

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

Διπλωματική Εργασία

***Επίδραση κλασμάτων καθαρών πολυφαινολικών μορίων από εκχυλίσματα
ψυχανθών στην ανθρώπινη τοποΐσομεράση I και στην ευκαρυωτική
τοποΐσομεράση I από σπόρο σιταριού***



Τσελέπη Μαρία

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Λιαδάκη Καλλιόπη

Λάρισα 2010

Στοιχεία Πτυχιακής Εργασίας

Το πειραματικό μέρος της πτυχιακής εργασίας με τίτλο *“Επίδραση κλασμάτων καθαρών πολυφαινολικών μορίων από εκχυλίσματα ψυχανθών στην ανθρώπινη τοποϊσομεράση I και στην ευκαρυωτική τοποϊσομεράση I από σπόρο σιταριού”*, πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη της καθηγήτριας κυρίας Κ. Λιαδάκη.

Μέλη τριμελούς επιτροπής: Λιαδάκη Καλλιόπη, Λέκτορας Βιοχημικής Φαρμακολογίας

Κουρέτας Δημήτριος, Καθηγητής Φυσιολογίας Ζώων

Στάγκος Δημήτριος, Λέκτορας Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών

Ευχαριστίες

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Καλλιόπη Λιαδάκη, Λέκτορα του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε στην ανάθεση της πτυχιακής μου εργασίας, καθώς και για την επίβλεψη, την καθοδήγηση, την πολύτιμη βοήθειά της, αλλά και τη στήριξη κατά τη διάρκεια του πειραματικού μέρους.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στην υποψήφια διδάκτορα Χρύσα Σπανού για την καθοδήγηση και την προθυμία της να άπαντα σε τυχόν απορίες μου. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω και την ομάδα του εργαστηρίου για το ιδιαίτερα φιλικό κλίμα που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο καθώς και για την πολύ καλή συνεργασία.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την οικογένεια μου για την κατανόηση που έδειξαν και την ψυχολογική υποστήριξη που μου προσέφεραν κατά τη διάρκεια της διεκπεραίωσης αυτής της εργασίας.

Περιεχόμενα

<u>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</u>	9
<u>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</u>	10
1.1 Ψυχανθή	10
1.2 Πολυφαινόλες	13
1.2.1 Φαινολικά οξέα	13
1.2.2 Φλαβονοειδή	14
1.2.3 Κατεχίνες	16
1.2.4 Ανθοκυανιδίνες	16
1.2.5 Στιλβένια	17
1.2.6 Λιγνάνες	17
1.3 Καρκίνος και χημειοπροστασία	19
1.3.1 Καρκίνος	19
1.3.2 Χημειοπροστασία	20
1.4 Πολυφαινόλες και καρκίνος	21
1.4.1 Αντικαρκινική δράση	22
1.4.2 Αντιοξειδωτική δράση	23
1.4.2.1 Ελεύθερες ρίζες και οξειδωτικό στρες	23
1.4.2.2 Αντιοξειδωτικοί παράγοντες	23
1.5 DNA Τοποϊσομεράσες	25
1.5.1 DNA Τοποϊσομεράση I	26
1.5.1.1 Δομή της Τοποϊσομεράσης I	26
1.5.1.2 Μηχανισμός δράσης της Τοποϊσομεράσης I	28
1.5.1.3 Βιολογικές λειτουργίες της Τοποϊσομεράσης I	30
1.5.2 DNA Τοποϊσομεράση II	31
1.5.2.1 Δομή της Τοποϊσομεράσης II	31
1.5.2.2 Μηχανισμός δράσης της Τοποϊσομεράσης II	32
1.5.2.3 Βιολογικές λειτουργίες της Τοποϊσομεράσης II	33
1.5.3 Τοποϊσομεράσες και καρκίνος	34
1.5.4 Αναστολείς των τοποϊσομερασών	35
1.5.4.1 Αναστολείς της τοποϊσομεράσης I	37
1.5.4.2 Αναστολείς της τοποϊσομεράσης II	39
1.5.5 Πολυφαινόλες ως αναστολείς των τοποϊσομερασών	40
1.6 Σκοπός	43
<u>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</u>	45
2.1 Υλικά	45
2.1.1 Κλάσματα καθαρών μορίων	45
2.1.2 Πλασμιδιακό DNA	46

2.1.3 Απομόνωση πλασμιδίου	46
2.1.4 Topoisomerase I relaxation assay	47
2.1.4.1 Wheat germ topoisomerase I relaxation assay	47
2.1.4.2 Human topoisomerase I relaxation assay	47
2.2 Μέθοδοι	48
2.2.1 Αρχή της μεθόδου	48
2.2.2 Πειραματική διαδικασία	49
2.2.2.1 Απομόνωση πλασμιδίου	49
2.2.2.2 Wheat germ Topoisomerase I relaxation assay	50
2.2.2.3 Human Topoisomerase I relaxation assay	51
2.2.3 Υπολογισμοί	52
<u>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</u>	54
3.1 Επίδραση κλασμάτων καθαρών μορίων στην ευκαρυωτική τοποϊσομεράση I του σίτου και την ανθρώπινη τοποϊσομεράση I.	54
3.2 Επίδραση στην τοποϊσομεράση I του σίτου κλασμάτων καθαρών μορίων που απομονώθηκαν από το φυτό <i>Vicia faba</i>	56
3.3 Επίδραση στην τοποϊσομεράση I του σίτου κλασμάτων καθαρών μορίων που απομονώθηκαν από το φυτό <i>Lotus edulis</i>	59
3.4 Επίδραση στην ανθρώπινη τοποϊσομεράση I κλασμάτων καθαρών μορίων που απομονώθηκαν από το φυτό <i>Vicia faba</i>	60
3.5 Επίδραση στην ανθρώπινη τοποϊσομεράση I κλασμάτων καθαρών μορίων που απομονώθηκαν από το φυτό <i>Lotus edulis</i>	64
<u>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ</u>	66
<u>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u>	70

Περιεχόμενα Εικόνων

<u>Εικόνα 1:</u> Σχηματική απεικόνιση ψυχανθούς	12
<u>Εικόνα 2:</u> Χημική δομή υδροξυβενζοϊκών και υδροξυκινναμικών οξέων	14
<u>Εικόνα 3:</u> Χημική δομή φλαβονοειδών	15
<u>Εικόνα 4:</u> Χημική δομή της ρεσβερατρόλης	17
<u>Εικόνα 5:</u> Χημική δομή φυτικών λιγνάνων και των ζωικών παραγώγων τους	18
<u>Εικόνα 6:</u> Πολυσταδιακό μοντέλο καρκινογένεσης	20
<u>Εικόνα 7:</u> Μηχανισμοί χημειοπροστασίας σε καρκίνο του πνεύμονα	21
<u>Εικόνα 8:</u> Δομή DNA τοποϊσομεράσης I	27
<u>Εικόνα 9:</u> Οργάνωση των περιοχών της τοποϊσομεράσης I	27
<u>Εικόνα 10:</u> Πρότυπο δράσης της τοποϊσομεράσης IA	30
<u>Εικόνα 11:</u> Πρότυπο δράσης της τοποϊσομεράσης IB	30
<u>Εικόνα 12:</u> Δομή της DNA τοποϊσομεράσης II	32
<u>Εικόνα 13:</u> Πρότυπο δράσης της τοποϊσομεράσης II	33
<u>Εικόνα 14:</u> Μηχανισμός κυτταροτοξικότητας των αναστολέων των τοποϊσομερασών	35
<u>Εικόνα 15:</u> Σχηματισμός του συμπλόκου τοποϊσομεράση-φάρμακο-DNA	36
<u>Εικόνα 16:</u> Σύνδεση της καμπτοθεκίνης στο σύμπλοκο του ενζύμου με το DNA	37
<u>Εικόνα 17:</u> Χημική δομή αναστολέων δηλητήρια (poison) της τοποϊσομεράσης I	38
<u>Εικόνα 18:</u> Χημικές δομές παραγώγων καμπτοθεκίνης	38
<u>Εικόνα 19:</u> Χημικές δομές αναστολέων poison της τοποϊσομεράσης II	39
<u>Εικόνα 20:</u> Χημική δομή των φλαβονοειδών λουτεολίνη και κερκετίνη	40
<u>Εικόνα 21:</u> Φυτό <i>Vicia faba</i> διάταξη του φυτού, το άνθος και οι καρποί του (κουκιά)	44
<u>Εικόνα 22:</u> Φυτό <i>Lotus edulis</i> , το άνθος και ο καρπός του	44
<u>Εικόνα 23:</u> Χημική δομή των καθαρών μορίων του φυτού <i>Vicia faba</i>	45
<u>Εικόνα 24:</u> Χημική δομή των καθαρών μορίων του φυτού <i>Lotus edulis</i>	45
<u>Εικόνα 25:</u> Διαμορφώσεις του πλασμιδιακού DNA στην ηλεκτροφόρηση	48
<u>Εικόνα 26:</u> Επίδραση όλων των κλασμάτων των καθαρών μορίων στην ενεργότητα της ευκαρυωτικής τοποϊσομεράσης I του σίτου	54
<u>Εικόνα 27:</u> Επίδραση όλων των κλασμάτων των καθαρών μορίων στην ενεργότητα της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I	55
<u>Εικόνα 28:</u> Επίδραση του κλάσματος καθαρού μορίου 7bb στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I του σίτου σε συγκεντρώσεις 75, 150, 300, 500, 750 και 1000 μM	56
<u>Εικόνα 29:</u> Επίδραση του κλάσματος καθαρού μορίου 11c στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I του σίτου σε συγκεντρώσεις 150, 300, 500, 750 και 1000 μM	57
<u>Εικόνα 30:</u> Επίδραση του κλάσματος καθαρού μορίου 12e στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I του σίτου σε συγκεντρώσεις 150, 300, 500, 750, 1000 μM	57
<u>Εικόνα 31:</u> Επίδραση του κλάσματος καθαρού μορίου 12f στην ενεργότητα της	

ευκαρυωτικής τοποϊσομεράσης I του σίτου σε συγκεντρώσεις 75, 150, 300, 500, 750 και 1000 μM 58

Εικόνα 32: Επίδραση του κλάσματος καθαρού μορίου Le C₂ στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I του σίτου σε συγκεντρώσεις 75, 150, 300, 500, 750 και 1000 μM 59

Εικόνα 33: Επίδραση του κλάσματος καθαρού μορίου 7bb στην ενεργότητα της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I σε συγκεντρώσεις 100, 200, 300, 400 και 500 μM 60

Εικόνα 34: Επίδραση του κλάσματος καθαρού μορίου 8c στην ενεργότητα της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I σε συγκεντρώσεις 100, 200, 300, 400 και 500 μM 61

Εικόνα 35: Επίδραση του κλάσματος καθαρού μορίου 11c στην ενεργότητα της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I σε συγκεντρώσεις 100, 200, 300, 400 και 500 μM 61

Εικόνα 36: Επίδραση του κλάσματος καθαρού μορίου 12e στην ενεργότητα της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I σε συγκεντρώσεις 100, 200, 300, 400 και 500 μM 62

Εικόνα 37: Επίδραση του κλάσματος καθαρού μορίου 12f στην ενεργότητα της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I σε συγκεντρώσεις 100, 200, 300, 400 και 500 μM 63

Εικόνα 38: Επίδραση του κλάσματος καθαρού μορίου Le C₂ στην ενεργότητα της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I σε συγκεντρώσεις 100, 200, 300, 400 και 500 μM 64

Περιεχόμενα Πινάκων

<u>Πίνακας 1:</u> Δομικές διαφορές ανάμεσα στις κατηγορίες των φλαβονοειδών	15
<u>Πίνακας 2:</u> Κατηγοριοποίηση των υποοικογενειών των τοποϊσομερασών	26
<u>Πίνακας 3:</u> Ικανότητα αναστολής της τοποϊσομεράσης I από φλαβονοειδή, τα οποία δρουν ως αναστολείς δηλητήρια	41
<u>Πίνακας 4:</u> Ονόματα των καθαρών πολυφαινολικών ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στα κλάσματα που απομονώθηκαν από τα μεθανολικά εκχυλίσματα των φυτών <i>V. faba</i> και <i>L. edulis</i>	46
<u>Πίνακας 5:</u> Δείγματα για μελέτη της δράσης των κλασμάτων καθαρών μορίων	51
<u>Πίνακας 6:</u> Δείγματα για μελέτη της δράσης των κλασμάτων καθαρών μορίων	52

Περιεχόμενα Γραφημάτων

<u>Γράφημα 1:</u> Ποσοστό αναστολής της ευκαρυωτικής τοποϊσομεράσης I του σίτου από το καθαρό μόριο 7bb	56
<u>Γράφημα 2:</u> Ποσοστό αναστολής της ευκαρυωτικής τοποϊσομεράσης I του σίτου από το καθαρό μόριο 11c	57
<u>Γράφημα 3:</u> Ποσοστό αναστολής της ευκαρυωτικής τοποϊσομεράσης I του σίτου από το καθαρό μόριο 12e	58
<u>Γράφημα 4:</u> Ποσοστό αναστολής της ευκαρυωτικής τοποϊσομεράσης I του σίτου από το καθαρό μόριο 12f	58
<u>Γράφημα 5:</u> Ποσοστό αναστολής της ευκαρυωτικής τοποϊσομεράσης I του σίτου από το καθαρό μόριο Le C ₂	59
<u>Γράφημα 6:</u> Ποσοστό αναστολής της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I από το καθαρό μόριο 7bb	60
<u>Γράφημα 7:</u> Ποσοστό αναστολής της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I από το καθαρό μόριο 8c	61
<u>Γράφημα 8:</u> Ποσοστό αναστολής της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I από το καθαρό μόριο 11c	62
<u>Γράφημα 9:</u> Ποσοστό αναστολής της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I από το καθαρό μόριο 12e	62
<u>Γράφημα 10:</u> Ποσοστό αναστολής της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I από το καθαρό μόριο 12f	63
<u>Γράφημα 11:</u> Ποσοστό αναστολής της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I από το καθαρό μόριο Le C ₂	64
<u>Γράφημα 12:</u> Τιμές IC ₅₀ των καθαρών πολυφαινολικών μορίων για την ευκαρυωτική τοποϊσομεράση I του σίτου	65
<u>Γράφημα 13:</u> Τιμές IC ₅₀ των καθαρών πολυφαινολικών μορίων για την ανθρώπινη τοποϊσομεράση I	65

Περίληψη

Τα ψυχανθή αποτελούν μια από τις πολυπληθέστερες ομάδες των δικοτυλήδων φυτών και ανήκουν στην οικογένεια *Leguminosae*. Καρπός των ψυχανθών είναι τα όσπρια, τα οποία θεωρούνται από τις πιο θρεπτικές τροφές της Μεσογειακής διατροφής, καθώς περιέχουν πλήθος ωφέλιμων συστατικών, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται οι πολυφαινόλες. Οι πολυφαινόλες είναι οργανικές ενώσεις με σπουδαίες αντιοξειδωτικές και αντικαρκινικές ιδιότητες, στις οποίες οφείλεται η ικανότητά τους να δρουν ως χημειοπροστατευτικοί παράγοντες. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν κλάσματα καθαρών μορίων, πλούσια σε πολυφαινόλες, τα οποία απομονώθηκαν από τα υπέργεια τμήματα των φυτών *Vicia faba* και *Lotus edulis*. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν επτά μόρια από το φυτό *Vicia faba* και τρία μόρια από το φυτό *Lotus edulis*. Σκοπός της εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης τους στην ενεργότητα ευκαρυωτικών τοποϊσομερασών και συγκεκριμένα στην τοποϊσομεράση I του σίτου και στην ανθρώπινη τοποϊσομεράση I. Η τοποϊσομεράση I αποτελεί ένζυμο σημαντικό για πολλές κυτταρικές διεργασίες, ενώ είναι ενδεικτική η αυξημένη έκφρασή της στα καρκινικά κύτταρα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η δράση της τοποϊσομεράσης I του σίτου αναστέλλεται από ένα κλάσμα του φυτού *Lotus edulis* και από τέσσερα κλάσματα του φυτού *Vicia faba*. Αντίστοιχα η ανθρώπινη τοποϊσομεράση I αναστέλλεται από ένα κλάσμα του φυτού *Lotus edulis* και από πέντε κλάσματα του φυτού *Vicia faba*. Επιπλέον υπολογίσθηκαν οι τιμές IC50 των κλασμάτων για την κάθε τοποϊσομεράση. Η αναστολή που έδειξαν τα συγκεκριμένα φυτικά εκχυλίσματα στη δράση της τοποϊσομεράσης I τα καθιστά πιθανούς αντικαρκινικούς παράγοντες, διευρύνοντας έτσι τις προοπτικές της πρόληψης του καρκίνου.

1.Εισαγωγή

1.1 Ψυχανθή

Τα ψυχανθή ανήκουν στην οικογένεια των φυτών *Leguminosae*, που αποτελεί ομάδα δικοτυλήδων φυτών και απαριθμεί 9.861 είδη, τα οποία κατανέμονται σε μεγάλο αριθμό γενών. Η οικογένεια των ψυχανθών (*Fabaceae* ή *Leguminosae*) είναι μια πολύ μεγάλη και οικονομικά σημαντική οικογένεια ανθοφόρων φυτών, που είναι κοινά γνωστή ως η οικογένεια των οσπρίων. Η ονομασία "*Fabaceae*" προέρχεται από το εκλιπόν γένος *Faba*, που τώρα συμπεριλαμβάνεται στο γένος *Vicia*. Η ονομασία *Leguminosae* είναι μια παλαιότερη αλλά ακόμη έγκυρη ονομασία και αναφέρεται στον τυπικό καρπό αυτών των φυτών που αποκαλείται *legume* (όσπριο). Πρόκειται για την τρίτη σε μέγεθος οικογένεια ανθοφόρων φυτών, μετά από εκείνες των Ορχιδεών (*Orchidaceae*) και των Σύνθετων (*Compositae* ή *Asteraceae*), με 730 γένη και πάνω από 19.400 είδη. Το μεγαλύτερο γένος είναι το *Astragalus* με περισσότερα από 2.000 είδη, ακολουθεί η *Acacia* με περισσότερα από 900 είδη και η *Indigofera* με περίπου 700 είδη. Άλλα μεγάλα γένη είναι τα *Crotalaria* με 600 είδη και *Mimosa* με 500 είδη.

Τα είδη αυτής της οικογένειας είναι ευρέως διαδεδομένα και αναπτύσσονται σε πολύ διαφορετικά περιβάλλοντα και κλίματα. Ένας μεγάλος αριθμός από αυτά αποτελεί σημαντικά αγροτικά φυτά, συμπεριλαμβανομένων των: *Glycine max* (σόγια), *Phaseolus* (φασόλια), *Pisum sativum* (μπιζέλι), *Cicer arietinum* (ρεβύθι), *Medicago sativa* (ήμερο τριφύλλι) και *Arachis hypogaea* (αραχίς), που είναι από τα πλέον γνωστά μέλη της οικογένειας των ψυχανθών. Ορισμένα είδη είναι επίσης φυτοπαράσιτα σε διαφορετικά μέρη της γης, όπως τα *Cytisus scoparius* (κτύσιος) και κάποια είδη *Lupinus* (www.minagric.gr, Η οικογένεια των *Leguminosae*).

Τα Ψυχανθή ποικίλλουν σε μορφή από γιγάντια δέντρα (όπως το είδος *Koompassia excelsa*) μέχρι μονοετείς πόες, με την πλειονότητα να ανήκει στις πολυετείς πόες. Τα φυτά έχουν ισχυρό πασσαλώδες ριζικό σύστημα με πολυάριθμες διακλαδώσεις. Στην κύρια ρίζα και στις διακλαδώσεις παρατηρούνται εξογκώσεις που ονομάζονται φυμάτια, τα οποία σχηματίζονται από τη συμβιωτική σχέση των αζωτοβακτηρίων του γένους *Rhizobium* ή *Bradyrhizobium* με τα φυτά. Τα αζωτοβακτήρια έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν ατμοσφαιρικό άζωτο και να το αποδίδουν στα φυτά σε άμεσα αφομοιώσιμη μορφή.

Οι βλαστοί φέρουν συνήθως διακλαδώσεις, μπορεί να είναι λείοι ή τριχωτοί με όρθια, έρπουσα ή αναρριχώμενη ανάπτυξη. Τα δύο πρώτα πραγματικά φύλλα είναι συνήθως απλά, εκφύονται αντίθετα στον πρώτο κόμβο του βλαστού, ενώ τα υπόλοιπα φύλλα είναι σύνθετα κατά εναλλαγή. Τα φύλλα αποτελούνται από τρία ή περισσότερα φυλλάρια περιπτόληκτα ή αρτιόληκτα που διαφέρουν σε υφή, σχήμα αριθμό και μέγεθος, ανάλογα με το είδος και την ποικιλία. Σε μερικά είδη το ακραίο φυλλάριο ή το ζεύγος των

φυλλαρίων μπορεί να αντικαθίσταται από απλή ή διακλαδιζόμενη έλικα. Στη βάση του σύνθετου φύλλου διακρίνεται ένα ζευγάρι μικρότερων φυλλαρίων, που ονομάζονται παράφυλλα, τα οποία ποικίλλουν σε σχήμα και μέγεθος.

Οι ταξιανθίες είναι επάκριες ή μασχαλιαίες και τα άνθη τους είναι διατεταγμένα σε κεφαλές ή βότρυς. Το άνθος των ψυχανθών περιλαμβάνει ένα σωληνοειδή κάλυκα που καταλήγει σε πέντε ανισομήκη ή σχεδόν ισομήκη δόντια και τη στεφάνη, που αποτελείται από πέντε πέταλα τριών διαφορετικών ειδών: το μεγαλύτερο πέταλο που είναι ο πέτασος, δύο όμοια μεταξύ τους, ελεύθερα το ένα από το άλλο, που ονομάζονται πτέρυγες και δύο ενωμένα μεταξύ τους πέταλα που αποτελούν την τρόπιδα. Στο εσωτερικό της τρόπιδας βρίσκονται δέκα στήμονες, τα νήματα των οποίων μπορεί να είναι ενωμένα μεταξύ τους σχηματίζοντας ένα σωλήνα που περιβάλλει τον ύπερο ή μπορεί ο ένας να είναι ελεύθερος και οι υπόλοιποι εννέα ενωμένοι. Ο ύπερος είναι επιφυής και αποτελείται από ένα καρπόφυλλο, το οποίο σχηματίζει ένα στύλο που καταλήγει σε ένα μόνο στίγμα. Το καρπόφυλλο αποτελείται από μία ωοθήκη που περικλείει μία ή περισσότερες σπερματικές βλάστες (ωάρια). Ο καρπός είναι ένας λοβός με δύο τοιχώματα, τα οποία συνδέονται με δύο ραφές. Ο λοβός ποικίλλει σε σχήμα, υφή, χρώμα, μέγεθος και στο εσωτερικό του βρίσκεται ένας ή περισσότεροι σπόροι ενωμένοι με το λοβό στο σημείο του οφθαλμού (μάτι ή hilum) μέσω του ομφαλικού ιμάντα (www.minagric.gr, Μορφολογικά χαρακτηριστικά ψυχανθών).

Τα ψυχανθή είναι από τα πιο χρήσιμα φυτά στον άνθρωπο. Η χρησιμότητά τους είναι πολλαπλή. Πάνω από όλα είναι από τις πιο θρεπτικές τροφές και για τον ίδιο και για τα ζώα. Έχουν περισσότερο λεύκωμα από τα σιτηρά, πιο πολλές θερμίδες (1 κ. όσπρια περίπου 2.660 θερμίδες) και περιέχουν αλκαλικές βάσεις αναγκαίες για τον οργανισμό. Παράλληλα είναι και από τα πιο φτηνά, από οικονομική άποψη, προϊόντα, γιατί η καλλιέργειά τους είναι εύκολη (www.livopedia). Αποτελούν σημαντική πηγή αμύλου, πρωτεϊνών και μετάλλων όπως ασβέστιο, σίδηρος, κάλιο, μαγνήσιο και ψευδάργυρο. Έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε νάτριο και λιπαρά. Η πλούσια σε θρεπτικά συστατικά σύστασή τους τα καθιστά ιδανικές τροφές, παρόλο που η κατανάλωσή τους στο Δυτικό κόσμο είναι περιορισμένη. Επιπλέον τα ψυχανθή χρησιμοποιούνται και σε άλλους τομείς, όπως για παράδειγμα στη φαρμακευτική, στις βιομηχανίες υφαντουργίας και χρωστικών ουσιών, στην ανθοκομία, στην ξυλουργική ακόμα και ως καλλωπιστικά διακοσμητικά φυτά (www.livopedia).

Τα ψυχανθή έχουν διάφορες ευεγερτικές ιδιότητες, όπως για παράδειγμα χαμηλό γλυκαιμικό δείκτη, με αποτέλεσμα να συμβάλλουν στη διατήρηση των χαμηλών επιπέδων της χοληστερόλης. Παράλληλα, έχειδειχτεί ότι περιέχουν ουσίες, οι οποίες μπορούν να δράσουν ως χημειοπροστατευτικοί παράγοντες. Επιπλέον οι πρωτεΐνες των ψυχανθών είναι αρκετά ωφέλιμες για την υγεία, εφόσον έχει παρατηρηθεί ότι έχουν ευεγερτικές επιδράσεις σε ασθένειες όπως ο διαβήτης, καρδιαγγειακές παθήσεις, παθήσεις του γαστρεντερικού σωλήνα, και στη παχυσαρκία. Παρόλα αυτά τα διάφορα είδη των ψυχανθών παρουσιάζουν

διαφορετικές επιδράσεις στον οργανισμό, οι οποίες οφείλονται στη διαφορετική σύσταση των ψυχανθών (Madar et al, 2002).

Ωστόσο στους καρπούς των ψυχανθών, που είναι τα όσπρια, υπάρχουν και ορισμένα συστατικά όπως είναι οι αναστολείς τρυψίνης, τα φυτικά οξέα, οι ολιγοσακχαρίτες και οι σαπωνίνες, οι οποίες μπορεί να μην επιδρούν θετικά στον οργανισμό. Παράδειγμα συστατικών με αρνητική επίδραση στον οργανισμό είναι οι αναστολείς τρυψίνης, οι οποίοι σχετίζονται με την πρωτεϊνική πέψη και σε κάποιους οργανισμούς είναι ικανοί να προκαλέσουν προαγωγή των χημικά επαγόμενων παγκρεατικών όγκων. Από την άλλη πλευρά αυτά τα φαινομενικά μη ευεγερτικά συστατικά μπορούν να ωφελήσουν τον οργανισμό. Για παράδειγμα, τα φυτικά οξέα εμφανίζουν σημαντικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες, οι οποίες σχετίζονται με τη μείωση του ρίσκου εμφάνισης καρκίνου του εντέρου και ίσως και του καρκίνου του μαστού. Επιπλέον έχει δειχθεί ότι οι ολιγοσακχαρίτες είναι υπεύθυνοι για την παραγωγή αερίων, τα οποία προάγουν την υγεία του εντέρου μειώνοντας παράλληλα το ρίσκο εμφάνισης καρκίνου. Τέλος οι σαπωνίνες παρατηρήθηκε ότι εμφανίζουν αντικαρκινική δράση αναστέλλοντας κατά 2/3 την ανάπτυξη των αζοξυμεθάνιο-επαγόμενων βλαβών στον έντερο. Επομένως αν και οι προαναφερθείσες ουσίες φαίνεται να μην αποτελούν αμιγώς θρεπτικά συστατικά των ψυχανθών, εμφανίζουν ορισμένες ευεγερτικές ιδιότητες, οι οποίες τα καθιστούν σημαντικούς αντικαρκινικούς παράγοντες (Messina, 1999).

Ορισμένοι καρποί των ψυχανθών, όπως είναι τα κοινά φασόλια, περιέχουν μεγάλες ποσότητες τυραμίνης, γι' αυτό και η κατανάλωση τους πρέπει να αποφεύγεται όταν γίνεται παράλληλη λήψη αναστολέων των μονοαμινοξειδασών (MAOI). Επιπρόσθετα, τα ακατέργαστα κοινά φασόλια περιέχουν ουσίες όπως βισίνη και ισουραμίλη, οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν αιμολυτική αναιμία στους ασθενείς που έχουν έλλειψη του ενζύμου G6PD, γνωστό ως φαινόμενο φαβισμού (favism). Οι περιοχές προέλευσης του φασολιού σχετίζονται με περιοχές ανθεκτικότητας σε ελονοσία και υπάρχουν προτάσεις ότι η αναιμία ως αποτέλεσμα του φαινομένου φαβισμού (favism) ενεργεί προστατευτικά στην ελονοσία. (www.worldlingo.com)



Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση ψυχανθούς

1.2 Πολυφαινόλες

Οι πολυφαινόλες αποτελούν μια μεγάλη ομάδα φυτικών συστατικών, τα οποία συναντώνται κυρίως στο κυτταρικό τοίχωμα. Θεωρούνται πολύ σημαντικές ενώσεις με σπουδαία αντιοξειδωτική δράση, όπως επίσης και χημειοπροστατευτική δράση έναντι διάφορων τύπων καρκίνων (Dragsted et al., 2003). Είναι σύνθετες ενώσεις αποτελούμενες από δύο ή περισσότερους φαινολικούς δακτυλίους και είναι δυνατόν να κατηγοριοποιηθούν σε περισσότερους από δέκα τύπους, ανάλογα με τη χημική δομή τους. Τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή, τα στιλβένια και οι λιγνάνες είναι από τις πιο άφθονες φυτικές πολυφαινόλες, από τις οποίες τα φλαβονοειδή και τα φαινολικά οξέα καταλαμβάνουν το 60% και 30% αντίστοιχα των συνολικών καταναλισκόμενων πολυφαινολών (Nichenametla et al., 2006).

Οι πολυφαινόλες αποτελούν ισχυρές αντιοξειδωτικές ουσίες και έχουν πολλαπλές ευεργετικές ιδιότητες, όπως αντιφλεγμονώδεις, αντιαλλεργικές, αντικαρκινικές ιδιότητες, καθώς και ιδιότητες που εμποδίζουν τη διαδικασία της μεταλλαξιγένεσης και αυτήν της οστεοκλασίας που μπορεί να οδηγήσει στην οστεοπόρωση. Ως αντιοξειδωτικά παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην προστασία από το οξειδωτικό στρες, καθώς είναι ικανές να εξουδετερώνουν τις δραστικές ελεύθερες ρίζες που δημιουργούνται, οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν βλάβες στο DNA (Cantero et al., 2006).

Τροφές πλούσιες σε πολυφαινόλες είναι τα φρούτα, τα λαχανικά, το κρασί, το τσάι, ο καφές, το κακάο, τα δημητριακά, το ελαιόλαδο και τα όσπρια. Έχει βρεθεί ότι η κατανάλωση τροφών πλούσιων σε πολυφαινόλες μειώνει την πιθανότητα ανάπτυξης καρδιοαγγειακών παθήσεων, διαβήτη και νευροεκφυλιστικών ασθενειών (Scalbert et al., 2005).

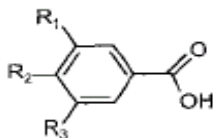
1.2.1 Φαινολικά Οξέα

Τα φαινολικά οξέα βρίσκονται σε μεγάλα ποσοστά στα φυτά και συνήθως αυτά που συναντώνται πιο συχνά είναι τα παράγωγα του υδροξυβενζοϊκού και του υδροξυκινναμικού οξέος. Στα παράγωγα του υδροξυβενζοϊκού οξέος συγκαταλέγονται το γαλλικό οξύ, το βανιλλικό οξύ, το προκατεχοϊκό οξύ και το συρινγικό οξύ, ενώ στα παράγωγα του υδροξυκινναμικού οξέος συγκαταλέγονται το π-κουμαρικό οξύ, το καφεϊκό οξύ και το φερουλικό οξύ. Τα υδροξυκινναμικά οξέα υπάρχουν κυρίως ως εστέρες με καρβοξυλικά οξέα ή γλυκόζη και τα υδροξυβενζοϊκά οξέα υπάρχουν ως γλυκοσίδες (Nichenametla et al., 2006).

Έχει βρεθεί ότι τα φαινολικά οξέα έχουν τόσο αντικαρκινική όσο και αντιοξειδωτική δράση. Πιθανοί χημειοπροστατευτικοί μηχανισμοί που χρησιμοποιούνται από τα φαινολικά οξέα είναι η αναστολή της πρόσληψης και ενεργοποίησης του καρκινογόνου, αδρανοποίηση

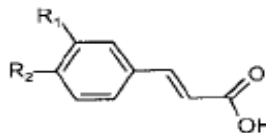
του καρκινογόνου, παρεμπόδιση της πρόσδεσης του καρκινογόνου στο DNA καθώς και ενίσχυση της πιστότητας των επιδιορθωτικών μηχανισμών του DNA. Ως αντιοξειδωτικά τα φαινολικά οξέα δρουν εξουδετερώνοντας τις δραστικές ηλεκτρόφιλες ρίζες και τις ρίζες του οξυγόνου και αναστέλλοντας το μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος (Nichenametla et al., 2006).

Hydroxybenzoic acids



$R_1 = R_2 = OH, R_3 = H$: Protocatechuic acid
 $R_1 = R_2 = R_3 = OH$: Gallic acid

Hydroxycinnamic acids



$R_1 = OH$: Coumaric acid
 $R_1 = R_2 = OH$: Caffeic acid
 $R_1 = OCH_3, R_2 = OH$: Ferulic acid

Εικόνα 2: Χημική δομή υδροξυβενζοϊκών και υδροξυκινναμικών οξέων

1.2.2 Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι από τις πιο άφθονες πολυφαινόλες που συναντώνται στα φυτά. Αποτελούν μια μεγάλη τάξη φαινολικών ενώσεων, οι οποίες έχουν μικρό μοριακό βάρος. Είναι παρόντα στα φύλλα, στους καρπούς, στο φλοιό και στα άνθη των φυτών και είναι ικανά να προσφέρουν σε αυτά προστασία από την υπεριώδη ακτινοβολία, από παθογόνους μικροοργανισμούς, καθώς και από τα φυτοφάγα ζώα (Heim et al., 2002). Τα φλαβονοειδή αποτελούνται από φαινολικούς και πυρανικούς δακτυλίους και κατηγοριοποιούνται ανάλογα με τους υποκαταστάτες. Ομαδοποιούνται σε φλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβανόνες, φλαβανονόλες, φλαβανόλες, ισοφλαβόνες, ανθοκυανιδίνες και προανθοκυανιδίνες, ανάλογα με το βαθμό οξειδωσης του κεντρικού πυρανικού δακτυλίου. Οι δομικές διαφορές των φλαβονοειδών συνοψίζονται στον πίνακα 1 και οι χημικές τους δομές δίνονται στην Εικόνα 3 (Nichenametla et al., 2006).

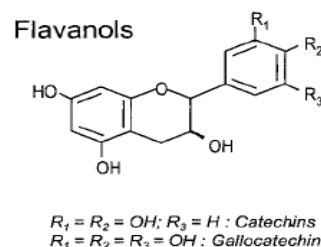
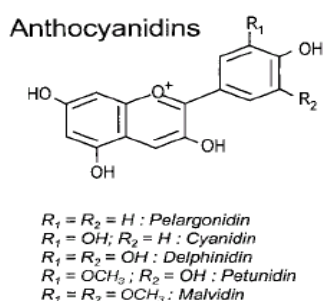
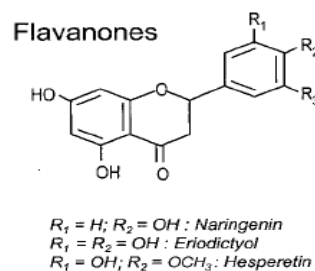
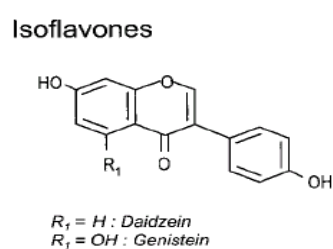
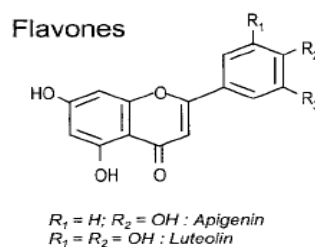
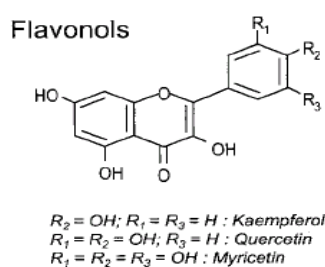
Οι φλαβονόλες είναι από τα πιο άφθονα φλαβονοειδή που υπάρχουν στις τροφές με περισσότερο συνηθισμένες τις κερκετίνη, καιμπερόλη και μυρικετίνη. Οι φλαβανόνες βρίσκονται συνήθως στα εσπεριδοειδή φρούτα και οι φλαβόνες στο σέλινο, ενώ οι κατεχίνες που ανήκουν στην κατηγορία των φλαβανολών βρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες στο πράσινο και το μαύρο τσάι και στο κόκκινο κρασί. Οι ανθοκυανίνες βρίσκονται στις φράουλες και σε άλλα σαρκώδη φρούτα. Τέλος οι ισοφλαβόνες όπως οι γενιστεΐνη και ντενζεΐνη βρίσκονται στα όσπρια και κυρίως στη σόγια (Di Carlo et al., 1999).

Οι περισσότερες από τις ευεγερτικές επιδράσεις που έχουν τα φλαβονοειδή στην υγεία αποδίδονται κυρίως στην αντιοξειδωτική δράση τους και στην ικανότητα να σχηματίζουν δακτυλίους μεταλλικών ιόντων. Πιο αναλυτικά, τα φλαβονοειδή έχουν την ικανότητα να μεταφέρουν τα ηλεκτρόνια των ελεύθερων ριζών, να σχηματίζουν δακτυλίους

μεταλλικών καταλυτών, να ενεργοποιούν ένζυμα με αντιοξειδωτική λειτουργία, να ελαττώνουν τις ρίζες της α-τοκοφερόλης και να αναστέλλουν οξειδάσες. Συγκεκριμένα, η αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης φαίνεται ότι αποτελεί τον κύριο καρδιοπροστατευτικό μηχανισμό των φλαβονοειδών. Κατά αυτόν τον τρόπο η κατανάλωση των φλαβονοειδών μπορεί να οδηγήσει σε μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου και καρδιοαγγειακών παθήσεων (Heim et al., 2002)

Πίνακας 1: Δομικές διαφορές ανάμεσα στις κατηγορίες των φλαβονοειδών

Κατηγορία	Άτομα άνθρακα που συμμετέχουν στο διπλό δεσμό	Λειτουργικές ομάδες
Φλαβανόλες	-	3-hydroxy, 3-o-gallate
Φλαβονόλες	2 ^{ος} και 3 ^{ος}	3-hydroxy, 4-oxo
Φλαβόνες	2 ^{ος} και 3 ^{ος}	4-oxo
Φλαβανόνες	-	4-oxo
Ανθοκυανιδίνες	1 ^{ος} και 2 ^{ος} , 3 ^{ος} και 4 ^{ος}	3-hydroxy



Εικόνα 3: Χημική δομή φλαβονοειδών

1.2.3 Κατεχίνες

Οι κατεχίνες είναι παρούσες σε μεγάλες ποσότητες στο πράσινο τσάι και περιέχονται σε ικανοποιητικές ποσότητες σε φρούτα, όπως τα βατόμουρα. Στις κατεχίνες οφείλονται η πικρή γεύση και η στυπτικότητα των φρούτων. Μερικές από τις κατεχίνες που συναντώνται στο τσάι είναι η επικατεχίνη, η επιγαλλοκατεχίνη, η γαλλοκατεχίνη και η επιγαλλοκατεχίνη (epigallocatechin-3-gallate, EGCG) (Nichenametla et al., 2006).

Η επιγαλλοκατεχίνη είναι η συνηθέστερη από τις κατεχίνες και είναι γνωστή για την ανοσορυθμιστική της ικανότητα, τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες, καθώς και την προστατευτική της δράση απέναντι σε παθογόνους μικροοργανισμούς. Επιπλέον, έχειδειχθεί ότι η επιγαλλοκατεχίνη έχει σημαντικές αντικαρκινικές ιδιότητες, καθώς παίζει σημαντικό ρόλο στην παρεμπόδιση της μετάστασης του καρκίνου, αναστέλλοντας την κυτταρική μετανάστευση, φαινόμενο απαραίτητο για την ανάπτυξη του καρκίνου στους ιστούς (Nichenametla et al., 2006). Σε μοριακό επίπεδο έχειδειχθεί ότι η επιγαλλοκατεχίνη αναστέλλει ένα σημαντικό αριθμό πρωτεϊνικών κινασών και εμποδίζει την ενεργοποίηση ορισμένων μεταγραφικών παραγόντων και πιθανώς με τον τρόπο αυτό προκαλεί την αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Bandelet et al., 2008).

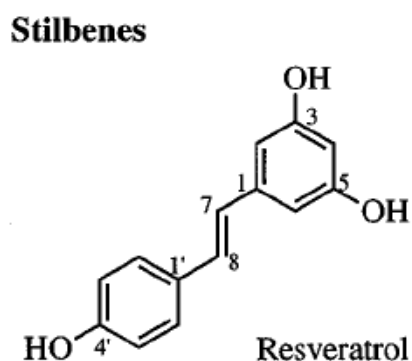
1.2.4 Ανθοκυανιδίνες

Οι ανθοκυανιδίνες είναι φυσικές υδατοδιαλυτές χρωστικές που υπάρχουν στα φυτά, αποτελούμενες από μια δομή φαινυλβενζοφυριλίου (2-phenylbenzophrylium). Είναι ευρέως διαδεδομένες καθώς υπάρχουν περισσότερες από τριακόσιες διαφορετικές ανθοκυανιδίνες ή γλυκοσίδια τους σε φρούτα και λαχανικά. Είναι υπεύθυνες για το σκούρο χρώμα πολλών φρούτων, όπως των μούρων. Οι πιο κοινές ανθοκυανιδίνες είναι η κυανιδίνη, η δελφινιδίνη, η πετουινιδίνη, η πελαργονιδίνη, η πεονιδίνη και η μαλβιδίνη (Nichenametla et al., 2006).

Οι ανθοκυανιδίνες εμφανίζουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, καθώς και χημειοπροστατευτικές ιδιότητες, επεμβαίνοντας και αναστέλλοντας πολλούς καταρράκτες μετάδοσης σήματος που οδηγούν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Επιπλέον έχει βρεθεί ότι έχουν αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες, ενώ παράλληλα έχουν ευεργετικές επιδράσεις σε διάφορες ασθένειες, όπως τη διαβητική ρετινοπάθεια (diabetic retinopathy) (Habermeyer et al., 2005).

1.2.5 Στιλβένια

Τα στιλβένια είναι οργανικές ενώσεις, οι οποίες έχουν το 1,2-διφαινυλαιθυλένιο ως λειτουργική ομάδα. Η ρεσβερατρόλη είναι μέλος της οικογένειας των στιλβενίων και συναντάται κυρίως στα μούρα και στα σταφύλια. Στα φρούτα η ρεσβερατρόλη υπάρχει είτε ως ελεύθερη μορφή, έχοντας cis ή trans διαμόρφωση, είτε με τη μορφή γλυκοσιδίου. Έχει βρεθεί ότι η ρεσβερατρόλη έχει αντικαρκινικές ιδιότητες, καθώς είναι ικανή να αναστέλλει την κυκλοξυγενάση 1, ένα ένζυμο που συμμετέχει στο στάδιο προαγωγής του καρκίνου, όπως επίσης και το σχηματισμό των ελευθέρων ριζών, στάδιο απαραίτητο για την έναρξη του καρκίνου. Η ικανότητα που διαθέτει να παρεμβαίνει και να εμποδίζει τη διαδικασία έναρξης του καρκίνου μπορεί να αποδοθεί στην αντιμεταλλαξιγόνο ιδιότητά της, στην αναστολή της ενεργοποίησης του καρκινογόνου, στην ικανότητά της να επάγει τα ένζυμα μεταβολισμού της φάσης II και στην αντιοξειδωτική δράση της. Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητές της αφορούν την αναστολή της αποικοδόμησης της δεοξυριβόζης και την αναστολή της υπεροξειδωσης των λιπιδίων, που προκαλείται από τις υδροξυλικές ρίζες. Επιπλέον, εμφανίζει οιστρογονική δράση και μπορεί να λειτουργήσει ως ανοσοκατασταλτικός, αλλά και ως παράγοντας που προάγει ανοσολογικές απαντήσεις (Nichenametla et al., 2006).



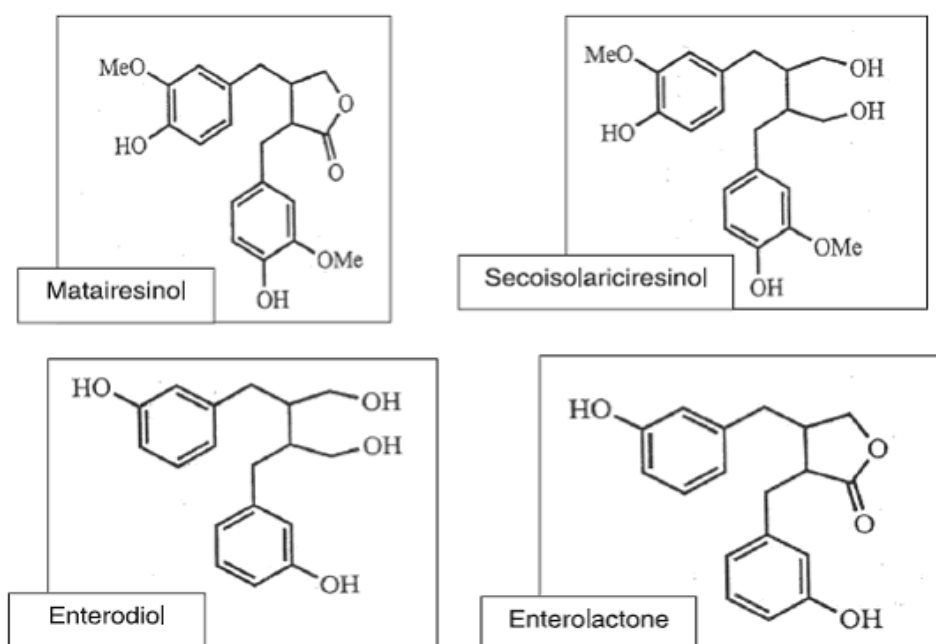
Εικόνα 4: Χημική δομή της ρεσβερατρόλης

1.2.6 Λιγνάνες

Οι λιγνάνες είναι δευτερογενείς μεταβολίτες, οι οποίοι παράγονται από τον οξειδωτικό διμερισμό δύο φαιλυλπροπανοειδών μονάδων. Συνήθως υπάρχουν στη φύση σε ελεύθερη μορφή, αλλά απαντώνται και υπό μορφή γλυκοσιδίων σε μικρό ποσοστό. Οι λιγνάνες είναι ευρέως διαδεδομένες στο φυτικό βασίλειο και έχει βρεθεί ότι κατατάσσονται σε περισσότερες από εβδομήντα οικογένειες. Επιπλέον οι λιγνάνες είναι παρούσες σε πολλά φυτά που είναι πλούσια σε φυτικές ίνες, όπως στα δημητριακά, στο σίτο, στο κριθάρι, στη βρώμη, στα όσπρια, στα σπαράγγια, στο σκόρδο, στα μπρόκολα και στα καρότα.

Συγκεκριμένα οι λιγνάνες συναντώνται στο ριζικό σύστημα των φυτών, στους βλαστούς, στα φύλλα, στους καρπούς και στα φρούτα (Saleem et al., 2005). Παραδείγματα φυτικών λιγνάνων είναι η ματαιρεσινόλη (matairesinol) και η σεκοϊσολαρισειρίνη (secoisolariciresinol), ενώ τα ζωικά τους παράγωγα είναι η εντεροδιόλη (enterodiol) και η εντερολακτόνη (enterolactone) (Webb et al., 2005).

Στις βιολογικές δράσεις των λιγνάνων περιλαμβάνονται αντιμικροβιακές και αντιϊκές ιδιότητες. Συγκεκριμένα είναι χαρακτηριστική η ενίσχυση του αμυντικού συστήματος των φυτών με σκοπό την προστασία τους από παθογόνους μικροοργανισμούς. Παράλληλα οι λιγνάνες εμφανίζουν σημαντικές φαρμακολογικές δράσεις, στις οποίες συμπεριλαμβάνονται αντιφλεγμονώδεις, ανοσοκατασταλτικές, αντικαρκινικές και αντιοξειδωτικές λειτουργίες, καθώς και θετικές επιδράσεις στις καρδιαγγειακές παθήσεις (Saleem et al., 2005).



Εικόνα 5: Χημική δομή φυτικών λιγνάνων και των ζωικών παραγώγων τους

1.3 Καρκίνος και χημειοπροστασία

1.3.1 Καρκίνος

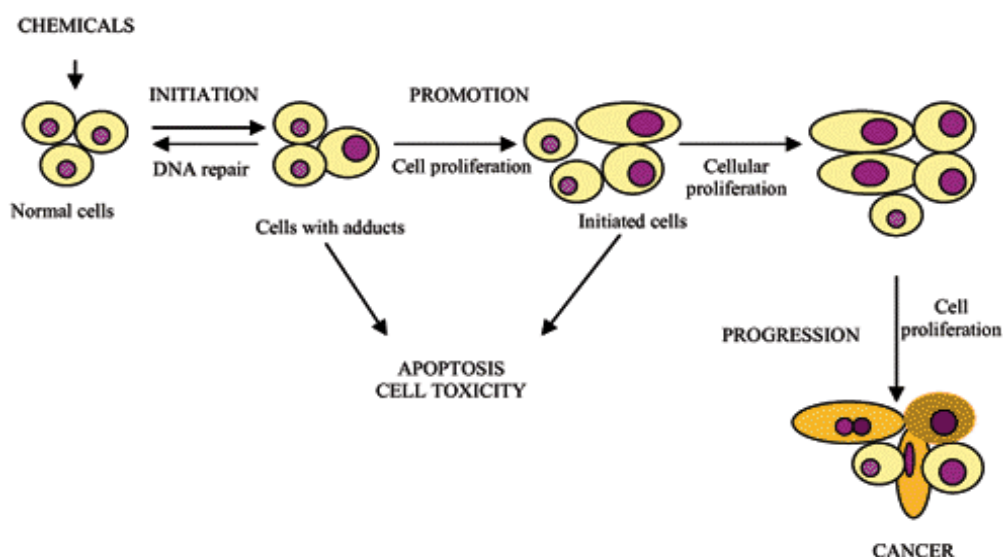
Ο καρκίνος είναι από τις μεγαλύτερες αιτίες θανάτου παγκοσμίως, παρόλη την πρόοδο που έχει σημειωθεί στη διαδικασία ανίχνευσης και θεραπείας του. Σύμφωνα με το πολυσταδιακό μοντέλο ανάπτυξης του καρκίνου η καρκινογένεση μπορεί να θεωρηθεί ως μια διαδικασία που περιλαμβάνει την αλλαγή στις μεταβολικές διαδικασίες ενός κυττάρου, οι οποίες έχουν σαν τελικό αποτέλεσμα την μετατροπή ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό κύτταρο (Cairns, 1975).

Είναι πλέον αποδεκτό ότι η διαδικασία ανάπτυξης του καρκίνου αποτελείται από τρία στάδια: το στάδιο της έναρξης (initiation), το στάδιο της προαγωγής (promotion) και το στάδιο της προόδου (progression), το καθένα από τα οποία περιλαμβάνει διαφορετικούς μηχανισμούς (Εικόνα 6) (Trosko et al., 1983).

Το πρώτο στάδιο, αυτό της έναρξης, είναι ένα μη αντιστρεπτό γεγονός, κατά το οποίο ένα φυσιολογικό κύτταρο εκτίθεται σε ένα καρκινογόνο, με αποτέλεσμα να προκαλείται μετάλλαξη στο DNA γονιδίων που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση του κυττάρου (Trosko et al., 1989). Έχει βρεθεί ότι τα γονίδια που σχετίζονται με τη διαδικασία της καρκινογένεσης είναι τόσο τα ογκοκατασταλτικά, όσο και τα πρωτογονιδια, τα προϊόντα των οποίων είναι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, στη μετάδοση σήματος και στη ρύθμιση της μεταγραφής (Tsao et al., 2004). Κάτω από αυτές τις συνθήκες το φυσιολογικό κύτταρο μετατρέπεται σε ένα κύτταρο ικανό να υφίσταται πολύ περισσότερες μιτωτικές διαιρέσεις από ότι ένα φυσιολογικό κύτταρο (Trosko et al., 1989).

Στο στάδιο της προαγωγής το αρχικό κύτταρο, στο οποίο έχει γίνει η μετάλλαξη, κάτω από την επίδραση μιτωτικών παραγόντων διαιρείται και δίνει ένα κλώνο μεταλλαγμένων κυττάρων. Σε ένα από αυτά τα μεταλλαγμένα κύτταρα συμβαίνει μια κρίσιμη μετάλλαξη, η οποία το μετατρέπει σε ένα προ-καρκινικό κύτταρο. Το στάδιο της προαγωγής συνήθως είναι αντιστρεπτό και χρειάζεται πολλά χρόνια για να εγκαθιδρυθεί. (Sun et al., 2004)

Το τρίτο στάδιο, στάδιο της προόδου, περιλαμβάνει τη μετατροπή ενός προ-καρκινικού κυττάρου σε καρκινικό, λόγω της συσσώρευσης γενετικών αλλαγών που οδηγούν στην εμφάνιση του καρκινικού φαινοτύπου. Έτσι το καρκινικό κύτταρο που δημιουργείται είναι ικανό να πραγματοποιεί ένα μεγάλο αριθμό διαιρέσεων, έχοντας παράλληλα τη δυνατότητα διείσδυσης και μετάστασης (Hennings et al., 1983).



Εικόνα 6: Πολυσταδιακό μοντέλο καρκινογένεσης

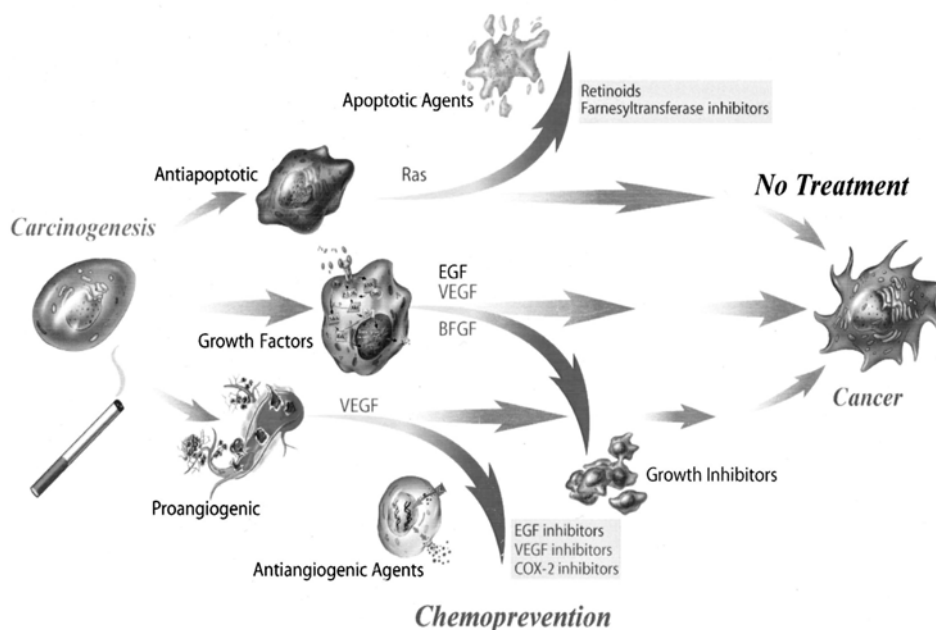
1.3.2 Χημειοπροστασία

Το πολυσταδιακό μοντέλο της καρκινογένεσης εξελίσσεται με αργό ρυθμό και η εμφάνιση του τελικού σταδίου, δηλαδή του μεταστατικού καρκίνου μπορεί να γίνει μετά από πολλά χρόνια. Η χημειοπροστασία θεωρείται από τις σημαντικότερες στρατηγικές για την πρόληψη του καρκίνου. Αφορά την χρήση ειδικών, φυσικών ή συνθετικών παραγόντων, με σκοπό την πρόληψη και αναστολή της ανάπτυξης ή της προόδου του καρκίνου (Syed et al., 2007).

Η χημειοπροστασία έναντι του καρκίνου μπορεί να επιτευχθεί, επεμβαίνοντας σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες. Ένας πρώτος μηχανισμός αφορά την αναστολή της μεταβολικής ενεργοποίησης του προκαρκινογόνου, μέσω της οποίας παρεμποδίζεται και η δράση του καρκινογόνου. Δεύτερον μέσω της επαγωγής των μεταβολικών ενζύμων της φάσης I και II επιτυγχάνεται η απενεργοποίηση και απομάκρυνση του καρκινογόνου από τον οργανισμό. Επιπλέον διεργασίες όπως η παρεμπόδιση της σύνδεσης του καρκινογόνου στο DNA και η ενίσχυση των διορθωτικών μηχανισμών του DNA, είναι μερικοί από τους μηχανισμούς με τους οποίους μπορεί να επιτευχθεί χημειοπροστασία (Syed et al., 2007).

Ένας μεγάλος αριθμός ουσιών που εμπεριέχονται στις καθημερινές τροφές φαίνεται ότι παρουσιάζουν σημαντικές χημειοπροστατευτικές ιδιότητες και για το λόγο αυτό έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες, με απώτερο σκοπό να γίνει κατανοητός ο μηχανισμός με τον οποίο αυτές δρουν (Kwon et al., 2007). Ορισμένες ουσίες δρουν εξουδετερώνοντας τις ελεύθερες ρίζες του οξειδίου ή αναστέλλοντας το μεταβολισμό των πολυαμινών, προλαμβάνοντας με αυτόν τον τρόπο τη δημιουργία μεταλλάξεων και τον μη ελεγχόμενο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Ένας άλλος μηχανισμός που χρησιμοποιείται από τους χημειοπροστατευτικούς παράγοντες είναι η ρύθμιση των σηματοδοτικών μονοπατιών, όπως

επίσης και η ρύθμιση της έκφρασης ορμονών, αυξητικών παραγόντων και των υποδοχέων τους στα κύτταρα, επιτυγχάνοντας έτσι την παρεμπόδιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Επιπρόσθετα, η επαγωγή της απόπτωσης και η αναστολή της αγγειογένεσης είναι μηχανισμοί με τους οποίους οι χημειοπροστατευτικοί παράγοντες μπορούν να εμποδίσουν την καρκινογένεση (Syed et al., 2007).



Εικόνα 7: Μηχανισμοί χημειοπροστασίας σε καρκίνο του πνεύμονα

1.4 Πολυφαινόλες και καρκίνος

Πολλοί διατροφικοί παράγοντες έχουν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν και χρησιμοποιούνται ακόμα και σήμερα για τη θεραπεία και πρόληψη του καρκίνου. Οι περισσότεροι από αυτούς τους παράγοντες παρουσιάζουν αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες, οι οποίες συμβάλλουν στη χημειοπροστατευτική τους ικανότητα. Συγκεκριμένα, τροφές όπως τα φρούτα, τα λαχανικά, οι φυτικές ίνες, το τσάι, είναι πλούσιες σε πολυφαινόλες, οι οποίες αποτελούν σημαντικούς χημειοπροστατευτικούς παράγοντες.

Οι χημειοπροστατευτικοί παράγοντες σύμφωνα με την κατηγοριοποίηση του Wattenberg (Wattenberg, 1985), χωρίζονται σε δύο ομάδες: στους παράγοντες που μπλοκάρουν (blocking agents) και στους παράγοντες που καταστέλλουν (suppressing agents). Οι παράγοντες της πρώτης κατηγορίας (blocking agents), στους οποίους συμπεριλαμβάνονται ισοθειοκυάνες (isothiocyanates), το ελλαγικό οξύ και τα φλαβονοειδή επιδρούν στο πρώτο στάδιο της καρκινογένεσης (στάδιο έναρξης), αναστέλλοντας το σχηματισμό του καρκινογόνου από πρόδρομα μόρια ή εμποδίζοντας τα καρκινογόνα να

αλληλεπιδράσουν με τα μόρια-στόχους στα κύτταρα. Η δεύτερη κατηγορία παραγόντων (suppressing agents), η οποία περιλαμβάνει το β-καροτένιο και την επιγαλλοκατεχίνη, δρα κυρίως στο δεύτερο και τρίτο στάδιο της καρκινογένεσης, δηλαδή στο στάδιο της προαγωγής και της προόδου αντίστοιχα (Ray, 2005).

1.4.1 Αντικαρκινική δράση

Η χημειοπροστασία αποτελεί μια στρατηγική προστασίας έναντι του καρκίνου με σκοπό την καθυστέρηση ή την αναστολή της διαδικασίας της καρκινογένεσης, με τη χρήση φυσικών ή συνθετικών χημικών παραγόντων. Ο όρος αυτός χρησιμοποιήθηκε πρώτα από τον Dr. Michael B. Sporn, ο οποίος αναφερόταν στην πρόληψη του καρκίνου με τη χρήση φυσικών μορφών της βιταμίνης A και των συνθετικών αναλόγων της. Είναι πλέον γνωστό ότι ένας μεγάλος αριθμός φυσικών προϊόντων που περιέχονται σε διάφορες τροφές, παρουσιάζουν σημαντικές χημειοπροστατευτικές ιδιότητες και έχουν γίνει διάφορες προσπάθειες προκειμένου να γίνει κατανοητός ο μηχανισμός με τον οποίον δρουν.

Μελέτες έχουν δείξει ότι φυτικές πολυφαινόλες, όπως για παράδειγμα πολυφαινόλες από το πράσινο και το μαύρο τσάι ή φλαβονοειδή από τη σόγια αποτελούν σημαντικούς αντικαρκινικούς παράγοντες, οι οποίοι είναι ικανοί να παρέχουν προστασία με διάφορους μηχανισμούς όπως η επαγωγή έκφρασης ενζύμων της φάσης II και αντιοξειδωτικών ενζύμων, η αναστολή της προόδου του κυτταρικού κύκλου και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, η αναστολή της έκφρασης και ενεργοποίησης των ογκογονιδίων, η επαγωγή ογκοκατασταλτικών γονιδίων, η ρύθμιση σηματοδοτικών μονοπατιών που σχετίζονται με την αγγειογένεση και τη μετάσταση, καθώς και η επαγωγή της απόπτωσης (Kwon et al., 2007).

Οι πολυφαινόλες μπορούν να επηρεάσουν τη διαδικασία της καρκινογένεσης, επιδρώντας και στα τρία στάδια (έναρξη, προαγωγή και πρόοδος). Ανάμεσα στις φυτικές πολυφαινόλες η ρεσβερατρόλη, ένα στιλβένιο που συναντάται σε μεγάλες ποσότητες στα σταφύλια, παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς είναι ικανή να επηρεάζει ένα μεγάλο αριθμό παραγόντων που εμπλέκονται στο πολυσταδιακό μοντέλο της καρκινογένεσης. Συγκεκριμένα η ρεσβερατρόλη δρα αναστέλλοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και επάγοντας την απόπτωση. Η ικανότητα της να επάγει την απόπτωση συνδέεται με την αυξημένη δραστηριότητα των κασπασών, την απορύθμιση του κυτταρικού κύκλου και τη ρύθμιση των επιπέδων έκφρασης διάφορων πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην απόπτωση, όπως η Bcl-2, Bcl-XL και η Bax. Επομένως η ρεσβερατρόλη αποτελεί ένα πολλά υποσχόμενο αντικαρκινικό παράγοντα, ο οποίος θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την πρόληψη και θεραπεία του καρκίνου (D'Archivio et al., 2008).

Σημαντικές αντικαρκινικές ιδιότητες έχουν δείξει μεταξύ των άλλων και οι πολυφαινόλες του πράσινου και μαύρου τσαγιού, οι οποίες έχουν διαπιστωθεί in vitro σε

πολλές περιπτώσεις καρκίνου (καρκίνος δέρματος, προστάτη, εντέρου, μαστού και πνεύμονα). Οι πολυφαινόλες του πράσινου και του μαύρου τσαγιού, όπως το φλαβονοειδές EGCG (epigallocatechin-3-gallate), είναι ικανές να ρυθμίζουν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων, την απόπτωση, την αγγειογένεση και τη μετάσταση, επεμβαίνοντας σε πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο. Πιο συγκεκριμένα το EGCG επιδρά στη διαδικασία της καρκινογένεσης με το να επηρεάζει την έκφραση πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην απόπτωση, όπως για παράδειγμα οι πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2, την έκφραση του VEGF και των αναστολέων του κυτταρικού κύκλου (D'Archivio et al., 2008).

1.4.2 Αντιοξειδωτική δράση

1.4.2.1 Ελεύθερες ρίζες και οξειδωτικό στρες

Ο όρος (ROS) χρησιμοποιείται για να περιγράψει όλες τις οξυγονοκεντρικές ρίζες, όπως το ανιόν του σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) και του υδροξυλίου (OH^{\cdot}), καθώς και άλλα παράγωγα που δεν αποτελούν ρίζες του οξυγόνου, όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) και η μονήρης κατάσταση του οξυγόνου (1O_2) (Halliwell & Gutteridge, 1998). Επιπλέον, ως ελεύθερες ρίζες χαρακτηρίζονται και ορισμένες δραστικές μορφές του αζώτου (RONS) όπως το μονοξειδίο του αζώτου (NO^{\cdot}) και το διοξειδίο του αζώτου (NO_2^{\cdot}) (Rigas et al., 2008).

Οι οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις είναι σημαντικές για τα κύτταρα, καθώς η παραγωγή της βασικής μονάδας ενέργειας (ATP) εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις ανταλλαγές υδρογόνων και ηλεκτρονίων μεταξύ των βιολογικών μορίων. Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και αζώτου παράγονται συνεχώς με οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις από τα μιτοχόνδρια των περισσότερων κυττάρων, καθώς και από το κυτόχρωμα P450, τα μακροφάγα και τα υπεροξύσωματα (peroxisome) (Rigas et al., 2008). Είναι απαραίτητες για την κυτταρική επιβίωση γιατί συμμετέχουν στη μεταγωγή σήματος και χρησιμοποιούνται από τα φαγοκύτταρα για την ανοσολογική απόκριση. Ωστόσο, οι ελεύθερες ρίζες είναι ικανές να αντιδράσουν και να προκαλέσουν βλάβες σε διάφορα βιομόρια, όπως νουκλεϊκά οξέα (DNA), λιπίδια και πρωτεΐνες. Συνεπώς, η έλλειψη ισορροπίας μεταξύ των ελεύθερων ριζών και των αντιοξειδωτικών μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση του οξειδωτικού στρες, το οποίο συνδέεται με πολλές παθολογικές καταστάσεις, όπως καρκίνος, κυτταρική γήρανση, καρδιαγγειακές και νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Finkel et al., 2000).

1.4.2.2 Αντιοξειδωτικοί παράγοντες

Ως αντιοξειδωτικό θεωρείται οποιαδήποτε ουσία η οποία όταν βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις, συγκριτικά με εκείνες ενός οξειδωμένου υποστρώματος, επιβραδύνει ή

εμποδίζει την οξειδωση αυτού του υποστρώματος (Halliwell, 2001). Η ικανότητα μιας ουσίας να δρα ως αντιοξειδωτικό αποδίδεται εν μέρει στο δυναμικό (E°), το οποίο αφορά την ικανότητα της ουσίας να είναι δότης ενός υδρογόνου ή ενός ηλεκτρονίου υπό καθορισμένες συνθήκες. Μια μικρή τιμή του E° υποδηλώνει ότι απαιτείται λιγότερη ενέργεια για την απομάκρυνση του υδρογόνου ή του ηλεκτρονίου (Frei et al., 2003). Τα αντιοξειδωτικά είναι οι κύριοι μηχανισμοί άμυνας στο οξειδωτικό στρες και ανάλογα με την έκφρασή τους σε κυτταρικό επίπεδο μπορούν να ελέγχουν την ανάπτυξη, αλλά και την πορεία διαφόρων χρόνιων παθήσεων (Λουκίδης, 2007).

Οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί χωρίζονται σε ενζυμικούς και μη ενζυμικούς. Οι κύριες μη ενζυμικές μορφές αντιοξειδωτικών περιλαμβάνουν τη γλουταθειόνη (GSH), τις βιταμίνες E & C, την β-καροτίνη και το ουρικό οξύ. Οι ενζυμικές μορφές αφορούν την υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), την καταλάση και τις περοξειδάσες. Σε κυτταρικό επίπεδο υπάρχει μία δεύτερη γραμμή άμυνας, που περιλαμβάνει ειδικές πρωτεΐνες, όπως οι θειορεδοξίνες, οι οξυγενάσες της αίμης και οι αναγωγάσες (Λουκίδης, 2007).

Ένας σημαντικός αριθμός μελετών έχει ασχοληθεί με την ταυτοποίηση φυσικών ουσιών, που εμπεριέχονται στις τροφές, στις οποίες έχουν αποδοθεί οι ευεργετικές επιδράσεις των φυτών στην υγεία (Rigas et al., 2008). Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες των πολυφαινολών έχουν μελετηθεί σε τέτοιο βαθμό, ώστε είναι πλέον γνωστός ο τρόπος δράσης τους. Οι πολυφαινόλες δρουν εξουδετερώνοντας τις ελεύθερες ρίζες, αναστέλλοντας τη λιπιδική οξειδωση, προστατεύοντας τη μεμβράνη από οξειδωση, επάγοντας τα ένζυμα της φάσης II και τέλος εμποδίζοντας τη μεταγωγή σήματος και τη δράση μεταγραφικών παραγόντων.

Συγκεκριμένα τα αντιοξειδωτικά χαρακτηριστικά των πολυφαινολικών ενώσεων αποδίδονται κυρίως στην ικανότητά τους να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες και να σχηματίζουν δακτυλίους μεταλλικών ιόντων (metal chelating properties). Η βασική λειτουργική ομάδα στην οποία οφείλεται η αντιοξειδωτική ικανότητα των πολυφαινολικών ενώσεων είναι η ομάδα του υδροξυλίου (OH). Ο αριθμός των υδροξυλίων όπως επίσης και η θέση τους στο μόριο αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την εμφάνιση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των φλαβονοειδών. Για παράδειγμα όταν το υδροξύλιο βρίσκεται στον πυρήνα του φλαβονοειδούς τότε η αντιοξειδωτική του δράση αυξάνεται, ενώ η αντικατάστασή του από μια ομάδα OCH_3 οδηγεί σε ελάττωση της αντιοξειδωτικής του δράσης. Επομένως υπάρχει άμεση σχέση μεταξύ της αντιοξειδωτικής ικανότητας των πολυφαινολικών μορίων και της χημικής δομής τους (Xia et al., 2010).

1.5 DNA Τοποϊσομεράσες

Οι τοποϊσομεράσες είναι ένζυμα ικανά να αλλάζουν την τοπολογία τμημάτων του DNA, μέσω ενός πολύπλοκου καταλυτικού κύκλου, ο οποίος περιλαμβάνει τη δημιουργία θραυσμάτων στον ένα ή και στους δύο κλώνους του DNA, το πέρασμα του κλώνου από το σημείο εγκοπής και την επανένωση των κλώνων, με αποτέλεσμα την επαναφορά της αρχικής διαμόρφωσης του DNA. Αποτελούν πολύ σημαντικά ένζυμα και είναι απαραίτητα για τα κύτταρα, καθώς είναι ικανά να αλλάζουν τον αριθμό συνδέσεων του DNA και με αυτόν τον τρόπο να εμποδίζουν τη δημιουργία υπερελικώσεων στο DNA, όταν αυτό υποβάλλεται σε διάφορες φυσιολογικές κυτταρικές διεργασίες, όπως είναι η αντιγραφή ή μεταγραφή (Cummins et al, 1993). Η μελέτη των τοποϊσομερασών έχει επεκταθεί και στο τομέα της Φαρμακολογίας και της Κλινικής Ιατρικής με την ταυτοποίηση της βακτηριακής γυράσης ως στόχο για τα αντιβιοτικά και την ταυτοποίηση των ευκαρυωτικών τοποϊσομερασών I και II ως στόχους για πολλούς αντικαρκινικούς παράγοντες (Wang et al., 1996).

Το πρώτο μέλος της κατηγορίας των τοποϊσομερασών, το οποίο είχε τη δυνατότητα να αφαιρεί τις αρνητικές υπερελικώσεις, απομονώθηκε από το βακτήριο *Escherichia coli* το 1971. Την ανακάλυψη αυτή ακολούθησε η εύρεση αντίστοιχου ενζύμου στο ποντίκι, που μπορεί να αφαιρεί θετικές όπως και αρνητικές υπερελικώσεις από το DNA. Ακολούθησε η ταυτοποίηση ενός ενζύμου που μπορεί να προσθέτει αρνητικές υπερελικώσεις στο χαλαρωμένο DNA του βακτηρίου *E. coli* και η ενεργότητα αυτή εξαρτάται από την παρουσία ATP. Τα προαναφερθέντα ένζυμα είναι γνωστά ως *E. coli* DNA τοποϊσομεράση I, DNA τοποϊσομεράση I του ποντικού και *E. coli* DNA γυράση ή τοποϊσομεράση II αντίστοιχα και αποτελούν τρεις διαφορετικές υποοικογένειες τοποϊσομερασών. Η τοποϊσομεράση I του *E. coli* και του ποντικού ανήκουν στα ένζυμα τύπου I και είναι ικανά να αλλάζουν τη διαμόρφωση του DNA προκαλώντας εγκοπή σε μια μόνο αλυσίδα του δίκλωνου DNA, επιτρέποντας το πέρασμα της δεύτερης αλυσίδας από το σημείο που προκλήθηκε η εγκοπή. Η *E. coli* τοποϊσομεράση I και η τοποϊσομεράση I του ποντικού (υποοικογένεια IA) παρουσιάζουν παρόμοια δομή. Η *E. coli* γυράση ή τοποϊσομεράση II ανήκει στα ένζυμα τύπου II, τα οποία είναι ικανά να προκαλούν εγκοπές και στις δύο αλυσίδες του DNA σε ένα σημείο, δημιουργώντας μια πύλη από όπου μπορεί να διέλθει ένα άλλο ζεύγος αλυσίδων. Τα ένζυμα τύπου II, ακόμα και αυτά που ανήκουν σε διαφορετικά είδη, παρουσιάζουν δομικές και εξελικτικές ομοιότητες (Wang et al., 1996).

Στον πίνακα 2 παρουσιάζονται οι υποοικογένειες των τοποϊσομερασών (Wang et al., 2002).

Πίνακας 2: Κατηγοριοποίηση των υποοικογενειών των τοποϊσομερασών

Υποοικογένεια	Αντιπροσωπευτικά μέλη
IA	Βακτηριακή DNA τοποϊσομεράση I και III DNA τοποϊσομεράση III της ζύμης <i>Drosophila melanogaster</i> DNA τοποϊσομεράση IIIα και IIIβ DNA τοποϊσομεράση IIIα και IIIβ των θηλαστικών
IB	Ευκαρυωτική DNA τοποϊσομεράση I Μιτοχονδριακή DNA τοποϊσομεράση I των θηλαστικών Pox virus τοποϊσομεράση
IIA	Βακτηριακή γυράση, DNA τοποϊσομεράση IV DNA τοποϊσομεράση του φάγου T4 DNA τοποϊσομεράση II της ζύμης <i>Drosophila melanogaster</i> DNA τοποϊσομεράση II DNA τοποϊσομεράση IIα και IIβ των θηλαστικών
IIB	<i>Sulfolobus shibatae</i> DNA τοποϊσομεράση VI

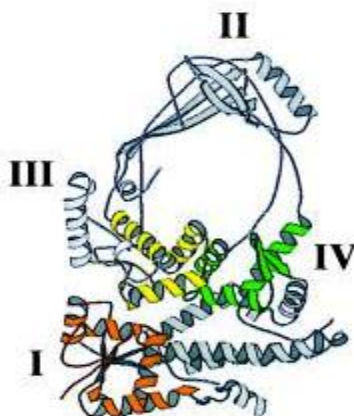
1.5.1 DNA Τοποϊσομεράση I

Η DNA τοποϊσομεράση I προκαλεί παροδικά μονόκλωνα σπασίματα στην αλυσίδα του DNA, μέσα από τα οποία περνούν άλλες αλυσίδες DNA. Με την δράση αυτή η τοποϊσομεράση χαλαρώνει το DNA, μια διαδικασία που είναι απαραίτητη σε σημαντικές διεργασίες όπως την αντιγραφή, μεταγραφή και συμπύκνωση της χρωματίνης.

1.5.1.1 Δομή της Τοποϊσομεράσης I

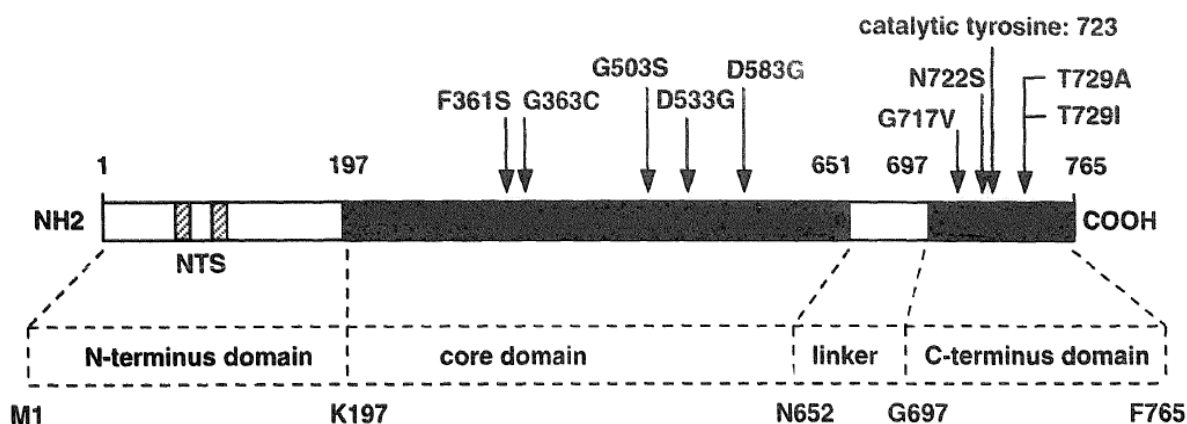
Η τοποϊσομεράση I είναι μια μονομερής πρωτεΐνη μεγέθους 100 kDa και κωδικοποιείται από ένα γονίδιο που χαρτογραφείται στη περιοχή 20q12-13.2. Το ένζυμο είναι κυρίως συγκεντρωμένο στον πυρηνίσκο και σχετίζεται με μεταγραφικά ενεργές περιοχές του γενώματος. Βρίσκεται επίσης στο πυρηνόπλασμα και δεν εμφανίζει διακυμάνσεις κατά την διάρκεια των φάσεων του κυτταρικού κύκλου (Cummings et al., 1993). Αποτελείται από τέσσερις δομικές περιοχές, οι οποίες διατάσσονται γύρω από μία κεντρική κοιλότητα διαμέτρου 20 Å⁰: μία α/β Rossmann-fold (περιοχή I), μία μικρή β-barrel (περιοχή II) και δύο περιοχές (III και IV), οι οποίες διπλώνονται με παρόμοιο τρόπο με την πρωτεΐνη (CAP) που βρέθηκε στην *E. coli*. Το κατάλοιπο τυροσίνης που είναι

υπεύθυνο για την διάσπαση του DNA βρίσκεται στην περιοχή III (Εικόνα 8) (Berger et al., 1998).



Εικόνα 8: Δομή DNA τοποϊσομεράσης I

Η τοποϊσομεράση I είναι οργανωμένη σε τέσσερις διαφορετικές περιοχές. Στη δομή της πρωτεΐνης διακρίνεται η N-τελική περιοχή (N-terminus domain), η οποία είναι ευαίσθητη στην πρωτεόλυση και είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση του ενζύμου με άλλες πρωτεΐνες. Η πυρηνική περιοχή (core domain) καταλαμβάνει ένα τμήμα 54 kDa, το οποίο είναι ανθεκτικό στην πρωτεόλυση και είναι ικανό να συνδέεται σε υπερελικωμένο DNA. Η συνδετική περιοχή (linker domain), η οποία είναι μικρή, είναι θετικά φορτισμένη και η παράλειψή της δεν επηρεάζει την δράση του ενζύμου. Η C-τελική περιοχή (C-terminus domain) περιέχει την καταλυτική τυροσίνη στη θέση 723, τα κατάλοιπα από το Gly713 έως την Gly717, τα οποία εμπλέκονται στην κατάλυση αλλά όχι στην σύνδεση με την πυρηνική περιοχή, ενώ τα τελευταία 5 κατάλοιπα της περιοχής είναι σημαντικά για το διμερισμό με την πυρηνική περιοχή (Pommier, 1998).



Εικόνα 9: Οργάνωση των περιοχών της τοποϊσομεράσης I

1.5.1.2 Μηχανισμός δράσης της Τοποϊσομεράσης I

Ο καταλυτικός μηχανισμός της τοποϊσομεράσης αποτελείται γενικά από τέσσερα στάδια:

1. Σύνδεση στο DNA

Η ευκαρυωτική τοποϊσομεράση I προσδένεται κυρίως σε δίκλωνο DNA, το οποίο παρουσιάζει μια κάμψη ή υπερελίκωση. Παρόλα αυτά το ένζυμο μπορεί να προσδεθεί και σε μονόκλωνα τμήματα, τα οποία αλληλεπιδρούν μεταξύ τους σε παλίνδρομες αλληλουχίες. Η μεθυλίωση της κυτοσίνης, η οποία συμβαίνει κοντά στο σημείο όπου δρα η τοποϊσομεράση, μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση ή μείωση της ενεργότητας του ενζύμου. Γενικά, η σύνδεση του ενζύμου στο DNA και η ενεργότητά του εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τροποποιήσεις του DNA, όπως είναι η μεθυλίωση της κυτοσίνης, υποκαταστάσεις της ουρακίλης, λάθος ζευγάρωμα και ελλείψεις βάσεων, οι οποίες συνήθως έχουν ως αποτέλεσμα την καταστολή του ενζύμου.

2. Αποκοπή της αλυσίδας του DNA

Η τοποϊσομεράση I συνδέεται στο 5' άκρο του DNA και προκαλεί ρήξη σε ένα μόνο κλώνο του δίκλωνου DNA, δημιουργώντας έτσι ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο με το DNA (cleavage complex). Η ρήξη στην αλυσίδα του DNA προκαλείται με ένα μηχανισμό τρανσεστεροποίησης, κατά τον οποίο η υδροξυλική ομάδα της τυροσίνης του ενζύμου συνδέεται με τη φωσφορική ομάδα που συμμετέχει στο φωσφοδιεστερικό δεσμό, αφήνοντας το 5' άκρο ελεύθερο.

3. Πέρασμα του μονού κλώνου DNA

Υπάρχουν δύο μηχανισμοί με τους οποίους η τοποϊσομεράση καταλύει το πέρασμα του μονού κλώνου. Σύμφωνα με μελέτες κρυσταλλογραφίας, στη μια περίπτωση το ένζυμο περικυκλώνει το DNA και γεφυρώνει το κενό που δημιουργείται στον ένα κλώνο, αλληλεπιδρώντας ομοιοπολικά και μη ομοιοπολικά και με τα δύο άκρα του DNA. Στη δεύτερη περίπτωση, χρησιμοποιείται ένα μηχανισμός περιστροφής, κατά τον οποίο το τμήμα του DNA όπου έχει συνδεθεί το ένζυμο περιστρέφεται με αποτέλεσμα να αλλάζει ο αριθμός συνδέσεων του DNA, ενώ το υπόλοιπο τμήμα του DNA παραμένει σταθερό.

4. Επανασύνδεση του DNA

Η επανασύνδεση των δύο άκρων του DNA αποτελεί μια δεύτερη τρανσεστεροποίηση, στην οποία η ελεύθερη υδροξυλική ομάδα στο 5' άκρο του DNA δρα ως πυρηνόφιλο και προσβάλλει τη φωσφοτυροσίνη που έχει δημιουργηθεί στο στάδιο της αποκοπής της αλυσίδας του DNA. Ένας άλλος μηχανισμός με τον οποίο γίνεται η επανένωση των δύο άκρων του DNA αναφέρει την παρουσία μιας ενδογενούς φωσφοδιεστεράσης ικανής να απελευθερώνει ένα 3' άκρο, το οποίο στη συνέχεια

χρησιμεύει ως υπόστρωμα για DNA πολυμεράση. Τέτοια δραστικότητα έχει αναφερθεί σε ανθρώπινα κύτταρα και σε κύτταρα ζύμης (Pommier et al., 1998).

Η τοποϊσομεράση I χωρίζεται σε δύο υποοικογένειες, την IA και την IB, οι οποίες δρουν με διαφορετικό μηχανισμό (Leppard et al., 2005).

Υποοικογένεια IA

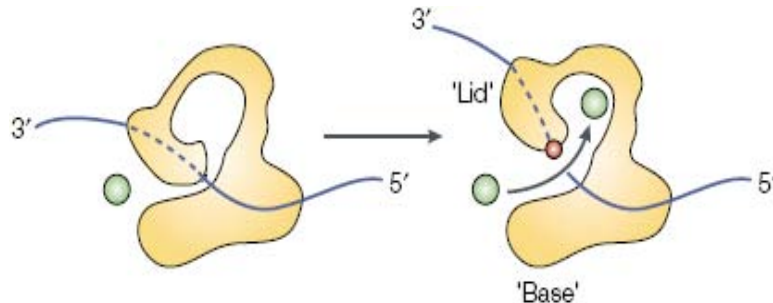
Η αφαίρεση αρνητικών υπερελικώσεων από την τοποϊσομεράση IA προϋποθέτει το τοπικό ξετύλιγμα της διπλής έλικας του DNA, προκειμένου να μπορέσει το ένζυμο να προκαλέσει ρήγμα στη μια αλυσίδα του DNA. Η ικανότητα του ενζύμου να ξετυλίγει το δίκλωνο DNA μειώνεται όσο λιγότερο αρνητικά υπερελικωμένο είναι το DNA, γι' αυτό και η ικανότητα του ενζύμου μειώνεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Η τοποϊσομεράση IA μπορεί να δράσει και σε θετικά υπερελικωμένο DNA, εφόσον προϋπάρχει μια μονόκλωνη περιοχή. Επιπρόσθετα η τοποϊσομεράση IA είναι ικανή να καταλύει το πέρασμα μιας διπλής έλικας DNA μέσα από μια άλλη, αν η μια αλυσίδα περιέχει μια εγκοπή ή κενό, προκαλώντας μια προσωρινή θραύση απέναντι από το σημείο εγκοπής.

Οι τοποϊσομεράσες τύπου IA φαίνεται να καταλύουν το πέρασμα της αλυσίδας του DNA μέσω ενός μηχανισμού "γέφυρας", κατά το οποίο τα άκρα του DNA, που δημιουργούνται από τη δράση της τοποϊσομεράσης IA, συνδέονται κατά κάποιο τρόπο μεταξύ τους, καθώς το ένζυμο δημιουργεί μια γέφυρα ανάμεσα τους. Με αυτόν τον τρόπο οι κινήσεις του συμπλόκου, το οποίο σχηματίζεται από το ένζυμο και τα άκρα του DNA, μεσολαβούν στο άνοιγμα και κλείσιμο της πύλης και το πέρασμα της αλυσίδας του DNA από αυτήν. Κατά το παροδικό σπάσιμο της DNA αλυσίδας από την τοποϊσομεράση IA το 5' άκρο της σπασμένης DNA αλυσίδας είναι ομοιοπολικά προσαρτημένο στην ενεργή περιοχή της τυροσίνης και το 3' άκρο είναι μη ομοιοπολικά συνδεδεμένο στη βάση (base) του ενζύμου. Απομακρύνοντας την καμπή (lid) ανοίγει η πύλη στο DNA για το πέρασμα της άλλης αλυσίδας (Εικόνα 10). Η δεύτερη αλυσίδα πρέπει να περάσει από την κεντρική κοιλότητα του ενζύμου πριν την επανασύνδεση της σπασμένης αλυσίδας (Wang et al, 2002).

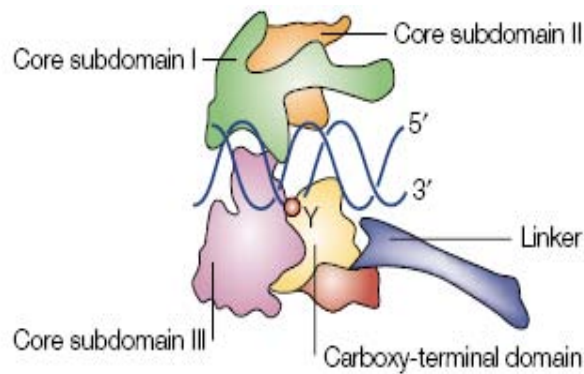
Υποοικογένεια IB

Οι τοποϊσομεράσες IB είναι ικανές να αφαιρούν τόσο θετικές όσο και αρνητικές υπερελικώσεις από το DNA. Έχει βρεθεί ότι ο τρόπος δράσης τους αφορά ένα μηχανισμό περιστροφής της αλυσίδας του DNA και όχι μηχανισμό γεφύρωσης, όπως συμβαίνει με τις τοποϊσομεράσες τύπου IA. Όταν η τοποϊσομεράση IB προκαλεί κάποιο ρήγμα στη μια αλυσίδα του δίκλωνου DNA χωρίζει το DNA σε δύο τμήματα και μόνο το τμήμα το οποίο βρίσκεται ανοδικά από το σημείο εγκοπής (3' άκρο), είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο με το ένζυμο. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του δίκλωνου τμήματος του DNA, που βρίσκεται καθοδικά από το σημείο εγκοπής και του ενζύμου είναι κυρίως ιονικής φύσης και γι' αυτό το λόγο τα τμήματα αυτά έχουν την δυνατότητα να περιστραφούν (Εικόνα 11). Η

περιστροφή αυτή επιτρέπει πολλαπλά περάσματα αλυσίδων για κάθε κύκλο πρόκληση ρήγματος και επανένωσης των αλυσίδων του DNA (Wang et al, 2002). Με το μηχανισμό της περιστροφής η τοποϊσομεράση αφαιρεί τις υπερελικώσεις ταχύτατα, χωρίς να υπάρχει καθυστέρηση στη διαδικασία της αντιγραφής ή της μεταγραφής.



Εικόνα 10: Πρότυπο δράσης της τοποϊσομεράσης IA



Εικόνα 11: Πρότυπο δράσης της τοποϊσομεράσης IB

1.5.1.3 Βιολογικές λειτουργίες της Τοποϊσομεράσης I

Η ικανότητα της τοποϊσομεράσης να ελέγχει τις υπερελικώσεις είναι πολύ σημαντική για τα κύτταρα ιδιαίτερα σε διεργασίες μεταβολισμού του DNA, όπως αυτή της αντιγραφής, της μεταγραφής και του ανασυνδυασμού του DNA. Κατά τη διάρκεια της αντιγραφής, καθώς εξελίσσεται το ξετύλιγμα του DNA, θετικές υπερελικώσεις συσσωρεύονται στο τμήμα του DNA που δεν έχει αντιγραφεί. Απουσία της τοποϊσομεράσης I η διχάλα της αντιγραφής θα παγιδευόταν, εξαιτίας της αλλαγής της διαμόρφωσης του DNA, γεγονός που θα οδηγούσε στην καθυστέρηση ή ακόμα και στη διακοπή της αντιγραφής.

Επιπλέον έχει βρεθεί ότι η τοποϊσομεράση I συμμετέχει και στη μεταγραφή, κατά την οποία συνδέεται σε τμήματα του DNA τα οποία είναι ενεργά, όπως τα γονίδια της RNA πολυμεράσης I και II και το γονίδιο c-fos, και αφαιρεί τις υπερελικώσεις που

δημιουργούνται. Έχει βρεθεί μάλιστα ότι η τοποϊσομεράση I αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη TBP (TATA binding protein) και συμμετέχει στην έναρξη της μεταγραφής. Συνεπώς η τοποϊσομεράση I καταστέλλει τη μεταγραφή απουσία ενός ενεργοποιητή, ενώ την προωθεί παρουσία ενός ενεργοποιητή σε γονίδια τα οποία περιέχουν την αλληλουχία TATA.

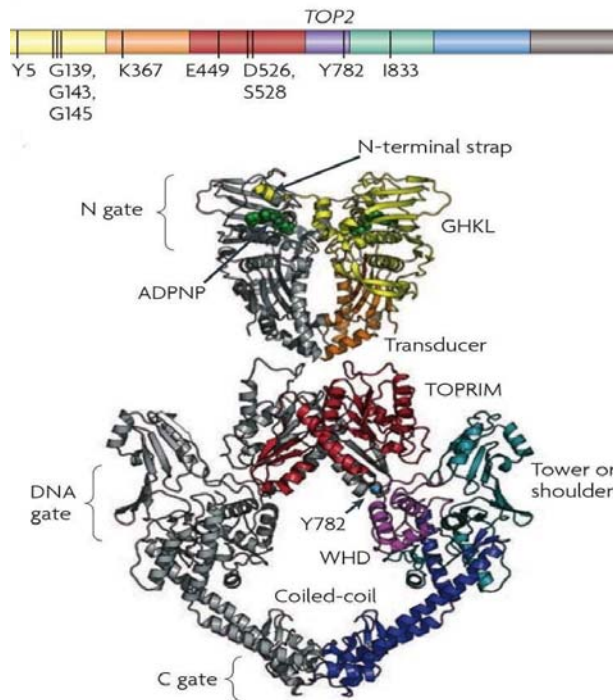
Σημαντική είναι η δραστικότητα της τοποϊσομεράσης I στη διαδικασία ανασυνδυασμού του DNA, καθώς έχει δείχθει ότι η τοποϊσομεράση I μπορεί να προκαλέσει μη ομόλογο ανασυνδυασμό ανάμεσα σε εξωγενές DNA και το σύμπλοκο ενζύμου-DNA, ενώ είναι ικανή και να δημιουργεί και να λύνει τις δομές Holiday, οι οποίες δημιουργούνται κατά τον ανασυνδυασμό του DNA (Pommier et al., 1998).

1.5.2 DNA Τοποϊσομεράση II

Η τοποϊσομεράση II, όπως και η τοποϊσομεράση I, αλλάζει τον αριθμό συνδέσεων του DNA και χωρίζεται σε δύο κατηγορίες την τοποϊσομεράση IIα και IIβ. Σε αντίθεση με την τοποϊσομεράση I, η τοποϊσομεράση II προκαλεί ρήξη και στους δύο κλώνους του DNA και καταλύει το πέρασμα ενός άλλου δίκλωνου τμήματος DNA μέσα από το σημείο εγκοπής. Η ιδιότητα της τοποϊσομεράσης II να προκαλεί δίκλωνες ρήξεις στο DNA την καθιστά ικανή να συμμετέχει σε πολυπλοκότερες διεργασίες, όπου συμμετέχουν τμήματα DNA τα οποία μπορεί να είναι είτε γραμμικά είτε κυκλικά (Cummings et al., 1993).

1.5.2.1 Δομή της Τοποϊσομεράσης II

Η τοποϊσομεράση II είναι ένα υψηλά συντηρημένο ένζυμο, το οποίο προέρχεται από τη συγχώνευση των A- και B- υπομονάδων της βακτηριακής DNA γυράσης. Έχει μία A_2 διμερή δομή, ενώ το βακτηριακό ένζυμο έχει μία A_2B_2 τετραμερή διάταξη. Η αμινοτελική περιοχή (N-terminal domain) της πρωτεΐνης περιλαμβάνει την περιοχή σύνδεσης στο DNA και την περιοχή πρόσδεσης του ATP, η οποία είναι απαραίτητη για την πλήρη ενεργότητα του ενζύμου (Berger et al., 1998). Το κεντρικό τμήμα της πρωτεΐνης περιλαμβάνει μια περιοχή TOPRIM, η οποία ακολουθείται από το ενεργό κέντρο, το οποίο περιλαμβάνει ένα κατάλοιπο τυροσίνης (Y782). Η καρβοξυτελική περιοχή (C-terminal domain) δεν είναι συντηρημένη ανάμεσα σε διαφορετικά είδη, καθώς και ανάμεσα στην τοποϊσομεράση IIα και IIβ. Η καρβοξυτελική περιοχή πιθανόν να είναι απαραίτητη για τον πυρηνικό εντοπισμό του ενζύμου, τις αλληλεπιδράσεις του ενζύμου με άλλες πρωτεΐνες, όπως επίσης και για τη ρύθμιση της ενεργότητάς του (Nitiss, 2009). (Εικόνα 12)



Εικόνα 12: Δομή της DNA τοποϊσομεράσης II

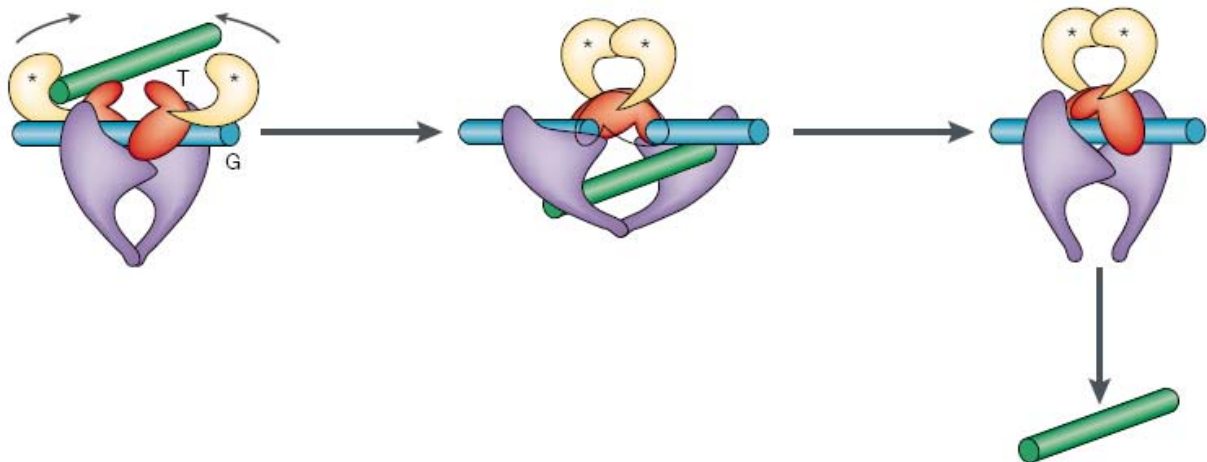
1.5.2.2 Μηχανισμός δράσης της Τοποϊσομεράσης II

Σε αντίθεση με τους κατώτερους ευκαρυώτες, όπως η ζύμη και η *Drosophila*, στις οποίες εκφράζεται ένας μόνο τύπος της τοποϊσομεράσης II, τα σπονδυλωτά κωδικοποιούν δύο ισομορφές του ενζύμου, την τοποϊσομεράση IIα και IIβ. Η τοποϊσομεράση IIα είναι απαραίτητη για την επιβίωση των ενεργά πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων. Η έκφραση του ενζύμου είναι αυξημένη κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου με την υψηλότερη έκφραση να παρατηρείται στις φάσεις G2 και M. Το ένζυμο εντοπίζεται στις διχάλες της αντιγραφής και παραμένει συνδεδεμένο με τα χρωμοσώματα κατά τη διάρκεια της μίτωσης. Κατά συνέπεια η τοποϊσομεράση IIα συμμετέχει σε διαδικασίες που σχετίζονται με την αύξηση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, όπως η αντιγραφή του DNA και ο διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων. Αντίθετα η τοποϊσομεράση IIβ δεν εξαρτάται από τα στάδια του κυτταρικού κύκλου και αποσυνδέεται από τα χρωμοσώματα κατά τη διάρκεια της μίτωσης. Παρόλο που οι βιολογικές της λειτουργίες δεν έχουν προσδιοριστεί επακριβώς, έχει βρεθεί ότι η τοποϊσομεράση IIβ είναι απαραίτητη για την διαμόρφωση του νευρικού συστήματος στα ποντίκια (McClendon et al., 2007).

Τόσο η τοποϊσομεράση IIα όσο και η τοποϊσομεράση IIβ δρουν ως ομοδιμερή και αλλάζουν την τοπολογία του DNA προκαλώντας ρήγμα και στους δύο κλώνους του DNA. Ο καταλυτικός μηχανισμός που χρησιμοποιούν και τα δύο ένζυμα περιλαμβάνει την ένωση δύο ξεχωριστών τμημάτων του DNA και έπειτα την πρόκληση δίκλωνου ρήγματος στο ένα

από τα δύο τμήματα του DNA (G-segment). Στη συνέχεια το ένζυμο καταλύει τη μεταφορά του δεύτερου τμήματος του DNA (T-segment) μέσα από την πύλη που δημιουργείται από το ρήγμα στους δύο κλώνους του DNA. Ακολούθως γίνεται η σύνδεση των κλώνων στους οποίους προκλήθηκε το ρήγμα και απελευθέρωση του δεύτερου τμήματος (G-segment) μέσω μιας πύλης της πρωτεΐνης. Τέλος, η πύλη της πρωτεΐνης κλείνει και το ένζυμο είναι έτοιμο να ακολουθήσει ένα δεύτερο καταλυτικό κύκλο. Η τοποϊσομεράση II συνδέεται ομοιοπολικά μόνο σε τμήματα DNA τα οποία έχουν μονόκλωνα άκρα αποτελούμενα από τέσσερις βάσεις στο 5' τελικό άκρο (Εικόνα 13).

Η τοποϊσομεράση II χρειάζεται δύο συμπράγοντες προκειμένου να πραγματοποιήσει τον καταλυτικό της κύκλο. Πρώτον η τοποϊσομεράση II χρειάζεται ένα δισθενές κατιόν, το οποίο είναι απαραίτητο για την εμφάνιση της ενεργότητας του ενζύμου. Συγκεκριμένα, *in vivo* μελέτες έχουν δείξει ότι το ένζυμο χρησιμοποιεί ως δισθενές κατιόν το μαγνήσιο. Δεύτερον, το ένζυμο χρησιμοποιεί την ενέργεια του ATP προκειμένου να πραγματοποιήσει το πέρασμα του τμήματος του DNA (McClendon et al., 2007).



Εικόνα 13: Πρότυπο δράσης της τοποϊσομεράσης II

1.5.2.3 Βιολογικές Λειτουργίες της Τοποϊσομεράσης II

Ένας από τους σημαντικούς ρόλους των DNA τοποϊσομερασών είναι η επίλυση τοπολογικών προβλημάτων στο DNA, τα οποία δημιουργούνται κατά τη διάρκεια της αντιγραφής. Απουσία της ενεργότητας της τοποϊσομεράσης το ξετύλιγμα της μητρικής αλυσίδας του DNA οδηγεί στη συσσώρευση θετικών υπερελικώσεων στο τμήμα του DNA που βρίσκεται καθοδικά από την διχάλα αντιγραφής. Αυτές οι θετικές υπερελικώσεις που δημιουργούνται είναι δυνατόν να αφαιρεθούν τόσο από την τοποϊσομεράση I όσο και από την τοποϊσομεράση II. Η δράση της τοποϊσομεράσης II ωστόσο είναι απαραίτητη στην περίπτωση που υπάρχουν δύο διχάλες αντιγραφής, οι οποίες συναντώνται κατά την εξέλιξη της διαδικασίας της αντιγραφής.

Η τοποϊσομεράση II συμμετέχει και στη διαδικασία της μεταγραφής. Η RNA πολυμεράση γλιστρώντας πάνω στο DNA δημιουργεί θετικές υπερελικώσεις καθοδικά από το σύμπλοκο μεταγραφής και αρνητικές υπερελικώσεις ανοδικά από το σημείο δράσης της. Είναι επομένως κατανοητό ότι η παρουσία της τοποϊσομεράσης II είναι απαραίτητη για την επιμήκυνση της μεταγραφής. Έχει δειχθεί ότι η τοποϊσομεράση IIβ αλληλεπιδρά με τους υποκινητές ως μέρος ενός πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου και ότι η ενεργότητα του ενζύμου απαιτείται για την ενεργοποίηση της μεταγραφής. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι το σύμπλοκο πρωτεϊνών που αλληλεπιδρά με τους υποκινητές περιλαμβάνει επιδιορθωτικά ένζυμα, τα οποία δεν φαίνεται να συμμετέχουν στην επιδιόρθωση του ρήγματος που προκαλείται από την τοποϊσομεράση IIβ (Nitiss, 2009).

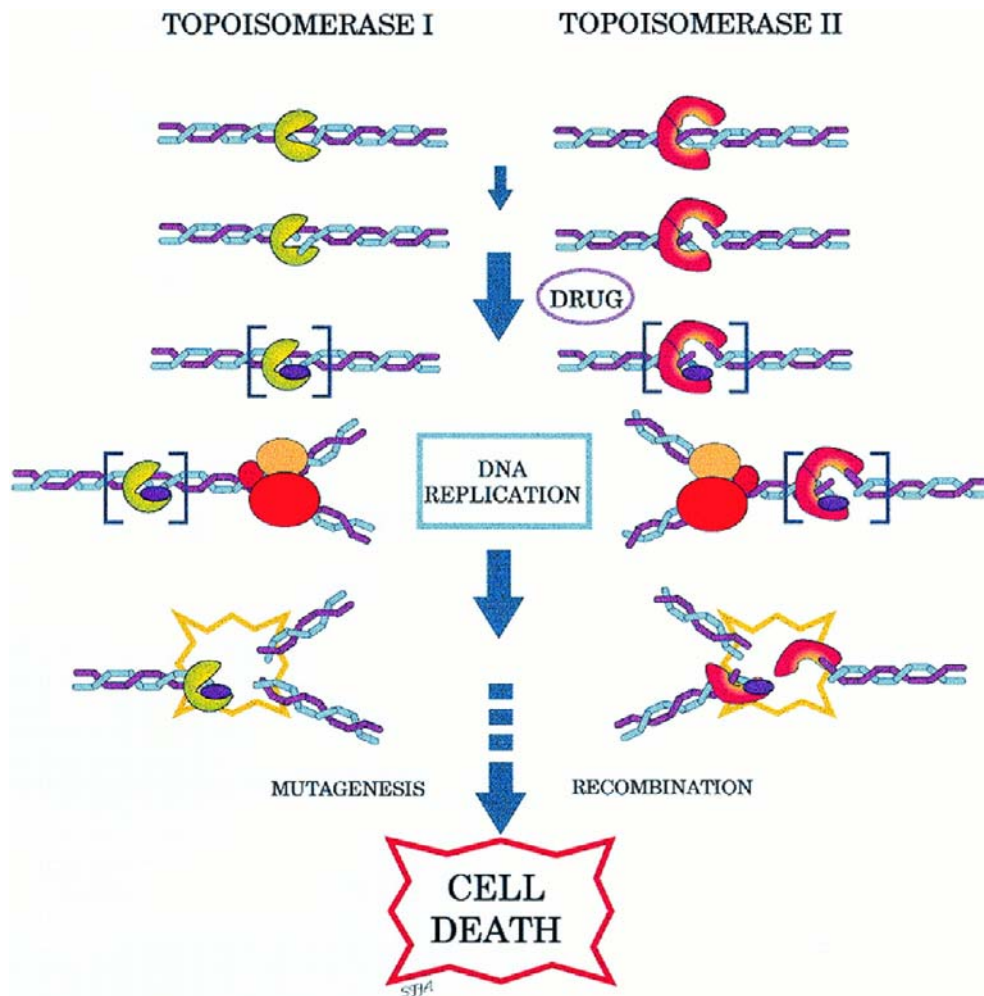
Σημαντική είναι η δραστικότητα της τοποϊσομεράσης II για τη διατήρηση της δομής των χρωμοσωμάτων, καθώς και για τη συμπύκνωση της χρωματίνης. Έχει ταυτοποιηθεί ένα χρωμοσωμικό σύμπλεγμα-ικρίωμα (scaffold) που περιλαμβάνει την τοποϊσομεράση IIα και ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο συμπύκνωσης, το οποίο είναι σημαντικό για την ένωση και το διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων (Nitiss et al., 2009).

Η συμμετοχή της τοποϊσομεράσης στη συμπύκνωση της χρωματίνης είναι εύλογη εφόσον κατά τη διάρκεια της διαδικασίας εμφανίζονται τοπολογικές αλλαγές στο DNA, οι οποίες μπορεί να οδηγήσουν στη δημιουργία υπερελικώσεων στην αλυσίδα του DNA. Πειράματα σε *Drosophila* και κύτταρα θηλαστικών έχουν δείξει ότι η αναστολή του ενζύμου μπλοκάρει το τελικό στάδιο της συμπύκνωσης του χρωμοσώματος. Τα κύτταρα τα οποία εισέρχονται στον κυτταρικό κύκλο και στα οποία δεν έχει ολοκληρωθεί η συμπύκνωση καθώς και ο διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων, εμφανίζουν πολυπλοειδία και οδηγούνται σε κυτταρικό θάνατο (Wang, 1996).

1.5.3 DNA Τοποϊσομεράσες και καρκίνος

Οι τοποϊσομεράσες είναι ένζυμα ικανά να αλλάζουν την τοπολογία του DNA με αποτέλεσμα να συμμετέχουν σε πολλές διεργασίες που αφορούν το μεταβολισμό του DNA, όπως η αντιγραφή, η μεταγραφή, ο ανασυνδυασμός του DNA και η συμπύκνωση της χρωματίνης (Webb et al., 2003). Κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες η πιθανότητα εμφάνισης μεταλλάξεων, παρεμβολών, ελλείψεων και χρωμοσωμικών ανωμαλιών είναι δυνατόν να αυξάνεται με αποτέλεσμα τη δημιουργία σοβαρών βλαβών στο DNA, που πιθανότατα να οδηγήσουν στην εμφάνιση καρκίνου. Έχει βρεθεί ότι στα καρκινικά κύτταρα οι τοποϊσομεράσες βρίσκονται σε αυξημένα επίπεδα, καθώς τα κύτταρα αυτά πολλαπλασιάζονται με γρήγορους ρυθμούς. Με βάση το γεγονός ότι οι τοποϊσομεράσες αποτελούν σημαντικά ένζυμα για την αντιγραφή και τη σταθερότητα του γενετικού υλικού, συχνά έχουν αποτελέσει στόχο πολλών αντικαρκινικών φαρμάκων σε διάφορες θεραπείες κατά του καρκίνου. Έτσι παράγοντες οι οποίοι επιδρούν και αναστέλλουν τη δράση τόσο

της τοποϊσομεράσης I και όσο και της II θεωρούνται σημαντικοί αντικαρκινικοί παράγοντες (Froelich-Ammon et al., 1995).



Εικόνα 14: Μηχανισμός κυτταροτοξικότητας των αναστολέων των τοποϊσομερασών I και II

1.5.4 Αναστολείς τοποϊσομερασών

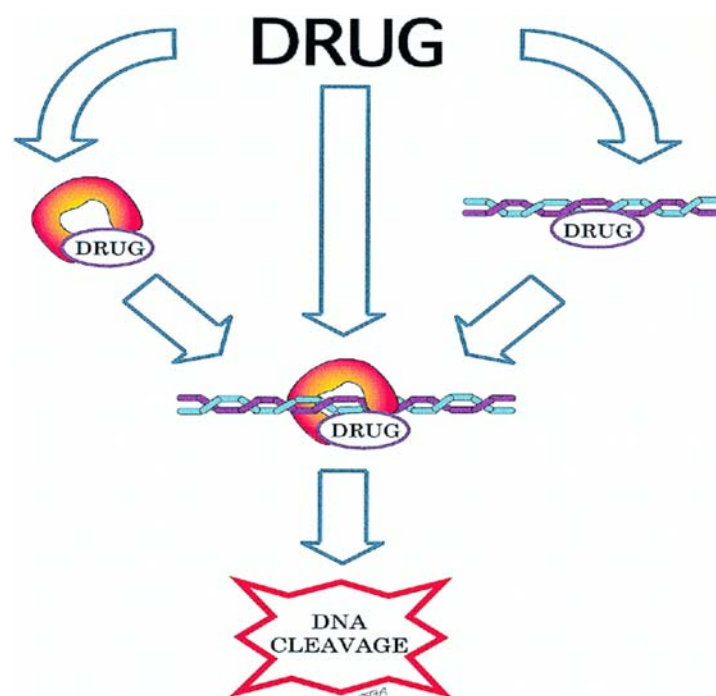
Η αναστολή των τοποϊσομερασών μπορεί να επιτευχθεί με δύο διαφορετικούς τρόπους, με αποτέλεσμα οι αναστολείς των ενζύμων να χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: τους αναστολείς τάξης I και αναστολείς τάξης II. Οι αναστολείς τάξης I ή αναστολείς δηλητήρια (poison) συνδέονται στο σύμπλοκο ενζύμου-DNA και το σταθεροποιούν, με αποτέλεσμα να εμποδίζουν την επανένωση των αλυσίδων του DNA. Οι αναστολείς τάξης II ή καταλυτικοί αναστολείς μπορούν να συνδεθούν είτε στο ένζυμο είτε στο DNA, με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η σύνδεση της τοποϊσομεράσης στο DNA (Chowdhury et al., 2002).

Οι αναστολείς που δρουν ως δηλητήρια (poison) χρησιμοποιούν δύο διαφορετικούς μηχανισμούς με τους οποίους καταστέλλουν την ενεργότητα των ενζύμων. Οι αναστολείς

της τοποϊσομεράσης I σταθεροποιούν ένα ομοιοπολικό δεσμό ανάμεσα σε ένα κατάλοιπο τυροσίνης του ενζύμου και το 5' άκρο της αλυσίδας του DNA, ενώ οι αναστολείς της τοποϊσομεράσης II σταθεροποιούν ένα ομοιοπολικό δεσμό ανάμεσα στην τυροσίνη του ενζύμου και το 3' άκρο της αλυσίδας του DNA (Cummins et al., 1993).

Το σύμπλοκο τοποϊσομεράση-DNA-αναστολέας μπορεί να σχηματιστεί με τρεις διαφορετικούς τρόπους. Το φάρμακο είτε συνδέεται πρώτα στην τοποϊσομεράση και μετά δημιουργείται το σύμπλοκο με το DNA, είτε συνδέεται στο DNA και μετά δημιουργείται το σύμπλοκο με την τοποϊσομεράση. Εναλλακτικά, δημιουργείται πρώτα το σύμπλοκο τοποϊσομεράσης-DNA και κατόπιν συνδέεται το φάρμακο (Εικόνα 15) (Froelich-Ammon et al., 1995).

Στη θεραπεία κατά του καρκίνου χρησιμοποιούνται φάρμακα που στοχεύουν τόσο την τοποϊσομεράση I όσο και την τοποϊσομεράση II. Ωστόσο κάθε είδος φαρμάκου χρησιμοποιείται για διαφορετικούς τύπους καρκίνου, ανάλογα με την τοποϊσομεράση που στοχεύει και τον τρόπο δράσης του. Για παράδειγμα τα φάρμακα που στοχεύουν την τοποϊσομεράση I, όπως η καμπτοθεκίνη και η τοποτεκάνη, είναι αποτελεσματικά απέναντι σε αργά αναπτυσσόμενους όγκους, στους οποίους η ποσότητα της τοποϊσομεράσης I είναι παρόμοια με αυτή που εκφράζεται στους πιο γρήγορα αναπτυσσόμενους όγκους. Αντίθετα φάρμακα που στοχεύουν την τοποϊσομεράση II, όπως η ετοποσιδίνη και η τενιποσιδίνη, είναι χρήσιμα για γρήγορα αναπτυσσόμενους όγκους, οι οποίοι εκφράζουν μεγάλες ποσότητες του ενζύμου (Constantinou et al., 1995).

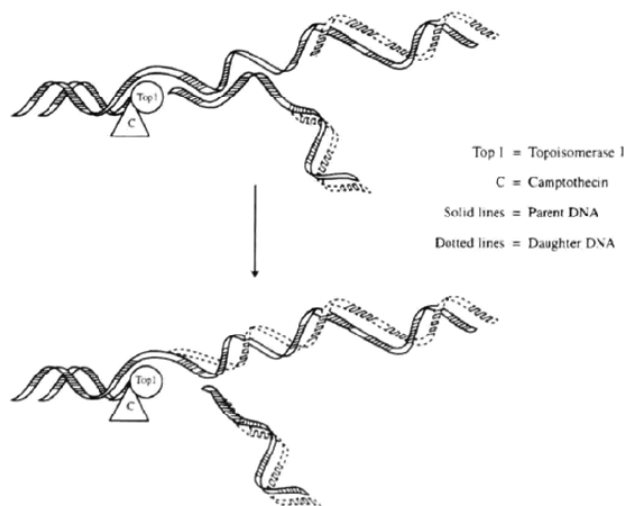


Εικόνα 15: Σχηματισμός του συμπλόκου τοποϊσομεράση-φάρμακο-DNA

1.5.4.1 Αναστολείς της τοποϊσομεράσης I

Οι γνωστοί αναστολείς της τοποϊσομεράσης I είναι η καμπτοθεκίνη και ορισμένα παράγωγά της. Η καμπτοθεκίνη (CPT) είναι ένα αλκαλοειδές, παρόν στο κινέζικο δέντρο, *Camptotheca acuminata*. Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι η CPT αποτελεί ένα αναστολέα δηλητήριο (poison) της τοποϊσομεράσης I. Μόνο το φυσικό ισομερές της CPT είναι ικανό να αναστέλλει την τοποϊσομεράση I και επιπλέον κύτταρα τα οποία επιλέγονται με βάση την ανθεκτικότητα τους στη CPT εμφανίζουν μεταλλάξεις στο γονίδιο της τοποϊσομεράσης I (Pommier, 2009).

Η καμπτοθεκίνη συνδέεται και σταθεροποιεί το παροδικό σύμπλοκο που αποτελείται από το DNA και την τοποϊσομεράση I, το οποίο δημιουργείται κατά τη διάρκεια της αντιγραφής. Η καμπτοθεκίνη δεν επηρεάζει την ικανότητα της τοποϊσομεράσης να προκαλεί ρήγμα στην αλυσίδα του DNA, αλλά αναστέλλει το τελικό στάδιο της κατάλυσης από την τοποϊσομεράση, αυτό της επανασύνδεσης των αλυσίδων του DNA. Αυτή η διαδικασία εμφανίζεται κατά τη διάρκεια της φάσης S του κυτταρικού κύκλου και η δράση της καμπτοθεκίνης θεωρείται ότι εξαρτάται από τον κυτταρικό κύκλο. Ωστόσο, έχουν αναφερθεί μελέτες που δείχνουν ότι η καμπτοθεκίνη δεν έχει κυτταροτοξική δράση μόνο κατά τη διάρκεια της φάσης S, αλλά μπορεί να επιδρά και σε κύτταρα που δεν βρίσκονται στη διαδικασία της σύνθεσης του DNA. Οι μηχανισμοί κυτταροτοξικότητας που εξαρτώνται από την αντιγραφή πιθανόν να περιλαμβάνουν πρωτεάσες σερίνης και ενδονουκλεάσες (Rothenberg, 1997).



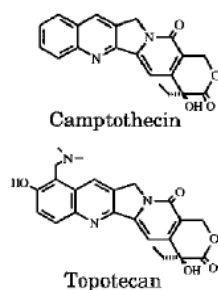
Εικόνα 16: Σύνδεση της καμπτοθεκίνης στο σύμπλοκο του ενζύμου με το DNA

Η καμπτοθεκίνη, ως αναστολέας της τοποϊσομεράσης I παρουσιάζει σημαντική αντικαρκινική δράση, όμως προκαλεί σοβαρές ανεπιθύμητες επιδράσεις στα κύτταρα, οι οποίες περιορίζουν την κλινική εφαρμογή της. Η δημιουργία αναστολέων που αποτελούν

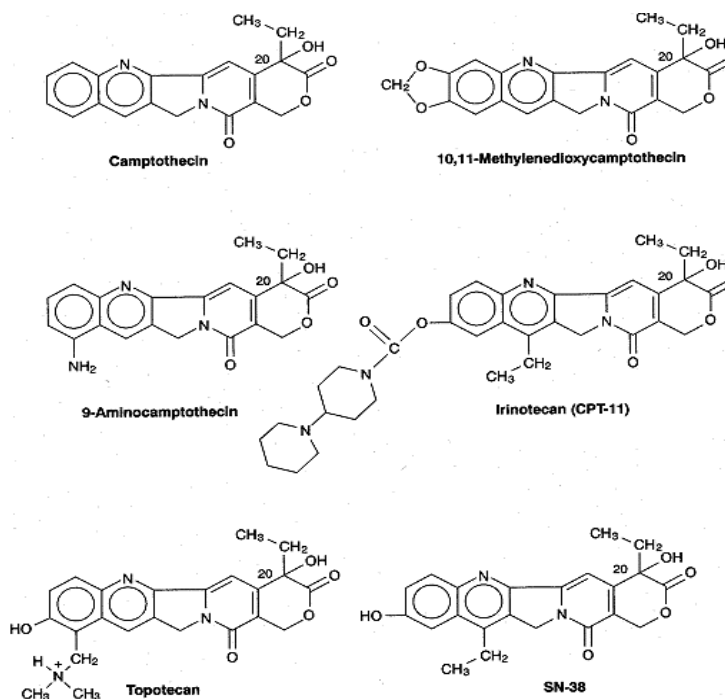
ανάλογα της καμπτοθεκίνης πραγματοποιήθηκε ώστε να μειωθεί η υψηλή τοξικότητα και να αυξηθεί η διαλυτότητα της καμπτοθεκίνης στο νερό, δύο παράγοντες που περιορίζουν την εφαρμογή του φαρμάκου. Ως αποτέλεσμα δημιουργήθηκαν υδατοδιαλυτά ανάλογα της καμπτοθεκίνης, όπως η ιρινοτεκάνη (CPT-11), η τοποτεκάνη και η 9-αμινοκαμπτοθεκίνη (9-AC) (Rothenberg, 1997). Άλλοι αναστολείς της τοποϊσομεράσης I αποτελούν το SN-38 (μεταβολίτης του CPT-11), τα βενζοανθρακένια, οι ινδολοκαρμπαζόλες και οι βενζιμιδαζόλες (Pommier et al., 1998).

Στους καταλυτικούς αναστολείς της τοποϊσομεράσης I συγκαταλέγονται μόρια που συνδέονται στο DNA και καταστέλλουν τη δημιουργία ρήγματος στην αλυσίδα του DNA, όπως η δοξορουμπικίνη, η ακλακινομυκίνη A (aclacinomycin), το TAN-1518 A και B και η δισταμυκίνη. Η αποτελεσματικότητα των μορίων αυτών είναι εμφανής σε μεγάλες συγκεντρώσεις και φαίνεται ότι σχετίζεται με την ικανότητα τους να συνδέονται στο DNA (Pommier et al., 1998).

TOPOISOMERASE I



Εικόνα 17: Χημική δομή αναστολέων δηλητήρια (poison) της τοποϊσομεράσης I

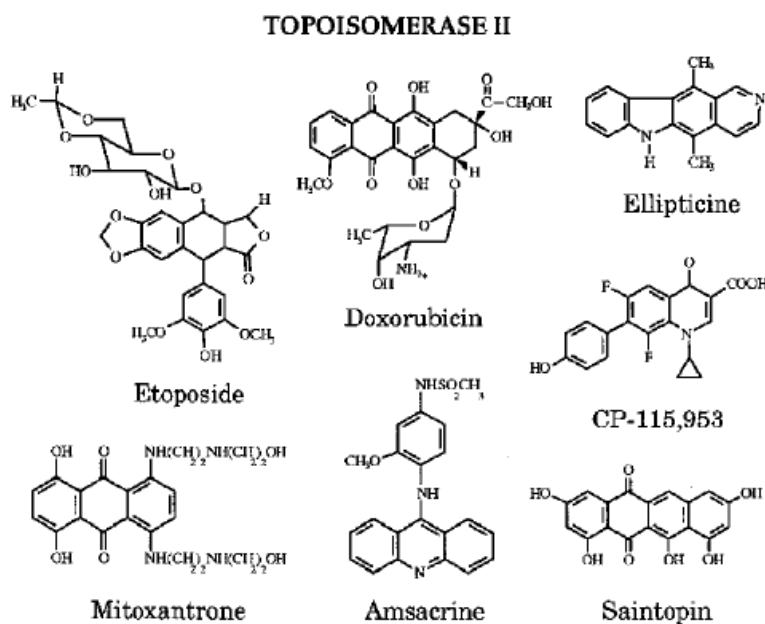


Εικόνα 18: Χημικές δομές παραγώγων καμπτοθεκίνης

1.5.4.2 Αναστολείς της τοποϊσομεράσης II

Σε αντίθεση με την τοποϊσομεράση I, η τοποϊσομεράση II αποτελεί στόχο για ένα μεγάλο αριθμό αντινεοπλασματικών φαρμάκων, τα οποία μπορεί να διαφέρουν δομικά. Φάρμακα όπως η ετοποσιδίνη, η δοξορουμπικίνη, η αμσακρίνη και η μιτοξανδρόνη χρησιμοποιούνται συχνά για τη θεραπεία ανθρώπινων καρκίνων. Επιπλέον, οι χημειοπροστατευτικές διατροφές για τη θεραπεία κακοήθων όγκων στηρίζονται ή αποτελούνται κυρίως από παράγοντες που στοχεύουν την τοποϊσομεράση II. Τα φάρμακα πιθανόν να αλληλεπιδρούν κυρίως με την α ισομορφή του ενζύμου. Ωστόσο μελέτες έχουν δείξει ότι και η τοποϊσομεράση IIβ παίζει ένα σημαντικό ρόλο στη δράση του φαρμάκου.

Ικανότητα αναστολής της τοποϊσομεράσης II έχουν δείξει και άλλα φάρμακα όπως η σαϊντοπίνη, η ελλiptικίνη και το μόριο CP-115,953, μια κινολόνη που μάλιστα εμφανίζει μεγαλύτερη ικανότητα αναστολής της τοποϊσομεράσης II από την ετοποσιδίνη. Γενικότερα οι κινολόνες αποτελούν μια από τις σημαντικότερες κατηγορίες φαρμάκων, καθώς έχει βρεθεί ότι μπορούν να επιδρούν τόσο σε ευκαρυωτικούς όσο και σε προκαρυωτικούς οργανισμούς (Froelich-Ammon et al., 1995).



Εικόνα 19: Χημικές δομές αναστολέων ποίση της τοποϊσομεράσης II

Ο μηχανισμός δράσης του κάθε φαρμάκου είναι διαφορετικός. Η ετοποσιδίνη, η οποία ανήκει στις επιποδοφυλλτοξίνες, σταθεροποιεί το σύμπλοκο της τοποϊσομεράσης II με το DNA. Η δοξορουμπικίνη, που ανήκει στις ανθρακυκλίνες, συνδέεται με την πυρηνική χρωματίνη σχηματίζοντας ένα τριαδικό σύμπλεγμα με την τοποϊσομεράση II και το DNA που προκαλεί διάσπαση του κλώνου. Η ελλiptικίνη προκαλεί είτε την αποσύνδεση της τοποϊσομεράσης, είτε τον σχηματισμό του συμπλόκου τοποϊσομεράση II-DNA που

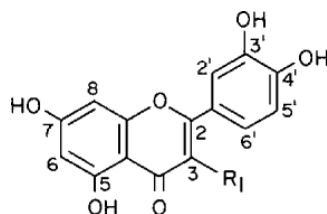
δημιουργεί συνεχόμενα σπασίματα. Τέλος, η αμσακρίνη που κατατάσσεται στις μακαλουβαμίνες δημιουργεί διαμεσολαβούμενα από το ένζυμο δίκλιωνα σπασίματα (Wang et al., 1997).

Μια δεύτερη τάξη φαρμάκων που επιδρούν στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης II έχουν σημαντικές κλινικές εφαρμογές. Σε αντίθεση με τους αναστολείς-δηλητήρια (poison) οι παράγοντες αυτοί επιδρούν στην καταλυτική ενεργότητα του ενζύμου, χωρίς όμως να εμποδίζουν την πρόκληση ρήγματος στο DNA. Έχει βρεθεί από μελέτες σε προκαρυωτικούς οργανισμούς ότι ουσίες όπως η νοβομπιοκίνη και η κουμερμυκίνη αποτελούν καταλυτικούς αναστολείς της τοποϊσομεράσης II, καθώς παρεμβαίνουν και εμποδίζουν την πρόσδεση του ATP, με αποτέλεσμα το ένζυμο να μην ενεργοποιείται. Καταλυτικοί αναστολείς έχουν βρεθεί και για την ευκαρυωτική τοποϊσομεράση II όπως είναι η μερβαρόνη, το μόριο ICRF-193, σταυροσπορίνη και η μιτινδομίδη (Fortune et al., 1998).

1.5.5 Πολυφαινόλες ως αναστολείς των τοποϊσομερασών

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

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



R₁

Luteolin : H

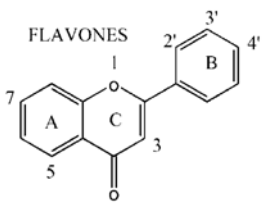
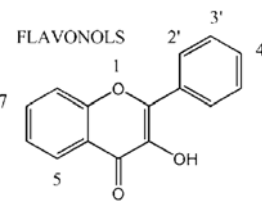
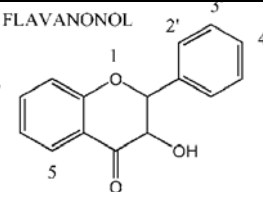
Quercetin: OH

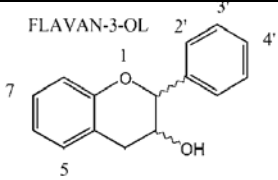
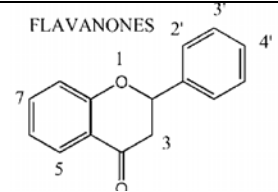
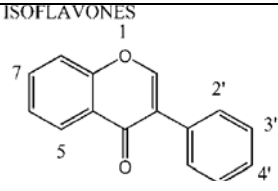
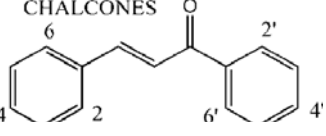
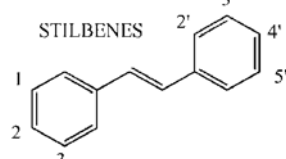
Εικόνα 20: Χημική δομή των φλαβονοειδών λουτεολίνη και κερκετίνη

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

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

Πίνακας 3: Ικανότητα αναστολής της τοποϊσομεράσης I από ορισμένα φλαβονοειδή, τα οποία δρουν ως αναστολείς δηλητήρια

Χημική Δομή	Κοινή ονομασία	% Αναστολή στα 100μM (±SD)
 <p>FLAVONES</p>	Χρυσίνη	2 (± 2.1)
	Απιγενίνη	44 (±8.9)
	Λουτεολίνη	55 (± 8.2)
	Οριεντίνη	69 (± 5.6)
	Διοσμίνη	13 (± 4.9)
 <p>FLAVONOLS</p>	Φισκτίνη	48 (± 1)
	Καιμπφερόλη	56 (± 6.2)
	Κερκετίνη	57 (± 15.6)
	Μυρικετίνη	62 (± 14.9)
	Γκοσιπετίνη	9 (± 4.9)
	Μορίνη	16 (± 5.5)
	Ραμνετίνη	<25
 <p>FLAVANONOL</p>	Ταξιφολίνη	14 (± 9.9)
	Σιλιμπινίνη	5 (± 4)

<p>FLAVAN-3-OL</p> 	<p>Κατεχίνη Επικατεχίνη Επιγαλοκατεχίνη</p>	<p>1 (\pm 1) 9 (\pm 5.4) 5</p>
<p>FLAVANONES</p> 	<p>Χεσπερίνη</p>	<p>4 (\pm 2.5)</p>
<p>ISOFLAVONES</p> 	<p>Γενιστεΐνη</p>	<p>22 (\pm 9.5)</p>
<p>CHALCONES</p> 	<p>Φλορετίνη Φλοριντζίνη</p>	<p>19 (\pm 2.8) 19 (\pm 0.7)</p>
<p>STILBENES</p> 	<p>trans-Ρεσβερατρόλη trans-Πικεατανόλη</p>	<p>26 (\pm 2.1) 23 (\pm 6.4)</p>

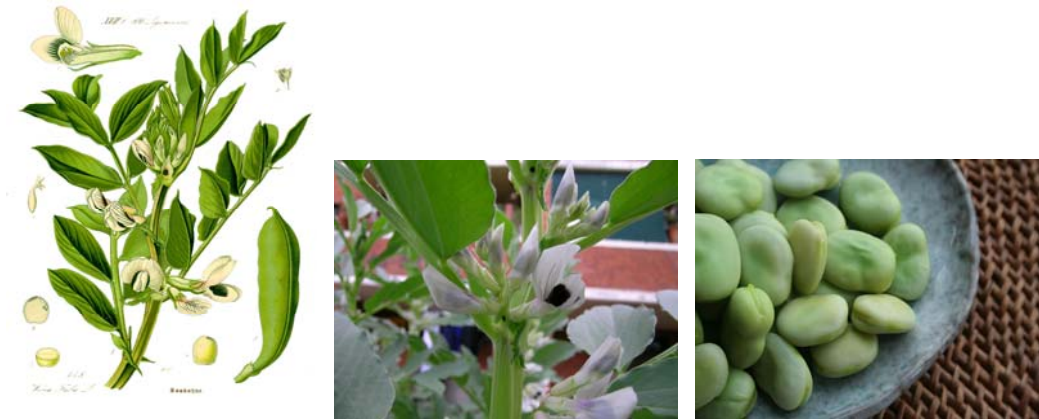
1.6 Σκοπός

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της μελέτης των βιολογικών ιδιοτήτων φυτικών εκχυλισμάτων απομονωμένα από ψυχανθή, μέλη της οικογένειας *Leguminosae*, με έμφαση κυρίως στις χημειοπροστατευτικές τους ιδιότητες. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η παρατήρηση της επίδρασης κλασμάτων τους, πλούσιων σε πολυφαινολικές ενώσεις, στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I του σίτου και της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I. Η τοποϊσομεράση I αποτελεί σημαντικό ένζυμο που συμμετέχει σε ζωτικές κυτταρικές λειτουργίες (αντιγραφή, μεταγραφή, σταθερότητα γενετικού υλικού) και έχει παρατηρηθεί ότι εμφανίζει αυξημένα επίπεδα έκφρασης σε καρκινικά κύτταρα. Είναι σημαντική η ταυτοποίηση παραγόντων που στοχεύουν και αναστέλλουν την δράση των τοποϊσομερασών (I και II), οι οποίοι μπορούν να αποτελέσουν πιθανούς αντικαρκινικούς και χημειοπροστατευτικούς παράγοντες. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν 7 κλάσματα καθαρών μορίων που απομονώθηκαν από το μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού *Vicia faba* και 3 κλάσματα καθαρών μορίων που απομονώθηκαν από το μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού *Lotus edulis*.

Φυτά της οικογένειας Leguminosae

Vicia faba

Το φυτό *Vicia faba* είναι ένα είδος ψυχανθούς της οικογένειας *Fabaceae* προερχόμενο από τη Βόρεια Αφρική και την Νοτιοδυτική Ασία το οποίο καλλιεργείται σε μεγάλο βαθμό και σε άλλες περιοχές. Τα φύλλα του φυτού είναι πτεροειδή με 2-7 φυλλάρια και έχουν ένα ευδιάκριτο γκριζοπράσινο χρώμα, τα λουλούδια αποτελούνται από 5 πέταλα, ενώ ο καρπός (legume) είναι ένα πλατύ σκληρό περικάρπιο οσπρίου με μια πλατιά χνουδωτή επιφάνεια που περιέχει 3-8 σπόρους. Πρόκειται για ένα διπλοειδές φυτό και κάθε κύτταρο του περιέχει 12 χρωμοσώματα (6 ομόλογα ζεύγη). Οι καρποί είναι γνωστοί ως κουκιά, καταναλώνονται ως τρόφιμα και είναι σημαντικό κομμάτι της Μεσογειακής διατροφής, ενώ επιδεικνύουν και μια σειρά από σημαντικά οφέλη για την υγεία, αφού είναι πλούσια σε πολλά ζωτικά συστατικά για τον ανθρώπινο οργανισμό. Περιέχουν μεγάλες ποσότητες τυραμίνης, γι' αυτό και πρέπει να μην περιλαμβάνονται στη διατροφή ατόμων που λαμβάνουν αναστολείς μονοαμινοξειδασών (MAOI) ως φάρμακα.



Εικόνα 21: Φυτό *Vicia faba* διάταξη του φυτού, το άνθος και οι καρποί του (κουκιά)

Lotus edulis

Το γένος *Lotus* ανήκει στην οικογένεια φυτών *Fabaceae* και προέρχεται από την Ευρώπη και συγκεκριμένα από την περιοχή της Μεσογείου. Το φυτό *Lotus edulis*, γνωστό και ως περατζούνι, είναι ετήσιο και παρουσιάζει συμβιωτικές σχέσεις με βακτήρια του εδάφους, τα οποία σχηματίζουν εξογκώματα στις ρίζες των φυτών και παράγουν ατμοσφαιρικό άζωτο. Κατά συνέπεια αποτελεί σημαντική πηγή αζώτου, ενώ μπορεί να καταναλωθεί και ως τρόφιμο (www.pfaf.org).



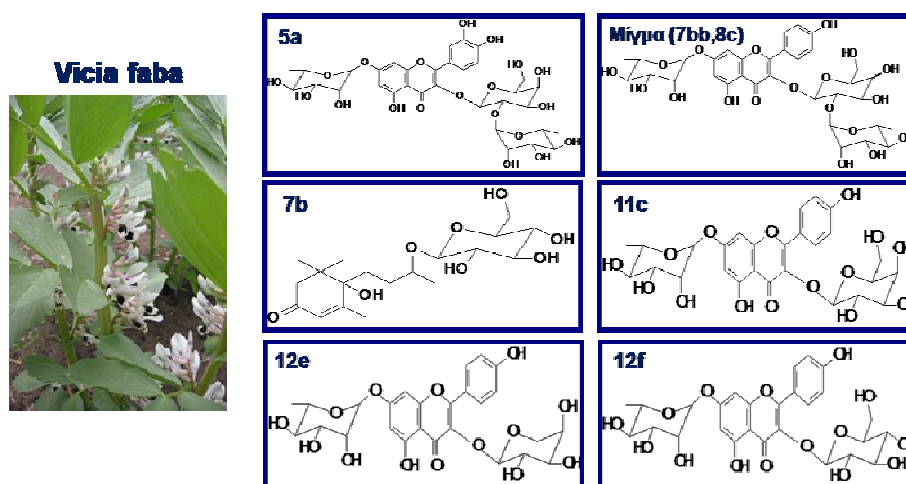
Εικόνα 22: Φυτό *Lotus edulis*, το άνθος και ο καρπός του

2.Υλικά και μέθοδοι

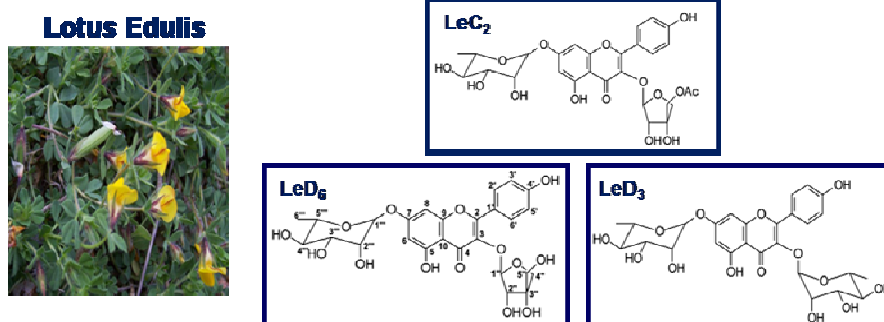
2.1 Υλικά

2.1.1 Κλάσματα καθαρών μορίων

Στη συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκε η επίδραση κλασμάτων καθαρών μορίων της οικογένειας *Leguminosae* στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I. Πιο αναλυτικά 7 κλάσματα απομονώθηκαν από το φυτό *Vicia faba* και 3 κλάσματα από το φυτό *Lotus edulis*. Η απομόνωση των μεθανολικών εκχυλισμάτων από τα φυτά, η περαιτέρω κλασμάτωση των εκχυλισμάτων, ο καθαρισμός τους και η ταυτοποίηση των καθαρών μορίων έχει περιγραφεί αναλυτικά από τους Spanou et al. (Spanou et al., 2008). Οι δομές των πολυφαινολικών ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στα κλάσματα δίνονται στις *Εικόνες 23 και 24* και οι πλήρεις ονομασίες και τα μοριακά βάρη των πολυφαινολικών ενώσεων δίνονται στον πίνακα 4.



Εικόνα 23: Χημική δομή των καθαρών μορίων του φυτού *Vicia faba*



Εικόνα 24: Χημική δομή των καθαρών μορίων του φυτού *Lotus edulis*

Πίνακας 4: Ονόματα των καθαρών πολυφαινολικών ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στα κλάσματα που απομονώθηκαν από τα μεθανολικά εκχυλίσματα των φυτών *V. faba* και *L. edulis*

Φυτό	Καθαρή ένωση	Όνομα της ένωσης	MB*
<i>Vicia faba</i>	Vf 5a	3-O-(2-O-ραμνοπυρανοσυλο)-γαλακτοπυρανοσυλο-7-O-ραμνοπυρανοσυλοκερκετίνη	756,66
<i>Vicia faba</i>	Vf 7b	9-O-β-D-γλυκοπυρανοσυλοξυ-6-υδροξυ-3-οξο-α-ιονόλη	386
<i>Vicia faba</i>	Vf 7bb, Vf 8c	3-O-(2-O-ραμνοπυρανοσυλο)-γαλακτοπυρανοσυλο-7-O-ραμνοπυρανοσυλοκαιμπερόλη	740,66
<i>Vicia faba</i>	Vf 11c	3-O-γαλακτοπυρανοσυλο-7-O-ραμνοπυρανοσυλοκαιμπερόλη	594,52
<i>Vicia faba</i>	Vf 12e	3-O-αραβινοπυρανοσυλο-7-O-ραμνοπυρανοσυλοκαιμπερόλη	564,49
<i>Vicia faba</i>	Vf 12f	3-O-γλυκοπυρανοσυλο-7-O-ραμνοπυρανοσυλοκαιμπερόλη	594,52
<i>Lotus edulis</i>	Le D ₃	3,7-δι-O-ραμνοπυρανοσυλοκαιμπερόλη	578,52
<i>Lotus edulis</i>	Le C ₂	3-O-(5-O-ακετυλαπιοφουρανοσυλο)-7-O-ραμνοπυρανοσυλοκαιμπερόλη	606
<i>Lotus edulis</i>	Le D ₆	3-O-απιοφουρανοσυλο-7-O-ραμνοπυρανοσυλοκαιμπερόλη	578,52

*MB: Μοριακό βάρος της ένωσης

2.1.2 Πλασμιδιακό DNA

Πλασμίδιο Bluescript-SK+ ενσωματωμένο σε βακτήρια *E. coli*

2.1.3 Απομόνωση πλασμιδίου

- LB Broth (Scharlau-Ισπανία)
- NaCl (Panreac-Ισπανία)
- Αμπικικιλίνη (Ampicilin) (Sigma-Γερμανία)
- Sol 1 (διάλυμα 1): Γλυκόζη (glucose) (Panreac-Ισπανία), Tris (Merck-Γερμανία) (pH=8), EDTA (Panreac-Ισπανία)
- Sol 2 (διάλυμα 2): SDS 10% (Sigma-Γερμανία), NaOH (Merck-Γερμανία)
- Sol 3 (διάλυμα 3): potassium acetate (Sigma-Γερμανία), οξικό οξύ (Merck-Γερμανία)

- Προπανόλη (Merck-Γερμανία)
- Αιθανόλη (Merck-Γερμανία)
- RNase (Sigma-Γερμανία)

2.1.4 Topoisomerase I relaxation assay

2.1.4.1 Wheat germ Topoisomerase I relaxation assay

- Ένζυμο: τοποϊσομεράση I από σπόρο σιταριού (Promega-Η.Π.Α.)
- DTT (DiThioThreitol-Διθειοθρεϊτόλη) (Applichem-Γερμανία)
- Γλυκερόλη (Panreac-Ισπανία)
- Tris (Merck-Γερμανία)
- HCl (Merck-Γερμανία)
- NaCl (Panreac-Ισπανία)
- EDTA (Panreac-Ισπανία)
- Βορικό οξύ (Boric acid) (Sigma-Γερμανία)
- Αγαρόζη (agarose)
- Χρωστική κυανό της βρωμοφαινόλης (Bromophenol blue) (Research Organics-Η.Π.Α)
- Βρωμιούχο αιθίδιο (Ethithium Bromide) (Merck-Γερμανία)

2.1.4.2 Human Topoisomerase I relaxation assay

- Ανθρώπινη τοποϊσομεράση I (ανασυνδυσασμένη, αγρίου τύπου) (TopoGen-Η.Π.Α)
- Διάλυμα αντίδρασης (Reaction buffer, 1X): 10 mM Tris-Cl, pH 7.9, 150 mM NaCl, 0.11% BSA, 0.11 mM σπερμιδίνη, 5% γλυκερόλη (TopoGen-Η.Π.Α)
- Διάλυμα αραιώσης ενζύμου: 10 mM Tris-Cl, pH 7.5, 500 mM NaCl, 1 mM PMSF, 2 mM DTT, 50 µg/ml BSA (TopoGen-Η.Π.Α)
- Tris (Merck-Γερμανία)
- HCl (Merck-Γερμανία)
- NaCl (Panreac-Ισπανία)
- EDTA (Panreac-Ισπανία)
- Βορικό οξύ (Boric acid) (Sigma-Γερμανία)
- Αγαρόζη (agarose)
- Χρωστική κυανό της βρωμοφαινόλης (Bromophenol blue) (Research Organics-Η.Π.Α)

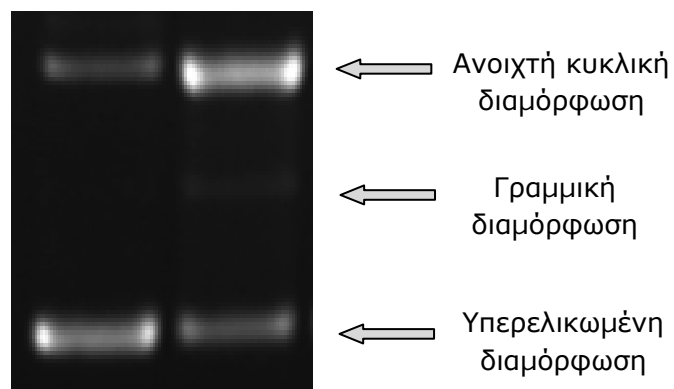
2.2 Μέθοδοι

Topoisomerase I relaxation assay

2.2.1 Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα της τοποϊσομεράσης I να προκαλεί μονόκλωνα σπασίματα σε πλασμιδιακό DNA. Το πλασμιδιακό DNA έχει την ιδιότητα να εμφανίζεται σε τρεις διαμορφώσεις όταν τρέχει μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης: α) την υπερελικωμένη μορφή, η οποία είναι και η πιο συμπυκνωμένη μορφή, β) την ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση, στην οποία μεταβαίνει το πλασμίδιο μετά από μονόκλωνο ρήγμα στην αλυσίδα του DNA και γ) τη γραμμική διαμόρφωση, στην οποία μεταβαίνει το πλασμίδιο μετά από δίκλωνο ρήγματα της αλυσίδας του DNA.

Οι διαμορφώσεις του πλασμιδιακού DNA κινούνται με διαφορετική ταχύτητα στο πήκτωμα της αγαρόζης κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης. Η υπερελικωμένη διαμόρφωση του DNA είναι η πιο συμπαγής και έχει την ικανότητα να διαπερνά τους πόρους της αγαρόζης με μεγαλύτερη ταχύτητα και συνεπώς διανύει μεγαλύτερη απόσταση στο πήκτωμα της αγαρόζης. Η δράση της τοποϊσομεράσης I στο πλασμιδιακό DNA προκαλεί μονόκλωνα σπασίματα στην υπερελικωμένη διαμόρφωση του DNA, με αποτέλεσμα αυτό να μεταβαίνει στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση. Η ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση κινείται πιο αργά από την υπερελικωμένη διαμόρφωση διαμέσου των πόρων της αγαρόζης, με αποτέλεσμα να εμφανίζεται ψηλότερα από την υπερελικωμένη μορφή στο πήκτωμα της αγαρόζης μετά από την ηλεκτροφόρηση. Τέλος, η γραμμική διαμόρφωση εμφανίζεται ανάμεσα στην ανοιχτή κυκλική και στην υπερελικωμένη διαμόρφωση, λόγω του ότι μπορεί να διαπεράσει τους πόρους της αγαρόζης γρηγορότερα από ότι η ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση.



Εικόνα 25: Διαμορφώσεις του πλασμιδιακού DNA στην ηλεκτροφόρηση

2.2.2 Πειραματική διαδικασία

2.2.2.1 Απομόνωση πλασμιδίου

Το θρεπτικό μέσο για την καλλιέργεια των βακτηρίων περιείχε 1,5 gr LB broth και 1 gr NaCl σε 100 ml απιονισμένο νερό. Ακολούθησε προσθήκη διαλύματος 100μl αμπικιλλίνης 100mg/ml, ώστε να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση 100 μg/ml. Το θρεπτικό μέσο αποστειρώθηκε στους 120°C με υγρή αποστείρωση για 20min, πριν από την προσθήκη της αμπικιλλίνης. Έπειτα 3-4 ml από το θρεπτικό μέσο επιμολύνθηκαν με βακτήρια *E. coli* μετασχηματισμένα με το Bluescript-SK+ πλασμιδιακό DNA και η καλλιέργεια έφθασε σε εκθετικό στάδιο ανάπτυξης, μετά από συνεχή ανάδευση σε 210 στροφές, σε θερμοκρασία 37°C για περίπου 4 ώρες. Στη συνέχεια αυτή η μικρή καλλιέργεια μεταφέρθηκε στην φιάλη που περιείχε το θρεπτικό μέσο των 100 ml. και αφέθηκε να αναπτυχθεί, με συνεχή ανάδευση, στις 210 στροφές, σε θερμοκρασία 37°C, για περίπου 12-13 ώρες.

Η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA από την βακτηριακή καλλιέργεια περιλαμβάνει τα εξής βήματα: τα βακτήρια διαχωρίστηκαν (ως ίζημα) μετά από φυγοκέντρηση 20 λεπτών, σε 4000 στροφές και διαλύθηκαν σε 8 ml διαλύματος 1 (50 mM γλυκόζη, 25 mM Tris-Cl pH=8.0, 10 mM EDTA pH=8.0). Στην συνέχεια έγινε προσθήκη 16 ml διαλύματος 2 (0,2 N NaOH, 1% SDS) και απαλή ανάδευση. Ακολούθησε προσθήκη 12 ml διαλύματος 3 (45 ml από 5M οξικό κάλιο, 11,5 ml οξικό οξύ σε 28,5 ml νερό), ανάδευση και φυγοκέντρηση για 20 λεπτά σε 5000 στροφές, σε 4°C. Μετά την φυγοκέντρηση το υπερκείμενο συλλέχθηκε και μεταφέρθηκε σε καινούριο σωλήνα και πραγματοποιήθηκε επανάληψη της προηγούμενης φυγοκέντρωσης. Μετρήθηκε ο όγκος του υπερκείμενου και ακολούθησε η προσθήκη παγωμένης ισοπροπανόλης σε ποσό ίσο με το 60% του όγκου του υπερκείμενου. Μετά από έντονη ανάδευση του μείγματος ακολούθησε φυγοκέντρηση για 20 λεπτά, σε 5000 στροφές, σε 4°C και ξέπλυμα του ιζήματος με 70% παγωμένη αιθανόλη 50% του όγκου και ανάδευση. Τέλος ακολούθησε φυγοκέντρηση για 20 λεπτά σε 5000 στροφές και μετά από στέγνωμα σε 37°C το ίζημα διαλυτοποιήθηκε σε διάλυμα TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA) που περιείχε το ένζυμο RNase σε τελική συγκέντρωση 10 μg/ml για την αποφυγή της αποδόμησης του RNA.

Η εκτίμηση της ποσότητας και της καθαρότητας του πλασμιδιακού DNA πραγματοποιήθηκε με μέτρηση της απορρόφησης ABS σε μήκη κύματος 260 και 280 nm (στα 280 nm απορροφούν οι πρωτεΐνες και στα 260 nm το DNA). Η συγκέντρωση του πλασμιδιακού DNA υπολογίζεται βάσει του τύπου:

$$C (\mu\text{g}/\text{ml}) = \text{Απορρόφηση στα } 260 \times 50 \times \text{συντελεστής αραιώσης}$$

Η εκτίμηση των διαμορφώσεων του πλασμιδιακού DNA γίνεται μετά από ηλεκτροφόρηση σε 1% πήκτωμα αγαρόζης. Επιλέγονται δείγματα στα οποία το πλασμιδιακό DNA βρίσκεται κατά 90% στην υπερλικωμένη διαμόρφωση. Το πλασμίδιο διατηρείται στους -20°C , αφού έχει πραγματοποιηθεί διαχωρισμός του σε μικρότερες ποσότητες (aliquots), δεδομένου ότι το συχνό ξεπάγωμα μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια της υπερελικωμένης διαμόρφωσης.

2.2.2.2 Wheat germ Topoisomerase I relaxation assay

Τα κλάσματα καθαρών μορίων εξετάστηκαν σε συγκεντρώσεις 75, 150, 300, 500, 750, 1000 μM για να προσδιοριστεί η επίδρασή τους στη δραστικότητα της τοποϊσομεράσης I, δηλαδή την ικανότητά της να χαλαρώνει το υπερελικωμένο πλασμίδιο προκαλώντας μονόκλινα σπασίματα. Ως ισχυρός αναστολέας της τοποϊσομεράσης I χρησιμοποιήθηκε ένα υδατικό εκχύλισμα κόκκινου σταφυλιού ποικιλίας Μανδηλαριάς σε συγκέντρωση 800 $\mu\text{g/ml}$, αναστέλλοντας κατά 90% την δράση της τοποϊσομεράσης I (Stagos et al., 2005). Η τιτλοδότηση του ενζύμου έδειξε ότι 1 unit ενζύμου απαιτείται για να επιτευχθεί κατά 90% η μετατροπή της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδίου στην χαλαρωμένη ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση υπό καθορισμένες πειραματικές συνθήκες.

Το μείγμα κάθε αντίδρασης (20 μl) περιείχε 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 20% γλυκερόλη, 50 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 μg Bluescript SK+ και 1 unit της τοποϊσομεράσης I. Κάθε αντίδραση περιλάμβανε τα εξής δείγματα: τον αρνητικό μάρτυρα (πλασμιδιακό DNA), το θετικό μάρτυρα (πλασμιδιακό DNA με το ένζυμο), το θετικό μάρτυρα αναστολής (πλασμιδιακό DNA και ένζυμο και μεθανολικό εκχύλισμα σταφυλιού Μανδηλαριάς) και το κάθε κλάσμα καθαρού μορίου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (πλασμιδιακό DNA και ένζυμο και κλάσμα καθαρού μορίου).

Τα δείγματα επωάζονταν στους 37°C για 45 λεπτά και η αντίδραση τερματιζόταν με την προσθήκη 5 μl διάλυμα φόρτωσης (κυανό της βρωμοφαινόλης 0.25% + 30% γλυκερόλη). Η ανάλυση των δειγμάτων γινόταν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8%, σε διάλυμα TBE 1x (10 mM Tris-Cl, 90 mM βορικό οξύ, 0,5 M EDTA pH=8) στα 70 V για 1 ώρα. Στη συνέχεια το πήκτωμα της αγαρόζης χρωματίστηκε σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (τελικής συγκέντρωσης 0,5 $\mu\text{g/ml}$) για 30 λεπτά και αποχρωματίστηκε σε 250 ml απιονισμένο νερό για 30 λεπτά. Τελικά το πήκτωμα φωτογραφιζόταν κάτω από υπεριώδες φως (UV) και η αποθήκευση των εικόνων γινόταν με το πρόγραμμα Alpha View (Alpha Innotech, San Leandro, California). Κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν.

Πίνακας 5: Δείγματα για μελέτη της δράσης των κλασμάτων καθαρών μορίων

	1μg πλασμιδιακ ό DNA	1 unit ενζύμου	Μεθανολικό εκχύλισμα σταφυλιών	Καθαρά μόρια
Αρνητικός μάρτυρας	+	-	-	-
Θετικός μάρτυρας	+	+	-	-
Θετικός μάρτυρας αναστολής	+	+	+	-
Δείγμα με τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις των μορίων	+	+	+	+

2.2.2.3 Human Topoisomerase I relaxation assay

Τα κλάσματα καθαρών μορίων εξετάστηκαν σε συγκεντρώσεις 100, 200, 300, 400, 500 μM για να προσδιοριστεί η επίδρασή τους στη δραστικότητα της τοποϊσομεράσης I. Ως θετικός μάρτυρας αναστολής της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης χρησιμοποιήθηκε το μεθανολικό εκχύλισμα κόκκινου σταφυλιού ποικιλίας Μανδηλαριάς σε συγκέντρωση 800 μg/ml, αναστέλλοντας κατά 90% την δράση της τοποϊσομεράσης I (Stagos et al., 2005). Η τιτλοδότηση του ενζύμου έδειξε ότι 1 unit ενζύμου απαιτείται για να επιτευχθεί κατά 90% η μετατροπή της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδίου στην χαλαρωμένη ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση υπό καθορισμένες πειραματικές συνθήκες.

Το μείγμα κάθε αντίδρασης (20 μl) περιείχε 100 mM Tris-HCl (pH 7.9), 1.5 M NaCl, 50% γλυκερόλη, 1% BSA (bovine serum albumin-αλβουμίνη ορού βοός), 10x διαλύματος αντίδρασης (reaction buffer), 0,25 μg Bluescript SK+ και 1 unit ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I. Κάθε αντίδραση περιλάμβανε τα εξής δείγματα: τον αρνητικό μάρτυρα (πλασμιδιακό DNA), το θετικό μάρτυρα (πλασμιδιακό DNA και ένζυμο), το δείκτη ισχυρής ανασταλτικής δράσης- ή τον θετικό μάρτυρα αναστολής (πλασμιδιακό DNA και ένζυμο και υδατικό εκχύλισμα σταφυλιού Μανδηλαριάς) και το κάθε κλάσμα καθαρού μορίου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (πλασμιδιακό DNA και ένζυμο και κλάσμα καθαρού μορίου).

Τα δείγματα επωάζονταν στους 37°C για 45 λεπτά και η αντίδραση τερματιζόταν με την προσθήκη 5 μl διάλυμα φόρτωσης (κυανό της βρωμοφαινόλης 0.25% + 30% γλυκερόλη). Η ανάλυση των δειγμάτων γινόταν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8%, σε διάλυμα TBE 1x (10 mM Tris-Cl, 90 mM βορικό οξύ, 0,5 M EDTA pH=8) στα 70 V για 1 ώρα. Στη συνέχεια το πήκτωμα της αγαρόζης χρωματίστηκε σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (τελικής συγκέντρωσης 0,5 μg/ml) για 30 λεπτά και αποχρωματίστηκε σε 250 ml

απιονισμένο νερό για 30 λεπτά. Τελικά το πήκτωμα φωτογραφιζόταν κάτω από υπεριώδες φως (UV) και η αποθήκευση των εικόνων γινόταν με το πρόγραμμα Alpha View (Alpha Innotech, San Leandro, California). Κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν.

Πίνακας 6: Δείγματα για μελέτη της δράσης των κλασμάτων καθαρών μορίων

	0,25 μg πλασμιδιακό DNA	1 unit ενζύμου	Μεθανολικό εκχύλισμα σταφυλιών	Καθαρά μόρια
Αρνητικός μάρτυρας	+	-	-	-
Θετικός μάρτυρας	+	+	-	-
Θετικός μάρτυρας αναστολής	+	+	+	-
Δείγμα με τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις των μορίων	+	+	+	+

2.2.3 Υπολογισμοί

Η επεξεργασία των φωτογραφιών των ηηκτωμάτων έγινε με το πρόγραμμα Gel-Pro, με το οποίο υπολογίστηκαν με βάση την οπτική πυκνότητα τα ποσοστά της υπερελικωμένης και της ανοιχτής κυκλικής διαμόρφωσης για την κάθε συγκέντρωση των υπό εξέταση μορίων. Από τις τιμές αυτές το ποσοστό της αναστολής για κάθε δείγμα υπολογίζεται με βάση τον τύπο

$$\% \text{ αναστολή} = \frac{S_p - S}{S_p - S_o} \times 100$$

Όπου :

S_p είναι το ποσοστό της υπερελικωμένης μορφής στο θετικό μάρτυρα, που είναι το δείγμα που περιέχει το πλασμιδιακό DNA μαζί με το ένζυμο,

S είναι το ποσοστό της υπερελικωμένης μορφής στο εξεταζόμενο δείγμα που περιέχει το πλασμιδιακό DNA με το ένζυμο και τις διαφορετικές συγκεντρώσεις του προς εξέταση μορίου

S_o είναι το ποσοστό της υπερελικωμένης μορφής στον αρνητικό μάρτυρα, που είναι το δείγμα που περιέχει το πλασμιδιακό DNA απουσία ενζύμου.

Τα ποσοστά αναστολής για το κάθε εξεταζόμενο μόριο μετρήθηκαν σε τρία ανεξάρτητα πειράματα. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος ανάλυσης SPSS 13.0 (Statistical Package for Social

Sciences). Για τη στατιστική ανάλυση υπολογιζόταν αρχικά οι παράμετροι της περιγραφικής στατιστικής που είναι η μέση τιμή (mean), η τυπική απόκλιση (standard deviation) και το τυπικό σφάλμα (standard error). Στη συνέχεια εφαρμόστηκαν μέθοδοι επαγωγικής στατιστικής. Η ανεξάρτητη μεταβλητή ήταν οι συγκεντρώσεις των καθαρών πολυφαινολικών ενώσεων.

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε μέσω ανάλυσης διακύμανσης ενός παράγοντα, 1- way ANOVA και οι ζευγαρωτές συγκρίσεις έγιναν μέσω του τεστ του Dunnett. Οι διαφορές θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές με επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $p < 0,05$. Στα γραφήματα των αποτελεσμάτων παρουσιάζονται μόνο οι στατιστικά σημαντικές τιμές.

Για την σύγκριση της ανασταλτικής δράσης των φυτικών μορίων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία εκτιμήθηκε η τιμή IC_{50} για το κάθε μόριο. Η IC_{50} (Inhibitory Concentration) αντιστοιχεί στη συγκέντρωση του μορίου στην οποία παρατηρείται 50% αναστολή στην δράση της τοποϊσομεράσης II. Μόρια με μικρές τιμές IC_{50} αποτελούν ισχυρούς αναστολείς της τοποϊσομεράσης II.

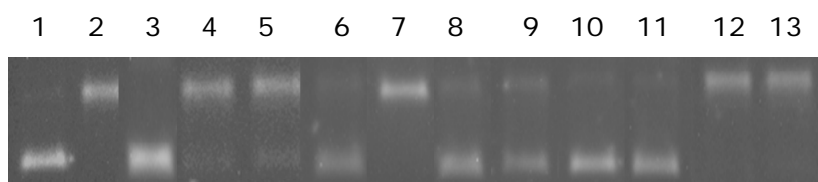
3. Αποτελέσματα

3.1 Επίδραση κλασμάτων καθαρών μορίων στην ευκαρυωτική τοποϊσομεράση I του σίτου και την ανθρώπινη τοποϊσομεράση I.

Αρχικά μελετήθηκε η δράση των κλασμάτων των καθαρών μορίων στην ενεργότητα και των δύο ενζύμων, σε μια ενδεικτική συγκέντρωση (500 μM), με απώτερο σκοπό την ταυτοποίηση των καθαρών μορίων ως αναστολέων της τοποϊσομεράσης I. Έπειτα τα μόρια που ανέστειλαν τελικά τα δύο ένζυμα μελετήθηκαν σε συγκεντρώσεις 75 μM έως 1000 μM για την ευκαρυωτική τοποϊσομεράση I του σίτου και σε συγκεντρώσεις από 100 μM έως 500 μM για την ανθρώπινη τοποϊσομεράση I.

Επιλέχτηκε η συγκέντρωση των 500 μM ως αρχική συγκέντρωση για την ταυτοποίηση των μορίων ως αναστολέων των τοποϊσομερασών, καθώς στόχος της μελέτης ήταν η εύρεση ισχυρών αναστολέων και των δύο ενζύμων. Κατά συνέπεια ήταν απαραίτητη η εύρεση μορίων που είναι ικανά σε μικρές συγκεντρώσεις να αναστέλλουν τη δράση των δύο υπό μελέτη ευκαρυωτικών τοποϊσομερασών και ιδιαίτερα της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I, προκειμένου να είναι εφικτή η προστασία έναντι του καρκίνου

Ευκαρυωτική τοποϊσομεράση I του σίτου



1. 1 μg πλασμίδιο
2. 1 μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου
3. 1 μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 800 $\mu\text{g/ml}$ μεθανολικό εκχύλισμα σταφυλιών
4. 1 μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 500 μM 5a
5. 1 μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 500 μM 7b
6. 1 μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 500 μM 7bb
7. 1 μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 500 μM 8c
8. 1 μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 500 μM 11c
9. 1 μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 500 μM 12e
10. 1 μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 500 μM 12f
11. 1 μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 500 μM Le C₂
12. 1 μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 500 μM Le D₃
13. 1 μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 500 μM Le D₆

Εικόνα 26: Επίδραση όλων των κλασμάτων των καθαρών μορίων στην ενεργότητα της ευκαρυωτικής τοποϊσομεράσης I του σίτου

Ανθρώπινη τοποϊσομεράση I

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



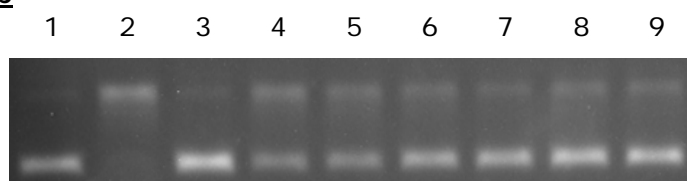
1. 0,25μg πλασμίδιο
2. 0,25μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου
3. 0,25μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 800μg/ml μεθανολικό εκχύλισμα σταφυλιών
4. 0,25μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 500μM 5a
5. 0,25μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 500μM 7b
6. 0,25μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 500μM 8c
7. 0,25μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 500μM 11c
8. 0,25μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 500μM 12e
9. 0,25μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 500μM 12f
10. 0,25μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 500μM Le C₂
11. 0,25μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 500μM Le D₃
12. 0,25μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 500μM Le D₆
13. 0,25μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου

Εικόνα 27: Επίδραση όλων των κλασμάτων των καθαρών μορίων στην ενεργότητα της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I

3.2 Επίδραση στην ευκαρυωτική τοποϊσομεράση I του σίτου κλασμάτων καθαρών μορίων που απομονώθηκαν από το φυτό *Vicia faba*

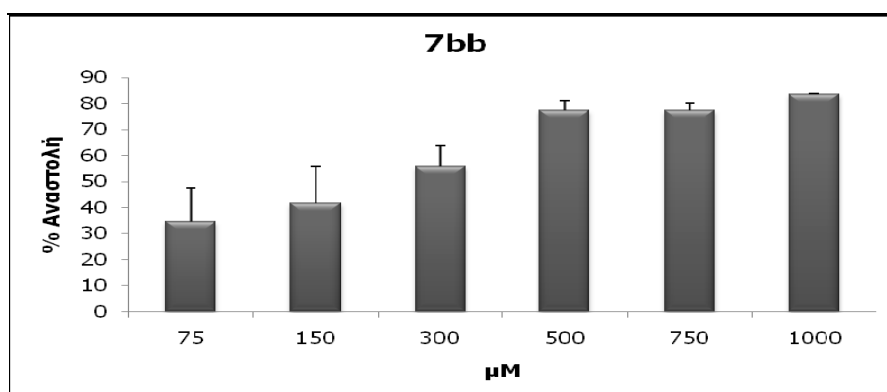
Συνολικά 4 από τα 7 κλάσματα καθαρών μορίων του φυτού *Vicia faba* εμφάνισαν αναστολή στην τοποϊσομεράση I του σίτου. Τα μόρια αυτά είναι τα 7bb, 11c, 12e και το 12f και η ανασταλτική τους δράση μελετήθηκε περαιτέρω στις συγκεντρώσεις των 75, 150, 300, 500, 750 και 1000 μM . Ο ισχυρότερος αναστολέας ήταν το μόριο 7bb, το οποίο παρουσίασε τη μικρότερη τιμή IC_{50} (150 μM) και μέγιστο ποσοστό αναστολής 80%. Τα υπόλοιπα μόρια παρουσίασαν ικανοποιητική αναστολή με τιμές IC_{50} της τάξεως των 200 μM , 240 μM και 350 μM για τα 11c, 12e και 12f αντίστοιχα.

Καθαρό μόριο 7bb



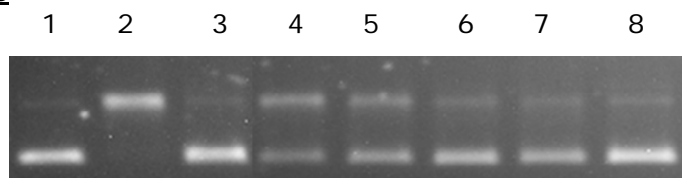
1. 1 μg πλασμίδιο
2. 1 μg πλασμίδιο + 1 unit ενζύμου
3. 1 μg πλασμίδιο + 1 unit ενζύμου + 800 $\mu\text{g/ml}$ μεθανολικό εκχύλισμα σταφυλιών
4. 1 μg πλασμίδιο + 1 unit ενζύμου + 75 μM 7bb
5. 1 μg πλασμίδιο + 1 unit ενζύμου + 150 μM 7bb
6. 1 μg πλασμίδιο + 1 unit ενζύμου + 300 μM 7bb
7. 1 μg πλασμίδιο + 1 unit ενζύμου + 500 μM 7bb
8. 1 μg πλασμίδιο + 1 unit ενζύμου + 750 μM 7bb
9. 1 μg πλασμίδιο + 1 unit ενζύμου + 1000 μM 7bb

Εικόνα 28: Επίδραση του κλάσματος καθαρού μορίου 7bb στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I του σίτου σε συγκεντρώσεις 75, 150, 300, 500, 750 και 1000 μM



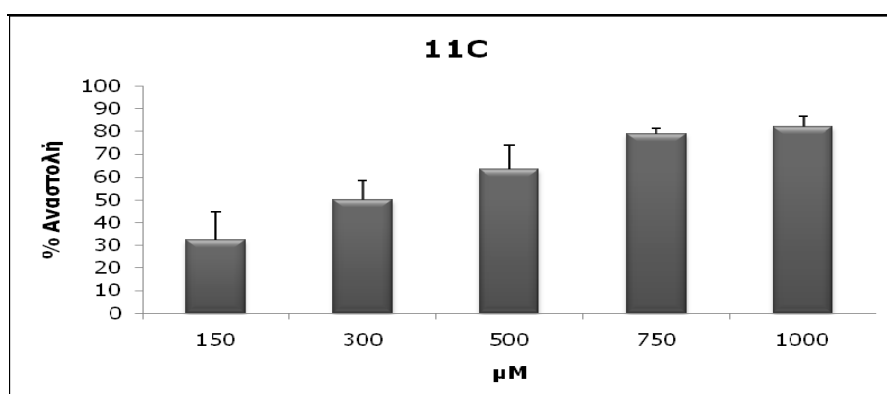
Γράφημα 1: Ποσοστά αναστολής στη δράση της τοποϊσομεράσης I του σίτου από το μόριο 7bb σε συγκεντρώσεις 75, 150, 300, 500, 750 και 1000 μM

Καθαρό μόριο 11c



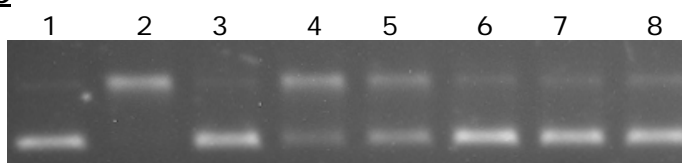
1. 1µg πλασμίδιο
2. 1µg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου
3. 1µg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 800µg/ml μεθανολικό εκχύλισμα σταφυλιών
4. 1µg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 150µM 11c
5. 1µg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 300µM 11c
6. 1µg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 500µM 11c
7. 1µg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 750µM 11c
8. 1µg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 1000µM 11c

Εικόνα 29: Επίδραση του κλάσματος καθαρού μορίου 11c στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I του σίτου σε συγκεντρώσεις 150, 300, 500, 750 και 1000 µM



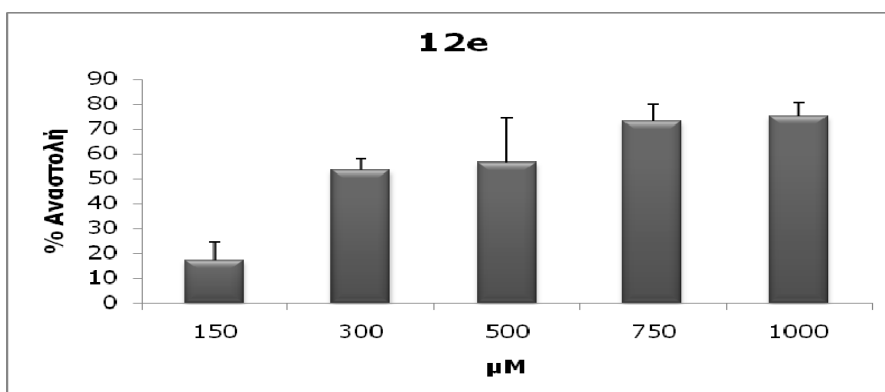
Γράφημα 2: Ποσοστά αναστολής στη δράση της τοποϊσομεράσης I του σίτου από το μόριο 11c σε συγκεντρώσεις 150, 300, 500, 750 και 1000 µM

Καθαρό μόριο 12e



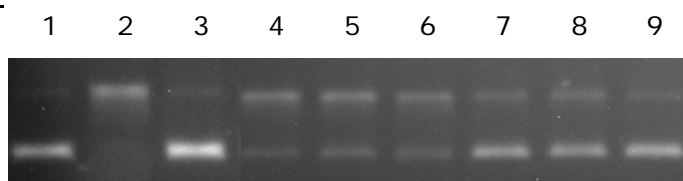
1. 1µg πλασμίδιο
2. 1µg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου
3. 1µg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 800µg/ml μεθανολικό εκχύλισμα σταφυλιών
4. 1µg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 150µM 12e
5. 1µg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 300µM 12e
6. 1µg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 500µM 12e
7. 1µg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 750µM 12e
8. 1µg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 1000µM 12e

Εικόνα 30: Επίδραση του κλάσματος καθαρού μορίου 12e στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I του σίτου σε συγκεντρώσεις 150, 300, 500, 750, 1000 µM



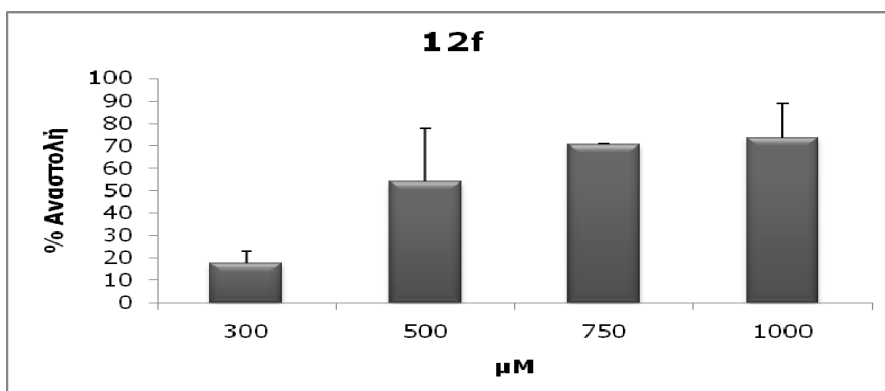
Γράφημα 3: Ποσοστά αναστολής στη δράση της τοποϊσομεράσης I του σίτου από το μόριο 12e σε συγκεντρώσεις 150, 300, 500, 750, 1000 μM

Καθαρό μόριο 12f



1. 1μg πλασμίδιο
2. 1μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου
3. 1μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 800μg/ml μεθανολικό εκχύλισμα σταφυλιών
4. 1μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 75μM 12f
5. 1μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 150μM 12f
6. 1μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 300μM 12f
7. 1μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 500μM 12f
8. 1μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 750μM 12f
9. 1μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 1000μM 12f

Εικόνα 31: Επίδραση του κλάσματος καθαρού μορίου 12f στην ενεργότητα της ευκαρυωτικής τοποϊσομεράσης I του σίτου σε συγκεντρώσεις 75, 150, 300, 500, 750 και 1000 μM

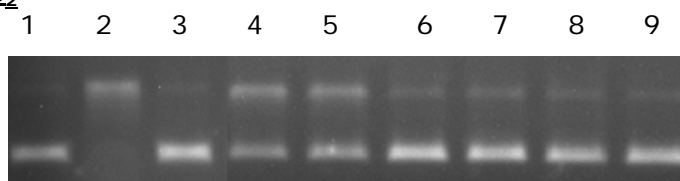


Γράφημα 4: Ποσοστά αναστολής στη δράση της τοποϊσομεράσης I του σίτου από το μόριο 12f σε συγκεντρώσεις 300, 500, 750 και 1000 μM

3.3 Επίδραση στην ευκαρυωτική τοποϊσομεράση I του σίτου κλασμάτων καθαρών μορίων που απομονώθηκαν από το φυτό *Lotus edulis*

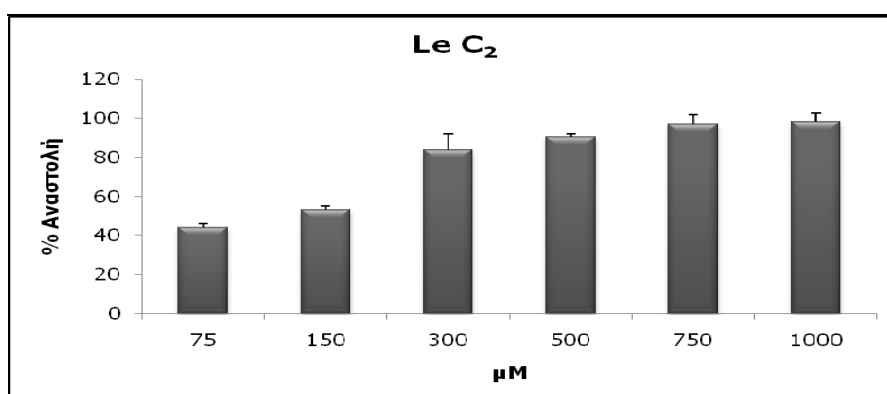
Από τα 3 κλάσματα καθαρών μορίων του φυτού *Lotus edulis* που εξετάστηκαν, επίδραση στην ευκαρυωτική τοποϊσομεράση I του σίτου εμφάνισε μόνο 1 κλάσμα και συγκεκριμένα το Le C₂, το οποίο εξετάστηκε περαιτέρω στις συγκεντρώσεις των 75, 150, 300, 500, 750 και 1000 μM. Συγκριτικά με τους αναστολείς του φυτού *Vicia faba*, το Le C₂ αποτελεί τον ισχυρότερο αναστολέα της ευκαρυωτικής τοποϊσομεράσης I του σίτου, καθώς εμφανίζει τη μικρότερη τιμή IC₅₀ (120 μM) και έχει μέγιστο ποσοστό αναστολής 100%.

Καθαρό μόριο LeC₂



1. 1μg πλασμίδιο
2. 1μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου
3. 1μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 800μg/ml μεθανολικό εκχύλισμα σταφυλιών
4. 1μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 75μM Le C₂
5. 1μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 150μM Le C₂
6. 1μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 300μM Le C₂
7. 1μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 500μM Le C₂
8. 1μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 750μM Le C₂
9. 1μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 1000μM Le C₂

Εικόνα 32: Επίδραση του κλάσματος καθαρού μορίου Le C₂ στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I του σίτου σε συγκεντρώσεις 75, 150, 300, 500, 750 και 1000 μM

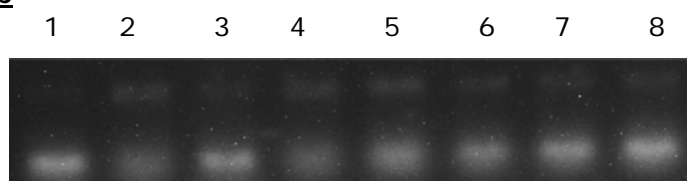


Γράφημα 5: Ποσοστά αναστολής στη δράση της τοποϊσομεράσης I του σίτου από το μόριο Le C₂ σε συγκεντρώσεις 75, 150, 300, 500, 750 και 1000 μM

3.4 Επίδραση στην ανθρώπινη τοποϊσομεράση I κλασμάτων καθαρών μορίων που απομονώθηκαν από το φυτό *Vicia faba*

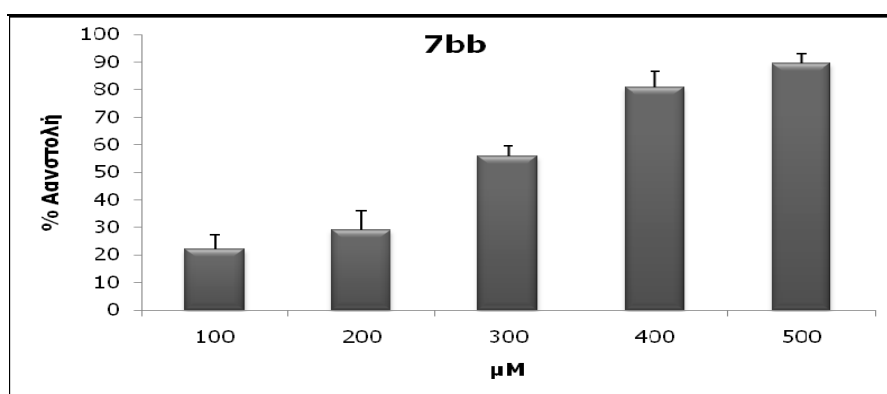
Συνολικά 5 από τα 7 κλάσματα καθαρών μορίων από το φυτό *Vicia faba* εμφάνισαν αναστολή στην ανθρώπινη τοποϊσομεράση I. Τα μόρια αυτά είναι τα 7bb, 8c, 11c, 12e και 12f και η ανασταλτική τους δράση μελετήθηκε περαιτέρω στις συγκεντρώσεις των 100, 200, 300, 400 και 500 μM . Ο ισχυρότερος αναστολέας ήταν το μόριο 12f, το οποίο παρουσίασε τη μικρότερη τιμή IC_{50} (110 μM) και μέγιστο ποσοστό αναστολής 100%. Τα υπόλοιπα μόρια παρουσίασαν ικανοποιητική αναστολή με τιμές IC_{50} της τάξεως των 180 μM , 220 μM , 250 μM και 260 μM για τα 11c, 8c, 12e και 7bb αντίστοιχα.

Καθαρό μόριο 7bb



1. 0,25 μg πλασμίδιο
2. 0,25 μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου
3. 0,25 μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ μεθανολικό εκχύλισμα σταφυλιών
4. 0,25 μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 100 μM 7bb
5. 0,25 μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 200 μM 7bb
6. 0,25 μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 300 μM 7bb
7. 0,25 μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 400 μM 7bb
8. 0,25 μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 500 μM 7bb

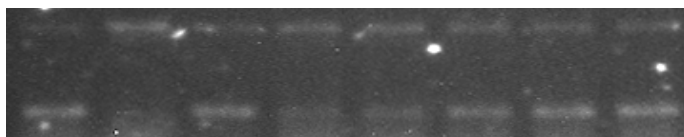
Εικόνα 33: Επίδραση του κλάσματος καθαρού μορίου 7bb στην ενεργότητα της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I σε συγκεντρώσεις 100, 200, 300, 400 και 500 μM



Γράφημα 6: Ποσοστά αναστολής στη δράση της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I από το μόριο 7bb σε συγκεντρώσεις 100, 200, 300, 400 και 500 μM

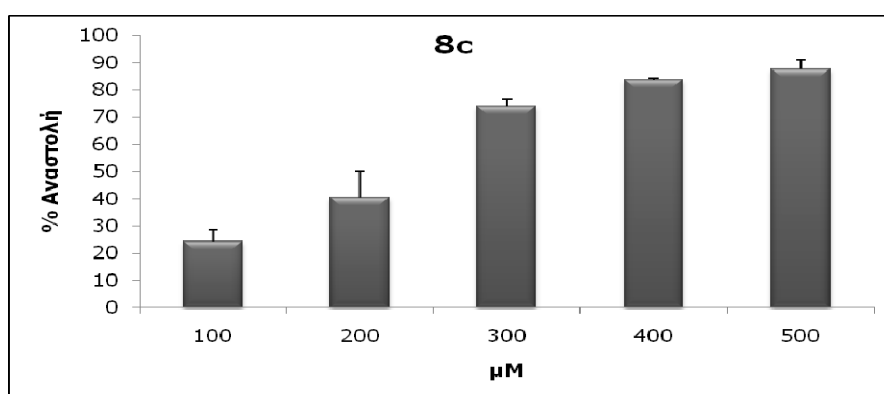
Καθαρό μόριο 8c

1 2 3 4 5 6 7 8



1. 0,25μg πλασμίδιο
2. 0,25μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου
3. 0,25μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 800μg/ml μεθανολικό εκχύλισμα σταφυλιών
4. 0,25μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 100μM 8c
5. 0,25μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 200μM 8c
6. 0,25μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 300μM 8c
7. 0,25μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 400μM 8c
8. 0,25μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 500μM 8c

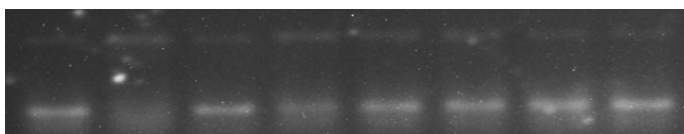
Εικόνα 34: Επίδραση του κλάσματος καθαρού μορίου 8c στην ενεργότητα της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I σε συγκεντρώσεις 100, 200, 300, 400 και 500 μM



Γράφημα 7: Ποσοστά αναστολής στη δράση της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I από το μόριο 8c σε συγκεντρώσεις 100, 200, 300, 400 και 500 μM

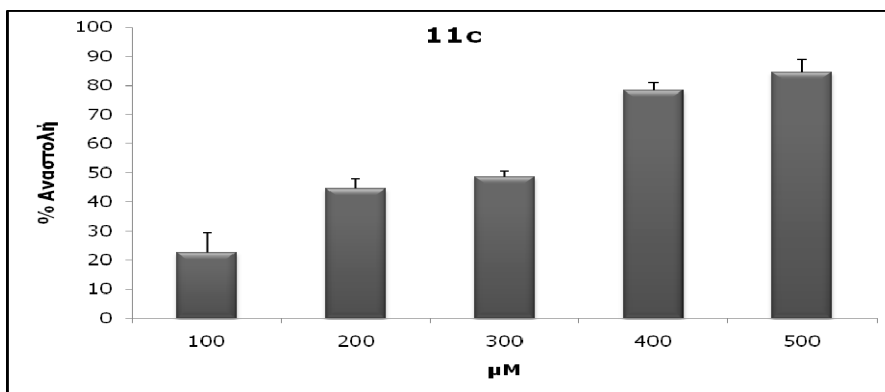
Καθαρό μόριο 11c

1 2 3 4 5 6 7 8



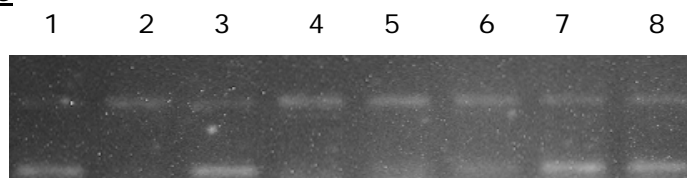
1. 0,25μg πλασμίδιο
2. 0,25μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου
3. 0,25μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 800μg/ml μεθανολικό εκχύλισμα σταφυλιών
4. 0,25μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 100μM 11c
5. 0,25μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 200μM 11c
6. 0,25μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 300μM 11c
7. 0,25μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 400μM 11c
8. 0,25μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 500μM 11c

Εικόνα 35: Επίδραση του κλάσματος καθαρού μορίου 11c στην ενεργότητα της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I σε συγκεντρώσεις 100, 200, 300, 400 και 500 μM



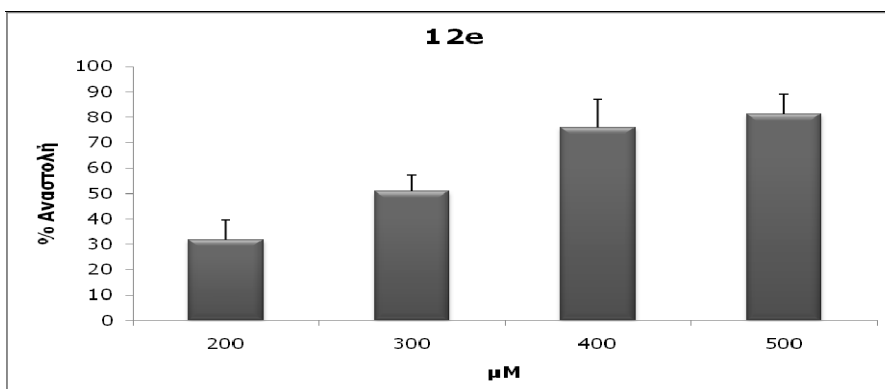
Γράφημα 8: Ποσοστά αναστολής στη δράση της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I από το μόριο 11c σε συγκεντρώσεις 100, 200, 300, 400 και 500 μM

Καθαρό μόριο 12e



1. 0,25 μg πλασμίδιο
2. 0,25 μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου
3. 0,25 μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ μεθανολικό εκχύλισμα σταφυλιών
4. 0,25 μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 100 μM 12e
5. 0,25 μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 200 μM 12e
6. 0,25 μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 300 μM 12e
7. 0,25 μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 400 μM 12e
8. 0,25 μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 500 μM 12e

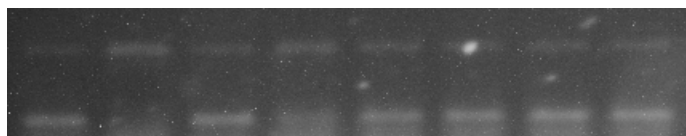
Εικόνα 36: Επίδραση του κλάσματος καθαρού μορίου 12e στην ενεργότητα της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I σε συγκεντρώσεις 100, 200, 300, 400 και 500 μM



Γράφημα 9: Ποσοστά αναστολής στη δράση της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I από το μόριο 12e σε συγκεντρώσεις 200, 300, 400 και 500 μM .

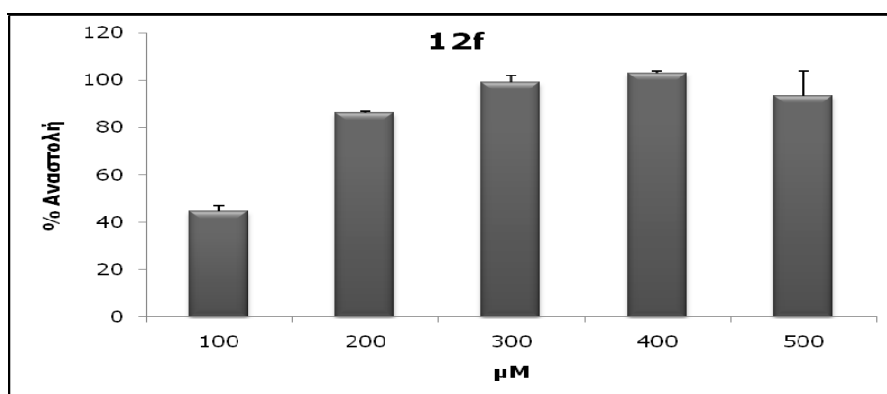
Καθαρό μόριο 12f

1 2 3 4 5 6 7 8



1. 0,25μg πλασμίδιο
2. 0,25μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου
3. 0,25μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 800μg/ml μεθανολικό εκχύλισμα σταφυλιών
4. 0,25μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 100μM 12f
5. 0,25μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 200μM 12f
6. 0,25μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 300μM 12f
7. 0,25μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 400μM 12f
8. 0,25μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 500μM 12f

Εικόνα 37: Επίδραση του κλάσματος καθαρού μορίου 12f στην ενεργότητα της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I σε συγκεντρώσεις 100, 200, 300, 400 και 500 μM

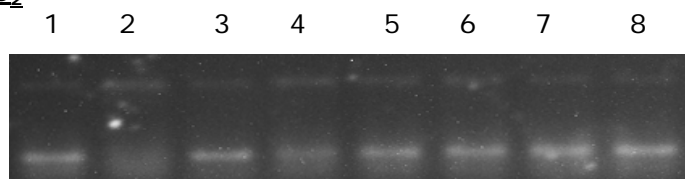


Γράφημα 10: Ποσοστά αναστολής στη δράση της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I από το μόριο 12f σε συγκεντρώσεις 100, 200, 300, 400 και 500 μM

3.5 Επίδραση στην ανθρώπινη τοποϊσομεράση I κλασμάτων καθαρών μορίων που απομονώθηκαν από το φυτό *Lotus edulis*

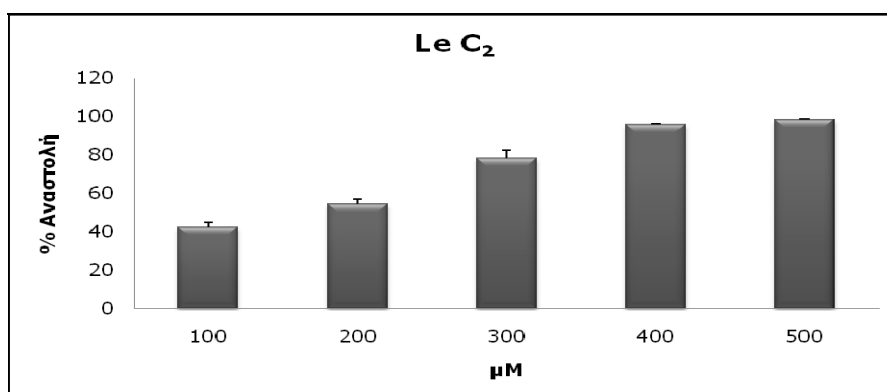
Από τα 3 κλάσματα καθαρών μορίων του φυτού *Lotus edulis* μόνο το κλάσμα Le C₂ εμφάνισε ικανότητα αναστολής της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I. Συγκεκριμένα, το Le C₂ αποτελεί ένα ισχυρό αναστολέα της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I, όπως υποδεικνύεται από την τιμή IC₅₀ (150 μM) και το μέγιστο ποσοστό αναστολής που φθάνει σε 100%.

Καθαρό μόριο LeC₂



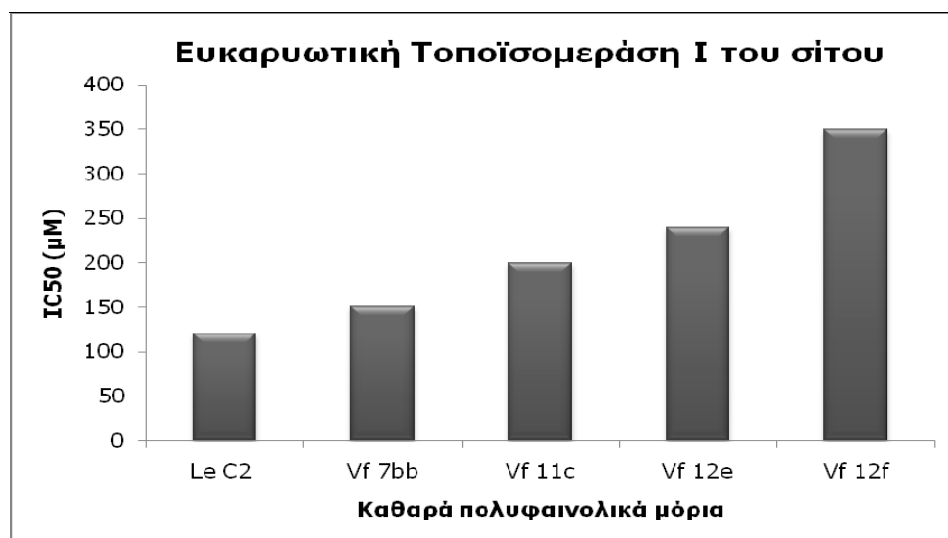
1. 0,25μg πλασμίδιο
2. 0,25μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου
3. 0,25μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 800μg/ml μεθανολικό εκχύλισμα σταφυλιών
4. 0,25μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 100μM Le C₂
5. 0,25μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 200μM Le C₂
6. 0,25μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 300μM Le C₂
7. 0,25μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 400μM Le C₂
8. 0,25μg πλασμίδιο + 1unit ενζύμου + 500μM Le C₂

Εικόνα 38: Επίδραση του κλάσματος καθαρού μορίου Le C₂ στην ενεργότητα της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I σε συγκεντρώσεις 100, 200, 300, 400 και 500 μM

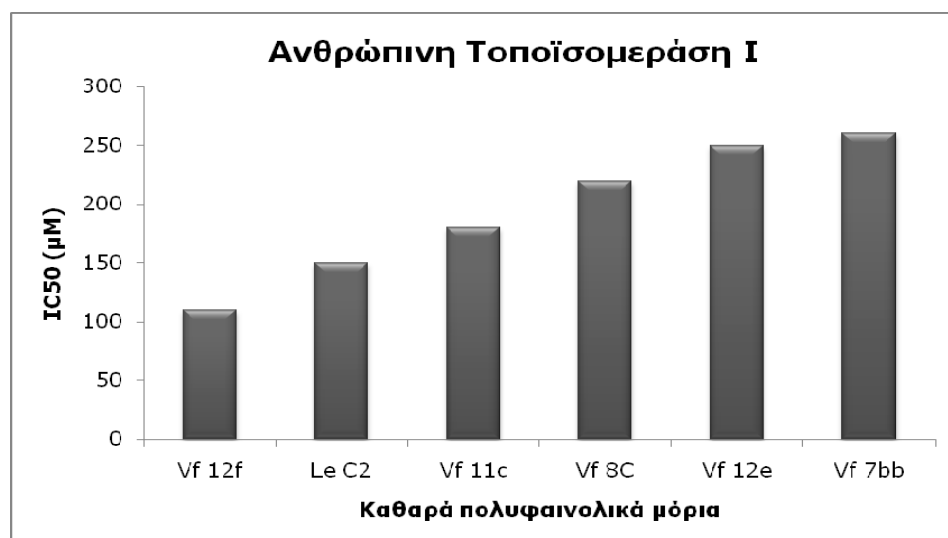


Γράφημα 11: Ποσοστά αναστολής στη δράση της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I από το μόριο LeC₂ σε συγκεντρώσεις 100, 200, 300, 400 και 500 μM

Παρακάτω παρατίθενται συνοπτικά σε γραφήματα οι τιμές IC_{50} που εμφανίζει κάθε καθαρό πολυφαινολικό μόριο για τα δύο ένζυμα.



Γράφημα 12: Τιμές IC_{50} των καθαρών πολυφαινολικών μορίων για την ευκαρυωτική τοποϊσομεράση I του σίτου



Γράφημα 13: Τιμές IC_{50} των καθαρών πολυφαινολικών μορίων για την ανθρώπινη τοποϊσομεράση I

4. Συζήτηση

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

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

Οι τοποϊσομεράσες αποτελούν απαραίτητα ένζυμα για την κυτταρική επιβίωση, καθώς συμμετέχουν σε διεργασίες μεταβολισμού του DNA, όπως η αντιγραφή, η μεταγραφή και η συμπύκνωση της χρωματίνης. Η συγκέντρωση των ενζύμων είναι χαμηλή στα κύτταρα σε φυσιολογικές συνθήκες, ενώ παρατηρείται αύξηση στην έκφρασή τους σε καρκινικά κύτταρα, καθώς αυτά τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται με γρήγορους ρυθμούς (Froelich-Ammon et al., 1995). Αυτή η παρατήρηση έχει οδηγήσει στην αναζήτηση αναστολέων των ενζύμων, με απώτερο σκοπό την πρόληψη της εξέλιξης του καρκίνου.

Οι γνωστοί φυτικοί αναστολείς των τοποϊσομερασών περιλαμβάνουν την καμπτοθεκίνη για την τοποϊσομεράση I και την ετοποσίδη για την τοποϊσομεράση II. Αρκετές μελέτες έχουν εξετάσει την ικανότητα διαφορετικών φυτικών πολυφαινολών να αναστέλλουν τη δράση των τοποϊσομερασών. Στόχος των ερευνών είναι η διαμόρφωση μιας διατροφής, η οποία θα περιέχει συστατικά με χημειοπροστατευτικές ιδιότητες με σκοπό την παρεμπόδιση ή την καταστολή της διαδικασίας της καρκινογένεσης.

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκε η επίδραση κλασμάτων καθαρών μορίων από φυτά της οικογένειας *Leguminosae* στην ενεργότητα δύο διαφορετικών τοποϊσομερασών, της τοποϊσομεράσης I του σίτου και της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I. Συνολικά μελετήθηκαν 10 κλάσματα καθαρών μορίων, από τα οποία τα 7 απομονώθηκαν από

μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού *Vicia faba* και τα 3 απομονώθηκαν από μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού *Lotus edulis*. Η ταυτοποίηση των κλασμάτων έδειξε ότι πρόκειται για πολυφαινολικές ενώσεις, οι οποίες στην πλειοψηφία τους αποτελούν γλυκοσίδια της καιμπφερόλης, εκτός από μία ένωση που είναι γλυκοσίδιο της κερκετίνης (Vf 5a) και μία ένωση που δεν ανήκει στα φλαβονοειδή (Vf 7b). Ως τώρα πάνω από 200 γλυκοσίδια καιμπφερόλης έχουν εντοπιστεί σε ποικίλες φυτικές πηγές (Crozier et al, 2006).

Στην παρούσα μελέτη ταυτοποιήθηκαν καταλυτικοί αναστολείς της τοποϊσομεράσης I. Από τα καθαρά μόρια του φυτού *Vicia faba* ταυτοποιήθηκαν 4 μόρια (12f, 12e, 7bb και 11c) ως καταλυτικοί αναστολείς και των δύο τοποϊσομερασών. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι τα μόρια αυτά παρουσιάζουν διαφορετική ικανότητα αναστολής ανάλογα με την τοποϊσομεράση. Ενδεικτικά, το μόριο 7bb, ενώ αποτελεί τον ισχυρότερο αναστολέα της τοποϊσομεράσης I του σίτου (IC_{50} 150 μ M), αποτελεί τον ασθενέστερο αναστολέα της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I (IC_{50} 260 μ M). Παρομοίως, το μόριο 12f παρουσίασε ισχυρή καταλυτική αναστολή της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I (IC_{50} 110 μ M), αλλά την ασθενέστερη καταλυτική αναστολή της τοποϊσομεράσης I του σίτου (IC_{50} 350 μ M). Άλλα μόρια εμφάνισαν παρόμοιες δυνατότητες αναστολής και των δύο ενζύμων. Ενδεικτικά το μόριο 11c αναστέλλει την τοποϊσομεράση I του σίτου με IC_{50} 200 μ M και την ανθρώπινη τοποϊσομεράση I με IC_{50} 180 μ M. Παρομοίως, το μόριο 12e αναστέλλει την τοποϊσομεράση I του σίτου με IC_{50} 240 μ M και την ανθρώπινη τοποϊσομεράση I με IC_{50} 250 μ M. Επιπλέον παρατηρήθηκε ότι η ανθρώπινη τοποϊσομεράση I αναστέλλεται από το μόριο 8c (IC_{50} 220 μ M), το οποίο όμως δεν αναστέλλει την τοποϊσομεράση του σίτου.

Σε προηγούμενες εργασίες τα φλαβονοειδή, όπως η κερκετίνη και η καιμπφερόλη καθώς και γλυκοσίδιά τους έχουν χαρακτηριστεί ως ισχυροί αναστολείς των τοποϊσομερασών I και II (Webb et al., 2004). Από τα αποτελέσματα ταυτοποιήθηκαν 5 κλάσματα που δρουν ως καταλυτικοί αναστολείς της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I. Επειδή τα κλάσματα που μελετήθηκαν αποτελούνται από καθαρές πολυφαινολικές ενώσεις είναι εφικτή η συσχέτιση των δομικών τους χαρακτηριστικών με την ιδιότητά τους να δρουν ως αναστολείς της τοποϊσομεράσης I. Οι διαφορές στην ανασταλτική δράση των μορίων μπορούν να αποδοθούν στην διαφορετική στερεοχημική διαμόρφωση, στον αριθμό και τη διαθεσιμότητα των υδροξυλομάδων, καθώς και στις θέσεις γλυκοσυλίωσης των υδροξυλομάδων και την δομή του σακχάρου. Όπως προαναφέρθηκε, οι ενώσεις των κλασμάτων είναι στην πλειοψηφία τους γλυκοσίδια καιμπφερόλης, οι οποίες παρά τη γλυκοσυλίωσή τους, φέρουν στη δομή τους χαρακτηριστικά που είναι σημαντικά για την ικανότητα των φλαβονοειδών να αναστέλλουν τη δραστηριότητα των τοποϊσομερασών. Συγκεκριμένα, φέρουν μια υδροξυλομάδα στον δακτύλιο B (C4'), μια υδροξυλομάδα στη θέση C3 και C7 του βασικού ανθρακικού σκελετού των φλαβονοειδών και διπλό δεσμό μαζί με την οξο-θέση στη γέφυρα του πυρανικού δακτυλίου C, τα οποία καθιστούν τα φλαβονοειδή ισχυρούς αναστολείς των τοποϊσομερασών (Constantinou et al., 1995). Όλα

τα μόρια που δρουν ως αναστολείς της τοποϊσομεράσης I αποτελούν γλυκοσίδια της καιμπφερόλης και διαθέτουν τα προαναφερθέντα χαρακτηριστικά. Το μόριο Vf 7b, που δεν ανέστειλε την τοποϊσομεράση I, δεν ανήκει στα φλαβονοειδή. Επίσης, το μόριο Vf 5a, που αποτελεί γλυκοσίδιο της κερκετίνης, δεν ανέστειλε την τοποϊσομεράση I. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η κερκετίνη αποτελεί ισχυρό αναστολέα των τοποϊσομερασών I και II και συγκεκριμένα κατατάσσεται στους καταστολείς-δηλητήρια (poisons). Η κερκετίνη σχηματίζει ένα τριμερές σύμπλοκο με την τοποϊσομεράση και την αλυσίδα του DNA, και με τον τρόπο αυτό σταθεροποιεί το παροδικό σύμπλοκο ενζύμου-DNA και εμποδίζει την επανένωση των αλυσίδων του DNA, μια απαραίτητη διαδικασία στην καταλυτική δράση της τοποϊσομεράσης. Η ικανότητα της κερκετίνης να σταθεροποιεί το παροδικό σύμπλεγμα της τοποϊσομεράσης I με το DNA εξαρτάται από τα δομικά της χαρακτηριστικά και συγκεκριμένα απαιτεί υδροξυλικές υποκαταστάσεις στις θέσεις 5 και 7 του φαινολικού δακτυλίου. Το μόριο Vf 5a έχει σάκχαρα συνδεδεμένα στις υδροξυλικές ομάδες του C3 και C7 και είναι πιθανό η παρουσία των σακχάρων να εμποδίζει την ικανότητα αναστολής της τοποϊσομεράσης. Εναλλακτικά το γεγονός ότι το μόριο Vf 5a δεν παρουσίασε ανασταλτική δράση μπορεί αν οφείλεται στο πειραματικό πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε στην παρούσα μελέτη, το οποίο επιτρέπει την ταυτοποίηση καταλυτικών αναστολέων της τοποϊσομεράσης I και διαφέρει σημαντικά από το πειραματικό πρωτόκολλο που εφαρμόζεται για την αναζήτηση καταστολέων που λειτουργούν ως δηλητήρια (poisons) των τοποϊσομερασών.

Όλα τα καθαρά μόρια που απομονώθηκαν από το εκχύλισμα του φυτού *Lotus edulis* αποτελούν γλυκοσίδια καιμπφερόλης. Το μόριο Le C₂ έδειξε την μέγιστη αναστολή, τόσο της τοποϊσομεράσης I του σίτου, με τιμή IC₅₀ 120 μM, όσο και της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I, με τιμή IC₅₀ 150 μM. Αντιθέτως, τα μόρια Le D₃ και Le D₆ δεν παρουσίασαν αναστολή των ευκαρυωτικών τοποϊσομερασών. Το μόριο Le C₂ διαφέρει από το Le D₆ ως προς μια ακετυλομάδα και από το Le D₃ ως προς το σάκχαρο που είναι συνδεδεμένο στην υδροξυλομάδα στη θέση του C3. Φαίνεται ότι τα δομικά χαρακτηριστικά που φέρει το μόριο Le C₂ το καθιστούν πιο αποτελεσματικό αναστολέα της τοποϊσομεράσης I.

Γενικά, η διαφορετική επίδραση των μορίων στην δράση της τοποϊσομεράσης I οφείλεται στην διαφορετική δομή τους, με αποτέλεσμα να διαφέρει ο μηχανισμός αλληλεπίδρασης του κάθε μορίου με το ένζυμο. Όμως είναι ιδιαίτερα σημαντικό το γεγονός ότι κάποια από τα πολυφαινολικά καθαρά μόρια που εξετάστηκαν είναι ικανά να αναστέλλουν και τα δύο ένζυμα, εμφανίζοντας μάλιστα δόσοεξαρτώμενη αναστολή. Η κοινή αναστολή των τοποϊσομερασών υποδηλώνει τις ομοιότητες που μοιράζονται τα δύο ένζυμα, καθώς και τα δύο προέρχονται από ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Επιπλέον αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι το μόριο Le C₂ από το φυτό *Lotus edulis* αποτελεί τον ισχυρότερο αναστολέα και των δύο ενζύμων με παρόμοιες τιμές IC₅₀. Συνεπώς, θα ήταν σημαντική η

περαιτέρω μελέτη και η ταυτοποίηση των δομικών περιοχών της ένωσης Le C₂ που συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση με τις ευκαρυωτικές τοποϊσομεράσες.

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι το μόριο Le C₂ εμφανίζει ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα (εξουδετέρωση της ελεύθερης ρίζας DPPH[•]), καθώς και προστατευτική δράση ενάντια σε μονόκλινα σπασίματα που προκαλούνται στο DNA από ελεύθερες ρίζες (OH[•] και ROO[•]). Επιπλέον, διαθέτει και ισχυρή αντιμεταλλαξιγόνο δράση, η οποία ταυτοποιήθηκε με αναστολή της μεταλλαξιγένεσης που επάγεται από μπλεομυκίνη σε βακτηριακά στελέχη *Salmonella typhimurium* (Spanou et al., 2008). Οι προαναφερθείσες ιδιότητες καθιστούν το μόριο Le C₂ σημαντικό αντικαρκινικό παράγοντα.

Η ικανότητα των μορίων να αναστέλλουν τη δράση της ευκαρυωτικής τοποϊσομεράσης I του σίτου και της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I, τα καθιστά σημαντικούς χημειοπροστατευτικούς παράγοντες και πιθανούς αντικαρκινικούς παράγοντες. Ως αντικαρκινικοί παράγοντες τα πολυφαινολικά μόρια μπορούν να επέμβουν και να αναστείλουν ή ακόμα και να διακόψουν τη διαδικασία της καρκινογένεσης, ενώ ως χημειοπροστατευτικοί παράγοντες μπορούν να βοηθήσουν στη διαμόρφωση της κατάλληλης διατροφής, η οποία θα συμβάλλει στην πρόληψη του καρκίνου. Κατά συνέπεια, με τα υπάρχοντα δεδομένα διευρύνονται οι τωρινές προοπτικές για την αντιμετώπιση του καρκίνου, που αφορά τόσο την πρόληψη όσο και θεραπεία του. Σε επόμενο στάδιο σημαντική είναι η μελέτη της επίδρασης των ενώσεων στην ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό διαφορετικών καρκινικών κυττάρων και περαιτέρω σε μελέτες βιοδιαθεσιμότητας σε ζωντανούς οργανισμούς.

Βιβλιογραφία

- Bandele O. J., Clawson S. J., Osheroff N., (2008), Dietary polyphenols as Topoisomerase II poisons: B-ring and C-ring substituents determine the mechanism of enzyme-mediated DNA cleavage enhancement, *American Chemistry Society*
- Berger J. M., Fass D., Wang J. C., Harrison S. C. (1998), Structural similarities between topoisomerases that cleave one or both DNA strands, *National Academy of Sciences*, **95**:7876-7881
- Boege F., Straub T., Kehr A., Boesenberg C., Christiansen K., Andersen A., Jakob F., Kohrle J., (1996), Selected novel flavones inhibit the DNA binding or the religation step of eucaryotic topoisomerase I, *Journal of Biological Chemistry*, **271**: 2262-2270
- Cairns J., (1975), Mutation selection and the natural history of cancer, *Nature*, **255**: 197-200
- Cantero G., Campanella C., Mateos S., Cortés F., (2006), Topoisomerase II inhibition and high yield of endoreduplication induced by the flavonoids luteolin and quercetin *Mutagenesis*, **21**: 321-325
- Carlo G. D., Mascolo N., Izzo A., Capasso F., (1999), Flavonoids : Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs, *Life Sciences*, **4**:337-353
- Chowdhury A. R., Sharma S., Mandal S., Goswami A., Mukhopadhyay S., Majumder H. K., (2002), Luteolin, an emerging anti-cancer flavonoid, poisons eukaryotic DNA topoisomerase I, *Biochemical Society*, **366**: 653-661
- Constantinou A., Mehta R., Runyan C., Rao K., Vaughan A., Moon R., (1995), Flavonoids as DNA topoisomerases antagonists and poisons: structure-activity relationships, *Journal of Natural Products*, **58**: 217-225
- Crozier A., Jaganath I.B., Clifford M.N. (2009) Dietary phenolics: Chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat Prod Reports* **26**: 1001-1043.
- Cummings J., Smyth J. F., (1993), DNA topoisomerase I and II as targets for rational design of new anticancer drugs, *Annals of Oncology*, **4**: 533-543
- D' Archivio M., Santangelo C., Scazzocchio B., Vari R., Filesi C., Masella R., Giovannini C., (2008), Modulatory Effects of Polyphenols on Apoptosis Induction: Relevance for Cancer Prevention, *International Journal of Molecular Sciences*, **9**: 213-228
- Finkel T., Holbrook N. J., (2000), Oxidants, oxidative stress and the biology of aging, *Nature*, **408**: 239-247
- Fortune J. M., Osheroff N., (1998), Merbarone inhibits the catalytic activity of human topoisomerase II α by blocking DNA cleavage, *The Journal of Biological Chemistry*, **273**: 17643-17650
- Frei B., Higdon J. V., (2003), Antioxidant Activity of Tea Polyphenols In Vivo: Evidence from Animal Studies, *The Journal of Nutrition* **133**: 3275S-3284S

- Froelich-Ammon S. J., Osheroff N., (1995), Topoisomerase poisons: Harnessing the dark side of enzyme mechanism, *The Journal of Biochemical Chemistry*, **270**: 21429-21432
- Habermeyer M., Fritz J., Barthelmes H. U., Christensen M. O., Larsen M. K., Boege F., Marko D., (2005), Anthocyanidins modulate the activity of human DNA topoisomerases I and II and affect cellular DNA integrity, *American Chemical Society*, **18**: 1395-1404
- Halliwell B., Gutteridge J. M.C., (1998), Free radicals in biology and medicine, Third edition, Oxford science Publications,.
- Halliwell B., (2001), Free radicals and other reactive species in disease, *Encyclopedia of life sciences*, pages, 1-7.
- Heim K. E., Tagliaferro A. R., Bobilya D. J., (2002), Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships, *Journal of Nutritional Biochemistry*, **13**: 572-584
- Hennings H., Shores R., Wenk M. L., Spangler E. F., Tarone R., Yuspa S. H., (1983), Malignant conversion of mouse skin tumours is increased by tumour initiators and unaffected by tumour promoters, *Nature*, **304**: 67-69
- Kwon K. H., Barve A., Yu S., Huang M. T., Kong A. N. T., (2007), Cancer chemoprevention by phytochemicals: potential molecular targets, biomarkers and animal models, *Acta Pharmacologica Sinica ISSN*, **28** (9): 1409–1421
- Leppard J. B., Champoux J. J., (2005), Human DNA topoisomerase I: relaxation, roles and damage control, *Chromosoma*, **114**: 74-85
- Madar Z., Stark A., (2002), New legume sources as therapeutic agents, *British Journal of Nutrition*, **88**:287-292
- McClendon A. K., Osheroff N., (2007), DNA Topoisomerase II, Genotoxicity, and Cancer, *National Institute of Health*, **623**: 83-97
- Messina M., (1999), Legumes and soy beans: overview of their nutritional profiles and health effects, *American Society for Clinical Nutrition*, **70**:439-450
- Nitiss J. L., (2009), DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions, *National Institute of Health*, **5**: 327–337
- Pommier Y., (1998), Diversity of DNA topoisomerases I and inhibitors, *Biochimie*, **80**: 255-270
- Pommier Y., Pourquier P., Fan Y., Strumberg D., (1998), Mechanism of action of eukaryotic DNA topoisomerase I and drugs targeted to the enzyme, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1400**: 83-106
- Pommier Y., (2009), DNA Topoisomerase I Inhibitors: Chemistry, Biology and Interfacial Inhibition, *National Institute of Health*, **109**(7): 2894–2902
- Ray A., (2005), Cancer preventive role of selected dietary factors, *Indian Journal of cancer*, **42**: 15-24

- Rigas B., Sun Y., (2008), Induction of oxidative stress as a mechanism of action of chemopreventive agents against cancer, *British Journal of Cancer*, **98**: 1157–1160
- Rothenberg M. L., (1997), Topoisomerase I inhibitors: Review and update, *Annals of Oncology*, **8**: 837-855
- Saleem M., Kim H. J., Alic M. S., Lee Y. S., (2005), An update on bioactive plant lignans, *Nat. Prod. Rep.*, **22**: 696–716
- Scalbert A., Manach C., Morand C., Remesy C., (2005), Dietary polyphenols and the prevention of diseases, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **45**: 287-306
- Spanou C., Bourou G., Dervishi A., Aligiannis N., Angelis A., Komiotis D., Skaltsounis A. L., Kouretas D., (2008), Antioxidant and chemoprotective properties of polyphenolic compounds derived from Greek legume plant extracts, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**: 6967-6976
- Stagos D., Karaberis E., Kouretas D., (2005), Assessment of antioxidant/anticarcinogenic activity of plant extracts by a combination of molecular methods, *in vivo*, **19**: 741-748
- Sun S. Y., Hail N. Jr, Lotan R., (2004), Apoptosis as a novel target for cancer chemoprevention. *J Natl Cancer Inst*, **96**: 662-672
- Syed D. N., Khan N., Afaq F., Mukhtar H., (2007), Chemoprevention of Prostate Cancer through Dietary Agents: Progress and Promise, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, **16** (11): 2193-203
- Trosko J. E., Chang C. C., Medcalf A., (1983), Mechanisms of tumor promotion: potential role of intercellular communication, *Cancer invest*, **6**: 511-526
- Trosko J. E., Chang C. C., (1989), Stem cell theory of carcinogenesis, *Toxicol lett*, **49**: 283-295
- Tsao A. S., Kim E. S., Hong W.Ki, (2004), Chemoprevention of Cancer , *CA A Cancer Journal for Clinicians*, **54**: 150–180
- Wang H., Morris-Natschke S., Lee K., (1997), Recent advances in the discovery and development of topoisomerase inhibitors as antitumor agents, *Medicinal Researches Reviews*, **17**: 367-425
- Wang J. C., (1996), DNA Topoisomerases, *Annual Reviews of Biochemistry*, **65**: 635-92
- Wang J. C., (2002), Cellular roles of DNA Topoisomerases: a molecular perspective, *Nature Publishing*, **3**: 430-440
- Wattenberg LW. Chemoprevention of cancer, (1985). *Cancer Res* **45**: 1-8
- Webb A., McCullough M., (2005), Dietary lignans: Potential role in cancer prevention, *Nutrition and Cancer*, **51**: 117-131
- Webb M. R., Ebeler S. E., (2003), A gel electrophoresis assay for the simultaneous determination of topoisomerase I inhibition and DNA intercalation, *Analytical Biochemistry*, **321**: 22-30

- Webb M. R., Ebeler S. E., (2004), Comparative analysis of topoisomerase IB inhibition and DNA intercalation by flavonoids and similar compounds: structural determinates of activity, *Biochem. J.*, **384**: 527–541
- Xia E. Q., Deng G. F., Guo Y. J., Li H. B., (2010), Biological Activities of Polyphenols from Grapes, *International Journal of Molecular Sciences*, **11**: 622-646
- Λουκίδης Σ. Θ. (2007), Οξειδωτικό στρες και ο έλεγχος του στον πνεύμονα, *Πνεύμων*, **20**: 285-288
- www.livepedia
- www.minagric.gr
- www.pfaf.org
- www.wikipedia.com
- www.worldlingo.com