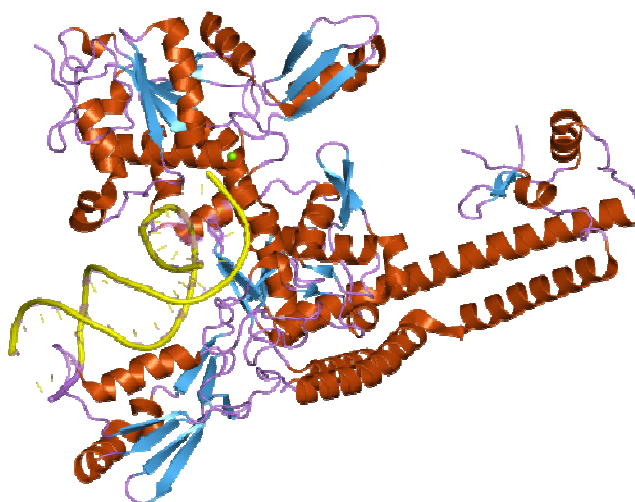




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Διπλωματική εργασία

*Επίδραση κλασμάτων καθαρών πολυφαινολικών μορίων από
εκχυλίσματα ψυχανθών στην ενεργότητα της ανθρώπινης
τοποϊσομεράσης II*



Παπαχρήστου Ευαγγελία

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Καλλιόπη Λιαδάκη

Λάρισα 2010

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή	Υπογραφή Παραλαβής
Λιαδάκη Καλλιόπη, Λέκτορας Βιοχημικής Φαρμακολογίας	
Κουρέτας Δημήτριος, Καθηγητής Φυσιολογίας	
Στάγκος Δημήτριος, Λέκτορας Φυσιολογίας Ζωϊκών οργανισμών	

Στοιχεία πτυχιακής εργασίας

Το πειραματικό μέρος της πτυχιακής εργασίας με τίτλο, *«Επίδραση κλασμάτων καθαρών πολυφαινολικών μορίων από εκχυλίσματα ψυχανθών στην ενεργότητα της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης II»* πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζώων του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη της Λέκτορος Κ. Λιαδάκη.

Μέλη τριμελούς επιτροπής: Κ. Λιαδάκη

Δ. Κουρέτας

Δ. Στάγκος

Ευχαριστίες

Θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω την κ. Καλλιόπη Λιαδάκη, Λέκτορα του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την ανάθεση της πτυχιακής μου εργασίας, για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα ενδιαφέρον θέμα που μου πρόσφερε νέες και πολύτιμες γνώσεις για την περαιτέρω πορεία μου, καθώς και για την καθοδήγηση και υπομονή της.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον κ. Δημήτρη Κουρέτα, Καθηγητή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, που μου έδωσε την ευκαιρία να πραγματοποιήσω το πειραματικό μέρος της πτυχιακής μου εργασίας στο εργαστήριο του, καθώς και στους διδάκτορες Χρύσα Σπανού και Άρη Βεσκούκη και στον Λέκτορα κ. Δημήτρη Στάγκο για την προθυμία τους να απαντούν σε όλες τις απορίες μου κατά τη διάρκεια διεκπεραίωσης της διπλωματικής μου εργασίας. Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω την προπτυχιακή φοιτήτρια Μαρία Τσελέπη για την πολύτιμη βοήθεια της κατά τη διάρκεια του πειραματικού μέρους.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την ομάδα του εργαστηρίου για το ιδιαίτερο φιλικό κλίμα που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο και για την πολύ καλή συνεργασία.

Περιεχόμενα

Περίληψη	11
1. Εισαγωγή	12
1.1 Ψυχανθή	12
1.2 Πολυφαινόλες	14
1.2.1 Χαρακτηριστικά πολυφαινολών	14
1.2.2 Φαινολικά οξέα	15
1.2.3 Φλαβονοειδή	16
1.2.4 Ανθοκυανίνες	19
1.2.5 Στιλβένια	20
1.2.6 Λιγνάνες	20
1.3 Χημειοπροστασία και καρκίνος	22
1.3.1 Καρκίνος	22
1.3.2 Χημειοπροστασία	23
1.4 Πολυφαινόλες και χημειοπροστασία	24
1.4.1 Αντικαρκινική δράση	24
1.4.2 Αντιοξειδωτική δράση	26
1.4.2.1 Ελεύθερες ρίζες	27
1.4.2.2 Αντιοξειδωτικοί παράγοντες	29
1.5 Τοποϊσομεράσες	30
1.5.1 Είδη τοποϊσομερασών	30
1.5.2 DNA Τοποϊσομεράση I	32
1.5.2.1 Χαρακτηριστικά του ενζύμου	32
1.5.2.2 Δομή του ενζύμου	33
1.5.3. DNA Τοποϊσομεράση II	34
1.5.3.1 Δράση του ενζύμου	34
1.5.3.2 Δομή του ενζύμου	35
1.5.3.3 Βιολογικές λειτουργίες της DNA τοποϊσομεράσης II	37
1.5.4 Μηχανισμός δράσης της τοποϊσομεράσης II	41
1.5.4.1 Διάσπαση του DNA	41
1.5.4.2 Μηχανισμός τοποϊσομεράσης II	42
1.5.4.3 Μηχανισμός δράσης της DNA γυράσης	44

1.5.5 Τοποϊσομεράσες και καρκίνος	45
1.5.5.1 Οι τοποϊσομεράσες ως στόχοι αντικαρκινικών φαρμάκων	45
1.5.5.2 Ανθεκτικότητα καρκινικών κυττάρων στους αναστολείς της τοποϊσομεράσης	46
1.6 Αναστολείς τοποϊσομερασών	49
1.6.1 Δύο τάξεις αναστολέων	49
1.6.2 Καταλυτικοί αναστολείς	50
1.6.3 Δηλητήρια τοποϊσομεράσης (topoisomerase poisons)	50
1.6.4 Σχηματισμός του συμπλόκου τοποϊσομεράση-φάρμακο-DNA	53
1.6.5 Ανάλυση των θέσεων διάσπασης του DNA από τους αναστολείς	54
1.6.6 Ταξινόμηση αναστολέων	55
1.6.7 Ανθεκτικότητα και υπερευαισθησία των ενζύμων στη δράση των αναστολέων	58
1.7 Πολυφαινόλες ως αναστολείς τοποϊσομερασών	58
1.7.1 Αναστολή των τοποϊσομερασών από διάφορα πολυφαινολικά μόρια	58
1.8 Σκοπός	61
2. Υλικά και μέθοδοι	63
2.1 Υλικά	63
2.1.1 Εκχυλίσματα και κλάσματα καθαρών μορίων	63
2.1.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA	63
2.1.3 Topoisomerase II relaxation assay	64
2.1.4 Ηλεκτροφόρηση πλασμιδιακού DNA	64
2.2 Μέθοδοι	65
2.2.1 Αρχή της μεθόδου	65
2.2.2. Πειραματική διαδικασία	67
2.2.2.1 Διαδικασία απομόνωσης των φυτικών εκχυλισμάτων	67
2.2.2.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA	67
2.2.2.3 Topoisomerase II relaxation assay	69
2.2.3 Υπολογισμοί	70
3. Αποτελέσματα	72
3.1 Επίδραση κλασμάτων φυτών της οικογένειας <i>Leguminosae</i> στη δράση της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης II.	72
3.2 Επίδραση του κλάσματος Le C ₂ στη δράση της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης II	74
3.3 Επίδραση του κλάσματος Le D ₆ στη δράση της ανθρώπινης	

τοποϊσομεράσης II	76
3.4 Επίδραση του κλάσματος Vf 12e στη δράση της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης II	77
3.5 Επίδραση του κλάσματος Vf 12f στη δράση της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης II	78
4. Συζήτηση	80
Βιβλιογραφία	84

Περιεχόμενα Εικόνων

<i>Εικόνα 1:</i> Ψυχανθή που καταναλώνονται παγκοσμίως	12
<i>Εικόνα 2:</i> Δομές φαινολικών οξέων	15
<i>Εικόνα 3:</i> Βασικός σκελετός των φλαβονοειδών	18
<i>Εικόνα 4:</i> Χημική δομή των ανθοκυανινών	19
<i>Εικόνα 5:</i> Χημικές δομές της ρεσβερατρόλης	20
<i>Εικόνα 6:</i> Χημική δομή φυτικών λιγνάνων και των ζωϊκών παραγώγων τους	21
<i>Εικόνα 7:</i> Στάδια καρκινογένεσης	23
<i>Εικόνα 8:</i> Απόκριση σε χημειοπροστατευτικούς παράγοντες	24
<i>Εικόνα 9:</i> Δράση των ελευθέρων ριζών	28
<i>Εικόνα 10:</i> Δράση αντιοξειδωτικών μηχανισμών	29
<i>Εικόνα 11:</i> Δομή DNA τοποϊσομεράσης I	34
<i>Εικόνα 12:</i> Δράση DNA τοποϊσομεράσης II	34
<i>Εικόνα 13:</i> Δομή DNA τοποϊσομεράσης II	37
<i>Εικόνα 14:</i> Ρόλος της DNA τοποϊσομεράσης II στην αντιγραφή	39
<i>Εικόνα 15:</i> Ρόλος της DNA τοποϊσομεράσης II στην μεταγραφή	40
<i>Εικόνα 16:</i> Διάσπαση του DNA	42
<i>Εικόνα 17:</i> Μηχανισμός δράσης της τοποϊσομεράσης II	43
<i>Εικόνα 18:</i> Μηχανισμός δράσης της DNA γυράσης	44
<i>Εικόνα 19:</i> Δομή συγκεκριμένων δηλητηρίων τοποϊσομεράσης	51
<i>Εικόνα 20:</i> Μηχανισμός κυτταροτοξικότητας των δηλητηρίων τοποϊσομεράσης	52
<i>Εικόνα 21:</i> Σχηματισμός του συμπλόκου τοποϊσομεράση-φάρμακο-DNA	54
<i>Εικόνα 22:</i> Χημικές δομές παραγώγων καμπτοθεκίνης	55
<i>Εικόνα 23:</i> Φυτό <i>Vicia faba</i>	62
<i>Εικόνα 24:</i> Φυτό <i>Lotus edulis</i>	62
<i>Εικόνα 25:</i> Διαμορφώσεις του πλασμιδιακού DNA	66
<i>Εικόνα 26:</i> Απομόνωση πλασμιδίου	69
<i>Εικόνα 27:</i> Δομές φαινολικών μορίων που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία	72
<i>Εικόνα 28:</i> Επίδραση των κλασμάτων καθαρών μορίων των φυτών <i>L. edulis</i> και <i>V. faba</i> στην δράση της τοποϊσομεράσης II σε συγκεντρώσεις 600 μM και 1000 μM	74
<i>Εικόνα 29:</i> Επίδραση του φυτικού κλάσματος Le C ₂ (100, 200, 300, 400, 500, 600 μM) στην δράση της τοποϊσομεράσης II	74

<i>Εικόνα 30:</i> Επίδραση του φυτικού κλάσματος Le D ₆ (200, 400, 600, 800 μM) στην δράση της τοποϊσομεράσης II	76
<i>Εικόνα 31:</i> Επίδραση του φυτικού κλάσματος Vf 12e (400, 600, 800, 1000 μM) στην δράση της τοποϊσομεράσης II	77
<i>Εικόνα 32:</i> Επίδραση του φυτικού κλάσματος Vf 12f (400, 600, 800, 1000 μM) στην δράση της τοποϊσομεράσης II	79

Περιεχόμενα Πινάκων

<i>Πίνακας 1:</i> Πρωτεΐνες ψυχανθών	14
<i>Πίνακας 2:</i> Διάκριση φλαβονοειδών	17
<i>Πίνακας 3:</i> Υποοικογένειες των DNA τοποϊσομερασών	32
<i>Πίνακας 4:</i> Κυτταρικές σειρές με ανθεκτικότητα στους αναστολείς των τοποϊσομερασών	48
<i>Πίνακας 5:</i> Ιδιότητες νέων αναστολέων των τοποϊσομερασών I και II στα θηλαστικά	57
<i>Πίνακας 6:</i> Επιδράσεις φλαβονοειδών στην δράση των τοποϊσομερασών	60
<i>Πίνακας 7:</i> Χαρακτηρισμός των ψυχανθών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη	63
<i>Πίνακας 8:</i> 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>	73

Περιεχόμενα Γραφημάτων

<i>Γράφημα 1:</i> Ποσοστά αναστολής στην δράση της τοποϊσομεράσης II από το μόριο Le C ₂ (200, 300, 400, 500, 600 μM).	75
<i>Γράφημα 2:</i> Ποσοστά αναστολής στην δράση της τοποϊσομεράσης II από το μόριο Le D ₆ (400, 600, 800 μM)	77
<i>Γράφημα 3:</i> Ποσοστά αναστολής στην δράση της τοποϊσομεράσης II από το μόριο Vf 12e (400, 600, 800, 1000 μM)	78
<i>Γράφημα 4:</i> Ποσοστά αναστολής στην δράση της τοποϊσομεράσης II από το μόριο Vf 12f (400, 600, 800, 1000 μM).	79

Περίληψη

Τα ψυχανθή ανήκουν στην οικογένεια φυτών *Leguminosae*, που αποτελεί μία ομάδα δικοτυλήδων φυτών με υψηλή διατροφική και οικονομική αξία. Περιέχουν σημαντικές ποσότητες φυτοχημικών μορίων, όπως φαινολικά οξέα, λιγνάνες και ισοφλαβονοειδή, τα οποία έχει βρεθεί ότι ασκούν χημειοπροστατευτική και αντιοξειδωτική δράση. Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η επίδραση εκχυλισμάτων που απομονώθηκαν από τα ψυχανθή *Vicia faba* και *Lotus edulis* στην ενεργότητα της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης II. Η τοποϊσομεράση II είναι ένα ένζυμο που καταλύει τοπολογικές αλλαγές στο DNA και είναι απαραίτητη για την αντιγραφή, τη μεταγραφή και τον ανασυνδυασμό του DNA. Επίσης παίζει σημαντικό ρόλο στην δομή, τη συμπύκνωση, αποσυμπύκνωση και τον διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων. Η τοποϊσομεράση II αποτελεί στόχο για μερικά από τα πιο γνωστά αντικαρκινικά φάρμακα, καθώς εμφανίζεται σε αυξημένες συγκεντρώσεις σε καρκινικά κύτταρα. Συνολικά μελετήθηκαν δέκα καθαρά μόρια, πλούσια σε πολυφαινόλες, που απομονώθηκαν από μεθανολικά εκχυλίσματα του φυτού *L. edulis* και του φυτού *V. faba*. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι δύο μόρια από το φυτό *L. edulis* και δύο από το φυτό *V. faba*, δρουν ως καταλυτικοί αναστολείς της τοποϊσομεράσης II. Επιπλέον υπολογίσθηκαν οι τιμές IC_{50} του κάθε μορίου για την ανθρώπινη τοποϊσομεράση II. Η ικανότητα αυτών των καθαρών μορίων να αναστέλλουν την καταλυτική δραστηριότητα της τοποϊσομεράσης II τα καθιστά ως πιθανούς αντικαρκινικούς παράγοντες, δημιουργώντας μελλοντικές προοπτικές στην θεραπεία του καρκίνου.

1. Εισαγωγή

1.1 Ψυχανθή

Τα ψυχανθή είναι η πιο σημαντική οικογένεια των δικοτυλήδονων με υψηλή οικονομική αξία. Περιλαμβάνουν περισσότερα από 18.000 είδη, τα οποία ταξινομούνται σε 650 γένη και είναι μία από τις σημαντικότερες ομάδες φυτών στην ανθρώπινη διατροφή, με χαρακτηριστικά παραδείγματα τα φασόλια, τη σόγια, τις φακές και τα μπιζέλια (*Εικόνα 1*) (Duranti, 2005). Μορφολογικά τα ψυχανθή χαρακτηρίζονται από ισχυρό πασαλώδες ριζικό σύστημα με πολυάριθμες διακλαδώσεις. Τόσο στην κύρια ρίζα, όσο και στις διακλαδώσεις παρατηρούνται εξογκώσεις που ονομάζονται φυμάτια και των οποίων ο σχηματισμός οφείλεται στην συμβιωτική δράση των αζωτοβακτηρίων του γένους *Rhizobium*, τα οποία έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν ατμοσφαιρικό άζωτο και να το αποδίδουν στα φυτά σε άμεσα αφομοιώσιμη μορφή (www.minagric.gr).



Εικόνα 1: Ψυχανθή που καταναλώνονται παγκοσμίως

Τα ψυχανθή καλλιεργούνται σε ευρεία κλίμακα λόγω της υψηλής τους διατροφικής αξίας, αλλά και επειδή χρησιμοποιούνται στην ξυλεία, στην ιατρική, ενώ αποτελούν και πηγή ουσιών που δρουν ως εντομοκτόνα. Διαθέτουν υψηλή διατροφική αξία που αποδίδεται κυρίως στο περιεχόμενό τους σε πρωτεΐνες, οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο σε φυσιολογικές λειτουργίες που έχουν επίδραση στην ανθρώπινη υγεία (*Πίνακας 1*), ενώ αποτελούν και πηγές απαραίτητων αμινοξέων, όπως είναι η λυσίνη. Οι πρωτεΐνες αντιπροσωπεύουν περίπου το 20% του ξηρού

βάρους στα φασόλια και στα μπιζέλια και πάνω από 40% στη σόγια. Τα ψυχανθή είναι η πιο πλούσια πηγή τροφής σε πρωτεΐνες και αμινοξέα για τον άνθρωπο και τα ζώα και αποτελούν την μοναδική πηγή πρωτεϊνών σε πολλές χώρες παγκοσμίως (Duranti, 2005).

Επιπλέον, τα ψυχανθή έχουν ευεργετικές επιδράσεις σε χρόνιες ασθένειες, όπως σε συγκεκριμένους τύπους καρκίνου (μαστού, προστάτη), καρδιαγγειακές ασθένειες και διαβήτη (Spanou et al., 2008). Όσον αφορά την ευεργετική επίδραση στον διαβήτη, η κατανάλωση ψυχανθών καθυστερεί την πρόοδο της ασθένειας και μειώνει την αντίσταση στην ινσουλίνη (Venn et al., 2004). Σημαντικός είναι ο ρόλος τους και σε καρδιαγγειακές ασθένειες καθώς συμμετέχουν στον έλεγχο της ομοιόστασης των λιπιδίων. Μελέτες δείχνουν πως η κατανάλωση ψυχανθών, όπως του φυτού *Vicia faba*, επιδρά άμεσα και προκαλεί μείωση στα επίπεδα της χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι τα ψυχανθή καθυστερούν την πρόοδο της καρκινογένεσης. Υπάρχουν μελέτες που δείχνουν την αντικαρκινική δράση σπόρων μπιζελιού σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου (Duranti, 2005).

Η δράση των ψυχανθών φαίνεται πως οφείλεται τόσο στις πρωτεΐνες όσο και σε φυτοχημικά μόρια, που περιέχουν σε σημαντικές ποσότητες, αλλά και στις αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ αυτών των μορίων (Duranti, 2005). Φαινολικά μόρια, όπως φαινολικά οξέα, λιγνάνες και φλαβονοειδή (κυρίως ισοφλαβονοειδή), βρίσκονται στα ψυχανθή και φαίνεται πως ασκούν χημειοπροστατευτικές και αντιοξειδωτικές δράσεις μέσω διαφόρων μηχανισμών (Spanou et al., 2008). Για παράδειγμα, πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν ότι τα ισοφλαβονοειδή δρουν πλεονεκτικά έναντι των καρδιαγγειακών ασθενειών και του καρκίνου και ότι λειτουργούν δρώντας ως αντιοιστρογόνα. Επιπλέον, τα ψυχανθή περιέχουν ανθοκυανίνες, όπως κυανιδίνη, δελφινίνη, πετουνιδίνη, πελαργκονιδίνη και μαλβιδίνη καθώς και προανθοκυανίνες, μόρια που παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση *in vitro*. Το περιεχόμενο σε βιοενεργά μόρια εξαρτάται από τον τύπο του ψυχανθούς, από την ποικιλία του και από περιβαλλοντικούς και γενετικούς παράγοντες, όπως ο χρόνος καλλιέργειας, η τοποθεσία, η θερμοκρασία και το στάδιο ωρίμανσης (Lin et al., 2006). Τέλος, επειδή υπάρχουν πολλές ποικιλίες ψυχανθών με διαφορετική φυτοχημική σύνθεση, είναι σημαντική η περαιτέρω μελέτη των βιοδραστικών μορίων που βρίσκονται σε αυτά τα φυτά (Spanou et al., 2008).

Πίνακας 1: Πρωτεΐνες ψυχανθών

Πεπτιδίο/Πρωτεΐνη	Ψυχανθές	Εγγενής Δράση	Βιολογική δράση
7S γλοβουλίνη α' αλυσίδα	Σόγια	-	Ρύθμιση των υποδοχέων LDL Μείωση χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων Αντι-θρομβωτική δράση
Αποθηκευτικές πρωτεΐνες	Φάβα	-	Μείωση χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων
ΒΒσερίνη-αναστολέας πρωτεασών	Σόγια, Μπιζέλια	Αναστολέας θρυψίνης/ χυμοθρυψίνης	Αντικαρκινική Αντιφλεγμονώδη Προστασία από παχυσαρκία Προστασία από αυτοάνοσα νοσήματα
Αναστολέας α-αμυλάσης	Ποικίλες πηγές	Αναστολέας α-αμυλάσης	Έλεγχος βάρους Παχυσαρκία Διαβήτης
Λεκτίνες	Ποικίλες πηγές	Σύνδεση σε ρίζες γλυκοσιλίου	Αντικαρκινική

1.2 Πολυφαινόλες

1.2.1 Χαρακτηριστικά πολυφαινολών

Οι πολυφαινόλες είναι σύνθετες ουσίες που περιέχουν δύο ή και περισσότερους φαινολικούς δακτυλίους οι οποίοι συνδέονται μεταξύ τους. Πηγές πλούσιες σε φαινολικά μόρια είναι τα φρούτα, τα λαχανικά, τα φύλλα, τα καρύδια, οι σπόροι, τα άνθη και οι φλούδες (Nichenametla et al., 2006).

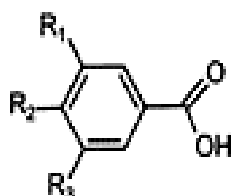
Τα πολυφαινολικά μόρια μπορούν να χωριστούν σε περισσότερους από δέκα τύπους με βάση τη χημική δομή τους. Φαινολικά οξέα, флаβονοειδή, στυλβένια και λιγνάνες είναι οι πιο άφθονες πολυφαινόλες στα φυτά, από τα οποία τα флаβονοειδή και τα φαινολικά οξέα αποτελούν το 60% και 30% αντίστοιχα του συνόλου των πολυφαινολών της διατροφής. Τα πολυφαινολικά μόρια είτε συνεργιστικά είτε μέσω ανταγωνιστικών αλληλεπιδράσεων, επηρεάζουν βασικές κυτταρικές διαδικασίες, όπως την διαφοροποίηση, τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση (Nichenametla et

al., 2006). Για παράδειγμα κάποιες μελέτες έχουν δείξει συνεργιστικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της προκυανιδίνης B₂ και πολυφαινόλων όπως η επικατεχίνη, η ρεσβερατρόλη και η μυρικετίνη (Jo et al., 2006). Επιπλέον, ο συνδυασμός των μορίων ρεσβερατρόλη και κερκετίνη στα σταφύλια, επάγει την απόπτωση στην ανθρώπινη παγκρεατική καρκινική κυτταρική σειρά. Οι επιδράσεις αυτών των δύο μορίων ενισχύονται από την αιθανόλη, η οποία καταστέλλει την έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί για την συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου (NO), καθώς και την παραγωγή του NO από τα μακροφάγα, γεγονός στο οποίο οφείλονται οι ευεργετικές επιδράσεις του κρασιού έναντι της αρτηριοσκλήρυνσης και της έναρξης της καρκινογένεσης. Γενικά έχει βρεθεί ότι τα τρόφιμα που είναι πλούσια σε πολυφαινόλες μειώνουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου και καρδιαγγειακών νοσημάτων (Jo et al., 2006), καθώς φαίνεται πως φαινολικά μόρια όπως φαινολικά οξέα, λιγνάνες και φλαβονοειδή παρουσιάζουν χημειοπροστατευτικές δράσεις (Spanou et al., 2008).

1.2.2 Φαινολικά οξέα

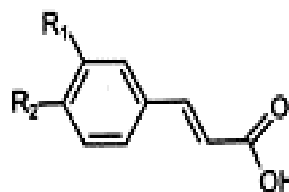
Τα φαινολικά οξέα είναι οι πιο άφθονες πολυφαινόλες στα φυτά και παράγονται από τα υδροξυβενζοϊκά ή τα υδροξυκινναμικά οξέα. Τα φαινολικά οξέα που παράγονται από το υδροξυβενζοϊκό οξύ περιλαμβάνουν το γαλλικό οξύ, το βανιλικό οξύ, το πρωτοκατεχοϊκό οξύ και το συριγγικό οξύ, ενώ φαινολικά οξέα που παράγονται από το υδροξυκινναμικό οξύ περιλαμβάνουν το π-κουμαρικό οξύ, το καφεϊκό οξύ και το φερουλικό οξύ (*Εικόνα 2*) (Nichenametla et al., 2006).

Hydroxybenzoic acids



$R_1 = R_2 = \text{OH}, R_3 = \text{H}$: Protocatechuic acid
 $R_1 = R_2 = R_3 = \text{OH}$: Gallic acid

Hydroxycinnamic acids



$R_1 = \text{OH}$: Coumaric acid
 $R_1 = R_2 = \text{OH}$: Caffeic acid
 $R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = \text{OH}$: Ferulic acid

Εικόνα 2: Δομές φαινολικών οξέων

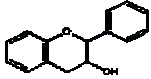
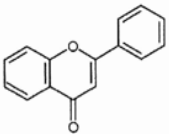
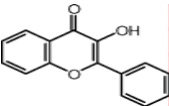
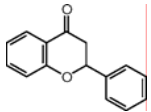
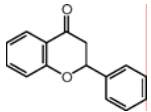
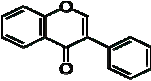
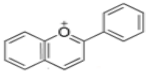
Τα υδροξυκινναμικά οξέα εμφανίζονται κυρίως ως απλοί εστέρες με καρβοξυλικά οξέα ή γλυκόζη και τα υδροξυβενζοϊκά οξέα σαν γλυκοζίτες. Το καφεϊκό οξύ είναι από τα πιο αντιπροσωπευτικά υδροξυκινναμικά οξέα και βρίσκεται στα τρόφιμα κυρίως ως χλωρογενικό οξύ, ένας εστέρας του καφεϊκού και κυνικού οξέος. Το φερουλικό οξύ, μόριο αρκετά διαδεδομένο στο βασίλειο των φυτών, είναι ένα μονοφαινολικό φαινυλοπροπανοειδές που χαρακτηρίζεται σε πολλές *in vivo* μελέτες ως αντιοξειδωτικό και χημειοπροστατευτικό μόριο. Τέλος, το π-κουμαρικό οξύ είναι ένα παράγωγο της φαινολικής κουμαρίνης. Το μόριο αυτό βρίσκεται σε πολλά φρούτα και φαίνεται ότι δρα ανασταλτικά στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Nichenametla et al., 2006).

Ένας σημαντικός παράγοντας για τα πιθανά πλεονεκτήματα των φαινολικών οξέων στην υγεία των ανθρώπων και των ζώων είναι η βιοδιαθεσιμότητα αυτών των μορίων. Έχει βρεθεί σε μοντέλα επιμύων ότι το καφεϊκό και το χλωρογενικό οξύ απορροφώνται από το μικρό έντερο. Στον άνθρωπο έχει αναφερθεί ότι περισσότερο από το 95% του καφεϊκού οξέος και περισσότερο από το 33% του χλωρογενικού οξέος απορροφώνται από το μικρό έντερο. Τα δύο αυτά οξέα πιθανώς υπόκεινται σε εκτεταμένο μεταβολισμό μετά την απορρόφηση, παρόλο που τα δεδομένα για τον μεταβολισμό τους στο ανθρώπινο σώμα είναι σπάνια. Όσον αφορά το φερουλικό οξύ, φαίνεται ότι διαχέεται παθητικά διαμέσου του εντέρου. Εντούτοις, μία *in vitro* μελέτη έχει δείξει ότι το φερουλικό οξύ μπορεί να μεταφερθεί διαμέσου του εντέρου από ένα σύστημα μονοκαρβοξυλικών μεταφορέων (Nichenametla et al., 2006).

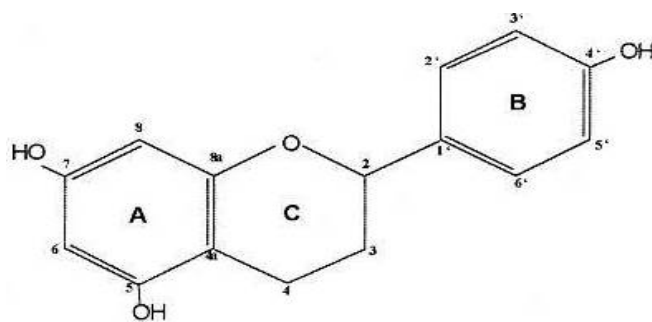
1.2.3 Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι η μεγαλύτερη κατηγορία πολυφαινολικών συστατικών και περιέχονται σε φρούτα, λαχανικά, στη σόγια, στο τσάι, στο χαμομήλι, στο κόκκινο κρασί και σε διάφορους καρπούς όπως το κακάο. Τα πιο διαδεδομένα και ταυτόχρονα μελετημένα φλαβονοειδή είναι οι φλαβόνες, οι φλαβονόλες, οι φλαβονόνες, τα ισοφλαβονοειδή, οι ανθοκυανιδίνες και οι προανθοκυανιδίνες (**Πίνακας 2**). Η διάκριση γίνεται με βάση τον βαθμό οξείδωσης του κεντρικού πυρανικού δακτυλίου (Nichenametla et al., 2006) και τους υποκαταστάτες (Heim et al., 2002).

Πίνακας 2: : Διάκριση φλαβονοειδών

Ομάδα	Δομή	Φλαβονοειδή	Πρότυπο υποκαταστάσεων	Πηγές διατροφής
Φλαβανόλες		(+)-κατεχίνη (-)-επικατεχίνη επιγαλλοκατεχίνη	3,5,7,3',4'-OH 3,5,7,3',4'-OH 3,5,7,3',4',5'-OH,3-gallate	Τσάι Τσάι Τσάι
Φλαβόνες		χρυσίνη απιγενίνη ρουτίνη	5,7-OH 5,7,4'-OH 5,7,3',4'-OH,3-ρουτινόζη	Φρούτα Μαϊντανός, σέλινο Κόκκινο κρασί, Εσπεριδοειδή, ντομάτα Κόκκινο πιπέρι
Φλαβονόλες		καμπφερόλη κερκετίνη	3,5,7,4'-OH 3,5,7, 3',4'-OH	Πράσο, μπρόκολο, αντίδια Γκρέιπφρουτ, μαύρο τσάι Κρεμμύδια, μαρούλι, μπρόκολο Ντομάτα, τσάι, κόκκινο κρασί Μούρα, λάδι ελιάς, μήλα
Φλαβονόνες		μυρικετίνη ταμαριχετίνη	3,5,7, 3',4',5'-OH 3,5,7, 3'-OH,4'-OMe	Σταφύλια, κόκκινο κρασί
Φλαβονόνες		ναρινγίνη ναρινγενίνη ταξιφολίνη εριοδικτυόλη εσπεριδίνη	5,4'-OH,7-ραμνογλυκόζη 5,7,4'-OH 3,5,7, 3',4'-OH 5,7, 3',4'-OH 3,5,7, 3'-OH,4'-OMe, 7-ρουτινόζη	Εσπεριδοειδή, Γκρέιπφρουτ Εσπεριδοειδή Εσπεριδοειδή Λεμόνια Πορτοκάλια
Ισοφλαβονοειδή		γενιστίνη γενιστεΐνη δαιζίνη δαιζεΐνη	5,4'-OH, 7-γλυκόζη 5,7,4'-OH 4'-OH, 7-γλυκόζη 7,4'-OH	Σόγια Σόγια Σόγια Σόγια
Ανθοκυανίνες		απιγενίνη κυανιδίνη	5,7,4'-OH 3,5,7,4'-OH,3,5-OMe	Πολύχρωμα φρούτα Κεράσι, φράουλα

Δομικά, τα φλαβονοειδή μοιράζονται ένα κοινό ανθρακικό σκελετό από διφαινυλοπροπάνια και δύο βενζοϊκούς δακτυλίους, όπου συνδέονται με μια ευθύγραμμη αλυσίδα τριών ανθράκων ($C_6+C_3+C_6$) (**Εικόνα 3**). Οι φλαβόνες και οι φλαβονόλες έχουν ένα διπλό δεσμό μεταξύ του C_3 και του C_2 . Οι φλαβονόλες διαφέρουν από τις φλαβόνες στο ότι έχουν μία υδροξυλική ομάδα στον C_3 . Οι φλαβανόνες χαρακτηρίζονται από την παρουσία μίας κορεσμένης ανθρακικής αλυσίδας και ενός ατόμου οξυγόνου στον άνθρακα C_4 , οι φλαβανόλες περιέχουν μία κορεσμένη ανθρακική αλυσίδα με μία υδροξυλική ομάδα, ενώ όσο αφορά τις προανθοκυανιδίνες είναι πολυμερή των φλαβονολών (Nichenametla et al., 2006).



Εικόνα 3: Βασικός σκελετός των φλαβονοειδών

Οι φλαβονόλες βρίσκονται σε ποικίλα επίπεδα σε διάφορα φρούτα. Η μυρικετίνη, η κερκετίνη, η καιμπφερόλη είναι τα πιο αντιπροσωπευτικά μόρια στο φυτικό βασίλειο, ενώ μόνο ένας περιορισμένος αριθμός φρούτων και λαχανικών περιέχει τις δομικά συγγενείς φλαβόνες, απιγενίνη και λουτεολίνη. Στους φυτικούς ιστούς, οι φλαβονόλες και οι φλαβόνες βρίσκονται συνδεδεμένες με σάκχαρα, κυρίως με γλυκόζη, ραμνόζη και ρουτινόζη (Nichenametla et al., 2006).

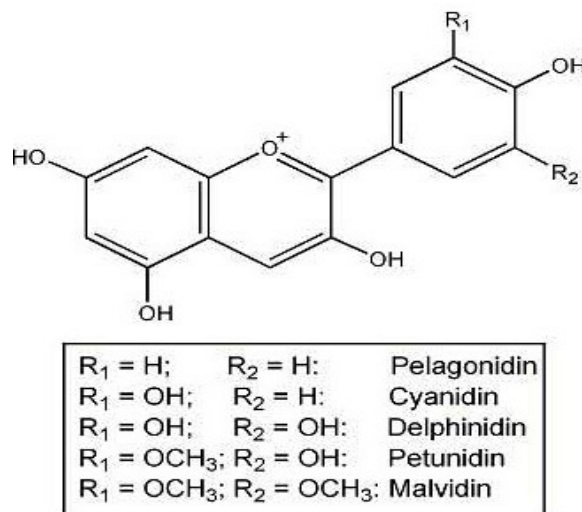
Τα φλαβονοειδή παρουσιάζουν αντιοξειδωτικές και καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες. Οι καρδιοπροστατευτικές επιδράσεις τους φαίνεται ότι οφείλονται στην ικανότητά τους να αναστέλλουν την λιπιδική υπεροξειδωση. Ο προστατευτικός αυτός ρόλος τους υποδεικνύεται από πολλές μελέτες. Ενδεικτικά μία μελέτη σε σύνολο 802 ανδρών έχει αναδείξει την αντίστροφη σχέση μεταξύ της κατανάλωσης της κατεχίνης (κυρίαρχο φλαβονοειδές στο τσάι) και της προκαλούμενης από ισχαιμική καρδιακή νόσο θνησιμότητας (Heim et al., 2002). Επιπλέον τα φλαβονοειδή εμφανίζουν αντιϊκές, αντιπαρασιτικές και αντικαρκινικές ιδιότητες. Ένα από τα σημαντικότερα μέλη της οικογένειας των φλαβονοειδών είναι η λουτεολίνη. Η λουτεολίνη έχει αποτελέσει

αντικείμενο εκτεταμένων μελετών που έχουν αναδείξει αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντιαλλεργικές ιδιότητες, καθώς και ανασταλτικές επιδράσεις στην ανάπτυξη ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών (Chowdhury et al., 2002).

1.2.4 Ανθοκυανίνες

Οι ανθοκυανίνες ανήκουν στην κατηγορία των φλαβονοειδών και αποτελούν φυσικές υδατοδιαλυτές χρωστικές των φυτών, ευρέως διαδεδομένες σε φρούτα και λαχανικά της καθημερινής διατροφής. Είναι υπεύθυνες για το σκούρο χρώμα πολλών φρούτων, όπως των μούρων (Nichenametla et al., 2006).

Οι ανθοκυανίνες είναι γλυκοσιδικές μορφές των ανθοκυανιδών. Οι προανθοκυανίδες, οι οποίες διαφέρουν από τα άλλα φαινολικά μόρια λόγω της πολυμερής δομής, δίνουν ανθοκυανιδίνες κάτω από όξινες συνθήκες και υψηλή θερμοκρασία. Έχουν βρεθεί περισσότερες από 300 διαφορετικές ανθοκυανιδίνες ή τα γλυκοσίδια τους σε φυτά. Οι πιο κοινές είναι η κυανιδίνη, η δελφινίνη, η πετουνιδίνη, η πελαργκονιδίνη, η πεονιδίνη και η μαλβιδίνη (**Εικόνα 4**) (Nichenametla et al., 2006). Έχει δειχθεί ότι οι ανθοκυανίνες διαθέτουν αντιφλεγμονώδεις, χημειοπροστατευτικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες και επιπλέον έχουν ευεργετικές επιδράσεις σε διάφορες ασθένειες, όπως η διαβητική νεφροπάθεια. Γενικά οι διαθέσιμες πληροφορίες σχετικά με τις κυτταρικές επιδράσεις των ανθοκυανινών είναι περιορισμένες. Εντούτοις μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι οι ανθοκυανίνες αλληλεπιδρούν με σηματοδοτικά μόρια τα οποία είναι σημαντικά για την ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, γεγονός που είναι θετικό κυρίως στην περίπτωση της χημειοπροφύλαξης (Habermeyer et al., 2005).

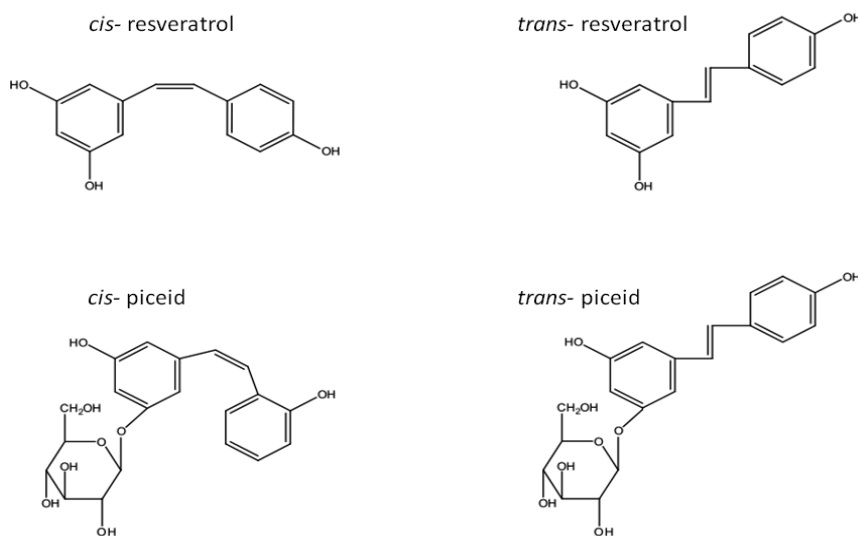


Εικόνα 4: Χημική δομή των ανθοκυανινών

1.2.5 Στιλβένια

Τα στιλβένια είναι οργανικά μόρια που περιέχουν 1,2-διφαινυλαιθυλένιο σαν λειτουργική ομάδα. Η ρεσβερατρόλη (3,5,4'-τριυδροξυ-στιλβένιο) ανήκει στα στιλβένια και βρίσκεται σε πολλές καθημερινές διατροφικές πηγές, όπως στα μούρα και στα σταφύλια. Στα φρούτα βρίσκεται σαν ελεύθερη (cis ή trans διαμόρφωση) ρεσβερατρόλη και με τη μορφή γλυκοσιδίου (**Εικόνα 5**) (Nichenametla et al., 2006).

Μελέτες απορρόφησης της ρεσβερατρόλης δείχνουν ότι μεταφέρεται στην κυκλοφορία διαμέσου του μικρού εντέρου σαν γλυκουρονίδιο. Στη συνέχεια το γλυκουρονίδιο μπορεί να διασπάται στην βιοδραστική ρεσβερατρόλη από τις β-γλυκουρονιδάσες, ένζυμα που βρίσκονται σε πολλά όργανα και σε υγρά του σώματος, όπως στα μακροφάγα, τα κύτταρα του αίματος, το συκώτι, τους πνεύμονες και τον ορό του αίματος (Nichenametla et al., 2006).



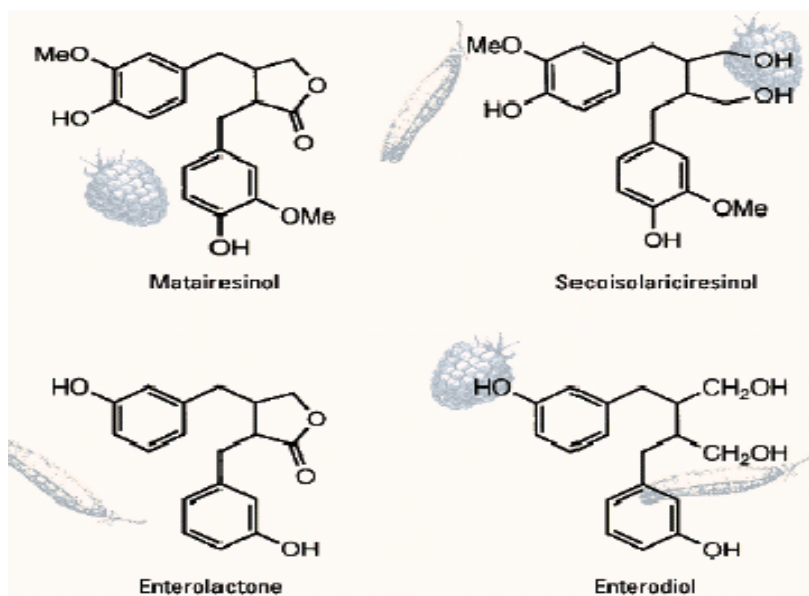
Εικόνα 5: Χημικές δομές της ρεσβερατρόλης

1.2.6 Λιγνάνες

Οι λιγνάνες είναι μία μεγάλη, ετερογενή ομάδα φαινολικών μορίων, ευρέως διαδεδομένη σε φυτά που περιλαμβάνονται στη ανθρώπινη διατροφή (**Εικόνα 6**) (Saarinen et al., 2007). Εμπλέκονται στους μηχανισμούς άμυνας των φυτών, αλλά η δράση τους παίζει και σημαντικό ρόλο στην ανθρώπινη υγεία (Lamblin et al., 2008).

Κάποιες λιγνάνες μετατρέπονται από την μικροχλωρίδα του εντέρου σε εντερολιγνάνες, εντεροδιόλες και εντερολακτόνες, με τις εντερολακτόνες να είναι οι κύριες βιολογικά ενεργές λιγνάνες με σημαντικό ρόλο στην μείωση κινδύνου εμφάνισης του καρκίνου στο στήθος (Saarinen et al., 2007). Πέρα από την μικροχλωρίδα υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν τα επίπεδα και τη δράση αυτών των φαινολικών μορίων, όπως το κάπνισμα, τα αντιβιοτικά και η παχυσαρκία (Adlercreutz et al., 2007).

Υπάρχουν πολλές *in vivo* και *in vitro* μελέτες που δείχνουν πως οι λιγνάνες δρουν χημειοπροστατευτικά σαν αντιοιστρογόνα, αναστέλλοντας ή καθυστερώντας την ανάπτυξη όγκων (Saarinen et al., 2007). Ένα καλά μελετημένο μόριο που ανήκει στις λιγνάνες είναι η ποδοφυλλοτοξίνη και τα ημισυνθετικά της παράγωγα (ετοποσίδη, τενιποσίδη) τα οποία χρησιμοποιούνται στην χημειοθεραπεία του καρκίνου στους πνεύμονες, λόγω των κυτταροτοξικών ιδιοτήτων τους (Lambdin et al., 2008). Οι λιγνάνες, εκτός από την αναστολή της βιοσύνθεσης των οιστρογόνων, επηρεάζουν και άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια προκαλώντας αναστολή της αγγειογένεσης, αναστολή των κινασών τυροσίνης και μελών της οικογένειας των επιδερμικών αυξητικών παραγόντων και τέλος αναστολή της λειτουργίας της DNA τοποϊσομεράσης II (Saarinen et al., 2007).



Εικόνα 6: Χημική δομή φυτικών λιγνάνων και των ζωϊκών παραγώγων τους

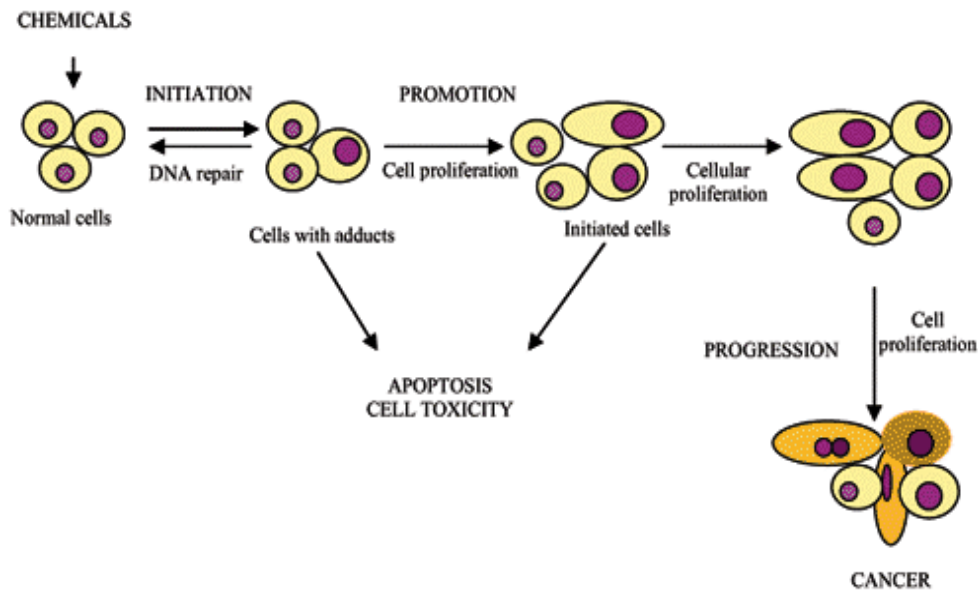
1.3 Χημειοπροστασία και καρκίνος

1.3.1 Καρκίνος

Η διαδικασία της καρκινογένεσης, κατά την οποία ένα φυσιολογικό κύτταρο μετατρέπεται σε κακοήγη όγκο είναι αρκετά περίπλοκη. Περιλαμβάνει αλλαγές στη δομή και λειτουργία κωδικών περιοχών του DNA καθώς και απορρύθμιση πολλών σηματοδοτικών μονοπατιών (Mehta et al., 2010).

Ο σχηματισμός των καρκινικών κυττάρων περιλαμβάνει τρία στάδια, που στηρίζονται σε διαφορετικούς μηχανισμούς εξέλιξης (*Εικόνα 7*):

1. Στο πρώτο στάδιο ή στάδιο έναρξης (initiation), περιβαλλοντικοί παράγοντες προκαλούν μία ή και περισσότερες μεταλλάξεις ή μικρές ελλείψεις σε γονίδια, τα οποία ελέγχουν τη διαδικασία της καρκινογένεσης.
2. Το δεύτερο στάδιο, γνωστό και ως προαγωγή (promotion), χαρακτηρίζεται από απορρύθμιση των σηματοδοτικών μονοπατιών, που φυσιολογικά ελέγχουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση. Γονίδια που ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο είναι συχνά μεταλλαγμένα σε καρκίνους στον άνθρωπο, όπως μεταλλάξεις στο p27 είναι συνηθισμένες σε όγκους παγκρέατος. Οι μεταλλάξεις αυτές οδηγούν σε ένα συνεχή πολλαπλασιασμό των μεταλλαγμένων κυττάρων, που ξεπερνά τον πολλαπλασιασμό των φυσιολογικών κυττάρων.
3. Το τρίτο στάδιο ή στάδιο προόδου (progression), χαρακτηρίζεται από γενετικές αλλαγές στον καρύτυπο των κυττάρων λόγω της συσσώρευσης μεταλλαγμένων γονιδίων που οδηγεί σε χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Η εισβολή, η αγγειογένεση που παρέχει στα κακοήγη κύτταρα απαραίτητες θρεπτικές ουσίες και οξυγόνο και η μετάσταση αποτελούν το στάδιο της προόδου.



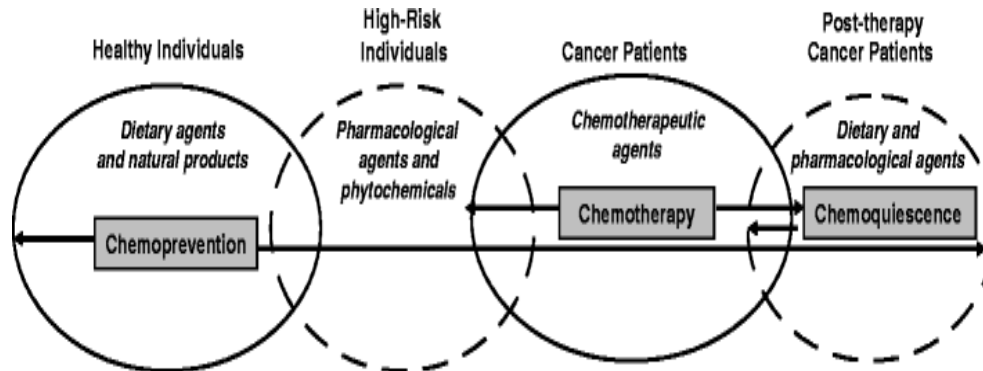
Εικόνα 7: Στάδια καρκινογένεσης

1.3.2 Χημειοπροστασία

Με τον όρο χημειοπροστασία ορίζεται η χρήση φυσικών ή συνθετικών συστατικών με σκοπό την πρόληψη, αναστολή ή αντιστροφή της ανάπτυξης ή της προόδου του καρκίνου (Mehta et al., 2010). Πολλές μελέτες αναφέρουν ότι η κατανάλωση φρούτων και λαχανικών οδηγεί σε μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου, μία χημειοπροστατευτική δράση που οφείλεται στα φυτοχημικά τους συστατικά. Τα φυτοχημικά συστατικά είναι μη θρεπτικά συστατικά που βρίσκονται κυρίως σε φρούτα και λαχανικά και παίζουν σημαντικούς ρόλους στη πρόληψη χρόνιων ασθενειών, όπως ο καρκίνος, ο διαβήτης και η υπερχοληστερολημία. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν τα καροτενοειδή, τα φλαβονοειδή, οι ινδόλες και οι στερόλες (Mehta et al., 2010).

Η χρήση των φυτοχημικών οδηγεί σε αλλαγές στις γενωμικές αποκρίσεις, οι οποίες μπορεί να σταματούν ή να καθυστερούν την διαδικασία της καρκινογένεσης. Η χημειοπροστατευτική διαδικασία μπορεί να συμβεί κατά την έναρξη της καρκινογένεσης ή κατά τη φάση της προαγωγής ή της προόδου (**Εικόνα 8**). Κλινικά, η χημειοπροφύλαξη μπορεί να εφαρμοστεί σε υγιή άτομα, στα οποία μία διατροφή πλούσια σε φυτοχημικά μπορεί να παρέχει προστασία. Επιπλέον, φαρμακευτικά μόρια που κατατάσσονται στους χημειοπροστατευτικούς παράγοντες μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε άτομα με υψηλό κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου, λόγω οικογενειακού ιστορικού, ενώ σε ασθενείς με καρκίνο είναι συχνή η χρήση χημειοθεραπευτικών μορίων, με σκοπό τον θάνατο των καρκινικών κυττάρων ή την μείωση του ρυθμού αύξησης του όγκου και την καθυστέρηση της

μετάστασης. Τέλος, υπάρχουν και περιπτώσεις ασθενών στους οποίους οι χημειοπροστατευτικοί παράγοντες μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό με χημειοθεραπευτικούς παράγοντες για καλύτερα αποτελέσματα (Mehta et al., 2010).



Εικόνα 8: Απόκριση σε χημειοπροστατευτικούς παράγοντες

1.4 Πολυφαινόλες και χημειοπροστασία

Πιθανοί μηχανισμοί για την χημειοπροστατευτική δράση των πολυφαινολών περιλαμβάνουν την αναστολή του σχηματισμού ή της δραστηριότητας του καρκινογνώματος, την αναστολή της σύνδεσης του καρκινογνώματος στο DNA και την ενίσχυση των επιπέδων των επιδιορθωτικών μηχανισμών ή την ενίσχυση της πιστότητας επιδιόρθωσης του DNA. Οι πολυφαινόλες έχουν και αντιοξειδωτικές ικανότητες, καθώς εξουδετερώνουν ελεύθερες ρίζες και αναστέλλουν και το μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος (Nichenametla et al., 2006).

1.4.1 Αντικαρκινική δράση

Πολλές μελέτες εξετάζουν τις επιδράσεις των πολυφαινολικών μορίων σε καρκινικά κύτταρα χρησιμοποιώντας τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* συστήματα (Nichenametla et al., 2006). Οι μελέτες πάνω στα φαινολικά οξέα παρουσιάζουν διαφορετικά αποτελέσματα. Κάποιες μελέτες υποδεικνύουν αντικαρκινική δράση, ενώ άλλες δείχνουν μόρια που επάγουν την καρκινογένεση. Οι διαφορές αυτές πιθανόν να οφείλονται στον διαφορετικό σχεδιασμό των πειραματικών συνθηκών (Nichenametla et al., 2006).

Έχει αποδειχθεί ότι το φερουλικό και το χλωρογενικό οξύ αναστέλλουν την δραστηριότητα του κυτοχρώματος P450, ενός ενζυμικού συστήματος το οποίο μπορεί να ενεργοποιήσει ή να απενεργοποιήσει την διαδικασία της καρκινογένεσης. Επίσης, τα φαινολικά οξέα αναστέλλουν ή επάγουν διάφορα ένζυμα, γεγονός που μπορεί να βοηθήσει στην πρόληψη του καρκίνου. Για παράδειγμα, επίμυες που εκτέθηκαν σε 1% φερουλικό οξύ παρουσίασαν σημαντική αύξηση στην δραστηριότητα του ενζύμου UDP-γλυκουρονικής μεταφοράσης, που ανήκει στα ένζυμα των αντιδράσεων της Φάσης II του μεταβολισμού. Επιπλέον, η επαγωγή της απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων, η αναστολή των μεταλλάξεων, η αντιμεταστατική δραστηριότητα και η ρύθμιση της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος αποτελούν μηχανισμούς μέσω των οποίων ασκείται η αντικαρκινική δράση αυτών των μορίων. Εντούτοις, έχουν αναφερθεί και μελέτες στις οποίες τα μόρια αυτά φαίνεται ότι προωθούν την καρκινογένεση, κάτι που πιθανόν να οφείλεται στις βλάβες που προκαλούνται στο DNA από την παραγωγή του H₂O₂ (Nichenametla et al., 2006).

Υπάρχουν μελέτες που αναφέρονται στην αντικαρκινική δράση των φλαβονοειδών και κυρίως σε μία υποομάδα τους, τις φλαβονόλες. Οι φλαβονόλες φαίνεται ότι ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο, την ανάπτυξη των κυττάρων και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, γεγονός που αποτελεί ένα σημαντικό αντικαρκινικό μηχανισμό. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η κερκετίνη, μόριο που αναστέλλει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου στα καρκινικά κύτταρα μαστού MCF-7, μέσω προσωρινής συσσώρευσης στη φάση M, παύση στη φάση G2 και επαγωγή απόπτωσης. Γενικά, η κερκετίνη θεωρείται ένα μη καρκινογόνο μόριο (Nichenametla et al., 2006). Εντούτοις, έχει αναφερθεί μια μελέτη σε ποντίκια όπου η χορήγηση 0.1 % κερκετίνης για 58 εβδομάδες οδήγησε στην εμφάνιση καρκίνου στην κύστη και στο έντερο, γεγονός που δηλώνει ότι στην συγκεκριμένη περίπτωση η κερκετίνη επάγει τον σχηματισμό καρκίνου (Pamuksu et al., 1980).

Οι ανθοκυανίνες αποτελούν μια από τις ομάδες των φλαβονοειδών, οι οποίες έχουν μελετηθεί για τις βιολογικές και χημειοπροστατευτικές τους ιδιότητες. Η αντιοξειδωτική τους δραστηριότητα που παρουσιάζεται σε πολλά *in vitro* πειράματα, φαίνεται να είναι η σημαντικότερη ιδιότητα που επιτρέπει τη χρήση τους σαν μόρια για την πρόληψη του καρκίνου. Οι αντικαρκινικές ιδιότητες των ανθοκυανινών παρουσιάζονται και σε *in vivo* μελέτες, όπου εμφανίζουν μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα κυρίως έναντι στον καρκίνο του δέρματος. Οι ανθοκυανίνες πέρα από την άμεση αντιοξειδωτική τους δράση μπορούν και έμμεσα να συμμετέχουν στην πρόληψη του καρκίνου. Εκχυλίσματα πλούσια σε ανθοκυανίνες σε δόση 200-400 mg/kg μπορούν να μειώσουν την διαπερατότητα των

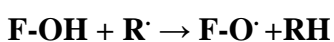
αγγείων, η οποία είναι αρκετά αυξημένη στα καρκινικά κύτταρα, με αποτέλεσμα να αναστέλλεται η ανάπτυξή τους (Nichenametla et al., 2006).

Τέλος, τα στυλβένια αποτελούν μια ακόμα υποομάδα των φλαβονοειδών που εμφανίζει αντικαρκινική δράση. Έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν κυτταρικά γεγονότα που σχετίζονται με την καρκινογένεση, όπως είναι η έναρξη σχηματισμού του όγκου, η φάση της προώθησης και η φάση της προόδου. Σε συνδυασμό με *in vitro* μελέτες η αντικαρκινική δράση των στυλβενίων έχει αποδειχθεί και από *in vivo* μελέτες, όπου τα στυλβένια και κυρίως η ρεσβερατρόλη, είναι δραστικά σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου, όπως στον καρκίνο του εντέρου, του δέρματος και του οισοφάγου (Nichenametla et al., 2006).

1.4.2 Αντιοξειδωτική δράση

Πολλά πολυφαινολικά μόρια που βρίσκονται σε αρκετές τροφές φαίνεται ότι έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες, με αποτέλεσμα να είναι ευεργετικά για την ανθρώπινη υγεία (Dragsted, 2003).

Καθαρές πολυφαινολικές ενώσεις, οι οποίες απομονώθηκαν από μεθανολικά εκχυλίσματα του φυτού *Vicia faba*, βρέθηκε ότι μειώνουν αποτελεσματικά τις ρίζες DPPH, όπως και τα καθαρά φλαβονοειδή που απομονώθηκαν από μεθανολικά εκχυλίσματα του φυτού *Lotus edulis*, τα οποία όμως εμφάνισαν μικρότερη αποτελεσματικότητα σε σχέση με τα πολυφαινολικά κλάσματα. Η διαφορετική αποτελεσματικότητα πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι όταν τα μόρια συνδυάζονται παρουσιάζουν διαφορετική αντιοξειδωτική δράση συγκριτικά με όταν βρίσκονται σε καθαρή μορφή. Επιπλέον, οι διαφορετικοί συνδυασμοί των πολυφαινολικών μορίων, καθώς και οι μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις μπορούν να εξηγήσουν τις διαφορές που εμφανίζονται στην αποδοτικότητά τους έναντι των ελευθέρων ριζών (Spanou et al., 2008). Γενικά, η αλληλεπίδραση των μορίων με τις ελεύθερες ρίζες εξαρτάται από την δομή και κυρίως από τον συνολικό αριθμό και την διαθεσιμότητα των υδροξυλικών ομάδων. Φαίνεται λοιπόν ότι η ικανότητα εξουδετέρωσης των πολυφαινολικών μορίων, οφείλεται στις υψηλά ενεργές ρίζες οι οποίες συμμετέχουν στην παρακάτω αντίδραση (Heim et al., 2002):



Υπάρχουν και άλλες μελέτες που φανερώνουν την αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολικών μορίων. Τα παράγωγα του υδροκινναμικού οξέος έχουν την ικανότητα να εξουδετερώνουν ενεργές ρίζες αζώτου προστατεύοντας διάφορα υποστρώματα από τη

νίτρωση. Πιο ισχυρή αντιοξειδωτική δράση έχει το καφεϊκό, ακολουθεί το φερουλικό και τέλος το π-κουμαρικό. Εκτός από την εξουδετέρωση των ριζών αζώτου το φερουλικό οξύ όταν χορηγείται σε δόσεις των 100 mg/kg σε θηλυκούς επίμυες, οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης, ενός σημαντικού αντιοξειδωτικού μορίου που η δράση του σχετίζεται και με την αναστολή της καρκινογένεσης. Επιπλέον, μελέτες δείχνουν πως το καφεϊκό οξύ μειώνει την οξειδωτική βλάβη του DNA στα S30 καρκινικά κύτταρα στήθους και το χλωρογενικό εξουδετερώνει τις ρίζες υπεροξειδίου που παράγονται από το σύστημα ξανθίνη/οξειδάση της ξανθίνης. Τέλος, το π-κουμαρικό μειώνει την επαγωγή του οξειδωτικού στρες ενισχύοντας την δραστηριότητα της γλουταθειόνης, της καταλάσης και της υπεροξειδικής δισμουτάσης (Nichenametla et al., 2006).

Αντιοξειδωτική δράση εμφανίζουν και οι φλαβονόλες. Η κερκετίνη και η καιμπερόλη αυξάνουν τα επίπεδα της γλουταθειόνης σε ποσοστό μέχρι και 50% σε κύτταρα COS-1, ενώ η μυρικετίνη προστατεύει τα Caco-2 κύτταρα από τις ρίζες υπεροξειδίου. Πολλές μελέτες περιγράφουν και την αντιοξειδωτική δράση των ανθοκυανινών, οι οποίες είναι πιο ισχυρά αντιοξειδωτικά μόρια σε σχέση με τη βιταμίνες C και E. Η αντιοξειδωτική ικανότητα πολλών φρούτων εξαρτάται από το περιεχόμενό τους σε ανθοκυανίνες και υπάρχουν μελέτες που αναφέρονται στην δράση εκχυλισμάτων που προέρχονται από μούρα έναντι ριζών οξυγόνου (Nichenametla et al., 2006).

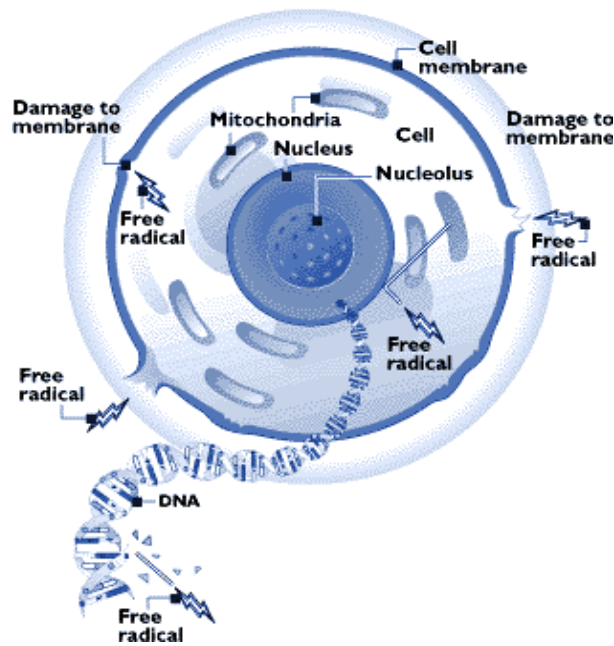
Υπάρχουν όμως και *in vitro* μελέτες που υποστηρίζουν ότι τα φλαβονοειδή προάγουν το οξειδωτικό στρες, με αποτέλεσμα να εμφανίζουν κυτταροτοξικές και προαποπτωτικές επιδράσεις. Φαίνεται ότι μόρια με πολλαπλές υδροξυλικές ομάδες, κυρίως στον Β δακτύλιο, οδηγούν σε αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών υδροξυλίου μέσω της αντίδραση Fenton. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων μορίων αποτελούν η μυρικετίνη και η μπαϊσελεΐνη (Heim et al., 2002).

1.4.2.1 Ελεύθερες ρίζες

Οι ελεύθερες ρίζες είναι δραστικά μόρια ή άτομα με πολλαπλούς μηχανισμούς δράσης πάνω σε βασικά βιομόρια, όπως τα λιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης, οι πρωτεΐνες και το DNA. Παράγονται από εξωγενείς και ενδογενείς πηγές με κυριότερη από αυτές τα κύτταρα που ενέχονται σε φλεγμονώδεις διαδικασίες. Το χαρακτηριστικό των ελευθέρων ριζών είναι ότι περιέχουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Το ελεύθερο αυτό ηλεκτρόνιο μπορεί να δεσμεύσει ένα ηλεκτρόνιο από άλλο μόριο, να ενωθεί με άλλο μόριο

ή να απεμπλακεί τελείως και να επανενωθεί με κάποιο άλλο μόριο. Είναι αυτή η τάση των ελευθέρων ριζών να δίνουν ή να παίρνουν ηλεκτρόνια από άλλα μόρια ή να ενώνονται με άλλα μόρια, που τις καθιστά τόσο ασταθείς, αλλά και ταυτόχρονα τόσο δραστικές (Katsoulis, 2006).

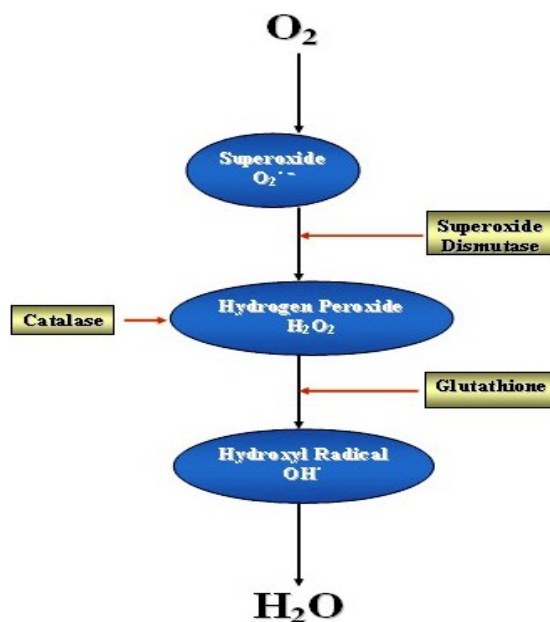
Μερικές ελεύθερες ρίζες περιέχουν οξυγόνο και για αυτό ονομάζονται δραστικές μορφές οξυγόνου. Υπάρχουν όμως και ορισμένες ενώσεις του οξυγόνου, όπως για παράδειγμα το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και το μονήρες οξυγόνο (O_2) που, ενώ δεν είναι ελεύθερες ρίζες, συμπεριλαμβάνονται σε αυτές, διότι είναι χημικά πολύ δραστικές και μπορούν να οδηγήσουν στον σχηματισμό ελευθέρων ριζών (Katsoulis, 2006). Έχει βρεθεί ότι οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν κυτταρική γήρανση, μεταλλαξιγένεση, καρκινογένεση, στεφανιαία νόσο, ενώ σχετίζονται και με διάφορες νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπως οι νόσοι του Πάρκινσον και του Αλτσχάιμερ, πιθανότατα μέσω αποσταθεροποίησης των μεμβρανών, βλάβης στο DNA και οξειδωσης της λιποπρωτεΐνης LDL (*Εικόνα 9*) (Heim et al., 2002).



Εικόνα 9: Δράση των ελευθέρων ριζών

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 οξείδωση αυτού του υποστρώματος (Halliwell, 2001). Οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί χωρίζονται σε ενζυμικούς και μη ενζυμικούς (*Εικόνα 10*) (Λουκίδης, 2007). 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 (SODs), την καταλάση και τις περοξειδάσες. Σε κυτταρικό επίπεδο υπάρχει μία δεύτερη γραμμή άμυνας που αφορά ειδικές πρωτεΐνες, όπως οι θειορεδοξίνες, οι οξυγενάσες της αίμης, και οι αναγωγάσες. Τα αντιοξειδωτικά είναι οι κύριοι μηχανισμοί άμυνας στο οξειδωτικό στρες και ανάλογα με την έκφραση τους σε κυτταρικό επίπεδο καθώς και με την ισχύ του γονιδιακού τους φορτίου, μπορεί να ελέγχουν την ανάπτυξη, αλλά και την πορεία διαφόρων χρόνιων παθήσεων (Λουκίδης, 2007).



Εικόνα 10: Δράση αντιοξειδωτικών μηχανισμών

1.5 Τοποϊσομεράσες

1.5.1 Είδη τοποϊσομερασών

Στο κύτταρο η τοπολογία του DNA καθορίζεται από ένζυμα που είναι γνωστά ως τοποϊσομεράσες. Τα ένζυμα αυτά είναι απαραίτητα για την αντιγραφή, τη μεταγραφή και τον ανασυνδυασμό και παίζουν και σημαντικό ρόλο στην δομή, τη συμπύκνωση και αποσυμπύκνωση και τον διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων (Stasie et al., 1995). Είναι επίσης σημαντικά κατά την διάρκεια του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της κυτταρικής διαφοροποίησης (Constantinou et al., 1995). Οι DNA τοποϊσομεράσες βρίσκονται σε όλα τα ευκαρυωτικά και προκαρυωτικά κύτταρα, ενώ και μερικοί φάγοι και ιοί κωδικοποιούν τις δικές τους τοποϊσομεράσες (Roca, 1995). Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον για τις τοποϊσομεράσες έχει αυξηθεί, διότι αποτελούν κύριους κυτταρικούς στόχους για μερικά από τα πιο γνωστά αντιβιοτικά και αντικαρκινικά φάρμακα (Stasie et al., 1995).

Όλα τα κύτταρα περιέχουν δύο υψηλά συντηρημένες τάξεις τοποϊσομερασών, οι οποίες διαφέρουν τόσο στο μηχανισμό όσο και στις φυσικές ιδιότητες. Τα ένζυμα του τύπου I, ο οποίος περιλαμβάνει τις βακτηριακές τοποϊσομεράσες I και III καθώς και τις ευκαρυωτικές τοποϊσομεράσες I και III, είναι μονομερή, λειτουργούν χωρίς ενεργειακό συμπράγοντα και καταλύουν τη χαλάρωση του υπερσπειρωμένου DNA. Τα ένζυμα του τύπου II περιλαμβάνουν την βακτηριακή DNA γυράση, την βακτηριακή τοποϊσομεράση IV καθώς και την ευκαρυωτική τοποϊσομεράση II και χρησιμοποιούν την ενέργεια από την υδρόλυση του ATP για να ρυθμίζουν την τοπολογία του DNA (Stasie et al., 1995). Συνοπτικά, οι τοποϊσομεράσες αλλάζουν την τοπολογική κατάσταση του DNA καταλύοντας μια διεργασία τριών βημάτων:

1. Διάσπαση του ενός ή και των δύο κλώνων του DNA
2. Πέρασμα ενός τμήματος του DNA διαμέσου του ανοίγματος που δημιουργείται από τη διάσπαση
3. Επανασύνδεση του διασπασμένου DNA

Στα θηλαστικά έχει ταυτοποιηθεί μόνο μία μορφή της τοποϊσομεράσης I, ενώ έχουν περιγραφεί δύο ισοένζυμα της τοποϊσομεράσης II: η α μορφή και η β μορφή. Τα δύο ισοένζυμα βρίσκονται στον πυρήνα, ρυθμίζονται ανεξάρτητα, διαφέρουν στην απόκρισή τους σε αναστολές και παρουσιάζουν διαφορετική έκφραση σε ανθεκτικές κυτταρικές σειρές (Cummings et al., 1993). Οι τοποϊσομεράσες I και II συνυπάρχουν στα κύτταρα και

καθορίζουν το βαθμό υπερελίκωσης. Για παράδειγμα, οι υπερελικώσεις στα βακτηριακά χρωμοσώματα ρυθμίζονται από την αντίθετη δράση της τοποϊσομεράσης I, η οποία απομακρύνει αρνητικές υπερελικώσεις και της DNA γυράσης που χαλαρώνει το DNA. Τέλος, τα δυο αυτά ένζυμα μπορούν περαιτέρω να χωριστούν σε τέσσερις υποοικογένειες IA, IB, IIA, IIB (**Πίνακας 3**). Μέλη της ίδιας υποοικογένειας είναι όμοια τόσο δομικά όσο και στον μηχανισμό δράσης, ενώ ένζυμα που ανήκουν σε διαφορετικές υποοικογένειες παρουσιάζουν ευδιάκριτες διαφορές (Wang, 2002).

Στους ευκαρυώτες, υπάρχει μία λειτουργική ποικιλότητα μεταξύ των τοποϊσομεράσεων στα διάφορα είδη. Στις ζύμες και στη *Drosophila* υπάρχει μόνο ένας τύπος τοποϊσομεράσης II, ενώ τα θηλαστικά έχουν και τις δύο ισομορφές του ενζύμου, την α και την β. Μελέτες σε αλληλουχίες του γενόματος, δείχνουν ότι όλοι οι οργανισμοί έχουν τουλάχιστον ένα ένζυμο τύπου IA και ένα ένζυμο τύπου II, συνήθως της υποοικογένειας IIA. Εντούτοις, υπάρχουν αρχαία που περιέχουν ένζυμο τύπου IIB (DNA τοποϊσομεράση VI) και κανένα ένζυμο τύπου IIA. Ο τύπος IB βρίσκεται κυρίως στα ευκάρυα, στα αρχαία και στα βακτήρια όμως υπάρχουν και εξαιρέσεις, όπως το βακτήριο *Escherichia coli* και πολλά άλλα βακτήρια. Πράγματι, βακτήρια όπως το *Campylobacter jejuni* και το *Treponema pallidum* έχουν μόνο δύο DNA τοποϊσομεράσες, μία τύπου IA και μία τύπου IIA (Wang, 2002). Οι πολυκύτταροι οργανισμοί έχουν μεγαλύτερο αριθμό DNA τοποϊσομερασών, λόγω των διαφορετικών απαιτήσεων κατά την διάρκεια των διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων. Πειράματα έχουν δείξει ότι η απενεργοποίηση της DNA τοποϊσομεράσης I οδηγεί σε εμβρυϊκό θάνατο μεταξύ του σταδίου των 4 και 16 κυττάρων, ενώ η απενεργοποίηση της DNA τοποϊσομεράσης IIβ οδηγεί σε θάνατο κατά την γένεση. Επιπλέον, η απενεργοποίηση της DNA τοποϊσομεράσης IIIα οδηγεί σε εμβρυϊκό θάνατο αμέσως μετά την εμφύτευση, ενώ μη ενεργή DNA τοποϊσομεράση IIIβ δεν προκαλεί εμβρυϊκές ανωμαλίες, αλλά τα ζώα που φέρουν την μετάλλαξη ζουν μικρότερο χρονικό διάστημα. Τέλος, μεταλλάξεις στο γονίδιο TOP2a, που κωδικοποιεί για την DNA τοποϊσομεράση IIA είναι θνησιγόνες ακόμα και σε κυτταρικές σειρές (Wang, 2002).

Πίνακας 3: Υποοικογένειες των DNA τοποϊσομερασών

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

1.5.2 DNA Τοποϊσομεράση I

1.5.2.1 Χαρακτηριστικά του ενζύμου

Η τοποϊσομεράση I καταλύει τοπολογικές αλλαγές στο DNA, προκαλώντας σπασίματα στον ένα κλώνο και επιτρέποντας την ίδια στιγμή το πέρασμα του άλλου κλώνου (Wang, 1996). Έχει αποτελέσει στόχο διαφόρων φαρμάκων λόγω της αυξημένης έκφρασής της σε καρκινικά συγκριτικά με φυσιολογικά κύτταρα (Cummings et al., 1993).

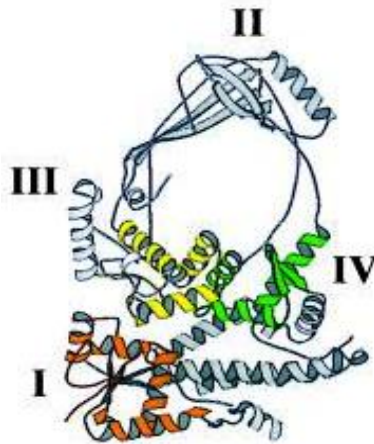
Η τοποϊσομεράση I της *E. coli* προτιμά να συνδέεται σε περιοχές του δίκλωνου ή μονόκλωνου DNA που έχουν διακλαδώσεις και προκαλεί παροδικά σπασίματα στη μία αλυσίδα του DNA. Νουκλεοτιδικές και χημικές εξετάσεις χρησιμοποιώντας ποικίλα DNA υποστρώματα παρουσία και απουσία του ενζύμου, υποδεικνύουν ότι το ένζυμο αλληλεπιδρά και με το 5' και με το 3' άκρο της θέσης του DNA όπου πραγματοποιείται το σπάσιμο και η επανασύνδεση. Επιπλέον, η παρουσία θέσης σύνδεσης του μονόκλωνου DNA στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου, αποδεικνύεται από την ικανότητα του ενζύμου να διασπά τα ολιγοδεοξυνουκλεοτίδια σε μικρά επταμερή. Η θέση διάσπασης εστιάζεται σε τέσσερα νουκλεοτίδια από το 5' άκρο και τρία νουκλεοτίδια από το 3' άκρο. Επίσης, η DNA τοποϊσομεράση III της ζύμης και της *E. coli* φαίνεται ότι διαθέτει μία θέση στο

καταλυτικό κέντρο για την διάσπαση του μονόκλωνου DNA, αλλά η θέση διάσπασης είναι έξι νουκλεοτίδια από το 5' άκρο και ένα νουκλεοτίδιο από το 3' άκρο. Όμως, έχουν αναφερθεί και θέσεις έξω από τα καταλυτικά κέντρα των ενζύμων τύπου IA, οι οποίες εμπλέκονται στην σύνδεση με το DNA ή στο πέρασμα της αλυσίδας του DNA. Κατάλοιπα στο καρβοξυτελικό άκρο της DNA τοποϊσομεράσης I της *E. coli*, τα οποία είναι διαθέσιμα κατά τη χαλάρωση του DNA από το ένζυμο, μπορούν να δεσμεύουν το DNA και να βελτιώνουν τη σταθερότητα του συμπλόκου ένζυμο-DNA (Wang, 1996).

Τα ένζυμα του τύπου IB, όπως η ευκαρυωτική DNA τοποϊσομεράση I, συνδέονται στο δίκλωνο DNA καλύπτοντας μία περιοχή περίπου 20 bp, ενώ δείχνουν και προτίμηση στο αρνητικά ή θετικά υπερελικωμένο DNA, κάτι που πιθανότατα να οφείλεται στις δομικές αλλαγές που επάγονται από την υπερελίκωση του DNA. Η δράση της DNA τοποϊσομεράσης I επηρεάζεται σημαντικά από την μεθυλίωση της κυτοσίνης που βρίσκεται κοντά στην θέση διάσπασης. Η διάσπαση διεγείρεται από τη μεθυλίωση στη θέση -4, αλλά αναστέλλεται από την μεθυλίωση στη θέση -3. Η ανασταλτική επίδραση οφείλεται στην παρουσία της μεθυλικής ομάδας στην μεγάλη αύλακα του DNA, με αποτέλεσμα να παρεμβαίνει στις αλληλεπιδράσεις του ενζύμου με την αύλακα του DNA σε εκείνη την περιοχή. Επίσης και η παρουσία της θυμίνης, αλλά όχι της ουρακίλης, εμποδίζει τη διάσπαση του DNA από το ένζυμο (Wang, 1996).

1.5.2.2 Δομή του ενζύμου

Η τοποϊσομεράση I είναι μια μονομερής πρωτεΐνη 100 kDa η οποία κωδικοποιείται από ένα αντίγραφο ενός γονιδίου 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 (Cummins et al., 1993). Αποτελείται από τέσσερις δομικές περιοχές, οι οποίες διατάσσονται γύρω από μία κεντρική κοιλότητα διαμέτρου 20 Å: μία α/β πτύχωση (Rossmann-fold) (περιοχή I), μία μικρή περιοχή με δομή β-βαρελιού (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* (**Εικόνα 11**). Το κατάλοιπο τυροσίνης που είναι υπεύθυνο για την διάσπαση του DNA βρίσκεται στην περιοχή III (Berger et al., 1998).

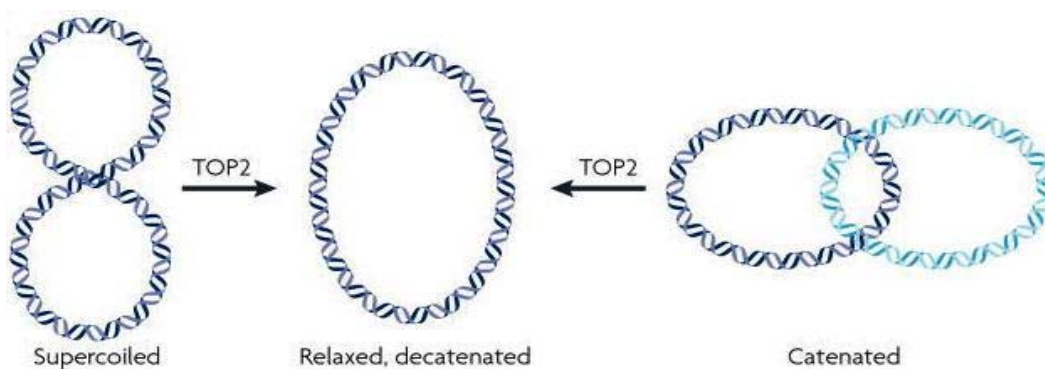


Εικόνα 11: Δομή DNA τοποϊσομεράσης I

1.5.3. DNA Τοποϊσομεράση II

1.5.3.1 Δράση του ενζύμου

Η DNA τοποϊσομεράση II είναι απαραίτητη για τη διαίρεση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, καθώς παίζει καθοριστικό ρόλο στην ολοκλήρωση της μίτωσης, ρυθμίζοντας την τοπολογία του DNA (Jo et al., 2006). Η πιο απλή τοπολογική αλλαγή που καταλύεται από την τοποϊσομεράση II είναι ο διαχωρισμός των συνδεδεμένων αλυσομερών (Nitiss, 2009), ο οποίος απαιτείται κυρίως στην περίπτωση κυκλικών γενωμάτων και πλασμιδίων όπου οι αλυσίδες-υπόβαθρα είναι συνδεδεμένοι κύκλοι (Bjornsti et al., 1999) (*Εικόνα 12*). Μία άλλη σημαντική αλλαγή αφορά τη ρύθμιση της υπερελίκωσης του DNA, όπου το ένζυμο μετατρέπει το DNA σε ένα μόριο ενεργειακά σταθερό χωρίς υπερελικώσεις (Nitiss, 2009).



Εικόνα 12: Δράση DNA τοποϊσομεράσης II

Η τοποϊσομεράση II υπόκειται σε τροποποιήσεις, όπως φωσφορυλίωση, ουβικιτινιλίωση, ενώ έχει παρατηρηθεί και γλυκοσυλίωση της τοποϊσομεράσης II στα θηλαστικά. Η επίδραση αυτών των τροποποιήσεων είναι αρκετά αμφισβητούμενη, όμως όσον αφορά την φωσφορυλίωση φαίνεται ότι ενισχύει την καταλυτική δραστηριότητα του ενζύμου. Για παράδειγμα, φωσφορυλίωση της DNA τοποϊσομεράσης II στην *Drosophila* από την πρωτεϊνική κινάση C έχει αναφερθεί ότι ενισχύει την καταλυτική δραστηριότητα, λόγω αύξησης του ρυθμού υδρόλυσης του ATP (Wang, 1996).

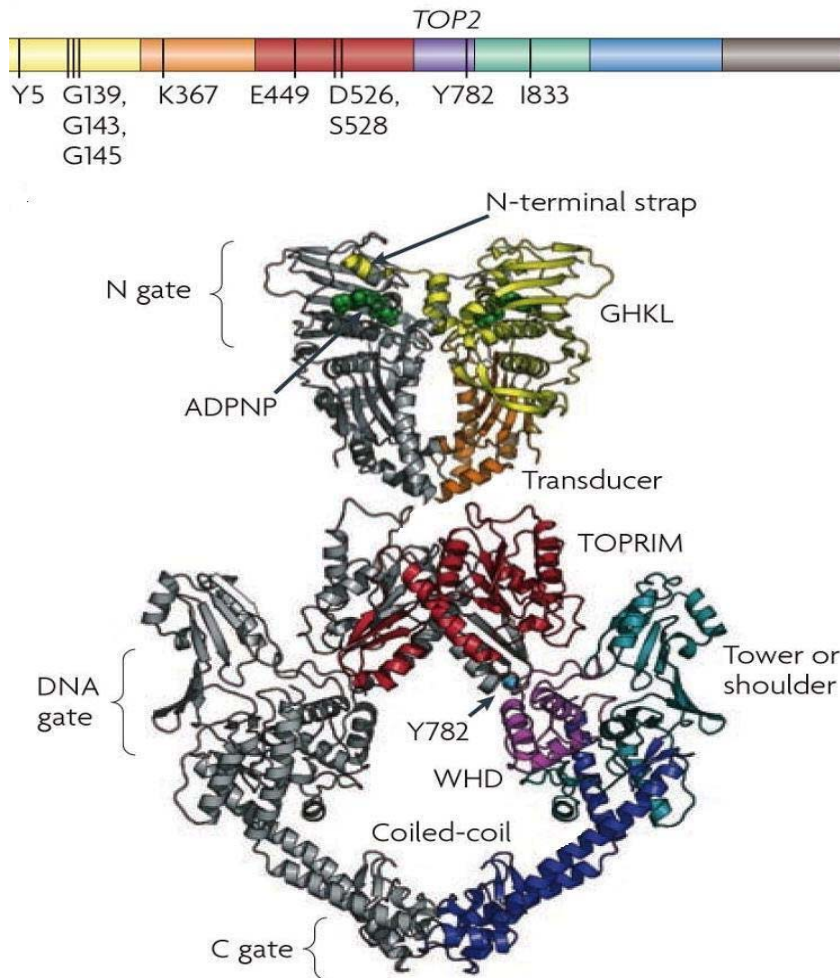
Η έκφραση της τοποϊσομεράσης II εξαρτάται από την κατάσταση πολλαπλασιασμού των κυττάρων και από την φάση του κυτταρικού κύκλου. Η τοποϊσομεράση II δεν ανιχνεύεται σε G_0 κύτταρα, αυξάνεται δραματικά στη φάση S, κορυφώνεται κατά το πέρασμα από τη φάση G_2 στην M και μετά μειώνεται. Αντιθέτως, η β μορφή παραμένει σταθερή κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου και ανιχνεύεται σε G_0 κύτταρα. Κύτταρα στην φάση αύξησης είναι πιο άφθονα στην πρωτεΐνη α , ενώ κύτταρα που δεν διαιρούνται είναι πιο άφθονα στην πρωτεΐνη β (Cummings et al., 1993). Σε ποντίκια, κατά την ανάπτυξη του εγκεφάλου, η σύνθεση του mRNA της τοποϊσομεράσης II σχετίζεται με τη μιτωτική δραστηριότητα περιοχών του εγκεφάλου που αναπτύσσονται γρήγορα, ενώ το mRNA της τοποϊσομεράσης IIβ ανιχνεύεται στα διαφοροποιημένα νευρικά κύτταρα (Wang, 1996). Μάλιστα, η υψηλή έκφραση της α μορφής έχει συσχετιστεί με επιθετικά νεοπλασμάτα τα οποία παρουσιάζουν υψηλούς ρυθμούς πολλαπλασιασμού (Cummings et al., 1993).

1.5.3.2 Δομή του ενζύμου

Η τοποϊσομεράση II είναι ένα υψηλά συντηρημένο ένζυμο και αποτελεί αποτέλεσμα της συγχώνευσης 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 (Benedetti et al., 1999). Το ένζυμο διαθέτει μια περιοχή σύνδεσης στο DNA, που είναι διμερής, και μία περιοχή σύνδεσης του ATP στο αμινοτελικό άκρο (Berger et al., 1998), η οποία περιλαμβάνει μια GHKL πτύχωση που συναντάται σε ποικίλες ATPάσες (Nitiss et al. 2009). Φαίνεται ότι το ένζυμο έχει και δράση ATPάσης, η οποία είναι απαραίτητη για την πλήρη ενζυμική δραστηριότητα (Berger et al., 1998). Το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης δεν είναι συντηρημένο μεταξύ των τοποϊσομερασών II που βρίσκονται σε διαφορετικά είδη και ούτε μεταξύ των ισομορφών α και β . Πιθανόν, το καρβοξυτελικό άκρο να είναι απαραίτητο για τον πυρηνικό εντοπισμό, τη ρύθμιση της δραστηριότητας και

για τις αλληλεπιδράσεις του ενζύμου με άλλα πρωτεϊνικά μόρια. Το καρβοξυτελικό άκρο της ATPάσης καταλήγει στην περιοχή μετατροπέα (transducer), η οποία είναι σημαντική για την σύνδεση και υδρόλυση του ATP. Μία ακόμα σημαντική περιοχή του μορίου είναι η TOPRIM, η οποία τοποθετείται μακριά από τη θέση της ενεργής τυροσίνης και συμμετέχει στη διάσπαση του DNA. Όμως κατά τη διάρκεια της διάσπασης και επανασύνδεσης, η περιοχή TOPRIM και η τυροσίνη του ενεργού κέντρου έρχονται κοντά και αλληλεπιδρούν. Η τυροσίνη του ενεργού κέντρου αποτελεί μέρος μίας περιοχής που είναι όμοια με την καταβολική ενεργή πρωτεΐνη (CAP-like domain). Δίπλα στην τυροσίνη του ενεργού κέντρου βρίσκεται μία περιοχή «πύργος» η οποία οδηγεί σε μια μακριά υπερελίκωση (coiled coil), που καταλήγει στην διασύνδεση των υπομονάδων του διμερούς (**Εικόνα 13**) (Nitiss, 2009).

Οι δύο ισομορφές του ενζύμου έχουν βρεθεί στα σπονδυλωτά, αλλά όχι στους κατώτερους ευκαρυώτες. Η α μορφή είναι μία ομοδιμερής πρωτεΐνη 170 kDa, κωδικοποιείται από ένα αντίγραφο ενός γονιδίου που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17q21-22 και εντοπίζεται στο πυρηνόπλασμα. Η β μορφή έχει μοριακό βάρος 180 kDa, έχει χαρτογραφηθεί στο χρωμόσωμα 3p24 και εντοπίζεται αποκλειστικά στον πυρηνίσκο (Cummings et al., 1993). Η β μορφή έχει βρεθεί ότι υποβάλλεται σε εναλλακτικό μάτισμα. Το μεγαλύτερο σε μήκος, αλλά λιγότερο άφθονο Πβ-2 mRNA κωδικοποιεί πέντε επιπλέον αμινοξέα (Thr-Leu-Phe-Asp-Gln) μετά την Val-23, τα οποία ματίζονται και προκύπτει το mRNA Πβ-1, το οποίο έχει μικρότερο μήκος και είναι πιο άφθονο. Το κομμάτι το οποίο απομακρύνεται δεν φαίνεται να επηρεάζει την δραστηριότητα του ενζύμου, αλλά είναι άγνωστο αν η παρουσία ή η απουσία του πεπτιδίου επιδρά στην κυτταρική τοπολογία του ενζύμου ή στην αλληλεπίδραση του με άλλα κυτταρικά μόρια (Wang, 1996).



Εικόνα 13: Δομή DNA τοποϊσομεράσης II

1.5.3.3 Βιολογικές λειτουργίες της DNA τοποϊσομεράσης II

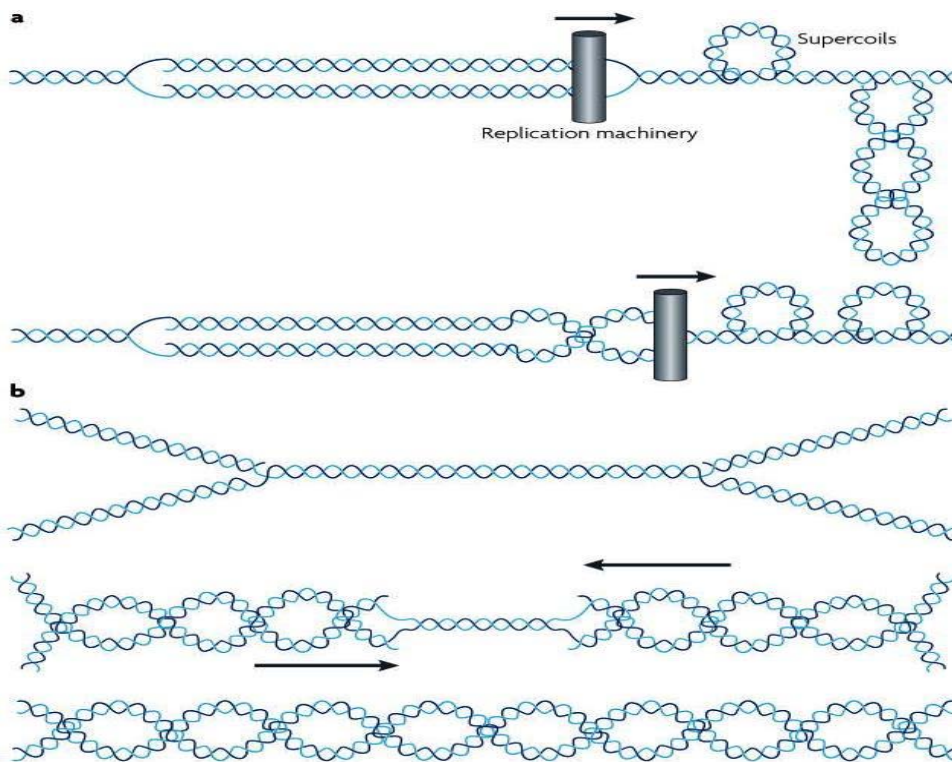
Η DNA τοποϊσομεράση II παίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές βιολογικές λειτουργίες, όπως η αντιγραφή, η μεταγραφή και ο διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων, καθώς και σε διαδικασίες απαραίτητες για την πρόληψη της καρκινογένεσης όπως η διατήρηση της δομής των χρωμοσωμάτων και η σταθερότητα του γενώματος (Nitiss, 2009).

- **Ρόλος της τοποϊσομεράσης II στην αντιγραφή**

Ένας από τους σημαντικότερους ρόλους της τοποϊσομεράσης II είναι να λύνει τοπολογικά προβλήματα που δημιουργούνται κατά την διάρκεια της αντιγραφής (Nitiss, 2009). Ο ημισυντηρητικός μηχανισμός της αντιγραφής περιλαμβάνει το ξετύλιγμα του

δίκλωνου DNA και την αντιγραφή του κάθε κλώνου. Απουσία δραστηριότητας τοποϊσομεράσης το ξετύλιγμα του πατρικού κλώνου οδηγεί σε συσσώρευση θετικών υπερελικώσεων μπροστά από την αντιγραφική διχάλα, οι οποίες χαλαρώνονται είτε από την τοποϊσομεράση I, είτε από την τοποϊσομεράση II. Επιπλέον, καθώς προχωρά η αντιγραφή, κάθε θυγατρικό δίκλωνο μπορεί να περιστρέφεται γύρω από το άλλο, σε ένα στάδιο που ονομάζεται προσύνδεση αλυσομερών (**Εικόνα 14a**). Αυτά τα αλυσομερή αποτελούν ένα υπόστρωμα για την τοποϊσομεράση II και πιθανόν αντιπροσωπεύει έναν μηχανισμό για την δράση του ενζύμου κατά τη διάρκεια της επιμήκυνσης. Μελέτες αντιγραφής στα βακτήρια παρέχουν σαφή στοιχεία για τον σχηματισμό των αλυσομερών και είναι πιθανόν ότι αυτός ο μηχανισμός είναι σημαντικός και για τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Στα τελευταία στάδια της αντιγραφής, όταν οι δύο αντιγραφικές διχάλες συγκρούονται, δεν υπάρχει χώρος για την τοποϊσομεράση I να χαλαρώσει τις θετικές υπερελικώσεις και η ολοκλήρωση της αντιγραφής οδηγεί σε δύο συνδεδεμένα αλυσομερή. Η δράση της τοποϊσομεράσης II είναι απαραίτητη για την διάλυση των διμερών (**Εικόνα 14b**) (Nitiss, 2009).

Απουσία της τοποϊσομεράσης II, τα προϊόντα της αντιγραφής ενός μικρού κυκλικού DNA *in vitro* είναι ενωμένα διμερή πλασμιδίων. Η απαίτηση για την τοποϊσομεράση II στην αντίδραση με το χρωμοσωμικό DNA παρατηρήθηκε αρχικά στην ζύμη. Κύτταρα ζύμης που έχουν μόνο την τοποϊσομεράση II είναι βιώσιμα και υποβάλλονται σε φυσιολογική αντιγραφή του DNA, χωρίς ενεργοποίηση των σημείων ελέγχου που εξαρτώνται από την φάση S. Απουσία της τοποϊσομεράσης II, τα κύτταρα ολοκληρώνουν την αντιγραφή και πεθαίνουν όταν εισέρχονται στην μίτωση. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός, ότι οι επιδράσεις στην αντιγραφή διαφέρουν μεταξύ κυττάρων ζύμης που στερούνται το ένζυμο και κυττάρων που περιέχουν μία μη ενεργή πρωτεΐνη. Κύτταρα με μειωμένη έκφραση τοποϊσομεράσης II μπορούν να ολοκληρώσουν την αντιγραφή, αλλά όχι την αποσυμπύκνωση του χρωμοσώματος και συνεπώς δεν είναι βιώσιμα κατά την μίτωση. Όμως, η έκφραση μίας ανενεργής καταλυτικά πρωτεΐνης οδηγεί σε ένα διαφορετικό φαινότυπο, την αποτυχία ολοκλήρωσης της αντιγραφής στις περιοχές που συναντώνται οι αντιγραφικές διχάλες (Nitiss, 2009). Ένα πιθανό μοντέλο για αυτά τα αποτελέσματα είναι ότι η τοποϊσομεράση II φυσιολογικά δρα όπου συναντιούνται οι διχάλες. Σε πλήρη απουσία της πρωτεΐνης η αντιγραφή ολοκληρώνεται με τα προϊόντα της αντίδρασης να είναι συνδεδεμένες αδελφές χρωματίδες, ενώ η παρουσία καταλυτικά μη ενεργής πρωτεΐνης παρεμβαίνει στην ολοκλήρωση της αντιγραφής, οδηγώντας σε επαγωγή του σημείου ελέγχου (Nitiss, 2009).

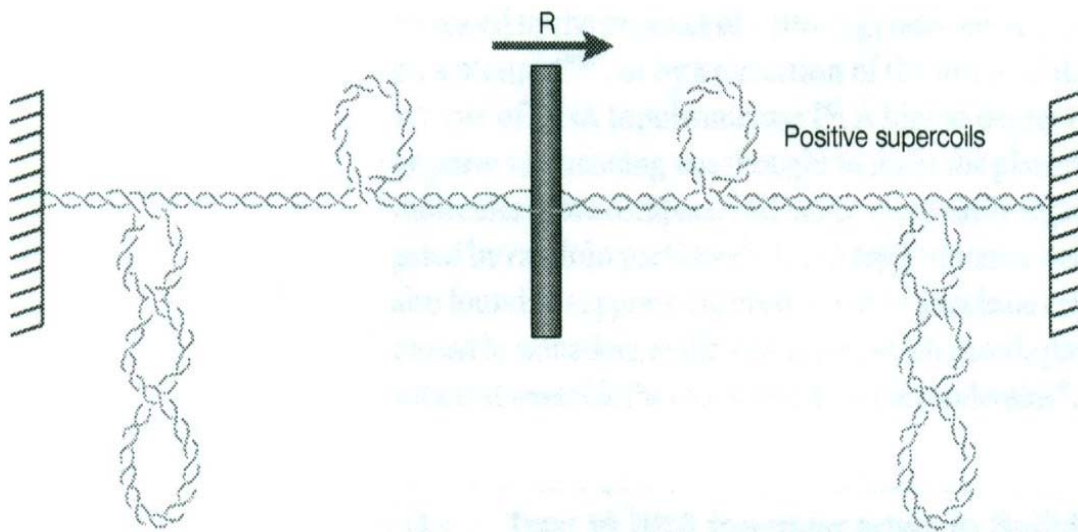


Εικόνα 14: Ρόλος της DNA τοποϊσομεράσης II στην αντιγραφή

- Ρόλος της τοποϊσομεράσης II στην μεταγραφή

Κατά τη διάρκεια της μεταγραφής η μετακίνηση της RNA-πολυμεράσης οδηγεί σε θετική υπερελίκωση μπροστά από το μεταγραφικό σύμπλοκο και σε αρνητική υπερελίκωση πίσω από αυτό (**Εικόνα 15**). Λόγω της υπερελίκωσης είναι απαραίτητη η δράση των τοποϊσομερασών κατά το στάδιο της επιμήκυνσης (Nitiss, 2009). Τα ένζυμα τύπου II στους προκαρυώτες, κυρίως η DNA γυράση, απομακρύνουν θετικές υπερελικώσεις, ενώ τα ένζυμα τύπου IA είναι σημαντικά για την απομάκρυνση αρνητικών υπερελικώσεων (Wang, 2002). Στις ζύμες η έλλειψη ενός τύπου τοποϊσομεράσης δεν μπλοκάρει την μεταγραφή, αλλά η απουσία της δραστηριότητας και των δύο τύπων ενζύμου, μπλοκάρει ισχυρά την διαδικασία της μεταγραφής και κυρίως επιδρά στην μεταγραφή που καταλύεται από την RNA-πολυμεράση I (Nitiss, 2009). Πρόσφατες έρευνες φανερώνουν ότι οι τοποϊσομεράσες, κυρίως η τοποϊσομεράση IIβ, παίζουν σημαντικό ρόλο και στην έναρξη της μεταγραφής. Το συγκεκριμένο ένζυμο εντοπίζεται σε

υποκινητές γονιδίων και η ενζυμική του δραστηριότητα είναι απαραίτητη για την αποδοτική έναρξη μεταγραφής (Nitiss et al., 2009).



Εικόνα 15: Ρόλος της DNA τοποϊσομεράσης II στην μεταγραφή

- Ρόλος της τοποϊσομεράσης II στον διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων

Η DNA τοποϊσομεράση II παίζει σημαντικό ρόλο στον διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων. Η αναστολή της τοποϊσομεράσης II στη *Drosophila* εμποδίζει τον διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων κατά τη διάρκεια της ανάφασης. Το ίδιο αποτέλεσμα προέκυψε και από μελέτες σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών, στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν μόρια που αναστέλλουν την ευκαρυωτική τοποϊσομεράση II, όπως ετοποσίδη, τενιποσίδη ή αμσακρίνη (Wang, 1996). Επιπλέον βρέθηκε ότι ο μη σωστός διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων οδηγεί σε σπασίματα στο DNA με έναν εξαιρετικά υψηλό ρυθμό (Bjornsti et al., 1999). Όμως *in vivo* μελέτες οδήγησαν σε πιο σύνθετα αποτελέσματα, γεγονός που πιθανώς οφείλεται στη σύνθετη απόκριση των κυττάρων ανάλογα με το μόριο-αναστολέα της τοποϊσομεράσης II που χρησιμοποιείται (Wang, 1996).

- Ρόλος της τοποϊσομεράσης II στην δομή των χρωμοσωμάτων

Η τοποϊσομεράση II παίζει ρόλο κλειδί στην δομή των χρωμοσωμάτων (Nitiss, 2009) και στο τελικό στάδιο της συμπύκνωσής τους και πιθανόν και σε συγκεκριμένες

φάσεις της αποσυμπύκνωσης (Wang, 1996). Έχει ταυτοποιηθεί μια χρωμοσωμική σκαλωσιά που περιλαμβάνει την τοποϊσομεράση IIa και ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο συμπύκνωσης (condensin), το οποίο είναι σημαντικό για την ένωση και τον διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων (Nitiss, 2009). Πειράματα που έχουν γίνει σε ευκαρυώτες, στη *Drosophila* και σε 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).

- *Τοποϊσομεράση II και σταθερότητα του γενώματος*

Γενετικές και βιοχημικές μελέτες δείχνουν ότι οι τοποϊσομεράσες εμπλέκονται στην σταθερότητα του γενώματος (Wang, 1996). Η απενεργοποίηση οποιασδήποτε τοποϊσομεράσης αυξάνει την συχνότητα του μιτωτικού ανασυνδυασμού, ενώ έχει βρεθεί ότι η απενεργοποίηση της DNA τοποϊσομεράσης III αυξάνει το ρυθμό των ελλείψεων. Όμως, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες η απενεργοποίησή τους με χρήση αναστολέων μπορεί να προκαλέσει γενωμική αστάθεια. Επεξεργασία κυττάρων με φάρμακα που σταθεροποιούν το ενδιάμεσο σύμπλοκο μεταξύ του ενζύμου και του DNA, όπως είναι η καμπτοθεκίνη, βρέθηκε ότι διεγείρουν τόσο χρωμοσωμικές ελλείψεις, όσο και τις ανταλλαγές μεταξύ των αδερφών χρωματίδων (Wang, 1996).

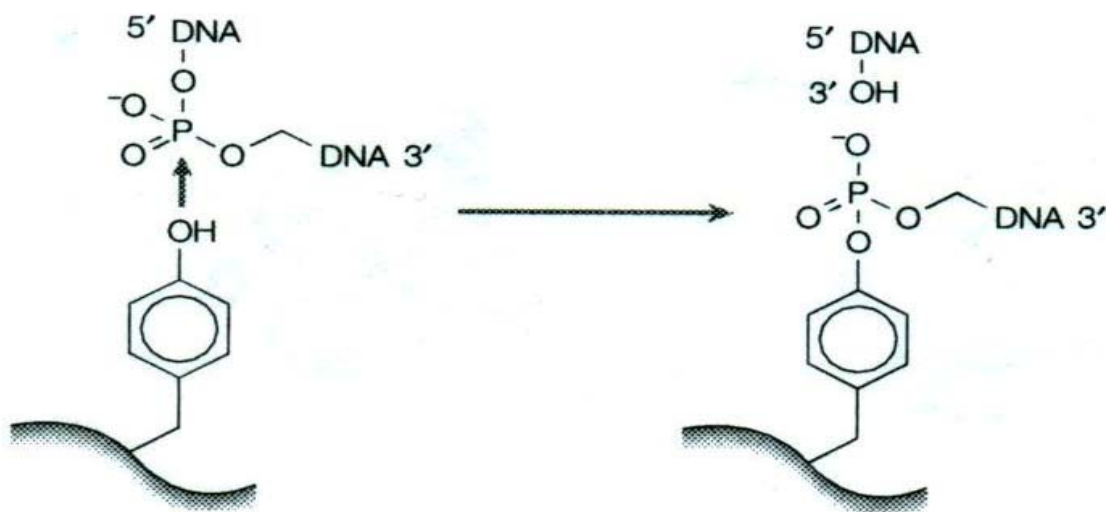
1.5.4 Μηχανισμός δράσης της τοποϊσομεράσης II

1.5.4.1 Διάσπαση του DNA

Η τοποϊσομεράση II έχει την ιδιότητα να διασπά και να ενώνει τον φωσφοδιεστερικό κορμό του DNA, μέσω δύο διαδοχικών αντιδράσεων (Roca, 1995). Κατά την αντίδραση διάσπασης της αλυσίδας του DNA από την τοποϊσομεράση II, η υδροξυλική ομάδα της τυροσίνης του ενζύμου προσβάλλει ένα μόριο φωσφόρου στο DNA προκαλώντας διάσπαση ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού. Η επανασύνδεση της αλυσίδας του DNA συμβαίνει με την αντιστροφή της παραπάνω αντίδρασης. Το μόριο οξυγόνου της ελεύθερης υδροξυλικής ομάδας που δημιουργήθηκε στην πρώτη αντίδραση, προσβάλλει τον φώσφορο που είναι συνδεδεμένος με την τυροσίνη, οδηγώντας σε διάσπαση του

ομοιοπολικού δεσμού μεταξύ του DNA και της πρωτεΐνης και επανασύνδεση του κορμού του DNA (**Εικόνα 16**) (Wang, 2002).

Συνήθως, η δεύτερη αντίδραση αποκαθιστά τον αρχικό φωσφοδιεστερικό δεσμό. Όμως, υπό συγκεκριμένες συνθήκες, οι DNA τοποϊσομεράσες μπορεί να προκαλέσουν τη μεταφορά ενός άκρου του DNA σε ένα διαφορετικό άκρο, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε ενσωμάτωση ή αποκοπή του DNA σε συγκεκριμένες θέσεις (Bjornsti et al., 1999). Φαίνεται ότι σημαντικό ρόλο στον μηχανισμό του ενζύμου παίζει και μία συντηρημένη αργινίνη, που βρίσκεται δίπλα στο κατάλοιπο τυροσίνης, καθώς η μετάλλαξή της επηρεάζει τόσο την χαλάρωση όσο και την διάσπαση του DNA (Berger et al., 1998). Οι παραπάνω αντιδράσεις προκαλούν παροδικά ανοίγματα στο DNA που επιτρέπουν το πέρασμα της διπλής έλικας (Wang, 2002) και επειδή η ενέργεια του δεσμού διατηρείται κατά την δημιουργία του συμπλόκου ενζύμου-DNA, δεν απαιτείται ενεργειακός συμπαραγοντας για την διάσπαση και επανασύνδεση του DNA (Roca, 1995).



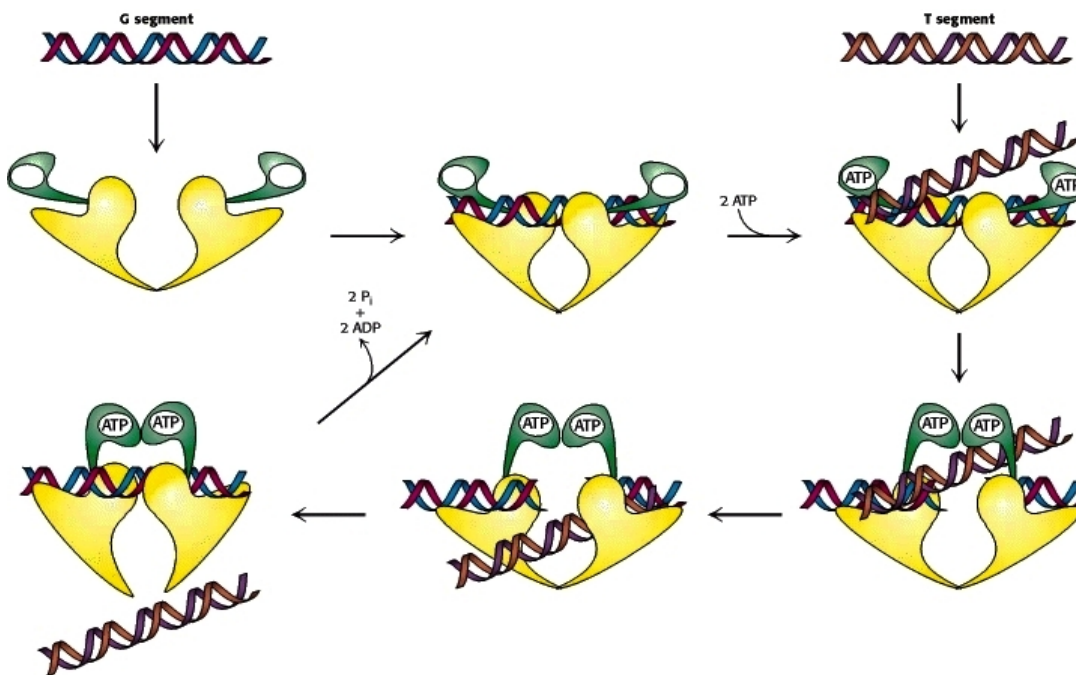
Εικόνα 16: Διάσπαση του DNA

1.5.4.2 Μηχανισμός τοποϊσομεράσης II

Η τοποϊσομεράση II λειτουργεί σαν ένα διμερές μόριο και η δράση της εξαρτάται από την σύνδεση και υδρόλυση του ATP (Roca, 1995). Η σύνδεση του ATP πυροδοτεί το πέρασμα της αλυσίδας του DNA και η υδρόλυση είναι απαραίτητη για την ανακύκλωση της τοποϊσομεράσης II (Kingma et al., 2001). Έχει παρατηρηθεί ότι απουσία του ATP η γυράση στην *E. coli* μπορεί αργά να χαλαρώσει το αρνητικά, αλλά όχι το θετικά

υπερελικωμένο DNA. Ομοίως, οι μεταλλάξεις του ενζύμου όπου η Gly στην θέση 144 έχει αντικατασθεί από Pro, Val ή Ile, με αποτέλεσμα την μείωση της δραστηριότητας ATPάσης της πρωτεΐνης, εμποδίζουν τη χαλάρωση του DNA (Wang, 1996).

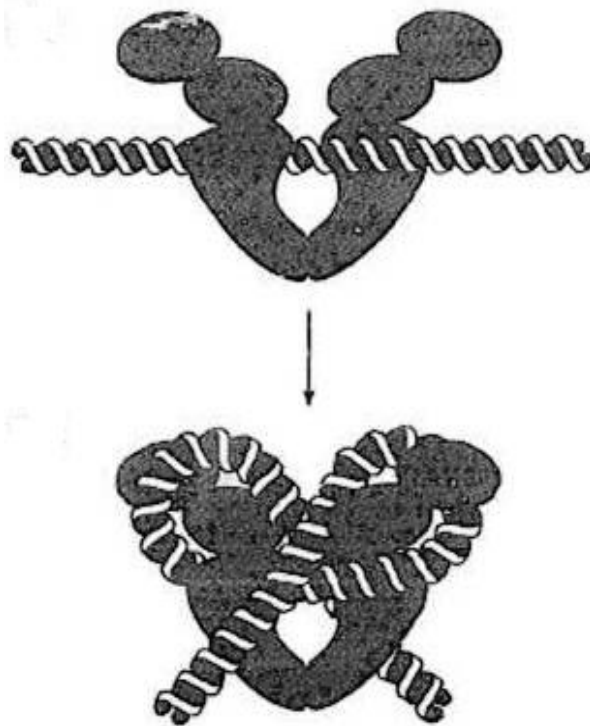
Αρχικά το ένζυμο συνδέεται με ένα δίκλωνο τμήμα DNA (τμήμα G), όπου ο κάθε κλώνος του τοποθετείται δίπλα από ένα κατάλοιπο τυροσίνης, ένα από κάθε μονομερές, ικανό να σχηματίζει μία ομοιοπολική σύνδεση με τον κορμό του DNA (*Εικόνα 17*). Στη συνέχεια, ένα δεύτερο δίκλωνο τμήμα (τμήμα T), συνδέεται χαλαρά σε αυτό το σύμπλοκο (Roca, 1995). Κάθε μονομερές του ενζύμου έχει μία δομική περιοχή που δεσμεύει ATP, και η δέσμευση αυτή οδηγεί σε αλλαγή της στερεοδιάταξης που ευνοεί το πλησίασμα των δύο δομικών περιοχών και τον εγκλωβισμό των τμημάτων. Ακολουθεί διαχωρισμός και διάσπαση των δύο κλώνων του τμήματος G, με αποτέλεσμα το τμήμα T να περνά διαμέσου του διασπασμένου τμήματος στην μεγάλη κεντρική κοιλότητα. Η επανασύνδεση του τμήματος G οδηγεί στην ελευθέρωση του τμήματος T. Η υδρόλυση του ATP και η ελευθέρωση ADP και ορθοφωσφορικού επιτρέπουν στις δομικές περιοχές δέσμευσης ATP να χωρίσουν, προετοιμάζοντας το ένζυμο να δεσμεύσει ένα άλλο τμήμα T. Παρόλο που η υδρόλυση του ATP είναι απαραίτητη για την δράση του ενζύμου, οι τοπολογικές αλληλομετατροπές που καταλύονται στο DNA συνήθως καθορίζονται από τις ελεύθερες ενέργειες των τμημάτων G και T (Roca, 1995).



Εικόνα 17: Μηχανισμός δράσης της τοποϊσομεράσης II

1.5.4.3 Μηχανισμός δράσης της DNA γυράσης

Η DNA γυράση είναι ένας ειδικός τύπος τοποϊσομεράσης II που καταλύει την εισαγωγή αρνητικών υπερελικώσεων στο DNA. Η μοναδική αυτή ιδιότητά της οφείλεται στην γεωμετρία του συμπλόκου DNA-γυράση, που επιτρέπει μόνο την μεταφορά του DNA η οποία πραγματοποιείται μεταξύ τμημάτων G και T που βρίσκονται στο ίδιο μόριο, ενώ διασφαλίζει πάντα την μετατροπή των θετικών υπερσπειρώσεων σε αρνητικές (Roca, 1995). Σε αντίθεση με τις άλλες τύπου II τοποϊσομεράσες που φαίνεται να αλληλεπιδρούν με μικρά και ανεξάρτητα τμήματα DNA, η DNA γυράση αλληλεπιδρά με μοναδικά τμήματα DNA μήκους περίπου 150 bp, που τυλίγονται γύρω από το ένζυμο με ένα δεξιόστροφο τρόπο, με αποτέλεσμα να έρχονται κοντά οι αμινοτελικές περιοχές του ενζύμου και να δημιουργείται μία είσοδος για το τμήμα T (*Εικόνα 18*). Στη συνέχεια ο μηχανισμός είναι ο ίδιος που ακολουθούν και οι άλλες τοποϊσομεράσες II (Roca, 1995).



Εικόνα 18: Μηχανισμός δράσης της DNA γυράσης

1.5.5 Τοποϊσομεράσες και καρκίνος

1.5.5.1 Οι τοποϊσομεράσες ως στόχοι αντικαρκινικών φαρμάκων

Η ταυτοποίηση των τοποϊσομερασών ως κρίσιμων στόχων στο μηχανισμό των αντικαρκινικών φαρμάκων πραγματοποιήθηκε στα μέσα του 1980 μετά από μελέτες στις οποίες βρέθηκε, ότι προκαλούσαν μονόκλωνα και δίκλωνα σπασίματα στο DNA καρκινικών κυττάρων *in vitro*. Επιπλέον, βρέθηκε ότι διάφορα φάρμακα συμμετείχαν στις βλάβες του DNA παρεμβαίνοντας στον καταλυτικό κύκλο των ενζύμων και παγιδεύοντας την πρωτεΐνη σε ένα διασπασίμο σύμπλοκο. Η δράση αυτή αφήνει την τοποϊσομεράση ομοιοπολικά συνδεδεμένη με το DNA, καλύπτοντας την θέση διάσπασης (Cummings et al., 1993). Επομένως, οι τοποϊσομεράσες είναι υπεύθυνες για την βλάβη στο DNA και την επαγωγή της απόπτωσης των κυττάρων και αυτό φαίνεται από το γεγονός ότι οι αναστολείς τους είναι περισσότερο αποτελεσματικοί σε κυτταρικές σειρές, οι οποίες εκφράζουν υψηλά επίπεδα της πρωτεΐνης (Cummings et al., 1993). Για παράδειγμα, καρκινικά κύτταρα, τα οποία πολλαπλασιάζονται με υψηλούς ρυθμούς, εκφράζουν την τοποϊσομεράση II 25-300 φορές περισσότερο σε σχέση με φυσιολογικά κύτταρα και αποτελούν στόχους αντικαρκινικών φαρμάκων (Jo et al., 2006). Χαρακτηριστικά παραδείγματα αντικαρκινικών φαρμάκων είναι η καμπτοθεκίνη (camptothecin, CPT), που αναστέλλει ειδικά την τοποϊσομεράση I και τα φάρμακα δαουνομυκίνη (daunomycin, DAU), δοξυκυκλίνη (doxycyclin, DOX), αμσακρίνη (amsacrine, m-AMSA), ετοποσίδη (VP-16) και τενιποσίδη, τα οποία αναστέλλουν την δράση της τοποϊσομεράσης II (Wang et al., 2003).

Αλλα αντικαρκινικά φάρμακα, όπως η κινόνη δρουν αυξάνοντας την παραγωγή των ελευθέρων ριζών, ενώ υπάρχουν και αντικαρκινικά φάρμακα που στοχεύουν άμεσα τα μιτοχόνδρια προκαλώντας το άνοιγμα πόρων, απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και απόπτωση μέσω ενός μιτοχονδριακού μονοπατιού που εξαρτάται από τον πυρήνα. Άλλωστε υπάρχουν μελέτες που αναφέρουν τον διπλό εντοπισμό των τοποϊσομερασών στα μιτοχόνδρια και τον πυρήνα (Wang et al., 2003).

Επομένως, ουσίες οι οποίες στοχεύουν είτε την τοποϊσομεράση I είτε την τοποϊσομεράση II μπορούν να βρουν εφαρμογή στην θεραπεία του καρκίνου, η εφαρμογή τους όμως εξαρτάται από τον τύπο της τοποϊσομεράσης που στοχεύουν και από τον τρόπο δράσης τους. Για παράδειγμα, οι ουσίες καμπτοθεκίνη και τοποτεκάνη είναι

αποτελεσματικές ενάντια αργά αναπτυσσόμενων καρκίνων, οι οποίοι περιέχουν τα ίδια επίπεδα τοποϊσομεράσης I με τους γρήγορα αναπτυσσόμενους όγκους. Αντιθέτως, τα μόρια ετοποσίδη και τενιποσίδη που στοχεύουν την τοποϊσομεράση II, είναι περισσότερο αποτελεσματικά σε καρκινώματα που πολλαπλασιάζονται γρήγορα και εκφράζουν υψηλά επίπεδα τοποϊσομεράσης II (Constantinou et al., 1995).

1.5.5.2 Ανθεκτικότητα καρκινικών κυττάρων στους αναστολείς της τοποϊσομεράσης

Ο κύριος λόγος αποτυχίας των αναστολέων της τοποϊσομεράσης σε μακροχρόνιες θεραπείες είναι το πρόβλημα εμφάνισης ανθεκτικότητας στα συγκεκριμένα μόρια (Cummings et al., 1993). Πολλές κυτταρικές σειρές εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε αναστολείς των τοποϊσομερασών I και II (**Πίνακας 4**). Υπάρχουν κυτταρικές σειρές με χαμηλά επίπεδα ανθεκτικότητας, στις οποίες δεν ανιχνεύεται αλλαγή στην έκφραση ή την λειτουργικότητα των τοποϊσομερασών (HN-1/VP2). Ενδιάμεσα επίπεδα ανθεκτικότητας εμφανίζονται σε κυτταρικές σειρές (Calc18/AMSA) που χαρακτηρίζονται από μειωμένη έκφραση του φυσιολογικού ενζύμου. Μια ενδιαφέρουσα εξαίρεση αποτελεί η κυτταρική σειρά KB-VP2, στην οποία παρουσιάζεται μείωση μέχρι και είκοσι φορές στην έκφραση της τοποϊσομεράσης II, εντούτοις δεν μεταβάλλεται η καταλυτική δραστηριότητα του ενζύμου εξαιτίας της αύξησης της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης.

Τέλος, έχουν αναφερθεί κυτταρικές σειρές (CEM/VM-1-5, CHOcrpt) με υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας, οι οποίες παράγουν γενετικά σταθερά μεταλλαγμένα ένζυμα, με διαφορετική καταλυτική λειτουργία και με υψηλή ικανότητα σταθεροποίησης του διασπάσιμου συμπλόκου σαν απόκριση στους αναστολείς. Αυτές οι γενετικές αλλαγές, οι οποίες εμφανίζονται κυρίως σαν σημειακές μεταλλάξεις σε ένα μόνο αλληλόμορφο, μπορεί να είναι συγκεκριμένες για ένα επιλεγόμενο φάρμακο. Επίσης, σημαντικό στον καθορισμό της χημειοευαισθησίας στους αναστολείς της τοποϊσομεράσης II είναι η αναλογία της α μορφής προς την β μορφή. Μελέτες έχουν δείξει ότι η β πρωτεΐνη είναι τρεις φορές λιγότερο ευαίσθητη στον αναστολέα VM-26, σε σύγκριση με την α πρωτεΐνη και ότι η ανθεκτικότητα σε αυτόν τον αναστολέα μπορεί να οφείλεται στη έλλειψη ευαισθησίας του β ισοενζύμου στο φάρμακο (Cummings et al., 1993).

Λόγω της ανθεκτικότητας είναι απαραίτητο να δημιουργηθούν νέοι συνθετικοί αναστολείς με βελτιωμένη βιοδραστηριότητα. Τα συνθετικά ανάλογα της τριπτυκίνης αποτελούν μια ομάδα αντικαρκινικών φαρμάκων που έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν τόσο την τοποϊσομεράση I όσο και την II, χωρίς να επηρεάζουν το DNA απουσία των

ενζύμων και δρουν σε κυτταρικές σειρές που έχουν αναπτύξει διαφορετικούς μηχανισμούς ανθεκτικότητας σε φάρμακα. Αποτελούν αρκετά αποτελεσματικά αντικαρκινικά μόρια, για παράδειγμα το μόριο TT24 εμποδίζει την βιωσιμότητα καρκινικών κυττάρων με τιμή IC_{50} της τάξεως των 48 nM (Wang, 2003).

Πίνακας 4: Κυτταρικές σειρές με ανθεκτικότητα στους αναστολείς των τοποϊσομερασών

Κυτταρική σειρά	Επιλεγόμενο φάρμακο	Παράγοντας ανθεκτικότητας	Έκφραση	Καταλυτική Δράση	Διάσπαση	Ειδικά χαρακτηριστικά
<i>α, τοπο II</i>						
HN-1/VP2	VP-16	3-φορές	Δεν αλλάζει	Δεν αλλάζει	Δεν αλλάζει	
K6-1	VP-16	11-φορές	Δεν αλλάζει	Δεν αλλάζει	Δεν αλλάζει	
Calc18/AMSA	m-AMSA	10-φορές	Μικρή ↓	3-φορές ↓	Δεν αλλάζει	Καμία τροποποίηση στο γονίδιο, 3-φορές ↑ τοπο I
CHO Vpm5	Μεταλλαξογόνο	20-φορές	Δεν αλλάζει	Δεν αλλάζει	30-φορές ↓	
HL-60/MX2	Μιτοξανδρόνη	35-φορές	Μικρή ↓	4-5-φορές ↓	3-4-φορές ↓	↑ τοπο II στο κυτταρόπλασμα, μόνο η α παρούσα
KB-VP2 CEM/VM-1-5	VP-16 VM-26	50-φορές 140-φορές	20-φορές ↓ Δεν αλλάζει	Δεν μειώνεται 7-φορές ↓	20-φορές ↓ 20-30 φορές ↓	14-18 φορές ↑ στην φωσφορυλίωση της τοπο II Μεταλλαγμένη τοπο II (Αργινίνη 449 σε γλουταμίνη) ↑ 8 φορές η απαίτηση για ATP
HL-60/AMSA	m-AMSA	100-φορές	Δεν αλλάζει	3-φορές ↓	Μεγάλη ↓	Μεταλλαγμένο ένζυμο, αλλαγή στις ιδιότητες διάσπασης και ↑ απαίτησης για ATP
KBM-3/AMSA	m-AMSA	208 φορές			Μεγάλη ↓	Μεταλλαγμένο ένζυμο (αργινίνη 486 σε λυσίνη) δεν σχηματίζει διασπάσιμα σύμπλοκα με το m-AMSA
<i>β, τοπο I</i>						
A549/CPT DC3FC-10 CHO Cpt ^c	CPT11 CPT Μεταλλαξογόνο	2.9 φορές 134-φορές 300-φορές	Δεν αλλάζει Δεν αλλάζει 40-50% ↓	Δεν αλλάζει Μείωση 40-50%	Δεν αλλάζει Μεγάλη μείωση Μεγάλη μείωση	τοπο II 3-φορές ↑ Μεταλλαγμένο ένζυμο με διαφορετική καταλυτική δραστηριότητα και απόκριση στους αναστολείς
RPMI CPT-K5	CPT	300-φορές	50% ↓		> 125-φορές ↓	Μεταλλαγμένο ένζυμο με διαφορετικές ιδιότητες

1.6 Αναστολείς τοποϊσομερασών

1.6.1 Δύο τάξεις αναστολέων

Υπάρχουν δύο τάξεις αναστολέων των τοποϊσομερασών. Η πρώτη τάξη περιλαμβάνει τους καταλυτικούς αναστολείς, οι οποίοι συνδέονται στο ένζυμο πριν αυτό συνδεθεί στο DNA, εμποδίζοντας τον σχηματισμό του διασπάσιμου συμπλόκου. Οι αναστολείς αυτοί είναι γνωστοί και ως ανταγωνιστές της τοποϊσομεράσης, επειδή εμποδίζουν και το πέρασμα της αλυσίδας του DNA και την δράση της δεύτερης τάξης των αναστολέων. Στην δεύτερη τάξη αναστολέων των τοποϊσομερασών ανήκουν κυτταροτοξικοί παράγοντες, γνωστοί ως δηλητήρια τοποϊσομεράσης (poisons), οι οποίοι συνδέονται και σταθεροποιούν το ενδιάμεσο σύμπλοκο, αφού αυτό σχηματιστεί, εμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο την απελευθέρωση της αλυσίδας του DNA (Constantinou et al., 1995). Συνεπώς προκαλούνται δίκλινα σπασίματα λόγω των αλληλεπιδράσεων ή των συγκρούσεων των συμπλόκων με την διχάλα της αντιγραφής, με τα σύμπλοκα της μετάφρασης ή με τις DNA ελικάσες (Wang et al., 2003), με αποτέλεσμα να μπλοκάρονται η αντιγραφή και η μεταγραφή (Nitiss, 2009). Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι η καμπτοθεκίνη, ένας αναστολέας της τοποϊσομεράσης I και η ετοποσίδη, ένας αναστολέας της τοποϊσομεράσης II (Habermeyer et al., 2005).

Τα δηλητήρια των τοποϊσομερασών, χωρίζονται περαιτέρω σε μόρια που παρεμβάλλονται στο DNA και σε μόρια τα οποία δεν παρεμβάλλονται και δεν αλληλεπιδρούν με το DNA. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν μόρια, όπως οι ανθρακυκλίνες, η μιτοξανδρόνη και η αμσακρίνη, τα οποία ενσωματώνονται στη θέση διάσπασης. Πολλά από τα μόρια αυτής της κατηγορίας, πέρα από την δράση τους στην τοποϊσομεράση II, έχουν και άλλες ποικίλες επιδράσεις στα κύτταρα, όπως η παραγωγή ελευθέρων ριζών και βλάβες στις μεμβράνες. Στην δεύτερη κατηγορία ανήκουν μόρια που κυρίως δρουν έναντι της προκαρυωτικής τοποϊσομεράσης II, όπως η ετοποσίδη και η τενιποσίδη και αλληλεπιδρούν αποκλειστικά με την πρωτεΐνη, παγιδεύοντας την στο διασπάσιμο σύμπλοκο (Nitiss, 2009).

Οι αναστολείς της τοποϊσομεράσης II σταθεροποιούν έναν ομοιοπολικό δεσμό μεταξύ ενός καταλοίπου τυροσίνης στην πρωτεΐνη και του 5' φωσφορικού άκρου σε κάθε σπασμένη αλυσίδα του DNA, ενώ οι αναστολείς της τοποϊσομεράσης I σταθεροποιούν

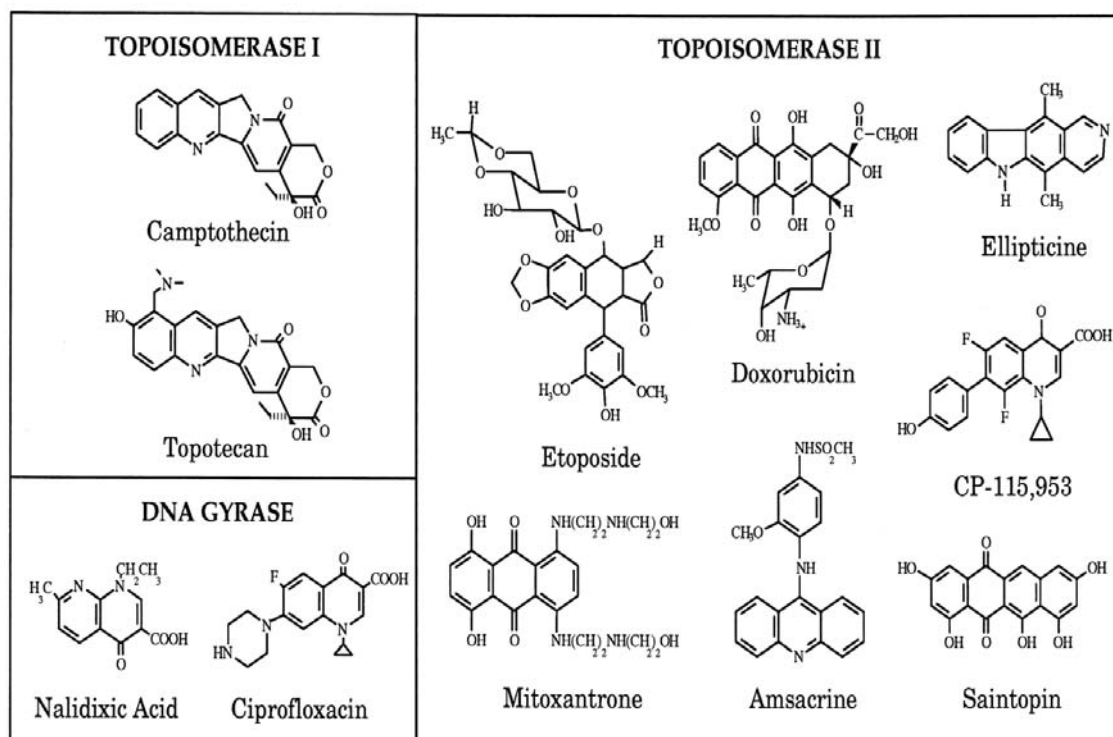
έναν ομοιοπολικό δεσμό μεταξύ ενός καταλοίπου τυροσίνης στην πρωτεΐνη και του 3' φωσφορικού άκρου της μονόκλωνης αλυσίδας η οποία σπάει (Cummins et al., 1993).

1.6.2 Καταλυτικοί αναστολείς

Οι καταλυτικοί αναστολείς αναστέλλουν τις καταλυτικές δραστηριότητες των τοποϊσομερασών με διαφορετικούς τρόπους (Wang et al., 2003). Για παράδειγμα, παράγωγα της κουμαρίνης αναστέλλουν την τοποϊσομεράση II, που είναι ένα ένζυμο που η δράση του εξαρτάται από το ATP, λειτουργώντας ως ανταγωνιστικοί αναστολείς του ATP. Μέσω της δράσης τους μπορούν να προκαλέσουν βλάβη στο DNA, είτε να εμποδίσουν σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες οι οποίες βασίζονται στην καταλυτική δράση των τοποϊσομερασών, με αποτέλεσμα να προκαλούν τον θάνατο πολλών κυττάρων (Wang et al., 2003). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το μόριο QAP1, το οποίο εμποδίζει τη διάσπαση του DNA από την τοποϊσομεράση II, χωρίς όμως να επιδρά στην σύνδεση της πρωτεΐνης με το DNA (Nitiss, 2009). Άλλα παραδείγματα καταλυτικών αναστολέων, αποτελούν το ελλαγικό οξύ και το φλαβελλαγικό οξύ, τα οποία αναστέλλουν την καταλυτική δραστηριότητα και της τοποϊσομεράσης I και της τοποϊσομεράσης II (Pommier et al., 1998). Τέλος, σε αντίθεση με τους αναστολείς της τοποϊσομεράσης II που είναι ειδικό για το ένζυμο, δεν υπάρχουν σαφείς ενδείξεις για την ειδικότητα των αναστολέων της τοποϊσομεράσης I (Pommier et al., 1998).

1.6.3 Δηλητήρια τοποϊσομεράσης (*topoisomerase poisons*)

Οι τοποϊσομεράσες I και II και η βακτηριακή γυράση είναι κύριοι στόχοι πολλών κλινικών φαρμάκων. Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζονται μερικά τέτοια παραδείγματα φαρμάκων (**Εικόνα 19**).

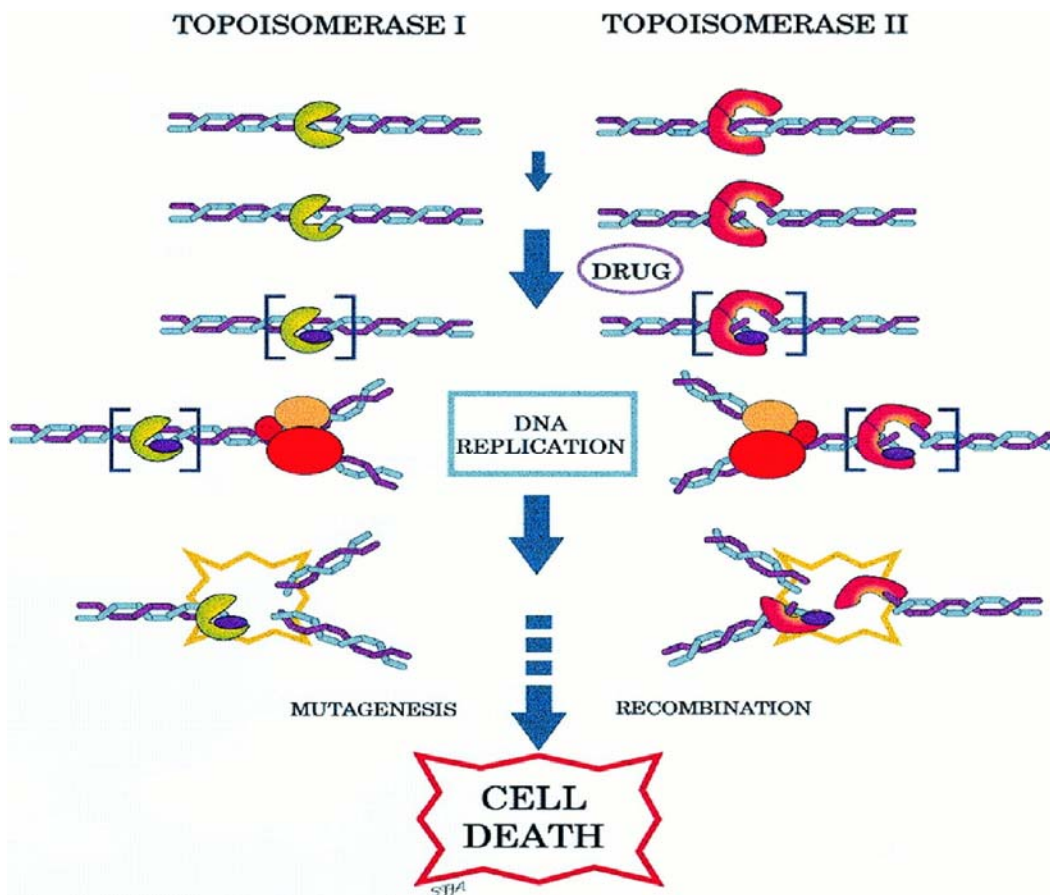


Εικόνα 19: Δομή συγκεκριμένων δηλητηρίων τοποϊσομεράσης

Η DNA γυράση αποτελεί στόχο αντιβιοτικών κινόλης και μάλιστα η δημιουργία φθοριούχων κινολών, με αντιπροσωπευτικό παράδειγμα το μόριο σιπροφλοξασίνη (ciprofloxacin), οδήγησε σε μόρια με ευρεία αντιβακτηριακή δράση. Οι κινολόνες είναι η μόνη τάξη φαρμάκων που έχει βρεθεί να επιδρά και σε προκαρυωτικά και σε ευκαρυωτικά είδη. Παρόλο που υπάρχει ένας περιορισμένος αριθμός φαρμάκων που δρουν στην τοποϊσομεράση I ή στην DNA γυράση, η τοποϊσομεράση II αποτελεί στόχο για πολλά μόρια. Φάρμακα όπως η ετοποσίδη, η δοξορουβικίνη, η αμσακρίνη και η μιτοξανδρόνη χρησιμοποιούνται συστηματικά για τη θεραπεία διάφορων μορφών καρκίνου στον άνθρωπο και κυρίως δρουν στην α ισομορφή του ενζύμου, αν και πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι και η τοποϊσομεράση IIβ παίζει σημαντικό ρόλο στη δράση των φαρμάκων (Stasie et al., 1995).

Τα δηλητήρια τοποϊσομεράσης δρουν, είτε προκαλώντας εξασθένηση της ικανότητας του ενζύμου να επανασυνδέει το DNA που περιέχει σπασίματα, είτε ενισχύοντας το ρυθμό διάσπασης του DNA. Το τελικό αποτέλεσμα της δράσης τους είναι η σταθεροποίηση του διασπασίμου συμπλόκου. Μάλιστα, η πιθανή θνησιμότητα που προκαλείται από την σταθεροποίηση των συμπλόκων, αυξάνεται δραματικά όταν το σύμπλοκο της αντιγραφής ή οι ελικάσες προσπαθήσουν να περάσουν τον ομοιοπολικό δεσμό, διότι τότε τα παροδικά μονόκλινα ή δίκλινα σπασίματα μετατρέπονται σε μόνιμα

δίκλινα σπασίματα. Αυτά τα σπασίματα που δημιουργούνται στο γενετικό υλικό, γίνονται στόχοι για ανασυνδυασμό και επιδιόρθωση, κάτι που διεγείρει την ανταλλαγή μεταξύ αδερφών χρωματίδων, τη δημιουργία μεγάλων ελλείψεων και την παραγωγή χρωμοσωμικών μετατοπίσεων και όταν βρεθούν σε επαρκή συγκέντρωση πυροδοτούν μία σειρά γεγονότων που τελικά καταλήγουν στον κυτταρικό θάνατο μέσω νέκρωσης ή απόπτωσης (*Εικόνα 20*) (Stasie et al., 1995).



Εικόνα 20: Μηχανισμός κυτταροτοξικότητας των δηλητηρίων τοποϊσομεράσης

Όλες οι μελέτες που είναι βασισμένες στη καμπτοθεκίνη υποδεικνύουν, ότι το συγκεκριμένο δηλητήριο της τοποϊσομεράσης I δρα κυρίως εμποδίζοντας το βαθμό υπερελίκωσης του DNA και μάλιστα η ανασταλτική του δράση εξαρτάται από την συγκέντρωσή του. Αντίθετα, τα μόρια που στοχεύουν την τοποϊσομεράση II χρησιμοποιούν και τους δύο μηχανισμούς. Μόρια όπως η ετοποσίδη και η αμσακρίνη είναι πιθανοί αναστολείς της επανασύνδεσης, ενώ οι κινολόνες και οι ελλειπτικές έχουν μικρή επίδραση στη δραστηριότητα του ενζύμου και δρουν κυρίως ενισχύοντας το ρυθμό διάσπασης (Stasie et al., 1995). Πολύ σημαντικό ρόλο στον μηχανισμό παίζει η δομή του

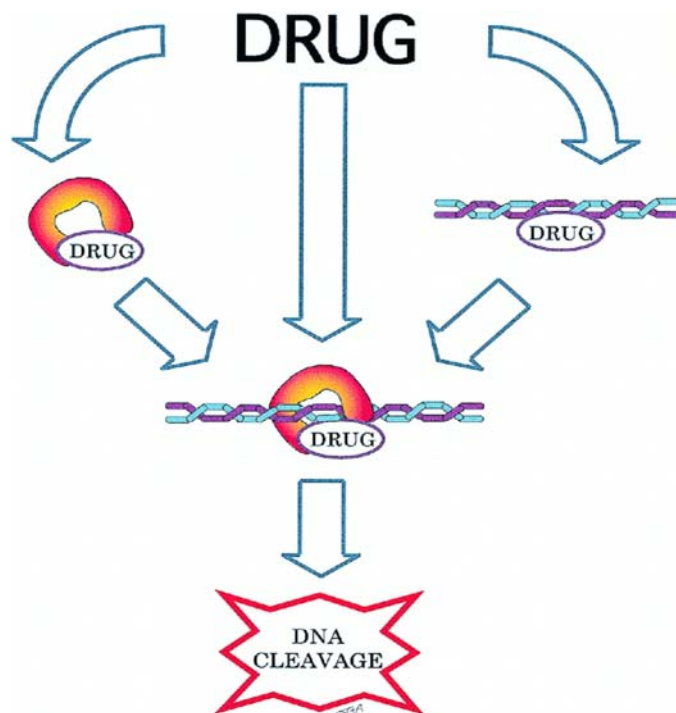
κάθε μορίου. Η απομάκρυνση της 9-υδροξυλικής ομάδας από τις ελλειπτικές αλλάζει την αλληλεπίδραση και οδηγεί στην παραγωγή μη ενεργών μορίων. Από αυτό το παράδειγμα φαίνεται πόσο ευαίσθητος είναι ο μηχανισμός σύνδεσης με μία συγκεκριμένη πρωτεΐνη, σε μικρές αλλαγές στη δομή του αναστολέα (Cummings et al., 1993).

Τα δηλητήρια της τοποϊσομεράσης αν και σε υψηλές συγκεντρώσεις αναστέλλουν τις ενζυμικές δραστηριότητες (όπως για παράδειγμα την υδρόλυση του ATP και το πέρασμα της αλυσίδας), πρέπει να διαφοροποιούνται από τους αναστολείς της τοποϊσομεράσης, οι οποίοι δρουν μπλοκάροντας την συνολική καταλυτική δραστηριότητα. Η διάκριση ανάμεσα στα δηλητήρια της τοποϊσομεράσης και τους αναστολείς βασίζεται σε κυτταροτοξικά κριτήρια. Τα υψηλά επίπεδα τοποϊσομεράσης καθιστούν τα κύτταρα ευαίσθητα στα δηλητήρια και ανθεκτικά στους αναστολείς, ενώ τα χαμηλά επίπεδα του ενζύμου τα καθιστούν ανθεκτικά στα δηλητήρια, αλλά ευαίσθητα στους αναστολείς. Μάλιστα όσο πιο υψηλή η συγκέντρωση του ενζύμου, τόσο πιο ισχυρή και θανατηφόρα η δράση των μορίων που ανήκουν στα δηλητήρια (Stasie et al., 1995).

1.6.4 Σχηματισμός του συμπλόκου τοποϊσομεράση-φάρμακο-DNA

Υπάρχουν τρεις πιθανές πορείες για το σχηματισμό του συμπλόκου τοποϊσομεράση-φάρμακο-DNA (*Εικόνα 21*):

- 1) Τα φάρμακα συνδέονται στο σύμπλοκο τοποϊσομεράσης-DNA και αλληλεπιδρούν ελάχιστα με το ένζυμο ή με το DNA. Μελέτες σύνδεσης της καμπτοθεκίνης με την τοποϊσομεράση I υποστηρίζουν αυτό τον μηχανισμό, καθώς βρέθηκε ότι το μόριο αλληλεπιδρά αποκλειστικά με το σύμπλοκο ένζυμο-DNA.
- 2) Τα φάρμακα μπορεί να αλληλεπιδρούν κυρίως με το DNA. Η υποστήριξη αυτού του μηχανισμού προέρχεται από το γεγονός ότι πολλά μόρια που στοχεύουν την τοποϊσομεράση, συνδέονται στο DNA.
- 3) Τα φάρμακα αποτελούν μέρος του συμπλόκου μέσω αρχικής ένωσης με την τοποϊσομεράση-στόχο. Πρόσφατες μελέτες της αλληλεπίδρασης της ελλειπτικής με την τοποϊσομεράση II έδειξαν ότι τα μόρια δημιουργούν σύμπλοκο με το ένζυμο απουσία DNA (Stasie et al., 1995).



Εικόνα 21: Σχηματισμός του συμπλόκου τοποϊσομεράση-φάρμακο-DNA

1.6.5 Ανάλυση των θέσεων διάσπασης του DNA από τους αναστολείς

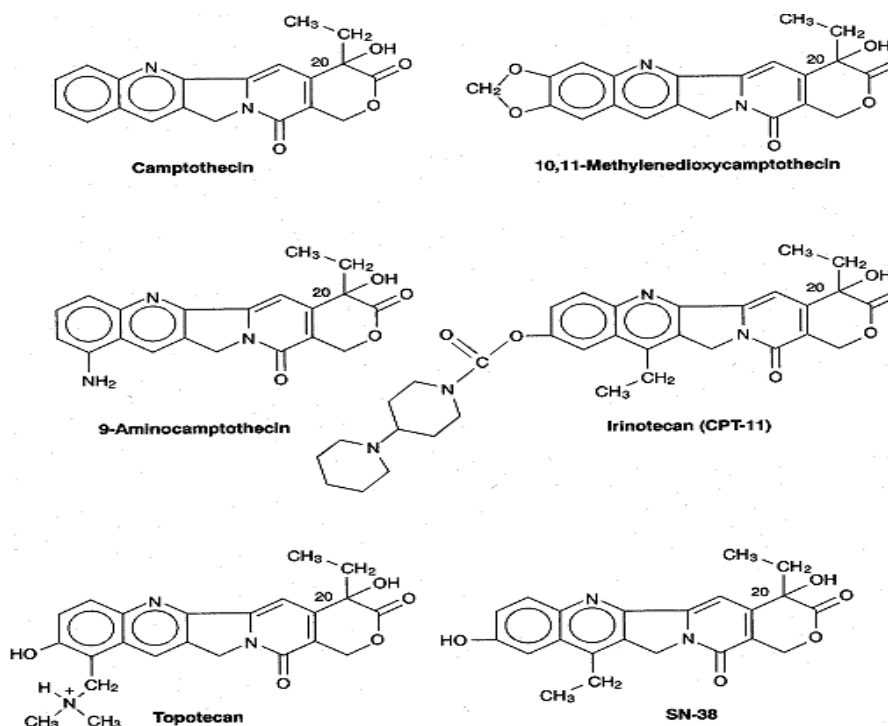
Η ανάλυση των θέσεων διάσπασης οι οποίες προκαλούνται από διαφορετικούς αναστολείς των τοποϊσομερασών, έχει φανερώσει ότι υπάρχει η τάση οι θέσεις διάσπασης να είναι μοναδικές για κάθε τάξη μορίων. Μάλιστα έχει βρεθεί ότι αυτά τα σπασίματα είναι περισσότερο κρίσιμα για τον θάνατο καρκινικών κυττάρων. Για παράδειγμα, το πρώτο-ογκογονίδιο c-myc είναι είκοσι φορές περισσότερο ευαίσθητο στην διάσπαση που επάγεται από αμσακρίνη από ότι ολόκληρο το γένωμα. Η ταυτοποίηση αυτών των θέσεων διάσπασης θα μπορούν να παρέχουν έναν περισσότερο επιλεκτικό στόχο για τον μελλοντικό σχεδιασμό φαρμάκων (Cummings et al., 1993).

Οι θέσεις διάσπασης για μεμονωμένα φάρμακα εμφανίζονται με υψηλή συχνότητα στην ίδια βάση. Στην περίπτωση των αναστολέων της τοποϊσομεράσης II, η δοξουκυκλίνη έχει μία προτίμηση για την βάση A στο 3' άκρο του σπασίματος (-1), οι ελλειπτικές έχουν μία προτίμηση για την T στην θέση -1 και η αμσακρίνη μία προτίμηση για A στην +1 (5' άκρο του σπασίματος). Για την εξήγηση της επιλεκτικότητας των τοπο-δηλητηρίων σε συγκεκριμένες βάσεις έχει προταθεί το παρακάτω μοντέλο: αρχικά ένα κατάλοιπο τυροσίνης της πρωτεΐνης, ενσωματώνεται στο DNA σε μία πιθανή θέση διάσπασης. Στη συνέχεια το φάρμακο αναστολέας συνδέεται στο DNA στην ίδια θέση και σαν συνέπεια μετατοπίζει την τυροσίνη κατά μήκος του φωσφορικού κορμού, για να δημιουργήσει έναν ομοιοπολικό δεσμό και το σύμπλοκο διάσπασης. Με την δοξουκυκλίνη η παρουσία του A

στην -1 θα διευκολύνει το σχηματισμό του ομοιοπολικού δεσμού, ενώ η παρουσία των G, C και η T όχι. Η ίδια εξήγηση μπορεί να εφαρμοστεί για τις προτιμήσεις σε βάσεις άλλων τοπο-δηλητηρίων (Cummings et al., 1993).

1.6.6 Ταξινόμηση αναστολέων

Έχει περιγραφεί μια κύρια τάξη αναστολέων της τοποϊσομεράσης I, οι καμπτοθεκίνες, που περιλαμβάνουν το κύριο μόριο καμπτοθεκίνη και κάποια παράγωγά της (*Εικόνα 22*).



Εικόνα 22: Χημικές δομές παραγώγων καμπτοθεκίνης

Οι αναστολείς της τοποϊσομεράσης II χωρίζονται σε διάφορες τάξεις και περιλαμβάνουν τις ανθρακυκλίνες (π.χ. δοξυκυκλίνη), ανθραπυραζόλες (π.χ. βιανθραζόλη), ακρυδίνες (π.χ. αμσακρίνη), ακτινομυκίνες (π.χ. ακτινομυκίνη D), ελλειπτικές (π.χ. 9-υδροξυ-ελλειπτικήνη), ανθρακενεδιόνες (π.χ. μιτοξανδρόνη) και επιποδοφυλοτοξίνες (π.χ. VP-16, VM-26). Έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με το DNA, να δρουν αποκλειστικά στην τοποϊσομεράση II ή στην τοποϊσομεράση I και να λειτουργούν διαμέσου του διασπάσιμου συμπλόκου. Τα μόρια ετοποσίδη και καμπτοθεκίνη δεν παρεμβάλλονται και πιστεύεται ότι συνδέονται στο DNA μόνο μετά από διάσπαση του από την τοποϊσομεράση (Cummings et al., 1993).

Στον *Πίνακα 5* αναφέρονται οι αναστολείς που έχουν εμφανιστεί τα τελευταία πέντε χρόνια. Αυτό που αξίζει να σημειωθεί είναι ότι η πλειοψηφία αυτών των μορίων δεν ακολουθεί τα πρότυπα που περιγράφηκαν παραπάνω. Κάποια από τα νέα μόρια δεν συνδέονται σημαντικά στο DNA, αλλά παρ' όλα αυτά σταθεροποιούν τα διασπάσιμα σύμπλοκα (γενιστεΐνη, επικατεχίνη). Υπάρχουν επίσης μόρια που σταθεροποιούν τα διασπάσιμα σύμπλοκα και με την τοποϊσομεράση I και με την τοποϊσομεράση II (σαϊντοπίνη, AzalQD) (Cummings et al., 1993).

Πίνακας 5: Ιδιότητες νέων αναστολέων των τοποϊσομερασών I και II στα θηλαστικά

Κατηγορίες	Πηγή	Κύρια μόρια	Μηχανισμός σύνδεσης στο DNA	Αναστολέας		Τύπος		Ειδικό χαρακτηριστικό
				topo II	topoI	Καταλυτική δραστηριότητα	Διασπάζσιμο Σύμπλοκο	
	Φυτό	Withangulatin		+	-	+	+	
Lexjtropsins	Αντιβιοτικό	Σαϊντοπίνη	ασθενής ενσωμάτωση	+	+	+	+	Αναστολή τοπο I και τοπο II
	Αντιβιοτικά	Netropsin	μικρή αύλακα	+	+	+	-	Αποτροπή συσχέτισης με το DNA
		Δισταμυκίνη	μικρή αύλακα	+	+	+	-	Ανταγωνιστές σχηματισμού συμπλόκου από VM-26, m-AMSA Διέγερση τοπο II, προώθηση VM-26 συμπλόκου
bu(2,6-diaio piperazirjes)	Συνθετικό	ICRF 193, 154	κανένας	+	-	+	-	Ανταγωνιστές σχηματισμού του διασπάζιμου συμπλόκου
Anthracenyipeptides	Συνθετικό	NU-ICRF 500	κανένας	+	+	+	-	Μείγμα αναστολέων των τοπο I και τοπο II
	Αντιβιοτικό	Fostriecin	κανένας	+		+	-	Ανταγωνιστές σχηματισμού του διασπάζιμου συμπλόκου
	Συνθετικό	Μερβαρόνη	κανένας	+	ασθενής	+	-	Ανταγωνιστές σχηματισμού του διασπάζιμου συμπλόκου
Terpenoides	Αντιβιοτικό	Terpeniecin	όχι ενσωμάτωση	+		+	+	Διακριτό πρότυπο συμπλόκου
Φλαβονοειδή Κατεχίνες	Φυτό	Γενιστεΐνη, Orbol	όχι ενσωμάτωση	+		+	+	Φυσιολογικό πρότυπο
	Φυτό	Επικατεχίνη	κανένας	+		+	+	Ίδιο πρότυπο με το m-AMSA
Idoloquinoline Διόνες	Συνθετικό	AzalQD	κανένας	+	+	+	+	
Benzisoquinolindiones Κινολόνες	Συνθετικό	Αμοναφίδη	ενσωμάτωση	+		+	+	Παραγωγή μίας κύριας θέσης διάσπασης στην pBR322
	Συνθετικό		όχι ενσωμάτωση	+		+	+	Αναστολή συμπλόκου
	Συνθετικό	2-nitroimidazoie	κανένας	+		-	+	Επαγωγή συμπλόκου
Hexasulfated Naphthurea	Συνθετικό	Σουραμίνη	κανένας	+		+	-	Συσσώρευση στον πυρήνα και σύνδεση στην τοπο II
	Συνθετικό	Αμιλόνη	ασθενής ενσωμάτωση	+		+	-	
Αζατοξίνες	Συνθετικό	Αζατοξίνη	κανένας	+	-	+	+	Σχεδιασμός στον υπολογιστή
Καμπτοθεκίνη	Φυτό	Corilagin, Cbebolagic acid	κανένας	-	+	+	-	
	Φυτό/ Ημι	τοποτεκάνη	κανένας	-	+	+	+	Πρόοδος μέσω κλινικών δοκιμών
	συνθετικό	MDO-CPT CPT-11	κανένας κανένας	- -	+	+	+	Πιθανός σχηματισμός συμπλόκου Βιομετασχηματισμός στον ενεργό μεταβολίτη SN 38

1.6.7 Ανθεκτικότητα και υπερευαισθησία των ενζύμων στη δράση των αναστολέων

Μεταλλάξεις οδηγούν στην παραγωγή τοποϊσομερασών που εμφανίζουν ανθεκτικότητα και διαφορετική ευαισθησία στη δράση των αναστολέων (Stasie et al., 1995). Έχουν ταυτοποιηθεί δύο περιοχές στην DNA γυράση οι οποίες παρέχουν ανθεκτικότητα στις κινολόνες. Η μία βρίσκεται στην υπομονάδα gyA, η οποία περιέχει την ενεργή τυροσίνη και αφορά την σερίνη 83. Οι μεταλλάξεις σε αυτή τη θέση είναι επικρατείς και οδηγούν σε υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας και μειώνουν σημαντικά τη σύνδεση της κινολόνης στο σύμπλοκο DNA-πρωτεΐνης. Η δεύτερη βρίσκεται στην υπομονάδα gyiB, η οποία περιέχει τη θέση σύνδεσης του ATP. Μεταλλάξεις σε αυτή την περιοχή καθιστούν τα ένζυμα λιγότερο ανθεκτικά, αλλά τους παρέχουν υπερευαισθησία ως προς το φάρμακο μέσω ενός μηχανισμού για τον οποίο γνωρίζουμε ελάχιστα. Όμως, μείωση της συγγένειας του φαρμάκου έχει αναφερθεί για μία μετάλλαξη που οδηγεί σε ανθεκτικότητα, ενώ η αύξηση της συγγένειας σύνδεσης όπως και η μείωση του ρυθμού επανασύνδεσης, σχετίζονται με εμφάνιση υπερευαισθησίας (Stasie et al 1995). Γενικά, η ανθεκτικότητα κυρίως στα κύτταρα θηλαστικών οφείλεται σε μειωμένη έκφραση του ενζύμου, παρά σε ενισχυμένη ενζυμική δραστηριότητα. Επιπλέον, η ανθεκτικότητα στα δηλητήρια της τοποϊσομεράσης είναι υπολειπόμενη, επομένως παρουσία ανθεκτικότητας με παρουσία ευαισθησίας, οδηγεί σε κύτταρα με ανθεκτικότητα στο συγκεκριμένο φάρμακο (Nitiss 2009).

1.7 Πολυφαινόλες ως αναστολείς τοποϊσομερασών

1.7.1 Αναστολή των τοποϊσομερασών από διάφορα πολυφαινολικά μόρια

Ο ακριβής μηχανισμός χημειοπροστασίας των πολυφαινολικών μορίων δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί. Τα φλαβονοειδή αποτελούν την καλύτερα μελετημένη ομάδα πολυφαινολών που δρουν ως αναστολείς των τοποϊσομερασών I και II. Τα μόρια μυρικετίνη, κερκετίνη, φυσετίνη αναστέλλουν και τα δύο ένζυμα, ενώ τα μόρια καιμπερόλη και φλωρετίνη αναστέλλουν την τοποϊσομεράση II, χωρίς να εμποδίζουν την δράση της τοποϊσομεράσης I. Για την αναστολή και των δύο ενζύμων απαιτείται η παρουσία υδροξυλικών ομάδων στις θέσεις C-3, C-7, C-3' και C-4' και μία κετονομάδα στην θέση C-4. Επιπλέον, μία ακόμα υδροξυλική ομάδα στον B δακτύλιο ενισχύει την

ανασταλτική δράση των φλαβονοειδών στην τοποϊσομεράση I και όταν βρεθεί δίπλα στην θέση C-4' τα φλαβονοειδή είναι ακόμα πιο αποδοτικοί αναστολείς (**Πίνακας 6**). Επίσης, απαιτείται ένας διπλός δεσμός, αλλά όταν ο A δακτύλιος είναι ανοικτός, η απαίτηση για τον διπλό δεσμό μειώνεται (Constantinou et al., 1995). Υπάρχουν όμως και εξαιρέσεις, όπως παρουσιάζεται και στον παρακάτω πίνακα, όσο αφορά αυτό το πρότυπο δομής. Η δ-κατεχίνη, ένα φλαβονοειδές με τις ίδιες υδροξυλικές αντικαταστάσεις με το μόριο κερκετίνη, δεν αναστέλλει ούτε την τοποϊσομεράση I ούτε την τοποϊσομεράση II. Η ρουτίνη, η οποία επίσης έχει τις ίδιες υδροξυλικές ομάδες με την κερκετίνη με την διαφορά ότι είναι ένα C-3 γλυκοσίδιο, στερείται της ιδιότητας να αναστέλλει τις τοποϊσομεράσες. Ένα επιπλέον μόριο που ανήκει στα φλαβονοειδή είναι η γαλαγίνη, μόριο που δεν αναστέλλει τις τοποϊσομεράσες, διότι δεν έχει υδροξυλικές ομάδες στον B δακτύλιο (Constantinou et al., 1995).

Τα φλαβονοειδή μπορούν να δράσουν ως δηλητήρια της τοποϊσομεράσης II, ως καταλυτικοί αναστολείς ή και τα δύο, αυτό όμως εξαρτάται από τη θέση των υδροξυλίων στους δακτυλίους A και B του μορίου. Η γενιστεΐνη έχει την ικανότητα να σταθεροποιεί το σύμπλοκο που δημιουργείται από την ομοιοπολική σύνδεση της τοποϊσομεράσης II στο DNA και επομένως να δρα ως δηλητήριο της τοποϊσομεράσης II, ενώ και τα μόρια κερκετίνη, καιμπερόλη και απιγενίνη σταθεροποιούν το σύμπλοκο τοποϊσομεράσης II-DNA (Constantinou et al., 1995). Ένα ακόμα μόριο που ανήκει στα φλαβονοειδή και δρα ως δηλητήριο των τοποϊσομερασών είναι η λουτεολίνη. Συνδέεται στην ευκαρυωτική τοποϊσομεράση I και επάγει την σταθεροποίηση του διασπασίμου συμπλόκου τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Η σύνδεση του συγκεκριμένου μορίου με το ένζυμο είναι αντιστρέψιμη και η δράση του εξαρτάται από την συγκέντρωσή του. Έχει βρεθεί ότι αναστέλλει πλήρως την καταλυτική δραστηριότητα του ενζύμου σε συγκέντρωση 40 μM με IC_{50} 5 μM (Chowdhury et al., 2002).

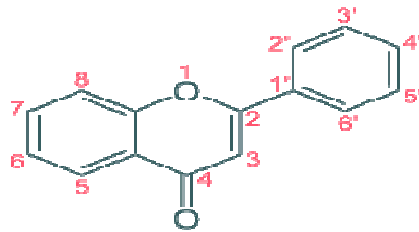
Μεταξύ των διαφόρων φλαβονοειδών υπάρχει και ανταγωνισμός καθώς η δράση της γενιστεΐνης καταστέλλεται από την μυρικετίνη, γεγονός που αποδεικνύει ότι και οι δύο τύποι αναστολέων αλληλεπιδρούν με την ίδια λειτουργική περιοχή του ενζύμου-στόχου. Παρατηρείται λοιπόν ότι κάθε μόριο που ανήκει στην κατηγορία των φλαβονοειδών μπορεί να αναστείλει συγκεκριμένες τοποϊσομεράσες σε συγκεκριμένα στάδια της αντίδρασης που καταλύουν (Constantinou et al., 1995).

Οι ανθοκυανίνες αποτελούν μια άλλη κατηγορία πολυφαινολικών μορίων που αναστέλλουν την καταλυτική δραστηριότητα των ανθρώπινων τοποϊσομερασών I και II, χωρίς να εμφανίζουν διαφορά στη δράση τους μεταξύ των ισομορφών IIα και IIβ. Όλες οι

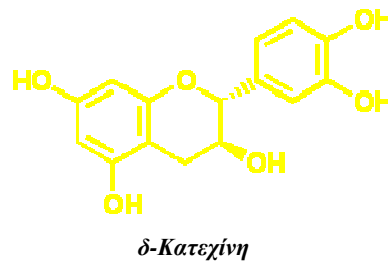
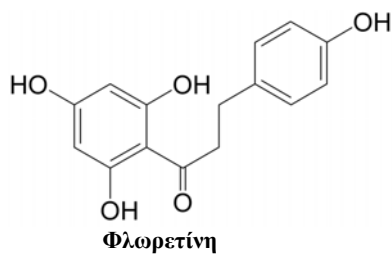
ανθοκυανίνες έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με το DNA, αλλά μόνο η δελφινίνη και η κυανιδίνη αναστέλλουν τις τοποϊσομεράσες. Αυτό οφείλεται στην παρουσία του –OH στον δακτύλιο Β, το οποίο αποτελεί ένα σημαντικό δομικό στοιχείο για την αποδοτική στόχευση της τοποϊσομεράσης II. Σε αντίθεση με τα δηλητήρια της τοποϊσομεράσης, η δελφινίνη και η κυανιδίνη δεν σταθεροποιούν το ενδιάμεσο σύμπλοκο που σχηματίζεται από την ομοιοπολική σύνδεση του ενζύμου με το DNA (Habermeyer et al., 2005).

Πίνακας 6: Επιδράσεις φλαβονοειδών στην δράση των τοποϊσομερασών

Μόριο	Θέση -OH		IC50 (µg/ml)	
	A δακτύλιος	B δακτύλιος	Τοπο I	Τοπο II



Φλαβόνη				-	-	
Μυρικετίνη	3	5	7	3' 4' 5'	11.9	11.9
Κερκετίνη	3	5	7	3' 4'	12.8	6.9
Φυσετίνη	3		7	3' 4'	20.6	8.2
Μορίνη	3	5	7	2' 4'	42.1	40.8
Καμπφερόλη	3	5	7	4'	-	8.1
Απιγενίνη		5	7	4'	-	-
Ρουτίνη		5	7	3' 4'	-	-
Γαλαγίνη	3	5	7		-	-
3-OH Φλαβόνη	3				-	-
5-OH Φλαβόνη		5			-	-
6-OH Φλαβόνη			6		-	-
7-OH Φλαβόνη			7		-	-



Φλωρετίνη		5	7	4'	-	46.1
δ-Κατεχίνη	3	5	7	3' 4'	-	-

1.8 Σκοπός

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της μελέτης των βιολογικών ιδιοτήτων φυτικών εκχυλισμάτων απομονωμένα από ψυχανθή (μέλη της οικογένειας *Leguminosae*) με έμφαση στις χημειοπροστατευτικές τους ιδιότητες. Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης κλασμάτων καθαρών μορίων, πλούσιων σε πολυφαινολικές ενώσεις, στην ενεργότητα της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης II. Η τοποϊσομεράση II παίζει καθοριστικό ρόλο σε διεργασίες που είναι απαραίτητες για την επιβίωση του κυττάρου και έχει παρατηρηθεί ότι βρίσκεται σε αυξημένα επίπεδα στα καρκινικά κύτταρα και για τον λόγο αυτό αποτελεί κυτταρικό στόχο πολλών αντικαρκινικών φαρμάκων. Έτσι μόρια, τα οποία αναστέλλουν την δράση του συγκεκριμένου ενζύμου, θεωρούνται σημαντικοί αντικαρκινικοί και χημειοπροστατευτικοί παράγοντες. Συνολικά μελετήθηκαν 10 κλάσματα καθαρών μορίων, από τα οποία τα επτά απομονώθηκαν από το μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού *Vicia faba* και τα τρία από το μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού *Lotus edulis*.

Φυτά της οικογένειας *Leguminosae* που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία

1. *Vicia faba*

Το γένος *Vicia* αποτελεί ένα από τα πολυάριθμα γένη της οικογένειας *Leguminosae*. Περιλαμβάνει 140 ανθοφόρα φυτά, τα οποία προέρχονται από την Ευρώπη, την Ασία και την Αφρική και αποτελείται από αρκετά αυτοφυή είδη, αλλά και καλλιεργούμενα υβρίδια. Το είδος *Vicia faba* (**Εικόνα 23**) προέρχεται από την Βόρεια Αφρική και την Νοτιοδυτική Ασία, αλλά καλλιεργείται σε μεγάλο βαθμό και σε άλλες περιοχές. Είναι ετήσιο φυτό και οι καρποί του που είναι γνωστοί ως κουκιά, καταναλώνονται ως τρόφιμα και είναι σημαντικό κομμάτι της Μεσογειακής διατροφής, ενώ είναι πλούσια και σε συστατικά με ευεργετικές επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία (www.wikipedia.com).



Εικόνα 23: Φυτό *Vicia faba*

2. *Lotus edulis*

Το γένος *Lotus* περιλαμβάνει αυτοφυή και καλλιεργούμενα φυτά. Το είδος *Lotus edulis* (**Εικόνα 24**) είναι γνωστό ως περατζούνι. Είναι ένα ετήσιο φυτό που απαντάται στην περιοχή της Μεσογείου και ιδιαίτερα στην Ιταλία, στην Ισπανία και στην Ελλάδα. Παρουσιάζει συμβιωτικές σχέσεις με βακτήρια του εδάφους, τα οποία σχηματίζουν εξογκώματα στις ρίζες των φυτών και παράγουν ατμοσφαιρικό άζωτο για αυτό και αποτελεί σημαντική πηγή αζώτου, ενώ καταναλώνεται και ως τρόφιμο (www.wikipedia.com).



Εικόνα 24: Φυτό *Lotus edulis*

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Υλικά

2.1.1 Εκχυλίσματα και κλάσματα καθαρών μορίων

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν δύο ελληνικά ψυχανθή της οικογένειας *Leguminosae*. Τα φυτά που ανήκουν στα γένη *Vicia* και *Lotus* (**Πίνακας 7**), συλλέχθηκαν από διάφορα μέρη της Ελλάδας και ακολούθησε ταυτοποίηση και μελέτη συνολικά δέκα καθαρών εκχυλισμάτων που απομονώθηκαν από τα δύο αυτά φυτά.

Πίνακας 7: Χαρακτηρισμός των ψυχανθών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη

Γένος	Είδος	Κοινή ονομασία	Προέλευση
<i>Vicia</i>	<i>Vicia faba</i>	κουκιά	εμπορική ποικιλία
<i>Lotus</i>	<i>Lotus edulis</i>	περατζούνι, λώτος	Ζαρός, Κρήτη

2.1.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Για την καλλιέργεια των βακτηρίων και την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω υλικά

- Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας: 1,5 gr LB broth, 1gr NaCl σε 100 ml απιονισμένο νερό. Το θρεπτικό μέσο αποστειρώθηκε στους 120°C με υγρή αποστείρωση για 20 λεπτά.
- Διάλυμα αμπικιλίνης 100 mg/ml αποστειρώνεται με πέρασμα από φίλτρο πόρων 0,45 μm και διατηρείται σε -20°C.
- Διάλυμα 1 (Sol 1): 50 mM γλυκόζη, 25 mM Tris-Cl pH 8.0, 10 mM EDTA (pH 8.0). Το διάλυμα 1 αποστειρώνεται και διατηρείται σε 4°C.
- Διάλυμα 2 (Sol 2) : 0,2 N NaOH και 1% SDS. Το διάλυμα 2 πρέπει να παρασκευάζεται την ημέρα εξαγωγής του πλασμιδιακού DNA.
- Διάλυμα 3 (Sol 3) : 5M οξικό κάλιο (45 ml), οξικό οξύ (11,5 ml) σε 28,5 ml νερό. Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

- Διάλυμα TE: 10mM Tris-Cl, 1mM EDTA pH 8.0
- RNαση: 10 µg/ml

2.1.3 *Topoisomerase II relaxation assay*

- Ανθρώπινη τοποϊσομεράση II, υπομονάδα α , p170 (Topogen-ΗΠΑ). Διατηρείται σε -70°C , σε μικρές ποσότητες (aliquots). Είναι αρκετά ευαίσθητο και το συνεχές πάγωμα – ξεπάγωμα μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια της δραστηριότητας.
- Διάλυμα A: 0.5 M Tris-HCl (pH 8.0), 1.5 M NaCl, 0.1 M MgCl_2 , 5 mM dithiothreitol (DTT), 300 µg/ml BSA (Topogen-ΗΠΑ). Διατηρείται σε -20°C .
- Διάλυμα B: 20 µM ATP σε νερό (Topogen-ΗΠΑ). Διατηρείται σε -20°C .
- Διάλυμα αραίωσης του ενζύμου: 10 mM Tris-Cl (pH 7.5), 500 mM NaCl ή KCl, 1 mM PMSF, 2 mM DTT και 50 µg BSA/ml (Topogen-ΗΠΑ). Διατηρείται σε -20°C .

2.1.4 *Ηλεκτροφόρηση πλασμιδιακού DNA*

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% πραγματοποιείται για τον διαχωρισμό και την ανάλυση των προϊόντων της αντίδρασης. Χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα υλικά:

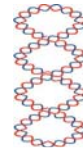
1. Διάλυμα φόρτωσης: 0,25% κυανό της βρωμοφαινόλης, 30% γλυκερόλη
2. TBE 1x: 100 mM Tris-Cl, 90 mM βορικό οξύ, 10 mM EDTA (pH 8)
3. Αγαρόζη (Applichen-Γερμανία)
4. Βρωμιούχο αιθίδιο: 10 mg/ml

2.2 Μέθοδοι

2.2.1 Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα της τοποϊσομεράσης II να ρυθμίζει την υπερσπείρωση του πλασμιδιακού DNA, προκαλώντας δίκλωνα σπασίματα, καθώς και στην ιδιότητα του πλασμιδιακού DNA να τρέχει διαφορετικά σε ένα πήκτωμα αγαρόζης κατά την ηλεκτροφόρηση, ανάλογα με την διαμόρφωσή του. Το πλασμιδιακό DNA απαντάται στις ακόλουθες διαμορφώσεις:

1. Την υπερελικωμένη διαμόρφωση, στην οποία το πλασμίδιο είναι άθικτο και αποτελεί και την πιο συμπαγή του μορφή



Υπερελικωμένη διαμόρφωση

2. Την ανοιχτή κυκλική, στην οποία το πλασμίδιο μεταβαίνει όταν προκαλούνται μονόκλωνα σπασίματα



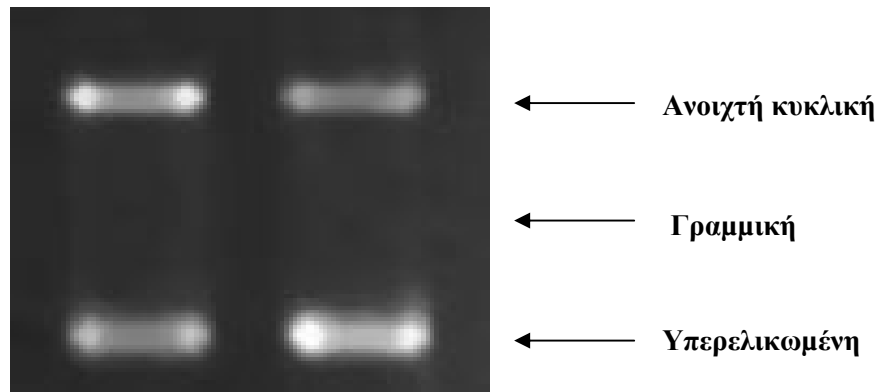
Ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση

3. Την γραμμική διαμόρφωση, στην οποία μεταβαίνει το πλασμίδιο όταν φέρει δίκλωνα σπασίματα



Γραμμική διαμόρφωση

Οι διαμορφώσεις αυτές τρέχουν με διαφορετική ταχύτητα σε ένα πήκτωμα ηλεκτροφόρησης. Συγκεκριμένα το υπερελικωμένο DNA είναι πιο συμπαγές και διαπερνά ταχύτερα τους πόρους της αγαρόζης, στη συνέχεια ακολουθεί η γραμμική και τέλος η ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA (*Εικόνα 25*).



Εικόνα 25: Διαμορφώσεις του πλασμιδιακού DNA

Όταν η τοποϊσομεράση II προκαλεί σπασίματα στο πλασμιδιακό DNA, τότε αυτό μεταβαίνει από την υπερελικωμένη διαμόρφωση στην ανοιχτή κυκλική. Αν και προκαλεί δίκλινα σπασίματα, στο συγκεκριμένο πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται δεν εμφανίζεται έντονα η γραμμική διαμόρφωση. Επομένως, στο τέλος της ηλεκτροφόρησης στο πήκτωμα στο κάτω μέρος θα εμφανίζεται η υπερελικωμένη διαμόρφωση, ενώ πιο ψηλά η ανοιχτή κυκλική, καθώς δεν μπορεί να περάσει το ίδιο γρήγορα με την υπερελικωμένη διαμόρφωση τους πόρους της αгарόζης. Η γραμμική διαμόρφωση θα εμφανίζεται ανάμεσα στην ανοιχτή και την υπερελικωμένη διαμόρφωση, διότι περνά μέσα από τους πόρους της αгарόζης πιο γρήγορα σε σχέση με την ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση.

Έτσι με βάση τον τρόπο δράσης του ενζύμου και τις διαφορετικές διαμορφώσεις του πλασμιδιακού DNA, μπορούμε να ελέγξουμε εάν ένα μόριο δρα ως πιθανός καταλυτικός αναστολέας της τοποϊσομεράσης II. Πιο συγκεκριμένα, εάν ένα φυτικό μόριο έχει την ικανότητα να αναστέλλει την δράση του ενζύμου, τότε θα παρατηρήσουμε την αναστολή της μετατροπής της υπερελικωμένης διαμόρφωσης στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση. Το πλασμιδιακό DNA θα παραμείνει στην υπερελικωμένη μορφή, γεγονός που φανερώνει αναστολή της ενζυμικής δραστηριότητας. Το ένζυμο δεν θα μπορεί να δράσει και να μειώσει τον αριθμό των υπερελικώσεων και το πλασμιδιακό DNA δεν θα μεταβαίνει στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση.

2.2.2. Πειραματική διαδικασία

2.2.2.1 Διαδικασία απομόνωσης των φυτικών εκχυλισμάτων

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

Στη συνέχεια μία ποσότητα των φυτικών τμημάτων χρησιμοποιήθηκε για εκχύλιση με μεθανόλη (2/1 κατ'όγκον) και νερό (2/1 κατ'όγκον) σε ειδική συσκευή επιταχυνόμενης εκχύλισης ASE (accelerated solvent extractor). Η παρασκευή των εκχυλισμάτων έγινε υπό καθορισμένες συνθήκες, με σκοπό την εξασφάλιση της επαναληψιμότητας και τη δυνατότητα της συγκριτικής τους μελέτης. Κάθε εκχύλιση με τον αντίστοιχο διαλύτη (μεθανόλη ή νερό) επαναλήφθηκε τρεις φορές και είχε διάρκεια 48 ώρες. Στα δοχεία εκχύλισης της συσκευής τοποθετήθηκαν 20 g του φυτικού υλικού και η κάθε εκχύλιση πραγματοποιήθηκε σε πίεση 1500 psi, σε θερμοκρασία 70°C και σε 100 mL όγκο διαλύτη. Ακολούθησε απομάκρυνση του διαλύτη των εκχυλισμάτων με τη βοήθεια συσκευής απόσταξης υπό κενό. Η περαιτέρω κλασμάτωση των εκχυλισμάτων, ο καθαρισμός τους και η ταυτοποίηση των καθαρών μορίων έχει περιγραφεί αναλυτικά από τους Spanou et al. (Spanou et al., 2008).

2.2.2.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Μετά την παρασκευή και αποστείρωση του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας ακολουθεί η προσθήκη διαλύματος αμπικιλίνης σε τελική συγκέντρωση 100 µg/ml. Αρχικά 3-4 ml από το θρεπτικό μέσο επιμολύνθηκαν με βακτήρια *E. coli* μετασηματισμένα με το Bluescript-SK+ πλασμιδιακό DNA (διατηρούνται ως στοκ γλυκερόλης σε -80 °C) και η καλλιέργεια έφθασε σε εκθετικό στάδιο ανάπτυξης, μετά από συνεχή ανάδευση σε 210 στροφές, σε θερμοκρασία 37°C για περίπου 4-6 ώρες. Στη συνέχεια αυτή η μικρή καλλιέργεια μεταφέρθηκε στο υπόλοιπο θρεπτικό μέσο (100 ml) και αφέθηκε για ανάδευση για 12 ώρες στις προαναφερθείσες συνθήκες.

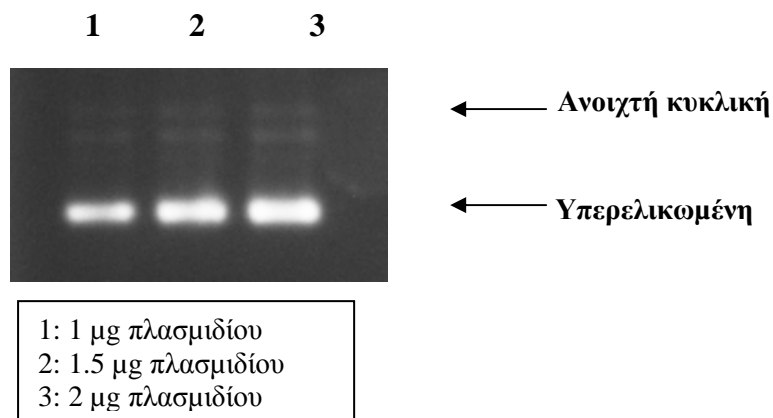
Η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA από την βακτηριακή καλλιέργεια περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα: τα βακτήρια διαχωρίστηκαν (ως ίζημα) μετά από

φυγοκέντρωση 20 λεπτών στις 4000 στροφές, σε 4°C, και διαλύθηκαν σε 16 ml διαλύματος 1 (Sol 1). Τα δείγματα επώαστηκαν για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε προσθήκη 16 ml διαλύματος 2 (Sol 2) και απαλή ανάδευση των δειγμάτων. Επειδή το διάλυμα 2 είναι πολύ αλκαλικό, θα προκαλέσει την χαλάρωση της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA και κατά συνέπεια μόλις το διάλυμα γίνει διαυγές, προστίθεται το επόμενο. Ακολούθησε προσθήκη 12 ml διαλύματος 3 (Sol 3), ανάδευση, επώαση 7-8 λεπτών σε πάγο και φυγοκέντρωση 20 λεπτών, στις 5000 στροφές, σε 4°C. Μετά την φυγοκέντρωση, το υπερκείμενο συλλέχθηκε και μεταφέρθηκε σε καινούργιο 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 τα δείγματα επώαστηκαν 3-5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και ακολούθησε φυγοκέντρωση 20 λεπτών στις 5000 στροφές σε 4°C. Στη συνέχεια το ίζημα ξεπλένεται με 70% αιθανόλη (50% του όγκου του) και γίνεται φυγοκέντρωση για 20 λεπτά στις 5000 στροφές σε 4°C. Τέλος, το ίζημα τοποθετείται σε κλίβανο 37°C για περίπου 45 λεπτά μέχρι να στεγνώσει και επαναδιαλύεται σε διάλυμα TE, το οποίο περιέχει RNase σε τελική συγκέντρωση 10μg/ml για την αποφυγή της αποικοδόμησης του RNA.

Η εκτίμηση της ποσότητας και της καθαρότητας του πλασμιδιακού DNA πραγματοποιήθηκε με μέτρηση της απορρόφησης ABS σε μήκη κύματος 260 και 280 νανόμετρων (σε 280 νανόμετρα απορροφούν οι πρωτεΐνες και σε 260 το DNA). Η καθαρότητα του πλασμιδίου θεωρείται ικανοποιητική όταν ο λόγος της απορρόφησης (260/280) είναι μεγαλύτερος από 1.8. Η συγκέντρωση του πλασμιδιακού DNA υπολογίζεται βάσει του τύπου:

C (μg/ml) = Απορρόφηση σε **260 x 50** x συντελεστής αραιώσης

Η εκτίμηση των διαμορφώσεων του πλασμιδιακού DNA γίνεται μετά από ηλεκτροφόρηση σε 1% πήκτωμα αγαρόζης (*Εικόνα 26*). 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.



Εικόνα 26: Απομόνωση πλασμιδίου

2.2.2.3 Topoisomerase II relaxation assay

Τα κλάσματα καθαρών μορίων εξετάστηκαν σε συγκεντρώσεις 100 - 1000 μM για να προσδιοριστεί η επίδρασή τους στη δραστικότητα της τοποϊσομεράσης II. Πριν την μελέτη των φυτικών μορίων, ήταν απαραίτητο να βρεθεί η μικρότερη ενζυμική συγκέντρωση, στην οποία το ένζυμο μπορεί να δράσει και να μειώσει ικανοποιητικά τις υπερελικώσεις στο πλασμιδιακό DNA. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε τιτλοδότηση του ενζύμου (δοκιμάστηκαν 0.8 units, 1.6 units και 2 units ενζύμου) και βρέθηκε ότι 1.6 units ενζύμου απαιτούνται για να επιτευχθεί κατά 90% η μετατροπή της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδίου στην χαλαρωμένη ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση, υπό τις καθορισμένες πειραματικές συνθήκες.

Οι αντιδράσεις πραγματοποιούνταν σε τελικό όγκο 20 μl και περιείχαν 0,2 μg πλασμιδίου Bluescript SK+, 1.6 units ανθρώπινης τοποϊσομεράσης II και 4 μl διάλυματος A+B σε τελική συγκέντρωση 1x (50 mM Tris-Cl, pH 0.8, 150mM NaCl, 10mM MgCl_2 , 5mM ATP, 0.5 mM dithiothreitol, 30 μg BSA/ml). Κάθε αντίδραση περιλάμβανε τα εξής δείγματα: τον αρνητικό μάρτυρα (πλασμιδιακό DNA), το θετικό μάρτυρα (πλασμιδιακό DNA και ένζυμο) καθώς και το κάθε κλάσμα φυτικού μορίου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (πλασμιδιακό DNA και ένζυμο και κλάσμα καθαρού μορίου). Τα δείγματα επωάζονταν για μία ώρα στους 37 $^{\circ}\text{C}$.

Μετά την ολοκλήρωση της επώασης, η αντίδραση τερματιζόταν με την προσθήκη 4 μl διάλυμα φόρτωσης και τα δείγματα αναλύονταν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1%, στα 70 Volt για τουλάχιστον μία ώρα. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, γινόταν χρωματισμός και αποχρωματισμός του πηκτώματος. Για τον χρωματισμό το πήκτωμα τοποθετούνταν σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (τελικής συγκέντρωσης 0.5

mg/ml) και αναδεύοταν συνεχώς για σαράντα λεπτά. Μετά την προσεκτική απομάκρυνση του διαλύματος του βρωμιούχου αιθιδίου (που είναι εξαιρετικά μεταλλαξιγόνο) το πήκτωμα αποχρωματίζοταν με προσθήκη 250 ml απεσταγμένου νερού, με συνεχή ανάδευση για σαράντα λεπτά. Με την ολοκλήρωση του αποχρωματισμού, το πήκτωμα φωτογραφιζόταν κάτω από το υπεριώδες φως (UV) και η αποθήκευση των εικόνων γινόταν με το πρόγραμμα Alpha View (Alpha Innotech, San Leandro, California).

2.2.3 Υπολογισμοί

Η επεξεργασία των φωτογραφιών των πηκτωμάτων έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος 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 παρακάτω τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = \frac{S_p - S}{S_p - S_0} \times 100$$

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, το ένζυμο και τις διαφορετικές συγκεντρώσεις του προς εξέταση μορίου και S_0 είναι το ποσοστό της υπερελικωμένης μορφής στον αρνητικό μάρτυρα, που είναι το δείγμα που περιέχει μόνο 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 υπολογίζονταν 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 Dunnet. Οι διαφορές θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές με επίπεδο στατιστικής

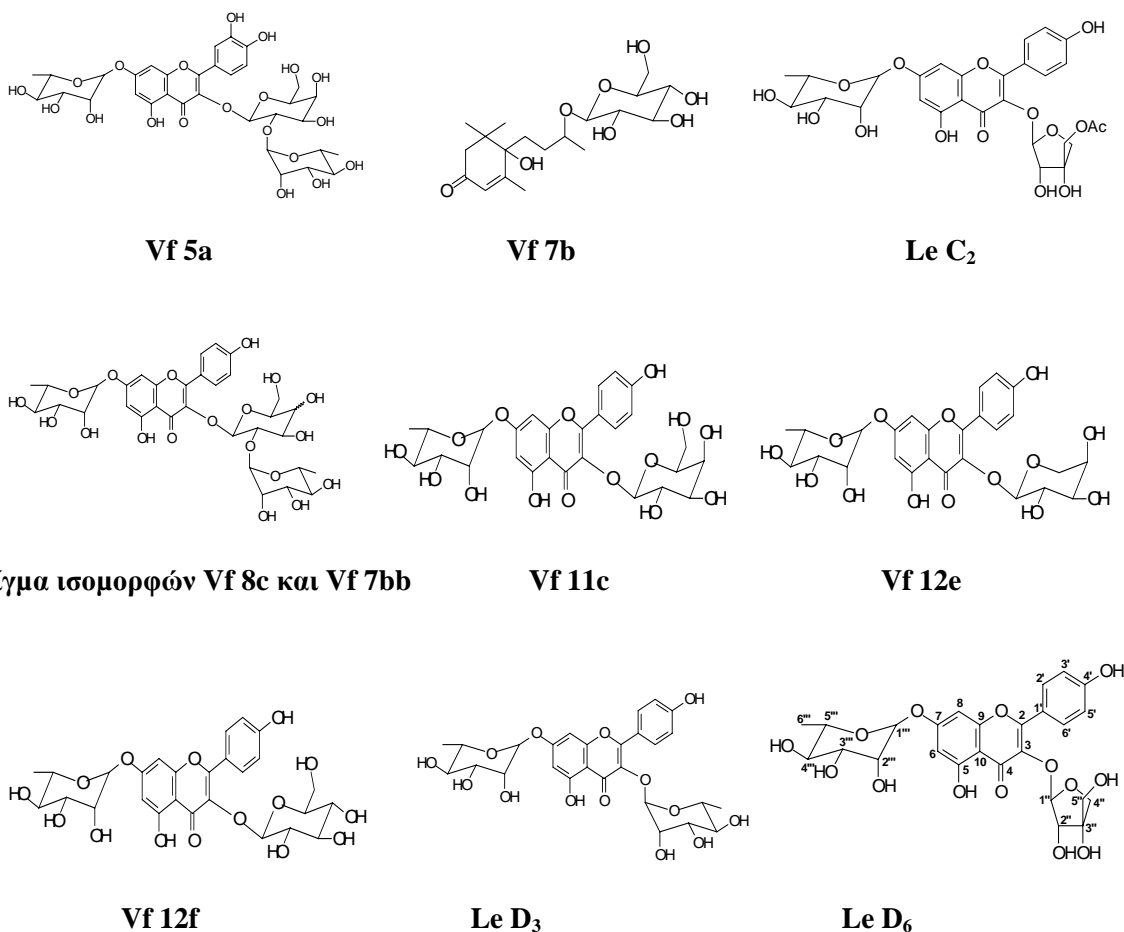
σημαντικότητας $p < 0,05$. Στα γραφήματα των αποτελεσμάτων παρουσιάζονται μόνο οι στατιστικά σημαντικές τιμές.

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 φυτών της οικογένειας *Leguminosae* στη δράση της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης II.

Συνολικά μελετήθηκε η επίδραση δέκα φυτικών κλασμάτων πολυφαινολικών μορίων στην καταλυτική δραστηριότητα της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης II. Τα κλάσματα Le C₂, Le D₃ και Le D₆ απομονώθηκαν από το φυτό *L. edulis*, ενώ τα κλάσματα Vf 12e, Vf 12f, Vf 7bb, Vf 7b, Vf 11c, Vf 8c και Vf 5a απομονώθηκαν από το φυτό *V. faba*. Οι δομές των μορίων δίνονται στην *Εικόνα 27*. Οι πλήρεις ονομασίες και τα μοριακά βάρη των πολυφαινολικών ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στα κλάσματα δίνονται στον *Πίνακα 8*.



Εικόνα 27: Δομές φαινολικών μορίων που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία

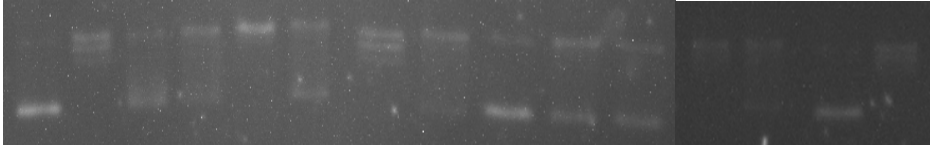
Πίνακας 8 : Ονόματα των καθαρών πολυφαινολικών ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στα κλάσματα που απομονώθηκαν από τα μεθανολικά εκχυλίσματα των φυτών *V. faba* και *L. edulis*

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

*MB: Μοριακό βάρος της ένωσης

Αρχικά μελετήθηκε η επίδραση των κλασμάτων καθαρών μορίων στην δράση της τοποϊσομεράσης II σε συγκέντρωση 600 μM, ενώ κάποια μόρια εξετάστηκαν και στην υψηλότερη συγκέντρωση των 1000 μM (**Εικόνα 28**). Παρατηρήθηκε ότι τα μόρια Vf 7b, Vf 11c, Vf 8c και τα Vf 7bb και Le D₃ (σε 1000 μM) ανέστειλαν την δράση του ενζύμου σε πολύ μικρό ποσοστό, τα μόρια Vf 12e, Vf 5a και Vf 12f ανέστειλαν σε ποσοστό μεγαλύτερο από 40% και τα μόρια Le D₆ και Le C₂ εμφάνισαν ισχυρή ανασταλτική δράση (ποσοστό αναστολής μεγαλύτερο από 80%). Επιλέχθηκαν τα κλάσματα Le D₆ και Le C₂ του φυτού *L. edulis* και τα κλάσματα Vf 12f, Vf 12e του φυτού *V. faba* για περαιτέρω μελέτη σε μεγαλύτερο εύρος συγκεντρώσεων (100 μM έως 1000 μM).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



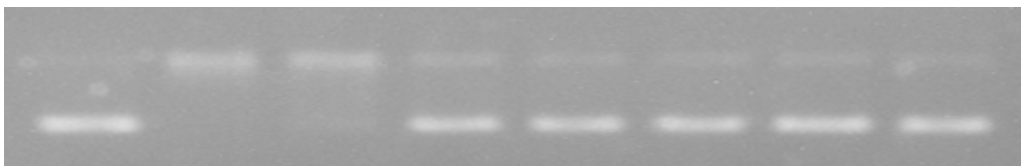
- 1: 200 ng πλασμιδίου
- 2: 200 ng πλασμιδίου + 1.6 units τοποϊσομεράση II
- 3: 200 ng πλασμιδίου + 1.6 units τοποϊσομεράση II + 600 μ M D₆
- 4: 200 ng πλασμιδίου + 1.6 units τοποϊσομεράση II + 600 μ M 5a
- 5: 200 ng πλασμιδίου + 1.6 units τοποϊσομεράση II + 600 μ M 11c
- 6: 200 ng πλασμιδίου + 1.6 units τοποϊσομεράση II + 600 μ M 12e
- 7: 200 ng πλασμιδίου + 1.6 units τοποϊσομεράση II
- 8: 200 ng πλασμιδίου + 1.6 units τοποϊσομεράση II + 600 μ M 8c
- 9: 200 ng πλασμιδίου + 1.6 units τοποϊσομεράση II + 600 μ M C₂
- 10: 200 ng πλασμιδίου + 1.6 units τοποϊσομεράση II + 600 μ M 7b
- 11: 200 ng πλασμιδίου + 1.6 units τοποϊσομεράση II + 600 μ M 12f
- 12: 200 ng πλασμιδίου
- 13: 200 ng πλασμιδίου + 1.6 units τοποϊσομεράση II
- 14: 200 ng πλασμιδίου + 1.6 units τοποϊσομεράση II + 1000 μ M D₃
- 15: 200 ng πλασμιδίου + 1.6 units τοποϊσομεράση II + 1000 μ M 7bb

Εικόνα 28: Επίδραση των κλασμάτων καθαρών μορίων των φυτών *L. edulis* και *V. faba* στην δράση της τοποϊσομεράσης II σε συγκεντρώσεις 600 μ M και 1000 μ M

3.2 Επίδραση του κλάσματος *Le C₂* στη δράση της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης II

Το καθαρό μόριο *Le C₂* λόγω της ισχυρής ανασταλτικής δράσης του σε συγκέντρωση 600 μ M, μελετήθηκε περαιτέρω και σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις των 100, 200, 300, 400 και 500 μ M (**Εικόνα 29**).

1 2 3 4 5 6 7 8

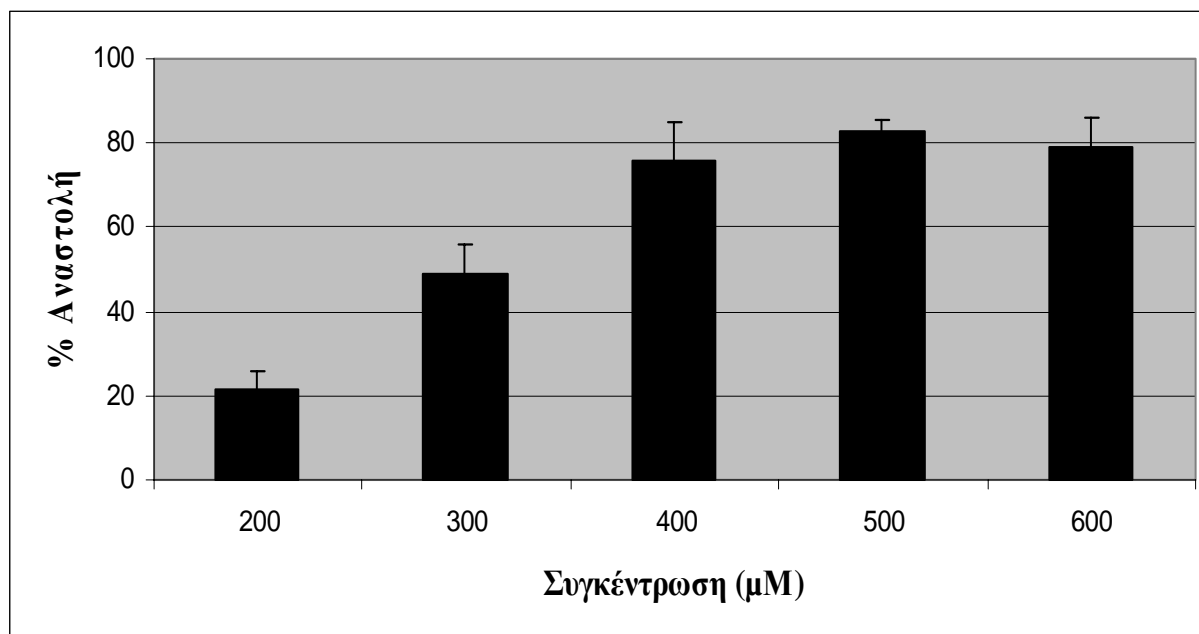


- 1: 200 ng πλασμιδίου
- 2: 200 ng πλασμιδίου + 1.6 units τοποϊσομεράση II
- 3: 200 ng πλασμιδίου + 1.6 units τοποϊσομεράση II + 100 μ M C₂
- 4: 200 ng πλασμιδίου + 1.6 units τοποϊσομεράση II + 200 μ M C₂
- 5: 200 ng πλασμιδίου + 1.6 units τοποϊσομεράση II + 300 μ M C₂
- 6: 200 ng πλασμιδίου + 1.6 units τοποϊσομεράση II + 400 μ M C₂
- 7: 200 ng πλασμιδίου + 1.6 units τοποϊσομεράση II + 500 μ M C₂
- 8: 200 ng πλασμιδίου + 1.6 units τοποϊσομεράση II + 600 μ M C₂

Εικόνα 29: Επίδραση του φυτικού κλάσματος *Le C₂* (100, 200, 300, 400, 500, 600 μ M) στην δράση της τοποϊσομεράσης II

Το μόριο Le C₂ στις συγκεντρώσεις 100, 200 και 300 μM παρουσίασε αναστολή 8%, 21,67% και 49% αντίστοιχα, ενώ στις συγκεντρώσεις 400, 500 και 600 μM παρουσίασε αναστολή 76%, 83% και 79% αντίστοιχα (*Γράφημα 1*). Από τα ποσοστά παρατηρούμε ότι το μέγιστο της αναστολής μπορεί να επιτευχθεί στη συγκέντρωση των 500 μM. Τα ποσοστά αναστολής αποτελούν τη μέση τιμή τουλάχιστον έξι ανεξάρτητων πειραμάτων.

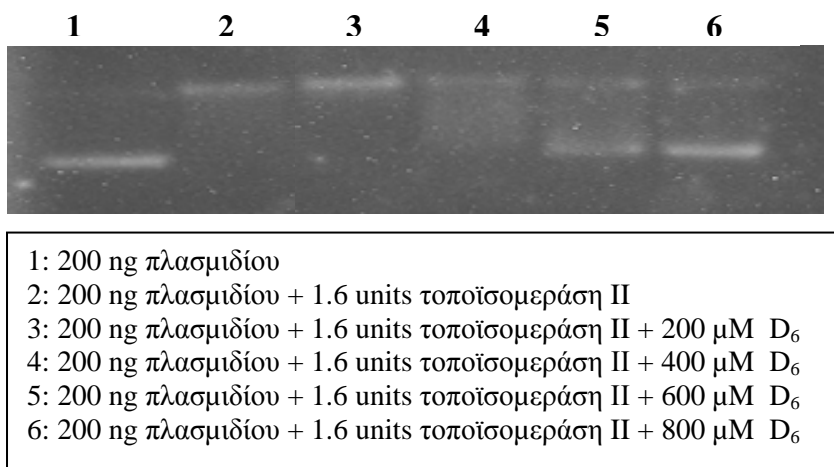
Με βάση τα ποσοστά αναστολής κατασκευάστηκε γραφική παράσταση όπου απεικονίζεται η ανασταλτική δράση του μορίου Le C₂ στις παραπάνω συγκεντρώσεις και η οποία χρησιμοποιείται για την εύρεση του IC₅₀, δηλαδή για την εύρεση της συγκέντρωσης του μορίου που απαιτείται για την αναστολή της καταλυτικής δραστηριότητας της τοποϊσομεράσης II κατά 50%. Το μόριο Le C₂ αποτελεί ισχυρό αναστολέα με τιμή IC₅₀ της τάξεως των 300 μM.



Γράφημα 1: Ποσοστά αναστολής στην δράση της τοποϊσομεράσης II από το μόριο Le C₂ (200, 300, 400, 500, 600 μM).

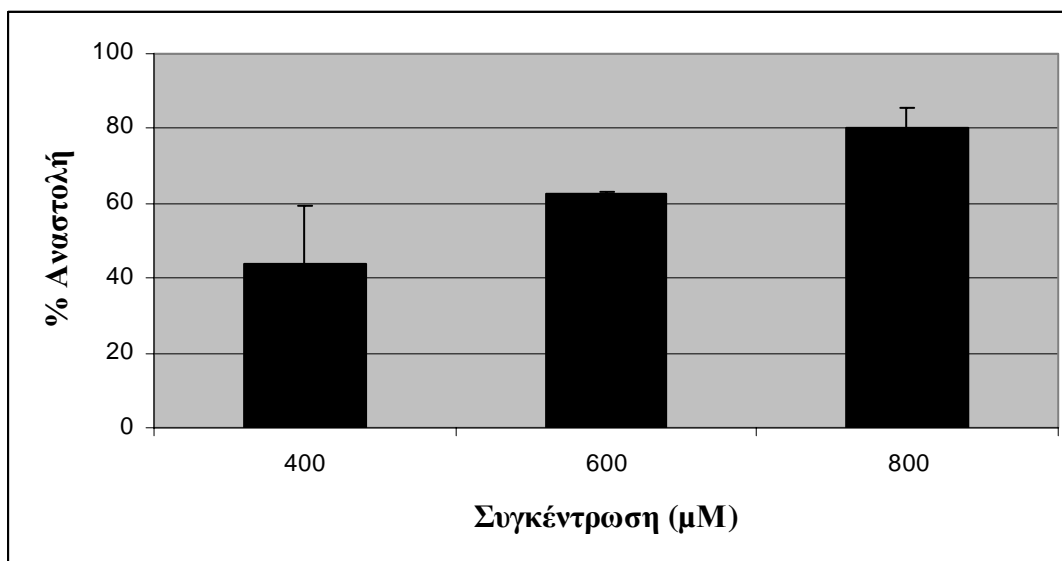
3.3 Επίδραση του κλάσματος *Le D₆* στη δράση της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης II

Το καθαρό μόριο *Le D₆* στη συγκέντρωση των 600 μM εμφάνισε 61% ποσοστό αναστολής της τοποϊσομεράσης II. Στη συνέχεια εξετάστηκε η δράση του σε μικρότερες συγκεντρώσεις, αλλά και στην μεγαλύτερη συγκέντρωση των 800 μM , ώστε να ταυτοποιηθεί η μέγιστη συγκέντρωση του μορίου που απαιτείται για να επιτευχθεί η πλήρης αναστολή του ενζύμου (**Εικόνα 30**). Έτσι βρέθηκε, ότι το εκχύλισμα *Le D₆* σε συγκεντρώσεις 200, 400, 600 και 800 μM εμφανίζει αναστολή της δράσης της τοποϊσομεράσης II με ποσοστά 3,33%, 44%, 62,5% και 80% αντίστοιχα (**Γράφημα 2**).



Εικόνα 30: Επίδραση του φυτικού κλάσματος *Le D₆* (200, 400, 600, 800 μM) στην δράση της τοποϊσομεράσης II

Με βάση τα ποσοστά αναστολής του γραφήματος 2, που αποτελούν την μέση τιμή τριών ανεξάρτητων πειραμάτων, κατασκευάστηκε η γραφική παράσταση απεικόνισης της ανασταλτικής δράσης του *Le D₆* σε διαφορετικές συγκεντρώσεις για την εύρεση της τιμής IC_{50} . Η τιμή IC_{50} του κλάσματος *Le D₆* είναι περίπου 440 μM .

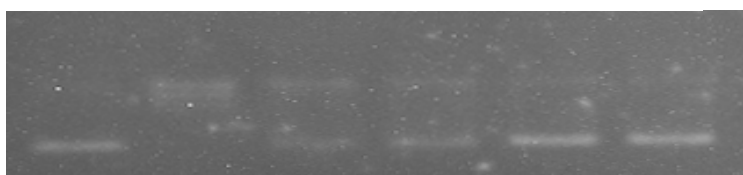


Γράφημα 2: Ποσοστά αναστολής στην δράση της τοποϊσομεράσης II από το μόριο Le D₆ (400, 600, 800 μM)

3.4 Επίδραση του κλάσματος Vf 12e στη δράση της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης II

Το καθαρό μόριο Vf 12e του φυτού *V. faba* μελετήθηκε στις συγκεντρώσεις 200, 400, 600, 800 και 1000 μM και εμφάνισε σημαντική επίδραση στη δράση της τοποϊσομεράσης II (**Εικόνα 31**). Συγκεκριμένα, στις συγκεντρώσεις 200, 400 και 600 μM εμφάνισε αναστολή 10%, 53,5 % και 61,3 % αντίστοιχα και στις συγκεντρώσεις 800 και 1000 μM 92,5% και 85,7 % αντίστοιχα (**Γράφημα 3**). Παρατηρούμε ότι επιτυγχάνεται η μέγιστη αναστολή και ο κορεσμός στη συγκέντρωση των 800 μM.

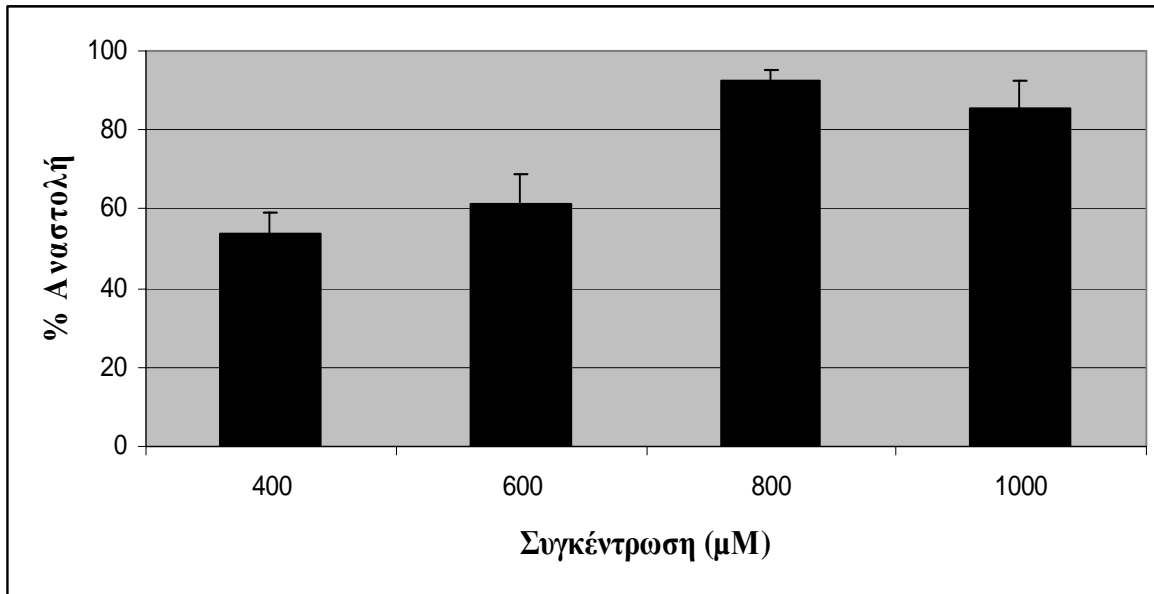
1 2 3 4 5 6



- 1: 200 ng πλασμιδίου
 2: 200 ng πλασμιδίου + 1.6 units τοποϊσομεράση II
 3: 200 ng πλασμιδίου + 1.6 units τοποϊσομεράση II + 400 μM 12e
 4: 200 ng πλασμιδίου + 1.6 units τοποϊσομεράση II + 600 μM 12e
 5: 200 ng πλασμιδίου + 1.6 units τοποϊσομεράση II + 800 μM 12e
 6: 200 ng πλασμιδίου + 1.6 units τοποϊσομεράση II + 1000μM 12e

Εικόνα 31: Επίδραση του φυτικού κλάσματος Vf 12e (400, 600, 800, 1000 μM) στην δράση της τοποϊσομεράσης II

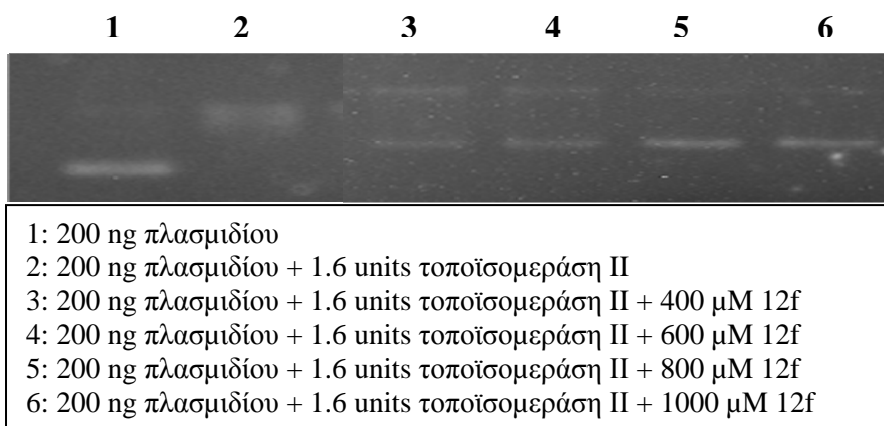
Για την αξιολόγηση της ανασταλτικής δράσης του μορίου Vf 12e κατασκευάστηκε γραφική παράσταση του ποσοστού αναστολής προς τις διαφορετικές συγκεντρώσεις και υπολογίσθηκε ότι η τιμή IC₅₀ είναι 330 μΜ.



Γράφημα 3: Ποσοστά αναστολής στην δράση της τοποϊσομεράσης II από το μόριο Vf 12e (400, 600, 800, 1000 μΜ)

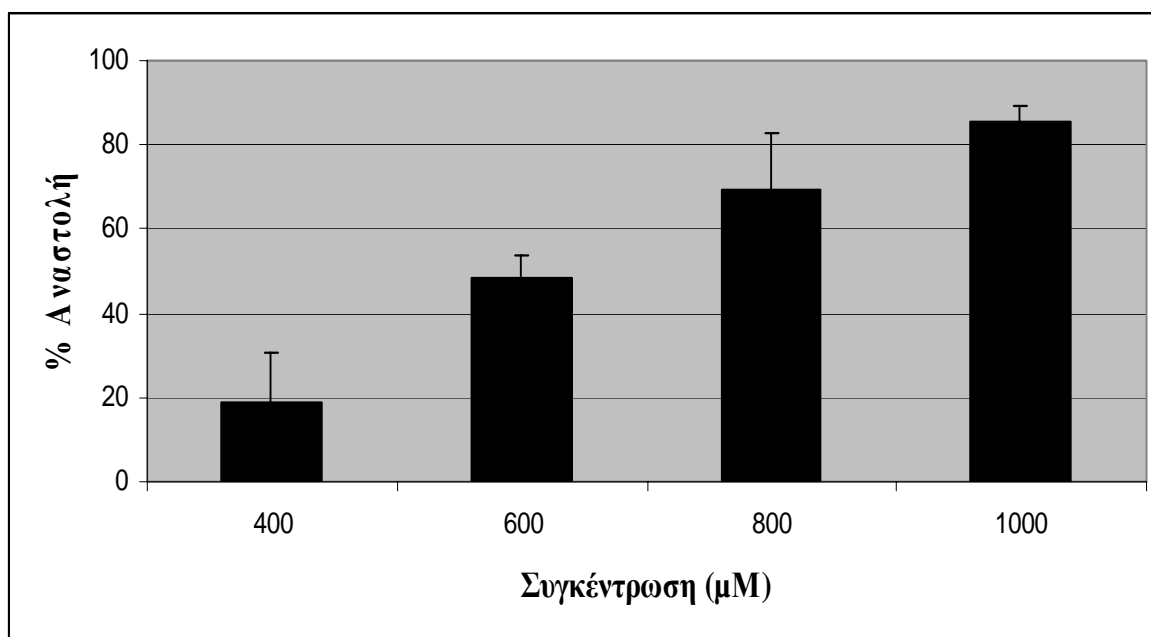
3.5 Επίδραση του κλάσματος Vf 12f στη δράση της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης II

Το καθαρό μόριο Vf 12f του φυτού *V. faba* μελετήθηκε στις συγκεντρώσεις των 200, 400, 600, 800 και 1000 μΜ (**Εικόνα 32**) και εμφάνισε σημαντική επίδραση στην δράση της τοποϊσομεράσης II, κυρίως στις μεγαλύτερες εξεταζόμενες συγκεντρώσεις. Συγκεκριμένα, τα ποσοστά αναστολής στις συγκεντρώσεις 200, 400, 600, 800 και 1000 μΜ εκτιμήθηκαν σε 11%, 19%, 48,5%, 69,3% και 85,3% αντίστοιχα (**Γράφημα 4**).



Εικόνα 32: Επίδραση του φυτικού κλάσματος Vf 12f (400, 600, 800, 1000 μM) στην δράση της τοποϊσομεράσης II

Για την μελέτη της ανασταλτικής δράσης του μορίου Vf 12f είναι απαραίτητος ο υπολογισμός του IC_{50} , που γίνεται με βάση την γραφική παράσταση απεικόνισης του ποσοστού αναστολής στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις. Το μόριο Vf 12f δεν είναι ισχυρό ανασταλτικό μόριο, συγκριτικά με τα προαναφερθέντα κλάσματα, καθώς παρουσιάζει τιμή IC_{50} περίπου 600 μM.



Γράφημα 4: Ποσοστά αναστολής στην δράση της τοποϊσομεράσης II από το μόριο Vf 12f (400, 600, 800, 1000 μM).

4. Συζήτηση

Τα ψυχανθή παίζουν σημαντικό ρόλο στην διατροφή παγκοσμίως, λόγω της υψηλής τους διατροφικής αξίας και επειδή περιέχουν βιοδραστικά φυτοχημικά μόρια που έχουν κερδίσει το ενδιαφέρον ως πιθανοί χημειοπροστατευτικοί και αντιοξειδωτικοί παράγοντες. Φαινολικά μόρια, όπως φαινολικά οξέα, λιγνάνες, φλαβονοειδή (κυρίως ισοφλαβονοειδή) και ανθοκυανίνες βρίσκονται στα ψυχανθή και είναι υπεύθυνα για τις ευεργετικές τους επιδράσεις σε χρόνιες ασθένειες, όπως σε συγκεκριμένους τύπους καρκίνου (μαστού, προστάτη), καρδιαγγειακές ασθένειες και διαβήτη (Spanou et al., 2008).

Οι πολυφαινόλες είναι μια πολύπλοκη ομάδα ενώσεων που χαρακτηρίζονται από σημαντική αντιοξειδωτική 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 των 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 σημαντικά ένζυμα που ρυθμίζουν την τοπολογία του DNA. Η τοποϊσομεράση II παίζει σημαντικό ρόλο στην αντιγραφή, μεταγραφή, ανασυνδυασμό, συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων και τη διατήρηση της σταθερότητας του γενόματος (Wang, 2002). Επειδή η τοποϊσομεράση II είναι απαραίτητο ένζυμο για τις διεργασίες μεταβολισμού του DNA κατά την διάρκεια της φυσιολογικής ανάπτυξης του κυττάρου, τα μόρια που αναστέλλουν την δράση της αποτελούν σημαντικούς αντικαρκινικούς παράγοντες. Οι μηχανισμοί με τους οποίους πολυφαινολικές ουσίες που βρίσκονται στα ψυχανθή δρουν ως χημειοπροστατευτικοί παράγοντες δεν είναι πλήρως γνωστοί. Στα πλαίσια λοιπόν της μελέτης των βιολογικών ιδιοτήτων φυτικών εκχυλισμάτων, με έμφαση στις χημειοπροστατευτικές τους ιδιότητες, πραγματοποιήθηκε η συγκεκριμένη μελέτη.

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η επίδραση κλασμάτων καθαρών μορίων, πλούσιων σε πολυφαινολικές ενώσεις, στην ενεργότητα της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης II. Συνολικά μελετήθηκαν 10 κλάσματα καθαρών μορίων, από τα οποία τα επτά απομονώθηκαν από μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού *Vicia faba* και τα τρία

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).

Από τα επτά καθαρά μόρια που απομονώθηκαν από το ψυχανθές *V. faba*, μόνο δύο παρουσίασαν ανασταλτική δράση στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης II, τα Vf 12e και Vf 12f. Το μόριο Vf 12e μελετήθηκε σε συγκεντρώσεις εύρους 200-1000 μM και παρατηρήθηκε ότι φθάνει σε κορεσμό στην συγκέντρωση των 800 μM (αναστολή σε ποσοστό 92%). Το συγκεκριμένο μόριο εμφάνισε σημαντική επίδραση στην δράση της τοποϊσομεράσης με ενδεικτική τιμή IC_{50} της τάξεως των 330 μM . Το μόριο Vf 12f μελετήθηκε σε συγκεντρώσεις εύρους 200-1000 μM και εμφάνισε σημαντική επίδραση στην δράση της τοποϊσομεράσης II, κυρίως στις μεγαλύτερες εξεταζόμενες συγκεντρώσεις. Συγκεκριμένα, τα ποσοστά αναστολής στις συγκεντρώσεις 200, 400, 600, 800 και 1000 μM εκτιμήθηκαν σε 11%, 19%, 48,5%, 69,3% και 85,3% αντίστοιχα. Όμως, το μόριο Vf 12f δεν αποτελεί ένα ισχυρό ανασταλτικό μόριο της τοποϊσομεράσης II καθώς παρουσιάζει τιμή IC_{50} της τάξεως των 600 μM .

Όσον αφορά στα καθαρά μόρια που απομονώθηκαν από το ψυχανθές *L. edulis*, ανασταλτική δράση παρουσίασαν τα Le C₂ και Le D₆. Η πιο ισχυρή ανασταλτική δράση παρουσιάστηκε από το μόριο Le C₂ το οποίο εξετάστηκε σε εύρος συγκεντρώσεων 100-600 μM και παρατηρήθηκε ότι έφτανε στο μέγιστο της αναστολής (ποσοστό 83%) στη συγκέντρωση των 500 μM . Η τιμή του IC_{50} για το μόριο Le C₂ είναι της τάξεως των 300 μM . Το μόριο Le D₆ εξετάστηκε σε συγκεντρώσεις 200, 400, 600 και 800 μM όπου εμφάνισε αναστολή της δράσης της τοποϊσομεράσης II με ποσοστά 3,33%, 44%, 62,5% και 80% αντίστοιχα. Η τιμή IC_{50} για το συγκεκριμένο κλάσμα είναι 440 μM .

Σε προηγούμενες εργασίες τα φλαβονοειδή, όπως η κερκετίνη και η καιμπφερόλη καθώς και τα γλυκοσίδιά τους έχουν χαρακτηριστεί ως ισχυροί αναστολείς των τοποϊσομερασών I και II (Constantinou et al, 1995; Webb et al., 2004). Από τα αποτελέσματα ταυτοποιήθηκαν τέσσερα κλάσματα που δρουν ως καταλυτικοί αναστολείς της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης II. 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 II. 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 γλυκοσυλίσωσης των υδροξυλομάδων και την δομή του σακχάρου. Όπως προαναφέρθηκε, οι ενώσεις των κλασμάτων είναι στην πλειοψηφία τους γλυκοσίδια καιμπερόλης, 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 II διαθέτουν τα προαναφερθέντα χαρακτηριστικά. Το μόριο Vf 7b που δεν ανέστειλε την τοποϊσομεράση II δεν ανήκει στα φλαβονοειδή. Επίσης το μόριο Vf 5a, που αποτελεί γλυκοσίδιο της κερκετίνης, δεν ανέστειλε την τοποϊσομεράση II και είναι πιθανό η παρουσία του σακχάρου στη θέση C3 να εμποδίζει την ικανότητα αναστολής. Επιπλέον, τα μόρια Vf 7bb, Vf 8c και Vf 11c, παρόλο που αποτελούν γλυκοσίδια της καιμπερόλης δεν ανέστειλαν την τοποϊσομεράση II, πιθανώς λόγω του διαφορετικού σακχάρου που είναι συνδεδεμένο στην υδροξυλομάδα στη θέση του C3 του δακτυλίου A (**Εικόνα 3**). Από τα μόρια του φυτού *L. edulis* το πιο ισχυρό μόριο ήταν το Le C₂, το οποίο 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 ως αναστολέα της τοποϊσομεράσης II. Γενικά, η διαφορετική επίδραση των μορίων στην δράση της τοποϊσομεράσης II οφείλεται στην διαφορετική δομή τους με αποτέλεσμα να διαφέρει ο μηχανισμός αλληλεπίδρασης του κάθε μορίου με το ένζυμο.

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι το μόριο Le C₂, που αποτελεί τον ισχυρότερο αναστολέα της τοποϊσομεράσης II εμφανίζει ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα (εξουδετέρωση της ελεύθερης ρίζας DPPH'), καθώς και προστατευτική δράση ενάντια σε μονόκλωνα σπασίματα που προκαλούνται στο DNA από ελεύθερες ρίζες (OH[•] και ROO[•]) Επίπλέον, το Le C₂ 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).

Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι κλάσματα καθαρών μορίων που προέρχονται από τα φυτά *V. faba* και *L. edulis* παρουσιάζουν ανασταλτική επίδραση στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης II, γεγονός που οφείλεται στις περιεχόμενες

πολυφαινολικές ενώσεις. Σε συνδυασμό με τις αντιοξειδωτικές τους ικανότητες τα κλάσματα αυτά μπορούν να θεωρηθούν πιθανοί αντικαρκινικοί παράγοντες, δημιουργώντας μελλοντικές προοπτικές στην χημειοθεραπεία του καρκίνου. Σε επόμενο στάδιο σημαντική είναι η μελέτη της επίδρασης των ενώσεων στην ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό διαφορετικών καρκινικών κυττάρων καθώς και περαιτέρω μελέτες βιοδιαθεσιμότητας σε ζωντανούς οργανισμούς.

Βιβλιογραφία

- ❖ Adlercreutz H. 2007. Lignans and Human Health, *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, **44**:483-525
- ❖ Benedetti P., Silvestri A. 1999. Visualization of DNA Topoisomerases by Electron Microscopy, *Methods in Molecular Biology*, **94**:269-277
- ❖ 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
- ❖ Bjornsti M., Osheroff N. 1999. Introduction to DNA Topoisomerases, *Methods in Molecular Biology*, **94**:1-8
- ❖ Constantinou A., Mehta R., Runyan C. 1995. Flavonoids as DNA topoisomerase Antagonists and Poisons: Structure-Activity Relationships, *Journal of Natural Products*, **58**:217-225
- ❖ Chowdhury A.R., Sharma S., Mandal S., Goswami A., Mukhopadhyay S., Majumder H.K. 2002. Luteolin, an emerging anti-cancer flavonoid, poisons eukaryotic DNA topoisomerase I, *Biochemical Society*, **366**:653-661
- ❖ Crozier A., Jaganath 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
- ❖ Dragsted L. 2003. Antioxidant Actions of Polyphenols in Humans, *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, **73**:112-119
- ❖ Duranti M. 2005. Grain legume proteins and nutraceutical properties, *Fitoterapia*, **77**:67-82
- ❖ Froelich-Ammon S.J., Osheroff N. 1995. Topoisomerase Poisons: Harnessing the Dark Side of Enzyme Mechanism, *The Journal of Biological Chemistry*, **270**:21429-21432
- ❖ Habermeyer M., Fritz J., Barthelmes H., Christensen M., Larsen M., Boege F., Marko D. 2005. Anthocyanidins Modulate the Activity of Human DNA Topoisomerases I and II and Affect Cellular DNA Integrity, *Chemical Research in Toxicology*, **18**:1395-1404

- ❖ 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
- ❖ Herzog C.E., Zwelling A.L. 2001. Drug-Induced Cytotoxicity in Tissue Culture, *Methods in Molecular Biology*, **95**:205-213
- ❖ Jo J., Mejia E., Lila M., 2006. Catalytic Inhibition of Human DNA Topoisomerase II by Interactions of Grape Cell Culture Polyphenols, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**:2083-2087
- ❖ Katsoulis K. 2006. Oxidative stress and bronchial asthma, *Pneumon*, **19**:311-323
- ❖ Kingma P., Fortune J., Osheroff N. 2001. Topoisomerase II-Catalyzed ATP Hydrolysis as Monitored by Thin-Layer Chromatography, *Methods in Molecular Biology*, **95**:51-56
- ❖ Lamblin F., Hano C., Fliniaux O., Mesnard F., Fliniaux M.A., Laine E. 2008. Interest of lignans in prevention and treatment of cancers, *Medecine sciences*, **24**:511-519
- ❖ Lin P., Lai H.M. 2006. Bioactive Compounds in Legumes and their Germinated Products, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**:3807-3814
- ❖ Mehta R., Murillo G., Naithani R., Peng X. 2010. Cancer Chemoprevention by Natural Products: How Far Have We Come? *Pharmaceutical Research*, **27**:950-961
- ❖ Nichenametla S., Taruscio T., Barney D., Exon J.H. 2006. A Review of the Effects and Mechanisms of Polyphenolics in Cancer, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **46**:161-183
- ❖ Nitiss J.L. 2009. DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions, *Natural Review of Cancer*, **9**:327-337
- ❖ 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
- ❖ Roca J. 1995. The mechanisms of DNA topoisomerases, *Trends in Biochemical Sciences*, **20**:151-160
- ❖ Saarinen N., Warri A., Airio M., Smeds A., Makela S. 2007. Role of dietary lignans in the reduction of breast cancer risk, *Molecular Nutrition and Food Research*, **51**:857-866
- ❖ Spanou C., Bourou G., Dervishi A., Aligiannis N., Angelis A., Komiotis D., Skaltsounis A.L., Kouretas D. 2008. Antioxidant and Chemopreventive Properties

- of Polyphenolic Compounds Derived from Greek Legume Plant Extracts, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**:6967-6976
- ❖ Venn BJ., Mann JI. 2004. Cereal grains, legumes and diabetes, *European Journal of Clinical Nutrition*, **58**:1443-1461
 - ❖ Wang B., Perchellet E.M., Wang Y., Tamura M., Hua D.H, Perchellet H. 2003. Antitumor triptycene bisquinones: a novel synthetic class of dual inhibitors of DNA topoisomerase I and II activities, *Anticancer Drugs*, **14**:503-514
 - ❖ Wang J.C. 2002. Cellular Roles of DNA topoisomerases: A molecular perspective, *Nature Publishing Group*, **3**:430-441
 - ❖ Wang J.C. 1996. DNA Topoisomerases, *Annual Reviews of Biochemistry*, **65**:635-692
 - ❖ 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**: 527-41.
 - ❖ Λουκίδης Σ.Θ. 2007. Οξειδωτικό στρες και ο έλεγχος του στον πνεύμονα, *Πνεύμων*, **20**:285-288
 - ❖ www.minagric.gr
 - ❖ www.wikipedia.com