of biological functions, such as antitumor and chemoprotective activity, but little is known about the modulation of secondary metabolites induction by abiotic stress (i.e. hypoxia) and its correlation to human health. In this study I demonstrate that 24 h hypoxia alter the production of secondary metabolites in spinach. In vitro studies on human colon adenocarcinoma HT-29 cell line of different spinach aqueous extracts. show different antioxidant and antiproliferative activities, depending on the concentrations of antioxidants present in each extract. When the antioxidant content increased over a defined threshold the antioxidant activity is reduced or lost, likely due to a prooxidant activity of such molecules in the biological system. Ultimately, spinach provides a valuable contribution to the field of chemoprevention and prevention of chronic degenerative diseases due to its antioxidant and antiproliferative properties.

Furthermore, it is presented the paper in preparation resulting from my period of research in France at the UFR de Médecine, Caen (France) on the study of the biological activity of a new demethylating compound.

ABSTRACT

È risaputo che lo Spinacio (*Spinacia oleracea* L.) ha diverse proprietà biologiche e la sua assunzione può risultare protettiva contro alcuni tipi di tumore (attività chemioprotettiva). Scarse sono però le conoscenze circa l'induzione di metaboliti secondari in risposta a stress abiotici (come l'ipossia) ed eventuali riflessi di questi sulla salute umana. In questo studio viene dimostrato come 24 ore di coltivazione in ipossia inducano la produzione di metaboliti secondari in spinacio. Studi in vitro, sulla linea cellulare di adenocarcinoma del colon umano HT-29 trattata con diversi estratti acquosi di spinacio, mostrano attività antiossidante e antiproliferativa differenti, a seconda delle concentrazioni di antiossidanti presenti in ogni estratto. Quando il contenuto antiossidante aumenta oltre una soglia definita, l'attività antiossidante è ridotta o persa, probabilmente a causa di una attività pro-ossidante di tali molecole nel sistema biologico. Le proprietà antiossidanti e antiproliferative evidenziate negli estratti di spinacio mostrano l'importanza di questo vegetale nella dieta, in particolare per il contributo che può fornire nel campo della chemioprevenzione e prevenzione delle malattie cronico degenerative. Viene presentato inoltre, il manoscritto in preparazione frutto della ricerca svolta durante il mio periodo di 4 mesi in Francia presso la UFR de Médecine, Caen (Francia) sullo studio dell'attività biologica di un nuovo composto demetilante.

1. Introduzione

1.1. Alimentazione e salute

L'alimentazione dell'uomo ha subito diversi cambiamenti nel corso della storia legata a scoperte, disponibilità di risorse e al contesto socio-culturale dell'epoca. L'uomo preistorico mancava di conoscenze scientifiche, lasciava che fosse il suo istinto a guidarlo nella scelta di un determinato alimento, piuttosto che un altro, in base a quello che la natura poteva offrirgli.

L'uomo moderno, invece, ha perso la sua parte istintuale e nonostante la mole di conoscenze scientifiche prodotte nell'ambito della nutrizione, oggi tende a mangiare alimenti raffinati e soprattutto tende ad assumere più calorie del necessario e a svolgere poca attività fisica. La riduzione del carico calorico aumenta sperimentalmente l'aspettativa di vita di diverse specie animali, mentre nell'uomo questo non è stato possibile osservarlo per limitazioni etiche sulle ricerche scientifiche, tuttavia studi di riduzione calorica condotti sull'uomo hanno evidenziato modifiche favorevoli su biomarkers della funzione cardiovascolare e del controllo della glicemia, che probabilmente correlano con la qualità della vita e la longevità [Trepanowski et al., 2011]. Oltre ad un discorso sulla quantità calorica, bisogna distinguere anche la qualità degli alimenti che apportano le calorie necessarie al metabolismo corporeo. I cibi raffinati, infatti, apportano per la maggior parte calorie, mentre i cibi meno raffinati e quindi più naturali, apportano fibre, vitamine e minerali utili al mantenimento del benessere psicofisico. Attualmente vi sono molte diete, ma non tutte sono adeguate a mantenere un buono stato di salute; per tale motivo molti studi hanno definito schemi alimentari a priori o a posteriori per valutare l'interazione e la funzione che la combinazione di cibo e nutrienti possono avere sulla salute umana, visto che singoli nutrienti o singoli cibi non possono spiegare da soli l'eziopatogenesi di malattie legate alla nutrizione [Kant, 2004; Van Dam, 2005].

Molte malattie croniche, come le malattie cardiovascolari, il diabete mellito e alcuni tumori (cancro al seno, cancro al colon e altri), sono stati associati con l'assunzione combinata di certi nutrienti. Per esempio, un'alta assunzione di carne rossa non è solamente associata ad un alto apporto di acidi grassi saturi (SFA) e colesterolo, ma anche ad un'alta ingestione di nitriti, o prodotti dietetici della glicossidazione, la cui azione congiunta può essere coinvolta nell'eziologia e nella progressione del diabete [Peppia et al., 2002]. Se queste interazioni non vengono prese in considerazione, quando si analizza il contributo di ogni nutriente al rischio di malattia, si possono trarre conclusioni non corrette sul ruolo degli acidi grassi sulla salute.

Alcuni modelli di comportamento alimentare potenzialmente salutari sono stati definiti dalla valutazione di schemi dietetici nella popolazione ed è emerso che modelli diversi hanno un profilo comune nella composizione della dieta: un alto apporto di frutta, verdura, pesce, legumi e cereali integrali [Hu 2002; Moeller et al., 2007]. La dieta Mediterranea, un modello di alimentazione sana, riportata in molti indici dietetici, fornisce un'indicazione sui cibi e i nutrienti che contribuiscono positivamente alla salute dell'individuo [Bach et al., 2006].

1.2 Genomica nutrizionale

Nell'ottica di personalizzare sempre di più la dieta per aumentarne i benefici negli ultimi anni numerose ricerche si sono svolte nell'ambito della genomica nutrizionale. Per genomica nutrizionale si intende lo studio delle interazioni tra i geni e fattori ambientali, specificamente con le componenti bioattive del cibo. Questa disciplina emergente descrive i concetti fondamentali che sottostanno alla terapia nutrizionale per la gestione e la prevenzione delle malattie. Il materiale genetico di ogni persona (DNA) contiene le informazioni essenziali per lo sviluppo e le funzioni dell'organismo. I geni sono unità di informazione formati da DNA che vengono tradotti nella miriade di proteine che regolano il lavoro delle cellule dell'organismo. La genomica, è un nuovo termine per indicare lo studio non solo dell'ereditarietà dei geni e di come questi funzionano, campo di cui si occupa la genetica classica, ma studia anche fenomeni più globali e complessi, come gli effetti di variazioni specifiche in un gene sulle funzioni di un organismo e il suo adattamento all'ambiente e inoltre l'influenza di fattori ambientali sull'espressione genica. La nutrizione è uno dei fattori maggiori in questa interazione tra i geni e l'ambiente in cui un organismo deve funzionare. La genomica nutrizionale è il campo di studio che concerne queste interazioni complesse tra i geni e i fattori ambientali. Ci sono due sottocategorie maggiori della genomica nutrizionale: la nutrigenetica e la nutrigenomica. La nutrigenetica si occupa degli effetti delle variazioni geniche (chiamate anche varianti geniche) sulle funzioni dell'organismo, specialmente sull'abilità di digerire, assorbire, e utilizzare il cibo per sostenere la vita. Di contro, la nutrigenomica, si occupa dell'interazione delle componenti attive contenute nel cibo sulla differente espressione e funzione dei geni [Gropper et al., 2009].

Un'approfondita conoscenza dei meccanismi coinvolti nell'interazione del cibo con il genotipo determina le basi per un intervento nutrizionale personalizzato. Per esempio, sapendo che gli acidi grassi omega-3 riducono l'espressione di geni pro-infiammatori coinvolti nell'infiammazione

cronica. Le conoscenze in merito all'integrazione della dieta con acidi grassi omega-3 forniscono un razionale logico per sviluppare diete e consigli opportuni per persone il cui genotipo espone ad un aumentato rischio di sviluppare infiammazione cronica [De Caterina et al., 2006].

1.3 Carcinogenesi

L'attuale comprensione della tumorigenesi suggerisce che il cancro si sviluppi come una serie di alterazioni genetiche ed epigenetiche che si accumulano nel tempo, culminando in un clone di cellule che differiscono dalla popolazione di origine in termini di identità e differenziazione cellulare, controllo della crescita e nella relazione con il loro ambiente. La carcinogenesi è categorizzata sperimentalmente in tre grandi gruppi: iniziazione, promozione e progressione tumorale [Balmain et al., 1988; Yuspa et al., 1996]. Il cancro risulta da una combinazione di fattori ereditari e dall'esposizione ambientale a fattori che possano danneggiare la crescita e l'organizzazione cellulare/tissutale, risultando nelle caratteristiche cardinali del cancro, come descritto da Hanahan e Weinberg [Hanahan e Weinberg, 2000-2011]. Tra le caratteristiche principali si ritrovano l'indipendenza dai segnali di crescita, l'insensibilità ai segnali di arresto della crescita, l'evasione dai programmi apoptotici, la capacità di replicazione illimitata, la neoangiogenesi, l'invasione dei tessuti e la capacità di dare metastasi, la deregolazione energetica e metabolica, l'evasione dal normale controllo immunologico, l'instabilità genomica progressiva e lo sviluppo dell'infiammazione. Fattori ereditari o della linea germinale includono difetti maggiori in oncogeni (come ad esempio ras) o geni oncosoppressori (come ad esempio APC, BRCA1, BRCA2) o differenze più sottili nel codice genetico o nella sua espressione come riflesso nei polimorfismi a singolo nucleotide (Single Nucleotide Polymorphisms, SNP) entro aree chiave del genoma. Sia le mutazioni ereditate sia quelle risultanti dall'esposizione ambientale hanno il potenziale per poter essere usate come marker molecolari della progressione tumorale e come bersagli per la chemioprevenzione.

1.4 Chemioprevenzione

La chemioprevenzione del cancro è l'inibizione o l'inversione della carcinogenesi prima dell'invasione della membrana basale mediante la somministrazione di principi attivi, contenuti in alimenti o sottoforma di farmaci, dotati di attività in grado di contrastare la mutagenesi/cancerogenesi [Keum et al., 2004].

Gli scopi sono di prevenire incidenti precursori del cancro, regredire precursori prevalenti, e/o sopprimere precursori ricorrenti (chemioprevenzione primaria, secondaria e terziaria rispettivamente) [Sporn et al, 1976; Kellof et al., 1995]. Nella ricerca nell'ambito della chemioprevenzione sono numerosi i fattori da prendere in considerazione: in primo luogo, se la scelta dell'agente chemioprotettivo è appropriata (meccanismo plausibile, dose definita, via e durata d'azione), se i biomarker che possono essere valutati giustificano i meccanismi di efficacia o tossicità osservata clinicamente; la qualità della coorte e se questa può giovare dei benefici di un agente effettivo ed, infine, se il trial è stato ben definito in termini di durata del trattamento, osservazione e metodi per verificare effetti immediati e ritardati e scelta di opportuni endpoints raggiungibili e significativi per dare una risposta esaustiva dei benefici riscontrati dal paziente [Wu et al., 2011].

1.4.1 Prodotti naturali nei processi chemiopreventivi

Negli ultimi anni è emerso che i prodotti naturali e i costituenti della dieta con un potenziale chemiopreventivo hanno un impatto sulla metilazione del DNA, sulle modificazioni istoniche e sull'espressione di microRNA [Gerhauser, 2012]. Anche l'azione antiossidante può essere importante, in quanto molti antiossidanti hanno dimostrato di modificare la carcinogenesi, e, di norma, ne inibiscono la fase iniziale, riducendo l'interazione tra cancerogeno e DNA [Guo et al., 2007].

Il folato e le vitamine del gruppo B, ad esempio, hanno un potenziale impatto sull'ipometilazione del DNA. Influenzano il cosiddetto "one-carbon metabolism" che fornisce i gruppi metilici per le reazioni di metilazione. Il folato è un importante fattore per il mantenimento della biosintesi e della riparazione del DNA, e la sua carenza determina una globale ipometilazione del DNA, instabilità genomica e danno cromosomico. E' un micronutriente essenziale che deve essere assunto da fonti alimentari, come agrumi, vegetali a foglia verde, cereali integrali e fagioli secchi. L'abuso di alcool è spesso associato alla deficienza di acido folico. Studi epidemiologici hanno indicato che bassi livelli di folato sono associati con un aumentato rischio di cancro coloretale, mammario, ovarico, del cervello, del pancreas, polmonare e della cervice [Huang, 2002; Lamprecht et al., 2003; Duthie, 2011]. Conseguentemente, la relazione tra il livello di folato, la metilazione del DNA e il rischio di sviluppare il cancro, è stata analizzata in numerosi modelli animali e in studi sull'uomo. Globalmente, i risultati sono inconcludenti e dipendono da numerosi parametri, per esempio la dose e il tempo di integrazione, la gravità della carenza di folato e lo stato di salute [Lamprecht et al., 2003; Kim, 2005; Johnson e Belshaw, 2008; Duthie, 2011]. Un'assunzione eccessiva di acido folico

di sintesi (derivante da integratori ad alto dosaggio o da cibi fortificati) può anche aumentare il rischio di cancro, accelerando la crescita di lesioni precancerose [Duthie, 2011]. Altri dati clinici confermano una relazione dose-risposta non lineare per l'acido folico, ma in contrasto con i dati epidemiologici precedenti. Uno studio caso controllo di pazienti con cancro coloretale ha mostrato che la curva che rappresenta il rischio di sviluppare la patologia aveva un andamento a campana in relazione ai livelli di acido folico, con rischio diminuito nel quintile più basso e più alto [Van Guelpen, 2006]. In questo caso i livelli di folato sono stati ottenuti da campioni di sangue dei partecipanti a digiuno, senza alcuna modificazione della dieta. In alcuni studi, i composti fitochimici sono stati somministrati a dosi normalmente presenti in una dieta bilanciata come costituenti del cibo. L'acido folico e la genisteina, ad esempio, sono stati somministrati sottoforma di spinaci [Prinz-Langenohl et al., 1999] e di panini alla soia [McMichael-Phillips, 1998], rispettivamente. Questi esperimenti hanno fornito rilevanti informazioni farmacocinetiche vista la dose e il modo di somministrazione, ma non si hanno avuto rilevanti informazioni sull'efficacia, visto che non si hanno avuto sostanziali effetti sui biomarkers. Studi di questo tipo possono essere di difficile interpretazione per la presenza di numerosi agenti con potenziale attività farmacologica e della matrice del cibo, che può influenzarne l'assorbimento e la farmacocinetica. Attribuire l'efficacia chemiopreventiva ad un singolo componente di un cibo è dunque potenzialmente più complesso che per un singolo agente purificato [Scott et al., 2009]. Da tutte queste considerazioni, dunque, l'integrazione di folato non può essere generalmente raccomandata e le carenze devono essere prevenute per mezzo della dieta.

I pathways che sono rilevanti per la chemioprevenzione, e che generalmente sono deregolati con meccanismi epigenetici nelle cellule cancerose, includono la detossificazione dei farmaci, la regolazione del ciclo cellulare, l'induzione di apoptosi, i meccanismi di riparazione del DNA, l'infiammazione tumore-associata, la segnalazione cellulare che promuove la crescita cellulare e la differenziazione cellulare [Gerhauser, 2012].

1.5 Il cancro coloretale (CRC)

Il cancro coloretale (CRC) è una patologia tumorale inizialmente considerata imputabile solo a mutazioni genetiche, ma che attualmente è stata rivista in un'ottica più ampia e considerata una neoplasia complessa interessata dal coinvolgimento di alterazioni epigenetiche. E' stata proposta un'equivalenza funzionale dei meccanismi genetici ed epigenetici nell'iniziazione e progressione del CRC.

Una caratteristica del CRC è la sua eterogeneità patogenetica ottenuta attraverso almeno 3 differenti pathways: uno tradizionale (costituito dalla sequenza adenoma-carcinoma), uno alternativo, e uno di più recente scoperta chiamato pathway serrato. Mentre il meccanismo alternativo risulta più eterogeneo e meno caratterizzato, i meccanismi tradizionale e serrato appaiono più omogenei e meglio caratterizzati [Pancione et al., 2012].

Globalmente CRC è il terzo tumore più diagnosticato nei maschi (dopo il tumore ai polmoni e alla prostata) e il secondo nelle femmine (assieme al tumore della cervice dell'utero e dopo il cancro al seno). Solo nel 2008 sono stati oltre 1,2 milioni i nuovi casi diagnosticati con 608.700 morti stimate. Il tasso d'incidenza nella popolazione è sostanzialmente più alto nei maschi che nelle femmine. L'incidenza più alta si ha in Australia e in Nuova Zelanda, Europa e Nord America, mentre l'incidenza più bassa è stata riscontrata in Africa e in Asia Sud-Centrale [Jemal et al., 2011]. Queste differenze geografiche sembrano imputabili alle differenze nella dieta e all'esposizione ambientale imposte su di un background di suscettibilità geneticamente determinata.

L'età è il maggiore fattore di rischio per il CRC sporadico; il tasso di incidenza inizia a crescere significativamente nel gruppo di età compreso tra 40 e 50 e aumenta in ogni decade seguente [Eddy, 1990]. Dati più recenti provenienti dai database SEER degli Stati Uniti e di altri registri occidentali dei tumori suggeriscono che i tassi di incidenza aumentano nel gruppo di età compreso tra 40-44 anni, mentre decrescono nei gruppi di età più anziani [Davis et al., 2011].

I fattori genetici e ambientali possono aumentare la possibilità di sviluppare il cancro coloretale [Chan et al., 2010]. Sebbene la suscettibilità ereditata rappresenti l'aumento più significativo del rischio, la maggior parte dei CRCs sono sporadici piuttosto che familiari. Questi fattori di rischio si possono suddividere in quelli che conferiscono un alto rischio sufficiente ad alterare le raccomandazioni per CRC screening, e quelli che non alterano le raccomandazioni per lo screening perché si ritiene che conferiscano un bassa o incerta importanza di rischio. Le raccomandazioni per CRC screening sono modificate per coloro che hanno familiarità per sindromi di cancro al colon ereditario e in pazienti con malattie infiammatorie dell'intestino [Ahnen et al., 2012].

Le conoscenze attuali sulla patogenesi molecolare del CRC hanno portato all'identificazione di numerose patologie genetiche specifiche, molte delle quali vengono ereditate in modo autosomico dominante e associate con un rischio molto alto di sviluppare il cancro al colon. La poliposi adenomatosa familiare (familial adenomatous polyposis, FAP) e la sindrome di Lynch (hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC)) sono le più comuni delle sindromi familiari di cancro al

colon, ma assieme queste due patologie rappresentano solo il 5% dei casi di CRC [Lynch et al., 1993; Ponz de Leon et al., 1993; Burt et al., 1995].

Dallo studio globale integrato della caratterizzazione molecolare del cancro al colon e al retto eseguito dal Cancer Genome Atlas project [The Cancer Genome Atlas Network, 2012], che ha condotto un'approfondita analisi del genoma di 276 tumori, sono state ricavate importanti informazioni. Dall'analisi della sequenza dell'esoma, eseguita su 224 tumori e i corrispettivi controlli, è emersa una variabilità considerevole del tasso di mutazione tra i campioni. Il tasso di mutazione riscontrato è compreso nel range di <1 per 10^6 basi e di >100 per 10^6 basi e i tumori sono stati così suddivisi in casi con poche mutazioni (non ipermutati 84%) e in casi con molte mutazioni (ipermutati 16%). Per comprendere le basi di questa differenza nel tasso di mutazioni è stata valutata l'instabilità dei microsatelliti (MSI) e le mutazioni nei geni del DNA mismatch-repair MLH1, MLH3, MSH2, MSH3, MSH6 e PMS2. Il 77% dei tumori ipermetilati hanno un'elevata instabilità dei microsatelliti e globalmente mutazione nei geni del DNA mismatch-repair. Dall'analisi delle mutazioni geniche dei tumori ipermetilati e non ipermetilati, sono stati riscontrati 32 geni somatici ricorrentemente mutati, 15 e 17 nei tumori ipermutati e non ipermutati, rispettivamente. Il profilo mutazionale è differente nelle due tipologie, ma i geni più frequentemente mutati in entrambi i casi come APC, BRAF, TP53 e altri geni, tutti implicati nella trasduzione del segnale e coinvolti nella regolazione della proliferazione cellulare. Lo studio ha inoltre analizzato eventuali differenze nel profilo genetico dei tumori del colon e del retto. Sebbene i pazienti con cancro al colon o al retto siano trattati in maniera differente e sebbene l'epidemiologia evidenzi delle differenze tra i due tipi di tumore, l'analisi integrativa dello status MSI, delle alterazioni del numero di copie somatiche (SCNAs), lo status CpG Island Methylator Phenotype (CIMP) e il profilo di espressione genica di 132 tumori al colon e 92 al retto non ha evidenziato differenze sostanziali dal punto di vista del profilo genetico di queste due tipologie di tumori. Questa analisi globale integrata di 224 tumori coloretali e controlli normali apporta un notevole contributo nell'approfondimento della biologia dei CRC, identificando inoltre potenziali targets terapeutici. Oltre il 94% dei tumori ha una mutazione in uno o più membri del pathway di segnalazione cellulare WNT, soprattutto in APC. Tuttavia sono state riscontrate alcune differenze tra i tumori provenienti dal colon ascendente e da altri siti. L'ipermetilazione è più frequente nel colon destro, e tre quarti dei campioni ipermutati sono derivati dallo stesso sito, sebbene non tutti presentassero MSI. Dal momento che il tasso di sopravvivenza dei pazienti con tumori con alta instabilità dei microsatelliti è migliore e che questi tumori sono ipermutati, il tasso di mutazione potrebbe essere

un valido indicatore prognostico. Il sequenziamento dell'intero esoma e l'analisi integrativa dei dati genomici hanno apportato ulteriori informazioni nell'alterazione dei pathways cellulari nel cancro coloretale. Gli autori hanno trovato che il 93% dei casi non ipermutati e il 97% dei casi ipermutati hanno una disregolazione del pathway di segnalazione cellulare WNT. Nuove scoperte includono mutazioni ricorrenti in FAM123B, ARID1A e SOX9 e alti livelli di espressione del gene del recettore che lega WNT FZD10. Gli autori dichiarano che SOX9 non è mai stato trovato prima frequentemente mutato in nessun tipo di cancro umano [The Cancer Genome Atlas Network, 2012]. SOX9 è trascrizionalmente represso dalla segnalazione WNT e la proteina SOX9 è stata dimostrato che facilita la degradazione della β -catenina [Topol et al., 2009]. ARID1A è frequentemente mutato nei tumori ginecologici e ha mostrato di sopprimere la trascrizione di MYC [Nagl et al., 2006]. L'attivazione della via di segnalazione WNT e l'inattivazione della via di segnalazione TGF- β ha come risultato l'attivazione di MYC che riveste un ruolo critico nei CRC. The Cancer Genome Atlas project ha messo in evidenza diversi approcci terapeutici ai CRC, tra i quali inibitori della via di segnalazione WNT e inibitori della β -catenina che si sono dimostrati promettenti [Chen et al., 2009; Sack et al., 2011]. Sono state identificate, inoltre, numerose proteine nei pathways RTK-RAS e PI3K, incluse IGF2, IGFR, ERBB2, MEK, AKT e MTOR che potrebbero essere target per l'inibizione.

Oltre ai fattori di rischio, esistono dei fattori protettivi che determinano una diminuzione del rischio di sviluppare carcinomi coloretali [Jänne and Mayer, 2000]. Tra questi troviamo lo svolgimento regolare di attività fisica, la composizione della dieta, nonché l'utilizzo di aspirina e farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS) e la terapia ormonale sostitutiva nelle donne dopo la menopausa.

1.6 Ruolo fisiologico e patologico dei radicali liberi

Sono passati circa 50 anni da quando Denham Harman suggerì che i radicali liberi prodotti durante la respirazione aerobia causano un danno cumulativo dovuto all'ossigeno, che porta all'invecchiamento e alla morte [Harman, 1956].

L'ossigeno è una molecola essenziale per tutti gli organismi aerobi, tuttavia gioca un duplice ruolo. Sebbene l'ossigeno sia indispensabile per tutte le cellule per la produzione di energia (ATP), è spesso trasformato in forme altamente reattive: Reactive Oxygen Species (ROS), che sono molto tossiche per le cellule [Arrigo, 1983; Hadad 1989].

Approssimativamente, il 2% dell'ossigeno ridotto dai mitocondri forma l'anione superossido ($O_2^{\cdot -}$) o il prodotto di dismutazione H_2O_2 . L'anione superossido e il perossido di idrogeno reagiscono con

ioni metallici (reazioni Heiber-Weiss e Fenton) promuovendo l'ulteriore formazione di specie radicali e, particolarmente, la generazione di radicali idrossilici. Il radicale idrossile reagisce con tutte le componenti della cellula, incluse le membrane lipidiche, DNA e proteine [Halliwell e Gutteridge, 1989].

L'ossido nitrico (NO) ha un elettrone spaiato ed è dunque una specie radicalica. E' una molecola lipofila con una breve emivita, generata dalla L-arginina dall'enzima NO sintetasi (NOS). NO è fisiologicamente implicato nella vasodilatazione, nella trasmissione nervosa, nell'inibizione dell'aggregazione piastrinica, nella difesa immunitaria e nella segnalazione intracellulare. Tuttavia NO reagisce con $O_2^{\cdot -}$ per formare lo ione perossinitrito ($ONOO^-$), che è un potente ossidante. L'attività biologica del NO è correlata alla produzione di numerosi intermedi reattivi, ma molte di queste specie reattive dell'azoto (*Reactive Nitrogen Species* (RNS)) sono in grado di danneggiare il DNA o di ostacolare la riparazione [Poderoso et al., 1996]. Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) e dell'azoto (RNS) (Tab. 1.6.1) sono prodotti del normale metabolismo cellulare e svolgono un duplice ruolo, benefico e deleterio, a seconda della loro concentrazione e localizzazione nell'organismo. Gli effetti positivi dei ROS si osservano a concentrazione bassa o moderata: queste specie sono inoltre coinvolte nella difesa nei confronti di agenti infettivi e nella trasduzione di segnali cellulari (Valko et al., 2007, Halliwell 2012).

Molte malattie sono causate dall'eccesso di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Dal momento che si è realizzato che i ROS possiedono una tossicità a livello biologico in tutti i distretti dell'organismo e preso atto della facilità con cui vengono prodotti (specialmente in seguito ad infezioni da parte di batteri), molte malattie cronico-degenerative come i tumori, patologie cardiovascolari e demenza sembrano poter essere associate ai ROS. Sono considerati infatti uno dei fattori coinvolti nel processo di invecchiamento, inoltre se non esistesse un efficiente sistema biologico antiossidante la vita stessa come la intendiamo non potrebbe esistere. I ROS sono formati spontaneamente in molti processi biologici e possono essere considerati indicatori d'inefficienza biologica, poiché sono generati dalla perdita di elettroni dalle membrane mitocondriali e dal malfunzionamento delle reazioni accoppiate; l'elettrone rilasciato riduce l'ossigeno molecolare, prima ad anione superossido, poi a perossido (Fig.1.6.1).

La perdita di elettroni si osserva continuamente nelle membrane mitocondriali e nel reticolo endoplasmatico; i citocromi P450, specialmente CYP2E1, agiscono principalmente da generatori di ROS (per ossidare specie chimiche come il benzene e l'etanolo). I ROS vengono prodotti dai leucociti attivati nel cosiddetto "burst ossidativo" per proteggere l'organismo dai batteri [Parke and Parke, 1995]. Altri meccanismi di produzione dei ROS includono la riduzione dell'ossigeno nei

tessuti da parte del ferro ed altri sistemi redox che agiscono tramite metalli, il ciclo redox dei chinoni e come reazione collaterale nella conversione di PGG2 a PGH2 nella biosintesi delle prostaglandine [Parke and Parke, 1995]. I ROS sono mediatori dell'inflammatione e attraverso la loro interazione con piastrine, neutrofili, macrofagi ed altre cellule, possono comportare la sintesi degli eicosanoidi, l'attivazione e il rilascio di varie citochine, propagando il processo infiammatorio da un organo (ad es. fegato) ad un altro (ad es. rene, polmone, etc.). Questo dà luogo allo stress ossidativo dei tessuti e a insufficienza multiorgano [Parke et Parke, 1995].

L'inflammatione ROS-mediata è correlata alla patogenesi delle malattie infettive [Welbourn et Young, 1992] ed autoimmuni come l'artrite reumatoide [Parke et al., 1991]. Alcuni studi hanno anche implicato il coinvolgimento dei ROS nel cancro [Witz,1991; Ames et al., 1993], aterosclerosi [Halliwell, 1994], epatiti [Elliot et Strunin, 1993], AIDS [Baruchel et Wanberg, 1992], sindrome di Alzheimer [Evans, 1993], insufficienza multiorgano [Fry 1992, Parke et Parke, 1995] e sindrome da distress respiratorio (ARDS) [McClean et Byrick, 1993].

Tabella 1.6.1. Specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto.

<i>ROS</i>			<i>RNS</i>		
$O_2^{\bullet-}$	1O_2	OH^{\bullet}	NO^{\bullet}	$ONOO^-$	$^{\bullet}NO_2$
H_2O_2	HOO^{\bullet}	ROO^{\bullet}	NO^-	NO^+	NO_2^+
$HBrO$	$HClO$	O_3	HNO_2	N_2O_4	N_2O_3

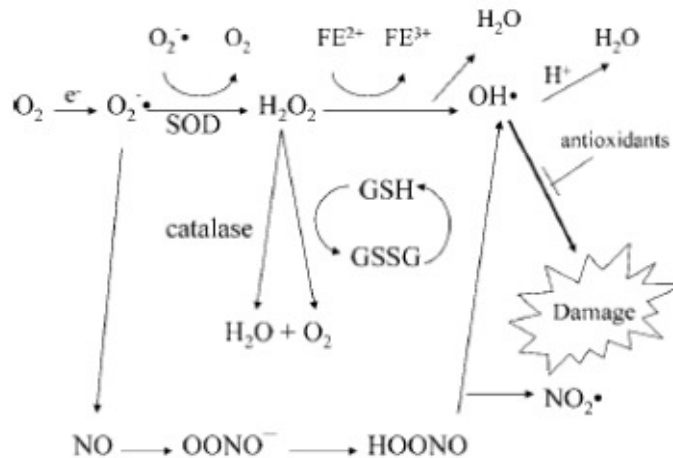


Figura 1.6.1 - Formazione e detossificazione di specie reattive dell'ossigeno (Tratto da Goodlett et al., 2005).

I meccanismi molecolari della tossicità mediata da ROS e delle malattie ROS-mediate prevedono:

1. ossidazione dei composti tiolici a disolfidi
2. perdita di glutatione ridotto (GSH) a livello tissutale
3. diminuzione della produzione di energia (ATP, NADH, NADPH)
4. inibizione del trasporto del Ca²⁺ e della omeostasi degli elettroliti
5. ossidazione dei citocromi
6. danno (scissura) al filamento del DNA
7. iniziazione e promozione di mutazioni e carcinogenesi [Parke, 1994].

La difesa biologica contro i ROS è costituita da un insieme di composti antiossidanti tra i quali enzimi antiossidanti endogeni, numerosi fattori endogeni antiossidanti quali il GSH e altri tioli tissutali, eme-proteine, coenzima Q, bilirubina e urati, ed una varietà di fattori nutrizionali, principalmente le vitamine antiossidanti (Tab. 1.6.2).

Tabella 1.6.2 - Difesa antiossidante (riadattata da Parke DW., 1999)

Fattori endogeni	Enzimi endogeni	Fattori nutrizionali
Glutatione e altri tioli	GSH riduttasi	Acido ascorbico (vitamina C)
Eme-proteine	GSH transferasi	Tocoferoli (vitamina E)
Coenzima Q	GSH Perossidasi (GPX e PHGPX)	β-Carotene e retinoidi
Bilirubina	Superossido dismutasi	Selenio (componente essenziale della perossidasi)
Urati	Catalasi	Metionina

Il glutatione (GSH) è un tripeptide formato da glutammato, cisteina e glicina e insieme ad altri tioli costituisce un importante bastione contro lo stress ossidativo e il danno tissutale [Liu et al., 1993], sebbene questi vengano mantenuti allo stato ridotto dall'azione concertata dall'ascorbato, dei tocoferoli e da altri fattori riducenti come la bilirubina e gli urati. La cascata degli enzimi endogeni antiossidanti richiede energia per mantenere l'organismo nello stato ridotto. GSH riduttasi mantiene il glutatione tissutale allo stato ridotto (GSH) alle spese del NADP e FAD ridotti (Fig. 1.6.2). Le GSH perossidasi riducono i perossidi solubili (GSHperossidasi, GPX) e i perossidi legati alle membrane (fosfolipide idroperossidasi GSHperossidasi, PHGPX) ai corrispondenti alcoli, alle spese del GSH che è ossidato a GSSG.

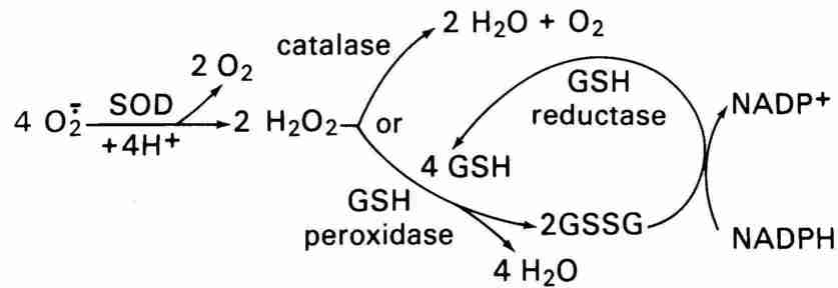


Figura 1.6.2 - Coinvolgimento degli enzimi detossificanti nella riduzione di specie radicaliche. SOD: superossidodismutasi; GSH: glutatione ridotto; GSSG: glutatione ossidato. (Tratto da Proctor e Reynolds, 1984).

L'enzima superossido dismutasi, catalizza la conversione dell'anione superossido radicalico a perossido e ossigeno e l'enzima catalasi converte il perossido in acqua. Questi enzimi antiossidanti endogeni ed altri fattori fanno funzionare un numero di sistemi di detossificazione tra i quali:

1. riduzione di disolfidi tossici e chinoni
2. rimozione dei ROS (ROS scavenging)
3. riduzione dei perossidi solubili e legati alla membrana

I sistemi difensivi necessitano costante rifornimento di energia (NADH e NADPH) e vitamine antiossidanti per funzionare efficientemente. L'acido ascorbico, α -tocoferolo e il GSH, interagiscono in un sistema complesso per ridurre i ROS e altre specie ossidanti

Tra i vari meccanismi di difesa e di prevenzione delle malattie derivanti dalla dieta ci sono:

1. rimozione dei ROS (ROS scavenging)
2. riduzione dei perossidi e riparazione delle membrane biologiche perossidate
3. sequestro del ferro (diminuzione formazione ROS)
4. utilizzazione dei lipidi della dieta (produzione rapida di energia e ROS scavenging da parte di acidi grassi a corta catena e di esteri del colesterolo).

ROS Scavenging - La vitamina C, la vitamina E e i retinoidi provenienti dalla dieta, forniscono un sistema antiossidante integrato con il GSH tissutale, inibendo la formazione a catena dei ROS e proteggendo i tessuti dal danno ossidativo, caratteristico dell'infiammazione acuta e delle patologie infiammatorie croniche. Il sistema antiossidante ascorbato-tocoferolo-GSH è autorigenerante, ed energia dipendente (NADH, NADPH). Così in presenza di una dieta bilanciata questo sistema protegge l'individuo nei confronti dello stress ossidativo. I retinoidi rimuovono i ROS [McCullough

et al., 2004] ed agiscono direttamente sui leucociti polimorfonucleati per prevenire la generazione di radicali idrossilici (Yoshioka et al., 1986; Parke, 1999). Gli antiossidanti, dunque, svolgono un ruolo fondamentale nella chemioprevenzione, prevenendo l'iniziazione cellulare e costituendo così il blocco dell'iniziazione cellulare in cellule normali.

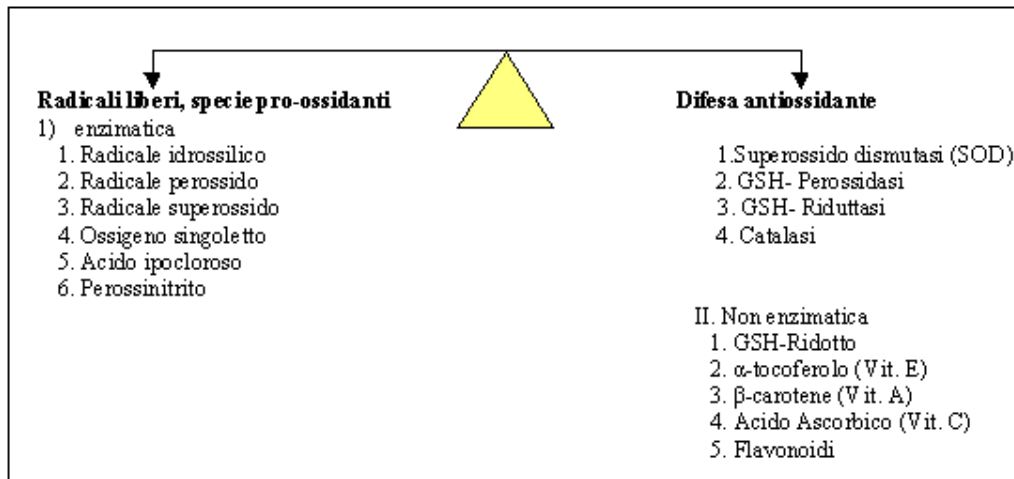


Figura 1.6.3 - Bilancia ossidativa: equilibrio tra specie pro-ossidanti prodotte e difesa antiossidante dell'organismo.

Lo stress ossidativo - Lo stress ossidativo deriva dallo sbilanciamento tra ossidanti ed antiossidanti, che normalmente è mantenuto stabile in soggetti normali. E' stato definito per la prima volta da Sies come una perturbazione nel bilancio pro-ossidante/antiossidante in favore del primo che porta ad un potenziale danno [Sies, 1986] (Fig. 1.6.3).

La difesa antiossidante dell'organismo umano si compone di una via enzimatica (enzimi antiossidanti endogeni) ed una non enzimatica (fattori nutrizionali, quali vitamine e minerali), nonché di numerosi fattori endogeni antiossidanti quali il GSH e altri tioli tissutali. Ad esempio, la GSHperossidasi è l'enzima coinvolto nella rimozione di H₂O₂ generato dalla dismutazione dell'anione superossido dalla superossidodismutasi (SOD). Il GSH, il più importante metabolita antiossidante, è il cofattore di molti enzimi riducenti come la deidroascorbato reduttasi e l'endoperossido isomerasi [Lenzi et al., 1994].

Molti composti con attività anticancerogena contenuti nel cibo agiscono come antiossidanti

modulando l'espressione e l'attività degli enzimi antiossidanti e di fase II, oltre ad essere *scavenger* dei radicali liberi [Verhoeven et al., 1996, Kellof, 2000, Surh, 2003, Davis et al., 2006]. Allo stesso tempo, studi più recenti hanno prodotto prove convincenti che indicano come alcuni agenti chemiopreventivi introdotti con la dieta causino essi stessi la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) per scatenare la trasduzione del segnale che culmina nell'arresto del ciclo cellulare o nella morte cellulare programmata (apoptosi) (Fig.1.6.4).

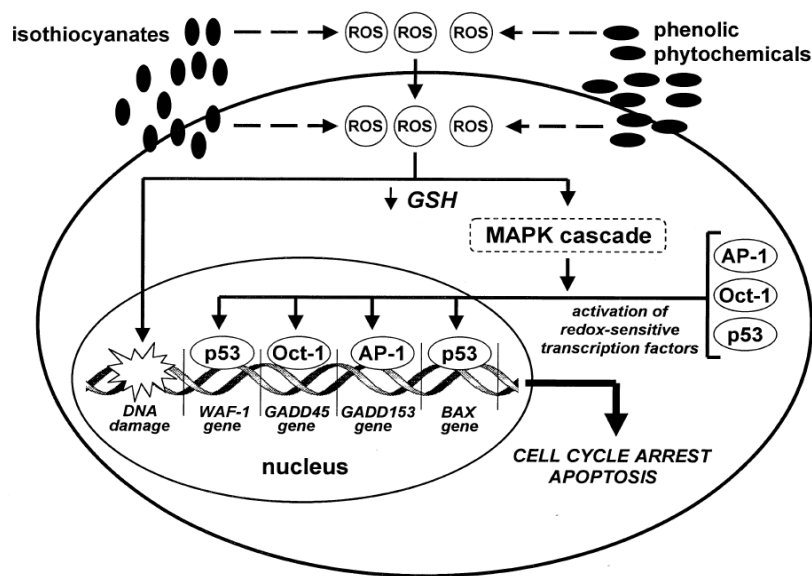


Fig. 1.6.4. Modulazione della produzione di ROS da parte di fitochimici pro-ossidanti.(Loo, 2003).

Molte molecole presenti nei cibi possiedono attività anti radicali liberi (Fig.1.6.5). Il licopene contenuto nei pomodori, ad esempio, svolge questa azione grazie all'alto numero di doppi legami coniugati nella sua molecola. Il licopene, inoltre, riduce la perossidazione lipidica rompendo la formazione a catena di radicali formando radicali perossilici, molto più stabili dei ROS [Bose et al., 2007]. I composti organosolfati derivati dai vegetali appartenenti al genere *Allium* non solo inducono gli enzimi di fase II compresi la glutazione reduttasi e la chinone reduttasi, ma aumentano anche i livelli di glutazione e l'attività della glutazione perossidasi nel fegato così come in tessuti extraepatici dei topi [Hu et al., 1996, Singh et al., 1997-1998].

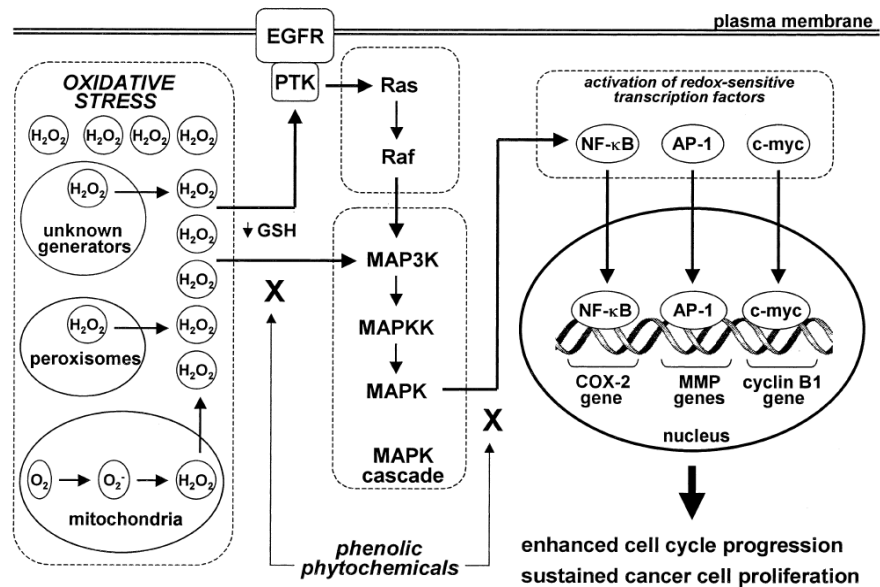


Fig. 1.6.5. Modulazione della produzione di ROS da parte di fitochimici antiossidanti.(Loo, 2003).

Un'altra classe di antiossidanti, gli isotiocianati, esplica la sua azione in maniera caratteristica: esistono evidenze che il trattamento delle cellule con gli isotiocianati comporta un picco transiente di ROS, il quale sembra essere la risposta della cellula al trattamento con questa classe di composti, il primo dei quali ad essere investigato è stato il benzilisotiocianato [Nakamura et al., 2000]. Si presume, quindi, che l'effetto antiossidante degli isotiocianati possa essere, almeno in parte, correlato ad una risposta adattativa della cellula all'induzione dei ROS da parte degli isotiocianati (Fig.1.6.4). È stata riportata una forte correlazione tra la generazione di ROS e l'induzione dell'apoptosi in cellule RL34 (cellule epiteliali epatiche di ratto) da parte del benzilisotiocianato. La produzione di ROS indotta dal benzilisotiocianato è associata con l'inibizione della respirazione mitocondriale, rigonfiamento dei mitocondri e rilascio del citocromo c e conseguente apoptosi [Nakamura et al., 2002]. Anche il sulforafano agisce inducendo la produzione di ROS con conseguente apoptosi cellulare in cellule umane cancerose della prostata [Singh et al., 2005]. In questa nuova ottica anche l' H_2O_2 assume un ruolo differente. Tale molecola, prodotta da una varietà di enzimi, inclusa nicotinammide adenina dinucleotide fosfato (NADPH) ossidasi (appartenente alla famiglia degli enzimi Nox), xantina ossidasi, lipossigenasi e mieloperossidasi, se presente in alte concentrazioni porta ad un danno cellulare irreversibile seguito da morte. D'altro canto tale molecola a basse concentrazioni può inibire reversibilmente molti enzimi, comprese le fosfatasi, agendo come segnale di sopravvivenza [Groeger et al., 2009]. In studi di comparazione tra effetti pro-morte contro pro-sopravvivenza delle proteine appartenenti alla famiglia Nox (famiglia di

proteine che generano specie radicaliche dell'ossigeno), è risultato che la risposta della cellula dipende da numerosi fattori come ad esempio, la quantità di O_2^\bullet/H_2O_2 prodotto, il comparto in cui O_2^\bullet/H_2O_2 viene prodotto e l'intensità dello stimolo. Si ritiene che una piccola produzione di H_2O_2 sia pro-sopravvivenza, mentre una produzione più lunga o una quantità maggiore sia pro-morte e questo è stato provato in cellule p53 proficienti. La proteina p53 controlla l'attività di geni anti- o pro-ossidanti. L'attività di geni altamente responsivi ad azione anti-ossidante viene indotta da uno stress fisiologico (non letale), mentre, in cellule gravemente danneggiate, un'azione pro-ossidante è mediata dall'induzione ritardata di geni pro-apoptotici meno responsivi. [Sablina et al., 2005]. Un processo attraverso cui H_2O_2 probabilmente agisce da fattore di sopravvivenza è il preconditionamento. Perché uno stimolo pre-condizionante possa essere efficace, deve essere di natura simile a quello maggiore, così è probabile che l'effetto pro-sopravvivenza dell' H_2O_2 generata dalle proteine Nox sia rilevante solo quando la cellula è sotto stress ossidativo. Ad esempio le cellule della retina presentano un picco pro-sopravvivenza di H_2O_2 solo quando sono sotto stress ossidativo e non con altri tipi di stress [Mackey et al., 2008].

1.7 Il duplice ruolo della vitamina C

La vitamina C è una vitamina idrosolubile contenuta nella frutta e nella verdura di cui l'uomo abbisogna per contrastare la formazione di radicali liberi, dal momento che non viene sintetizzata dall'organismo [Levine et al, 2011]. Il limite massimo dell'assunzione giornaliera dato dalle linee guida Dietary Reference Intakes è di 2 grammi e la dose orale tollerata è di 3-4 grammi [Food and Nutrition Board, Panel on Dietary Antioxidants and Related Compounds, 2000]. A queste concentrazioni l'assorbimento è finemente regolato e difficilmente si raggiungono concentrazioni plasmatiche che arrivino a 1 mmol/L. A queste concentrazioni la vitamina C svolge un ruolo fisiologico e si comporta essenzialmente come antiossidante. Al fine di esaminare l'attività chemioterapica nei confronti del cancro ipotizzata dal medico canadese William McCormick nel 1959 [McCormick, 1959], Ewan Cameron somministrò ai suoi pazienti con cancro avanzato 10 grammi di vitamina C al giorno e documentò meticolosamente numerosi casi. Incoraggiato dalle sue scoperte, Cameron contattò Linus Pauling, e insieme pubblicarono serie di casi che suggerivano che l'alto dosaggio di acido ascorbico potesse migliorare la sopravvivenza nel cancro [Cameron e Pauling, 1976-1978]. Pauling in seguito alle sue scoperte sfidò pubblicamente la classe medica e Charles Moertel raccolse la sfida e condusse due studi in doppio cieco con lo stesso dosaggio di vitamina C, ma non riscontrò differenze nel tasso di sopravvivenza [Moertel et al., 1985]. In seguito è stato possibile ricondurre queste differenze riscontrate alla biodisponibilità della vitamina C. Moertel e collaboratori somministrarono la vitamina C solo per via orale, mentre Cameron la somministrò sia per via orale sia endovenosa [Levine et al., 2011]. La concentrazione plasmatica di ascorbato somministrato per via endovenosa può essere anche 70 volte più alta di quella possibile con la massima dose tollerata per via orale [Padayatty et al., 2004]. Per determinare se e come la vitamina a dosi farmacologiche uccide solamente le cellule cancerose preservando quelle sane, sono state incubate per un'ora sia le cellule normali sia quelle tumorali con concentrazioni di acido ascorbico nel range 0-20 mmol/L. Le cellule normali non hanno risentito del trattamento con 20 mmol/L di acido ascorbico, mentre più dei tre quarti delle 43 linee tumorali hanno mostrato sensibilità al trattamento ≤ 10 mmol/L, definito come la dose di ascorbato effettiva per uccidere il 50% di un tipo di cellula tumorale (EC_{50}) [Chen et al., 2005; Hoffer et al., 2008; Park et al., 2009]. L'aggiunta dell'enzima catalasi al terreno di coltura cellulare, che catalizza la decomposizione del perossido di idrogeno (H_2O_2) a ossigeno e acqua, ha migliorato l'azione citotossica della vitamina C ad alto dosaggio. Basandosi su questi ed altri esperimenti in vitro, è stato proposto che la morte delle cellule cancerose è mediata dalla formazione di H_2O_2 , che in presenza di metalli di transizione

ridotti che fungono da catalizzatori è classicamente ritenuto che produca radicali ossidrilici altamente reattivi ($\text{OH}\cdot$). Questo è comunemente riferito alla chimica di Fenton, dove lo ione ferroso (Fe^{2+}) è ossidato da H_2O_2 , per ottenere lo ione ferrico (Fe^{3+}) e $\text{OH}\cdot$. I metalli di transizione come il ferro e il rame, sono facilmente ridotti dall'ascorbato. Questi metalli ridotti possono donare il loro elettrone all'ossigeno molecolare per produrre le specie conosciute come superossido ($\text{O}_2^{\cdot-}$). La reazione inversa può avvenire quando $\text{O}_2^{\cdot-}$ riduce il metallo ossidato. Questa reazione inversa può andare in competizione con l'enzima superossido dismutasi che rimuove cataliticamente $\text{O}_2^{\cdot-}$ producendo H_2O_2 . Nel mezzo biologico quando la vitamina C si trova ad alte concentrazioni, può dunque alimentare una serie di reazioni che favoriscono la formazione di H_2O_2 , la specie citotossica effettrice della morte cellulare. È stato proposto che H_2O_2 , raggiunga concentrazioni allo stato stazionario efficaci a provocare la morte cellulare di $\geq 25\text{--}50$ mmol/L [Chen et al., 2005; Hoffer et al., 2008; Park et al., 2009]. Levine e colleghi hanno osservato che queste concentrazioni possono essere raggiunte nei fluidi extracellulari, ma non nel sangue (Fig.1.7.1). Gli eritrociti contengono grandi quantità di catalasi e perossidasi, che reprimono efficientemente la reazione Fenton per proteggere l'emoglobina dal danno ossidativo [Levine et al., 2011]. L'azione della vitamina C a dosaggi farmacologici come pro farmaco per la formazione di H_2O_2 è stata esplorata in vivo [Chen et al., 2007-2008]. Lo scopo del loro lavoro è stato quello di comprendere se la formazione di H_2O_2 mediata dall'alto dosaggio di vitamina C avviene in vivo negli animali sperimentali. L'ascorbato nel sangue a dosaggi fisiologici e farmacologici si equilibra completamente nel fluido extracellulare. L' H_2O_2 si forma selettivamente nei fluidi extracellulari ma non nel sangue a causa del rapido catabolismo da parte degli eritrociti a dosi non rilevabili [Chen et al., 2007-2008]. Concentrazioni di ascorbato $> 2\text{--}4$ mmol/L sono richieste per ottenere concentrazioni di $\text{H}_2\text{O}_2 \geq 5$ mmol/L nei fluidi extracellulari. L' H_2O_2 si formava solamente quando la concentrazione del radicale ascorbato era superiore a 100 nmol/L. La comparsa del radicale ascorbato con la contemporanea formazione dell' H_2O_2 è consistente con l'ipotesi che una concentrazione soglia di ascorbato sia necessaria, sopra la quale sufficienti specie effettrici mediano la morte cellulare delle cellule cancerose. Le conoscenze recenti hanno portato alla scoperta chiave che la formazione di H_2O_2 avviene solo a dosi farmacologiche di vitamina C e non con dosi fisiologiche e che le concentrazioni micromolari allo stato stazionario di H_2O_2 prodotte nell'interstizio tumorale sono state efficaci nel ridurre la crescita tumorale [Levine et al., 2011].

A Generation of Reactive Oxygen Species by the Fenton Reaction

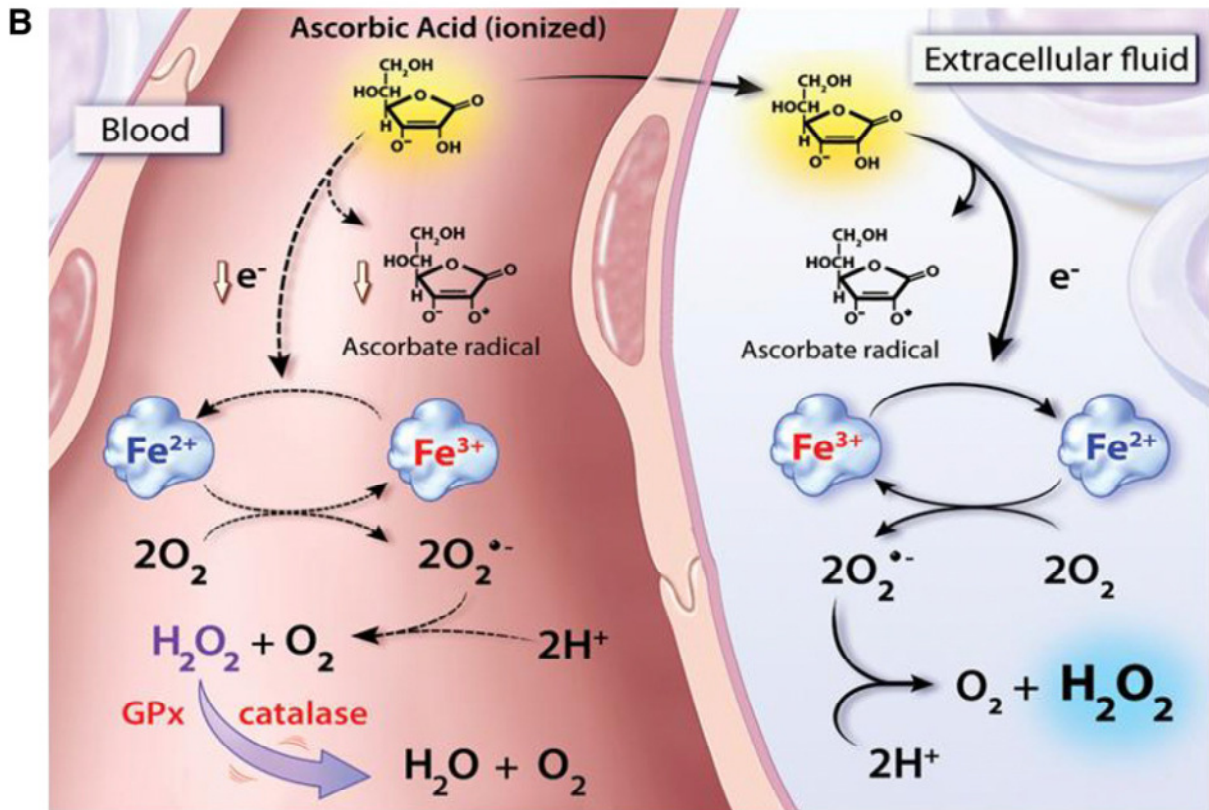
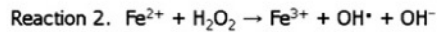
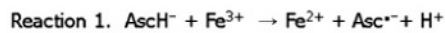


Fig. 1.7.1. (A) Nella reazione 1, l'ascorbato (AscH^-) reagisce con lo ione ferrico (Fe^{3+}) per produrre lo ione ferroso (Fe^{2+}) e il radicale ascorbato ($\text{Asc}^{\cdot-}$). Nella reazione 2, la reazione Fenton classica genera le specie del radicale ossidrilico (OH^\cdot) dall' H_2O_2 . (B) Meccanismo proposto della formazione del radicale ascorbato e dell' H_2O_2 nei fluidi extracellulari comparato con il sangue. [Da Chen et al., 2007].

1.8 Un vegetale ricco di antiossidanti: lo spinacio (*Spinacia oleracea* L.)

Da vari gruppi di ricerca è stata descritta l'attività antiossidante di diversi vegetali segnalando la presenza di una serie di potenti antiossidanti naturali in foglie di spinacio e descrivendo la loro potenziale attività biologica. Questo mi ha spinto ad approfondire le conoscenze attuali di questa specie nel contesto della chemioprevenzione.

I composti fitochimici nei vegetali, specialmente quelli appartenenti alla classe dei fenoli, sono considerati i composti maggiormente bioattivi nel mantenimento della salute umana, proteggendo i sistemi cellulari dal danno ossidativo e riducendo il rischio di malattie cronico-degenerative [Vinson et al. 2001, Sun et al., 2002]. *Spinacia oleracea* L. è uno tra i più importanti ortaggi che presentano un complesso pool di molecole antiossidanti, che rientra comunemente nella dieta umana sia crudo sia cotto. Un chilogrammo di foglie di spinacio appena tagliato contiene circa 1.000 mg di flavonoidi totali. Estratti acquosi delle foglie di spinacio hanno mostrato proprietà antiossidanti, antiproliferative, antinfiammatorie e antiallergiche nei sistemi biologici. Tali estratti hanno dimostrato la facoltà di esercitare numerosi effetti benefici, come la chemioprevenzione, protezione del sistema nervoso centrale, azione antitumorale e anti-invecchiamento (Bergman et al., 2001; Toledo et al., 2003; Bunea et al., 2008; Ishida 2013). Un apporto dietetico di spinacio è stato segnalato per ridurre il rischio di sviluppare vari tipi di cancro, come il tumore esofageo [Freedman et al., 2007], alla mammella [Longnecker et al., 1997] e al colon [Slattery et al., 2000].

L'ipotesi della presenza di specie affini ai flavonoidi nello spinacio è stata riportata per la prima volta nel 1943 [Weatherby e Cheng, 1943], ma ci sono voluti circa 20 anni prima che la struttura dei flavonoli isolati dalle foglie di spinacio fosse accertata come patuletina (3,5,7,3',4'-pentaidrossi-6-metossiflavone) e che fosse confermata la presenza di spinacetina [Zane e Wender, 1961]. Inoltre è stata riportata la presenza di glicosidi flavonolici in un estratto in metanolo [Aritomi e Kawasaki 1984; Aritomi et al., 1986].

Lo spinacio è considerato una utile fonte di vari carotenoidi e composti lipofili attivi (cioè, neoxantina, β -carotene, luteina, clorofilla e omega-3) [Kidmose et al., 2005; Moser et al., 2011; Parasramka et al., 2012] ; inoltre è tra le poche specie vegetali che contengono alti livelli di fitoecdisteroidi (50 μ g/g del peso fresco) [Grebek et al.1994]. I fitoecdisteroidi non sono gli unici composti antiossidanti presenti negli spinaci, ma si riscontra anche il contributo dell'acido ascorbico nonché di polifenoli e derivati dell'acido p-cumarico [Bergman et al., 2001].

Una potente miscela naturale antiossidante (NAO), solubile in acqua, che inibisce specificatamente l'enzima lipossigenasi, è stata isolata dalle foglie di spinacio. L'attività antiossidante di NAO è stata paragonata a quella di altri antiossidanti finora conosciuti, risultando superiore sia in vivo che in vitro a quella del tè verde, della N-acetilcisteina (NAC), del diidrossi-toluene butilato (BHT) e della vitamina E.

Dalla caratterizzazione chimica di questa miscela antiossidante naturale è stata riscontrata la presenza di derivati dei flavonoidi come acido glucuronico e isomeri trans e cis dell'acido p-cumarico. NAO è stata testata ed è risultata essere tollerata in diverse specie, come ad esempio in topo, ratto e coniglio. NAO risulta non mutagenica e ha mostrato effetti anticancerogeni promettenti in alcuni modelli sperimentali, come il tumore alla pelle e alla prostata e non ha mostrato alcuna tossicità negli organi bersaglio o effetti collaterali [Lomnitski et al., 2003].

Per determinare il contenuto di flavonoidi, i vari campioni sono stati analizzati mediante HPLC (High-performance liquid chromatography) e tale analisi hanno rilevato la presenza di glicosidi - specialmente quelli derivanti da patuletina e spinacetina, confermando studi precedenti (Aehle et al., 2004).

Infine, grande attenzione è rivolta verso una molecola costituente la membrana dei tilacoidi nei cloroplasti dello spinacio, il monogalactosil diacilglicerolo che ha dimostrato di inibire l'attività replicativa delle DNA polimerasi (α , δ e ϵ) dei mammiferi, sopprimendo la proliferazione delle cellule tumorali murine del colon Colon26 in studi in vivo e incrementando l'attività antiproliferativa della gemcitabina in tre linee di carcinoma pancreatico umano BxPC-3, MIAPaCa2 e PANC-1 in studi in vitro [Akasaka et al., 2012; Maeda et al., 2013].

2. Scopo della ricerca

Il progetto di ricerca si propone di indagare le variazioni in concentrazione di sostanze a potenziale azione chemioprotettiva in Spinacio (*Spinacia oleracea* L., famiglia Chenopodiaceae) soggetto a stress ipossico durante la crescita. In particolare, viene analizzata l'induzione di metaboliti secondari con un significativo effetto biologico positivo per l'uomo, l'attività antiproliferativa e chemioprotettiva di estratti di spinacio su linee cellulari tumorali umane.

Allo scopo di valutare l'attività cito-genotossica degli estratti sono stati condotti test biologici in vitro, quali, ad esempio, il saggio elettroforetico su gel a singola cellula (SCGE o Comet assay) per valutare gli effetti chemioprotettivi verso il danno ossidativo indotto al DNA, e il test di vitalità cellulare in luminescenza su cellule HT-29, una linea cellulare umana derivante da adenocarcinoma del colon che cresce in adesione. In particolare, sia gli estratti acquosi di foglie di spinacio liofilizzate sia il succo fresco di tali piante sono stati somministrati alla linea cellulare tumorale umana HT-29 per valutarne l'effetto chemioprotettivo. Si è inoltre proceduto a valutare l'induzione di apoptosi nella linea cellulare HT-29 tramite Tunel assay.

Al fine di poter confrontare l'effetto biologico degli estratti in cellule epiteliali intestinali tumorali e non tumorali, sono anche state sviluppate preliminarmente metodiche per mettere a punto colture di cellule epiteliali di colon murino.

3. Materiali e metodi

3.1 Colture cellulari

Per questo studio è stata utilizzata la linea cellulare HT-29 (Fig.3.1.1), una linea cellulare umana derivante da adenocarcinoma del colon che cresce in adesione, fornita da the Northern Ireland Center for Food and Health. Il numero di cromosomi è ipertriploide (numero modale 71; variazioni da 68-72), il cromosoma 13 è assente e i cromosomi 8 e 14 sono generalmente monosomici. Le cellule presentano un'ultrastruttura caratterizzata da microvilli, microfilamenti, mitocondri largamente vacuolizzati con granuli neri, reticolo endoplasmatico liscio e rugoso con ribosomi liberi, gocce lipidiche e molti lisosomi primari e pochi secondari. Le cellule HT-29 presentano una mutazione al sito 273 del codone per il gene P53 che vede la sostituzione di una G con una A e che porta alla sostituzione di un'arginina con un'istidina; l'antigene per P53 è sovraprodotto. Le cellule HT-29 offrono un buon mezzo per il monitoraggio delle potenzialità genotossiche delle sostanze contenute nel lume del colon in quanto simili alle cellule target. Infatti questa linea cellulare è stata ampiamente utilizzata per diversi studi sulla correlazione tra lo sviluppo del tumore e la dieta.

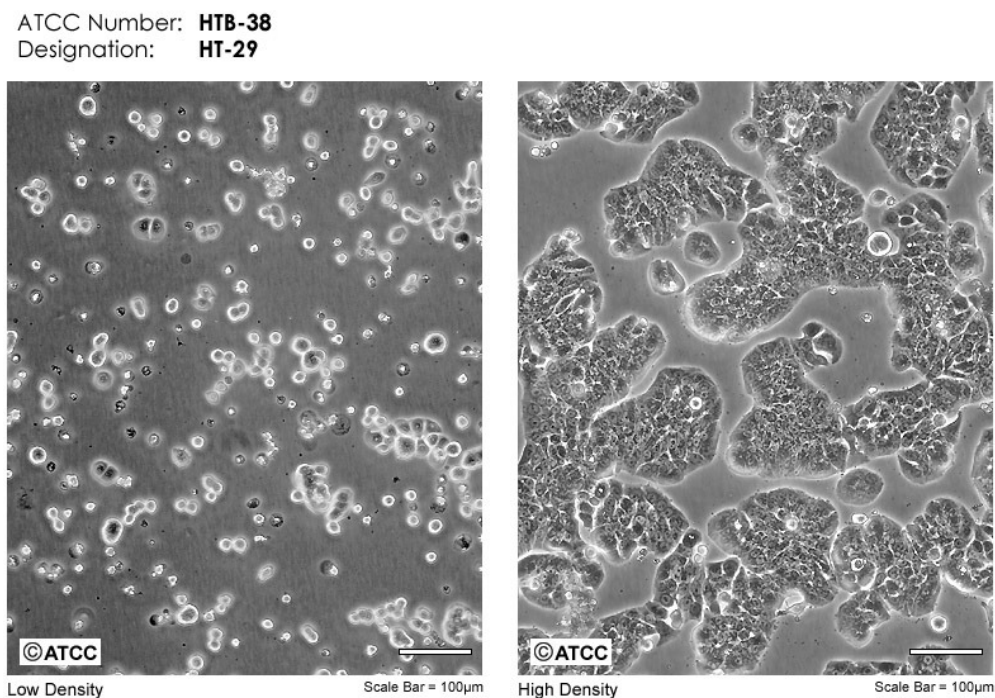


Fig. 3.1.1: Linea cellulare HT-29 a bassa e ad alta densità. (Da ATCC <http://www.lgcstandards-atcc.org/Attachments/1986.jpg>).

3.1.1 Procedura di mantenimento delle cellule

Le cellule HT-29 vengono coltivate in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) contenente il 10% di FBS (Fetal Bovin Serum) e lo 0.5% di una soluzione di Penicillina (5000U/ml)/Streptomicina (5000µg/ml). Le cellule vengono incubate a 37°C con il 5% di CO₂.

Ogni 2/3 giorni è necessario effettuare le subculture; viene rimosso il terreno consumato ed effettuati due lavaggi con HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution). Alle cellule viene, quindi, aggiunta tripsina-EDTA che viene lasciata agire per 10' a 37°C, in modo tale da determinare il distacco delle cellule. Passati i 10' si aggiunge DMEM completo 10% FBS, si staccano tutte le cellule; un rapporto 1:3 o 1:8 viene impiegato per le subculture.

3.2 Campioni vegetali

Per l'analisi dell'attività chemiopreventiva sono stati utilizzate piante di spinacio (*Spinacia oleracea* L. cv. Parrot), coltivate in due diverse condizioni: a concentrazione atmosferica di ossigeno (normossia) e a bassa concentrazione di ossigeno (ipossia), provenienti da una stessa partita. I campioni sono stati forniti dal gruppo del dipartimento di Scienze Agrarie e degli Alimenti dell'Università degli studi di Modena e Reggio Emilia che ha provveduto alla coltivazione delle piante in coltura idroponica, alla liofilizzazione e all'ottenimento del succo dei campioni raccolti in tempi diversi.

In particolare, sia gli estratti acquosi di foglie di spinacio liofilizzate [Lester et al., 2004] sia il succo di tali piante sono stati somministrati alla linea cellulare tumorale umana HT-29 per valutarne l'effetto chemioprotettivo.

3.2.1 Trattamento e raccolta dei campioni

Dopo la germinazione dei semi, ogni germoglio è stato trasferito in una vasca per coltura idroponica contenete circa 40 piantine, riempita con 10 litri di soluzione nutriente Hoagland (Tab. 3.2.1.1).

Tab 3.2.1.1: Soluzione nutritiva Hoagland

Molecola	Concentrazione	Molecola	Concentrazione
KNO ₃	1,25 mM	MnCl ₂	10 Mm
Ca(NO ₃) ₂	1,5 mM	ZnSO ₄	2 μM
MgSO ₄	0,75 mM	CuSO ₄	1,5 μM
KH ₂ PO ₄	0,5 mM	(NH ₄) ₆ MoO ₂₄	0,075 μM
KCl	50 μM	Na ₂ SiO ₃	0,1 mM
H ₃ BO ₃	50 μM	Fe-Na-EDTA	72 μM

Dopo circa 30 giorni dalla germinazione, quando la pianta risulta avere 5/6 foglie, si induce ipossia dell'apparato radicale sospendendo l'aerazione e coprendo la superficie della soluzione nutriente per prevenire lo scambio gassoso con l'atmosfera. Gli steli, i germogli e le foglie di tutte le piante sono stati lasciati esposti all'aria. La concentrazione di ossigeno, il pH e la temperatura della soluzione nutritiva è stata monitorata ogni due ore usando un misuratore di ossigeno disciolto nel medium (Oxy-Check HI 9147, Hanna Instruments) per tutta la durata dell'esperimento. Per quanto riguarda le piante coltivate in normossia, è stata ricreata la stessa condizione di coltura, senza sospendere l'aerazione del medium. Il campionamento è stato fatto in triplicato per ogni ora di campionamento (rispettivamente alle ore 8,00 – 12,00 – 16,00 – 20,00 per la prima sperimentazione (Tab. 3.1.2.2), per la seconda (Tab. 3.1.2.3) alle ore 9,00 – 15,00 – 21,00 – 9,00 – 11,00) raccogliendo alcune foglie da diversi punti della vasca di coltura, in modo da includere nell'analisi eventuali variazioni interne. In questo modo i risultati sono indipendenti da influenze dovute dalla vasca di coltura, ma dipendono solo dal trattamento.

Il campionamento delle foglie per l'ottenimento del succo di spinacio è stato fatto al tempo 0 e dopo 24 ore sia per il campione normossico (T24) che per il campione ipossico (T24I).

Sono di seguito riportati i valori monitorati (Tabella 3.1.2.2 e 3.1.2.3):

Tab.3.1.2.2: Parametri (percentuale di ossigeno, ossigeno disciolto, temperatura dell'aria e dell'acqua e peso fresco) misurati a diversi tempi di campionamento delle piante coltivate in normossia e in ipossia.

Normossia						
ora	% O ₂	mg/l O ₂	T °C aria	T °C acqua	campione	Peso (g)
8,00	88	7,2	30	24,8	T0	5,12
12,00	80	6,5	31	25	T2	10,61
16,00	80	6,5	32	25,3	T3	10,16
20,00	80	6,5	32	25,4	T4	9,91
Ipossia						
ora	% O ₂	mg/l O ₂	T °C aria	T °C acqua	campione	Peso (g)
8,00	74	6	30	24,8	T0I	5,26
12,00	67	5,6	31	25,2	T2I	7,43
16,00	20	1,6	32	25,8	T3I	9,4
20,00	5	0,4	32	26	T4I	6,62

Tab.3.1.2.3: Parametri (percentuale di ossigeno, ossigeno disciolto, temperatura dell'aria e dell'acqua e peso fresco) misurati a diversi tempi di campionamento delle piante coltivate in normossia e in ipossia.

Normossia						
ora	% O ₂	mg/l O ₂	T °C aria	T °C acqua	campione	Peso (g)
9,00	82	6,6	27	23	T0	4,56
15,00	69	5,9	24	22,8	T6	2,69
21,00	69	5,8	24	23,1	T12	2,77
9,00	70	6	20	21,4	T24	3,47
11,00	70	6	20	22,4	T26	3,12
Ipossia						
ora	% O ₂	mg/l O ₂	T °C aria	T °C acqua	campione	Peso (g)
9,00	82	6,6	27	23	T0I	3,06
15,00	19	1,6	24	22,9	T6I	2,64
21,00	18	1,5	24	23	T12I	3,1
9,00	3	0,3	20	21,5	T24I	3,42
11,00	70	6	20	22,5	T26I	3,03

Dopo la raccolta, le foglie sono state subito congelate in azoto liquido, liofilizzate e conservate a -80 °C.

3.3 Preparazione degli estratti liofilizzati e del succo

Estratto liofilizzato: I campioni liofilizzati sono stati posti in mortaio di porcellana, aggiunto azoto liquido in eccesso e pestati nel mortaio fino a ridurli in una polvere fine; ad ogni campione è stato aggiunto un determinato volume di terreno per colture cellulari (DMEM addizionato di 1% penicillina-streptomicina, 1% glutammina e 10% FBS) calcolato in base al peso fresco relativo di ogni campione. Trasferita la sospensione in biberon da ultracentrifuga, i campioni sono stati vortexati (3 volte per 20") e quindi trasferiti in centrifuga (14000 rpm per 20' a 4 °C).

Il surnatante ottenuto da ogni campione è stato filtrato con un filtro da 0.2 µm e conservato a -20°C. E' stata calcolata la concentrazione relativa di ogni estratto (g eq. pf / ml = grammi equivalenti di peso fresco per ml) aggiungendo ad ogni campione un volume di DMEM pari al peso fresco, in modo da avere un rapporto di 1:1 (Tabella 3.3.1 e 3.3.2):

Tab.3.3.1: Peso fresco (g), Volume di DMEM aggiunto e Volume di surnatante ottenuto dopo centrifuga da ogni campione del primo lotto.

Normossia	Peso (g)	DMEM aggiunto (ml)	Surnatante ottenuto (ml)	Ipossia	Peso (g)	DMEM aggiunto (ml)	Surnatante ottenuto (ml)
T0	5,12	5,12	3,07	T0I	5,26	5,26	3,55
T2	10,61	10,61	8,1	T2I	7,43	7,43	5,5
T3	10,16	10,16	7,4	T3I	9,4	9,4	6,9
T4	9,91	9,91	7,5	T4I	6,62	6,62	5,3

Tab.3.3.2: Peso fresco (g), Volume di DMEM aggiunto e Volume di surnatante ottenuto dopo centrifuga da ogni campione del secondo lotto.

Normossia	Peso (g)	DMEM aggiunto (ml)	Surnatante ottenuto (ml)	Ipossia	Peso (g)	DMEM aggiunto (ml)	Surnatante ottenuto (ml)
T0	4,56	4,56	3	T0I	3,06	3,06	1,7
T6	2,69	2,69	1,8	T6I	2,64	2,64	1,2
T12	2,77	2,77	1,3	T12I	3,1	3,1	2
T24	3,47	3,47	2	T24I	3,42	3,42	3,1
T26	3,12	3,12	2	T26I	3,03	3,03	1,7

Succo - Le foglie campionate e stoccate a -80°C sono state pestate in mortaio di porcellana con azoto liquido in eccesso fino a ridurle in una polvere fine. La polvere è stata pesata (2,9 g), trasferita in una siringa da 10 ml, quindi filtrata mediante filtro in Nylon da 60 µm. Il succo così ottenuto è stato centrifugato in biberon a 10.000 rpm per 10' a 4°C. Il surnatante ottenuto (circa 0,5 ml) è stato filtrato con un filtro da 0.2 µm e conservato a -20°C.

3.4 Analisi della composizione chimica mediante High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy (HPLC-MS)

La cromatografia liquida-spettrometria di massa (HPLC-MS, o in alternativa LC-MS) è una tecnica analitica che combina la separazione fisica della cromatografia liquida ad alta prestazione con l'analisi della massa mediante la spettrometria di massa. Questa metodica prevede il passaggio del solvente in cui è dissolto il campione ad alta pressione (fino a 400 atm) entro una colonna, rendendo l'analisi molto veloce. Lo strumento utilizzato è 6310A Ion Trap LC-MS avente un quadrupolo come trappola ionica per determinare la massa esatta delle molecole eluite. La colonna utilizzata per questo studio è ZORBAX SB-C18, 2,1x30mm, 3,5µm, composta da particelle di silice di 3,5 µm di diametro sulla cui superficie presentano catene apolari di idrocarburi da 8 e 18 atomi di carbonio. Il solvente impiegato nella fase mobile è una miscela di acqua, acido formico e metanolo. Per l'analisi chimica degli estratti di spinacio, ogni estratto secco è stato dissolto in 200 µl di una soluzione 1:9 (v/v) acqua:acetone. Il campione è stato ulteriormente diluito 1:10 con una soluzione 1:9 (v/v) aceto nitrile:acqua. A questo punto il campione si trova dissolto in un solvente simile alla fase mobile dell' HPLC-MS, in modo da evitare interferenze nel flusso, e pronto ad essere iniettato nell'HPLC.

3.4.1 Tipi di estratti sottoposti all'analisi chimica mediante HPLC-MS

Sono stati sottoposti all'analisi chimica 3 differenti tipologie di estratti: l'estratto idrofilo, il succo e il succo estratto con acqua (1:1 p/v).

Estratto Idrofilo

Seguendo il protocollo descritto da Bergman et al. 2001, le foglie di spinacio sono state omogeneizzate in un mortaio con acqua in un rapporto 1:1 per 5 minuti. Il prodotto è stato filtrato per mezzo di una garza sterile, trasferito in una microprovetta e centrifugato 2 volte per 12 minuti a 14000rpm. Il surnatante è stato recuperato e concentrato mediante Speed Vacuum Concentrator (Eppendorf 5301) fino all'essiccamento.

Succo e succo estratto con acqua

Il succo è stato ottenuto come precedentemente descritto al paragrafo 3.3, mentre il succo estratto con acqua è stato ottenuto mediante una variazione del protocollo, con l'aggiunta di acqua distillata sterile in rapporto 1:1 (p/v).

Gli estratti sono stati ottenuti sia dalle foglie di spinacio coltivati nelle condizioni sperimentali, sia da quelle acquistate in un locale supermercato già lavati e pronti al consumo (confezione da 300 g,

confezionato il 22/10/12 da “Il Melograno s.r.l, Santarcangelo di Romagna (RN), stabilimento Stab Via Bornaccino n. 1166.”).

3.5 Test di proliferazione cellulare (MTS)

Il test MTS è stato eseguito sulla linea cellulare HT-29 trattata con gli estratti vegetali di spinacio. La tecnica colorimetrica MTS (CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega Corporation, Madison, WI, USA) permette di determinare il numero di cellule vitali in proliferazione [Cory et al., 1991; Riss et Moravec, 1992]. I saggi che utilizzano sali di tetrazolio per determinare la vitalità cellulare (MTT, MTS, etc..) sono ampiamente utilizzati per analizzare gli effetti di sostanze ad attività chemiopreventiva sulla proliferazione cellulare, quali curcumina, quercetina, auraptene, indoli e isotiocianati [Mori et al., 2001].

Mediante l'analisi della proliferazione cellulare con MTS è stato possibile stabilire quale fosse la concentrazione non citotossica dei composti in questione da utilizzare per valutare le loro proprietà chemiopreventive mediante il Comet assay [Bonnesen et al., 2001]. Per questo test vengono utilizzate piastre contenenti 96 pozzetti. In ogni pozzetto vengono incubati 100µl di sospensione cellulare (5×10^3 cellule/ml) per 24 ore in presenza di differenti concentrazioni di estratto vegetale. Al termine dell'esposizione, viene eliminato il mezzo di trattamento, lavate le cellule in adesione con 100 µl di DMEM e aggiunti infine 100 µl di DMEM e 20 µl di soluzione reagente per pozzetto (CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay). La soluzione reagente contiene 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium salt (MTS), e il reagente PES (fenazina etosulfato). PES, che ha un'elevata stabilità chimica, combinandosi con MTS, forma una soluzione stabile. Il sale di tetrazolio MTS (Owen's reagent) viene bioridotto dalle cellule in un prodotto colorato (formazano), solubile nel mezzo di coltura. Dopo 4 ore di incubazione, viene misurata l'assorbanza a 450 nm con un lettore di piastre a 96 pozzetti (MULTISKAN EX, Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finlandia). La quantità di formazano, misurata come valore di assorbanza a 450 nm, è direttamente proporzionale al numero di cellule vitali in coltura [Cory et al., 1991; Riss e Moravec, 1992].

3.6 Test di bioluminescenza per la vitalità cellulare

Il test di bioluminescenza per la vitalità cellulare (CellTiter Glo, Promega, Milano, Italia) permette di determinare il numero di cellule vitali in coltura attraverso la quantificazione di ATP presente, in quanto l'ATP si correla alla presenza di cellule metabolicamente attive [Crouch, S.P.M. et al.,

1993]. La reazione sulla quale si basa il saggio è data dalla luciferina che per azione dell'enzima luciferasi in presenza di ATP (e magnesio come catalizzatore) produce Oxyluciferina, AMP, e il segnale luminoso che viene registrato (Fig. 3.6.1).



Fig. 3.6.1: Reazione della luciferasi. La monoossigenazione della luciferina è catalizzata dalla luciferasi in presenza di Mg₂⁺, ATP e O₂ (Tratto da: Technical Buletin, CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay, Promega, USA)

Per questo test vengono utilizzate piastre opache contenenti 96 pozzetti. In ogni pozzetto vengono incubati 100µl di sospensione cellulare (5x10⁴ cellule/ml) per 24 ore in presenza di differenti concentrazioni di estratto vegetale. Vengono preparati anche dei controlli senza cellule contenenti soltanto il medium per ottenere i valori di luminescenza di fondo. Una volta trascorso il tempo di incubazione con gli estratti a differenti diluizioni (0,1 - 0,5 - 0,05 g eq. pf/ml), la piastra è stata equilibrata a temperatura ambiente per circa 30', quindi è stato aggiunto lo stesso volume (100 µl) di reagente. Dopo aver miscelato per 2' su shaker orbitale per lisare le cellule, si è lasciato 10' a temperatura ambiente per equilibrare il segnale ed è stata fatta la lettura al luminometro.

3.7 Saggio di vitalità cellulare con Trypan blue

Le cellule sono state seminate in piastre da 6 pozzetti (2 ml / pozzetto) ad una densità di 2 x 10⁵ cellule / pozzetto. Le cellule sono state trattate con diverse concentrazioni di estratto e succo di spinacio per 24 ore e è stato fatto il conteggio al microscopio. Ogni esperimento è stato effettuato in doppio.

Il giorno del trattamento, le cellule sono state seminate in ciascun pozzetto alla densità di 2 x 10⁵ cellule in 2 ml di volume. Il giorno seguente è stato aggiunto l'estratto di spinacio all'opportuna concentrazione, mentre i controlli non hanno subito nessun trattamento.

Per il conteggio delle cellule, sono state staccate con 500 µl di tripsina per 5 minuti e sono state risospese in 1 ml di DMEM con una pipetta sterile da 1 ml. 30 µl di sospensione cellulare sono stati

miscelati con la stessa quantità di Trypan blue (Trypan Blue Stain 0,4% Biowhittaker ® (Lonza, Walkersville, MD 21.793 USA)) e caricati in un vetrino conta cellule (Burker).

3.8 Comet assay

Il danno al DNA è stato misurato mediante l'impiego del Comet assay o Single cell gel electrophoresis. La tecnica dell'elettroforesi su microgel è stato introdotto nel 1984 da Östling e Johanson come metodo per misurare le rotture a singolo filamento che determinavano il rilassamento del DNA superavvolto [Östling et Johanson, 1984]. Una versione modificata è stata pubblicata da Singh e colleghi nel 1988, che eseguirono il test in condizioni alcaline [Singh et al., 1988]. L'idea era quella di combinare l'elettroforesi su gel con la microscopia a fluorescenza per visualizzare la migrazione dei frammenti di DNA. Se la molecola di DNA contiene rotture, si ha un rilassamento della molecola stessa e le estremità dei frammenti, in virtù della loro carica negativa, migrano verso l'anodo durante l'elettroforesi, conferendo la tipica morfologia a cometa, da cui il nome del test. Se il DNA non è danneggiato, la mancanza di estremità libere e la grandezza dei frammenti rendono impossibile la migrazione. La determinazione della quantità relativa di DNA che migra permette una valutazione della quantità di rotture al DNA in ogni singola cellula. La testa della cometa, che contiene il DNA a più alto peso molecolare, e la coda della cometa, che contiene i frammenti che migrano verso l'anodo, vengono misurate mediante l'analisi di immagini digitalizzate usando software dedicati.

La versione alcalina (pH>13) del saggio è stata impiegata per identificare rotture a singolo filamento e siti labili in ambiente alcalino del DNA, come siti apurinici e apirimidinici, che si formano quando basi sono perse e ossidate.

Le cellule vengono seminate in piastre da 6 pozzetti (2 ml per pozzetto) in modo tale da avere 1×10^5 cell/ml. Dopo 24h dalla semina le cellule sono in adesione, si elimina il terreno e si aggiungono in ogni pozzetto le diverse quantità di estratto da saggiare (calcolate in base alla concentrazione degli estratti) e DMEM completo (1% glutammina, 1% penicillina/streptomina e 10% FBS) per un volume totale di 2 ml. Dopo 24h dal trattamento si elimina il terreno e si effettua un lavaggio con HBSS. Le cellule vengono staccate e trasferite in eppendorf in modo tale da avere 1×10^5 cell/ml nel caso dei campioni che devono essere trattati con H_2O_2 e 5×10^4 cell/ml per i campioni che non devono essere trattati. Per il trattamento con H_2O_2 (100 mM) i campioni, dopo centrifugazione (800g, 1'), vengono risospesi in DMEM e trattati con perossido di idrogeno per 5' in ghiaccio. Prima di procedere alla preparazione dei vetrini tutti i campioni vengono centrifugati a 800g per 1'.

La vitalità cellulare, dopo esposizione delle cellule agli estratti vegetali per 24 ore e dopo trattamento con H₂O₂ per 5', è stata rilevata utilizzando il colorante tripan blue (0,4%).

Il pellet viene risospeso in 90 µl di Low Melting Agarose (LMA) 0.7% e distribuito su vetrini sgrassati precedentemente agarizzati con Normal Melting Agarose (NMA) 1% e immediatamente coperto con un coprioggetto. I vetrini sono mantenuti in frigorifero per 15'. Successivamente vengono aggiunti altri 90 µl di LMA per formare l'ultimo strato. I vetrini sono mantenuti in frigorifero per altri 15'. Le cellule vengono poi lisate overnight a 4°C in una soluzione formata da NaCl 2,5 M, Na₂EDTA 100 mM, TRIS-HCl 10 mM, TRITON X-100 1% e DMSO 10% (pH 10) preparata di fresco. Le cellule lisate sono successivamente sottoposte al processo di "unwinding" e ad elettroforesi. I vetrini vengono disposti parallelamente in una cella elettroforetica orizzontale e poi ricoperti con tampone (Na₂EDTA 1 mM, NaOH 300 mM a pH > 13) mantenuto a 0°C. I campioni vengono lasciati in queste condizioni 20' (pre-elettroforesi) per permettere lo srotolamento del DNA e poi sottoposti a 20' di corsa elettroforetica a 0.78 V/cm e 300 mA. Tutti i passaggi descritti vengono eseguiti in luce gialla per evitare ulteriori danni al DNA.

Terminata l'elettroforesi i vetrini vengono rimossi e trattati con una soluzione di neutralizzazione (ciascun vetrino viene irrorato con 2 ml di trisHCl 0.4M, pH 7.5; si lascia agire per qualche minuto). Successivamente i vetrini vengono fissati per immersione per 3' in etanolo precedentemente mantenuto a -20°C e posti in termostato a 28°C per 24 ore.

L'analisi delle comete e la valutazione del danno viene eseguita mediante l'utilizzo della microscopia a fluorescenza contemporaneamente all'ausilio di specifici software collegati ad analizzatori di immagini (Comet assay III, Perceptive Instruments, UK).

Immediatamente prima della lettura al microscopio, il DNA viene marcato direttamente sul vetrino con 75µl di etidio bromuro (10µg/ml). I vetrini vengono esaminati (ingrandimento 400X) mediante microscopio a fluorescenza (Leica DMLS), equipaggiato con filtro di eccitazione BP515-560 e filtro di sbarramento LP580, collegato con una telecamera monocromatica PULNIX PE-2020P.

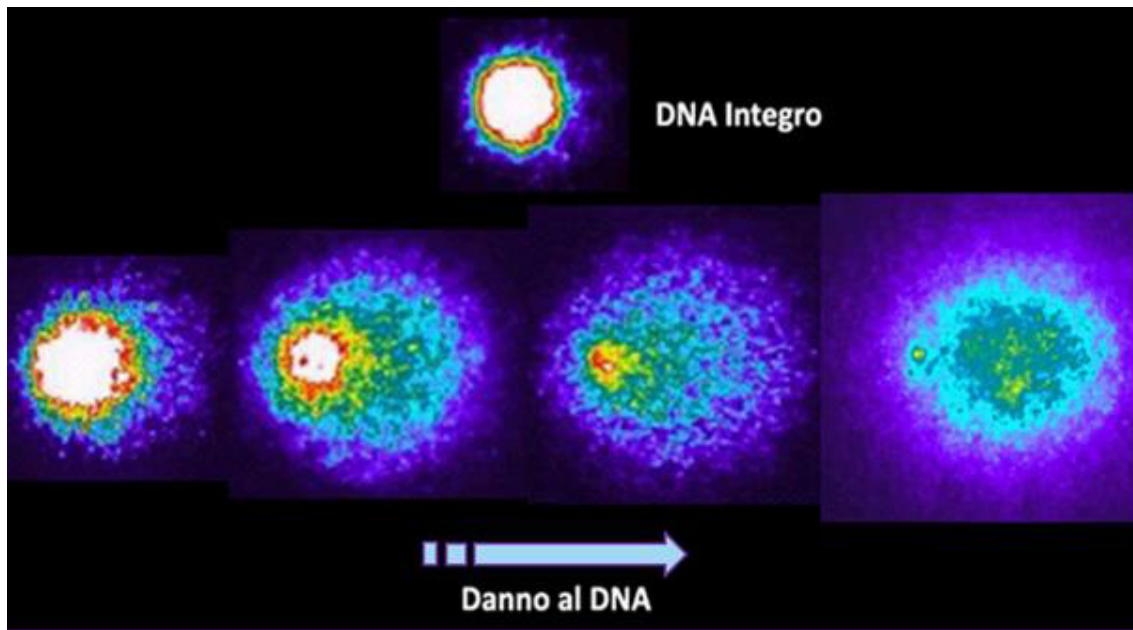


Figura 3.8.1: Immagine al microscopio a fluorescenza dei nuclei di cellule HT-29 diversamente danneggiati

3.8.1 Analisi statistica

I risultati sono stati elaborati statisticamente mediante il programma SPSS 14.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, U.S.A.). È stata applicata l'analisi della varianza univariata (ANOVA), seguita da Bonferroni multiple comparison post-hoc test.

3.9 TUNEL assay

Il saggio per la valutazione dell'apoptosi è stato approntato in due diversi esperimenti nei quali sono state valutate modalità di coltura differenti.

Nel primo esperimento le cellule HT-29 sono state seminate in Chamber Slides BD Falcon™ (2 pozzetti da 1 ml) (metodica Chamber) mentre nel secondo sono state seminate su coprioggetti opportunamente tagliati e posti sul fondo di pozzetti da 1 ml (metodica coprioggetto). In entrambi i casi le cellule sono state seminate alla concentrazione di 1×10^5 cell/ml. Le cellule HT-29 sono state trattate con gli estratti alle concentrazioni 0,1-0.5 g eq. pf/ml provenienti da piantine coltivate in normossia ed in ipossia e campionate a tempi diversi (T0: 0 h, T8: 8 h normossico, T8I: 8 h ipossico).

Il metodo che prevedeva l'utilizzo delle Chamber Slides ha garantito una migliore conservazione della morfologia cellulare, mentre le cellule adese al coprioggetto hanno mostrato alterazioni

morfologiche probabilmente imputabili a stress meccanici durante l'esperimento. Data la migliore conservazione delle cellule si valutano i dati provenienti dall'esperimento condotto sulle Chamber Slides.

La valutazione dei risultati per Tunel assay è stata effettuata valutando la positività nucleare su un numero complessivo di 1000 cellule. Per la maggior parte dei casi non è stato possibile raggiungere tale quota per la perdita di numerose cellule durante l'esperimento.

Il protocollo prevede il fissaggio in una soluzione 1% di paraformaldeide in PBS, pH 7.4 per 20' e 2 lavaggi in PBS per 5'. Successivamente, si è proceduto alla permeabilizzazione (soluzione 2:1 di etanolo:acido acetico fredda per 5' e 2 lavaggi in PBS per 5'), alla inibizione delle perossidasi endogene (immersione dei campioni in una vaschetta contenente H₂O₂ al 3%, in PBS per 10' a RT e lavaggio in PBS o H₂O 5' x 2), all'applicazione sui campioni di 50-100µl di Equilibration Buffer e alla loro incubazione per 10' a RT. Su ogni campione è stata applicata 80µl (volume calcolato per Chamber Slides da 2 senza supporto) di una soluzione composta da 70% di Reaction Buffer e 30% di TdT Enzyme e i campioni sono stati incubati in camera umida per 1 h e 45'. I vetrini sono stati immersi in una coplin jar contenente la soluzione Working Strenght Stop/Wash Buffer (1 ml Stop/Wash Buffer + 34 ml H₂O = 35 ml Working Strenght Stop/Wash Buffer), agitati per 15'', incubati per 10' a RT e sottoposti a 3 lavaggi in PBS (1' x 3). Successivamente ai campioni è stata applicata la Anti-Digoxigenin Peroxidase Conjugate e sono stati incubati in camera umida per 1h a RT. Dopo 4 lavaggi con PBS per 2', si è provveduto allo sviluppo della colorazione applicando sui campioni la soluzione composta da 147 µl di DAB Dilution Buffer + 3 µl di DAB Substrate (1:50) per 5-10' a RT. Dopo ripetuti lavaggi in H₂O, sono stati eseguiti: controcolorazione delle sezioni con Ematossilina di Harys per 5'', 3 lavaggi in H₂O fontis per 2', l'immersione (1'') in alcol (80%) ammoniacale al 3%, disidratazione in serie alcolica crescente di etanolo 80-95-100%, la chiarificazione in xilene ed infine il montaggio del vetrino per la successiva analisi microscopica.

3.10 Protocollo di isolamento di cellule epiteliali di colon murino

Le colture cellulari a lungo termine comunemente impiegate nei laboratori come modello di studio sono generalmente di origine tumorale, oppure cellule non tumorali opportunamente manipolate per poterle mantenere vitali in coltura. Sul mercato è presente una linea cellulare di colon di derivazione epiteliale non tumorale mantenibile in coltura, NCM460 (Normal derived Colon Mucosa) ottenuta dalla mucosa normale di un 68enne ispanico e selezionata per la coltivazione in vitro [Moyer et al.,

1996]. La difficoltà nel reperire tale linea cellulare dovuta a stringenti vincoli quali la sottoscrizione di un secret agreement nonché l'approvazione del progetto da parte della Incell di San Antonio TX, il fornitore della linea NCM460, ci ha spinti nel tentativo di isolare una linea cellulare normale da colon di topo. Come segnala la letteratura si tratta di una via tortuosa, in quanto, come testimonia Kaeffer, la coltura primaria a lungo termine (> 10 giorni) di cellule intestinali è ancora molto difficile nonostante i progressi nelle metodologie di isolamento e nella manipolazione del microambiente cellulare [Kaeffer, 2002]. Gli obiettivi nello stabilire una coltura a lungo termine sono il mantenimento delle proprietà fenotipiche delle cellule progenitrici e differenziate. La coltura in vitro manca di numerosi componenti sistemici implicati nella regolazione omeostatica in vivo, soprattutto quelli del sistema endocrino e nervoso. Inoltre la produzione de novo di una linea cellulare specializzata di un monostrato epiteliale della mucosa normale è limitata e difficile da confermare a causa della grande eterogeneità cellulare dell'organo di partenza. Ad oggi, non è possibile ricreare la mucosa specializzata in vitro, mentre progressi sono stati fatti nelle preparazioni a singola cellula e nel mantenimento breve in coltura.

Terreni di coltura

Terreno di coltura: RPMI al 10% FBS con antibiotici (Penicillina/Streptomicina 1%, Gentamicina 25µg/ml) e fattori di crescita (EGF 50 ng/ml, ITS 1%).

Terreno di coltura per Clonogenic Assay: RPMI 2X al 10% FBS con antibiotici (Penicillina/Streptomicina 1% , Gentamicina 25µg/ml) e fattori di crescita (EGF 50 ng/ml, ITS 1%) allo 0,8% di agarosio (top) e 1% di agarosio (bottom).

Metodi di isolamento

L'isolamento può essere ottenuto mediante quattro procedure:

- espianto di tessuto
- isolamento meccanico mediante dissezione e triturazione di campioni di tessuto
- chelazione
- digestione enzimatica

Il protocollo messo a punto per l'isolamento delle cellule da trattare e sottoporre al Comet assay si è ispirato al metodo proposto da Whitehead [Whitehead et al., 1999] che prevede l'utilizzo sia di colon murino, sia di colon umano tramite processamento della porzione sana di un pezzo operatorio.

Nel protocollo messo a punto per l'isolamento di singole cellule, è stato combinato un passaggio di chelazione (per liberare le cripte dal tessuto) ad uno di digestione enzimatica (per disaggregare le cripte e liberare le cellule).

Isolamento delle cripte: Si è provveduto alla rimozione del colon, ad opportuni lavaggi con PBS e alla sua apertura; i tessuti sono stati incubati in ipoclorito di sodio allo 0,04% per 15' a temperatura ambiente; successivamente è stato effettuato un lavaggio con PBS e all'incubazione con chelanti EDTA (3 mmol/L) e DTT (0,05 mmol/L) per 90' a temperatura ambiente. Dopo circa 3-4 lavaggi in PBS per 15", le frazioni recuperate sono state centrifugate a 400 rpm per 5'.

Disaggregazione delle cripte: Il pellet è stato risospeso in 20 ml di PBS allo 0,25% di pancreatina e incubato per 90' a temperatura ambiente. Successivamente è stato diluito con un uguale volume di PBS, centrifugato (1000 rpm per 5 minuti) e risospeso in EDTA/DTT. Le cellule sono state osservate al microscopio per valutazione della vitalità mediante Trypan blue.

4. Risultati

4.1 Livelli di ossigeno nel sistema sperimentale per l'induzione di ipossia nelle piante di spinacio

Le piante di spinacio sono state coltivate fino allo stadio di 5-6 foglie in un sistema idroponico costantemente aerato contenente un medium di coltura basato su di una versione modificata della soluzione salina Hoagland. L'ipossia è stata indotta all'apparato radicale delle piante sospendendo l'aerazione della soluzione nutriente e coprendo la superficie per prevenire lo scambio gassoso con l'atmosfera, mentre le foglie e i germogli di tutte le piante sono rimasti all'aria.

La riossigenazione di un campione di piante è stata indotta dopo 24 ore di ipossia, riprendendo l'aerazione del medium di coltura. Prima dell'induzione dell'ipossia, la concentrazione di ossigeno nella soluzione salina Hoagland era come la concentrazione di ossigeno nell'aria (7,8 mg/l), dato che vi era un buono scambio gassoso con l'aria (Fig. 4.1.1).

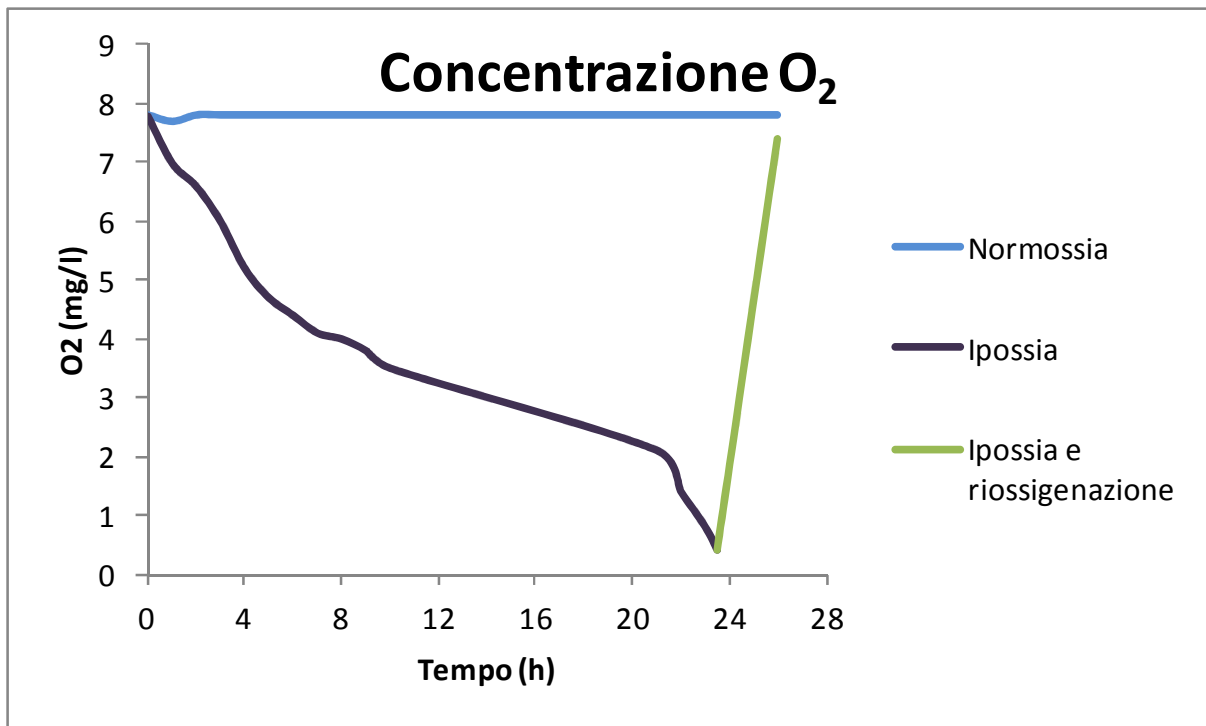


Fig. 4.1.1: Cambiamento della concentrazione di O₂ nella soluzione nutriente del sistema idroponico usato per la coltivazione dello spinacio dopo induzione di ipossia e dopo la riossigenazione. I valori si riferiscono ad una vasca contenente 2,5 L di soluzione nutriente e 12 piante. Nella vasca di controllo non è stata sospesa l'aerazione.

Dal momento della sospensione dell'aerazione e della copertura della superficie della soluzione si nota una progressiva diminuzione della concentrazione di ossigeno dovuta al consumo dell'ossigeno presente nel medium dalle radici delle piante. I livelli di ossigeno sono diminuiti costantemente fino a raggiungere circa 3 mg/l in 12 ore. L'ipossia è stata raggiunta approssimativamente 8-12 h dopo la sospensione dell'aerazione, quando la concentrazione di ossigeno è diventata un fattore limitante e ha raggiunto il valore più basso di 0,4 mg/l dopo 24 ore. Nella vasca contenente le piante sottoposte a riossigenazione dopo 24 ore di ipossia, si osserva un rapido incremento della concentrazione di ossigeno che dopo 2h raggiunge valori vicini a quelli delle piante coltivate in normossia.

Vengono riportati e analizzati i dati del trattamento delle cellule HT-29 con gli estratti liofilizzati e con il succo di spinacio. Ogni sperimentazione comprende diversi saggi su campioni di spinacio derivanti da coltivazioni indipendenti.

4.2 Definizione della composizione chimica degli estratti mediante analisi HPLC-MS

Per la caratterizzazione chimica di miscele complesse l'impiego della cromatografia liquida ad alta prestazione HPLC accoppiata con la spettrometria di massa MS è un valido strumento per la separazione e la caratterizzazione delle molecole costituenti. A questo scopo, HPLC-MS è stata utilizzata per la separazione e l'identificazione delle molecole presenti direttamente dall'estratto delle foglie di spinacio.

I campioni sottoposti all'analisi sono stati T0 come controllo, T24I (24 ore dopo la sospensione dell'aerazione del medium di coltura delle piante) e T26 (2 ore dopo la riossigenazione).

Dalla tabella 4.2.1 è possibile osservare i principali picchi individuati dei metaboliti secondari e la loro presenza relativa al controllo. Si può osservare come molti composti antiossidanti sono stati riconosciuti nell'estratto di spinacio e che la loro concentrazione cambia in funzione dello stress ipossico imposto dopo 24 ore e in seguito alla riossigenazione:

Il picco n. 1 mostra lo ione precursore caratteristico dell'acido ascorbico. Questa vitamina idrofila dalle note proprietà antiossidanti risulta incrementata di ben 4 volte dopo 24 h di carenza di ossigeno rispetto al controllo. Dopo la riossigenazione si osserva un decremento ad un livello che rimane comunque di 2,6 volte più alto rispetto al controllo.

Il picco n. 2 sviluppa la forma protonata e deprotonata caratteristica dell'acido ferulico. L'acido ferulico è un acido idrossicinnamico dalle note proprietà antiossidanti che reagisce con i ROS durante stress ossidativi. Si osserva un lieve incremento dopo 24 ore di trattamento ipossico, mentre la riossigenazione non ne determina una sensibile variazione rispetto al controllo.

I picchi n. 3 e 10 sono associati al flavonol diglicoside e al flavonol glicoside rispettivamente, che appartengono al gruppo dei flavonoidi, molecole che possiedono attività antiossidante, anti-infiammatoria, antiallergica antibiotica e anticancerogena. Attualmente non è possibile determinarne completamente la struttura, ma è possibile indicativamente identificarli come flavonoli mono o di glicosidi in base alla loro tipica frammentazione ionica. Dai risultati ottenuti emerge che il flavonol diglicoside ha un comportamento simile a quello della vitamina C con un incremento di circa 4 volte dopo 24 h dall'induzione di ipossia e una diminuzione a circa 2,7 volte la concentrazione del controllo dopo 2 h di riossigenazione.

Al contrario il flavonol glicoside mostra un comportamento differente con un lieve aumento di circa 2 volte dopo le 24 h del trattamento ipossico e un significativo aumento di circa 21 volte quello basale dopo la riossigenazione.

Il picco n. 4 è stato identificato come 20-idrossiecdisone, un ecdisteroide dalle note proprietà toniche, cicatrizzanti e antiossidanti. La sua concentrazione incrementa di 2,5 volte rispetto al controllo dopo le 24 h del trattamento ipossico, mentre diminuisce dell'11% nel riossigenato.

Il picco n. 5 è stato identificato come α -tocoferolo, la forma più attiva di vitamina E. Lo stress ipossico induce un aumento di circa due volte rispetto al controllo, mentre la riossigenazione non determina un sostanziale aumento di questa molecola.

I picchi n. 6, 7, 8 e 9 sono associati a flavonoidi tipici dello spinacio [Aehele et al., 2004; Bergquist et al., 2005]. Per tutti è stata riscontrata un'alta presenza nel campione di controllo, con un incremento maggiore di 2 volte dopo 24 ore di ipossia ed un ritorno ai valori basali dopo 2h di riossigenazione.

Il picco n. 11 non è associato ancora ad una molecola nota, in quanto m/z di 341,3 coincide con il rapporto massa/carica caratteristico dell'esculina, ma non con i suoi frammenti. Durante l'ipossia si ha una significativa diminuzione della molecola ad un terzo di quella presente nel controllo, mentre si ha un notevole aumento di ben 20 volte durante la riossigenazione.

Tab. 4.2.1: Principali picchi identificati mediante HPLC-MS, presenza relativa e identità chimica negli estratti T24 (dopo 24 dall'inizio della induzione dell'ipossia), T26 (dopo due ore dopo la riossigenazione).

Picco n.	Retention time (min)	[M-H] ⁻ m/z	[M-H] ⁺ m/z	Presenza relativa riferita al T0		Nome proposto
				T24	T26	
1	0,5	175,0		446%	262%	Acido Ascorbico
2	4,4	193,0	195,0	159%	99%	Acido ferulico
3	5,2	639,2	641,2	424%	278%	Flavonol diglicoside
4	5,5		481,3	248%	89%	20-Ipdrossiecdisone (20HE)
5	6	429,3	431,3	234%	132%	α-tocoferolo
6	6,1	535,4	537,4	285%	87%	Jaceidinglucuronide
7	6,2	521,1	523,1	238%	140%	Spinacetinglucuronide
8	6,4	519,1	521,1	277%	115%	5,3',4'-Trihydroxy-3-methoxy-6:7-methylenedioxyflavone-4'-glucuronide
9	6,5	533,1	535,1	259%	94%	5,4'-dihydroxy-3,3'-dimethoxy-6:7-methylenedioxyflavone-4'-glucuronide
10	9,2	425,3		194%	2120%	Flavonol glicoside
11	9,7	339,3	341,3	32%	2052%	Non identificato

Nella tabella 4.2.2 sono mostrate le principali molecole peculiari dello spinacio prese in considerazione nelle diverse metodiche di estrazione da foglie fresche di spinacio acquistate presso la grande distribuzione. E' stato fatto il confronto rispetto al T0 (estratto idrofilo da foglie di spinacio coltivate nelle condizioni sperimentali) e rispetto al succo fresco puro.

L'acido ferulico è risultato molto meno concentrato (in media più del 98% in meno) in tutti gli estratti di foglie di spinacio commerciale rispetto al T0. Il succo ne contiene circa quanto l'estratto idrofilo, mentre è inferiore nel succo estratto con l'aggiunta di acqua.

La concentrazione del α-tocoferolo è notevolmente inferiore (in media del 95% in meno) rispetto al T0 in tutti e tre gli estratti. Il succo con l'acqua ne ha una concentrazione inferiore del 12%, mentre l'estratto idrofilo ne contiene 2,7 volte in più rispetto al succo fresco.

Per quanto riguarda le molecole Jaceidin glucuronide, Spinacetin glucuronide , 5,3',4'-Trihydroxy-3-methoxy-6:7-methylenedioxyflavone-4'-glucuronide, Patuletin-3-glucosyl-(1→6)[apiosyl(1→2)]-glucoside, il puro succo risulta averne concentrazioni maggiori rispetto al T0, seguito dall'estratto idrofilo, mentre il succo estratto con acqua contiene più jaceidin glucuronide e 5,3',4'-Trihydroxy-3-methoxy-6:7-methylenedioxyflavone-4'-glucuronide, ma quantità inferiori di circa il 30% delle altre due molecole rispetto al T0. Spinacetin-3- glucosyl-(1→6)[apiosyl(1→2)]-glucoside risulta essere presente in quantità maggiori nel puro succo.

Tab.4.2.2: Principali molecole identificate mediante HPLC-MS, presenza relativa e identità chimica negli estratti: Succo, Succo + acqua ed estratto idrofilo.

[M-H] m/z	Presenza relativa riferita al T0			Presenza relativa riferita al succo		Nome proposto
	Succo	Succo+H ₂ O	Estratto Idrofilo	Succo+H ₂ O	Estratto Idrofilo	
193,0	2%	1%	2%	65%	103%	Acido ferulico
429,3	3%	3%	9%	88%	272%	α-tocoferolo
535,4	280%	131%	182%	47%	65%	Jaceidin glucuronide
521,1	127%	72%	100%	57%	79%	Spinacetin glucuronide
519,1	154%	105%	138%	68%	90%	5,3',4'-Trihydroxy-3-methoxy-6:7-methylenedioxyflavone-4'-glucuronide
787,4	194%	70%	113%	36%	58%	Patuletin-3-glucosyl-(1→6)[apiosyl(1→2)]-glucoside
801,3	-	-	-	44%	78%	Spinacetin-3- glucosyl-(1→6)[apiosyl(1→2)]-glucoside

4.3 Valutazione dell'attività antiproliferativa

Estratti liofilizzati

Inizialmente è stato condotto il saggio MTS che ha dato risultati inattesi, indicando un effetto altamente proliferante delle cellule HT-29 trattate con gli estratti di spinacio per 24 ore. L'ipotesi che il dato fosse stato viziato dalla patina di riagglutinazione che gli estratti hanno formato sulla superficie cellulare, producendo una colorazione indipendente e contrastante quella attesa dalla produzione di formazano (Fig. 4.3.1) è stata confermata dal Trypan blue assay. Il conteggio della concentrazione cellulare dopo il trattamento con gli estratti (0,5 g eq. pf/ml) ha indicato un'azione antiproliferativa e entrambi gli estratti liofilizzati delle piante coltivate in normossia ed in ipossia

hanno mostrato di influenzare sensibilmente la vitalità cellulare. Si è provveduto, inoltre, a determinare la vitalità cellulare, rilevando la citotossicità dell'estratto di spinacio sulle cellule HT-29 dopo 24 ore di trattamento con gli estratti (Figg. 4.3.2 e 4.3.3).

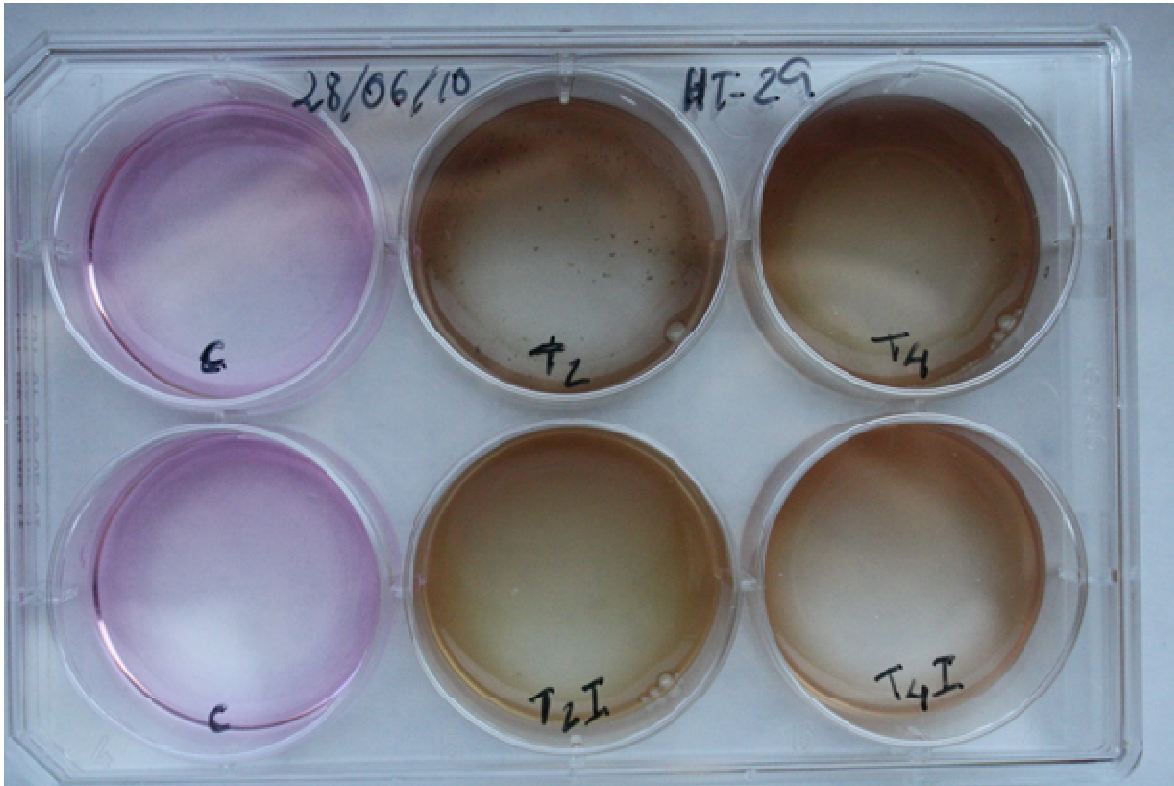


Fig.4.3.1: Piastra di coltura da 6 pozzetti (CELLSTAR®) dove è possibile osservare la differente colorazione dei controlli (C) rispetto ai trattati (T2,T2I,T4 e T4I).

Per la valutazione dell'attività antiproliferativa degli estratti è stata scelta una metodica altamente sensibile che non venisse influenzata dalla colorazione intrinseca degli estratti. L'analisi è stata condotta mediante rilevazione in luminescenza.

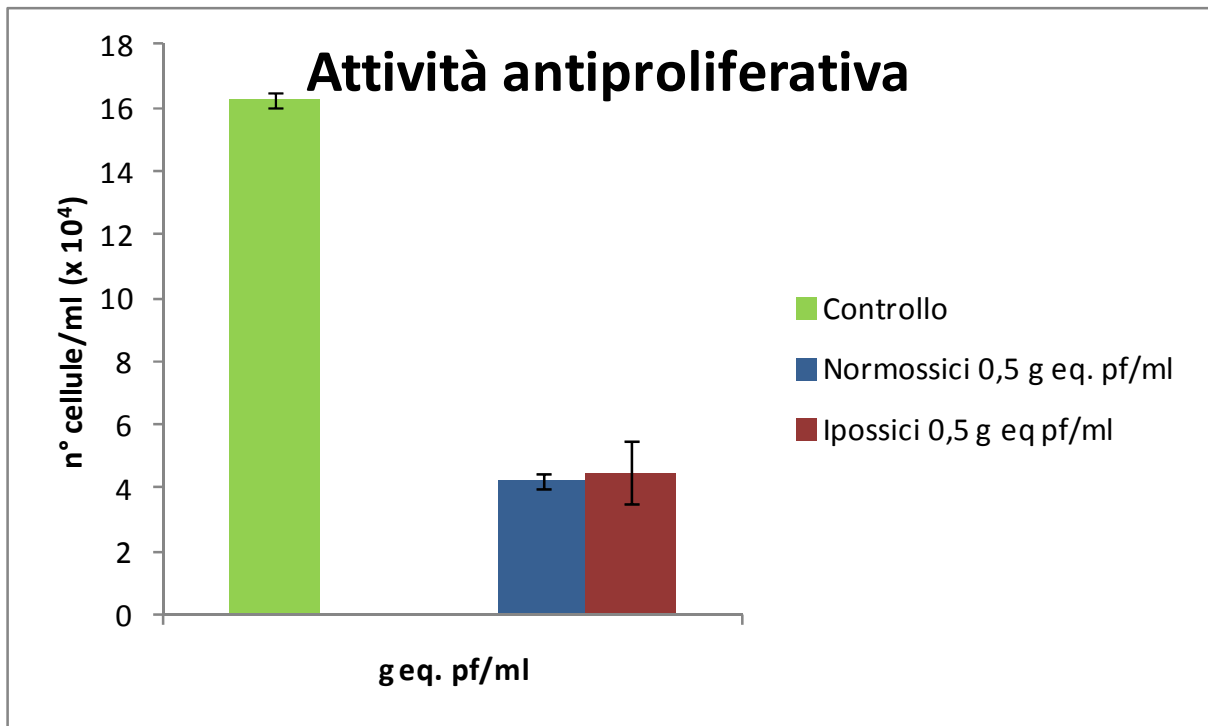


Fig. 4.3.2: Attività antiproliferativa degli estratti liofilizzati (0,5 g eq. pf/ml) provenienti da piante coltivate in normossia e in ipossia sulla linea cellulare HT-29 (24 h trattamento) mediante colorazione con Trypan blue. In ascissa è riportata la concentrazione degli estratti, mentre in ordinata il numero di cellule per ml ($\times 10^4$) \pm Errore Standard.

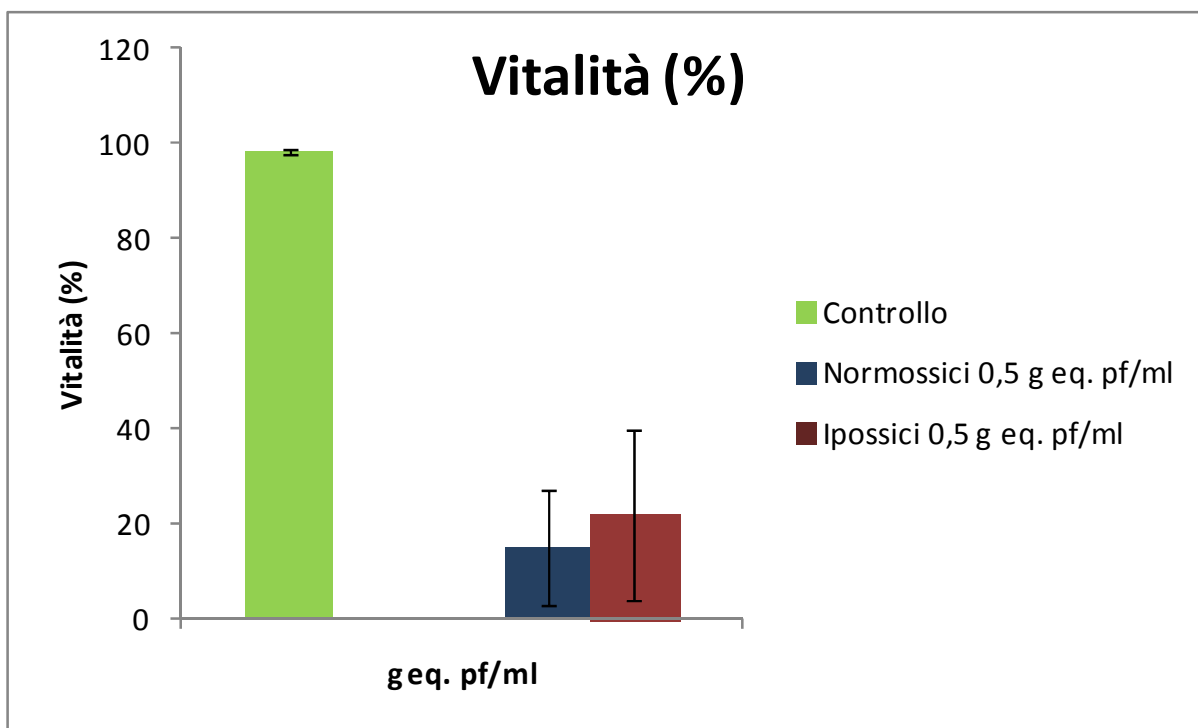


Fig. 4.3.3 Attività citotossica degli estratti liofilizzati (0,5 g eq. pf/ml) provenienti da piante coltivate in normossia e in ipossia sulla linea cellulare HT-29 (24 h trattamento) mediante colorazione con trypan blue. In ascissa è riportata la concentrazione degli estratti (g eq. pf/ml), in ordinata la vitalità (%) \pm Errore Standard.

I risultati relativi ai campioni della prima sperimentazione coltivati in normossia (T0, T4, T8 e T12) e in ipossia (T0I, T4I, T8I e T12I) (Tab. 3.3.1) sono riportati Figg. 4.3.4 e 4.3.5.

Gli estratti normossici influenzano significativamente la crescita cellulare, in particolare alla concentrazione più alta saggiata (0,5 g eq. pf/ml) (Fig. 4.3.4). A questa concentrazione tutti gli estratti mostrano un'attività antiproliferativa $T8 > T0 = T4 > T12$ con una percentuale di inibizione della crescita cellulare rispettivamente di circa 80, 60, 50 e 40% della crescita delle cellule HT-29.

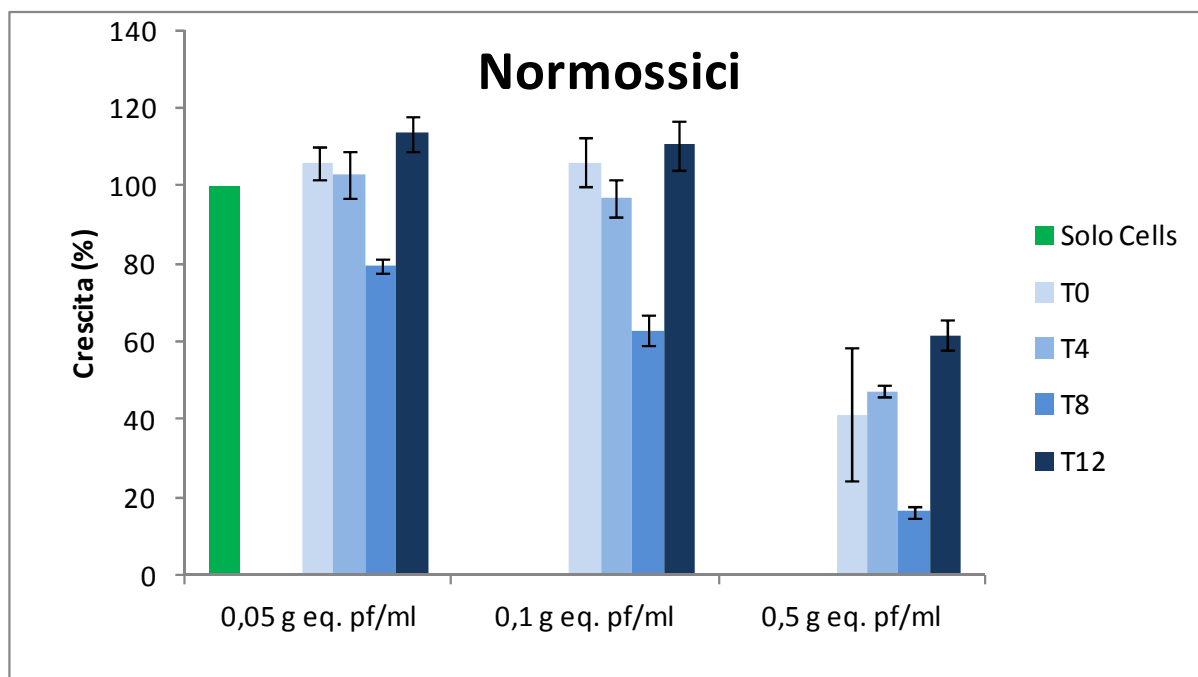


Fig 4.3.4: Saggio in luminescenza. Analisi della percentuale di crescita della linea cellulare HT-29 dopo 24 ore di trattamento con estratti liofilizzati di spinacio a differenti tempi di campionamento (T0, T4, T8 e T12) di piante coltivate in normossia. In ascissa è riportata la concentrazione degli estratti, mentre in ordinata la crescita percentuale.

Come si evince dalla Fig. 4.3.5, anche gli estratti ipossici influenzano significativamente la crescita cellulare alla concentrazione più alta saggiata (0,5 g eq. pf/ml). Tutti gli estratti mostrano un'alta attività antiproliferativa (T0I, T4I e T8I ~90%; T12I ~ 60%), superiore a quella osservata nei campioni coltivati in normossia (Figura 4.3.5).

Considerando l'attività antiproliferativa totale, alla concentrazione di 0,05 g eq. pf/ml entrambi gli estratti non influenzano la crescita cellulare. Alla concentrazione di 0,1 g eq. pf/ml vi è una lieve influenza, mentre alla concentrazione di 0,5 g eq. pf/ml si registra una riduzione altamente significativa ($p < 0,01$) della crescita cellulare di ~ 60% e > 80% per gli estratti liofilizzati delle piante coltivate in normossia e in ipossia, rispettivamente. Gli estratti delle piante coltivate in ipossia mostrano un'attività antiproliferativa maggiore della controparte coltivata in normossia (Fig. 4.3.6).

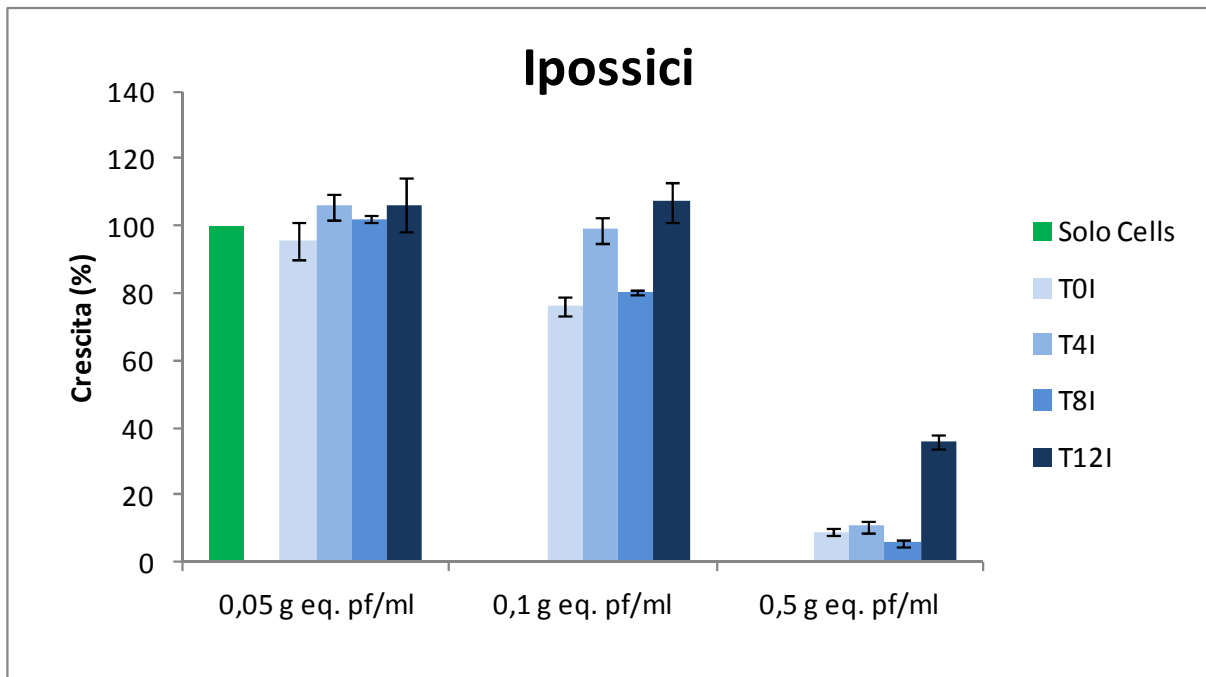


Fig 4.3.5: Saggio in luminescenza. Analisi della percentuale di crescita della linea cellulare HT-29 dopo 24 ore di trattamento con estratti liofilizzati di spinacio a differenti tempi di campionamento (T0I,T4I,T8I e T12I) di piante coltivate in ipossia. In ascissa è riportata la concentrazione degli estratti, mentre in ordinata la crescita percentuale.

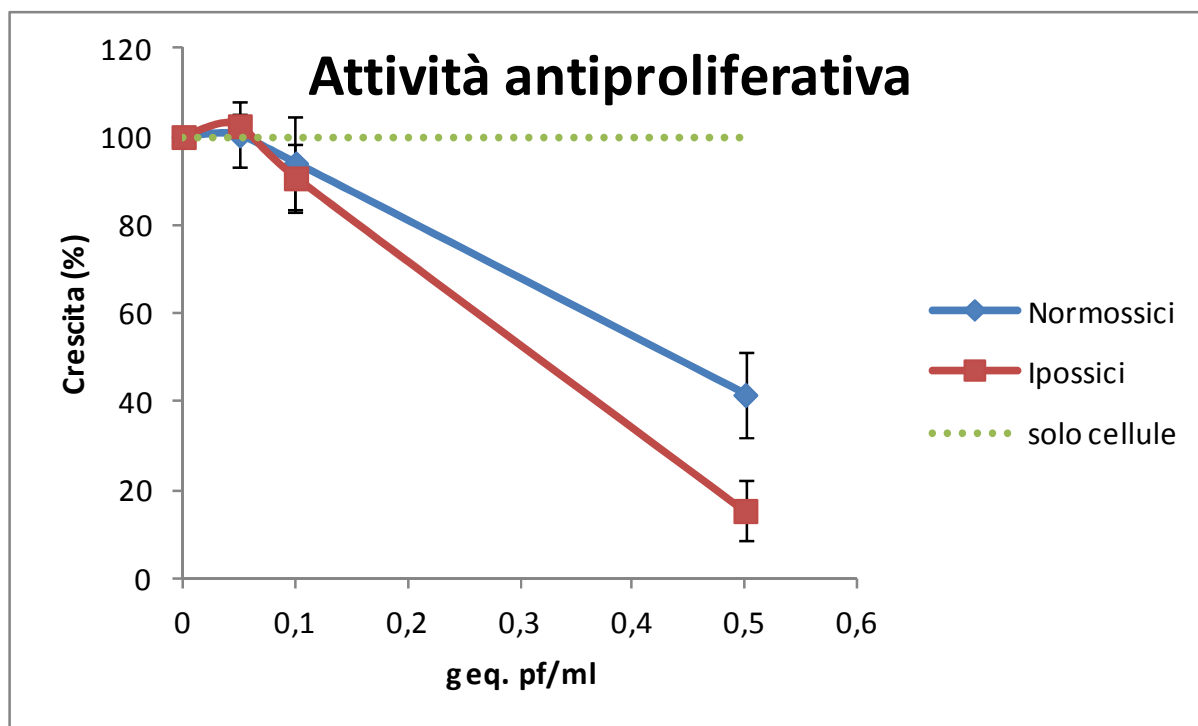


Fig 4.3.6: Saggio in luminescenza. Attività antiproliferativa totale degli estratti liofilizzati di piante coltivate in normossia e in ipossia. Per ogni concentrazione vengono riportati media di tutti gli estratti ed errore standard. In ascissa è riportata la concentrazione degli estratti, mentre in ordinata la crescita percentuale.

Successivamente, dopo aver ottenuto gli estratti normossici (T0, T6, T12, T24 e T26) e ipossici (T0I, T6I, T12I, T24I e T26I) della seconda sperimentazione (Tab. 3.3.2), derivanti da una nuova coltivazione indipendente, anch'essi sono stati sottoposti al saggio di proliferazione in luminescenza (Figg. 4.3.7 e 4.3.8). Sono state saggiate le concentrazioni di 0,1 e 0,5 g eq. pf/ml, mentre non è stata saggiata la concentrazione di 0,05 g eq. pf/ml in quanto precedentemente non ha mostrato di influenzare la crescita della linea cellulare tumorale HT-29 (Fig. 4.3.6). Dalla Fig. 4.3.7 si può osservare come alla concentrazione più bassa (0,1 g eq. pf/ml) tutti gli estratti normossici non presentano attività antiproliferativa, mentre alla concentrazione più alta (0,5 g eq. pf/ml) tutti gli estratti mostrano un'attività antiproliferativa sulla linea cellulare tumorale HT-29, con una riduzione di crescita media del 50%.

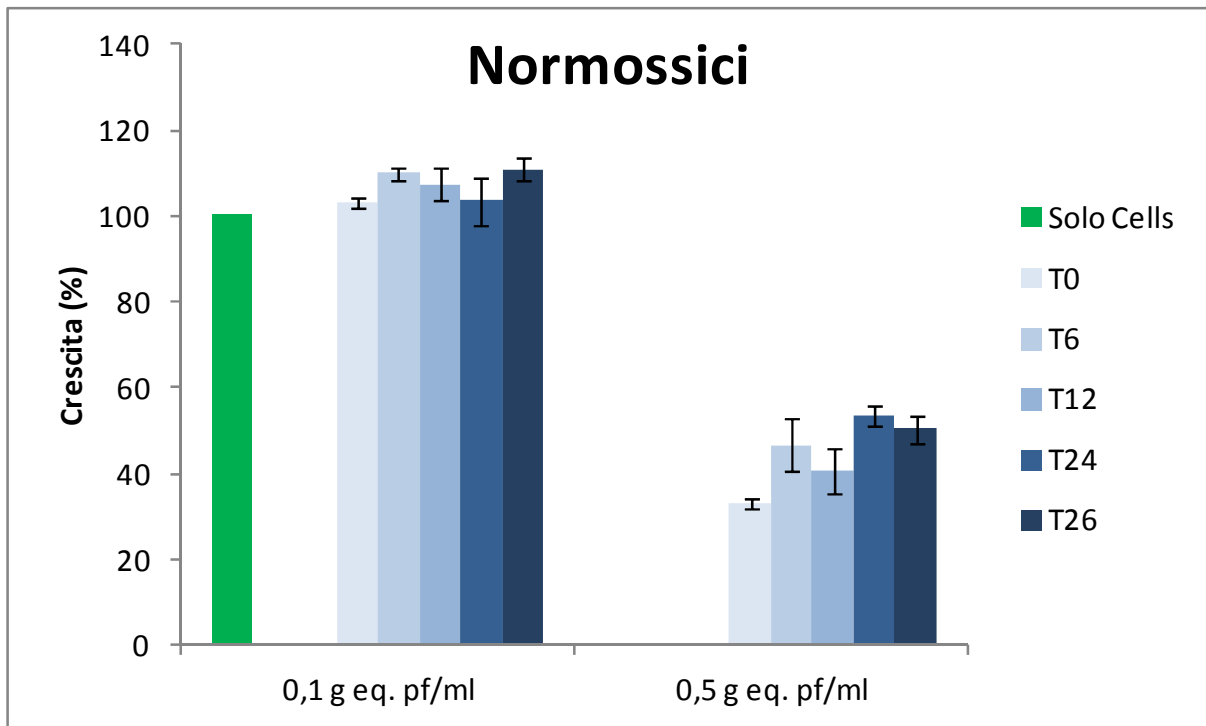


Fig. 4.3.7: Saggio in luminescenza. Analisi della percentuale di crescita della linea cellulare HT-29 dopo 24 ore di trattamento con estratti liofilizzati di spinacio a differenti tempi di campionamento (T0,T6,T12,T24 e T26) di piante coltivate in normossia. In ascissa è riportata la concentrazione degli estratti, mentre in ordinata la crescita percentuale.

Dalla Fig. 4.3.8 si può osservare che alla concentrazione più bassa (0,1 g eq. pf/ml) tutti gli estratti ipossici non influenzano significativamente la crescita, mentre alla concentrazione più alta (0,5 g eq. pf/ml) si osserva un progressivo aumento dell'attività antiproliferativa, a partire da T0I (~ 60%) che culmina con T12I che mostra l'attività antiproliferativa maggiore (~ 90%). T24I mostra una capacità antiproliferativa ridotta (~ 50%), che aumenta nuovamente per il campione post-riossigenazione T26I.

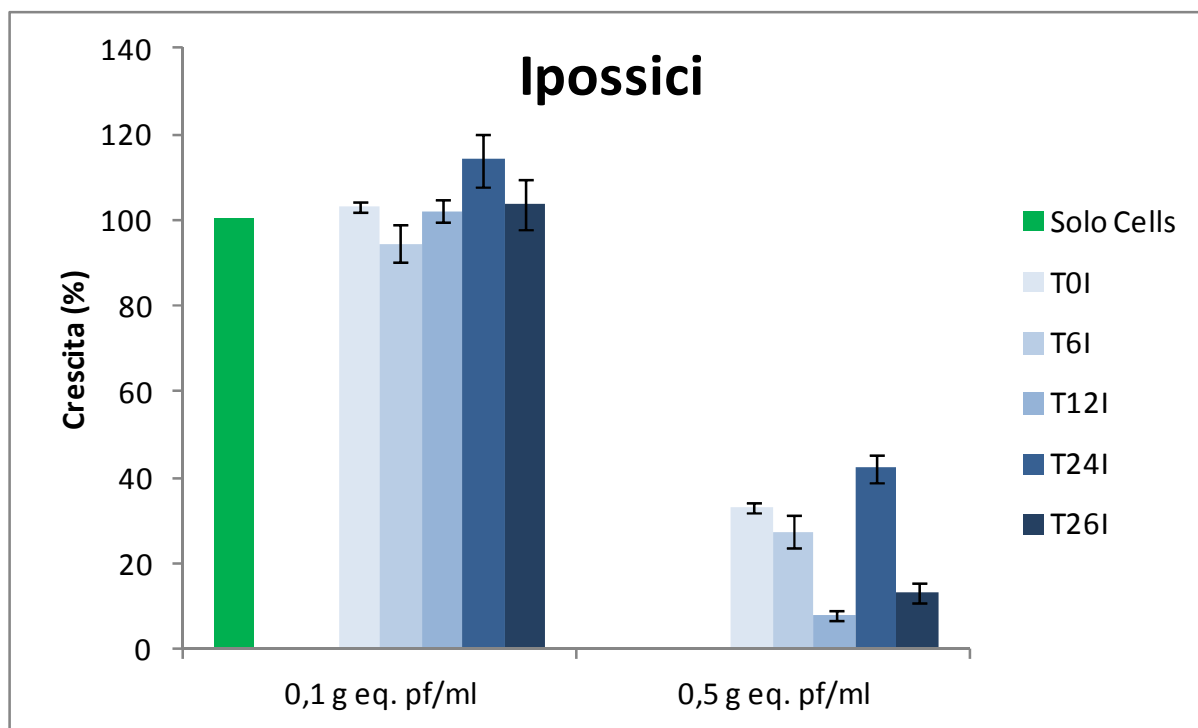


Fig. 4.3.8: Saggio in luminescenza. Analisi della percentuale di crescita della linea cellulare HT-29 dopo 24 ore di trattamento con estratti liofilizzati di spinacio a differenti tempi di campionamento (T0I,T6I,T12I,T24I e T26I) di piante coltivate in ipossia. In ascissa è riportata la concentrazione degli estratti, mentre in ordinata la crescita percentuale.

Considerando l'attività antiproliferativa totale, alla concentrazione di 0,1 g eq. pf/ml non si osserva inibizione della proliferazione; alla concentrazione di 0,5 g eq. pf/ml si riscontra una riduzione altamente significativa ($p < 0,01$) della crescita cellulare del 55 e del 75% per gli estratti liofilizzati delle piante coltivate in normossia e in ipossia, rispettivamente. Come nella sperimentazione precedente gli estratti delle piante coltivate in ipossia mostrano un'attività antiproliferativa maggiore della controparte coltivata in normossia (Fig. 4.3.9).

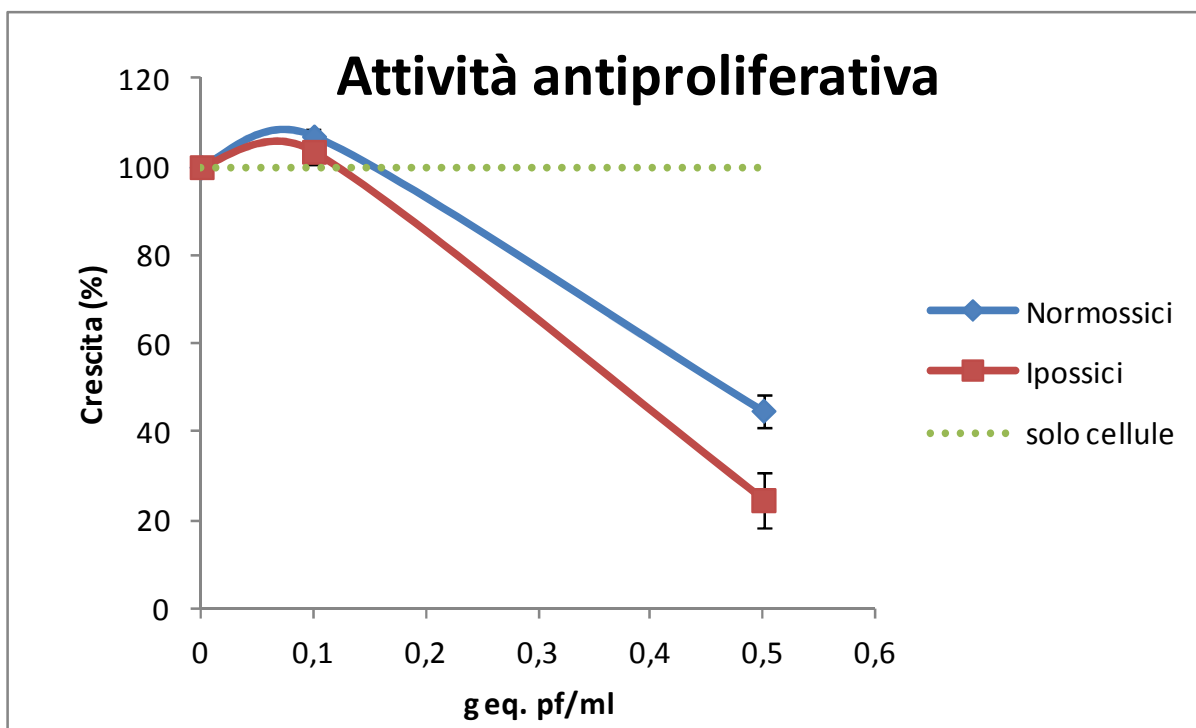


Fig 4.3.9: Saggio in luminescenza. Attività antiproliferativa totale degli estratti liofilizzati di piante coltivate in normossia e in ipossia. Per ogni concentrazione vengono riportati media di tutti gli estratti ed errore standard. In ascissa è riportata la concentrazione degli estratti, mentre in ordinata la crescita percentuale.

Per analizzare l'andamento dell'attività degli estratti ipossici della prima e seconda sperimentazione si è scelto di riportare la percentuale di crescita cellulare in funzione della concentrazione di ossigeno (mg/L) (Figg. 4.3.10 e 4.3.11).

Dal grafico (Fig. 4.3.10) relativo agli estratti di spinacio coltivato in ipossia per un intervallo di tempo di 12 ore del primo esperimento, si osserva che tutti gli estratti mostrano un'alta attività antiproliferativa (con T0I T4I e T8I di circa il 90% mentre T12I minore degli altri estratti e di circa il 60%). Comparando tale attività con la concentrazione di ossigeno si evidenzia una riduzione dell'attività antiproliferativa quando la concentrazione di ossigeno si riduce al di sotto di 1 mg/L.

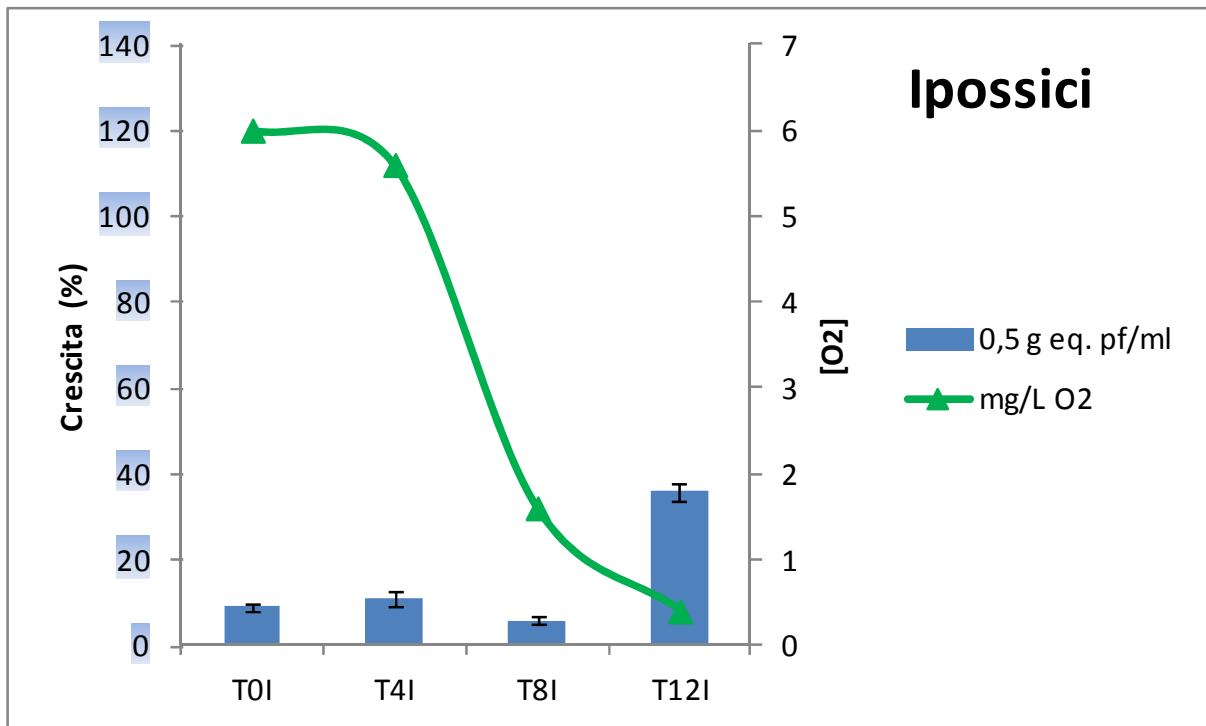


Fig. 4.3.10: Grafico dell'inibizione della crescita cellulare in funzione della concentrazione di ossigeno (mg/L) di cellule HT-29 trattate per 24 ore con estratti di spinacio (0,5 g eq.pf/ml) coltivato in ipossia. In ascissa sono riportati gli estratti ai diversi tempi di campionamento. In ordinata principale è riportata la crescita percentuale. In ordinata secondaria si ritrova la concentrazione di ossigeno in mg/L.

Dal grafico (Fig. 4.3.11) relativo agli estratti di spinacio coltivato in ipossia per un intervallo di tempo di 26 ore del secondo esperimento, si osserva un progressivo aumento dell'attività antiproliferativa, a partire da T0I (~ 60%) che culmina con T12I che mostra l'attività antiproliferativa maggiore (~ 90%). T24I mostra una capacità antiproliferativa ridotta (~ 50%), che aumenta nuovamente per il campione post-riossigenazione T26I. Anche in questo caso si ritrova la correlazione tra l'attività antiproliferativa e la concentrazione di ossigeno con la riduzione dell'attività antiproliferativa quando la concentrazione di ossigeno si riduce al di sotto di 1 mg/L; attività che viene nuovamente ripristinata con l'aumento della concentrazione di ossigeno, come dimostrato nel campione post-riossigenazione T26I.

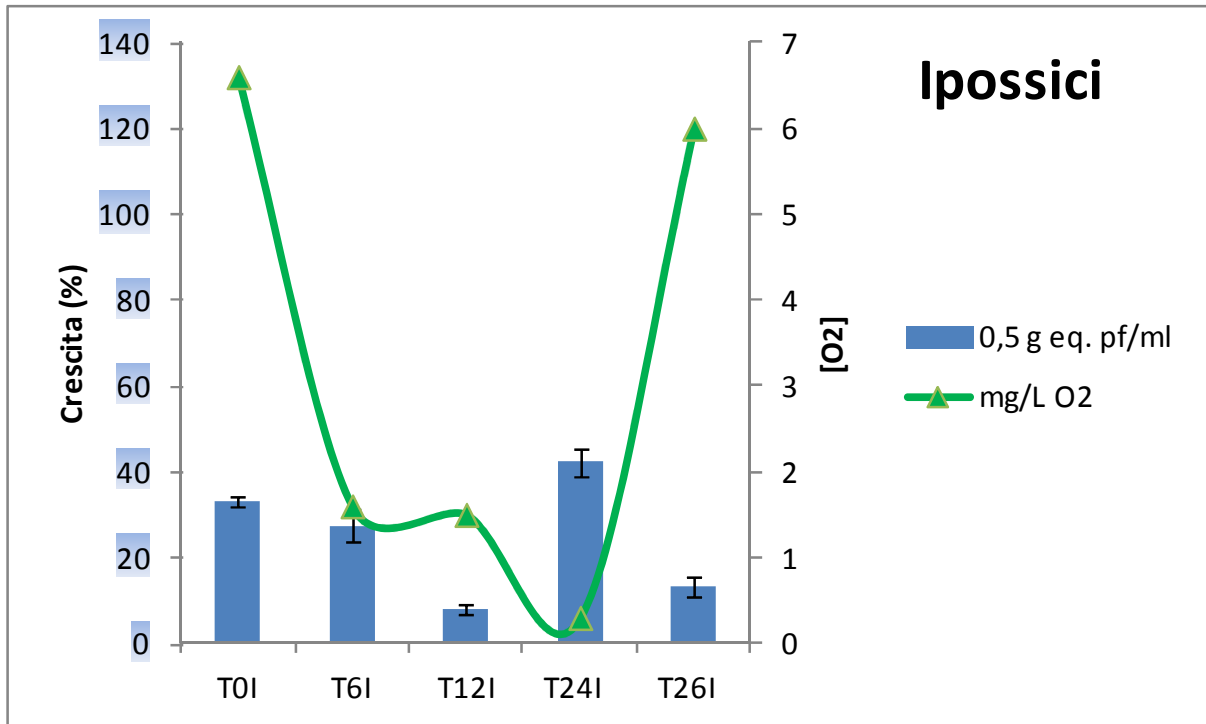


Fig. 4.3.11: Grafico dell'inibizione della crescita cellulare in funzione della concentrazione di ossigeno (mg/L) di cellule HT-29 trattate per 24 ore con estratti di spinacio coltivato in ipossia. In ascissa sono riportati gli estratti ai diversi tempi di campionamento. In ordinata principale è riportata la crescita percentuale. In ordinata secondaria si ritrova la concentrazione di ossigeno in mg/L.

Succo

L'analisi dell'attività antiproliferativa e citotossica del puro succo di spinacio di piante coltivate per 24 ore in normossia e in ipossia è stata eseguita mediante Trypan blue assay. Il campione è stato saggiato alle concentrazioni di 10%, 25% e 50% (rispettivamente 0,6-1,5-3 g eq. pf/ml). Si riportano i grafici relativi all'attività antiproliferativa dopo 24 e 48 ore di trattamento con gli estratti. Si riporta la citotossicità relativa alle 24 ore di trattamento con gli estratti, in quanto dopo 48 ore non si è potuta determinare, probabilmente a causa della perdita di adesione cellulare conseguente alla morte che ha determinato l'allontanamento delle cellule non adese dal campione in analisi durante le normali procedure di esecuzione del saggio.

Attività antiproliferativa

L'attività antiproliferativa del succo di spinacio dopo 24 h di trattamento (Fig. 4.3.12) si apprezza lievemente per le concentrazioni 1,5 e 3 g eq. pf/ml per entrambe le tipologie di succo; alla concentrazione di 0,6 g eq. pf/ml l'estratto delle piante coltivate in normossia non influenza la crescita cellulare, mentre l'estratto delle piante coltivate in ipossia ne sostiene la crescita. Dopo 48 h di trattamento con il succo di spinacio (Fig. 4.3.13), si evidenzia un'elevata attività antiproliferativa della concentrazione 3 g eq. pf/ml con una riduzione della crescita cellulare di circa l'80% sia per il succo delle piante coltivate in normossia sia per quello delle piante coltivate in ipossia. Alla concentrazione di 1,5 g eq. pf/ml le due tipologie di estratti mostrano un'attività differente: i normossici mostrano un'attività antiproliferativa del 10% contrariamente agli ipossici con un'attività maggiore pari al 55%. Alla concentrazione di 0,6 g eq. pf/ml entrambe le tipologie di succo non influenzano la crescita cellulare.

Citotossicità

La citotossicità del succo di spinacio dopo 24 ore di trattamento (Fig. 4.3.14) si apprezza solo alla concentrazione più alta (3 g eq. pf/ml). Sia i campioni coltivati in normossia sia quelli coltivati in ipossia hanno mostrato una sensibile riduzione della vitalità cellulare, con una maggiore citotossicità dei secondi rispetto ai primi come già osservato per gli estratti liofilizzati.

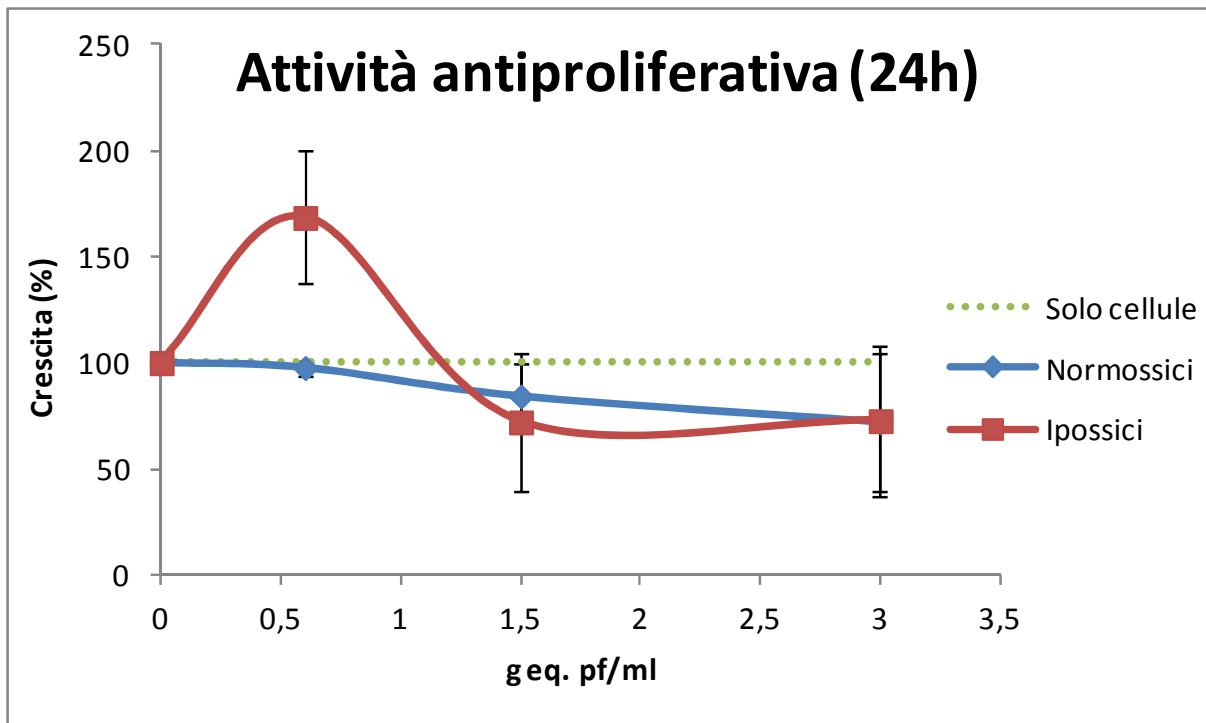


Fig. 4.3.12: Valutazione dell'attività antiproliferativa dopo 24 h di trattamento con succo di spinacio (0 - 0,6 - 1,5 e 3 g eq. pf/ml) provenienti da piante coltivate in normossia e in ipossia sulla linea cellulare HT-29 mediante colorazione con Trypan blue. In ascissa è riportata la concentrazione degli estratti, mentre in ordinata la crescita percentuale.

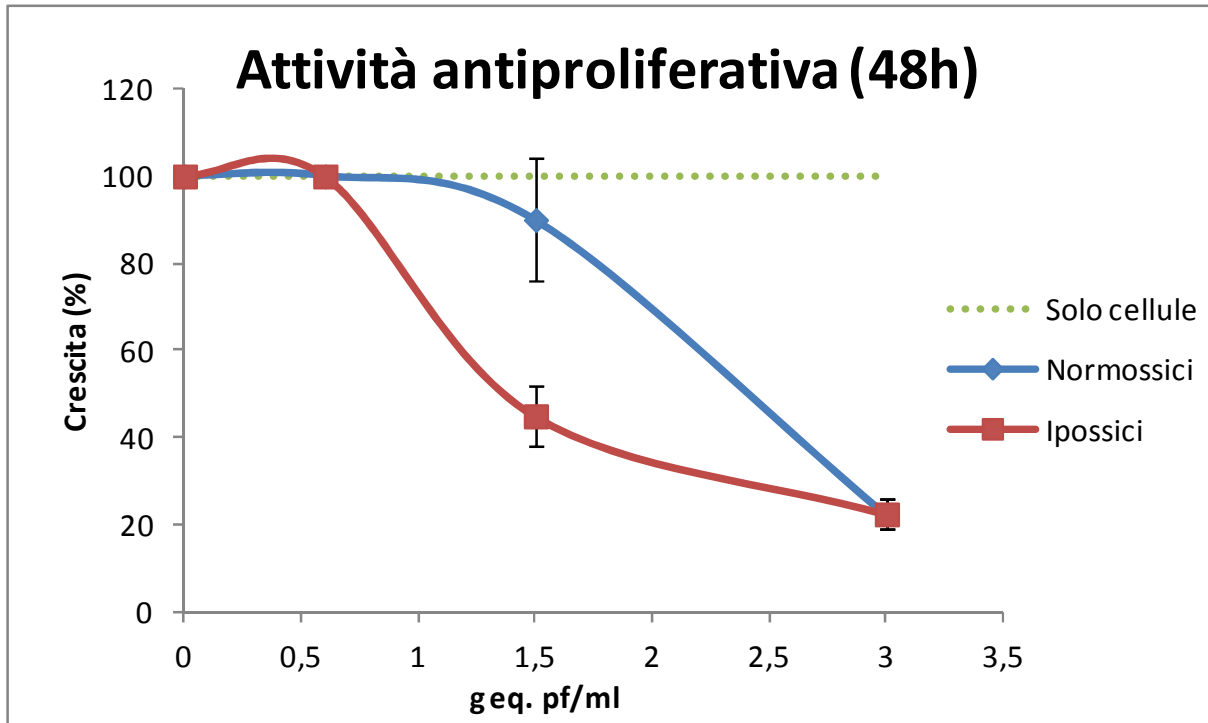


Fig. 4.3.13: Valutazione dell'attività antiproliferativa dopo 48 h di trattamento con succo di spinacio (0 - 0,6 - 1,5 e 3 g eq. pf/ml) provenienti da piante coltivate in normossia e in ipossia sulla linea cellulare HT-29 mediante colorazione con Trypan blue. In ascissa è riportata la concentrazione degli estratti, mentre in ordinata la crescita percentuale.

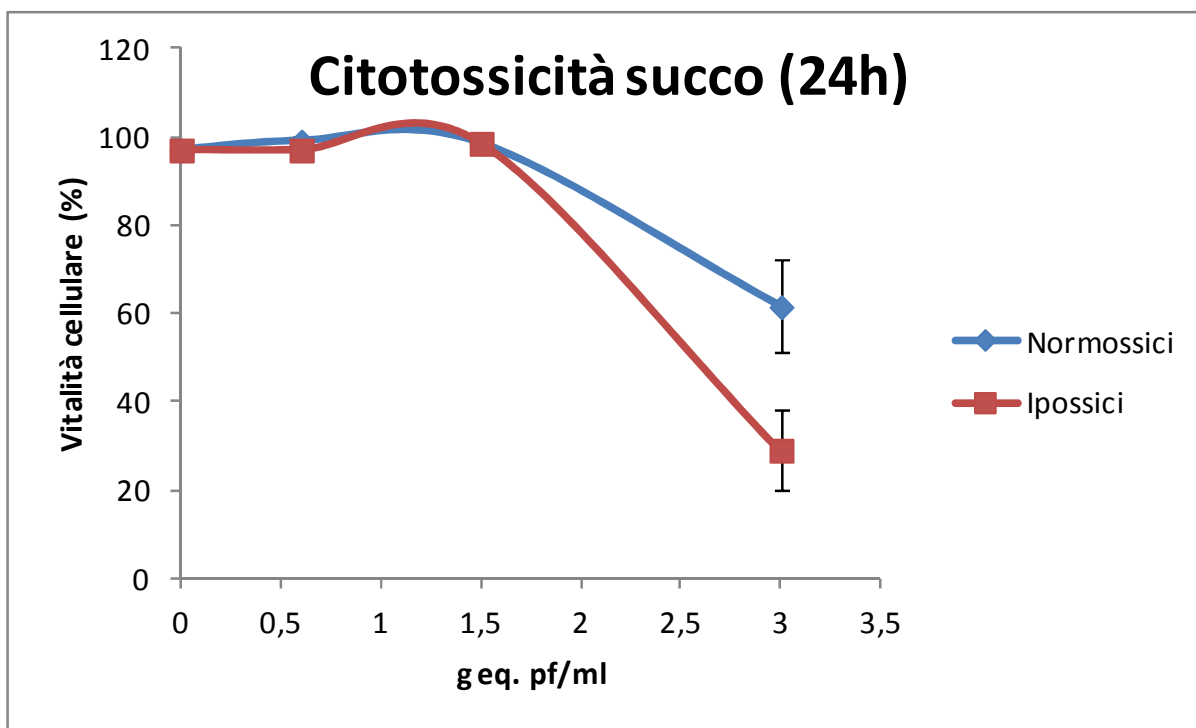


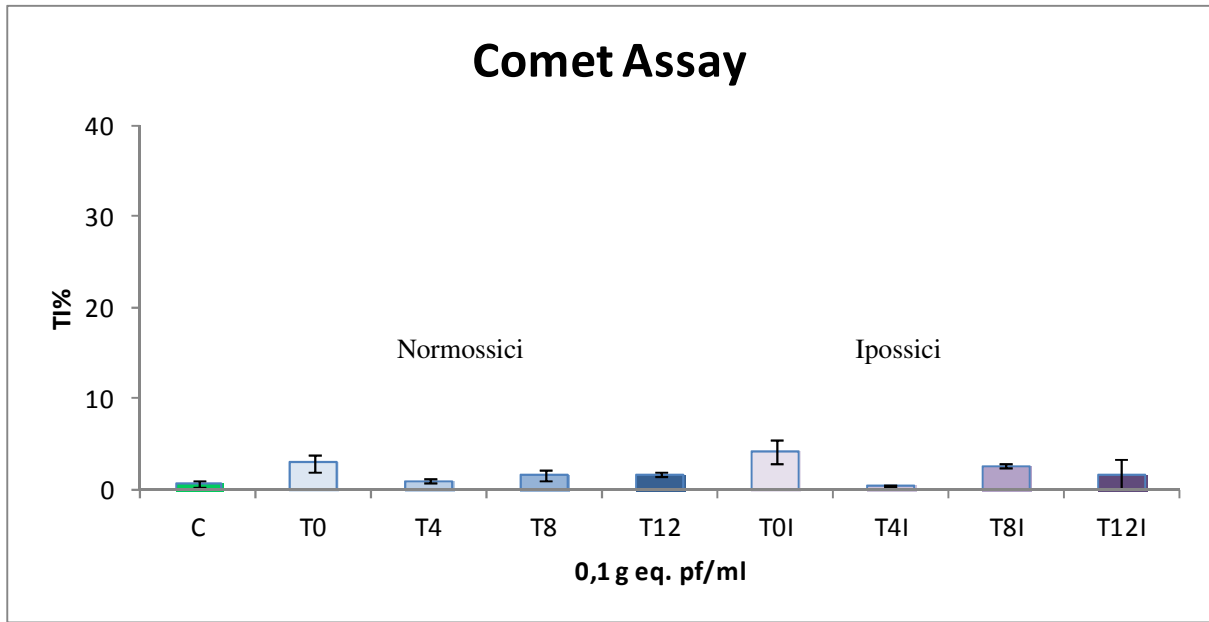
Fig. 4.3.14: Attività citotossica del succo di spinacio (0 - 0,6 – 1,5 e 3 g eq. pf/ml) provenienti da piante coltivate in normossia e in ipossia sulla linea cellulare HT-29 (24 h trattamento) mediante colorazione con Trypan blue.

4.4 Valutazione dell'attività genotossica e antiossidante

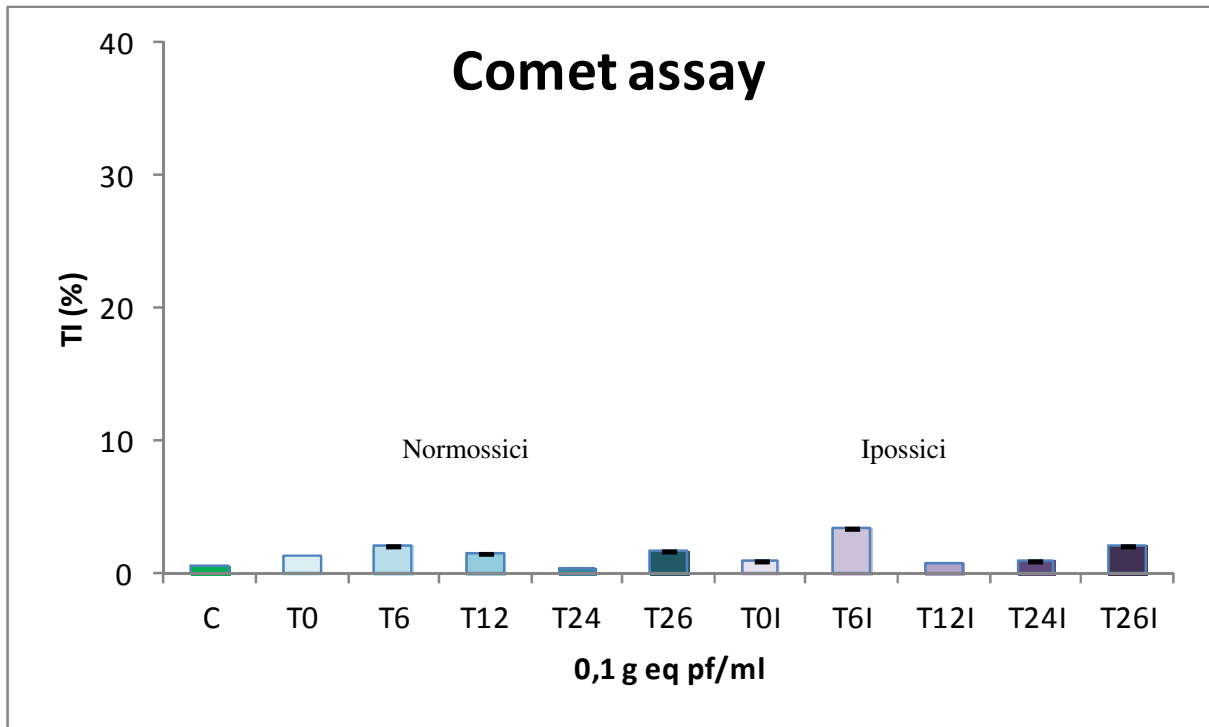
Estratti liofilizzati

Genotossicità

Dall'analisi dell'attività citotossica degli estratti liofilizzati, si è scelto di valutare la prima dose priva di citotossicità (0,1 g eq. pf/ml) mediante saggio Comet assay. Dopo esposizione di 24h delle cellule HT-29 in adesione agli estratti liofilizzati, è stato applicata la versione alcalina del Comet Assay (pH>13). Dai grafici relativi alle 2 sperimentazioni indipendenti (Fig. 4.4.1 a) e b)) si evidenzia l'assenza di genotossicità alla concentrazione saggiata per entrambi gli estratti.



a)



b)

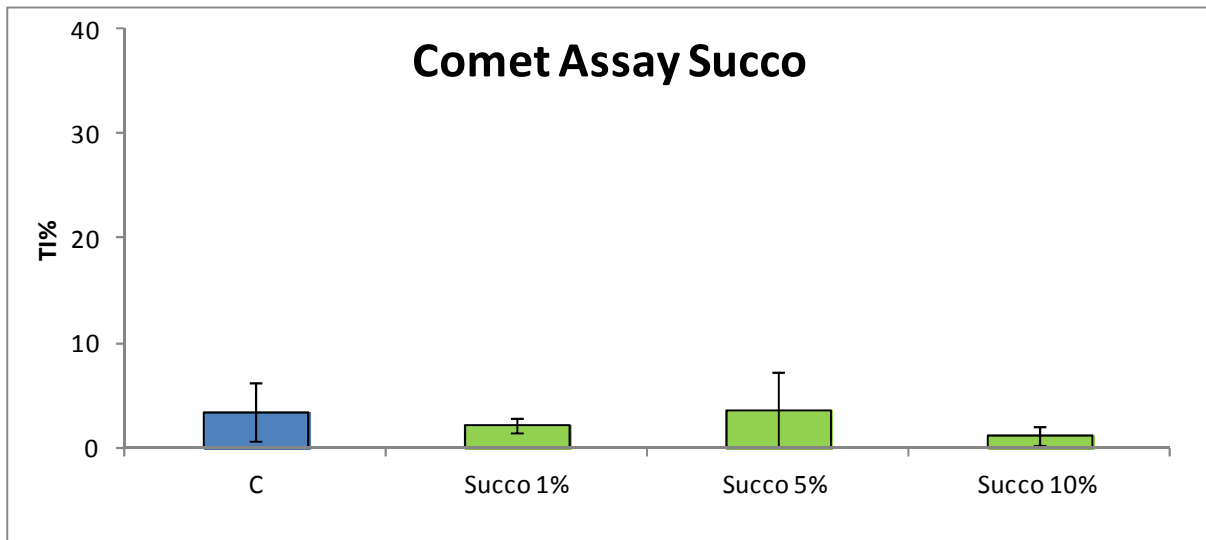
Fig. 4.4.1 (a) e b)): Comet assay su cellule HT-29 trattate con estratti liofilizzati. Nei grafici vengono riportate in ascissa la concentrazione saggiata (0,1 g eq. pf/ml) e in ordinata la Tail Intensity (TI%). C (controllo); a) T0, T4, T8, T12, T0I, T4I, T8I, T12I (estratti liofilizzati a diversi

tempi di campionamento come riportato in Tabella 1), T0, T6, T12, T24, T26, T0I, T6I, T12I, T24I, T26I (estratti liofilizzati a diversi tempi di campionamento come riportato in Tabella 2)

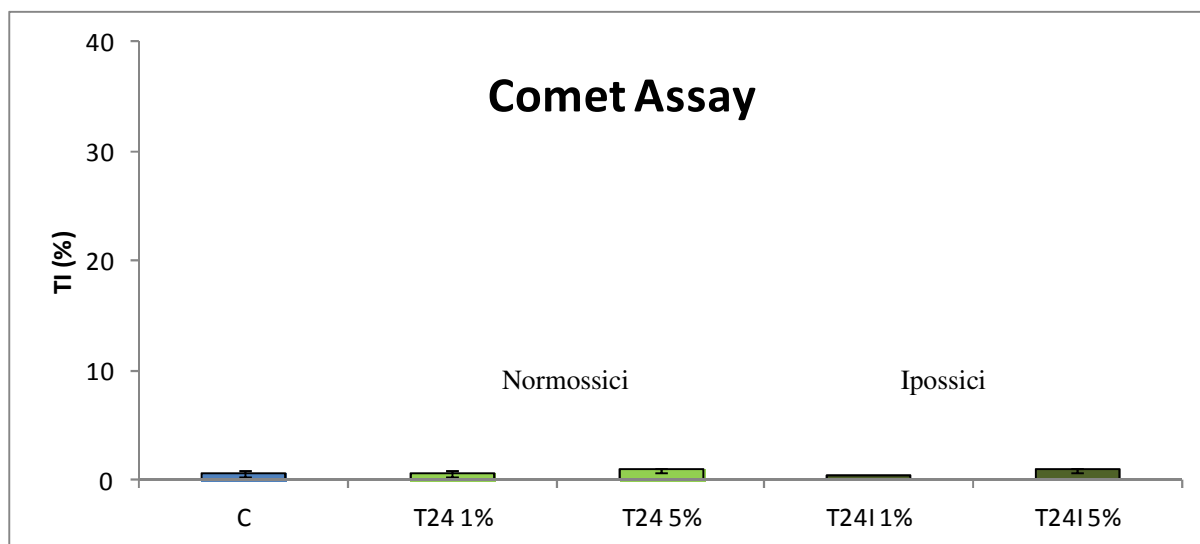
Succo

Genotossicità

L'attività genotossica è stata valutata anche per il succo tal quale di spinacio e per il succo delle piante coltivate in ipossia per 24 ore a concentrazioni sub-tossiche (rispettivamente 1 – 5 e 10% corrispondenti a 0,06 – 0,3 e 0,6 g eq. pf/ml). Dopo esposizione di 24h delle cellule HT-29 in adesione al succo, è stato applicata la versione alcalina del Comet Assay (pH>13). Dai grafici relativi alle 2 sperimentazioni indipendenti (Fig. 4.4.2 a) e b)) si evidenzia l'assenza di genotossicità alla concentrazione saggiata per entrambi gli estratti.



a)



b)

Fig. 4.4.2: Comet assay su cellule HT-29 trattate con succo di spinacio. Nei grafici vengono riportate in ascissa la concentrazione saggiata e in ordinata la Tail Intensity (TI%). C (controllo); Succo (1 – 5 e 10%), T24 1%, T24 5%, T24I 1%, T24I 5% (Succo ottenuto dopo 24 ore di coltura in normossia e in ipossia saggiato alla concentrazione di 1 e 5%)

Attività antiossidante

L'analisi dell'attività protettiva svolta dallo spinacio coltivato in normossia e in ipossia è stata condotta sottoponendo le cellule, dopo trattamento per 24 ore con gli estratti ed eliminazione del mezzo di coltura con l'estratto consumato, ad uno shock ossidativo prodotto da perossido di idrogeno (H₂O₂). Il perossido di idrogeno è considerato un ottimo controllo positivo, in quanto la sua attività genotossica si esplica attraverso percorsi multipli che vengono ben rilevati dal Comet assay, versione alcalina. Per il successivo trattamento è stata scelta la concentrazione 100 µM che risulta indurre un incremento della migrazione del DNA statisticamente significativo (Bonferroni, p<0.05). Questa concentrazione è stata scelta previa analisi preliminari e successivamente mantenuta in tutti gli esperimenti condotti. L'abilità di ridurre il danno al DNA indotto dal trattamento con il perossido di idrogeno alle cellule HT-29 è stato scelto come un indicatore della capacità chemiopreventiva degli estratti vegetali. L'attività antiossidante viene rilevata come riduzione della migrazione del DNA in cellule pre-trattate con l'agente presunto antiossidante e successivamente esposte al perossido di idrogeno [Ferrarini et al., 2011].

Estratti liofilizzati

Inizialmente sono stati analizzati i primi estratti liofilizzati campionati ogni 4 ore (T0, T4, T8 e T12 e la controparte coltivata in ipossia). Il grafico (Fig. 4.4.3) mostra un'ossidazione maggiore di tutti gli estratti nei confronti delle cellule HT-29 rispetto al controllo. Non si osserva una differenza sostanziale nell'azione pro-ossidante tra gli estratti liofilizzati delle piante coltivate in normossia e in ipossia, anche se si ha un valore di tail intensity percentuale più omogeneo per gli estratti ipossici.

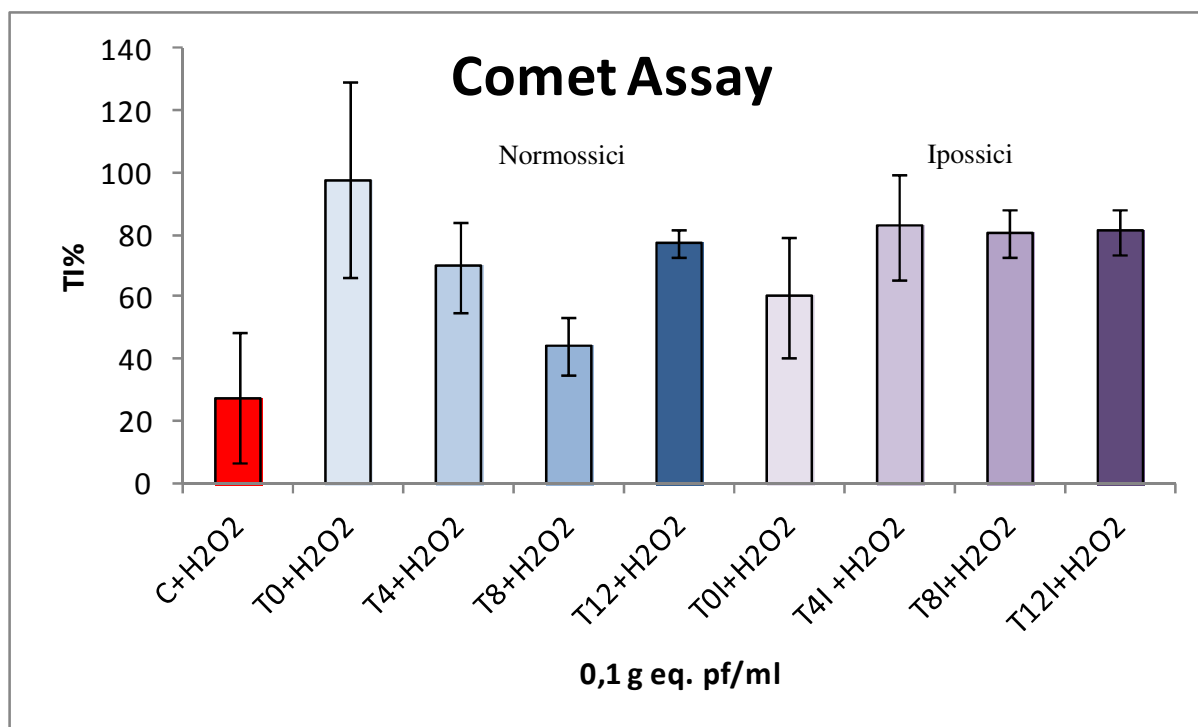


Fig 4.4.3: Comet assay. Valutazione dell'attività antiossidante degli estratti liofilizzati(T0, T4, T8 e T12 e T0I, T4I, T8I e T12I + H₂O₂ 100 μ M) su cellule HT-29 trattate per 24h. C+ H₂O₂ (Controllo: HT-29 trattate per 5' con H₂O₂ 100 μ M in ghiaccio). In ascissa è riportata la concentrazione degli estratti, in ordinata la percentuale di tail intensity (TI%)

Questo risultato è ancora più apprezzabile osservando la media di tutti gli estratti normossici ed ipossici in cui risulta evidente l'azione pro-ossidante di questi estratti senza differenze sostanziali nell'intensità dell'azione (Fig. 4.4.4).

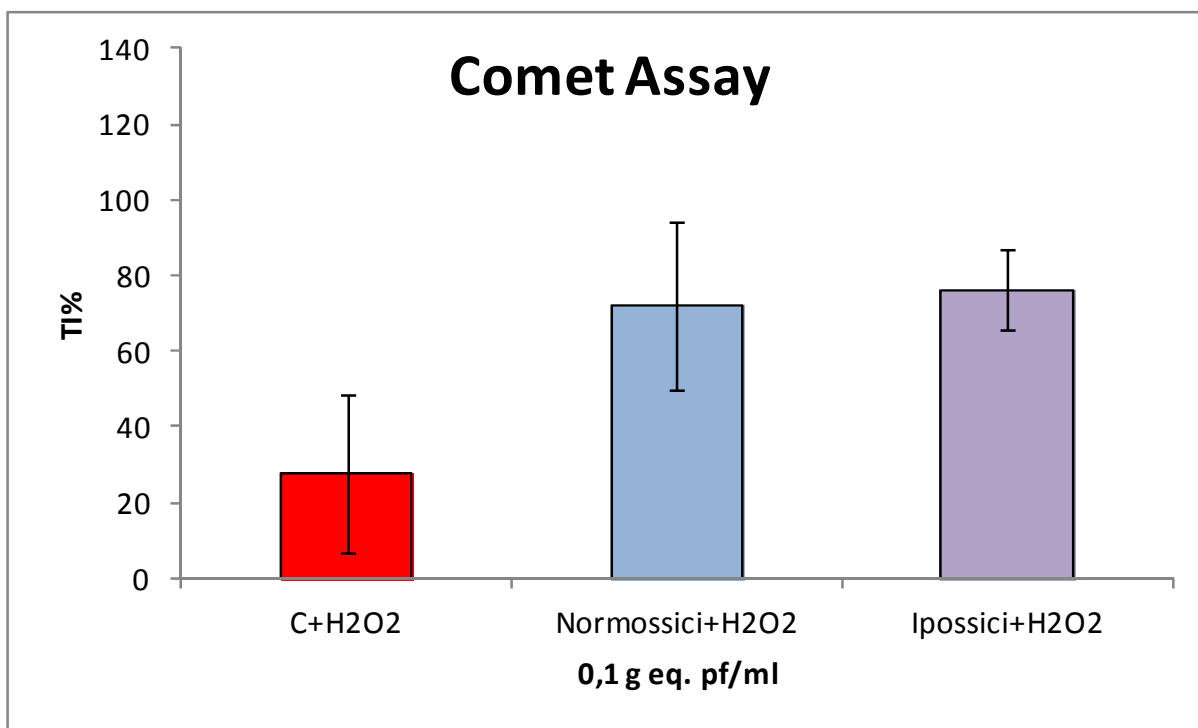


Fig. 4.4.4: Comet assay. Valutazione dell'attività antiossidante media di tutti gli estratti liofilizzati normossici ed ipossici su cellule HT-29 trattate per 24h. C+ H₂O₂ (Controllo: HT-29 trattate per 5' con H₂O₂ 100 µM in ghiaccio). In ascissa è riportata la concentrazione degli estratti, in ordinata la percentuale di tail intensity (TI%)

L'analisi dell'attività antiossidante è stata condotta anche sugli estratti liofilizzati della successiva sperimentazione a differenti tempi di campionamento (T0, T6, T12, T24 e T26 e la controparte coltivata in ipossia). Nessun estratto (tranne T6, T6I e T12I) mostra un'azione pro-ossidante (Fig.4.4.5), avendo tutti valore di tail intensity simile al controllo. Analizzando la media degli estratti normossici, come mostrato nel grafico 4.4.6, a fronte dell'assenza di attività antiossidante, non sembrano indurre un'azione pro-ossidante comparati al controllo. Per gli estratti ipossici, invece, si rileva la presenza, se pur lieve, dell'azione pro-ossidante.

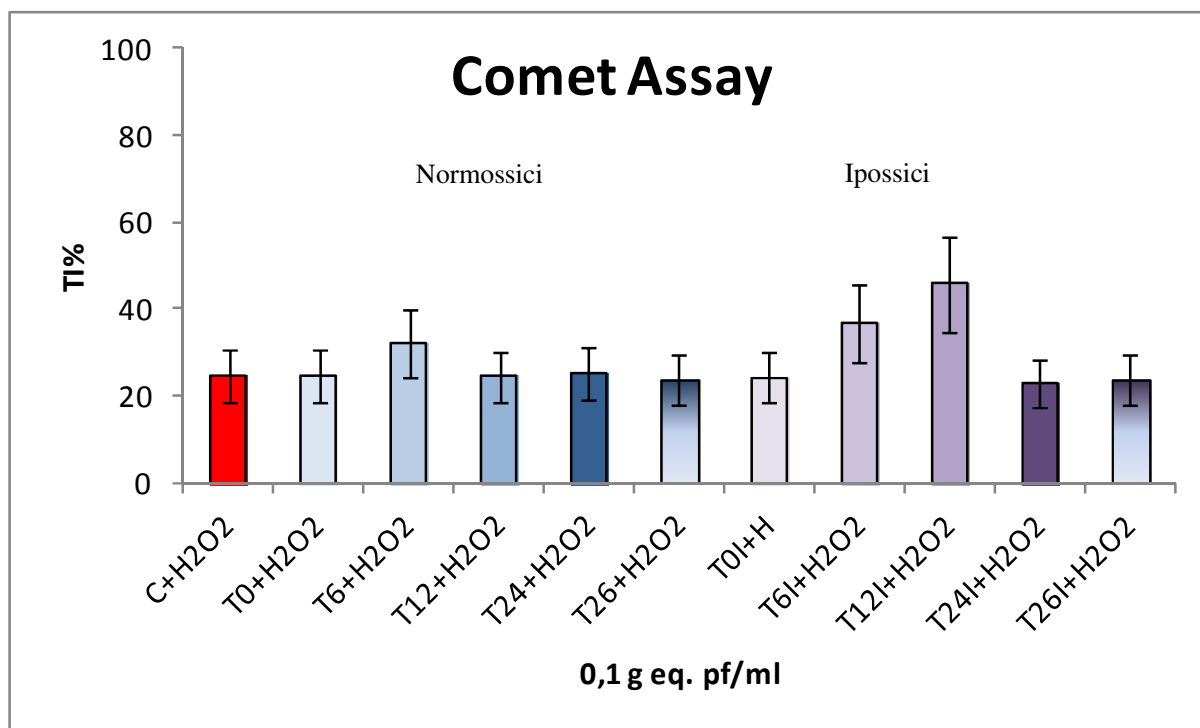


Fig. 4.4.5: : Comet assay. Valutazione dell'attività antiossidante degli estratti liofilizzati(T0, T6, T12, T24 e T26 e T0i, T6i, T12i, T24i e T26i + H₂O₂ 100 μM) su cellule HT-29 trattate per 24h. C+ H₂O₂ (Controllo: HT-29 trattate per 5' con H₂O₂ 100 μM in ghiaccio). In ascissa è riportata la concentrazione degli estratti, in ordinata la percentuale di tail intensity (TI%)

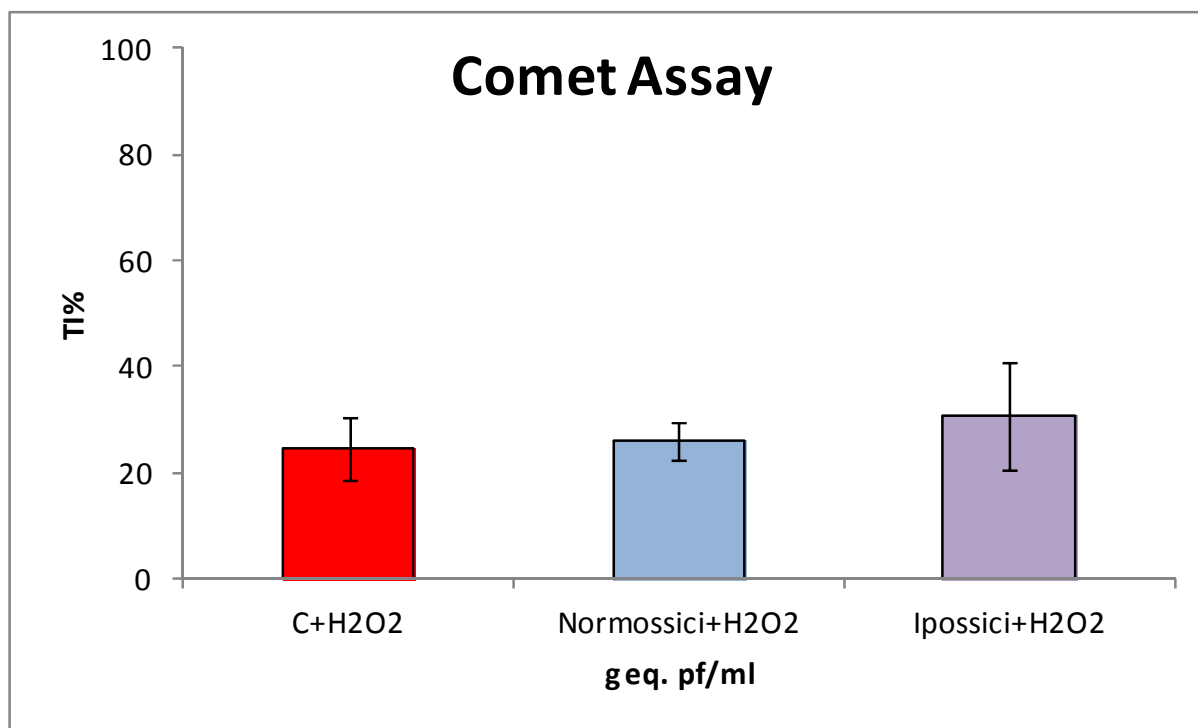


Fig. 4.4.6: Comet assay. Valutazione dell'attività antiossidante media di tutti gli estratti liofilizzati normossici ed ipossici su cellule HT-29 trattate per 24h. C+ H₂O₂ (Controllo: HT-29 trattate per 5' con H₂O₂ 100 µM in ghiaccio). In ascissa è riportata la concentrazione degli estratti, in ordinata la percentuale di tail intensity (TI%)

Succo

Sulla base dei precedenti risultati che mostravano un'azione tendenzialmente pro-ossidante degli estratti di spinacio, in contrasto con l'attività antiossidante riscontrata da diversi autori [Howard et al., 2002; Moser et al., 2012], è stata indagata mediante Comet Assay l'attività del puro succo di spinacio fresco, non sottoposto ad alcun trattamento di essiccamento e/o liofilizzazione.

Dal grafico 4.4.7 si osserva che tutte le concentrazioni saggate (1, 5 e 10% di succo) mostrano un'azione antiossidante, con una riduzione dell'attività ossidante dell'acqua ossigenata rispettivamente di circa 40, 80 e 33%. La risposta antiossidante osservata non è direttamente proporzionale alle concentrazioni saggate, in quanto la relazione dose/effetto si osserva solo per le due concentrazioni più basse (1 e 5%), mentre alla dose massima vi è una riduzione dell'attività antiossidante dell'estratto. La concentrazione di succo fresco che ha determinato la riduzione maggiore del danno al materiale genetico e quindi ha mostrato l'azione antiossidante più marcata risulta quella al 5% ed è statisticamente significativa (p<0,05).

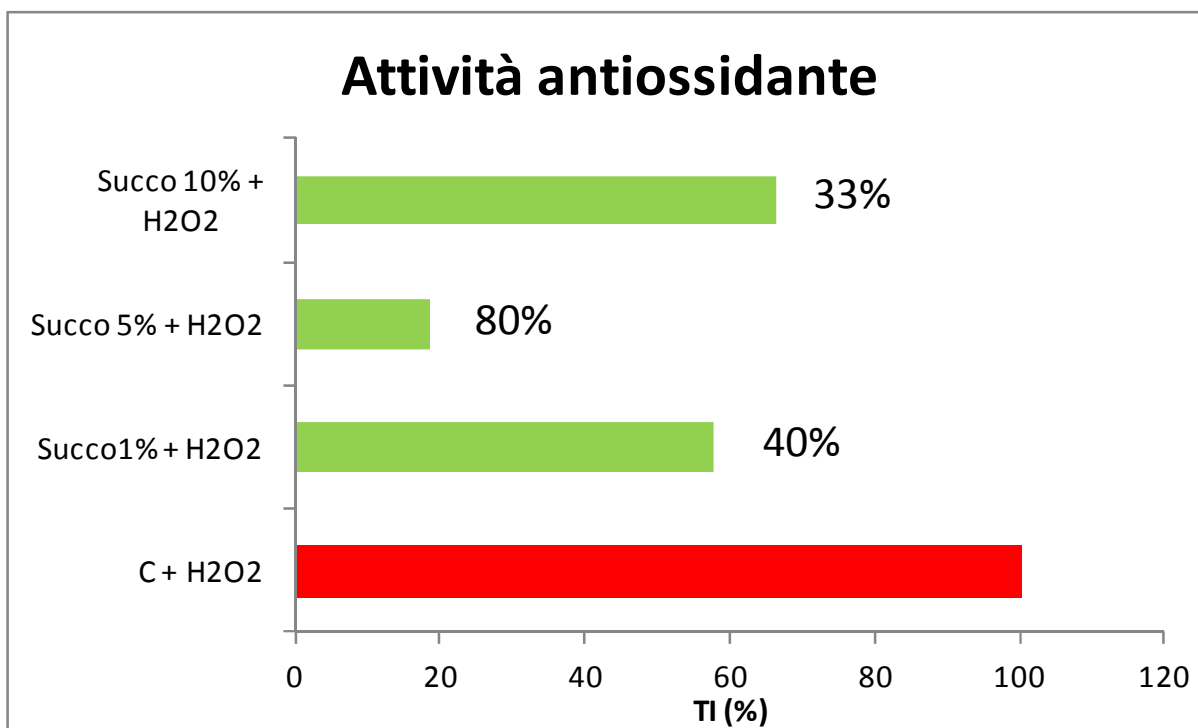


Fig. 4.4.7: Comet assay. Valutazione dell'attività antiossidante percentuale del puro succo fresco di spinacio a differenti concentrazioni (1 - 5 e 10%+ H₂O₂ 100 μM) su cellule HT-29 trattate per 24h. C+ H₂O₂ (Controllo: HT-29 trattate per 5' con H₂O₂ 100 μM in ghiaccio). In ascissa è riportata la percentuale di tail intensity (TI%), in ordinata la concentrazione del succo.

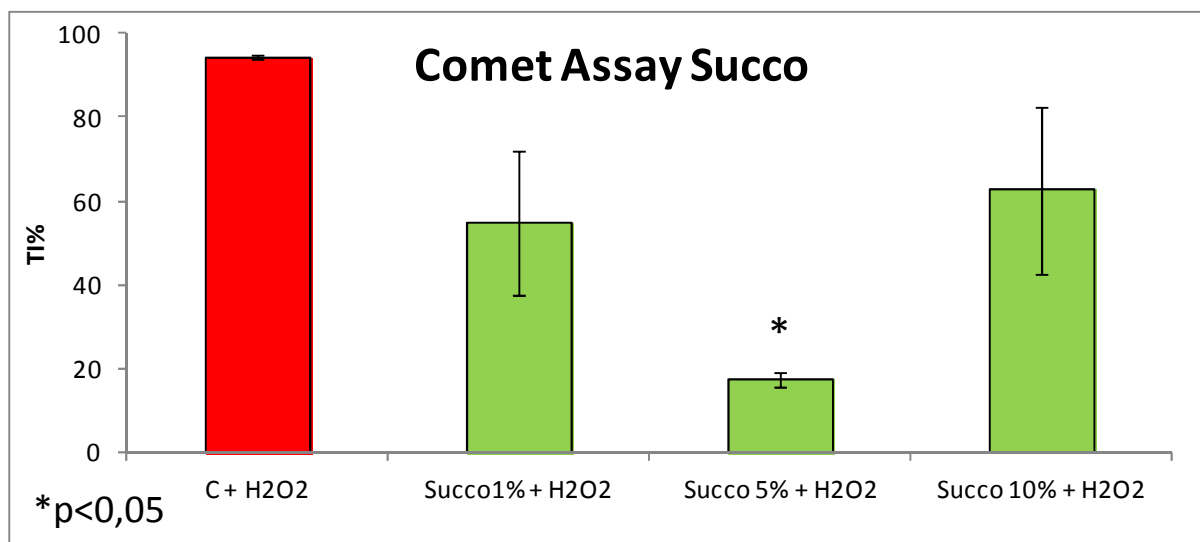


Fig. 4.4.8: Comet assay. Valutazione dell'attività antiossidante del puro succo fresco di spinacio a differenti concentrazioni (1 - 5 e 10%+ H₂O₂ 100 μM) su cellule HT-29 trattate per 24h. C+ H₂O₂ (Controllo: HT-29 trattate per 5' con H₂O₂ 100 μM in ghiaccio). In ascissa è riportata la concentrazione del succo, in ordinata la percentuale di tail intensity (TI%)

Individuata l'azione antiossidante del succo di spinacio si è proceduto alla valutazione dell'attività antiossidante anche del succo di piante sottoposte alla coltivazione in ipossia per 24 ore. Dal grafico 4.4.9 si rileva un'azione antiossidante di tutte le concentrazioni saggate (1 e 5%) sia per il succo di piante coltivate in normossia sia coltivate in ipossia. Il succo delle piante coltivate in normossia mostra la riduzione massima dell'attività dell'acqua ossigenata (81%) alla concentrazione dell'1%, mentre alla concentrazione del 5% determina una riduzione inferiore (27%). Per quanto riguarda il succo delle piante coltivate in ipossia entrambe le concentrazioni di 1 e 5% determinano una riduzione dell'attività dell'acqua ossigenata simile (rispettivamente del 40 e del 36%). Per entrambi gli estratti la concentrazione che ha mostrato l'attività antiossidante maggiore è quella dell'1%.

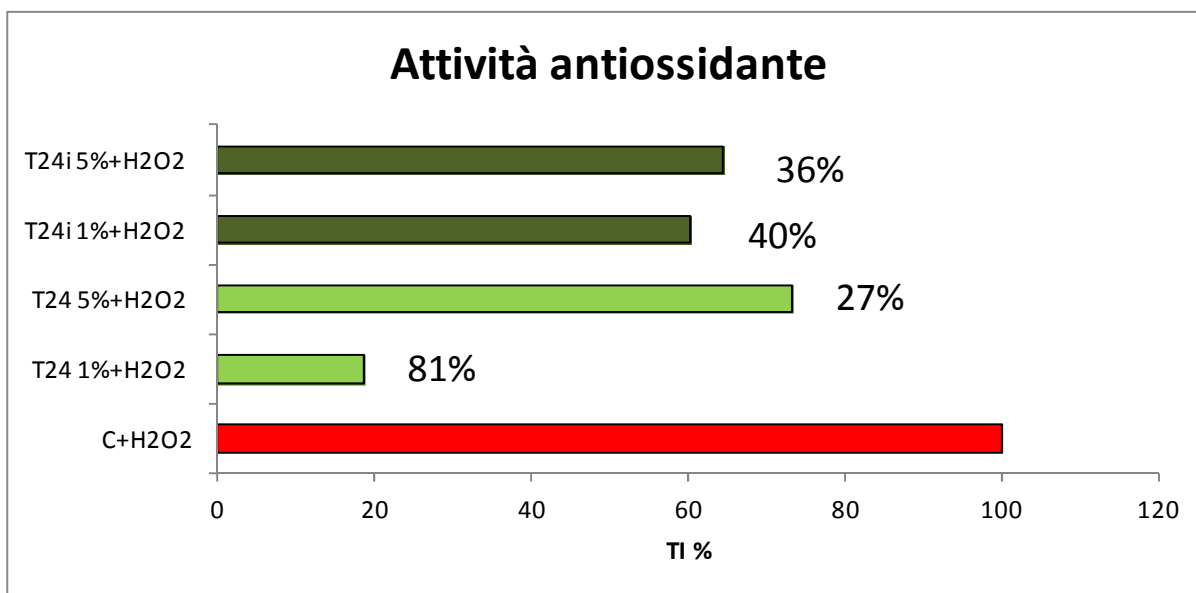


Fig. 4.4.9: Comet assay. Valutazione dell'attività antiossidante percentuale del puro succo fresco di spinacio in normossia e ipossia per 24h (T24 e T24i) a differenti concentrazioni (1 e 5 %+ H₂O₂ 100 μM) su cellule HT-29 trattate per 24h. C+ H₂O₂ (Controllo: HT-29 trattate per 5' con H₂O₂ 100 μM in ghiaccio). In ascissa è riportata la percentuale di tail intensity (TI%), in ordinata la concentrazione del succo.

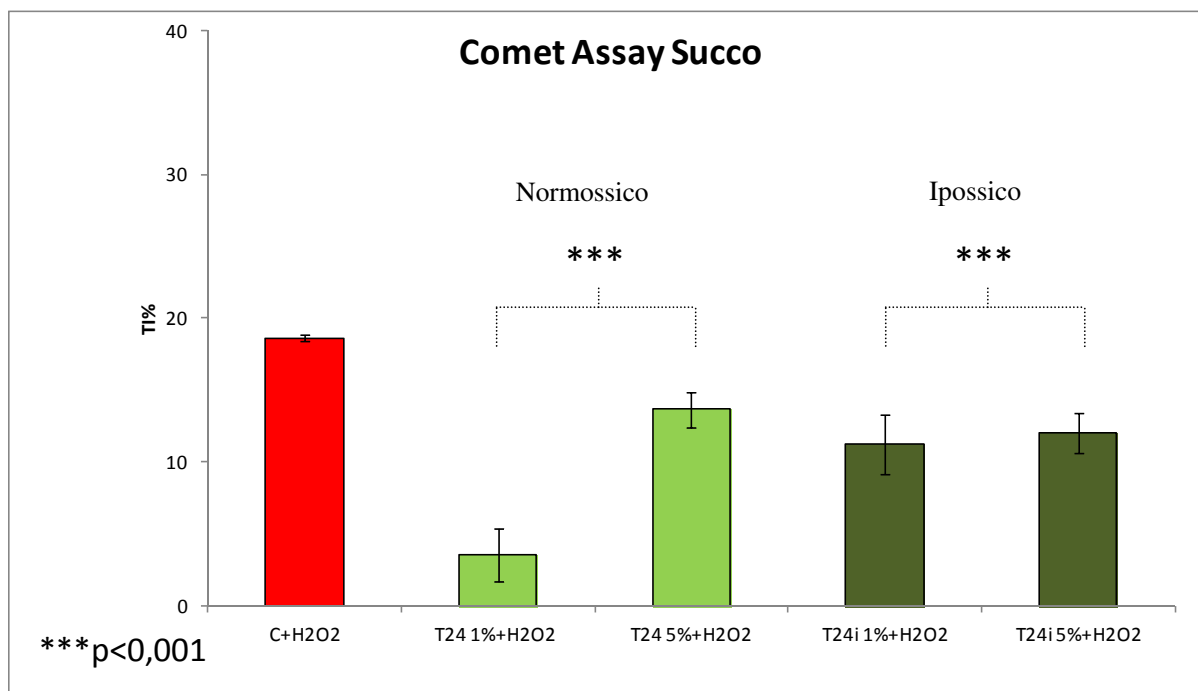


Fig. 4.4.10: Comet assay. Valutazione dell'attività antiossidante del puro succo fresco di spinacio in normossia e ipossia per 24h (T24 e T24i) a differenti concentrazioni (1 e 5 %+ H₂O₂ 100 μM) su cellule HT-29 trattate per 24h. C+ H₂O₂ (Controllo: HT-29 trattate per 5' con H₂O₂ 100 μM in ghiaccio). In ascissa è riportata la concentrazione del succo, in ordinata la percentuale di tail intensity (TI%)

Per valutare l'azione antiossidante riscontrata è stato condotto il comet assay trattando le cellule HT-29 con un antiossidante noto, l'acido ascorbico. Le concentrazioni saggiate sono state individuate in letteratura [Wenzel et al., 2004; Ferrarini et al., 2011], impiegando diluizioni seriali per analizzare l'andamento dose-effetto.

Dal Grafico (Fig. 4.4.11) si osserva l'assenza di genotossicità della vitamina C a tutte le concentrazioni saggiate e una riduzione dell'attività ossidante dell'acqua ossigenata del 33, 56 e 17% rispettivamente per le concentrazioni 1 - 2 e 4 mM. Si osserva una riduzione dose-dipendente alle due concentrazioni più basse (1 e 2 mM), mentre alla concentrazione 4 mM si ha una diminuzione dell'attività antiossidante. Questo andamento dell'attività antiossidante della vitamina C alle diverse concentrazioni saggiate è lo stesso rilevato nelle sperimentazioni precedenti dell'attività antiossidante del succo di spinacio a diverse concentrazioni.

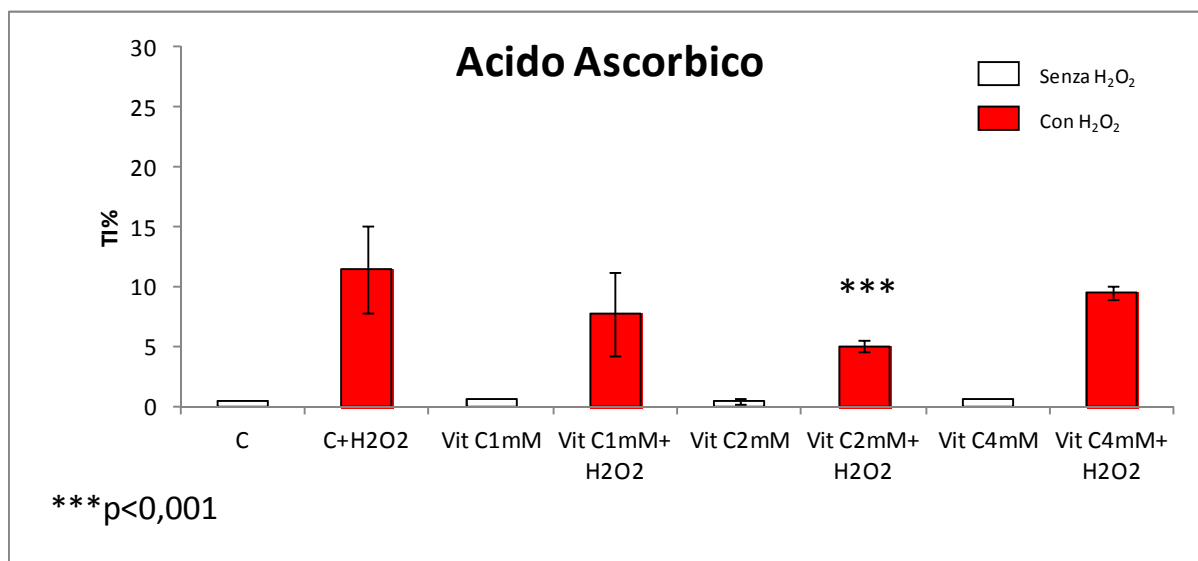


Fig. 4.4.11: Comet assay. Valutazione dell'attività antiossidante dell'acido ascorbico puro a differenti concentrazioni (1 - 2 e 4 mM) su cellule HT-29 trattate per 24h. C: Controllo; C+ H₂O₂ (Controllo: HT-29 trattate per 5' con H₂O₂ 100 μM in ghiaccio). In ascissa è riportata la concentrazione del succo, in ordinata la percentuale di tail intensity (TI%)

4.5 Valutazione dell'apoptosi mediante Tunel assay

I dati ottenuti dai saggi di proliferazione mostrano che gli estratti, in particolare quelli ipossici, hanno attività antiproliferativa che diventa citotossica alle concentrazioni maggiori. Per poter verificare se ci fosse un'attività pro-apoptotica nelle cellule HT-29 trattate con gli estratti di spinacio è stato impiegato il saggio Tunel che riesce a discriminare la morte cellulare che avviene mediante apoptosi. Per la messa a punto del saggio sono state comparate due metodiche (metodica Chamber e metodica coprioggetto). Mediante il Tunel assay è stata determinata la positività nucleare per attività apoptotica su un numero complessivo di 1000 cellule. Nella maggior parte dei casi non è stato possibile raggiungere tale quota per la perdita di numerose cellule durante l'esperimento. La metodica Chamber ha garantito una migliore conservazione della morfologia cellulare, mentre la metodica coprioggetto ha portato ad alterazioni morfologiche probabilmente imputabili a stress meccanici durante l'esperimento. Data la migliore conservazione delle cellule, l'analisi è stata condotta solo per i dati rilevati nell'esperimento condotto utilizzando le Chamber Slides (Fig. 4.5.1).

Dai dati preliminari non si evidenziano significative differenze tra i non trattati e le cellule trattate con gli estratti liofilizzati per 24h a concentrazioni e in tempi di campionamento differenti (Tab. 4.5.1).

Tabella 4.5.1: Determinazione del numero di cellule apoptotiche mediante Tunel Assay T0 e T8 (estratti liofilizzati di spinacio coltivato in normossia campionato al tempo 0 e dopo 8h) T8I (estratto liofilizzato di spinacio coltivato in ipossia campionato dopo 8h).

	Campioni	n° apo/cell tot	% su 1000 cell
Controlli	Non trattati	0/1000	0
Concentrazioni	T0 0,1 g ep. pf/ml	3/1000	0,3
	T0 0,5 g ep. pf/ml	12/1000	1,2
Tempi	T0 0,5 g ep. pf/ml	0/1000	0
	T8 0,5 g ep. pf/ml	5/1000	0,5
	T8I 0,5 g ep. pf/ml	0/1000	0

Da questi dati preliminari pare che l'attività citotossica degli estratti non si espliciti mediante apoptosi. Ulteriori esperimenti sono però necessari per caratterizzare l'attività degli estratti di spinacio sulla linea cellulare HT-29.

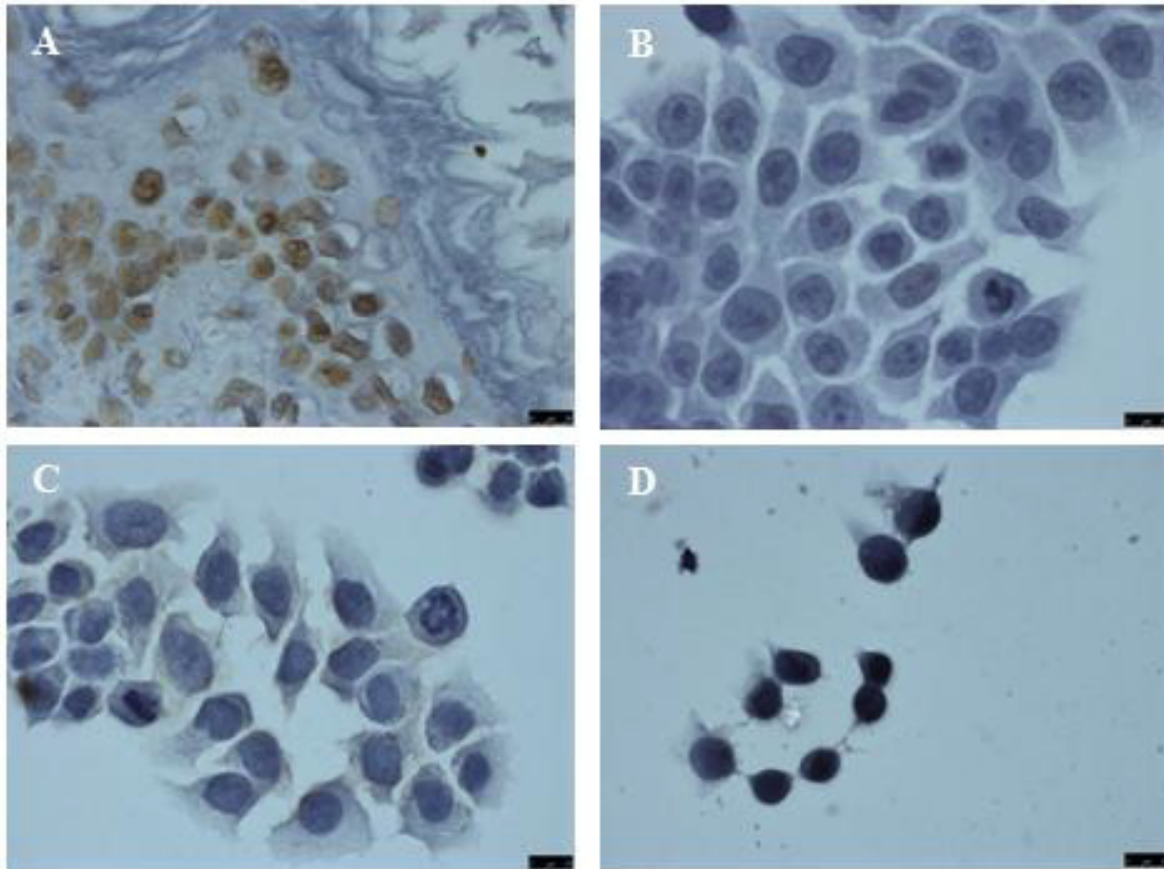


Fig. 4.5.1: Foto al microscopio ottico del controllo positivo istologico fornito nel kit (A), del controllo negativo (B), del trattato T0 0,5 g eq. pf/ml dell'esperimento condotto sulle Chambers Slides (C) e dello stesso dosaggio dell'esperimento condotto sui coprioggetti (D). In quest'ultimo sono evidenti le modificazioni morfologiche delle cellule che assumono la conformazione rotondeggiante che precede il distacco. Original Magnification X1000

4.6 Isolamento di cellule epiteliali di colon murino

Sono stati sperimentati vari protocolli per la separazione di cellule epiteliali di colon murino da frammenti istologici. In tabella (Tab. 4.6.1) vengono riportate le concentrazioni cellulari ottenute e le rispettive mortalità (%) in esperimenti relativi all'isolamento delle cellule di colon murino.

Tab. 4.6.1: Protocolli applicati per l'isolamento delle cellule murine. Per ogni protocollo si riporta la concentrazione cellulare e la mortalità (%)

	Protocollo	Campioni	Concentrazione cellulare (cell/ml)	Mortalità (%)
A	Isolamento per chelazione/digestione (Clonogenic Assay)	Col1	poche cellule	13
		Col2	$5,25 \times 10^4$	25
		Col3	$2,75 \times 10^4$	20
		Col4	$6,75 \times 10^4$	15
B	Isolamento per chelazione/digestione (Clonogenic Assay)	Col1	-	-
		Col2	-	-
C	Isolamento per chelazione/digestione (Clonogenic Assay)	Col1	-	-
		Col2	-	-
		Col3	-	-
D	Isolamento per chelazione/digestione (Clonogenic Assay)	Col1	$36,5 \times 10^5$	32
		Col2	30×10^5	28
		Col3	$23,5 \times 10^5$	38
		Col1 + ipoclorito	32×10^5	36
		Col2 + ipoclorito	$27,5 \times 10^5$	26
		Col3 + ipoclorito	$20,5 \times 10^5$	32
E (Mortalità valutata 6 giorni dopo l'isolamento)	Isolamento per digestione con tripsina/EDTA	Col 1	$11,1 \times 10^5$	18
		Col 2	$22,5 \times 10^5$	17
F	Isolamento per digestione con tripsina/EDTA	Col1	$1,5 \times 10^5$	60
		Col2	poche cellule	54

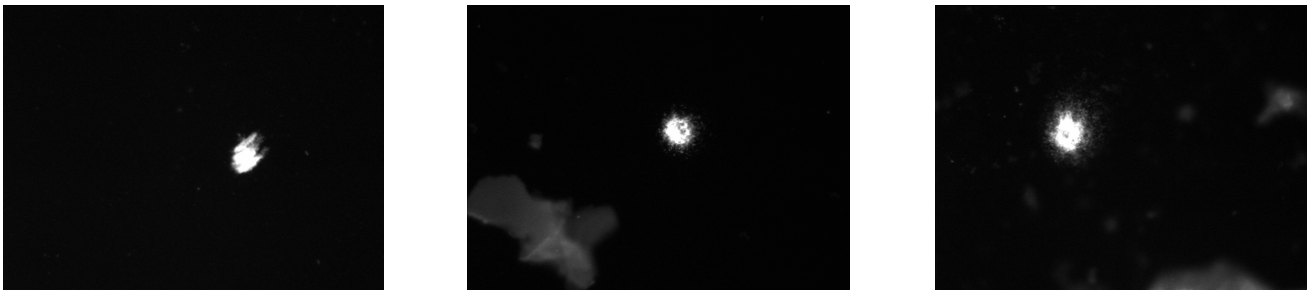
Nei vari protocolli indicati, sono state portate modifiche al protocollo di base (tempi di chelazione, digestione, concentrazione di FBS nel terreno), ma senza riuscire ad ottenere una colonia cellulare che spontaneamente proliferasse in coltura. Da qui si è abbandonato il Clonogenic Assay e si è

messo in coltura direttamente le cellule dopo digestione.

La mancanza di opportune matrici che simulassero la matrice extracellulare (ECM gel Sigma, ad esempio) dovute a costi onerosi, ha reso difficile il mantenimento della coltura primaria in vitro.

Nell'ottica di verificare la possibilità di eseguire il Comet Assay sulle cellule da espianto primario, le cellule isolate (Tab. 4.6.1, protocollo F) sono state trattate dopo 6 giorni con gli estratti di spinacio per 24 h (nonostante l'esiguo numero e l'alta mortalità) e sottoposte a corsa elettroforetica il giorno seguente.

Sono state trovate solo poche cellule all'analisi al microscopio, che non consente di ottenere un dato analizzabile, ciononostante questo dimostra l'attuabilità del Comet assay su queste cellule (Fig.4.6.1 a, b e c).



a)

b)

c)

Fig.4.6.1 (a,b e c): Immagini al microscopio ottico di cellule da espianto primario sottoposte a Comet Assay (40x)

5. Discussione

Questo lavoro di ricerca nasce dall'idea di indagare la complessa relazione esistente tra la risposta delle piante allo stress e la salute umana in seguito alla produzione negli organismi vegetali di metaboliti secondari antiossidanti e/o con proprietà farmacologiche desiderabili visto che è stata prestata poca attenzione alle conseguenze dell'acclimatazione delle piante agli stress ambientali e il loro valore nutritivo e/o farmacologico. Gli organismi vegetali hanno una grande adattabilità dovuta al fatto che organismi della stessa specie possono trovarsi a crescere in zone climatiche molto differenti e rispondono a stress differenti mediante la produzione di metaboliti secondari che potrebbero migliorare le qualità nutrizionali o che potrebbero essere impiegati come prodotti fitofarmaceutici [Jansen et al., 2008]. Alcuni dei metaboliti antiossidanti prodotti per proteggere le cellule vegetali possono avere un effetto analogo protettivo sulle cellule umane [Carlsen et al. 2010]. Questa ipotesi porta ad un campo interessante e promettente della ricerca, che suggerisce come uno stress ambientale specifico imposto alle piante può essere utile per la salute umana.

Al fine di trovare risposte a questo, si è preso in considerazione lo spinacio (*Spinacia oleracea* L., Chenopodiaceae) coltivato in condizioni standard o in ipossia. Si è scelto di studiare lo spinacio perché risulta uno dei vegetali di cui l'uomo si nutre più ricchi di composti fitochimici come l'ascorbato, carotenoidi, tocoferoli, flavonoidi, folato e minerali [Bergman et al., 2001; Moser et al., 2011] e l'apporto dietetico di spinacio è stato segnalato per ridurre il rischio di sviluppare vari tipi di cancro, come il tumore esofageo [Freedman et al., 2007], alla mammella [Longnecker et al., 1997] e al colon [Slattery et al., 2000]. Inoltre è stato dimostrato che estratti di spinacio hanno proprietà anti-infiammatorie, anticancerogene e anti-invecchiamento [Nyska et al., 2003]. Gli estratti acquosi di foglie di spinacio liofilizzate [Lester et al., 2004] sono stati analizzati chimicamente mediante LC-MS e somministrati alla linea cellulare tumorale umana HT-29 per valutarne l'effetto chemioprotettivo.

Uno stress molto comune nel regno vegetale è dato dalla carenza di ossigeno e la generazione di ROS è caratteristica dell'ipossia, specialmente in seguito alla riossigenazione, dal momento che il danno maggiore dello stress ipossico avviene dopo la re-immissione di ossigeno [Blokhina et al., 2003]. Nelle piante superiori questa generazione di ROS a livello cellulare in seguito a stress è strettamente controllata da un evidente incremento del sistema antiossidante [Reddy et al., 2004].

Per verificare quanto dichiarato da Reddy, è stata condotta l'analisi chimica con LC-MS (Liquid Chromatography–Mass Spectrometry) in collaborazione con il gruppo del dipartimento di Scienze

Agrarie e degli Alimenti dell'Università degli studi di Modena e Reggio Emilia per identificare simultaneamente singoli componenti in estratti grezzi di foglie di spinacio. Campioni prelevati sia durante l'induzione di ipossia che dopo riossigenazione sono stati studiati e confrontati: T24I (24 h dall'inizio della induzione dell'ipossia), T26 (due ore post-riossigenazione). Dalla analisi chimica si evince come la concentrazione dei composti antiossidanti principali identificati negli estratti di spinacio cambi in risposta allo stress. Sono stati identificati gli antiossidanti acido ascorbico e α tocoferolo che presentano un aumento, rispettivamente di 4 e 2 volte rispetto al controllo T0, dopo 24 h dall'inizio dello stress ipossico, mentre durante la riossigenazione la loro concentrazione sembra diminuire. Questo comportamento durante la riossigenazione potrebbe essere dovuto all'ossidazione delle molecole accumulate e quindi ad un aumento di specie reattive dell'ossigeno. La percentuale di acido ferulico cambia leggermente nel corso dello stress, con un aumento dopo 24 h dall'inizio dell'ipossia. È stato possibile identificare i picchi cromatografici relativi alla concentrazione dei glucuronidi jaceidina e spinacetina, 5,3',4'-triidrossi-3-metossi-6:7-metilendioxi-flavone-4'-glucuronide e 5,4'-diidrossi-3,3'-dimetossi-6:7-metilendioxi-flavone-4'-glucuronide, che aumenta di circa 2 volte rispetto al controllo T0 dopo 24 h di ipossia. Globalmente si ha un aumento dei metaboliti dopo 24 ore di ipossia e una riduzione dopo la riossigenazione (tranne il flavolol glicoside e il composto non ancora identificato che aumentano più di 20 volte nel riossigenato). Questo aumento registrato durante l'ipossia può essere correlato a quanto suggerito da Leopoldini et al. [Leopoldini et al., 2006]: alcuni flavonoidi hanno dimostrato di essere buoni chelanti per gli ioni ferro. Tale comportamento interferisce con la generazione dei ROS, inibendo le reazioni ossidative tramite la reazione di Fenton. Ciò significa che una maggiore produzione di antiossidanti durante l'ipossia rappresenta sia un modo preventivo per rispondere alla generazione di ROS durante la riossigenazione sia per inibirne la loro generazione. La riossigenazione sembra "consumare" parte di questi antiossidanti, riducendo il loro ammontare entro le due ore in post-riossigenazione.

E' stata analizzata inoltre l'influenza di 3 diverse metodiche estrattive da foglie di spinacio commerciale (succo puro, succo con aggiunta di acqua e estratto idrofilo) comparato con l'estratto idrofilo delle foglie di spinacio in coltura idroponica del sistema sperimentale (T0). Le modificazioni più rilevanti riguardano il contenuto in acido ferulico e α -tocoferolo che si riduce più del 90% in tutti e tre gli estratti rispetto al T0, mentre vi è un incremento di 2,8 volte di Jaceidin glucuronide e di quasi 2 volte di Patuletin-3-glucosyl-(1→6)[apiosyl(1→2)]-glucoside nel succo

rispetto al T0. Il succo puro è tra le tre metodologie utilizzate l'estratto che presenta la maggior concentrazione di flavonoidi.

La correlazione tra il contenuto di molecole antiossidanti negli estratti vegetali e l'attività antiproliferativa sulla linea cellulare HT-29 è stata riscontrata in diversi studi [Hendra et al., 2011; Isa et al., 2012], anche se è possibile osservare solamente l'attività antiossidante [Reddy et al., 2012]. In questo studio l'attività antiproliferativa è stata riscontrata in tutti gli estratti saggiati dopo un trattamento di 24 ore alla dose di 0,5 g eq. pf/ml per gli estratti liofilizzati e alla dose di 3 g eq. pf/ml per il succo. Inoltre gli estratti liofilizzati delle piante coltivate in ipossia hanno mostrato di possedere un effetto antiproliferativo maggiore rispetto a quelli delle piante coltivate in normossia. Il succo non ha mostrato particolare attività antiproliferativa dopo 24 ore di trattamento alla dose più alta saggiata, mentre nelle stesse condizioni ha determinato la diminuzione della vitalità cellulare, con attività maggiore del succo ipossico rispetto al normossico. Quanto osservato potrebbe essere dovuto ad una citotossicità tardiva del succo che non influenza la crescita cellulare e, a seguito della proliferazione, avvenga la morte cellulare. L'attività antiproliferativa del succo sia normossico, sia ipossico aumenta sensibilmente, invece, dopo 48 h di trattamento delle cellule HT-29, riducendo la crescita dell'80% in entrambi i casi. In 2 diversi esperimenti si è riscontrato una riduzione dell'attività antiproliferativa quando la concentrazione di ossigeno è scesa sotto a 1 mg/ml, attività che è aumentata nuovamente nell'estratto riossigenato. Considerando questo risultato alla luce della quantificazione chimica degli estratti, si può ipotizzare che la modificazione del profilo fitochimico dello spinacio dopo 24 ore di ipossia, porti ad una riduzione dell'attività antiproliferativa. L'incremento della mortalità cellulare determinato dal trattamento delle cellule HT-29 con gli estratti liofilizzati per 24 ore alla concentrazione di 0,5 g eq. pf/ml, non sembra sia imputabile all'induzione di apoptosi, in quanto il saggio Tunel è negativo; il saggio, però, andrebbe ripetuto anche con il succo fresco di spinacio alla dose di 3 g eq. pf/ml, per confermare il dato.

L'assenza di genotossicità dello spinacio sulla linea cellulare HT-29 si riscontra per tutti gli estratti liofilizzati alla dose saggiata di 0,1 g eq. pf/ml e per il succo fresco per tutte le dosi saggiate di 0,6 – 1,5 e 3 g eq. pf/ml mediante il Comet Assay. L'abilità chemioprotettiva degli estratti vegetali è stata verificata attraverso l'osservazione della diminuzione relativa della migrazione del DNA nel Comet assay, rispetto al controllo positivo rappresentato dalle cellule HT-29 trattate solo con H₂O₂. I primi estratti liofilizzati hanno mostrato un'azione pro-ossidante nel co-trattamento con H₂O₂ 100 µM rispetto al controllo, senza differenze nell'intensità dell'azione tra le due tipologie di estratto. Gli estratti liofilizzati delle piante coltivate in normossia del secondo lotto hanno mostrato un'azione

comparabile al controllo, mentre gli estratti liofilizzati delle piante coltivate in ipossia mostrano una lieve azione pro-ossidante. Il succo fresco di foglie spinacio ha mostrato una buona attività antiossidante nel co-trattamento con l'acqua ossigenata, come è stato già visto nel nostro laboratorio per i vegetali appartenenti alla famiglia delle Brassicaceae e più precisamente il broccolo, il cavolfiore e i cavoletti di Bruxelles [Ferrarini et al., 2011]. Il succo fresco delle piante coltivate in normossia ha mostrato di possedere un'azione antiossidante maggiore rispetto a quello delle piante coltivate in ipossia.

In tutti i casi si evidenzia un andamento dose-attività antiossidante peculiare e comparabile a quanto visto per la vitamina C: alle dosi più basse saggiate si osserva una relazione dose- dipendente, che viene persa alle concentrazioni più alte in cui si osserva riduzione o perdita dell'attività. Questo è stato dimostrato anche per l'acido p-cumarico e la curcumina nel lavoro di Ferguson e colleghi [Ferguson et al., 2005], mentre Levine documenta il ruolo come generatore di H₂O₂ della vitamina C quando supera concentrazione di 4 mM nei fluidi interstiziali dell'organismo [Levine et al., 2011]. Comparando la concentrazione dell'estratto liofilizzato e del succo il primo sembra essere più concentrato (di circa 5 volte), e basandoci anche sulla composizione chimica dell'estratto acquoso di spinacio è possibile ipotizzare che l'assenza di attività antiossidante negli estratti liofilizzati e la maggior attività antiossidante riscontrata nel succo normossico, rispetto a quello ipossico, sia implicabile ad un maggior contenuto di specie antiossidanti.

6. Conclusioni

L'analisi chimica degli estratti acquosi di spinacio ha mostrato la presenza di numerose molecole antiossidanti specifiche di questo vegetale e una sostanziale modifica del profilo fitochimico in seguito all'induzione dello stress ipossico per 24 ore. La riossigenazione post-ipossia, determina una riduzione della concentrazione di tutte le molecole tranne che del flavonol glicoside e di un'altra molecola non ancora identificata, che aumentano più di 20 volte. Il flavonol glicoside è una molecola antiossidante e potrebbe essere prodotta su larga scala estraendola direttamente da spinaci nel periodo post-riossigenazione. L'analisi chimica degli estratti idrofili di foglie di spinacio reperibile in commercio hanno mostrato un profilo fitochimico differente da quello degli estratti idrofili delle foglie di spinacio coltivato nelle condizioni sperimentali, pertanto sarebbe opportuno condurre ulteriori sperimentazioni per valutare l'effetto del metodo di coltivazione nello spinacio che effettivamente rientra nell'alimentazione umana. Le diverse modalità di ottenimento degli estratti di spinacio (liofilizzazione e spremitura), sembrano modificare la concentrazione dei metaboliti secondari e gli estratti liofilizzati sembrano essere più concentrati di circa 5 volte rispetto al succo.

L'attività antiossidante non è stata rilevata per tutti gli estratti liofilizzati, mentre si osserva una maggiore attività antiossidante del succo dei campioni normossici rispetto a quelli ipossici. Dal particolare andamento dell'attività antiossidante rilevata nel succo, con un andamento dose-effetto simile a quello verificato per diverse concentrazioni di vitamina C, è plausibile ipotizzare che anche per gli estratti di spinacio un maggior contenuto di molecole antiossidanti comporti l'aumento di ROS generati e quindi sposti l'attività del composto verso l'induzione di specie pro-ossidanti.

Le analisi in vitro sulla linea cellulare HT-29 hanno messo in evidenza attività antiproliferative e antiossidanti degli estratti. La citotossicità osservata non si esplica attraverso l'induzione di apoptosi, comportando la necessità di ulteriori indagini per chiarire meglio i meccanismi attraverso cui gli estratti inducono la morte cellulare.

Non è stato possibile ancora mettere a punto una linea cellulare non tumorale di colon murino per valutare il comportamento degli estratti in cellule non trasformate: l'obiettivo, tuttavia, mantiene la sua rilevanza dato che sarebbe auspicabile confrontare con i medesimi saggi linee cellulari umane non tumorali immortalizzate e tumorali provenienti dallo stesso distretto.

In ultima analisi, i risultati presentati in questa tesi confermano lo spinacio come una valida risorsa nell'ambito della chemioprevenzione e nella prevenzione delle malattie cronico degenerative grazie

alle sue proprietà antiproliferative e antiossidanti, ma sottolineano anche la necessità di approfondire alcune complessità riferibili alle modalità del suo possibile impiego

7.Report dell'attività di ricerca svolta presso il laboratorio MILPAT- UFR-de Medecine – Caen France

In-vitro study of the effects of 3-Deazaneplanocin A (DZNep) on multiple myeloma (MM) cell lines (Manuscript in preparation)

7.1.Introduction

The 3-Deazapalnocin A (DZNep) is the cyclopentanyl analog of 3-deazaadenosine that inhibits the activity of S-adenosyl-L-homocysteine (AdoHcy) hydrolase, the enzyme responsible for the reversible hydrolysis of AdoHcy to adenosine and homocysteine. Inhibition of AdoHcy hydrolase results in the cellular accumulation of AdoHcy, which leads to inhibition of S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase (MTase) activity [Xie et al., 2011].

To study the effect of DZNep, I started to test various concentrations (0.1, 0.5 and 1 μ M) and various times of treatment of DZNep on cultured cells and analyzed its effect on cell viability with the Trypan blue exclusion assay. After that, I investigated the effects of the drug on the mitochondrial respiration of cultured cells with a MTS assay in the same conditions. After having found that among the cells I tested, some were sensitive and other resistant, I choose a 72h-treatment and a 1 μ M-dose to analyze the apoptosis by flow cytometry (PI staining and APO 2.7 assay) and to analyse the targets of DZNep at the protein level using immunoblotting.

7.2. Material and Methods

7.2.1. Cell lines

CM is an immortalized (EBV+) and non transformed mature B cell line. LP-1, L-363, NCI-H929, OPM-2, RPMI 8226 (Paris) and U-266 are multiple myeloma (MM) cell lines. CM and MM cells were cultured in RPMI 1640 medium with L-glutamine (Lonza, Veviers, Belgium) plus 1% penicillin-streptomycin (Lonza, Veviers, Belgium) and 10% fetal calf serum (FBS)(PAA Laboratories GmbH-Austria). Subcultures are stated in the Table 7.2.1.

Table 7.2.1. Culture conditions for MM cell lines

Cell lines	Cell density (min - max)	Subculture (per week)
LP-1	3×10^5 - 1.5×10^6 cell/ml	2 (5×10^5 cell/ml)
L-363	2×10^5 - 1.5×10^6 cell/ml	3 (5×10^5 cell/ml)
NCI-H929 (H929)	5×10^5 - 10^6 cell/ml	2-3 (5×10^5 cell/ml)
OPM-2	3×10^5 - 10^6 cell/ml	2 (3×10^5 cell/ml)
RPMI 8226 (Paris)	5×10^5 - 2×10^6 cell/ml	2 (5×10^5 cell/ml)
U-266	2×10^5 - 10^6 cell/ml	2 (5×10^5 cell/ml)

7.2.2. Drug

DZNep stock solution was done in DMSO [50 mM] and stock solution was sequentially diluted. The final DZNep dilution was done in serum-free RPMI 1640 medium, we used 0.1, 0.5 and 1 μ M concentrations of drug.

7.2.3. Trypan blue exclusion cell viability assay

Cells were seeded in 6-well plates (2 ml/well) at the density of 2×10^5 cell/well. Cells were treated with the various concentrations of DZNep for various time intervals (24, 48, 72, 96 and 168 h) and the cell count was done. Each experiment was done in triplicate.

Briefly, the day before cell seeding, cells were diluted at a 1:2 ratio to have them in the growing log phase. The day after cells were seeded in each well at the density 2×10^5 cells in 1 ml volume. Then I added 1 ml of RPMI 1640 complete medium containing drug at twice as much final concentration (0.2, 1 or 2 μ M). Control were treated with 1% DMSO which is the highest concentration used for preparing the drug.

For cell counting, cells in each well were resuspended with a sterile 1 ml pipette and 30 μ l of cell suspension were mixed with the same amount of Trypan blue (Trypan Blue Stain 0,4% Biowhittaker® (Lonza, Walkersville, MD 21793 USA)).

7.2.4. MTS assay

Cultured cells were stimulated as before. Each experiment was carried out in 96-well plates (200 μ l/well) and cells (2×10^4 cell/well) were seeded in a volume of 100 μ l then treated as before (same

concentrations and time intervals for drug in a 100 µl volume). Each experiment was made in quadruplicate.

We used the CellTiter⁹⁶Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega Corporation, Madison, WI, USA). According to the manufacturer, 20 µl of solution were added to each well. Plates were incubated for 4 h at 37°C, then read with the spectrophotometer at OD 450 nm. Controls for background were made just adding the culture medium with no cells to the wells. Control of the untreated cells were made without adding any drug treatments to the cell seeded in the wells. Both the controls were carried out in quadruplicate.

7.2.5. Analysis of apoptosis with flow cytometry

Flow cytometry provides a rapid and reliable method to quantify viable cells in a cell suspension.

7.2.5.1. Staining of cells with propidium iodide

Propidium iodide staining coupled with flow cytometry provides a rapid and reliable method to quantify viable cells in a cell suspension. Propidium iodide (PI solution 1.0 mg/ml in water)(Sigma-Aldrich, USA) is a membrane impermeant dye that is generally excluded from viable cells used to determine the cell viability. It binds to double stranded DNA by intercalating between base pairs. Briefly, At least 1×10^6 cells were centrifuged at 1200 rpm for 5 min. The supernatant was discarded and the cells were washed twice with 100 µl cold (4°C) PBS (Sigma-Aldrich, USA). The cells were centrifuged again, the supernatant discarded and was added propidium iodide (P.I.) and RNase (Qiagen, Germany) (40 µg P.I. and 0.1 mg RNase/DNase-free) and the cells were incubated for 30 min in the dark. Finally, the cells were undergo to FACS analysis.

7.2.5.2. Apo.2.7

Apo2.7 reacts with a 38 kDa mitochondrial membrane protein (7A6 antigen) which is exposed on cells undergoing apoptosis. It has been suggested that Apo2.7 protein is involved in the molecular cascade of apoptosis and its expression represents an early event in apoptosis rather than a final product of dead cells. At least 1×10^6 cells were centrifuged at 1200 rpm for 5 min. The supernatant was discarded and the cells were washed twice with 100 µl cold (4°C) PBS (Sigma-Aldrich, USA). The cells were centrifuged again, the supernatant discarded and fixed with 100 µl cold (4°C) ethanol. The cells were centrifuged again, ethanol was discarded and the cells were washed twice with 100 µl cold (4°C) PBS (Sigma-Aldrich, USA). The cells were centrifuged again, the supernatant discarded and 20 µl Apo2.7 PE-labelled antibody (Coulter, UK) was added together

with 80 µl of PBS (Sigma-Aldrich, USA) and the cells were incubated for 15 min in the dark. Finally, the cells were undergo to FACS analysis.

7.2.6. Western Blot

Proteins were extracted from cultured treated cells (0.1 to 1 µM, for 72 h or vehicle). The lysis buffer for the protein extraction was prepared before as follow: 20 mM Hepes pH 7,9; 20% glycerol; 50 mM KCl; 1 mM EDTA; 400 mM NaCl (Sigma-Aldrich, USA) in sterile water Versylene® (FRESENIUS-KABI, France). For the protein extraction about 30 µl of lysis buffer added with 20% of inhibitors cocktail (5 µg/ml Leupeptine; 0.2 U/ml aprotinine; 1mM PMSF; 5 mM Na₃VO₄) was added to the pellet of cells in a eppendorf and vortexed. Then the suspension has been freezed and thawed for 5 times in liquid nitrogen. Then the suspension has been spinned in a centrifuge (13000 rpm x 15') and the supernatant collected. The supernatant has been analyzed for the protein concentration. Briefly, the blank has been prepared adding 200 µl of the reagent Bio-Rad Protein Assay dye reagent concentrate (Bio-Rad, USA) as the protocol required to 800 µl of sterile water Versylene® (FRESENIUS-KABI, France). For the samples the same quantity of supernatant (2 µl) was added to 800 µl of sterile water Versylene® (FRESENIUS-KABI, France) and 200 µl of reagent Bio-Rad Protein Assay dye reagent concentrate (Bio-Rad, USA). The blank has been used to tare the spectrophotometer and samples were analyzed by the spectrophotometer SmartSpec™ 3000 Spectrophotometer (Bio-Rad, USA).

For Western blot analysis, 30 µg of protein were separated by SDS-PAGE (12% acrylamide gels (30% Acrylamide/Bis Solution 29:1 (Bio-Rad, USA))), ran the electrophoresis (Bio-rad Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad, USA)), then transferred onto nitrocellulose membranes (Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad, USA) at a constant voltage of 15 V for 60 minutes.). The membrane was colored with a rapid passage in Rouge Ponceau to reveal the proteins and scanned to store the digital image. Membranes were firstly cut to the right size, rinsed (3 X 10 minutes) in the right buffer (e.g. Santa- Cruz) then immunoblotted with the following antibodies: antibody anti-histone H3 (3MeK27) AB 6002 (AbCAM, Cambridge, UK) and antibody EZh2 AC22 Mouse mAB (Cell Signaling, Danvers, MA 01923, USA). The membrane of nitrocellulose containing the protein of molecular weight of interest were incubated overnight at 4 °C at the dilution and the diluent (milk or BSA solution) indicated by the manufacturer. After the incubation with the primary antibody, the membrane was rinsed (3 X 10 minutes) in the right

buffer. The membrane were then incubated for 2 h at room temperature with the secondary antibody, rinsed and incubated with the luminescent revelator for few minutes and then the images were revealed by the luminometer in the dark and the images were acquired by the pc.

7.3. Result and Discussion

7.3.1. DNZep induces cell death in some MM cell lines assayed by Trypan blue exclusion cell viability assay

In figure 7.3.1.1 is reported the viability (%) of the various cell lines treated with DZNep 1 μ M for 96 h compared to their respective controls (vehicle-treated).

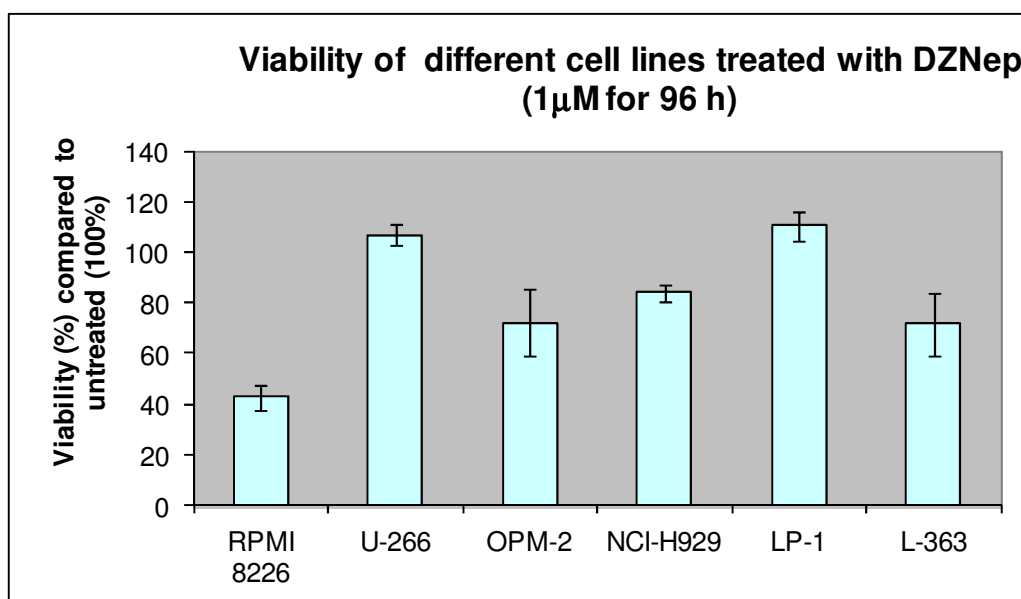


Figure 7.3.1.1. Effects of a 1 μ M- and 96 h-treatment of DNZep on the various MM cell lines

After 96 hours of treatment with the drug DZNep at the concentration of 1 μ M is possible to observe all the cellular response attended. U-266 and LP-1 do not show any difference compared to the untreated cells and they can be defined as resistant to the treatment. OPM-2, NCI-H929 and L-363, show a slight reduction of the cell viability compared to the untreated cells (30% for OPM-2 and L-363 and 20% for NCI-H929) and they can be defined as slight sensible to the treatment. Finally we observe a reduction of the cell viability of about 60% for the cell line RPMI-8226 compared to the untreated cells and this cell line is the most responsive to the treatment and it can be defined as high sensitive to the treatment.

7.3.2. DNZep decreases the metabolic activity of some MM cells

In the Figure 7.3.2.1 is reported the mitochondrial activity (%) of the different cell lines compared to their respective controls (vehicle-treated cells) after a 48 h- (blue) or a 72 h- (red) treatment with 1 μ M DNZep.

In Figure 7.3.2.1 is reported the effects of a 1 μ M- and 48 or 72 h-treatment of DNZep on the various MM cell lines assayed by the MTS Assay.

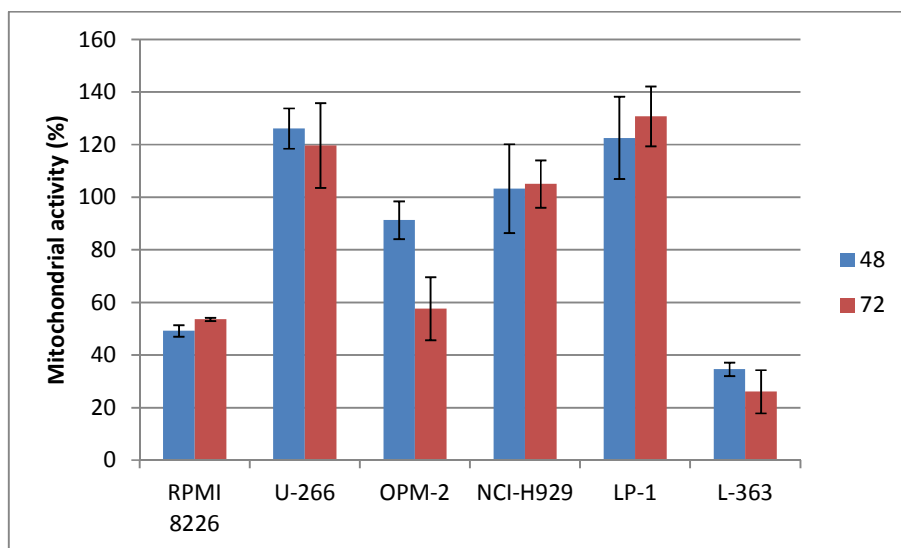


Figure 7.3.2.1. Effects of a 1 μ M- and 48 or 72 h-treatment of DNZep on the various MM cell lines

The MTS Assay can detect a cellular response to the treatment with the drug DNZep at the concentration of 1 μ M mediated by the mitochondrial activity. The LP-1 and U-266 show an increased mitochondrial activity compared to the untreated cells for both times of treatment. NCI-H929 shows no change in the mitochondrial activity for both times of treatment. OPM-2 shows a reduction in the mitochondrial activity of about 10 % for the 48 hours treatment and an increased reduction of about 40 % for the 72 hours treatment. RPMI-8226 shows a reduction of the mitochondrial activity of about 50% for both times of treatment, but is the cell line L-363 that shows the highest reduction of >60% for both times of treatment.

7.3.3. Analysis of cell cycle and apoptosis with flow cytometry

In the following figures the graphs of flow cytometry are presented. In each panel it is shown the graphs relative to cell cycle analysis in green and relative to the early stage apoptosis in red for every cell line tested after 72 hours treatment with DZNep 0,5 and 1 μ M.

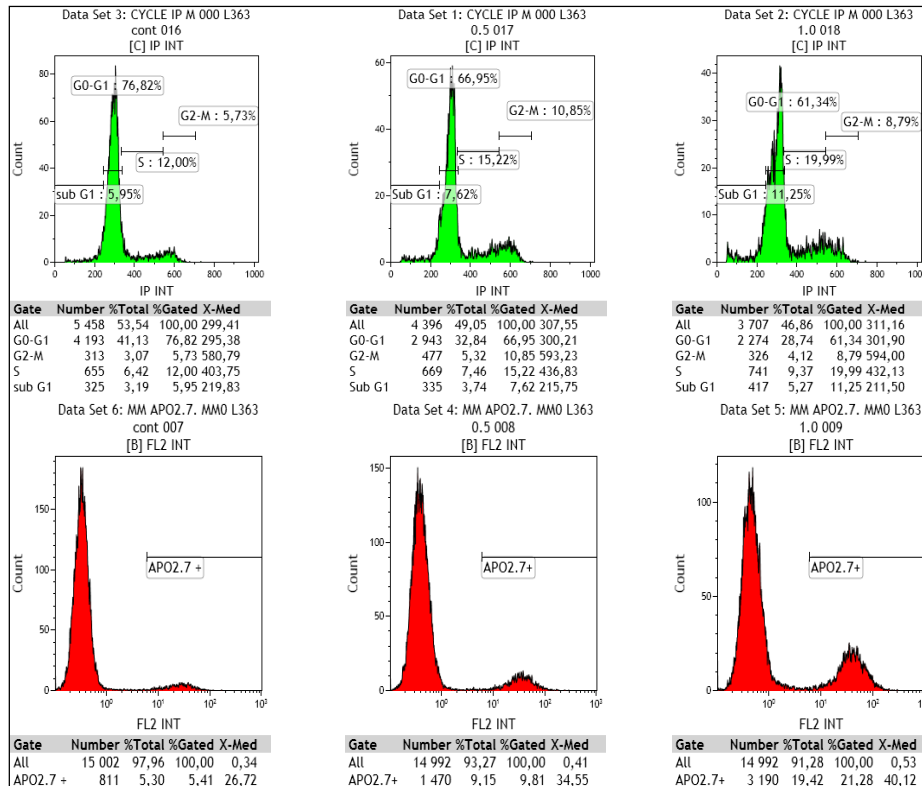


Fig. 7.3.3.1. Cell cycle analysis (green graphs) and APO 2.7 staining (red graphs) of the cell line L-363 treated for 72h with two different concentration of DZNep (0.5 and 1 μ M). L363 cont (Control), L363 0.5 (treated with DZNep 0.5 μ M) and L363 1.0 (treated with DZNep 1 μ M).

For the cell line L-363 is possible to observe in figure 7.3.3.1 a modification in the cell cycle with an increase of percentage of cells in S and sub G1 phases and a decrease of cells in G0-G1 phase of the treated compared to the control with a dose dependent response. Considering the results about the APO 2.7 assay is evident a dose dependent increase of the early stage apoptosis.

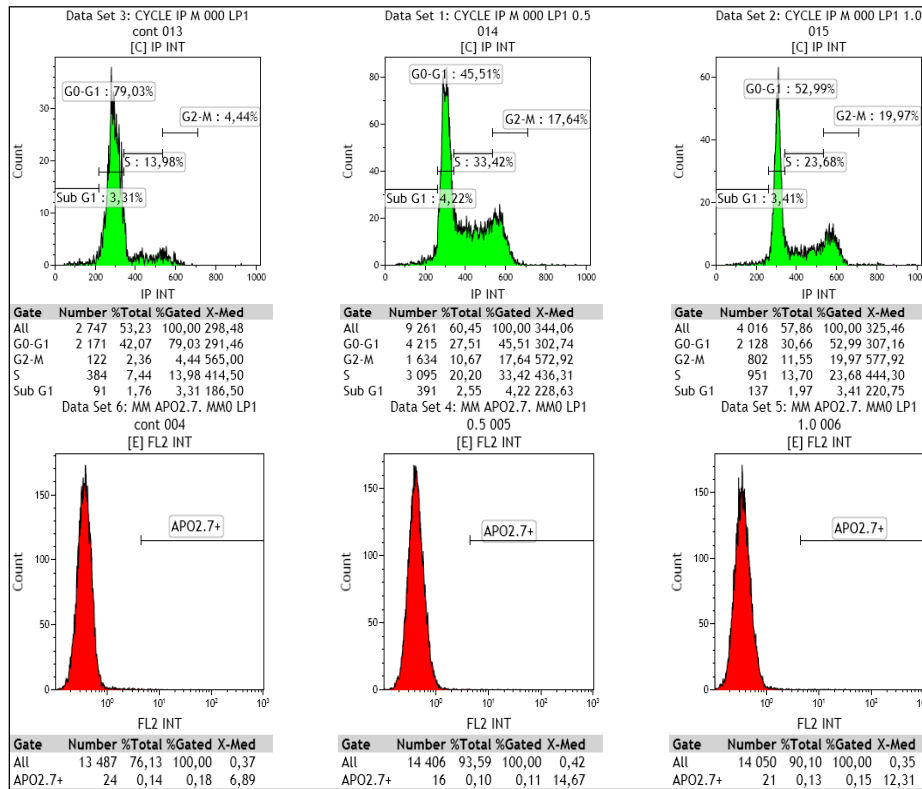


Fig. 7.3.3.2. Cell cycle analysis (green graphs) and APO 2.7 staining (red graphs) of the cell line LP-1 treated for 72h with two different concentration of DZNep (0.5 and 1 μ M). LP1 cont (Control), LP1 0.5 (treated with DZNep 0.5 μ M) and LP1 1.0 (treated with DZNep 1 μ M).

For the cell line LP-1 is possible to observe in figure 7.3.3.2 a modification in the cell cycle with an increase of percentage of cells in S and G2-M phases, a decrease of cells in G0-G1 phase and no substantial modification of the sub G1 population of the treated compared to the control. Considering the results about the APO 2.7 assay there is no induction of apoptosis.

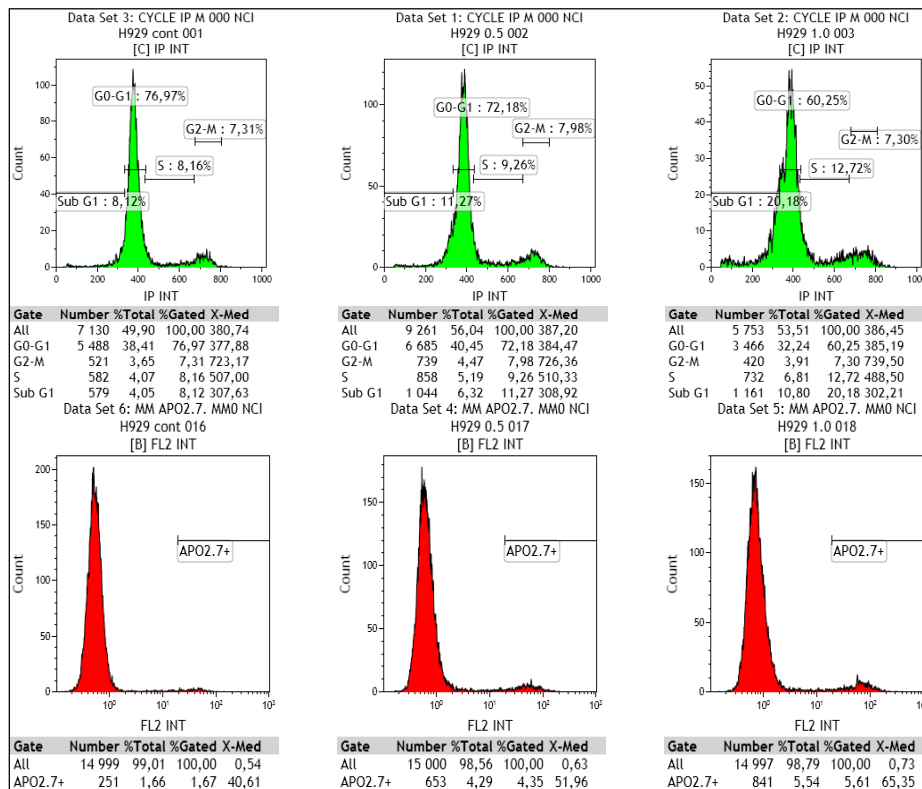


Fig. 7.3.3.3. Cell cycle analysis (green graphs) and APO 2.7 staining (red graphs) of the cell line NCI-H929 treated for 72h with two different concentration of DZNep (0.5 and 1 μ M). NCIH929 cont (Control), NCIH929 0.5 (treated with DZNep 0.5 μ M) and NCIH929 1.0 (treated with DZNep 1 μ M).

For the cell line NCI-H929 is possible to observe in figure 7.3.3.3 a modification in the cell cycle with an increase of percentage of cells in S and sub G1 phases, a decrease of cells in G0-G1 phase and no substantial modification of the G2-M population of the treated compared to the control. Considering the results about the APO 2.7 assay there is only a slight induction of apoptosis by the treatment with a dose dependent response.

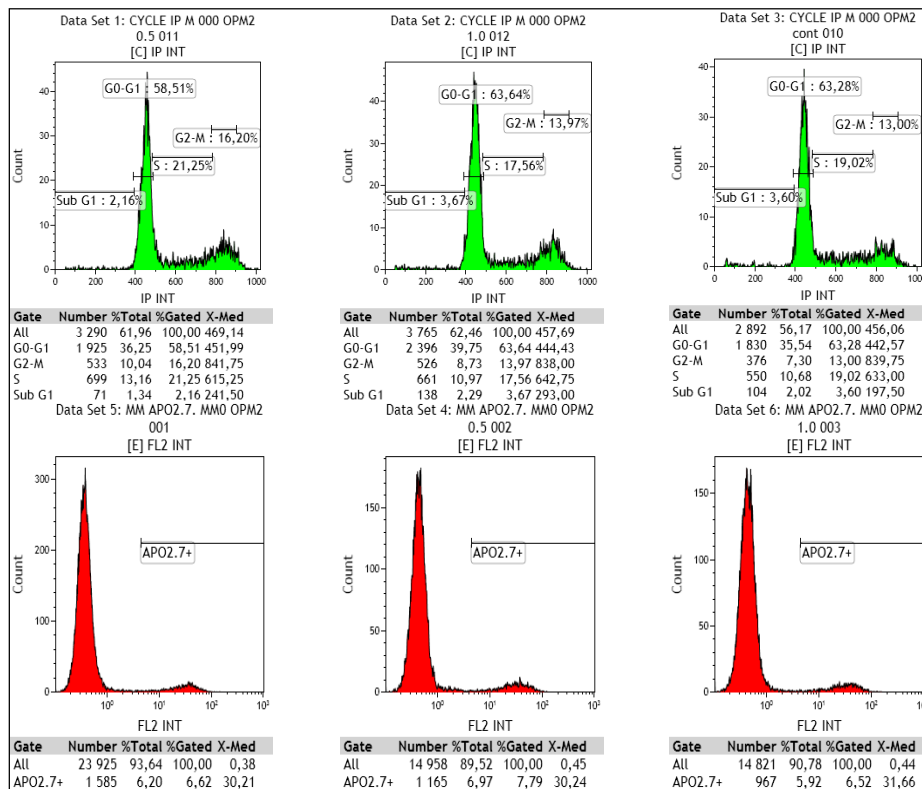


Fig. 7.3.3.4. Cell cycle analysis (green graphs) and APO 2.7 staining (red graphs) of the cell line OPM-2 treated for 72h with two different concentration of DZNep (0.5 and 1 μ M). OPM2 cont (Control), OPM2 0.5 (treated with DZNep 0.5 μ M) and OPM2 1.0 (treated with DZNep 1 μ M).

For the cell line OPM-2 is possible to observe in figure 7.3.3.4 not a substantial modification of the cell cycle with a slight increase of percentage of cells in G0-G1 and sub G1 phases and a slight decrease of cells in G2-M and S phases of the treated compared to the control. Considering the results about the APO 2.7 assay, early stage apoptosis is detected, but is not due to the treatment, because it is present at the same amount both in the control and in the treated cells.

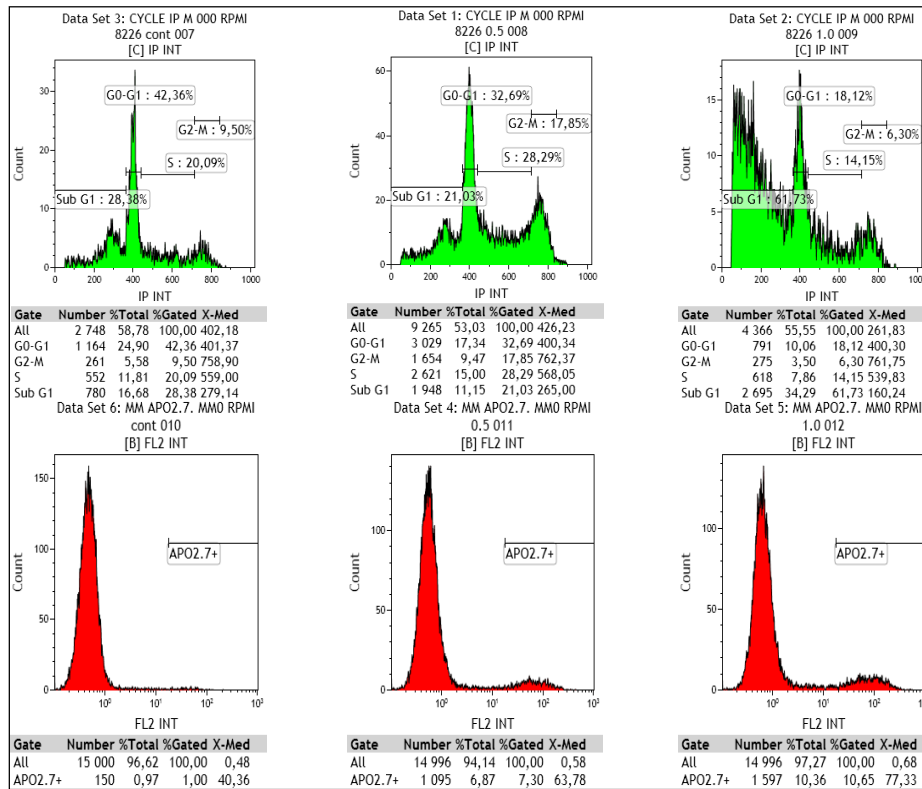


Fig. 7.3.3.5. Cell cycle analysis (green graphs) and APO 2.7 staining (red graphs) of the cell line RPMI-8226 treated for 72h with two different concentration of DZNep (0.5 and 1 μ M). RPMI cont (Control), RPMI 0.5 (treated with DZNep 0.5 μ M) and RPMI 1.0 (treated with DZNep 1 μ M).

For the cell line RPMI-8226 is possible to observe in figure 7.3.3.5 a modification in the cell cycle with an increase of percentage of cells in S and G2-M phases for the treatment with DZNep 0,5 μ M, but that decrease at values minor that of the control for the treatment with DZNep 1 μ M. For the sub G1 population there is a diminution of percentage for the treatment with DZNep 0,5 μ M, but an increase for the higher concentration (this data has to be checked with another experiment, probably due to cellular debris). A decrease of cells in G0-G1 phase is observed in both treatments compared to the control. Considering the results about the APO 2.7 assay is evident an increase dose dependent of the early stage apoptosis.

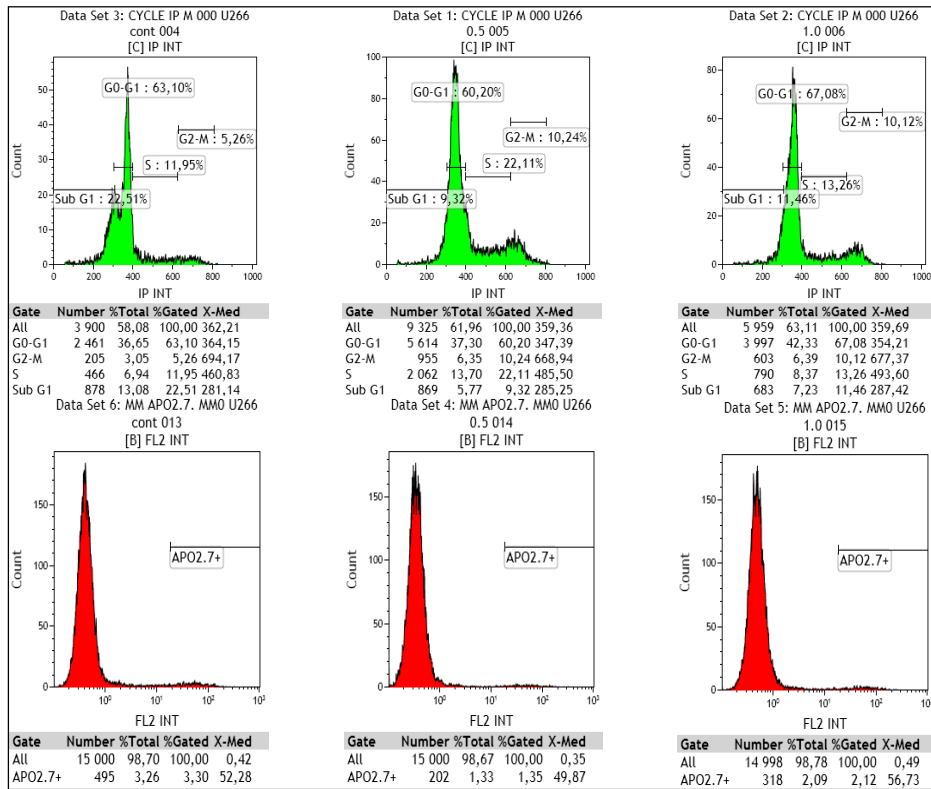


Fig. 7.3.3.6. Cell cycle analysis (green graphs) and APO 2.7 staining (red graphs) of the cell line U-266 treated for 72h with two different concentration of DZNep (0.5 and 1 μ M). U266 cont (Control), U266 0.5 (treated with DZNep 0.5 μ M) and U266 1.0 (treated with DZNep 1 μ M).

For the cell line U-266 is possible to observe in figure 7.3.3.6 a modification in the cell cycle with an increase of percentage of cells in S and G2-M phases, a decrease of cells in sub G1 phase and a decrease for the treatment with DZNep 0,5 μ M and an increase for the treatment with DZNep 1 μ M of the percentage of G0-G1 population of the treated compared to the control. Considering the results about the APO 2.7 assay there is no induction of apoptosis by the treatment with DZNep.

7.3.4. Western Blot

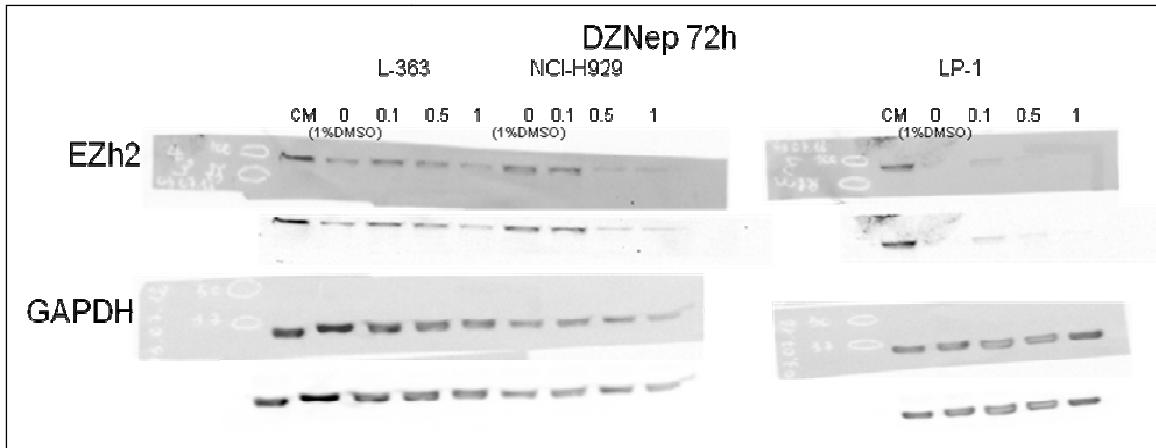


Fig. 7.3.4.1. Western blot analysis relative to L-363, NCI-H929 and LP-1 MM cell lines. CM (Control). WB has been performed after 72 h treatment with different concentration of the drug treatment DZNep (0 – 0.1 – 0.5 a 1 μ M). EZh2: enhancer of zeste homologue 2. GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

Considering the cell lines L-363 and NCI-H929 it seems that there is a downregulation of the EZh2 level after the drug treatment with the DZNep, but this finding is not consistent considering the level of GAPDH. Different is the case of LP-1 where we observe a global low or even no expression of EZh2 but where there is a good load of cellular protein extract demonstrated by the expression of GAPDH. (Fig.7.3.4.1)

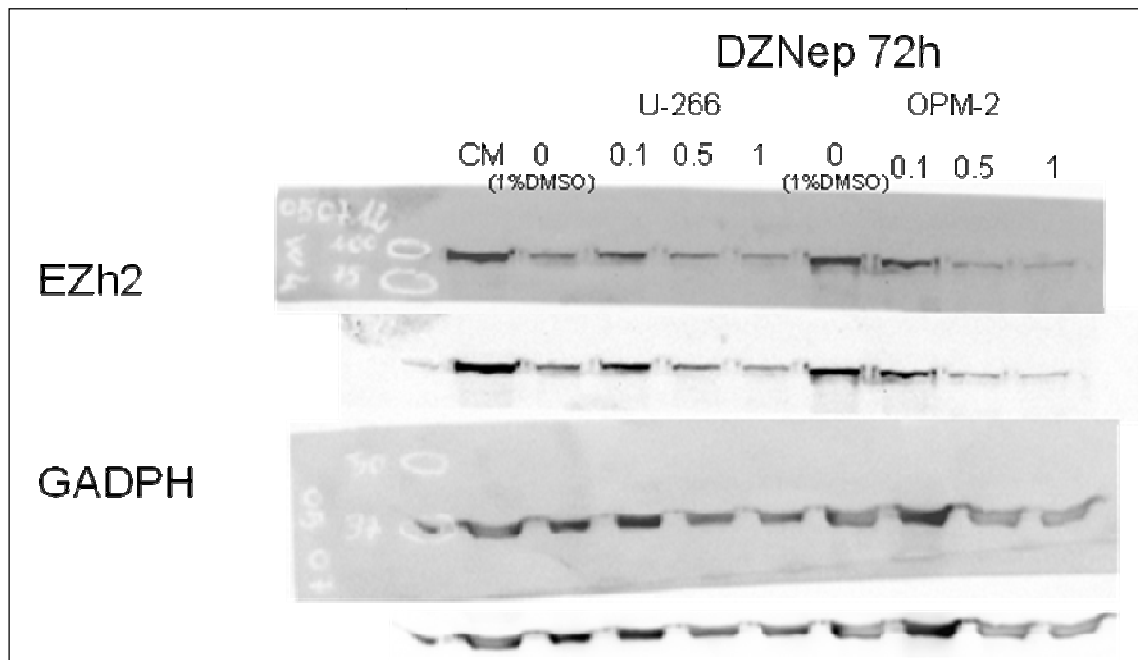


Fig. 7.3.4.2. Western blot analysis relative to U-266 and OPM-2 MM cell lines. CM (Control). WB has been performed after 72 h treatment with different concentration of the drug treatment DZNep (0 – 0.1 – 0.5 a 1 μ M). EZh2: enhancer of zeste homologue 2. GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

Considering the cell lines U-266 and OPM-2 it seems that there is a downregulation of the EZh2 level after the drug treatment with the DZNep, but this finding is not consistent considering the level of GAPDH. (Fig.7.3.4.2)

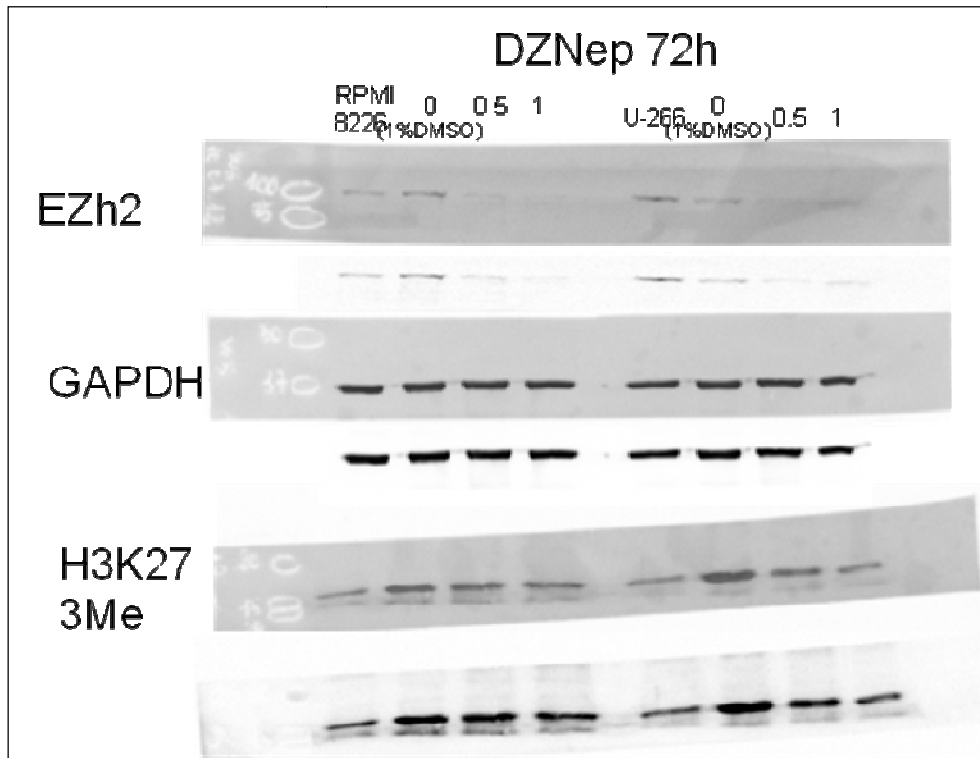


Fig. 7.3.4.3. Western blot analysis relative to RPMI 8226 and U-266 MM cell lines. WB has been performed after 72 h treatment with different concentration of the drug treatment DZNep (0 – 0.5 a 1 μ M). EZh2: Enhancer of zeste homologue 2. GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. H3K273Me: Trimethylated histone H3 (Lys27).

Considering the cell lines RPMI 8226 and U-266 there is a downregulation of the EZh2 level after the drug treatment with the DZNep in a dose-dependent manner and this finding is consistent considering the level of GAPDH. Considering the level of H3K27 is possible to observe a difference of expression of the untreated (RPMI 8226 and U-266) and the control of the vehicle (0 (1% DMSO)) for both cell lines. However is possible to see that there is a slightly decrease in the level of H3K273Me in a dose dependent manner for both cell lines(Fig. 7.3.4.3)

7.4.Conclusion

Considering all the analysis done we can integrate the results obtained so far and try to make a profile for each cell line as shown in the table (7.4.4.1):

Table 7.4.4.1. In the table are presented the multiple myeloma (MM) cell lines (LP-1, U-266, NCI-H929, OPM-2, L-363 and RPMI 8226 (Paris)) and the global result of Trypan blue exclusion assay, MTS, FACS and Western Blot Analysis.

Cell Line	Viability (Trypan assay – DZNep 1 μ M – 96 h treatment)	MTS (DZNep 1 μ M)		APO	WB	Notes
		48 h	72h			
LP-1	Resistant(100%)	↑	↑	-	No expression of EZH2	
U-266	Resistant(100%)	↑	↑	-	EZH2 and H3K273Me decrease in a dose dependent manner	
NCI-H929	20% ↓	=	=	+	Inconsistent data	
OPM-2	30% ↓	10% ↓	40% ↓	-	Inconsistent data	Apoptosis is equal in control and treated cells
L-363	30% ↓	60% ↓	70% ↓	++	Inconsistent data	

RPMI 8226	60% ↓	50% ↓	50% ↓	++	EZH2 and H3K273Me decrease in a dose dependent manner	
-----------	-------	-------	-------	----	---	--

LP-1: This cell line has shown to be resistant to the treatment, probably due to the lack of the target of the DZNep (EZH2). In particular, is possible to observe an increase in the S and G2-M phase with the treatment of 0.5 μM of DZNep and an increase in mitochondrial activity for both time of treatment (48 and 72 hours) with DZNep 1 μM.

U-266: This cell line has shown to be resistant to the treatment. In particular, is possible to observe an increase in the S and G2-M phase with the treatment of 0.5 μM of DZNep and an increase in mitochondrial activity for both time of treatment (48 and 72 hours) with DZNep 1 μM. Western Blot analysis has detected EZH2 and H3K273Me decrease in a dose dependent manner, but probably other mechanism are involved, and the outcome is no response to the DZNep.

NCI-H929: In this case is possible to observe a reduction of 20% of cell viability by Trypan Blue exclusion Assay after 1 μM DZNep treatment for 96 hours. Mitochondrial activity after 1 μM DZNep treatment of this cell line for 48 and 72 hours is not affected. No substantial modification of the cell cycle has been detected and only a slight increase of early stage apoptosis was present. EZh2 level modifications after the drug treatment with the DZNep are not consistent considering the different level of GAPDH found.

OPM-2: In this case is possible to observe a reduction of 30% of cell viability by Trypan Blue exclusion Assay after 1 μM DZNep treatment for 96 hours. Mitochondrial activity after 1 μM DZNep treatment of this cell line for 48 and 72 hours is decreased respectively of 10 and 40%. No substantial modification of the cell cycle has been detected and no increase of early stage apoptosis was present (compared to the control). EZh2 level modifications after the drug treatment with the DZNep are not consistent considering the different level of GAPDH found.

L-363: In this case is possible to observe a reduction of 30% of cell viability by Trypan Blue exclusion Assay after 1 μM DZNep treatment for 96 hours. Mitochondrial activity after 1 μM

DZNep treatment of this cell line for 48 and 72 hours is decreased respectively of 60 and 70%. Detected modifications in the cell cycle with an increase of percentage of cells in S and sub G1 phases and a decrease of cells in G0-G1 phase of the treated compared to the control with a dose dependent response. Considering the results about the APO 2.7 assay is evident an increase dose dependent of the early stage apoptosis. EZh2 level modifications after the drug treatment with the DZNep are not consistent considering the different level of GAPDH found. We can speculate that the increase of apoptosis detected is mediated by the mitochondrion by the intrinsic way, since the mitochondrial respiration is strongly altered by the DZNep.

RPMI 8226: In this case is possible to observe a reduction of 60% of cell viability by Trypan Blue exclusion Assay after 1 μ M DZNep treatment for 96 hours. Mitochondrial activity after 1 μ M DZNep treatment of this cell line for 48 and 72 hours is decreased of about 50% for both time of treatment. Detected deep modifications in the cell cycle with a great increase of percentage of cells in sub G1 phases of the treated with DZNep 1 μ M. This modification has to be verified with a repeated experiment to understand if is it due to cellular debris produced by the death of cell by necrosis or is imputable to artifacts, Considering the results about the APO 2.7 assay is evident an increase dose dependent of the early stage apoptosis. Western Blot analysis has detected EZH2 and H3K273Me decrease in a dose-dependent manner and this could be the molecular alteration imputable to the sensitivity to the DZNep treatment.

Lastly is important to highlight that MM cells responding to DZNep (RPMI and L-363) express MAF proteins. This protein plays a role in the regulation of several cellular processes, including embryonic lens fiber cell development, increased T-cell susceptibility to apoptosis, and chondrocyte terminal differentiation. Further investigations in other tumor cell lines that express MAF proteins to the susceptibility to DZNep are needed to see it could be a specific target of this drug.

Ringraziamenti

Arrivato al termine di questo percorso di ricerca non posso esimermi dal ringraziare chi mi ha dato l'opportunità di crescere e ampliare le mie conoscenze nell'ambito della ricerca.

Vorrei ringraziare il coordinatore del corso di dottorato in Biologia e Patologia Molecolare Prof.ssa Valeria Dall'Asta e i miei tutori Prof.ssa Annamaria Buschini e il Prof. Ovidio Bussolati. Inoltre vorrei ringraziare la Prof.ssa Laura Arru e la Dott.ssa Silvia Fornaciari del Dipartimento di Scienze della Vita dell'Università degli studi di Modena e Reggio Emilia per la preziosa collaborazione.

Grazie alla Dott.ssa Mirca Lazzaretti, Roberto Silva e Antonietta Cirasolo per il prezioso aiuto e ai miei colleghi e amici Serena, Francesca, Valeria e Alessio.

Un sentito grazie anche alla Prof.ssa Brigitte Sola del laboratorio MILPAT- UFR de Médecine di Caen e al suo gruppo di ricerca per avermi accolto nel suo laboratorio.

Grazie anche al supporto dei miei nonni, dei miei genitori, di mia sorella Giulia, di Gianpiero, di Fausta e degli amici di sempre Luca, Tibe e del mio compagno di "Viaggio" Panelli.

Grazie a tutte le persone che ho incontrato in tutti questi anni a Parma e che continuano a fare parte della mia vita, rendendola più bella.

Bibliografia

Aehle E., Raynaud-Le Grandic S., Ralainirina R., et al. Development and evaluation of an enriched natural antioxidant preparation obtained from aqueous spinach (*Spinacia oleracea*) extracts by an adsorption procedure. *Food Chem.* 2004; 86:579-585.

Ahnen D.J., Macrae F.A. Colorectal cancer: Epidemiology, risk factors, and protective factors. ©2012 UpToDate®

Akasaka H., Sasaki R., Yoshida K., Takayama I., Yamaguchi T., Yoshida H., Mizushima Y. Monogalactosyl diacylglycerol, a replicative DNA polymerase inhibitor, from spinach enhances the anti-cell proliferation effect of gemcitabine in human pancreatic cancer cells. *BBA* 2012. *In press.*

Ames B.N., Shinenaga M.K., Hagen T.M. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 1993; 90:7915-7922.

Aritomi M., Kawasaki T. Three highly oxygenated flavone glucuronides in leaves of *Spinacia oleracea*. *Phytochemistry* 1984; 23:2043–2047.

Aritomi M., Kokori T., Kawasaki T. Flavonol glycosides in leaves of *Spinacia oleracea*. *Phytochemistry* 1986; 25:231–234.

Arrigo A. P. Gene expression and thiol redox state. *Free Radical Biol Med* 1983; 27:936–944.

Bach A., Serra-Majem L., Carrasco J.L., et al. The use of indexes evaluating the adherence to the Mediterranean diet in epidemiological studies: a review. *Public Health Nutr* 2006; 9:132–146.

Balmain A., et al. Molecular analysis of chemical carcinogenesis in the skin. *Br J Cancer Suppl* 1988; 9:72–5.

Baruchel, S., Wainberg, M.A. The role of oxidative stress in disease progression in individuals infected by the human immunodeficiency virus. *Journal of Leukocyte Biology* 1992; 52:111-114.

Bergman M., Varshavsky L., Gottlieb H.E., Grossman S. The antioxidant activity of aqueous spinach extract: chemical identification of active fractions. *Phytochemistry* 2001; 58:143–152.

Bergquist S.A.M., Gertsson U.E., Knuthsen P., Olsson M.E. Flavonoids in Baby Spinach (*Spinacia oleracea* L.): Changes during Plant Growth and Storage. *J. Agric. Food Chem.* 2005; 53:9459-9464.

Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K.V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann. Bot.* 2003; 91:179-194.

Bonnesen C., Eggleston I.M., Hayes J.D. Dietary indoles and isothiocyanates that are generated from cruciferous vegetable can both stimulate apoptosis and confer protection against DNA damage in human colon cell lines. *Cancer Res.* 2001; 61:6120-6130.

Bose K.S.C., Agrawal B.K. Effect of lycopene from cooked tomatoes on serum antioxidant enzymes, lipid peroxidation rate and lipid profile in coronary heart disease. *Singapore Med J* 2007; 48:415-20.

Bunea A.; Andjelkovic M.; Socaciu C.; Bobis O.; Neacsu M.; Verhé R.; Van Camp J. Total and individual carotenoids and phenolic acids content in fresh, refrigerated and processed spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Food Chemistry* 2008; 108:649–656.

Burt R.W., DiSario J.A., Cannon-Albright L. Genetics of colon cancer: impact of inheritance on colon cancer risk. *Annu Rev Med* 1995; 46:371-9.

Cameron E., Pauling L. Supplemental ascorbate in the supportive treatment of cancer: prolongation of survival times in terminal human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1976; 73:3685–9.

Cameron E., Pauling L. Supplemental ascorbate in the supportive treatment of cancer: reevaluation of prolongation of survival times in terminal human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1978; 75:4538–42.

Carlsen M.H., Halvorsen B.L., Holte K., Bohn S.K., Dragland S., Sampson L., Willey C., Senoo H., Umezono Y., Sanada C., et al.: The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. *Nutr J* 2010; 9:3.

Chan A.T., Giovannucci E.L. Primary prevention of colorectal cancer. *Gastroenterology* 2010; 138:2029.

Chen B. et al. Small molecule-mediated disruption of Wnt-dependent signaling in tissue regeneration and cancer. *Nat. Chem. Biol.* 2009; 5:100–7.

Chen Q., Espey M.G., Krishna M.C., Mitchell J.B., Corpe C.P., Buettner G.R., Shacter E., Levine M. Pharmacologic ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells: action as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102:13604–9.

Chen Q., Espey M.G., Sun A.Y., Lee J.H., Krishna M.C., Shacter E., Choyke P.L., Pooput C., Kirk K.L., et al. Ascorbate in pharmacologic concentrations selectively generates ascorbate radical and hydrogen peroxide in extracellular fluid in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104:8749–54.

Chen Q., Espey M.G., Sun A.Y., Pooput C., Kirk K.L., Krishna M.C., Khosh D.B., Drisko J., Levine M. Pharmacologic doses of ascorbate act as a prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105:11105–9.

Cory A.H. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Commun.* 1991; 3:207-12.

Crouch S.P.M., et al. The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Methods* 1993; 160:81–8.

Davis C.D., Milner J.A. Diet and cancer prevention. In: Temple NJ, Wilson T, Jacobs DV, editors. *Nutritional health: strategies for disease prevention* Totowa: Humana Press; 2006; 151–71.

Davis D.M., Marcet J.E., Frattini J.C., et al. Is it time to lower the recommended screening age for colorectal cancer? *J Am Coll Surg* 2011; 213:352.

De Caterina R., Zampolli A., Del Turco S., Madonna R., Massaro M. Nutritional mechanisms that influence cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 2006; 83:421S-6S.

Duthie S.J. Folate and cancer: how DNA damage, repair and methylation impact on colon carcinogenesis. *J Inher Metab Dis.* 2011; 34(1):101-9.

Eddy D.M. Screening for colorectal cancer. *Ann Intern Med* 1990; 113:373.

Elliot R.H. and Strunin, L. Hepatotoxicity of volatile anaesthetics. *British Journal of Anaesthesia*, 1993; 70:339-349.

Evans P.H. Free radicals in brain metabolism and pathology. *British Medical Bulletin* 1993; 49:577-587.

Ferguson L.R., Zhu S.T., Harris P.J. Antioxidant and antigenotoxic effects of plant cell wall hydroxycinnamic acids in cultured HT-29 cells. *Mol. Nutr. Food Res.* 2005; 49:585 – 693.

Ferrarini L., Pellegrini N., Mazzeo T., Miglio C., Galati S., Milano F., Rossi C., Buschini A. Anti-proliferative activity and chemoprotective effects towards DNA oxidative damage of fresh and cooked Brassicaceae. *Br J Nutr.* 2011; 17:1-9.

Food and Nutrition Board, Panel on Dietary Antioxidants and Related Compounds. Vitamin C. Dietary Reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids. Washington, DC: National Academy Press; 2000; 95–185, 1–20, 434–435, 442–443.

Freedman N.D., Park Y., Subar A.F., Hollenbeck A.R., Leitzmann M.F., Schatzkin A., Abnet C.C. Fruit and vegetable intake and esophageal cancer in a large prospective cohort study. *Int. J. Cancer:* 2007; 121:2753–2760.

Fry D.E. Multiple system organ failure. In: Fry, D.E. (ed.) *Multiple system Organ Failure*. Mosby Year Book, St Louis, Missouri, 1992; pp. 3-14.

Gerhauser C. Cancer Chemoprevention and Nutri-Epigenetics: State of the Art and Future Challenges. *Top Curr Chem* 2012. *In press*.

Goodlett C.R., Horn K.H., Zhou F.C. Alcohol teratogenesis: mechanisms of damage and strategies for intervention. *Exp. Biol. Med.* 2005; 230(6):394-406.

Grebenok R.J., Venkatachari S., Adler J.H. Biosynthesis of ecdysone and ecdysone phosphates in spinach. *Phytochemistry* 1994; 36:1399–1408.

Groeger G., Quiney C., Cotter T. Hydrogen peroxide as a cell survival signaling molecule, *Antioxid Redox Signal.* 2009; 11(11):2655-71.

Gropper S.S., Smith J.L., Groff J.L. *Advanced Nutrition and Human Metabolism*. Fifth edition, 2009; Wadsworth, Canada.

- Guo S., Deng Q., Xiao J., Xie B., Sun Z. Evaluation of Antioxidant Activity and Preventing DNA Damage Effect of Pomegranate Extracts by Chemiluminescence Method. *J. Agric. Food Chem.*, 2007; 55 (8):3134–3140
- Hadad J. J. Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox (Y)—sensitive factors. *Cell Signal* 1989; 14, 879–897.
- Halliwell B. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutrition Review* 1994; 52:253-265.
- Halliwell B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutrition Review* 2012; 70(5):257-265.
- Halliwell B., Gutteridge J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, Oxford, 1989; p. 63.
- Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144(5):646–74.
- Hanahan D., Weinberg R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100:57–70.
- Harman D. Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956; 2, 298–300.
- Hendra R., Ahmad S., Oskoueian E., Sukari A., Shukor M.Y. Antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxicity of *Phaleria macrocarpa* (Boerl.) Scheff Fruit. *BMC Complement Altern Med.* 2011; 11:110.
- Huang S. Histone methyltransferases, diet nutrients and tumour suppressors. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(6):469–476.
- Hoffer L.J., Levine M., Assouline S., Melnychuk D., Padayatty S.J., Rosadiuk K., Rousseau C., Robitaille L., Miller W.H.Jr. Phase I clinical trial of i.v. ascorbic acid in advanced malignancy. *Ann Oncol.* 2008; 19:1969–74.
- Howard L.R., Pandjaitan N., Morelock T., Gil M.I. Antioxidant Capacity and Phenolic Content of Spinach As Affected by Genetics and Growing Season. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50:5891-5896.
- Hu F.B. Dietary pattern analysis: a new direction in nutritional epidemiology. *Curr Opin Lipidol* 2002; 1:3–9.
- Hu X., Benson P.J., Srivastava S.K., Mack L.M., Xia H., Gupta V., et al. Glutathione S-transferases of female A/J mouse liver and forestomach and their differential induction by anti-carcinogenic organosulfides from garlic. *Arch Biochem Biophys* 1996; 336:199–214.
- Isa N.M., Abdelwahab S.I., Mohan S., Abdul A.B., Sukari M.A., Taha M.M., Syam S., Narrima P., Cheah SCh., Ahmad S., Mustafa M.R. In vitro anti-inflammatory, cytotoxic and antioxidant activities of boesenbergin A, a chalcone isolated from *Boesenbergia rotunda* (L.) (fingerroot). *Braz J Med Biol Res.* 2012; 45(6):524-30.

- Ishida M., Nishi K., Watanabe H., Sugahara T. Inhibitory effect of aqueous spinach extract on degranulation of RBL-2H3 cells. *Food Chem.* 2013; 136:322–327.
- Jänne P.A., Mayer R.J. Chemoprevention of colorectal cancer. *N Engl J Med* 2000; 342:1960.
- Jansen M.A.K., Hectors K., O'Brien N.M., Guisez Y., Potters G. Plant stress and human health: Do human consumers benefit from UV-B acclimated crops? *Plant Science* 2008; 175:449–458.
- Jemal A., Bray F., Center M.M., et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61:69.
- Johnson I.T., Belshaw N.J. Environment, diet and CpG island methylation: epigenetic signals in gastrointestinal neoplasia. *Food Chem Toxicol* 2008; 46(4):1346–1359.
- Kaeffer B. MAMMALIAN INTESTINAL EPITHELIAL CELLS IN PRIMARY CULTURE: A MINI-REVIEW. *In Vitro Cell. Dev. Biol.- Anim.* 2002; 38(3):123-134.
- Kant A.K. Dietary patterns and health outcomes. *J Am Diet Assoc.* 2004; 104:615–635.
- Kelloff GJ. Perspectives on cancer chemoprevention research and drug development. *Adv Cancer Res* 2000; 78:199–334.
- Kelloff G.J., et al. Approaches to the development and marketing approval of drugs that prevent cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995; 4(1):1–10.
- Keum Y.S., Jeong W.S., Kong A.N.T. Chemoprevention by isothiocyanates and their underlying molecular signaling mechanism. *Mutation Research* 2004; 555:191-202.
- Kidmose U., Edelenbos M., Christensen L.P., Hegelund E. Chromatographic Determination of Changes in Pigments in Spinach (*Spinacia oleracea* L.) During Processing. *J. Chromatogr. Sci.* 2005; 43:466-472.
- Kim Y.I. Nutritional epigenetics: impact of folate deficiency on DNA methylation and colon cancer susceptibility. *J Nutr* 2005; 135(11):2703–2709.
- Lamprecht S.A., Lipkin M. Chemoprevention of colon cancer by calcium, vitamin D and folate: molecular mechanisms. *Nat Rev Cancer* 2003; (8):601–614.
- Lenzi A., Picardo M., Gandini L., et al. Glutathione treatment of dyspermia: effect on lipoperoxidation process. *Hum Reprod* 1994; 9:2044-50.
- Leopoldini M., Russo N., Chiodo S., Toscano M. Iron chelation by the powerful antioxidant flavonoid quercetin. *J. Agric. Food Chem.* 2006; 54: 6343-6351.
- Lester G.E., Hodges D.M., Meyer R.D., Munro K.D. Pre-extraction Preparation (Fresh, Frozen, Freeze-Dried, or Acetone Powdered) and Long-Term Storage of Fruit and Vegetable Tissues: Effects on Antioxidant Enzyme Activity. *J. Agric. Food Chem.*, 2004; 52:2167-2173.

- Levine M., Padayatty S.J., Espey M.G. Vitamin C: A Concentration-Function Approach Yields Pharmacology and Therapeutic Discoveries. American Society for Nutrition. *Adv. Nutr.* 2: 2011;78–88.
- Liu P.T., Ioannides C., Symons A.M., Parke D.V. Role of tissue glutathione in prevention of surgical trauma. *Xenobiotica.* 1993; 23:899–911.
- Lomnitski L., Bergman M., Nyska A., Ben-Shaul V., Grossman S. Composition, Efficacy, and Safety of Spinach Extracts. *NUTRITION AND CANCER*, 2003; 46(2):222–231.
- Longnecker M.P., Newcomb P.A., Mittendorf R., et al. Intake of Carrots, Spinach, and Supplements Containing Vitamin A in Relation to Risk of Breast Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997; 6:887-892.
- Loo G. Redox-sensitive mechanisms of phytochemical-mediated inhibition of cancer cell proliferation. *J. Nut. Biochem.* 2003; 14:64-73.
- Lynch H.T., Smyrk T.C., Watson P., et al. Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary non polyposis colorectal cancer: an updated review. *Gastroenterology* 1993; 104:1535.
- Mackey A.M., Sanvicens N., Groeger G., Doonan F., Wallace D., Cotter T.G. Redox survival signalling in retina-derived 661W cells. *Cell. Death Differ.* 2008; 15(8):1291-1303.
- Maeda N., Kokay Y., Hada T., Yoshida H., Mizushina Y. Oral administration of monogalactosyl diacylglycerol from spinach inhibits colon tumor growth in mice. *Exp. Ther. Med.* 2013; 5:17-22.
- McCullough M.L., Giovannucci E.L. Diet and cancer prevention. *Oncogene* 2004; 23:6349-6364.
- McCormick W.J. Cancer: a collagen disease, secondary to a nutritional deficiency. *Arch Pediatr.* 1959; 76:166–71.
- McLean J.S., Byrick R.J. ARDS and sepsis definitions and new therapy. *Canadian Journal of Anaesthesia* 1993; 40:585-590.
- McMichael-Phillips D.F., Harding C., Morton M., et al. Effects of soy-protein supplementation on epithelial proliferation in the histologically normal human breast. *Am J Clin Nutr* 1998; 68:1431–5S.
- Moeller S.M., Reedy J., Millen A.E., et al. Dietary patterns: challenges and opportunities in dietary patterns research an Experimental Biology workshop, April 1, 2006. *J Am Diet Assoc* 2007; 107:1233–1239.
- Moertel C.G., Fleming T.R., Creagan E.T., Rubin J., O'Connell M.J., Ames M.M. High-dose vitamin C versus placebo in the treatment of patients with advanced cancer who have had no prior chemotherapy. A randomized double-blind comparison. *N Engl J Med.* 1985; 312:137–41.
- Mori H., Niwa K., Zheng Q., Yamada Y., Sakata K., Yoshimi N. Cell proliferation in cancer prevention; effects of preventive agents on estrogen-related endometrial carcinogenesis model and

on an in vitro model in human colorectal cells. *Mut. Res./Fund. and Mol. Mechanisms of Mutagenesis*, 2001; 480–481(1):201-207.

Moser B., Szekeres T., Bieglmayer C., Wagner K.H., et al. Impact of spinach consumption on DNA stability in peripheral lymphocytes and on biochemical blood parameters: results of a human intervention trial. *Eur J Nutr.* 2011; 50(7):587-94.

Moyer M.P., Stauffer J.S., Manzano L.A., Tanzer L.R., Merriman R.L. NCM460, A Normal Human Colon Mucosal Epithelial Cell Line. *In Vitro Cell Dev Biol: Animal* 1996; 32:315-317.

Nagl N. G. Jr., Zweitzig D. R., Thimmapaya B., Beck G. R. Jr., Moran E. The c-myc gene is a direct target of mammalian SWI/SNF-related complexes during differentiation-associated cell cycle arrest. *Cancer Res.* 2006; 66:1289–1293.

Nakamura Y., Kawakami M., Yoshihiro A., Miyoshi N., Ohigashi H., Kawai K., et al. Involvement of the mitochondrial death pathway in chemopreventive benzyl isothiocyanate-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2002; 277:8492–9.

Nakamura Y., Ohigashi H., Masuda S., Murakami A., Morimitsu Y., Kawamoto Y., et al. Redox regulation of glutathione S-transferase induction by benzyl isothiocyanate: correlation of enzyme induction with the formation of reactive oxygen intermediates. *Cancer Res* 2000; 60: 219–25.

Nyska A., Suttie A., Bakshi S., Lomnitski L., Grossman S., Bergan M. Slowing tumorigenic progression in TRAMP mice and prostatic carcinoma cell lines using natural anti-oxidant from spinach, NAO—a comparative study of three anti-oxidants. *Toxicol Pathol* 2003; 1:39-51.

Östling O., Johanson, K.J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1984; 123:291-298.

Padayatty S.J., Sun H., Wang Y., Riordan H.D., Hewitt S.M., Katz A., Wesley R.A., Levine M. Vitamin C pharmacokinetics: implications for oral and intravenous use. *Ann Intern Med.* 2004; 140:533–7.

Pancione M., Remo A., Colantuoni V. Genetic and Epigenetic Events generate Multiple Pathways in Colorectal Cancer Progression. *Pathology Research International* 2012; 2012:1-11.

Parasramka M.A., Dashwood W.M., Wang R. et al., MicroRNA profiling of carcinogen-induced rat colon tumors and the influence of dietary spinach. *Mol. Nutr. Food Res.* 2012; 56:1259-1269.

Park C.H., Kimler B.F., Yi S.Y., Park S.H., Kim K., Jung C.W., Kim S.H., Lee E.R., Rha M., et al. Depletion of L-ascorbic acid alternating with its supplementation in the treatment of patients with acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndromes. *Eur J Haematol.* 2009; 83:108–18.

Parke, A., Parke, D.V. The pathogenesis of inflammatory disease: surgical shock and multiple system organ failure. *Inflammopharmacology* 1995; 3:149-168.

Parke A.L., Ioannides, C., Lewis, D.F.V. and Parke D.V. Molecular pathology of drugs – disease interaction in chronic autoimmune inflammatory diseases. *Inflammopharmacology* 1991; 1:3-36.

- Parke D.V. The cytochromes P450 and mechanisms of chemical carcinogenesis. *Environ Health Persp.* 1994; 102:852–3.
- Parke D.W. Nutritional antioxidants and disease prevention:□ mechanisms of action. In *Antioxidants in Human Health and Disease*; Basu, T. K., Temple, N. J., Garg, M. L., Eds.; CAB International:□ Wallingford, Oxon, U.K., 1999; 1–13.
- Peppas M., Goldberg T., Cai W., et al. Glycotoxins: a missing link in the ‘relationship of dietary fat and meat intake in relation to risk of type 2 diabetes in men’. *Diabetes Care* 2002; 25:1898–1899.
- Poderoso J.J., Carreras M.C., Lisdero C., Riobo N., Schopfer F., Boveris A. Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles. *Arch Biochem Biophys* 1996; 328:85-92.
- Ponz de Leon M., Sassatelli R., Benatti P., Roncucci L. Identification of hereditary nonpolyposis colorectal cancer in the general population. The 6-year experience of a population-based registry. *Cancer* 1993; 71:3493-501.
- Prinz-Langenohl R., Brönstrup A., Thorand B., Hages M., Pietrzik K. Availability of food folate in humans. *J Nutr* 1999; 129:913–6.
- Reddy A.R., Chaitanya K.V., Vivekanandan M. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *J Plan Phys* 2004; 161:1189-1202.
- Reddy N.S., Navanesan S., Sinniah S.K., Wahab N.A., Sim K.S. Phenolic content, antioxidant effect and cytotoxic activity of *Leea indica* leaves. *BMC Complement Altern Med.* 2012; 12(1):128.
- Riss T.L., Moravec R.A. Comparison of MTT, XTT, and a novel tetrazolium compound MTS for in vitro proliferation and chemosensitivity assays. *Mol. Biol. Cell (Suppl)*, 1992; 3:184-02.
- Sablina A.A., Budanov A.V., Ilyinskaya G.V., Agapova L.S., Kravchenko J.E., and Chumakov P.M. The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nat. Med.* 2005; 11(12):1306-1313.
- Sack U. et al. S100A4-induced cell motility and metastasis is restricted by the Wnt/b-catenin pathway inhibitor calcimycin in colon cancer cells. *Mol. Biol. Cell* 2011; 22:3344–3354.
- Scott E.N., Gescher A.J., Steward W.P., Brown K. Development of dietary phytochemical chemopreventive agents: biomarkers and choice of dose for early clinical trials. *Cancer Prev Res.* 2009; 2:525-530.
- Sies H. Biochemistry of oxidative stress. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1986; 25:1058 – 1071.
- Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 1988; 175:184-191.
- Singh S.V., Mack L.M., Xia H., Srivastava S.K., Hu X., Benson P.J. et al. Differential induction of glutathione redox-cycle enzymes by anti-carcinogenic organosulfides from garlic. *Clin Chem Enzymol Commun* 1997; 7:287–97.

- Singh S.V., Pan S.S., Srivastava S.K., Xia H., Hu X., Zaren H.A. et al. Differential induction of NAD(P)H:quinone oxidoreductase by anti-carcinogenic organosulfides from garlic. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 244:917–20.
- Singh S.V., Srivastava S.K., Choi S., Lew K.L., Antosiewicz J., Xiao D. et al. Sulforaphane-induced cell death in human prostate cancer cells is initiated by reactive oxygen species. *J Biol Chem* 2005; 280:19911–24.
- Slattery M.L., Benson J., Curtin K., Ma K., Schaeffer D., Potter J.D. Carotenoids and colon cancer. *Am J Clin Nutr* 2000; 71:575–82.
- Sporn M.B., et al. Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids). *Fed Proc* 1976;35:1332–8.
- Sun J., Chu Y.F., Wu X., Liu R.H. Antioxidant and antiproliferative activities of fruits. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50:7449-7454.
- Surh Y.J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer* 2003; 3:768–80.
- The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature.* 2012; 487:330-337.
- Toledo M.E.A., Ueda Y., Imahori Y., Ayaki M. L-ascorbic acid metabolism in spinach (*Spinacia oleracea* L.) during postharvest storage in light and dark. *Postharvest Biology and Technology* 2003; 28:47-57.
- Topol L., Chen W., Song H., Day T. F. & Yang Y. Sox9 inhibits Wnt signaling by promoting β -catenin phosphorylation in the nucleus. *J. Biol. Chem.* 2009; 284, 3323–3333.
- Trepanowski J.F., Canale R.E., Marshall K.E., Kabir M.M., Bloomer R.J. Impact of caloric and dietary restriction regimens on markers of health and longevity in humans and animals: a summary of available findings. *Nutrition Journal* 2011; 10:107.
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., Mazur M., Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2007; 39(1):44-84.
- Van Dam R.M. New approaches to the study of dietary patterns. *Br J Nutr* 2005; 93:573–574.
- Van Guelpen B., Hultdin J., Johansson I., et al. Low folate levels may protect against colorectal cancer. *Gut* 2006; 55:1461–6.
- Verhoeven D.T.H., Goldbohm R.A., van Poppel G., Verhagen H. and van den Brandt P.A., Epidemiological studies on brassica vegetables and cancer risk: a review, *Cancer Epidemiol., Biomarkers and Prev.* 1996; 5:733-748.
- Vinson J.A., Hao Y., Su X., Zubik L., Bose P. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. *J. Agric. Food Chem.* 2001; 49:5315-5321.

Weatherby L. and Cheng L.: Determination of flavones or quercetine-like substances in certain naturally occurring products. *J BiolChem* 1943; 48:707.

Welbourn, C.R.B., Young, Y. Endotoxin, septic shock and acute lung injury: neutrophils, macrophages and inflammatory mediators. *British Journal of Surgery* 1992; 79:998-1003.

Wenzel,U., Nickel A., Kuntz S., Daniel H. Ascorbic acid suppresses drug-induced apoptosis in human colon cancer cells by scavenging mitochondrial superoxide anions. *Carcinogenesis* 2004; 25:703–712.

Whitehead R.H., Demmler K., Rockman SP., Watson NK. Clonogenic growth of epithelial cells from normal colonic mucosa from both mice and humans. *Gastroenterology* 1999; 117:858–865.

Witz, G., 1991. Active oxygen species as factors in multistage carcinogenesis. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine* 1991; 198:675-682.

Wu X., Patterson S., Hawk E. Chemoprevention - History and general principles. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 2011; 25:445–459.

Xie Z., Bi C., Cheong LL., Liu SC., Huang G., et al. Determinants of Sensitivity to DZNep Induced Apoptosis in Multiple Myeloma Cells. *PLoS ONE* 2011; 6(6):e21583.

Yoshioka, A., Miyachi, Y., Imamura, S. and Niwa, Y. Anti-oxidant effects of retinoids on inflammatory skin diseases. *Archives of Dermatology Research* 1986; 278:177-183.

Yuspa S.H., et al. Multistage carcinogenesis in the skin. *J Investig Dermatol Symp Proc* 1996; 1(2):147–50.

Zane A., Wender S.H. Flavanols in spinach leaves. *J Org Chem* 1961; 26:4718.