



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΣΤΑΦΥΛΙΩΝ ΣΤΗΝ
ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΗΣ
ΤΟΠΟΪΣΟΜΕΡΑΣΗΣ Ι ΤΟΥ ΣΙΤΟΥ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
της
Μελετίας Δ. Καλλιαντά

Επιβλέπων : Λιαδάκη Καλλιόπη

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:
Κουρέτας Δ., Λιαδάκη Κ., Στάγκος Δ.

Λάρισα, Σεπτέμβριος 2010

Στοιχεία Πτυχιακής Εργασίας

Το πειραματικό μέρος της πτυχιακής εργασίας με τίτλο “*Επίδραση εκχυλισμάτων σταφυλιών στην ευκαρυωτική τοποϊσομεράση I του σίτου*”, πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη της καθηγήτριας κυρίας Κ. Λιαδάκη.

Τα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής είναι οι:

Κουρέτας Δημήτριος, Καθηγητής Φυσιολογίας Ζώων

Λιαδάκη Καλλιόπη, Λέκτορας Βιοχημικής Φαρμακολογίας

Στάγκος Δημήτριος, Λέκτορας Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών

Ευχαριστίες

Θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω την κυρία Καλλιόπη Λιαδάκη, Λέκτορα του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε στην ανάθεση της πτυχιακής εργασίας, για την καθοδήγηση, τις συμβουλές και τη μετάδοση χρήσιμων γνώσεων, αλλά και για την ευρύτερη πολύτιμη βοήθεια και στήριξής της σε όλη αυτή την προσπάθεια.

Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου, συμπεριλαμβανομένων των προπτυχιακών φοιτητών που πραγματοποίησαν τη διπλωματική τους εργασία παράλληλα με εμένα, για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας στη διάρκεια του πειραματικού μέρους.

Θα ήθελα τέλος να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την κατανόηση και τη συμπαράστασή τους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Εισαγωγή	6
1.1 ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ DNA	6
1.2 ΤΟΠΟΪΣΟΜΕΡΑΣΕΣ	7
1.2.1 Κατάταξη Τοποϊσομερασών	8
1.2.2 Δομή των Τοποϊσομερασών	9
1.2.3 Γενικά Χαρακτηριστικά των τοποϊσομερασών στον Άνθρωπο	10
1.2.4 Μηχανισμός Δράσης Τοποϊσομερασών	12
1.2.4.1 Τορο I	12
1.2.4.2 Τορο II A-B	15
1.2.4.3 Απαιτούμενη Ενέργεια για τη δράση των τοποϊσομερασών	16
1.3 ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΟΠΟΪΣΟΜΕΡΑΣΩΝ	17
1.3.1 Επισκόπηση αναστολέων Τορο I	18
1.3.1.2 Αναστολείς Δηλητήρια (Poisons)	18
1.3.1.3 Καταλυτικοί αναστολείς (Suppressors)	21
1.3.2 Επισκόπηση αναστολέων Τορο II	21
1.3.2.1 Αναστολείς δηλητήρια (Poisons)	21
1.3.2.2 Καταλυτικοί αναστολείς (Suppressors)	22
1.4 ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΠΟΪΣΟΜΕΡΑΣΩΝ	22
1.4.1 Αντιγραφή	22
1.4.2 Μεταγραφή	24
1.4.3 Ανασυνδυασμός DNA	24
1.4.4 Δομή και συμπίκνωση Χρωμοσωμάτων	24
1.5 ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ	25
1.5.1 Φλαβονοειδή	26
1.5.2 Φαινολικά οξέα	29
1.5.3 Φαινολικές αλκοόλες	30
1.5.4 Στιλβένια	31
1.5.5 Λιγνάνες	21
1.6 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ	32
1.7 ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑ	32
1.7.1 Εντερική απορρόφηση	33
1.7.2 Μηχανισμοί σύζευξης και μεταφορά στο πλάσμα	34
1.7.3 Συγκέντρωση πολυφαινολών στο πλάσμα	37
1.7.4 Κατανομή και Απέκκριση	39
1.8 ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ	39
1.9 ΠΟΛΥΣΤΑΔΙΑΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΚΑΡΚΙΝΟΥ	41
1.9.1 Χημειοπροστασία	43
1.9.2 Πολυφαινόλες ως χημειοπροστατευτικοί παράγοντες – Μηχανισμοί δράσης	43
1.10 ΣΚΟΠΟΣ	49
1.11 ΣΤΑΦΥΛΙΑ	49
2. Υλικά και Μέθοδοι	51
2.1 ΥΛΙΚΑ	51
2.1.1 Εκχυλίσματα που μελετήθηκαν	51
2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ	54
2.2.1 Topoisomerase I relaxation assay - Αρχή της μεθόδου	54
2.2.2 Πειραματική διαδικασία	56
2.2.2.1 Απομόνωση πλασμιδίου	56

2.2.2.2 Wheat germ Topoisomerase I relaxation assay	57
2.2.3 Υπολογισμοί	58
3.Αποτελέσματα	60
3.1 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΣΤΑΦΥΛΙΩΝ ΣΤΗΝ ΤΟΠΟΪΣΟΜΕΡΑΣΗ Ι ΤΟΥ ΣΙΤΟΥ	60
3.1.1 Εκχυλίσματα από Σταφύλια-Καρπούς	60
3.1.2 Εκχυλίσματα από Στέμφυλα	64
3.1.3 Εκχυλίσματα από Βόστρυχους	68
4.Συζήτηση	75
Βιβλιογραφία	78

Περίληψη

Τα σταφύλια και το κρασί είναι κυρίαρχα διαιτητικά συστατικά πολλών πληθυσμών και μία πλούσια πηγή πολυφαινόλων. Οι πολυφαινόλες είναι οργανικές ενώσεις με χαρακτηριστική δομή, παράγονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες από τα φυτά και αποτελούν μία πολυπληθή ομάδα αντιοξειδωτικών μορίων. Εκτός από την αντιοξειδωτική δράση, στις πολυφαινόλες αποδίδονται και άλλες σημαντικές δράσεις όπως η αντιφλεγμονώδης, η αντιμικροβιακή και η αντικαρκινική. Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε *in vitro* η επίδραση 11 εκχυλισμάτων σταφυλιών στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I του σίτου. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η ενεργότητα του ενζύμου αναστέλλεται από τα εκχυλίσματα που απομονώθηκαν από καρπούς, από στέμφυλα και βόστρυχους, και μάλιστα η αναστολή είναι δόσο-εξαρτώμενη με τιμές IC₅₀: 0.8 - 6μg/ml. Η αναστολή των τοποϊσομερασών *in vivo* διαταράσσει την ομοιόσταση των κυττάρων καθώς οι τοποϊσομεράσες συμμετέχουν σε ζωτικές κυτταρικές λειτουργίες, όπως η αντιγραφή, η μεταγραφή και ο ανασυνδυασμός και είναι υπεύθυνες για τη διατήρηση της σταθερότητας του γενώματος. Η λειτουργία τους συνίσταται στην εκπλήρωση ενός καταλυτικού κύκλου προκειμένου να ελεγχθεί η υπερσπείρωση στο γενετικό υλικό. Οι τοποϊσομεράσες χαρακτηρίζονται ως ενδογενείς τοξίνες καθώς αν ο καταλυτικός κύκλος δεν μπορεί να ξεκινήσει ή να ολοκληρωθεί, τότε αυξάνεται η αστάθεια του γενώματος. Μάλιστα όσο υψηλότερα είναι τα επίπεδα των ενζύμων, όπως συμβαίνει στα καρκινικά κύτταρα, τόσο περισσότερο αυξάνεται η πιθανότητα το κύτταρο να οδηγηθεί σε απόπτωση. Η αναστολή επομένως των ενζύμων αυτών από τα 11 εκχυλίσματα σταφυλιών που εξετάστηκαν, πιθανώς να αποτελεί σε επίπεδο οργανισμού έναν χημειοπροστατευτικό και αντικαρκινικό μηχανισμό. Η ταυτοποίηση χημειοπροστατευτικών και αντικαρκινικών μηχανισμών είναι πολύ σημαντική δεδομένου ότι ο καρκίνος είναι μία από τις κύριες αιτίες θανάτου ανδρών και γυναικών παγκοσμίως.

1. Εισαγωγή

1.1 Τοπολογία του DNA

Η κλασική μορφή της διπλής έλικας του γενετικού υλικού κατά τους Watson και Crick είναι το B-DNA. Το B-DNA χαρακτηρίζεται από απόσταση ανά ζεύγος βάσεων $3,4 \text{ \AA}$, από διάμετρο έλικας $23,7 \text{ \AA}$, από ζεύγη βάσεων ανά στροφή έλικας $10,4 \text{ \AA}$, από απόσταση ανά στροφή έλικας $35,4 \text{ \AA}$, η φορά περιστροφής είναι δεξιόστροφη, η μεγάλη αύλακα είναι πλατιά και αρκετά βαθιά και η μικρή αύλακα επίσης αρκετά βαθιά αλλά στενή (Stryer, 2004). Οι συνέπειες που προκύπτουν από τη διαμόρφωση και τη γενικότερη τοπολογία της διπλής έλικας του DNA δημιουργούν ένα δύσκολο καθήκον για το κύτταρο που ακόμα και ο Σίσυφος* θα μπορούσε να εκτιμήσει.

Πώς εφαρμόζεται η τοπολογία στο γενετικό υλικό;

Προκειμένου να γίνει κατανοητή η τοπολογία του DNA πρέπει να εισαχθούν τρεις βασικές μαθηματικές έννοιες: το μέτρο στρέψης (Tw), ο αριθμός συστροφών (Wr) και ο αριθμός σύνδεσης (Lk).

Το μέτρο στρέψης, αποτελεί ιδιότητα της ίδιας της διπλής έλικας και αντιπροσωπεύει την περιστροφή του ενός κλώνου γύρω από τον άλλο. Αντιστοιχεί στο συνολικό αριθμό στροφών του δίκλωνου μορίου και καθορίζεται από τον αριθμό των ζευγών βάσεων ανά στροφή.

Ο αριθμός συστροφών είναι ένα μέτρο των σπειρώσεων του άξονα της διπλής έλικας, οι οποίες ονομάζονται υπερσπειράματα. Με άλλα λόγια, αντιστοιχεί στη φυσική έννοια της υπερελίκωσης. Έτσι, για ένα χαλαρωμένο μόριο $Wr=0$.

Η μαθηματική έκφραση που περιγράφει αθροιστικά τις δύο παραπάνω παραμέτρους είναι ο αριθμός σύνδεσης. Ο αριθμός σύνδεσης ορίζει το πόσες φορές ένας κλώνος DNA στρέφεται γύρω από τον άξονα της έλικας προς τη δεξιόστροφη κατεύθυνση, όταν ο άξονας είναι περιορισμένος σε ένα επίπεδο. Ο αριθμός σύνδεσης είναι μία καθοριστική τοπολογική ιδιότητα που προσδιορίζεται για κλειστά μόρια, δηλαδή για κυκλικά μόρια DNA ή για γραμμικά μόρια των οποίων τα δύο άκρα είναι ακινητοποιημένα. Επομένως, η τοπολογία μας διδάσκει ότι: $Lk = Tw + Wr$.

Κλειστά μόρια γενετικού υλικού με πανομοιότυπη αλληλουχία μπορεί να έχουν διαφορετικούς αριθμούς σύνδεσης, γεγονός που αντικατοπτρίζει διαφορετικούς βαθμούς υπερελίκωσης. Μόρια DNA που είναι ακριβώς όμοια σε όλα εκτός από τους αριθμούς σύνδεσης ονομάζονται τοπολογικά ισομερή ή τοποϊσομερή. Τα ισομερή αυτά του DNA προκύπτουν από τη δράση ειδικών ενζύμων που ονομάζονται τοποϊσομεράσες (Deweese et al., 2008).

Σίσυφος*: Βασιλιάς της Κορίνθου που σύμφωνα με την Αρχαία Ελληνική Μυθολογία τιμωρήθηκε από τους θεούς του Ολύμπου να κουβαλάει έναν βράχο στην κορυφή ενός βουνού. Φτάνοντας στην κορυφή, ο βράχος δεν σταθεροποιούταν και έπεφτε και πάλι στους πρόποδες. Η τιμωρία ήταν αιώνια (www.wikipedia.org).

1.2 Τοποϊσομεράσες

Η ανάγκη ύπαρξης των τοποϊσομερασών αναγνωρίστηκε πολύ πριν την ανακάλυψή τους. Όταν οι J. Watson και Fr. Crick ανακάλυψαν το μοντέλο της διπλής έλικας του DNA και το δημοσίευσαν το 1953 ανέφεραν ότι θα πρέπει να υπάρχει ένας μηχανισμός που θα μπορεί να λύνει τους κόμπους που προκύπτουν από τα δομικά χαρακτηριστικά του γενετικού υλικού.

Η πρώτη DNA τοποϊσομεράση (Topo I) απομονώθηκε από την *Escherichia coli* το 1971 (Wang, 1971). Το 1972 βρέθηκε η ευκαρυωτική Topo I σε εμβρυϊκά κύτταρα ποντικού και στη συνέχεια το ένζυμο αυτό απομονώθηκε από τη ζύμη αλλά και από άλλα θηλαστικά.

Οι τοποϊσομεράσες είναι απαραίτητα ένζυμα για την κυτταρική επιβίωση, καθώς είναι υπεύθυνες για τη διατήρηση της σταθερότητας του γενώματος. Ωστόσο, προκειμένου να εκπληρώσουν το σκοπό τους, πρέπει να διασπάσουν τοπικά τη διπλή έλικα. Καθώς οι τοποϊσομεράσες δημιουργούν σπασίματα στο γενετικό υλικό, κάτι το οποίο αυξάνει την αστάθεια του γενώματος, θα μπορούσε να υποθέσει κάποιος πως διαθέτουν μία διπλή προσωπικότητα διότι έχουν μία κρυφή δυναμική να προκαλούν μεταλλάξεις.

Φυσιολογικά, τα σύμπλοκα τοποϊσομεράσης-γενετικού υλικού που ευθύνονται για τα σπασίματα στο γενετικό υλικό είναι προσωρινά, γρήγορα και διατηρούνται πάντα σε χαμηλά επίπεδα. Για αυτό το λόγο δεν προκαλούν καμία αρνητική επίπτωση και εντάσσονται αρμονικά στο σύνολο των λειτουργιών του κυττάρου. Ωστόσο, αν για κάποιο λόγο τα σπασίματα στο DNA δεν αποκατασταθούν ή αν κάποιο άλλο ένζυμο που σχετίζεται άμεσα με τον μεταβολισμό του DNA όπως η DNA πολυμεράση ή ελικάσες, συγκρουστούν με τα σύμπλοκα αυτά τότε τα σπασίματα στο γενετικό υλικό, δεν γεφυρώνονται πια από τις τοποϊσομεράσες και ενεργοποιούνται κυτταρικά μονοπάτια επιδιόρθωσης και ανασυνδυασμού. Έτσι, αυξάνεται η πιθανότητα εμφάνισης ανταλλαγών χρωμοσωμικών τμημάτων μεταξύ αδελφών χρωματίδων, μεταθέσεων, δημιουργίας εκτεταμένων ελλειμμάτων ή και ενθέσεων και γενικά χρωμοσωμικών ανωμαλιών. Όταν τα πλέον μόνιμα σπασίματα απαντώνται σε ένα μεγάλο μέρος του γενετικού υλικού, προκαλούν μία σειρά γεγονότων τα οποία οδηγούν το κύτταρο σε απόπτωση ή νέκρωση (Fortune et al, 2000, Leppard et al, 2005, McClendon et al, 2007, Pommier 2006, Bender et al, 2008).

Εξαιτίας αυτής της ιδιαίτερης ικανότητας των τοποϊσομερασών να δρουν, υπό συγκεκριμένες συνθήκες, ως DNA νουκλεάσες, προτάθηκε πως οι παράγοντας που προκαλούν τη δημιουργία ή την σταθεροποίηση των συμπλόκων DNA-τοποϊσομερασών θα μπορούσαν να αποτελέσουν αντικαρκινικά φάρμακα. Πράγματι, μέχρι σήμερα δεκάδες μόρια που χρησιμοποιούνται ως βασική θεραπεία σε πολλές μορφές καρκίνου, αποτελούν αναστολείς των τοποϊσομερασών. Τα μόρια αυτά μετά τη χορήγησή τους, στοχεύοντας τα καρκινικά κύτταρα και τις τοποϊσομεράσες που περιέχονται σε μεγάλες ποσότητες σε αυτά, προκαλούν

επιπλοκές στη σταθερότητα του γενώματος και οδηγούν τα καρκινικά κύτταρα σε θάνατο.

1.2.1 Κατάταξη Τοποϊσομερασών

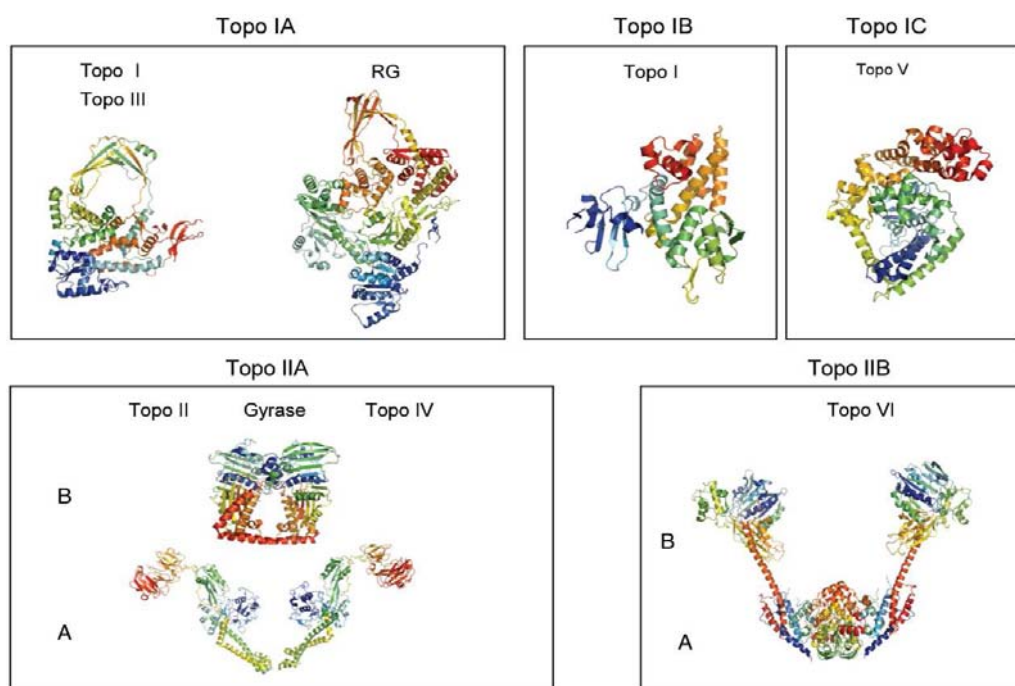
Οι τοποϊσομεράσες είχαν αρχικά κατηγοριοποιηθεί σε τύπου I και II. Οι κατηγορίες αυτές μπορούν να διαιρεθούν περαιτέρω σε τοποϊσομεράσες τύπου IA, IB, IIA και IIB, βάσει αποκλειστικά των χαρακτηριστικών λειτουργίας τους. Συγκεκριμένα, οι Τοπο I διασπών τον ένα κλώνο του DNA, ενώ οι Τοπο II διασπών και τους δύο κλώνους του DNA. Οι τύπου IA συνδέονται με το 5' άκρο του διασπασμένου κλώνου, ενώ οι τύπου IB συνδέονται στο 3' άκρο του διασπασμένου κλώνου. Οι Τοπο IIA δημιουργούν δίκλινα σπασίματα με τέσσερις προεξέχουσες βάσεις (overhangs), ενώ οι Τοπο IIB δημιουργούν επίσης δίκλινα σπασίματα στο γενετικό υλικό αλλά με δύο βάσεις προεξέχουσες (overhangs).

Ωστόσο οι τοποϊσομεράσες τύπου I διαθέτουν και μία επιπλέον οικογένεια ενζύμων, εκτός από τις IA και IB, τις IC. Αξίζει να σημειωθεί ότι η οικογένεια Τοπο IC περιλαμβάνει προς το παρόν μόνο μία ιδιαίτερα ασυνήθιστη τοποϊσομεράση, την Τοπο V, η οποία ανακαλύφθηκε περίπου 15 χρόνια πριν, σε ένα ειδικό είδος υπερθερμόφιλων μεθανογενών αρχαίων (*Methanopyrus kandleri*) τα οποία αναπτύσσονται ακόμα και σε περιβάλλοντα με 110°C. Αρχικά η Τοπο V συγκαταλέχθηκε στις Τοπο IB, λόγω αρκετών κοινών λειτουργικών τους χαρακτηριστικών. Στη συνέχεια όμως αποδείχθηκε πως η τοποϊσομεράση αυτή δεν είναι ομόλογη με τις Τοπο IB για αυτό και θεωρήθηκε ως το πρωτότυπο ένζυμο μίας νέας οικογένειας τοποϊσομερασών, των Τοπο IC.

Είναι σημαντικό να σημειωθεί πως από τις αλληλουχίες των ενζύμων καθώς και από τα δομικά τους χαρακτηριστικά, πλέον η κατηγοριοποίηση των τοποϊσομερασών γίνεται βάσει των εξελικτικών σχέσεων μεταξύ τους, η οποία ωστόσο συμπίπτει και με την αρχική κατηγοριοποίηση βάσει καθαρά των λειτουργικών χαρακτηριστικών τους. Επομένως, συνολικά υπάρχουν 5 διακριτές οικογένειες τοποϊσομερασών, οι οποίες προέρχονται από 5 διακριτά προγονικά ένζυμα. Η κάθε μία οικογένεια χωρίζεται σε υποοικογένειες και τα ένζυμα που ανήκουν στην ίδια υποοικογένεια παρουσιάζουν πολλές δομικές και λειτουργικές ομοιότητες. Όλα τα ένζυμα που κατατάσσονται στις Τοπο I ονομάζονται με μονούς λατινικούς αριθμούς (I, III, V), ενώ τα ένζυμα που ανήκουν στις Τοπο II ονομάζονται με ζυγούς λατινικούς αριθμούς (II, IV, VI).

Σε ορισμένα ένζυμα βέβαια έχουν δοθεί και ειδικές ονομασίες όπως συμβαίνει με την βακτηριακή Τοπο IA, η οποία αναφέρεται και ως ω πρωτεΐνη, με την βακτηριακή Τοπο IIA η οποία αναφέρεται ως γυράση και με μία ασυνήθιστη Τοπο IA που αναφέρεται ως αντίστροφη γυράση. Με την ονομασία γυράση δίνεται έμφαση στην ικανότητα του ενζύμου να εισάγει αρνητικές υπερέλικες, ενώ στην περίπτωση της αντίστροφης γυράσης, δίνεται έμφαση στην ικανότητα του ενζύμου

να εισάγει θετικές υπερέλικες. Στην εικόνα 1 απεικονίζονται αντιπροσωπευτικές δομές των πέντε οικογενειών τοποϊσομερασών (Forterre et al, 2009).

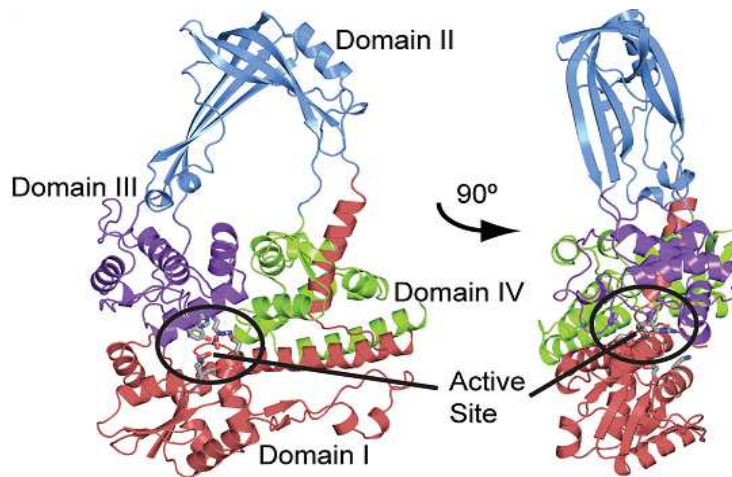


Εικόνα 1: Κρυσταλλικές δομές των 5 οικογενειών των τοποϊσομερασών. Για κάθε οικογένεια ενζύμου παρουσιάζεται μία αντιπροσωπευτική δομή.

1.2.2 Δομή των Τοποϊσομερασών

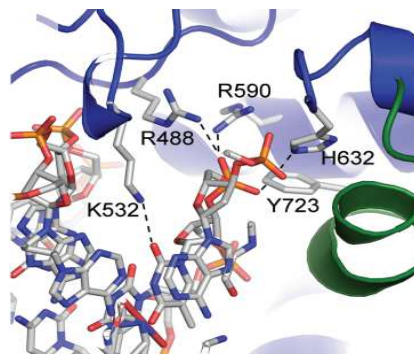
Οι τοποϊσομεράσες τύπου IA έχουν βρεθεί σε βακτήρια, αρχαία και ευκαρυώτες και δεδομένα υποστηρίζουν πως υπάρχει αρκετά μεγάλη ομολογία μεταξύ των μελών αυτής της οικογένειας των ενζύμων, προτείνοντας αντίστοιχα ομοιότητα στη δομή αλλά και στον τρόπο δράσης (Corbett et al, 2004). Τα ένζυμα τύπου IA έχουν τυπικά μοριακό βάρος 67 kDa και διαθέτουν μία χαρακτηριστική δακτυλιοειδή δομή η οποία συγκροτείται από τέσσερις διακριτές επικράτειες. Η δομή αυτή ανακαλύφθηκε αρχικά στην Topo I του βακτηρίου *E.coli* (Lima et al, 1994).

Τα πρώτα 160 κατάλοιπα του ενζύμου σχηματίζουν τέσσερις α -έλικες και τέσσερις β -αλυσίδες (α/β περιοχή) που συνολικά αποτελούν την επικράτεια I. Στο ανώτερο σημείο της δομής βρίσκεται η επικράτεια II η οποία αποτελείται από αντιπαράλληλα β -φύλλα. Η επικράτεια III αποτελείται κυρίως από α -έλικες και περιλαμβάνει το εξαιρετικά συντηρημένο κατάλοιπο τυροσίνης, όπως και άλλα συντηρημένα κατάλοιπα. Τέλος, η επικράτεια IV επίσης αποτελείται από α -έλικες και αντιπροσωπεύει το καρβοξυτελικό άκρο του ενζύμου. Οι επικράτειες συνολικά φαίνονται στην εικόνα 2.



Εικόνα 2: Κρυσταλλική δομή της τοποϊσομεράσης τύπου IA.

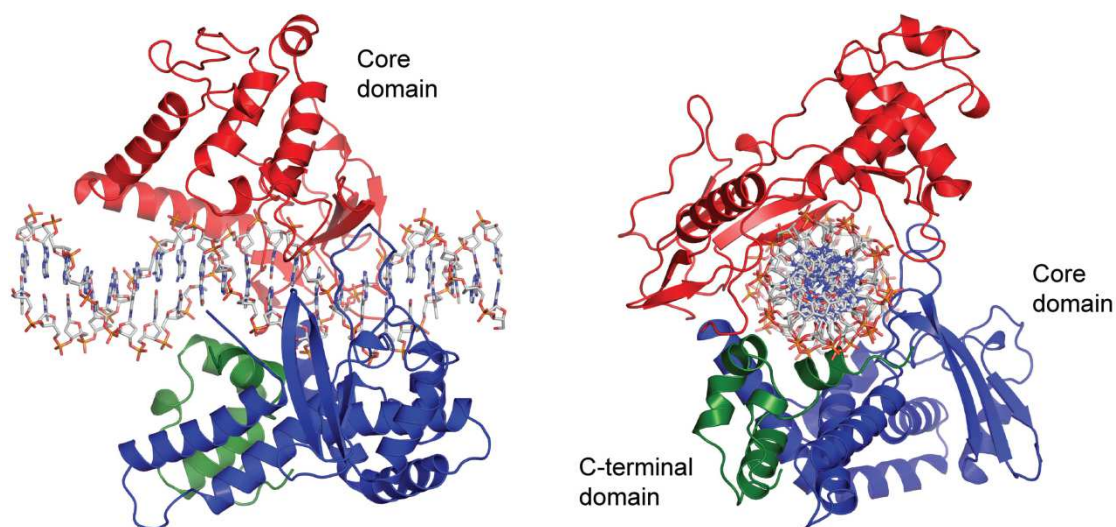
Οι τοποϊσομεράσες τύπου IB έχουν ταυτοποιηθεί σε ευκαρυώτες, ιούς και βακτήρια αλλά όχι σε αρχαία. Οι ευκαρυωτικές Τοπο IB είναι μεγάλες πρωτεΐνες με μοριακό βάρος περίπου 90 kDa, ενώ στα βακτήρια και στους ιούς έχουν μέσο μοριακό βάρος 36 kDa. Παρά τις διαφορές τους στο μέγεθος όλα τα ένζυμα τύπου IB διαθέτουν παρόμοιες δομές γύρω από τις ενεργές τους περιοχές και έχουν όμοιο τρόπο δράσης (Corbett et al, 2004, Cheng et al, 1998, Redinbo et al, 1998). Συγκεκριμένα, όλες οι τοποϊσομεράσες τύπου IB περιέχουν μία εξαιρετικά συντηρημένη πεντάδα καταλοίπων (Tyr, Arg, Arg, Lys και His/Asn) τα οποία σχηματίζουν με πανομοιότυπο τρόπο την ενεργή περιοχή σε κάθε ένα ένζυμο, όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.



Εικόνα 3: Το ενεργό κέντρο της τοποϊσομεράσης τύπου IB. Το ένζυμο συνδέεται μη ομοιοπολικά με DNA.

Στις ευκαρυωτικές τοποϊσομεράσες τύπου IB, ο πυρήνας του ενζύμου (core domain) και η καρβοξυτελική περιοχή σχηματίζουν ένα πλήρως λειτουργικό ένζυμο (Stewart et al, 1996). Οι δύο αυτές επικράτειες συνδέονται μέσω μίας περιοχής συνδέτη (linker region) η οποία αποτελείται από δύο μεγάλες έλικες. Η καρβοξυτελική περιοχή μάλιστα περιέχει το καταλυτικό και συντηρημένο κατάλοιπο τυροσίνης, ενώ τα υπόλοιπα συντηρημένα αμινοξέα της πεντάδας

βρίσκονται στον πυρήνα (Baker et al., 2009). Η κρυσταλλική δομή της IB δίνεται στην εικόνα 4.



Εικόνα 4: Κρυσταλλική δομή της τοποϊσομεράσης τύπου IB. Το ένζυμο περικλείει το DNA χωρίς να έχει συνδεθεί ομοιοπολικά με αυτό.

Τα βασικά δομικά χαρακτηριστικά της τοποϊσομεράσης II αναφέρονται στην ενότητα “Μηχανισμός δράσης των Τοποϊσομερασών”, καθώς είναι πιο εύκολο να αποκτηθεί μία συνολική εικόνα για τη δομή του ενζύμου παράλληλα με το πρότυπο δράσης του.

1.2.3 Γενικά Χαρακτηριστικά των τοποϊσομερασών στον Άνθρωπο

Σήμερα είναι γνωστό ότι τα σωματικά κύτταρα των θηλαστικών εκφράζουν έξι γονίδια τοποϊσομερασών: δύο γονίδια Τορο I (ένα πυρηνικό και ένα μιτοχονδριακό), δύο γονίδια Τορο II (α και β ισομορφές) και δύο γονίδια Τορο III (α και β ισομορφές).

Το γονίδιο της Τορο IB βρίσκεται στο χρωμόσωμα 20 και συγκεκριμένα στη θέση 20p12-13.2 (Juan et al, 1988).

Στα θηλαστικά υπάρχουν δύο ισομορφές του γονιδίου Τορο IA (ή Τορο III). Το γονίδιο της Τορο IIIα βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17 και συγκεκριμένα στη θέση 17p11.2-12, ενώ της Τορο IIIβ βρίσκεται στη θέση 22q11. Τα δύο αυτά γονίδια κωδικοποιούν εναλλακτικά μετάγραφα από τα οποία προκύπτουν πρωτεΐνες που διαφέρουν στην καρβοξυτελική τους περιοχή, η οποία συμμετέχει στην πρόσδεση στο DNA. Οι ισομορφές της Τορο III υποδηλώνουν την ύπαρξη διαφόρων φυσιολογικών λειτουργιών αυτής της τοποϊσομεράσης. Είναι σημαντικό να ειπωθεί πως ο ρόλος της Τορο III είναι κυρίως να δρα τοπικά παρά να εμπλέκεται στη ρύθμιση της γενικότερης τοπολογικής κατάστασης του πυρηνικού DNA (Bugreen et al, 2009).

Η Τορο II βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17 (17q21-22). Τα σπονδυλωτά εκφράζουν δύο ισομορφές της τοποϊσομεράσης II, την α και τη β. Οι ισομορφές α και β έχουν παρόμοιες ιδιότητες αλλά διαφέρουν σημαντικά στη ρύθμιση που επιδέχονται και στις κυτταρικές λειτουργίες που επιτελούν. Η Τορο IIα αποτελεί ένα απαραίτητο ένζυμο για την επιβίωση κυττάρων που πολλαπλασιάζονται. Τα επίπεδα του ενζύμου αυξάνονται δραματικά σε περιόδους ανάπτυξης και ρυθμίζονται κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, φτάνοντας σε ανώτερα επίπεδα στη φάση G2/M. Γενικά έχει αποδειχθεί ότι η παρουσία της Τορο IIα είναι σημαντική τόσο σε κυτταρικές διαδικασίες που σχετίζονται άμεσα με τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, όσο με την αντιγραφή και τον διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων. Αντίθετα, η Τορο IIβ φαίνεται να συμμετέχει στη μεταγραφή, ενώ γενικά ο ακριβής φυσιολογικός ρόλος της ισομορφής αυτής δεν είναι απόλυτα κατανοητός (Fortune et al, 2000). Οι ισομορφές α και β ανήκουν στις τοποϊσομεράσες τύπου IIΑ.

1.2.4 Μηχανισμός Δράσης Τοποϊσομερασών

Υπάρχουν διακριτές διαφορές στον τρόπο δράσης αλλά και στο υπόστρωμα στο οποίο δρουν οι δύο γενικές κατηγορίες τοποϊσομερασών (I και II). Η αναφορά που ακολουθεί αφορά κυρίως τις ευκαρυωτικές ισομορφές.

1.2.4.1 Τορο I

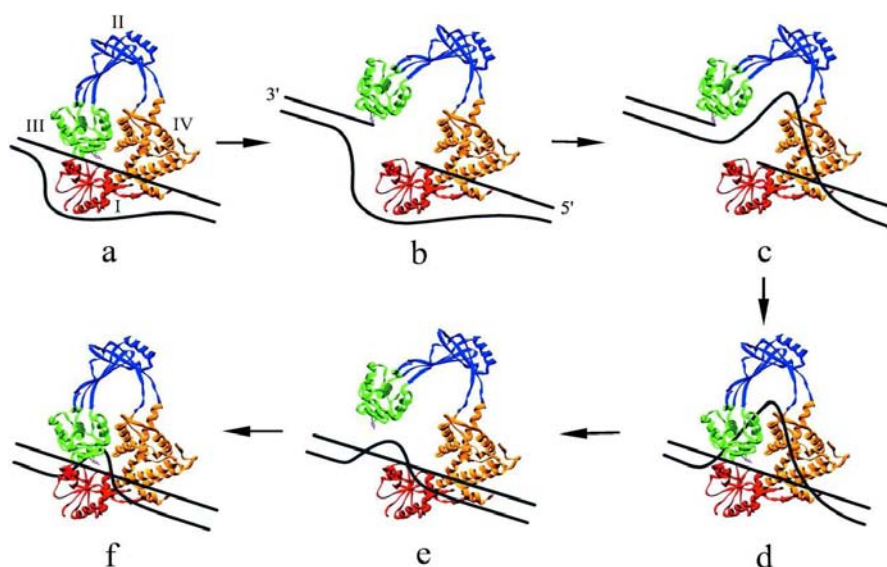
Τορο IA

Το ένζυμο προσδένεται αποκλειστικά σε μονόκλινα τμήματα δίκλωνων μορίων DNA. Μονόκλινα τμήματα βρίσκονται μόνο σε αρνητικά υπερελικωμένα τμήματα και μάλιστα η αποτελεσματικότητα της σύνδεσης του ενζύμου αυξάνεται με την αύξηση της αρνητικής υπερελίκωσης του μορίου-στόχου. Παράλληλα, η παρουσία μονόκλωνων τμημάτων υποδηλώνει τη γενικότερη τοπολογική κατάσταση του DNA (Kirkeraard et al, 1985).

Σε ένα πρώιμο στάδιο, το DNA στόχος τοποθετείται στο εσωτερικό της κοιλότητας του ενζύμου. Η υδροξυλική ομάδα της τυροσίνης, στο καρβοξυτελικό άκρο του ενζύμου, η οποία δρα ως πυρηνόφιλο προσβάλλει μία φωσφορική ομάδα στον έναν κλώνο του DNA ώστε να σχηματιστεί ένας ομοιοπολικός φωσφοδιεστερικός δεσμός μεταξύ του ενζύμου και του 5' άκρου του κλώνου του DNA. Επομένως η αντίδραση αυτή οδηγεί στη διάσπαση του κλώνου που προσβάλλεται. Η μεταφορά δεσμών από το νουκλεϊκό οξύ στο ένζυμο εξηγεί πως το ένζυμο λειτουργεί χωρίς κατανάλωση ενέργειας (GENES VIII, Lewin., 2004). Είναι ωστόσο απαραίτητη για τη δράση των Τορο IA η παρουσία δισθενών κατιόντων (Domanico et al, 1991). Η σύνδεση του ενζύμου (Τορο IA) με το 5' άκρο του διασπασμένου κλώνου απαντάται και στους προκαρυώτες. Στο στάδιο αυτό το ένζυμο ουσιαστικά αλληλεπιδρά τόσο με τον διασπασμένο κλώνο, ασφαρίζοντας τα δύο άκρα και γεφυρώνοντας το κενό που δημιουργείται, όσο και με τον ανέπαφο.

Η διαδικασία μέσω της οποίας το ένζυμο μειώνει την αρνητική υπερελίκωση του μορίου περιγράφεται από το μοντέλο “πέρασμα της αλυσίδας που γεφυρώνεται από το ένζυμο” ή “enzyme-bridged strand-passage”. Σύμφωνα με αυτό, το ένζυμο περνά τον ανέπαφο κλώνο από το ρήγμα που έχει δημιουργηθεί. Η αντίδραση αλλάζει τον αριθμό σύνδεσης κατά μία μονάδα ανά καταλυτικό κύκλο και έτσι κάθε φορά που ο ένας κλώνος περνά μέσα από ένα άνοιγμα του άλλου κλώνου παρατηρείται $\Delta L=+1$ (Baker et al, 2009).

Προκειμένου να ολοκληρωθεί ένας καταλυτικός κύκλος πραγματοποιείται επανασύνδεση των δύο κλώνων. Στο όψιμο αυτό στάδιο το -OH άκρο του DNA που δεν είναι συνδεδεμένο ομοιοπολικά με το ένζυμο συμπεριφέρεται ως πυρηνόφιλο, προσβάλλει τον δεσμό φωσφορικής ομάδας-τυροσίνης που έχει δημιουργηθεί στο πρώτο στάδιο, αποδεσμεύεται το ένζυμο από το DNA και έτσι καταλύεται η επανένωση του διασπασμένου κλώνου. Στην εικόνα που ακολουθεί περιγράφεται σταδιακά ο καταλυτικός κύκλος (Pommier et al, 1998).

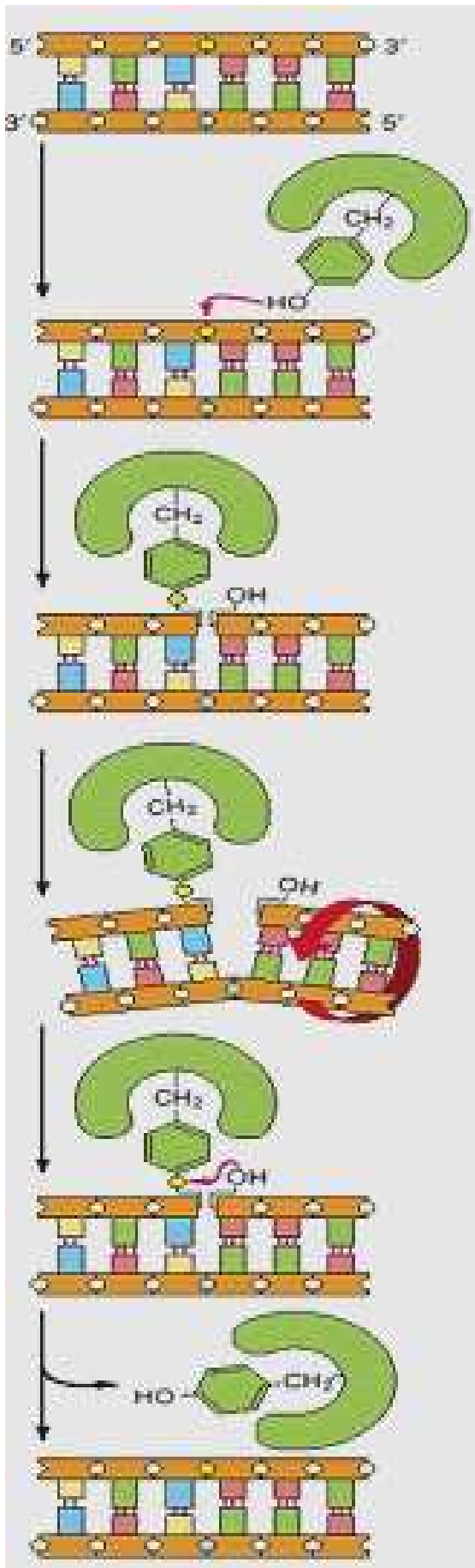


Εικόνα 5: Μηχανισμός δράσης της τοποϊσομεράσης IA.

Τορο IB

Οι Τορο IB μπορούν να δρουν εξίσου αποτελεσματικά τόσο σε αρνητικά όσο και σε θετικά υπερελικωμένο DNA, προκαλώντας χαλάρωση στο μόριο και χωρίς να απαιτούν την παρουσία ATP και δισθενών κατιόντων. Στην περίπτωση των Τορο IB, η διάσπαση του ενός κλώνου γίνεται στο δίκλωνο μόριο DNA, δηλαδή η πρόσδεση του ενζύμου στο μόριο στόχο δεν απαιτεί την ύπαρξη μονόκλωνων τμημάτων όπως συμβαίνει με τις Τορο IA.

Μετά τη διάσπαση του ενός κλώνου, μέσω του υδροξυλίου (OH) της συντηρημένης τυροσίνης του ενζύμου, δημιουργείται ένα 5' OH άκρο και ένα 3' φωσφορικό άκρο.



Η ομοιοπολική σύνδεση του ενζύμου με το DNA γίνεται επίσης ανάμεσα στο OH της τυροσίνης του ενζύμου και του φωσφορικού άκρου του διασπασμένου κλώνου που σε αυτήν την περίπτωση είναι το 3' άκρο (Baker et al, 2009).

Όπως φαίνεται και στην εικόνα, το τμήμα του διασπασμένου κλώνου που βρίσκεται αριστερά του σπασίματος συγκρατείται ισχυρά από το ένζυμο, ενώ το τμήμα που βρίσκεται δεξιά αλληλεπιδρά μέσω ιοντικών δυνάμεων με το ένζυμο και δεν έρχεται σε φυσική επαφή με αυτό. Η ιοντική αλληλεπίδραση επιτρέπει την περιστροφή του δεξιού τμήματος αρκετές φορές σε κάθε καταλυτικό κύκλο. Η διαδικασία μέσω της οποίας το ένζυμο μειώνει την αρνητική υπερέλικωση του μορίου περιγράφεται από το “μοντέλο περιστροφής” ή “rotation model” και όπως προαναφέρθηκε ο διασπασμένος κλώνος περιστρέφεται ελεγχόμενα γύρω από τον ανέπαφο κλώνο ο οποίος παραμένει ακίνητος. Άρα σε αντίθεση με τις Topo IA ο αριθμός σύνδεσης δεν μειώνεται μόνο κατά μία μονάδα, αλλά κατά n. Το n αντιπροσωπεύει το εξής: όσο υπάρχει τάση στρέψης στο μόριο DNA το ένζυμο επιτρέπει την περιστροφή του διασπασμένου κλώνου κατά n φορές γύρω από τον ανέπαφο (Koster et al, 2005, Koster et al, 2007).

Εικόνα 6: Μηχανισμός δράσης της τοποϊσομεράσης IB.

Η μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας αφορά κυρίως τις τοποϊσομεράσες I, για αυτό το λόγο παρατίθεται στον πίνακα 1 μια συγκεντρωτική κατάταξη των Topo I που περιλαμβάνει συνοπτικά τα βασικά χαρακτηριστικά λειτουργίας τους (Bugreen et al, 2009).

Ταξινόμηση Τοποϊσομερασών τύπου I

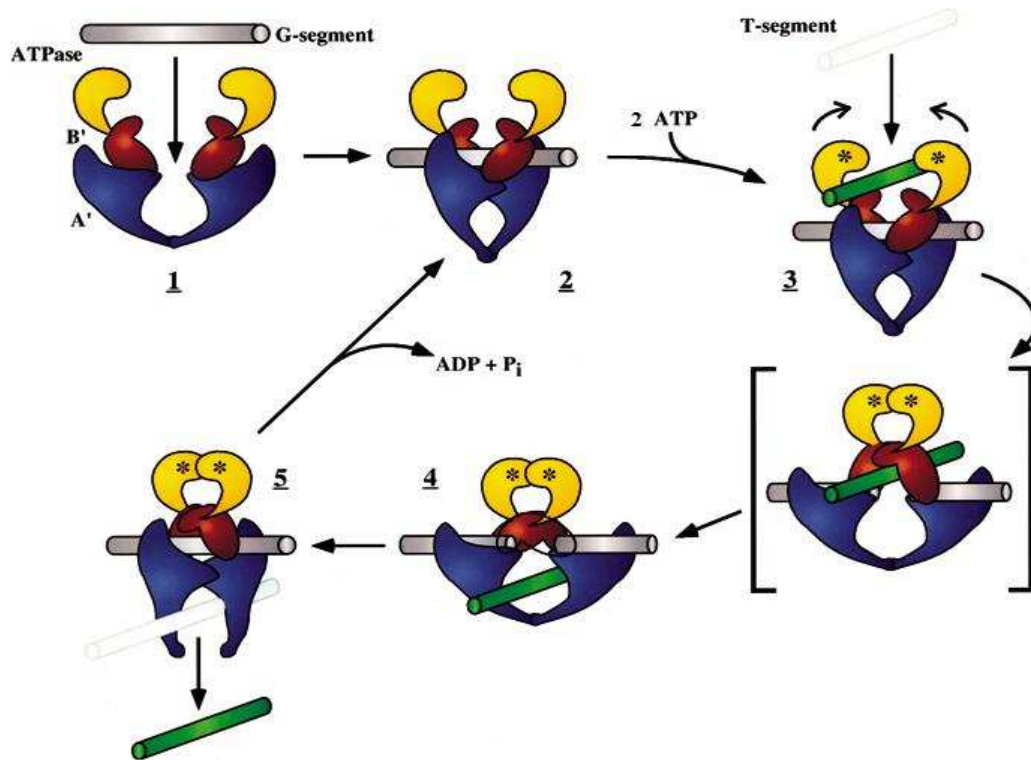
Χαρακτηριστικά Ενζύμων	Προκαρυώτες					Ιοί	Ευκαρυώτες	
	Topo I	Topo III	Dam topo III	Reverse gyrase	Topo V	Topo I	Topo I	Topo III
Τύπος Ενζύμου	IA	IA	IA	IA	IB	IB	IB	IA
Μοριακό Βάρος	97 kDa	74 kDa	108 kDa	132-180 kDa	110 kDa	36 kDa	90-165 kDa	74-112 kDa
Γονίδιο	<i>topA</i>	<i>topB</i>		<i>topRG</i>		<i>TOP1</i>	<i>TOP1</i>	<i>TOP3, TOP3α, TOP3β</i>
Υπόστρωμα (DNA)	ss	ss	ss	ss	ss	ds	ds	ss
Ομοιοπολικός δεσμός	5'-P	5'-P	5'-P	5'-P	3'-P	3'-P	3'-P	5'-P
Mg ²⁺	+	+	+	+	-	-	-	-
ATP	-	-	-	+	-	-	-	-
Καταλυτική Δραστικότητα	relaxes “-” scDNA	cleavage of two ssDNA	at 60-80°C relaxes “-” scDNA	insertion of positive supercoils	relaxes both “-” and “+” scDNA	relaxes both “-” and “+” scDNA	relaxes both “-” and “+” scDNA	relaxes “-” scDNA
Απομόνωση από	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>Desulfurococcus amylolyticus</i>	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i> , other hyper-thermophilic bacteria	<i>Methanopyrus kandleri</i>	pox	yeasts, mammals, <i>Drosophila</i> , <i>Xenopus</i>	yeasts, mammals

Πίνακας 1: Σύνοψη των χαρακτηριστικών των τοποϊσομερασών τύπου IA και IB.

1.2.4.2 Topo II A-B

Οι τοποϊσομεράσες τύπου II (A και B) έχουν αρκετές δομικές διαφορές αλλά ο μηχανισμός δράσης τους είναι παρόμοιος. Οι τοποϊσομεράσες II έχουν ταυτοποιηθεί σε αρχαία, βακτήρια, ιούς και στους ευκαρυώτες. Σε όλους τους οργανισμούς, τα ένζυμα τύπου II είναι διμερή, το σχήμα τους θυμίζει καρδιά και διαθέτουν μία μεγάλη κεντρική κοιλότητα. Η κοιλότητα αυτή έχει πύλες τόσο στην κορυφή όσο και στη βάση της, οι οποίες είναι κρίσιμες για τη δράση της τοποϊσομεράσης. Η αντίδραση αρχίζει με τη δέσμευση στο ένζυμο μίας διπλής έλικας, η οποία αποτελεί το τμήμα G. Ο κάθε κλώνος τοποθετείται δίπλα από ένα κατάλοιπο τυροσίνης, ένα από κάθε μονομερές, ικανό να σχηματίζει ομοιοπολική σύνδεση με τον κορμό του DNA. Το σύμπλοκο αυτό κατόπιν συνδέει χαλαρά μία δεύτερη διπλή έλικα DNA, η οποία αποτελεί το τμήμα T. Κάθε μονομερές του ενζύμου έχει μία δομική περιοχή που δεσμεύει ATP, η δέσμευση της οποίας οδηγεί σε αλλαγή της στερεοδιάταξης που ευνοεί το πλησίασμα των δύο δομικών περιοχών, όπως φαίνεται και στην εικόνα 7, στο στάδιο 3. Καθώς οι δύο αυτές

περιοχές προσεγγίζουν η μία την άλλη, εγκλωβίζουν το δεσμευμένο τμήμα T. Η αλλαγή της στερεοδιάταξης επιφέρει επίσης το διαχωρισμό και τη διάσπαση των δύο κλώνων του τμήματος G. Κάθε κλώνος συνδέεται με το ένζυμο δια μέσου ενός τυροσινοφωσφοδιεστερικού συνδέσμου. Σε αντίθεση με τις τοποϊσομεράσες τύπου I, τα ένζυμα τύπου II συλλαμβάνουν το DNA σφιχτά έτσι ώστε να μην μπορεί να περιστρέφεται. Τότε το τμήμα T περνά δια μέσου του διασπασμένου τμήματος G στη μεγάλη κεντρική κοιλότητα. Η επανασύνδεση του τμήματος G οδηγεί στην ελευθέρωση του τμήματος T μέσω της πύλης στη βάση του ενζύμου. Η υδρόλυση του ATP και η ελευθέρωση του ADP και του ορθοφωσφορικού επιτρέπουν στις δομικές περιοχές δέσμευσης ATP να χωρίζουν, προετοιμάζοντας το ένζυμο να δεσμεύσει ένα άλλο τμήμα T. Η όλη διεργασία οδηγεί σε μείωση του αριθμού συνδέσεων κατά δύο μονάδες. Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως για τη δράση των Τοπο II είναι απαραίτητη η παρουσία δισθενών κατιόντων (Stryer., 2004).



Εικόνα 7: Μηχανισμός δράσης των τοποϊσομερασών τύπου II. Οι αστερίσκοι αναπαριστούν τα μόρια ATP.

1.2.4.3 Απαιτούμενη Ενέργεια για τη δράση των τοποϊσομερασών

Αξίζει να σημειωθεί ξανά ότι τα ένζυμα τύπου I (A και B) και τύπου II (A και B) δεν απαιτούν ATP ως συμπαραγόντα για τη δράση τους (διάσπαση-επανασύνδεση) λόγω της μεταφοράς δεσμών από το νουκλεϊκό οξύ στην πρωτεΐνη (Genes VIII,

Lewin., 2004). Ωστόσο για την αλλαγή του αριθμού σύνδεσης του μορίου-στόχου στα ένζυμα τύπου II, είναι απαραίτητη η υδρόλυση του ATP για αλλαγές στη στερεοδιαμόρφωση του ενζύμου κατά τον καταλυτικό κύκλο ενώ στα τύπου I η αντίδραση οδηγείται από την ενέργεια της τάσης στρέψης του υπερελικωμένου μορίου (Baker et al, 2009).

Συνοπτικά

Σε κάθε περίπτωση ο καταλυτικός κύκλος των ενζύμων περιλαμβάνει τέσσερα (4) διακριτά στάδια από τα οποία ξεχωρίζουν **δύο κρίσιμες λειτουργίες** των τοποϊσομερασών. Τα στάδια είναι:

1. Πρόσδεση στο DNA στόχο
2. **Διάσπαση του DNA** (ενός κλώνου ή και των δύο)
3. Μείωση του αριθμού σύνδεσης
4. **Επανασύνδεση διασπασμένου/ων κλώνου/ων DNA**

Έτσι, με τις συντονισμένες δράσεις δύο ενζύμων (Τορο I και II) καθορίζεται ο βαθμός υπερσπείρωσης του γενετικού υλικού. Τα στάδια 2 και 4 είναι κρίσιμα διότι η όποια διαταραχή τους επιτρέπει στις τοποϊσομεράσες να δρουν ως ενδογενείς τοξίνες του κυττάρου, μία ιδιότητα που θα αναφερθεί εκτενώς στη συνέχεια.

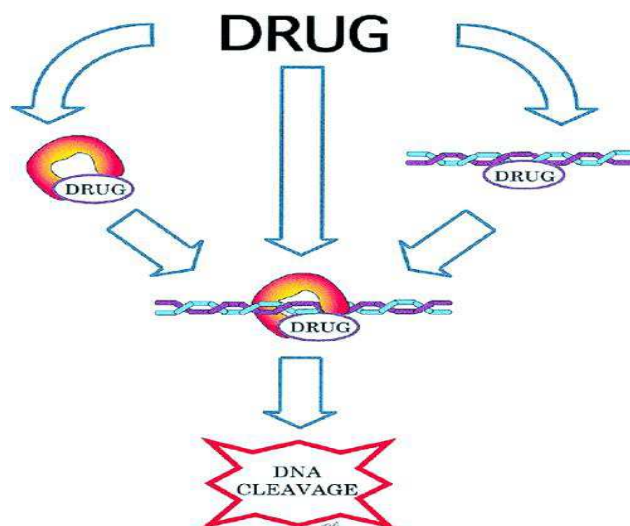
1.3 Αναστολείς τοποϊσομερασών

Υπάρχουν δύο διακριτές κατηγορίες αναστολέων τοποϊσομερασών τύπου I και II: οι αναστολείς δηλητήρια (poisons) και οι καταλυτικοί αναστολείς (catalytic inhibitors).

Οι αναστολείς δηλητήρια είτε σταθεροποιούν την ομοιοπολική σύνδεση του ενζύμου με το DNA αποτρέποντας την επανασύνδεση των κλώνων, είτε ενισχύουν τη διάσπαση των κλώνων του DNA και κατ' επέκταση τη δημιουργία συμπλόκου. Αντίθετα, οι καταλυτικοί αναστολείς εμποδίζουν την καταλυτική δραστηριότητα των τοποϊσομερασών (Froelich-ammon et al, 1995).

Οι αναστολείς των τοποϊσομερασών όπως έχει ήδη αναφερθεί χρησιμοποιούνται εκτενώς ως φάρμακα και η κατηγοριοποίησή τους στις δύο αυτές ομάδες γίνεται βάσει κυτταροτοξικών κριτηρίων. Συγκεκριμένα, αυξημένα επίπεδα τοποϊσομερασών καθιστούν τα κύτταρα υπερευαίσθητα στους αναστολείς δηλητήρια και ανθεκτικά στους καταλυτικούς, ενώ μειωμένα επίπεδα ενζύμων καθιστούν τα κύτταρα υπερευαίσθητα στους καταλυτικούς αναστολείς και ανθεκτικά στους αναστολείς δηλητήρια, κάτι το οποίο εξηγείται κάθε φορά από τον τρόπο δράσης των αναστολέων (Bjornsti et al, 1989, Madden et al, 1992, Nitiss et al 1992, Ishida et al, 1995, Nitiss et al, 1988, Nitiss et al, 1993).

Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως ανεξάρτητα από τον μηχανισμό δράσης των αναστολέων κάθε ένας μπορεί να επιτελέσει το ρόλο του αλληλεπιδρώντας είτε με το DNA, είτε με το ένζυμο, είτε με το σύμπλοκο DNA-ένζυμο, όπως φαίνεται και στην εικόνα 8 (Liu, 1994, Chen et al, 1994, Corbett et al, 1993, Froelich-Ammon et al, 1995, Hertzberg et al, 1989, Nabiev et al, 1994) .



Εικόνα 8: Πιθανοί τρόποι σχηματισμού του συμπλόκου τοποϊσομεράσης-DNA-αναστολέα.

1.3.1 Επισκόπηση αναστολέων Τοπο I

1.3.1.2 Αναστολείς Δηλητήρια (Poisons)

Η καμπτοθεκίνη (camptothecin-CPT) είναι ένα φυτικό αλκαλοειδές και αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά στο κινέζικο δέντρο *Camptotheca acuminata* (Wall et al, 1966, Wall et al, 1995). Την απομόνωση της καμπτοθεκίνης ακολούθησαν τέσσερις πολύ σημαντικές παρατηρήσεις: α) η ένωση αυτή μπορεί και δρα ως αναστολέας δηλητήριο της Τοπο I, β) μόνο το φυτικό ισομερές της ένωσης είναι δραστικό έναντι της τοποϊσομεράσης I (Hsiang et al, 1989), γ) γενετικά τροποποιημένες ζύμες στις οποίες έχει αποσιωπηθεί το γονίδιο topo I (Topo I) είναι ανθεκτικές στην καμπτοθεκίνη (Eng et al, 1988, Nitiss et al, 1988, Bjornsti et al, 1989) και δ) κύτταρα που εμφανίζουν ανθεκτικότητα στην CPT διαθέτουν σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο της topo I (Pommier et al, 1999). Ο τρόπος δράσης της CTP είναι αντιπροσωπευτικός μίας ολόκληρης κατηγορίας αναστολέων οι οποίοι δρουν ως δηλητήρια. Τα μόρια αυτά ουσιαστικά σταθεροποιούν τον ομοιοπολικό δεσμό στο σύμπλοκο DNA-τοποϊσομεράση I, αυξάνοντας τη θετική υπερελίκωση στο γενετικό υλικό άρα και την τάση στρέψης (Hsiang et al, 1985, Dexheimer et al, 2008). Όπως φαίνεται και στην εικόνα 9 η καμπτοθεκίνη είναι δραστική μόνο εναντίον της κύριας αντιπροσωπευτικής τοποϊσομεράσης των ευκαρυωτών, της Τοπο IB. Το ίδιο ισχύει για σχεδόν όλους τους αναστολείς που χρησιμοποιούνται ως αντικαρκινικά φάρμακα, οι οποίοι στοχεύουν επιλεκτικά τις Τοπο IB. Αντίθετα, αν και οι Τοπο IA αποτελούν εξίσου ελκυστικούς στόχους δεν

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

Οι κλινικές μελέτες διεξάγονται προκειμένου να διασφαλιστεί η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητα φαρμάκων αλλά και άλλων σκευασμάτων που αφορούν την υγεία και τις περισσότερες φορές χρηματοδοτούνται είτε από κυβερνητικούς οργανισμούς, ή από φαρμακευτικές ή βιοτεχνολογικές εταιρείες. Οι μελέτες χωρίζονται σε τέσσερις φάσεις οι οποίες στο σύνολό τους διαρκούν αρκετά χρόνια. Κάθε φάση αποτελεί μία ανεξάρτητη και ξεχωριστή κλινική δοκιμή. Αν ένα φάρμακο περάσει επιτυχώς τις φάσεις I, II και III, συνήθως εγκρίνεται από την εθνική αρμόδια αρχή για χρήση στον γενικό πληθυσμό. Η φάση IV θεωρείται ως μετα-αποδεικτική μελέτη.

Οι φαρμακευτικές εταιρείες πριν ξεκινήσουν τις κλινικές μελέτες, πραγματοποιούν εκτεταμένες προ-κλινικές μελέτες οι οποίες περιλαμβάνουν *in vitro* (δοκιμαστικός σωλήνας) και *in vivo* (πειραματόζωα και καλλιέργειες κυττάρων) δοκιμές. Σε κάθε πείραμα χρησιμοποιείται εύρος δόσεων του φαρμάκου ώστε να ληφθούν προκαταρκτικές πληροφορίες σχετικά με την αποτελεσματικότητα, τη φαρμακοκινητική, την τοξικότητα του φαρμάκου αλλά και την αξία του ως φάρμακο.

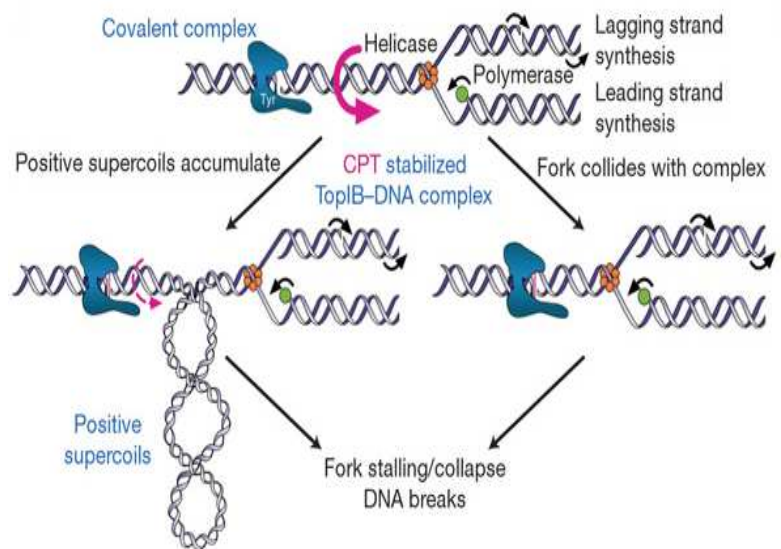
Φάση 0

Αποτελεί πρόσφατη κατηγορία κλινικής μελέτης η οποία διεξάγεται προκειμένου να επιταχύνει την ανάπτυξη υποσχόμενων φαρμάκων και να καθοριστεί κατά πόσο ο ανθρώπινος οργανισμός ανταποκρίνεται στον νέο αυτό παράγοντα, όπως αναμενόταν από τις προ-κλινικές μελέτες. Τα βασικά χαρακτηριστικά των μελετών της Φάσης 0 περιλαμβάνουν τη χορήγηση υποθεραπευτικών δόσεων σε έναν μικρό αριθμό ατόμων (10 με 15) ώστε να ληφθούν δεδομένα σχετικά με την φαρμακοκινητική και φαρμακοδυναμική του νέου αυτού παράγοντα. Ωστόσο, η Φάση 0 δεν δίνει στοιχεία σχετικά με την ασφάλεια και τη δυναμική του.

Φάση I

Οι μελέτες της Φάσης I είναι το πρώτο στάδιο ελέγχου σε ανθρώπους. Μια μικρή ομάδα (20 με 100) υγιών εθελοντών επιλέγεται. Ωστόσο, σε μερικές περιπτώσεις επιλέγονται ασθενείς για τη διεξαγωγή των δοκιμών και όχι υγιείς εθελοντές, όπως συμβαίνει με άτομα που έχουν καρκίνο σε τελευταία στάδια ή έχουν προσβληθεί από τον HIV και για τους οποίους δεν υπάρχει διαθέσιμη θεραπεία. Αυτή η φάση περιλαμβάνει δοκιμές προκειμένου να αποσαφηνιστεί η ασφάλεια, η ανεκτικότητα ή φαρμακοκινητική και η φαρμακοδυναμική ενός φαρμάκου. Επίσης, περιλαμβάνονται μελέτες από τις οποίες προσδιορίζεται η κατάλληλη δόση για θεραπευτική χρήση.

φαίνεται να υπάρχουν γνωστά μόρια που να αναστέλλουν επιλεκτικά αυτήν την οικογένεια ενζύμων (Baker et al, 2009).



Εικόνα 9: Απεικόνιση της δράσης της καμπτοθεκίνης

Υπάρχουν δύο εγκεκριμένα από τον FDA (Food and Drug Administration) ανάλογα της καμπτοθεκίνης, η τοποτεκάνη και η ιρινοτεκάνη, τα οποία χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία του καρκίνου των ωοθηκών και του πνεύμονα και για τη θεραπεία του καρκίνου του πεπτικού συστήματος, αντίστοιχα. Και οι δύο ενώσεις εμφανίζουν σημαντικές παρενέργειες.

Δύο ακόμη ενώσεις, επίσης παράγωγα της καμπτοθεκίνης, η γιματεκάνη και η μελοτεκάνη βρίσκονται σε διάφορες φάσεις κλινικών μελετών (**Παράρτημα Ι**).

Ωστόσο, η καμπτοθεκίνη αλλά και τα παράγωγά της εμφανίζουν συγκεκριμένα μειονεκτήματα:

1. Είναι χημικά ασταθείς ενώσεις και απενεργοποιούνται από καρβοξυλίωση στο

Φάση II

Αν η ασφάλεια του φαρμάκου επιβεβαιωθεί στη Φάση I τότε πραγματοποιούνται μελέτες σε μια μεγαλύτερη ομάδα ατόμων (20 με 300) εθελοντών και ασθενών. Οι μελέτες της φάσης II μερικές φορές χωρίζονται σε δοκιμές Φάσης IIΑ και IIΒ.

Οι δοκιμές της φάσης IIΑ πραγματοποιούνται προκειμένου να καθοριστεί η ποσότητα του φαρμάκου που θα πρέπει να δίνεται. Οι δοκιμές της φάσης IIΒ πραγματοποιούνται προκειμένου να ερευνηθεί η αποτελεσματικότητα του φαρμάκου στις καθορισμένες δόσεις. Ωστόσο, σε ορισμένες μελέτες στη φάση II ορισμένοι ασθενείς λαμβάνουν το εξεταζόμενο φάρμακο και άλλοι αποτελούν ομάδα ελέγχου (λαμβάνουν ψευδο-φάρμακο) ώστε να εκτιμηθεί καλύτερα η δράση του φαρμάκου. Κάποιες μελέτες συνδυάζουν τις φάσεις I και II και δοκιμάζουν παράλληλα την αποτελεσματικότητα και την τοξικότητα του φαρμάκου.

Φάση III

Πραγματοποιούνται σε έναν μεγάλο αριθμό ασθενών, δηλαδή περίπου 300 με 3000 ή και περισσότερους, το οποίο εξαρτάται από την ασθένεια για την οποία προορίζεται το νέο φάρμακο. Σκοπός των δοκιμών αυτών είναι να προσδιορίσουν κυρίως την αποτελεσματικότητα του νέου φαρμάκου συγκριτικά με αυτή των καθιερωμένων θεραπευτικών μέσων. Εξαιτίας του μεγέθους και της διάρκειας τους, οι δοκιμές της φάσης III είναι ιδιαίτερα χρονοβόρες και δύσκολες στο σχεδιασμό τους αλλά και στη διεξαγωγή τους. Σε πολλές περιπτώσεις γίνονται δοκιμές προκειμένου να δειχθεί κατά πόσο το φάρμακο μπορεί να δράσει για επιπρόσθετες ασθένειες. Τα περισσότερα φάρμακα τα οποία περνούν τη Φάση III μπορούν να κυκλοφορήσουν στην αγορά με συγκεκριμένες ενδείξεις. Αν καταγραφεί οποδήποτε κάποια παρενέργεια τότε τα φάρμακα αποσύρονται από την αγορά άμεσα.

Φάση IV

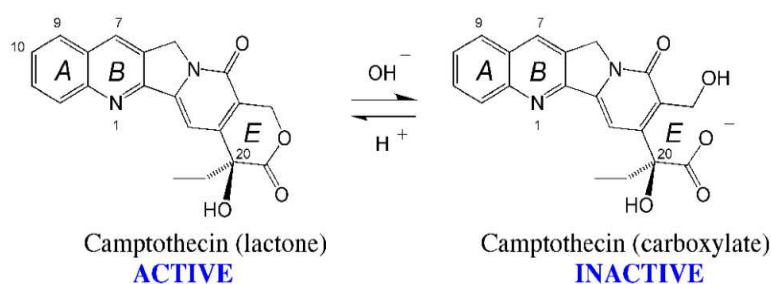
Οι μελέτες αυτές εστιάζουν στην φαρμακοεπαγρύπνηση. Η διεξαγωγή των μελετών της φάσης IV μπορεί είτε να απαιτείται από τις αρμόδιες αρχές είτε μπορεί να αναλαμβάνεται από εταιρείες οι οποίες λόγω ανταγωνισμού ψάχνουν καινούργια αγορά για το φάρμακο. Βέβαια, υπάρχουν και περιπτώσεις όπου οι δοκιμές της φάσης IV πραγματοποιούνται ώστε να γίνουν γνωστές πιθανές αλληλεπιδράσεις του φαρμάκου με άλλα φάρμακα ή ακόμα και η επίδραση του φαρμάκου σε συγκεκριμένους πληθυσμούς όπως οι έγκυες γυναίκες. Η φαρμακοεπαγρύπνηση πραγματοποιείται προκειμένου να παρατηρηθούν σπάνιες ή μακροχρόνιες παρενέργειες σε ένα πολύ μεγαλύτερο πληθυσμό και σε μεγαλύτερη χρονική διάρκεια συγκριτικά με τον πληθυσμό και τη διάρκεια των μελετών της φάσης III. Πολλά δυσάρεστα ευρήματα έχουν προκύψει κατά καιρούς στη φάση IV για διάφορα φάρμακα που ήδη βρίσκονταν στην κυκλοφορία (Wikipedia.org).

αίμα μετά τη χορήγηση τους σε ασθενείς, όπως φαίνεται και στην εικόνα 10.

2. Η πρόσδεσή τους στο σύμπλοκο DNA-ενζύμου είναι αντιστρεπτή και επομένως απαιτούνται παρατεταμένες εγχύσεις.

3. Κύτταρα που υπερεκφράζουν τους μεμβρανικούς μεταφορείς εκροής των φαρμάκων (ABCG2 και ABCB1) εμφανίζουν ανθεκτικότητα έναντι των καμπτοθεκινών.

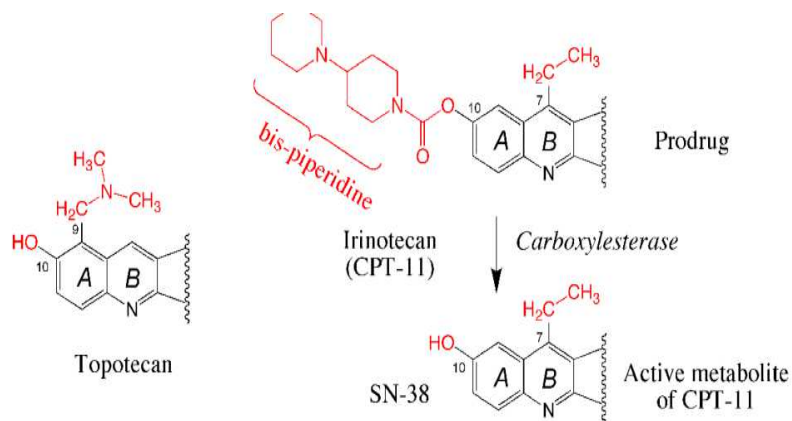
4. Οι παρενέργειες που προκαλούν τα φάρμακα είναι δόσο-εξαρτώμενες και αρκετά σημαντικές (Pommier, 2009).



Εικόνα 10: Η δραστική (αριστερά) και μη δραστική (δεξιά) μορφή της καμπτοθεκίνης, ανάλογα με την κατάσταση του δακτυλίου E.

Εξαιτίας αυτών των περιορισμών, δοκιμάζονται τα τελευταία χρόνια και άλλες ενώσεις ως αναστολείς των τοποϊσομερασών I. Οι αναστολείς αυτοί ανήκουν στις μη-καμπτοθεκίνες και είναι οι: indenoisoquinolines, indolacarbazoles και phenanthridines (Teicher, 2008).

Συγκεκριμένα οι indenoisoquinolines έχουν αρκετά επιθυμητά χαρακτηριστικά όπως ότι είναι χημικά σταθερές ενώσεις, δεν πλήττουν άλλους κυτταρικούς στόχους εκτός από τις Τοπο I, δεν αναγνωρίζονται από τους μεμβρανικούς μεταφορείς ABC και είναι πιθανό ότι οι θεραπευτικές δόσεις που έχουν δοκιμαστεί σε ποντίκια θα επιτευχθούν και στον άνθρωπο (Antony et al, 2007). Στην εικόνα 11 αναπαριστώνται οι χημικές δομές αναστολέων των Τοπο I.



Εικόνα 11: Τα παράγωγα της καμπτοθεκίνης, ιρινοτεκάνη και τοποτεκάνη, τα οποία εφαρμόζονται κλινικά σε ασθενείς, δρουν ως αναστολείς-δηλητήρια των τοποϊσομερασών τύπου I.

1.3.1.3. Καταλυτικοί αναστολείς (Suppressors)

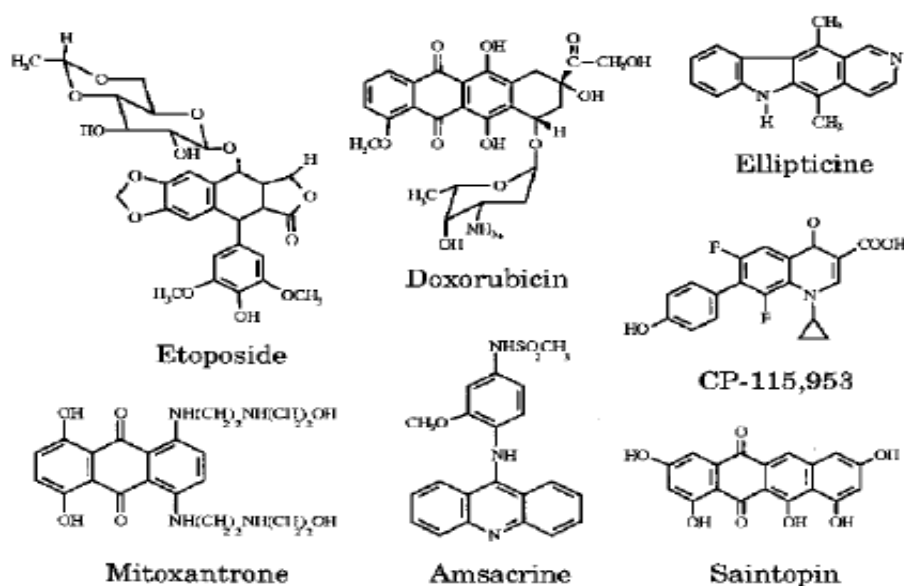
Αντίθετα με τους αναστολείς δηλητήρια, οι καταλυτικοί αναστολείς δεν σταθεροποιούν το σύμπλοκο DNA-Topo I αλλά συνδέονται στο DNA και/ή αλλάζουν τη δομή του, εμποδίζοντας την πρόσδεση των τοποϊσομερασών τύπου I. Γνωστοί αναστολείς της κατηγορίας αυτής είναι οι: δοξορουβικίνη, ακλασινομυκίνη A, TAN-1518 A και B. Ωστόσο δεν υπάρχουν συγκεκριμένα δεδομένα που να υποστηρίζουν πως οι αναστολείς αυτοί είναι ειδικοί για τις Topo I (Pommier et al, 1998).

1.3.2 Επισκόπηση αναστολέων Topo II

1.3.2.1 Αναστολείς δηλητήρια (Poisons)

Οι αναστολείς δηλητήρια για τις Topo II χρησιμοποιούν και τους δύο πιθανούς μηχανισμούς δράσης, δηλαδή υπάρχουν μόρια που ενισχύουν τη δημιουργία συμπλόκου και μόρια που δρουν στο ήδη δημιουργημένο σύμπλοκο DNA-ενζύμου, αντίθετα από τους αναστολείς δηλητήρια των Topo I, οι οποίοι κυρίως αναστέλλουν την επανασύνδεση των κλώνων (Froelich-Ammon et al, 1995). Τα πιο χαρακτηριστικά παραδείγματα αναστολέων των τοποϊσομερασών τύπου II φαίνονται στην εικόνα 12.

TOPOISOMERASE II



Εικόνα 12: Παραδείγματα αναστολέων, οι οποίοι δρουν ως δηλητήρια κατά των τοποϊσομερασών II.

1.3.2.2 Καταλυτικοί αναστολείς (Suppressors)

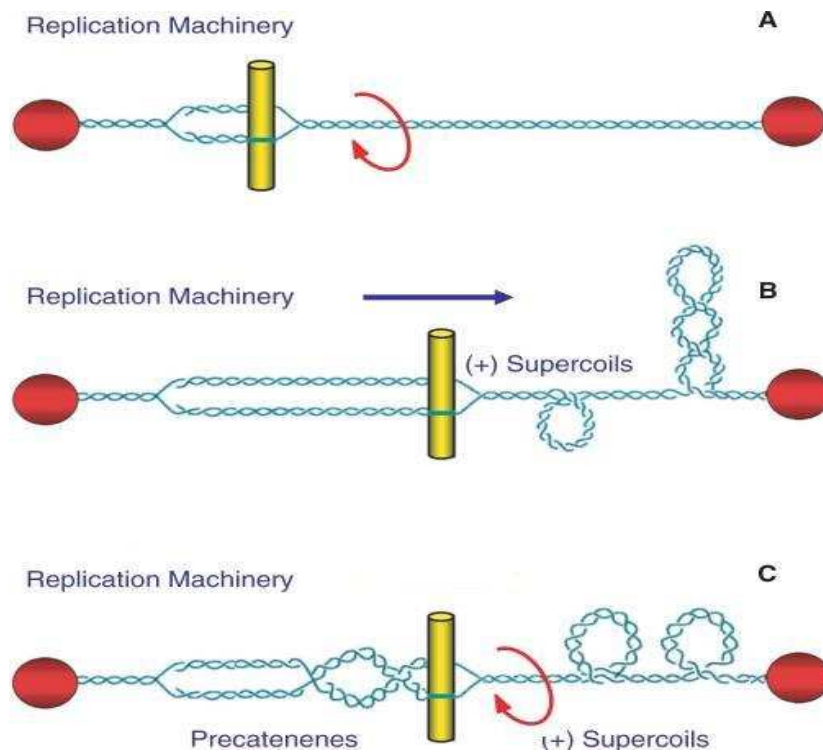
Οι καταλυτικοί αναστολείς των Τοπο II αλληλεπιδρούν κυρίως με την αμινο-τελική περιοχή του ενζύμου, η οποία διαθέτει ενεργότητα ΑΤΡάσης, λειτουργώντας ως μη συναγωνιστικοί ανταγωνιστές του ΑΤΡ. Παραδείγματα τέτοιων αναστολέων αποτελούν οι: νοβομπιοσίνη, μερμπαρόνη και ICRF-187.

1.4 Βιολογικές δράσεις τοποϊσομερασών

1.4.1 Αντιγραφή

Για την έναρξη της αντιγραφής είναι απαραίτητη η δημιουργία ενός αρνητικά υπερελικωμένου τμήματος DNA. Στα βακτήρια έχει βρεθεί ότι η DNA γυράση (Τοπο II) συμμετέχει ενεργά στην έναρξη της αντιγραφής του βακτηριακού χρωμοσώματος καθώς εισάγει αρνητικές υπερέλικες στο γενετικό υλικό (Wang,1996).

Το ολοένζυμο της DNA πολυμεράσης συνθέτει ταυτόχρονα τον προπορευόμενο και τον καθυστερούμενο κλώνο του DNA ταυτόχρονα στη διχάλα αντιγραφής (εικόνα 13). Καθώς η αντιγραφική διχάλα προχωρά στις γειτονικές περιοχές σχηματίζονται θετικές υπερέλικες οι οποίες αυξάνουν την τάση στρέψης στο γενετικό υλικό. Τα παραπάνω ισχύουν σε περίπτωση που η αντιγραφική μηχανή δεν περιστρέφεται καθώς καταλύει τον πολυμερισμό των θυγατρικών κλώνων. Αν η αντιγραφική διχάλα περιστρέφεται στο χώρο, τότε οι θετικές υπερελικώσεις ανακατανέμονται τόσο στις μη αντιγραμμένες περιοχές όσο και στα νεοσυντιθέμενα θυγατρικά μόρια.



Εικόνα 13: Στο πλαίσιο A φαίνεται ένα γραμμικό μόριο DNA με ακινητοποιημένα άκρα, όπως τα ευκαρυωτικά χρωμοσώματα, και η αντιγραφική μηχανή αναπαρίσταται ως μία ράβδος. Στο πλαίσιο B απεικονίζεται η αντιγραφική μηχανή η οποία δεν περιστρέφεται, ενώ στο C απεικονίζεται η αντιγραφική μηχανή να περιστρέφεται. Στα πλαίσια B και C φαίνονται και τα αντίστοιχα τοπολογικά προβλήματα που προκαλούνται.

Αν στο μόριο του DNA αυξηθεί αρκετά η τάση στρέψης από την υπερσυμπύκνωση τότε η αντιγραφική μηχανή θα αναγκαστεί να σταματήσει καθώς δεν θα μπορούν να διαχωριστούν οι δύο κλώνοι. Ένα ακόμη πιο απαισιόδοξο σενάριο υποστηρίζει πως θα προκληθούν τόσο σοβαρές βλάβες στο γενετικό υλικό ώστε το κύτταρο θα πρέπει να σταματήσει την αντιγραφή και να ενεργοποιήσει μηχανισμούς επιδιόρθωσης.

Για να αποφευχθεί αυτή η τοπολογική κρίση το κύτταρο χρησιμοποιεί τις τοποϊσομεράσες οι οποίες απομακρύνουν τις θετικές υπερελικώσεις. Στη διεργασία αυτή, κυρίως συμμετέχουν οι τοποϊσομεράσες τύπου IB και τύπου II. Οι Τορο IA δεν είναι αποτελεσματικές στη μείωση των θετικών υπερελικώσεων καθώς για τη δράση τους είναι απαραίτητο, όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, να προϋπάρχει ένα μονόκλωνο τμήμα στο DNA.

1.4.2 Μεταγραφή

Παρόμοια με την αντιγραφή, καθώς η μεταγραφή εξελίσσεται στο κύτταρο, στο DNA που βρίσκεται καθοδικά της μεταγραφικής μηχανής προκαλείται θετική υπερελίκωση ενώ στο DNA που βρίσκεται ανοδικά προκαλείται αρνητική υπερελίκωση. Ανάμεσα στα διάφορα είδη οργανισμών έχουν βρεθεί και διαφορετικά είδη τοποϊσομερασών που συμμετέχουν στην αποκατάσταση της διπλής έλικας εκατέρωθεν της αντιγραφόμενης περιοχής. Επιπλέον, έχει βρεθεί πως συγκεκριμένα η Topo I αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη TBP (TATA binding protein) και τον μεταγραφικό παράγοντα TFIID και έτσι συμμετέχει στην έναρξη της μεταγραφής. Συνεπώς, η τοποϊσομεράση I καταστέλλει τη μεταγραφή απουσία ενεργοποιητή και επάγει τη μεταγραφή παρουσία ενεργοποιητή σε γονίδια που περιέχουν την αλληλουχία TATA (Merino et al, 1993). Η επιπλέον αυτή δράση της Topo I δεν συμπεριλαμβάνεται στον καταλυτικό κύκλο του ενζύμου και δεν σχετίζεται με το κατάλοιπο τυροσίνης. Το ποιές ακριβώς επικράτειες της Topo I εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση με τους μεταγραφικούς παράγοντες δεν είναι γνωστό.

Ωστόσο, όλες οι παρατηρήσεις που υποστηρίζουν τον θεμελιώδη ρόλο των τοποϊσομερασών στη μεταγραφή θα πρέπει να εκτιμηθούν μαζί με δεδομένα που υποστηρίζουν πως στη μεταγραφή η παρουσία τοποϊσομερασών δεν είναι τόσο αναγκαία όσο στην αντιγραφή καθώς στη ζύμη η απενεργοποίηση των Topo I και II δεν επηρεάζει δραματικά τη σύνθεση μορίων mRNA (Wang., 2002).

1.4.3 Ανασυνδυασμός DNA

Έχει δειχθεί σε μελέτες *in vitro* πως η Topo I μπορεί να προκαλεί μη ομόλογο ανασυνδυασμό μεταξύ του συμπλόκου DNA-ενζύμου και ενός εξωγενούς μορίου DNA με ένα ελεύθερο 5' υδροξυλικό άκρο. Επίσης, δεδομένα υποστηρίζουν πως τόσο η Topo I όσο και η Topo II συμμετέχουν στην αποσυγκρότηση κόμβων Holliday οι οποίοι σχηματίζονται κατά τον ομόλογο ανασυνδυασμό (Pommier et al., 1998).

1.4.4 Δομή και συμπύκνωση Χρωμοσωμάτων

Στα θηλαστικά η Topo II αποτελεί μία μη ιστονική πρωτεΐνη του ικριώματος (scaffold) των μεταφασικών χρωμοσωμάτων και με τον τρόπο αυτό συμμετέχει στην οργάνωση της δομής τους. Είναι σημαντικό ωστόσο να τονιστεί πως τα ένζυμα αυτά δεν είναι καθηλωμένα συστατικά των χρωμοσωμάτων. Παρόμοιες παρατηρήσεις έχουν γίνει και στη *Drosophila* (Wang., 2002). Επίσης, έχει αποδειχθεί πως η Topo II συμμετέχει στην συμπύκνωση της χρωματίνης κατά την απόπτωση και μαζί με την Topo I ρυθμίζουν τη συμπύκνωση της χρωματίνης κατά τη μίτωση.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ & ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ

Στους αερόβιους οργανισμούς η παραγωγή ελευθέρων ριζών εξισορροπείται από αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς, οι οποίοι δεν εξαλείφουν πλήρως τις ελεύθερες ρίζες αλλά ελέγχουν τα επίπεδα στα οποία βρίσκονται. Αυτό συμβαίνει διότι από ενεργειακή άποψη είναι προτιμότερη η επιδιόρθωση ή αντικατάσταση κατεστραμμένων βιομορίων παρά η διατήρηση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών σε υψηλά επίπεδα (Halliwell, 2007 A).

Ελεύθερη ρίζα ή αντιδραστική ένωση (RS) είναι κάθε άτομο ή μόριο στοιχείου ή χημικής ένωσης το οποίο διαθέτει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Τα ηλεκτρόνια εκτός ζεύγους μπορεί να βρίσκονται είτε σε ένα άτομο άνθρακα, είτε σε ένα άτομο αζώτου ή θείου, είτε τέλος σε ένα άτομο οξυγόνου που είναι και η πιο κοινή μορφή. Οι σημαντικότερες ελεύθερες ρίζες που παράγονται στο εσωτερικό των κυττάρων είναι οι εξής: $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , ROO^{\cdot} , RO^{\cdot} και

NO^{\cdot} . Ο ανθρώπινος οργανισμός εκτίθεται σε ελεύθερες ρίζες είτε λόγω εξωγενών παραγόντων, όπως το κάπνισμα, η υπεριώδης ή η ιονίζουσα ακτινοβολία, είτε λόγω ενδογενών παραγόντων όπως η δράση των φαγοκυττάρων στη φλεγμονή ή η μερική αναγωγή του τελικού οξυγόνου κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση η οποία παράγει

$O_2^{\cdot-}$. Οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν βλάβες στο DNA είτε άμεσα με τροποποίηση βάσεων είτε έμμεσα μειώνοντας τη δραστηριότητα της DNA πολυμεράσης και των ενζύμων επιδιόρθωσης, λόγω οξειδωτικής βλάβης των συγκεκριμένων ενζύμων. Αυτό σημαίνει ότι εκτός από το DNA, αλληλεπιδρούν και με πρωτεΐνες επηρεάζοντας αρνητικά τη δραστηριότητά τους. Τέλος, αντιδρούν και με ακόρεστα λιπίδια που βρίσκονται σε διάφορες τοποθεσίες του κυττάρου όπως στη μεμβράνη των λισσωμάτων ή την πλασματική μεμβράνη και προκαλούν λιπιδιακή υπεροξειδωση. Μέσω των δράσεων αυτών, διαταράσσουν την ομοιότητα των κυττάρων.

1.5 Πολυφαινόλες

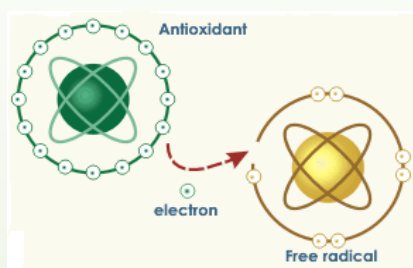
Τα φυτά παράγουν μία μεγάλη, ποικίλη κατηγορία οργανικών ενώσεων, οι οποίες φαίνεται να μην έχουν άμεση λειτουργική δράση στην αύξηση και την ανάπτυξη. Αυτές οι ουσίες είναι γνωστές ως δευτερογενείς μεταβολίτες και οι πολυφαινόλες ανήκουν στην κατηγορία αυτή. Σε πολλούς δευτερογενείς μεταβολίτες έχουν αποδοθεί σημαντικές οικολογικές λειτουργίες των φυτών. Κυρίαρχες ανάμεσα σε αυτές είναι η προστασία από φυτοφάγα ζώα και η μόλυνση από παθογόνα μικρόβια (Τσέκος., 2004)

Οι πολυφαινόλες αποτελούν μία πολυπληθή ομάδα αντιοξειδωτικών μορίων (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ) με χαρακτηριστική δομή, η οποία αποτελείται από αρωματικούς δακτυλίους με χαρακτηριστικές υδροξυλικές ομάδες και άλλους υποκαταστάτες, ή από έναν μόνο φαινολικό δακτύλιο με διάφορους υποκαταστάτες. Τα μόρια αυτά αποτελούν κυρίαρχα αναγωγικά μέσα της διατροφής του ανθρώπου και μαζί με άλλους διαιτητικούς αναγωγικούς παράγοντες (αντιοξειδωτικά) όπως η βιταμίνη C, η βιταμίνη E και τα καροτενοειδή, προστατεύουν τους ιστούς από το οξειδωτικό στρες. Για το λόγο αυτό υπάρχουν δεκάδες μελέτες στις οποίες υποστηρίζεται η θετική επίδραση των πολυφαινολών στην πρόληψη ασθενειών που έχουν σχετιστεί με το οξειδωτικό στρες όπως ο καρκίνος, καρδιαγγειακά νοσήματα, νευροεκφυλιστικές ασθένειες, ο διαβήτης αλλά και η φλεγμονή.

Η ταξινόμησή τους γίνεται βάσει του αριθμού των φαινολικών δακτυλίων που περιέχουν και των ατόμων άνθρακα που συνδέουν τους δακτυλίους μεταξύ τους. Οι κύριες ομάδες πολυφαινολών είναι: τα φλαβονοειδή, τα φαινολικά οξέα, οι φαινολικές αλκοόλες, τα

Αξίζει να σημειωθεί, πως η αλληλεπίδραση των RS με το DNA αυξάνει την πιθανότητα πρόκλησης μεταλλάξεων που ίσως αποτελέσουν την απαρχή καρκινογένεσης.

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 B., 2001). Τα αντιοξειδωτικά μόρια ουσιαστικά δρουν προσφέροντας ηλεκτρόνια στις ελεύθερες ρίζες, όπως φαίνεται και στην εικόνα.



Έτσι, τις εξουδετερώνουν και για αυτό πολλές φορές τα αντιοξειδωτικά χαρακτηρίζονται ως αναγωγικοί παράγοντες.

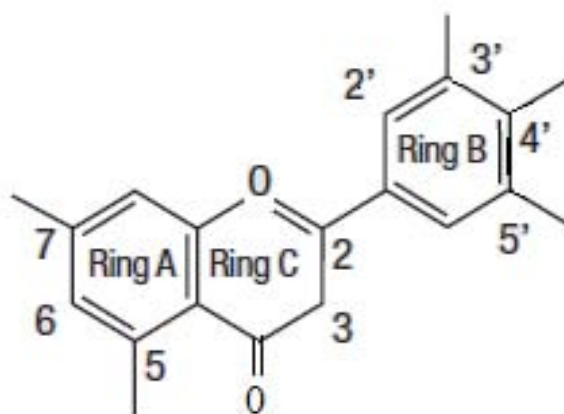
Αντιοξειδωτικά μόρια συντίθενται στον οργανισμό *in vivo* όπως η γλουταθειόνη, η καταλάση και η υπεροξειδική δισμουτάση αλλά μπορούν να ληφθούν και μέσω της διατροφής όπως συμβαίνει με το ασκορβικό οξύ, τη βιταμίνη E και τις πολυφαινόλες, οι οποίες επιδεικνύουν μία αρκετά μεγάλη αντιοξειδωτική ικανότητα κυρίως *in vitro*. *In vivo* πιστεύεται πως δεν έχουν αξιοσημείωτο αντιοξειδωτικό ρόλο κάτι το οποίο σχετίζεται άμεσα με την βιοδιαθεσιμότητά τους. Αντιθέτως, οι πολυφαινόλες ενδέχεται να εμπλέκονται στη διακυτταρική επικοινωνία, στη δραστηριότητα διαφόρων ενζύμων και στη γονιδιακή ρύθμιση.

Επομένως, η ανισορροπία ανάμεσα στην παραγωγή αντιδραστικών ενώσεων και αντιοξειδωτικών μηχανισμών αναφέρεται ως οξειδωτικό στρες και το αντίκτυπό του στον οργανισμό εξαρτάται από τον βαθμό στον οποίο επηρεάζει τις λειτουργίες του κυττάρου. Έτσι, ένα κύτταρο μπορεί να ανταπεξέλθει μικρών διαταραχών αλλά αν το οξειδωτικό στρες είναι έντονο τότε είτε θα προκληθούν μεταλλάξεις ή και κυτταρικός θάνατος (Halliwell., 2007 B).

στιλβένια και οι λιγνάνες (D'Archivio et al., 2007).

1.5.1 Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή διαθέτουν μία κοινή δομή η οποία περιλαμβάνει δύο βενζολικούς δακτυλίους A και B, όπως φαίνεται και στην εικόνα 14. Σε ορισμένα φλαβονοειδή υπάρχει και ένας τρίτος δακτύλιος (πυρανικός δακτύλιος C) ενώ σε άλλα οι δακτύλιοι A και B ενώνονται με αλειφατικές αλυσίδες ανθράκων.

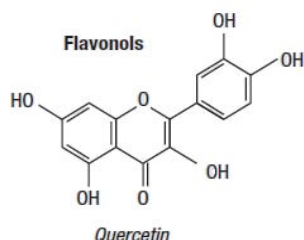


Εικόνα 14: Γενική χημική δομή Φλαβονοειδών.

Περισσότερα από 4000 φλαβονοειδή έχουν ταυτοποιηθεί σε φυτά (Harborne et al., 2000). Έτσι για την καλύτερη διάκρισή τους χωρίζονται σε έξι υποκατηγορίες, οι οποίες αντικατοπτρίζουν την οξείδωση του κεντρικού πυρανικού δακτυλίου: τις φλαβονόλες, τις φλαβόνες, τις φλαβανόνες, τα ισοφλαβονοειδή, τις ανθοκυανιδίνες και τις φλαβανόλες (D'Archivio et al., 2007). Αξίζει να σημειωθεί ότι τα φλαβονοειδή αποτελούν περίπου τα δύο τρίτα της συνολικής πρόσληψης πολυφαινολών μέσω της διατροφής (Scalbert et al, 2000).

Φλαβονόλες

Οι φλαβονόλες διαθέτουν ένα διπλό δεσμό μεταξύ των ανθράκων C₂ και C₃ και μία υδροξυλική ομάδα επίσης στον άνθρακα C₃ του δακτυλίου C. Αποτελούν την πιο ευρέως διαδεδομένη υποκατηγορία φλαβονοειδών στα τρόφιμα, με κύριο αντιπροσωπευτικό μόριο την κερκετίνη (εικόνα 15). Οι κύριες πηγές πρόσληψης των φλαβονολών είναι τα κρεμμύδια, το λάχανο, το πράσο, το μπρόκολο και τα βατόμουρα. Επίσης το τσάι και το κόκκινο κρασί συγκαταλέγονται στα τρόφιμα με την υψηλότερη συγκέντρωση φλαβονολών και συγκεκριμένα το κρασί περιέχει περίπου 30 mg στο λίτρο.

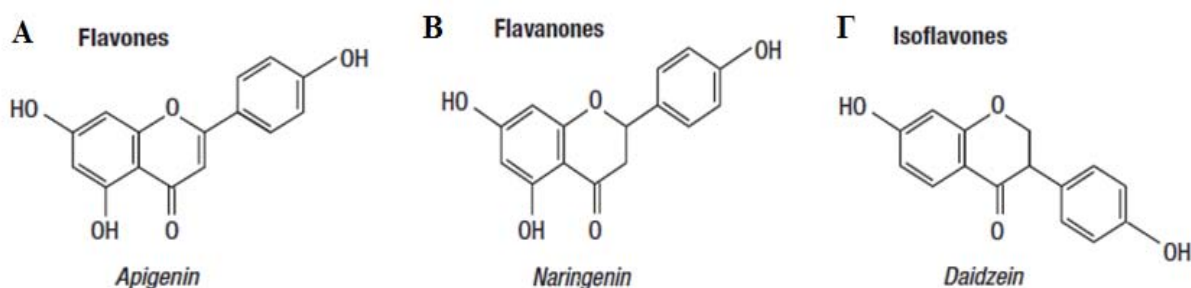


Εικόνα 15: Χημική δομή κερκετίνης

Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως η βιοσύνθεση αυτών των μορίων διεγείρεται από την ηλιακή ακτινοβολία και αυτό οδηγεί στη συσσώρευσή τους στο εξωτερικό και υπέργειο τμήμα των φυτών. Μάλιστα, διαφορές στη συγκέντρωση των φλαβονολών μπορούν να παρουσιαστούν ακόμα και σε φρούτα από το ίδιο φυτό ή και σε διαφορετικές πλευρές του ίδιου φρούτου λόγω διαφορετικής έκθεσης στο ηλιακό φως (Cortell et al., 2006).

Φλαβόνες

Οι φλαβόνες διαθέτουν έναν διπλό δεσμό μεταξύ των ανθράκων C₂ και C₃ του δακτυλίου C και είναι τα λιγότερο κοινά φλαβονοειδή. Ο μαϊντανός και το σέλινο είναι οι κυριότερες πηγές πρόσληψης των φλαβονών. Ωστόσο, η συγκεκριμένη υποκατηγορία φλαβονοειδών απαντάται και σε ορισμένα φρούτα και μάλιστα ο φλοιός των φρούτων αυτών φαίνεται να περιέχει ιδιαίτερα μεγάλες ποσότητες πολυμεθοξυλιωμένων (CH₃O-) φλαβονών, όπως για παράδειγμα έχει παρατηρηθεί στο μανταρίνι. Στην εικόνα 16Α απεικονίζεται η χημική δομή της απιγενίνης.



Εικόνα 16: Α. Χημική δομή της φλαβόνης απιγενίνης
Β. Χημική δομή της φλαβανόνης ναριγενίνης
Γ. Χημική δομή του ισοφλαβονοειδούς ντεϊζέϊνη

Φλαβανόνες

Οι φλαβονόνες χαρακτηρίζονται από την παρουσία ενός ατόμου οξυγόνου στον άνθρακα C₄. Είναι συνήθως γλυκοσυλιωμένες με έναν δισακχαρίτη στον άνθρακα C₇. Οι φλαβανόνες βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις μόνο στα εσπεριδοειδή. Απαντώνται επίσης στις ντομάτες αλλά και σε ορισμένα αρωματικά φυτά, όπως είναι η μέντα. Τα κυριότερα μόρια είναι η ναριγενίνη στο γκρέιπφρουτ, η χημική δομή της οποίας φαίνεται στην εικόνα 16B, η εσπεριδίνη στα πορτοκάλια και η εριοδικτυόλη στα λεμόνια.

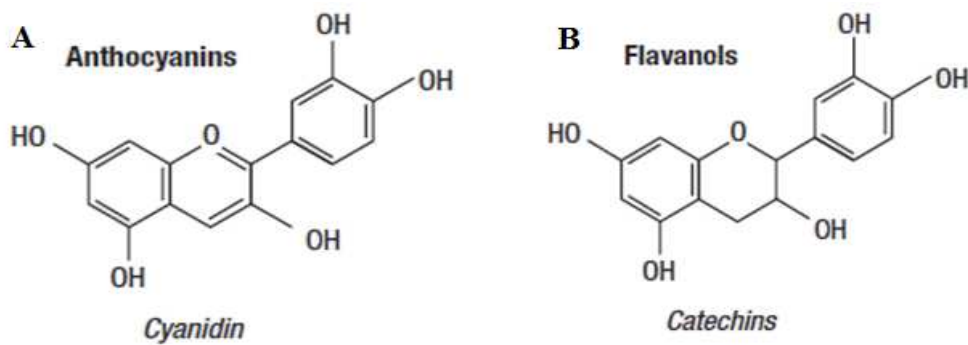
Ισοφλαβονοειδή

Τα ισοφλαβονοειδή έχουν πολλές δομικές ομοιότητες με τα οιστρογόνα και καθώς μπορούν να συνδέονται στους οιστρογονικούς υποδοχείς κατατάσσονται στα φυτοοιστρογόνα. Τα ισοφλαβονοειδή περιέχονται σχεδόν αποκλειστικά στα όσπρια. Συγκεκριμένα, η σόγια και τα επεξεργασμένα παράγωγά της αποτελούν τις βασικές πηγές πρόσληψης και περιέχουν τα τρία κυριότερα μόρια αυτής της υποκατηγορίας φλαβονοειδών: την γενιστεΐνη, την ντεΐζεΐνη (εικόνα 16Γ), την γλυκιτεΐνη, τα οποία βρίσκονται σε μη γλυκοσυλιωμένη μορφή αλλά ακόμα πιο συχνά απαντώνται συζευγμένα με γλυκόζη (Reinli et al., 1996, Eisen et al., 2003).

Ανθοκυανίνες

Αποτελούν υδατοδιαλυτές φυτικές χρωστικές οι οποίες ευθύνονται για το κόκκινο, το μπλε και το μωβ χρώμα σε φρούτα, λαχανικά, λουλούδια και άλλους φυτικούς ιστούς ή φυτικά προϊόντα. Απαντώνται κυρίως ως γλυκοσΐδια των ανθοκυανιδινών που αποτελούν τις μη γλυκοσυλιωμένες μορφές.

Οι ανθοκυανίνες είναι ευρέως διαδεδομένες στην διατροφή των ανθρώπων. Συγκεκριμένα, απαντώνται στο κόκκινο κρασί, σε ορισμένες ποικιλίες δημητριακών και λαχανικών όπως το λάχανο, τα φασόλια και τα κρεμμύδια, αλλά και σε διάφορα φρούτα. Η περιεκτικότητα των τροφίμων σε ανθοκυανίνες είναι ανάλογη της έντασης του χρώματος που έχουν, έτσι στη μαύρη σταφίδα και στα βατόμουρα φτάνει τα 2-4 g/kg και η τιμή αυτή αυξάνεται όσο τα φρούτα ωριμάζουν. Οι ανθοκυανίνες βρίσκονται κυρίως στο φλοιό των φρούτων, εκτός από κάποια κόκκινα φρούτα, όπως στα κεράσια και στις φράουλες, στα οποία απαντώνται και στη σάρκα. Στο κρασί περιέχονται περίπου 350mg ανθοκυανινών/L και είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι αυτές οι ανθοκυανίνες μετατρέπονται σε πολλές πολύπλοκες δομές καθώς το κρασί παλαιώνει (Es-Safi et al., 2002, Broulliard et al., 1997).



Εικόνα 17: Α. Χημική δομή της ανθοκυανίνης κυανιδίνης
 Β. Χημική δομή της φλαβανόλης κατεχίνης

Φλαβανόλες

Οι φλαβανόλες υπάρχουν και ως μονομερή και ως πολυμερή.

Τα μονομερή αποτελούν μία ομάδα μορίων που αναφέρονται ως κατεχίνες (εικόνα 17B). Οι κατεχίνες απαντώνται σε πολλά φρούτα, όπως τα βερίκοκα και τα κεράσια, στο κόκκινο κρασί, ενώ το πράσινο τσάι και η σοκολάτα αποτελούν τις πλουσιότερες πηγές κατεχινών.

Τα πολυμερή αντίθετα, αποτελούν μία ομάδα μορίων που αναφέρονται ως προανθοκυανιδίνες ή ταννίνες και είναι διμερή, ολιγομερή ή πολυμερή κατεχινών. Οι προανθοκυανιδίνες είναι υπεύθυνες για τον στυφό χαρακτήρα των φρούτων όπως τα σταφύλια και τα μήλα, των ποτών, όπως το κρασί, η μπύρα, ο χυμός μήλου και το τσάι αλλά και για την πικρή γεύση της σοκολάτας. Αξίζει να αναφερθεί ότι αυτή η στυφότητα αλλάζει κατά την ωρίμανση των φρούτων και συχνά εξαφανίζεται όταν τα φρούτα ωριμάσουν πλήρως.

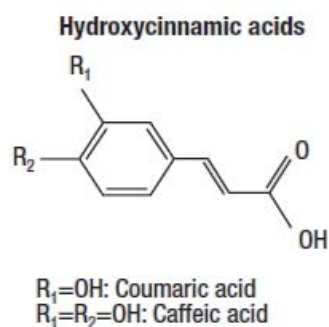
1.5.2 Φαινολικά οξέα

Τα φαινολικά οξέα αποτελούν το ένα τρίτο της συνολικής πρόσληψης σε πολυφαινόλες και χωρίζονται σε δύο υποκατηγορίες: τα παράγωγα του βενζοϊκού οξέος και τα παράγωγα του κινναμικού οξέος (εικόνα 18).

Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα, όπως το γαλλικό οξύ, βρίσκονται σε λίγα εδάδιμα φυτά και σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις, εκτός από κάποια κόκκινα φρούτα. Το τσάι κυρίως αποτελεί τη βασική πηγή πρόσληψης γαλλικού οξέος.

Τα υδροξυκινναμικά οξέα είναι παρόντα σε όλα τα μέρη των φυτών αν και οι υψηλότερες συγκεντρώσεις πιθανότατα να είναι στα εξωτερικά μέρη των φυτών. Οι συγκεντρώσεις των οξέων μειώνονται κατά την ωρίμανση, αν και η συνολική τους ποσότητα αυξάνεται όσο το φρούτο αυξάνεται σε μέγεθος.

Τα υδροξυκινναμικά οξέα αποτελούνται κυρίως από το καφεϊκό οξύ, το κουμαρικό οξύ και το φερουλικό τα οποία σπάνια βρίσκονται σε ελεύθερη μορφή. Οι δεσμευμένες μορφές είναι γλυκοσυλιωμένα παράγωγα ή εστέρες του κινικού, σικιμικού ή ταρταρικού οξέος (D'Archivio et al, 2007). Συγκεκριμένα το καφεϊκό οξύ ενώνεται με το κινικό οξύ και σχηματίζουν το χλωρογενικό οξύ το οποίο βρίσκεται σε πολλά φρούτα και σε αρκετά μεγάλες συγκεντρώσεις στον καφέ. Περίπου 200 ml στιγμιαίου καφέ περιέχουν 50-150 mg χλωρογενικού οξέος (Clifford., 1999). Από την άλλη το φερουλικό οξύ συνδέεται με διαιτητικές φυτικές ίνες και είναι άφθονο στα δημητριακά.

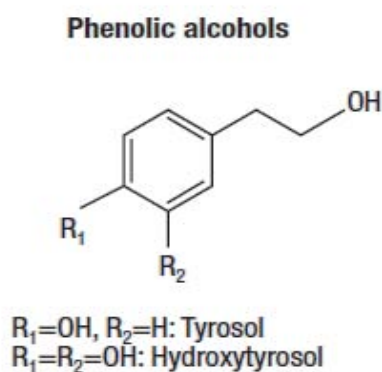


Είναι σημαντικό να σημειωθεί πως το καφεϊκό οξύ είναι το πιο άφθονο φαινολικό οξύ, αντιπροσωπεύοντας το 75-100% της συνολικής περιεκτικότητας των περισσότερων φρούτων σε υδροξυκινναμικά οξέα (Sosulski et al, 1982, Lempereur et al., 1997).

Εικόνα 18: Χημική δομή των φαινολικών οξέων κουμαρικό οξύ και καφεϊκό οξύ

1.5.3 Φαινολικές αλκοόλες

Η τυροσόλη και η υδροξυτυροσόλη αποτελούν τις σημαντικότερες φαινολικές αλκοόλες (εικόνα 19). Περιέχονται κυρίως στο παρθένο ελαιόλαδο (Cabrimi et al., 2001). Η περιεκτικότητα των φαινολών στο παρθένο ελαιόλαδο εξαρτάται από την ποικιλία, το κλίμα, την περιοχή όπου παράγεται, το γεωγραφικό πλάτος και την παλαιότητά του (Boskou., 2000). Η τυροσόλη επίσης βρίσκεται στο κόκκινο και λευκό κρασί αλλά και στη μύρα, ενώ η υδροξυτυροσόλη βρίσκεται μόνο στο κόκκινο κρασί.



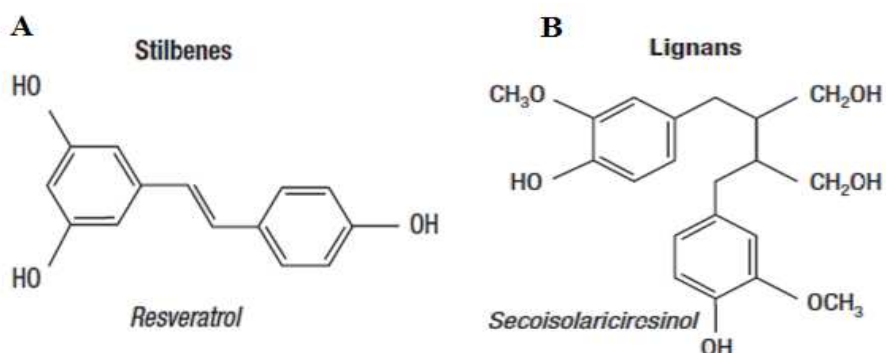
Εικόνα 19: Χημική δομή των φαινολικών αλκοολών τυροσόλη και υδροξυτυροσόλη

1.5.4 Στιλβένια

Μικρές ποσότητες στιλβενίων βρίσκονται στην ανθρώπινη διατροφή. Το πιο αντιπροσωπευτικό μόριο είναι η ρεσβερατρόλη (εικόνα 20Α) η οποία απαντάται κυρίως στην γλυκοσιλιωμένη μορφή της. Η ρεσβερατρόλη παράγεται ως απόκριση των φυτών στη μόλυνση από παθογόνα μικρόβια (Delmas et al., 2006) ή γενικά ως απάντηση των φυτών σε διάφορες στρεσογόνες καταστάσεις (Bavaresko., 2003). Έχει ανιχνευθεί σε περισσότερα από 70 είδη φυτών, συμπεριλαμβανομένων των σταφυλίων, των βατόμουρων και των φυσιτικών. Συγκεκριμένα, ο φλοιός των κόκκινων σταφυλίων είναι ιδιαίτερα πλούσιος σε ρεσβερατρόλη, γεγονός που έχει σχετιστεί και με την με την αντίστοιχη υψηλή συγκέντρωση ρεσβερατρόλης στο κόκκινο κρασί και στο χυμό σταφυλίων (Bertelli et al., 1998, Bhat et al., 2002). Υπάρχουν αρκετές μελέτες που τονίζουν την έντονη αντικαρκινική δράση αυτής της πολυφαινόλης.

1.5.5 Λιγνάνες

Ο λιναρόσπορος είναι η κυριότερη διαιτητική πηγή πρόσληψης των λιγνανών και αξίζει να σημειωθεί πως η μικροχλωρίδα του εντέρου μεταβολίζει τις λιγνάνες σε εντεροδιόλη και εντερολακτόνη. Οι μικρές ποσότητες των λιγνανών στη διατροφή του ανθρώπου δεν αντιστοιχούν στις ποσότητες των μεταβολιτών εντεροδιόλη και εντερολακτόνη που έχουν μετρηθεί στο πλάσμα και στα ούρα. Έτσι υποστηρίζεται πως υπάρχουν άγνωστες ακόμα λιγνάνες φυτικής προέλευσης, που δρουν ως πρόδρομα μόρια για τους δύο αυτούς μεταβολίτες (Heinonen et al, 2001).



Εικόνα 20: Α. Χημική δομή του στιλβενίου ρεσβερατρόλη
Β. Χημική δομή της φυτικής λιγνάνης σεκοΐσολαρισιρεσινόλης

1.6. Παράγοντες που επηρεάζουν την περιεκτικότητα πολυφαινολών στην ανθρώπινη διατροφή

Όπως έχει ήδη αναφερθεί και σε προηγούμενες ενότητες, τα φρούτα, το τσάι και το κόκκινο κρασί αποτελούν τις κύριες πηγές πρόσληψης των πολυφαινολών. Υπάρχουν φυτά των οποίων η ακριβής σύσταση σε πολυφαινόλες είναι γνωστή, όπως συμβαίνει με το μήλο και άλλα για τα οποία δεν υπάρχουν ακριβή δεδομένα.

Στις περισσότερες περιπτώσεις, περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως η έκθεση στον ήλιο, η βροχόπτωση, οι διαφορετικοί τύποι καλλιέργειας, η ωριμότητα των καρπών την περίοδο της συγκομιδής και η διάρκεια της αποθήκευσης επηρεάζουν την περιεκτικότητα των φυτών σε πολυφαινόλες. Συγκεκριμένα:

- Η έκθεση στον ήλιο έχει αξιοσημείωτη επίδραση στα περισσότερα φλαβονοειδή
- Ο βαθμός ωριμότητας επηρεάζει διαφορετικά τη συγκέντρωση των πολυφαινολών. Για παράδειγμα, στα φαινολικά οξέα η συγκέντρωση των πολυφαινολών μειώνεται κατά την ωρίμανση, ενώ η συγκέντρωση των ανθοκυανινών αυξάνεται
- Κατά την αποθήκευση οι πολυφαινόλες οξειδώνονται, σχηματίζοντας περισσότερο ή λιγότερο πολύπλοκα μόρια, τα οποία επηρεάζουν το χρώμα και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των φρούτων όπως είναι η γεύση, η οσμή και η υφή
- Η περιεκτικότητα των τροφών σε πολυφαινόλες δεν επηρεάζεται κατά την ψύξη τους
- Κατά τη θερμική επεξεργασία, η περιεκτικότητα των πολυφαινολών μπορεί να μειωθεί κατά 75% ή και κατά 100% (D'Archivio et al, 2007).

1.7 Βιοδιαθεσιμότητα

Είναι σημαντική η γνώση της ποσότητας των θρεπτικών συστατικών που περιέχονται σε κάθε τρόφιμο ή συμπλήρωμα διατροφής αλλά πιο σημαντική είναι η γνώση του κατά πόσο αυτά τα συστατικά είναι βιοδιαθέσιμα στον οργανισμό. Εξάλλου, η χημική δομή και όχι η συγκέντρωση κάθε μορίου, παίζει σημαντικό ρόλο στο βαθμό στον οποίο το μόριο μπορεί να απορροφάται από τον οργανισμό, να κυκλοφορεί στο πλάσμα του αίματος και να εκπληρώνει το βιολογικό του ρόλο. Έτσι, ο βασικός σκοπός των ερευνών βιοδιαθεσιμότητας είναι να προσδιορίσουν ποιες είναι οι πολυφαινόλες που απορροφώνται καλύτερα, ποιοι είναι οι πιο δραστικοί μεταβολίτες τους και ποιες πολυφαινόλες οδηγούν στο σχηματισμό των δραστικών μεταβολιτών. Οι πιο κοινές πολυφαινόλες στη διατροφή του ανθρώπου δεν είναι απαραίτητα αυτές που οδηγούν σε υψηλές συγκεντρώσεις δραστικών μεταβολιτών (D'Archivio et al., 2007).

1.7.1 Εντερική απορρόφηση

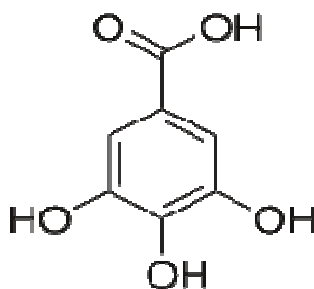
Οι περισσότερες πολυφαινόλες είναι παρούσες στα τρόφιμα σε διάφορες μορφές, όπως εστέρες ή πολυμερή, οι οποίες δεν μπορούν να απορροφηθούν στη φυσική τους μορφή. Συνεπώς, αυτές οι ουσίες θα πρέπει να αποικοδομηθούν από ένζυμα του εντέρου πριν απορροφηθούν (Day et al., 1998, Nemeth et al., 2003).

Γλυκοσιλίωση

Στα τρόφιμα όλα τα φλαβονοειδή, όπως οι φλαβονόλες, τα ισοφλαβονοειδή, οι φλαβόνες και οι ανθοκυανίνες, εκτός από τις φλαβανόλες υφίστανται ως γλυκοσίδια. Το δεσμευμένο σάκχαρο που φέρουν είναι γλυκόζη ή ραμνόζη, αλλά μπορεί να είναι και γαλακτόζη, αραβινόζη, ξυλόζη ή γλυκουρονικό οξύ (Harborne., 1994). Ο αριθμός των σακχάρων συνήθως δεν ξεπερνά τα τρία, αν και τα περισσότερα μόρια φέρουν μόνο ένα κατάλοιπο σακχάρου. Τα φλαβονοειδή διαθέτουν διάφορες πιθανές θέσεις για σύζευξη με σάκχαρα. Η γλυκοσιλίωση επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τόσο την απορρόφηση των μορίων όσο και τις βιολογικές δράσεις τους. Για παράδειγμα οι γλυκοσιλιωμένες πολυφαινόλες δεν μπορούν να διαπεράσουν τις κυτταρικές μεμβράνες μέσω παθητικής διάχυσης για αυτό και η τύχη των γλυκοσιδίων στο στομάχι δεν είναι ξεκάθαρη. Πιθανότατα, το πρώτο στάδιο του μεταβολισμού τους αφορά την απομάκρυνση του σακχάρου από ειδικά ένζυμα όπως γλυκοσιδάσες του εντέρου. Πράγματι, πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί σε επίμυες, έδειξαν ότι ορισμένα φλαβονοειδή, όπως η κερκετίνη, είναι πιθανόν να απορροφώνται σε γαστρικό επίπεδο, αλλά αυτό δεν ισχύει για τα γλυκοσίδιά τους (Crespy et al., 2002, Piskula et al., 1999).

Ακυλίωση

Οι φλαβονόλες βρίσκονται συχνά ακυλιωμένες από το γαλλικό οξύ (εικόνα 21). Ωστόσο, τα μόρια αυτά φαίνεται να μπορούν να διαπερνούν τις βιολογικές μεμβράνες και απορροφώνται χωρίς να είναι απαραίτητη η απομάκρυνση ή η υδρόλυση της επιπλέον άκυλο-ομάδας (Scalbert et al., 2000).



Εικόνα 21: Χημική δομή γαλλικού οξέος

Μοριακό βάρος

Η απορρόφηση των πολυφαινολών εξαρτάται και από το μοριακό βάρος τους. Για παράδειγμα οι ανθοκυανιδίνες διαφέρουν από τις περισσότερες φυτικές πολυφαινόλες εξαιτίας του μεγάλου μοριακού βάρους τους λόγω πολυμερισμού. Το γεγονός αυτό καθιστά δύσκολη την απορρόφησή τους από το λεπτό έντερο. Μόνο τα διμερή και τα τριμερή μπορούν να διαπεράσουν τις βιολογικές μεμβράνες και απορροφώνται απ' ευθείας στο επίπεδο του εντέρου, ενώ έχει βρεθεί πως ολιγομερή, μεγαλύτερα ενός τριμερούς είναι σχεδόν απίθανο να απορροφώνται στο λεπτό έντερο στη φυσική τους μορφή (Halliwell et al., 2000).

Εντερική Μικροχλωρίδα

Η συμβολή της εντερικής μικροχλωρίδας στη βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών φαίνεται ξεκάθαρα στο παράδειγμα των υδροξυκιναμικών οξέων. Τα υδροξυκιναμικά οξέα, όταν καταναλώνονται στη φυσική-ελεύθερη μορφή τους, απορροφώνται γρήγορα από το λεπτό έντερο και συζεύγγονται προκειμένου να μεταβολιστούν, όπως θα εξηγηθεί και παρακάτω. Ωστόσο, αυτά τα μόρια ενδέχεται να βρίσκονται στα φυτά συνδεδεμένα με σάκχαρα, οργανικά οξέα και λιπίδια, μέσω εστερικών δεσμών, κάτι το οποίο επηρεάζει την απορρόφησή τους, καθώς ο βλεννογόνο του εντέρου, το ήπαρ και το πλάσμα του αίματος δεν διαθέτουν εστεράσες ικανές να υδρολύουν το χλωρογενικό οξύ ώστε να προκύψει το καφεϊκό οξύ. Η υδρόλυση αυτή πραγματοποιείται μόνο από ένζυμα που παράγονται από την εντερική μικροχλωρίδα (Olthof et al., 2001, Gonthier et al., 2003). Τέλος, οι πολυφαινόλες οι οποίες δεν απορροφώνται στο λεπτό έντερο φτάνουν στο κόλον, όπου η μικροχλωρίδα υδρολύει τα γλυκοσίδια σε μη γλυκοσιλιωμένες μορφές και αυτές στη συνέχεια σε διάφορα αρωματικά οξέα (D'Archivio et al., 2007).

1.7.2 Μηχανισμοί σύζευξης και μεταφορά στο πλάσμα

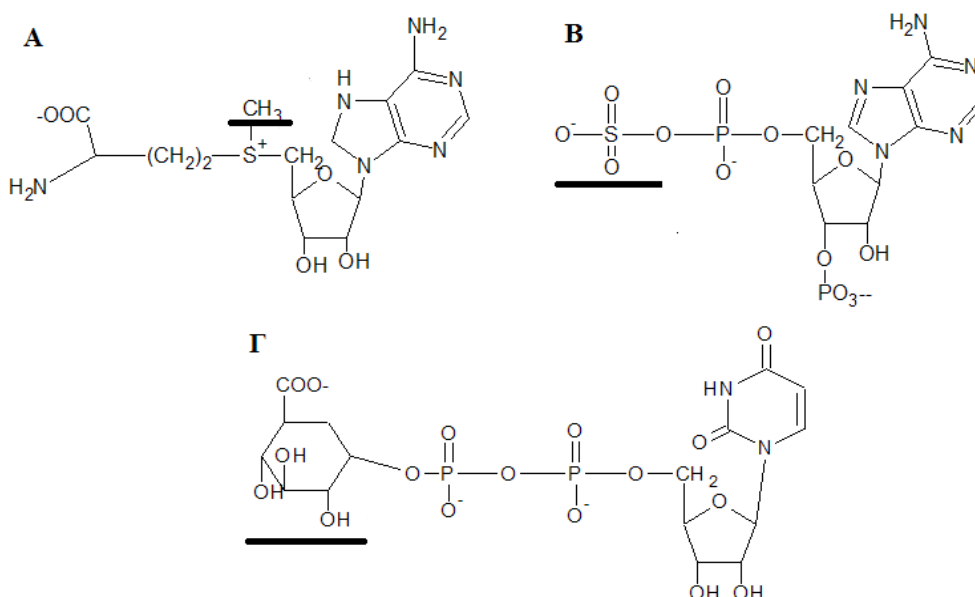
Γενικά οι πολυφαινόλες χαρακτηρίζονται από υψηλό ποσοστό μεταβολισμού. Έτσι, την απορρόφησή τους ακολουθεί η σύζευξη, η οποία περιλαμβάνει κυρίως τη μεταφορά σε κάθε ένα μόριο είτε μιας μεθυλικής ομάδας, είτε μιαςθειικής ομάδας ή ενός γλυκουρονιδίου (αντιδράσεις Φάσης II του μεταβολισμού). Μέσω αυτής της διαδικασίας πραγματοποιείται γενικά ο μεταβολισμός των ξενοβιοτικών και έτσι διευκολύνεται η απομάκρυνσή τους από τον οργανισμό μέσω της χολής ή του ουροποιητικού συστήματος καθώς αυξάνεται η υδροφιλικότητά τους. Είναι γνωστό πως όσο πιο υδρόφιλο είναι ένα μόριο, τόσο πιο εύκολη και γρήγορη είναι η απέκκρισή του από τον οργανισμό.

Η κατεχολ-Ο-μεθυλο τρανσφεράση καταλύει τη μεταφορά μίας μεθυλικής ομάδας από την S-αδενοσυλ-L-μεθειονίνη (SAM) στις πολυφαινόλες όπως η κερκετίνη, η λουτεολίνη, το καφεϊκό οξύ, οι κατεχίνες και η κυανιδίνη (εικόνα 22A). Η

μεθυλίωση συμβαίνει κυρίως στον C₃' των πολυφαινολών, αλλά μπορεί να γίνει και στον C₄'. Η δραστηριότητα της κατεχολ-O-μέθυλο τρανσφεράσης εντοπίζεται κυρίως στο ήπαρ και τους νεφρούς αλλά και σε άλλους ιστούς (Piskula et al., 1998, Tilgeman et al., 1996).

Οι θειοτρανσφεράσες καταλύουν τη μεταφορά μίας θειϊκής ομάδας από τον συμπαράγοντα 3'-φωσφοαδενοσίνη-5'-φωσφοθειϊκό (PARS) σε μία υδροξυλική ομάδα των πολυφαινολών (εικόνα 22B). Η μεταφορά της θειϊκής ομάδας καταλύεται κυρίως στο ήπαρ (Piskula et al., 1998, Falany., 1997).

Οι UDP-γλυκουρονοτρανσφεράσες είναι ένζυμα που εντοπίζονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Η γλυκουρονίδωση πραγματοποιείται κυρίως στο ΕΔ του ήπατος και του λεπτού εντέρου. Η αντίδραση σύζευξης περιλαμβάνει τη μεταφορά ενός γλυκουρονιδίου από το UDP- γλυκουρονικό οξύ κυρίως στον C₃ των πολυφαινολών (εικόνα 22Γ) (Spenser et al., 1999).



Εικόνα 22: Α. SAM
 Β. PARS
 Γ. UDP-γλυκουρονικό οξύ

Το ποσοστό στο οποίο συμβαίνει η κάθε αντίδραση σύζευξης αλλά και ο ιστός στον οποίο μεταβολίζεται κάθε μόριο, διαφέρει ανάλογα τη φύση του μορίου αλλά και την ποσότητα που καταναλώνεται. Συγκεκριμένα, αν καταναλωθούν μεγάλες ποσότητες ενός μορίου τότε ο μεταβολισμός του γίνεται πρωταρχικά στο ήπαρ, ενώ αν καταναλωθούν μικρότερες ποσότητες, τότε ίσως να μεταβολίζονται αρχικά στα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου και το ήπαρ να διαδραματίζει έναν δευτερεύοντα ρόλο στο μεταβολισμό του ήδη συζευγμένου μορίου (Piskula et al., 1998).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ

ΛΟΜΗ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ & ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ

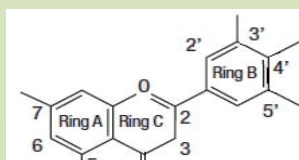
Για διάφορες πολυφαινόλες και κυρίως για τα φλαβονοειδή έχει βρεθεί πως αναστέλλουν ορισμένα ρυθμιστικά ένζυμα των κυττάρων των θηλαστικών όπως οι τοποϊσομεράσες.

Για παράδειγμα τα φλαβονοειδή myricetin, quercetin και fisetin αποτελούν ισχυρούς αναστολείς των Τοπο Ι και ΙΙ. Το πιο ενδιαφέρον είναι πως τα μόρια αυτά διαθέτουν ένα κοινό μοτίβο σε ότι αφορά τις χαρακτηριστικές ομάδες και τους υποκαταστάτες των αρωματικών δακτυλίων. Συγκεκριμένα και τα τρία μόρια διαθέτουν υδροξυλικές ομάδες στους άνθρακες C3, C7, C3' και C4' και μία κέτο-ομάδα στον C4. Η ύπαρξη επιπλέον υδροξυλίων στον Β δακτύλιο ενισχύει τη δράση των φλαβονοειδών ως αναστολείς των τοποϊσομερασών τύπου Ι. Επιπλέον, για την ανασταλτική δράση των μορίων είναι επίσης απαραίτητη η ύπαρξη διπλών δεσμών στους άνθρακες C2 και C3 μόνο όμως, όταν ο Α δακτύλιος είναι κλειστός.

Παρομοίως, φλαβόνες που δρουν ως αναστολείς-δηλητήρια των τοποϊσομερασών τύπου ΙΙ όπως η καμπφερόλη και η απιγενίνη, διαθέτουν υδροξύλια χαρακτηριστικά στις θέσεις C5, C7 και C4' (Constantinou et al., 1995).

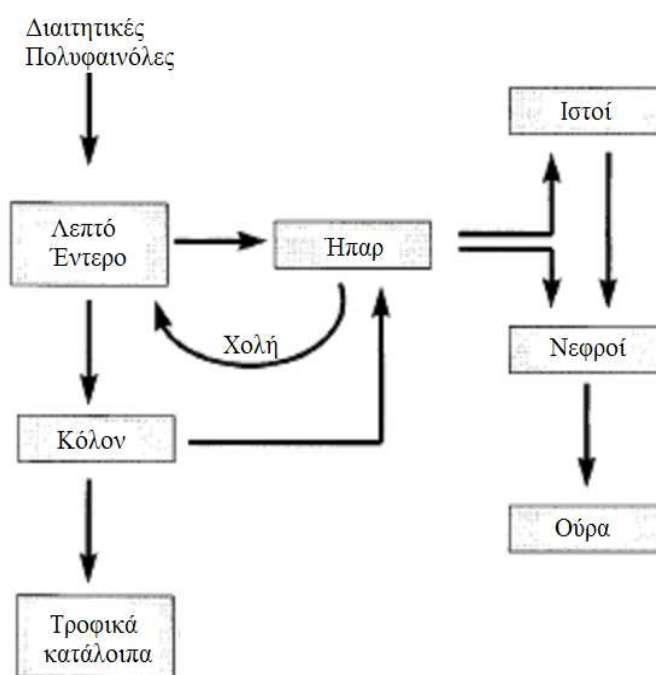
Οι μελέτες δομής-δράσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν προκειμένου να είναι ενδεχομένως δυνατό να προβλέπεται η δράση ενός μορίου ή προκειμένου να σχεδιάζονται και να συντίθενται φαινολικά μόρια με συγκεκριμένες βιολογικές δράσεις. Είναι σημαντικό για παράδειγμα πως η ύπαρξη υδροξυλίων στις θέσεις C3, C4 και C5 στις κατεχίνες φαίνεται να ενισχύει την αντιμικροβιακή τους δράση (Tagurt et al., 2004).

Στην εικόνα που ακολουθεί φαίνεται η βασική χημική δομή των φλαβονοειδών.



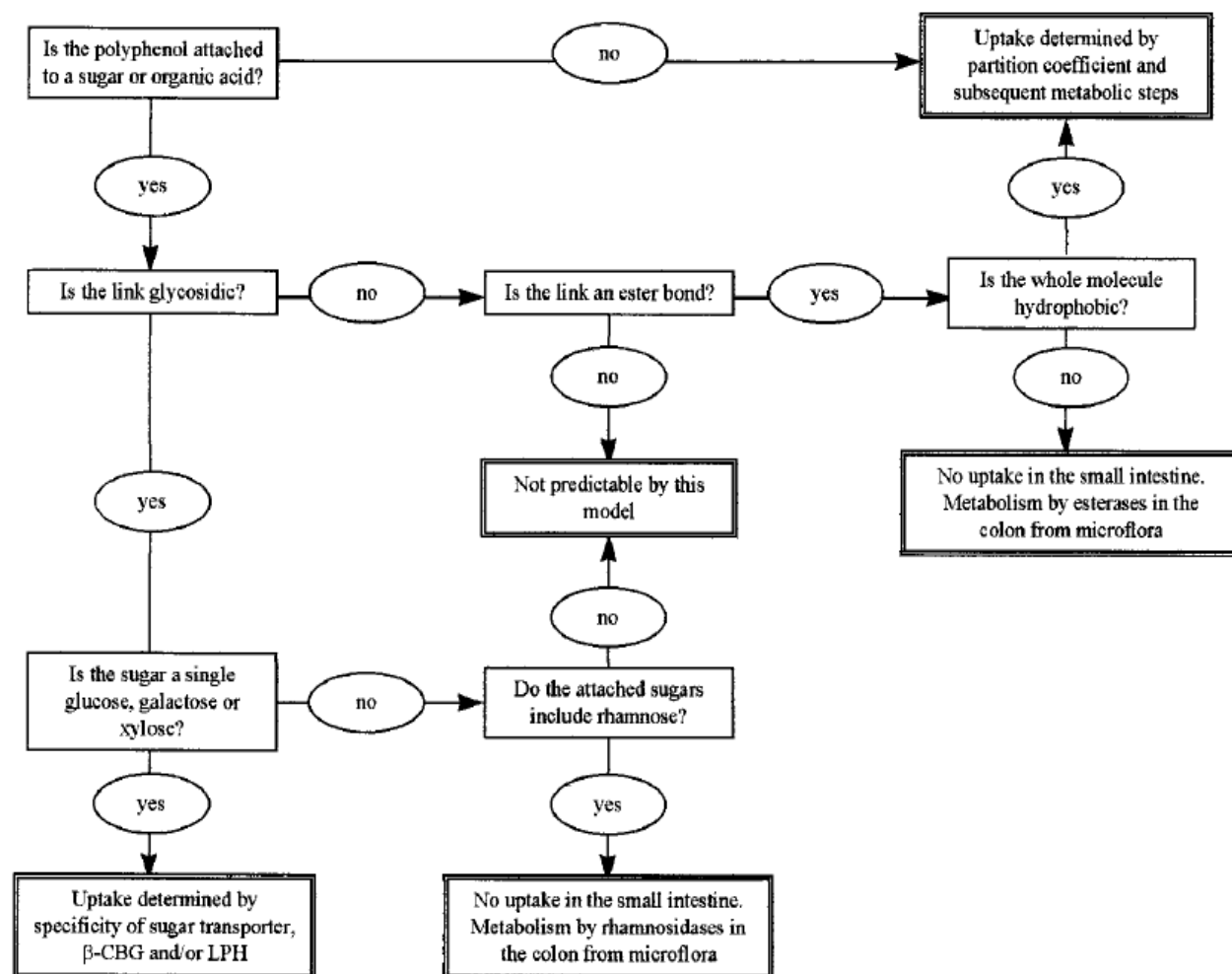
Τελικά, είναι αρκετά σημαντικό να γνωρίζουμε τους μεταβολίτες της κάθε πολυφαινόλης και τη θέση του μορίου που καταλύεται μία αντίδραση της φάσης ΙΙ, γιατί έτσι θα μπορέσουμε να κατανοήσουμε ή και να προβλέψουμε τις βιολογικές δράσεις των μορίων αυτών. Για παράδειγμα, οι μεταβολίτες που προκύπτουν στους ιστούς από ένζυμα του ανθρώπινου οργανισμού ή από τη μικροχλωρίδα του εντέρου παίζουν σημαντικό ρόλο στην αντιοξειδωτική ικανότητα των πολυφαινόλων. Στο **Παράρτημα ΙΙΙ** αναφέρονται δομικά χαρακτηριστικά διαφόρων πολυφαινόλων, σημαντικά για την ανασταλτική τους δράση στις Τοπο Ι και ΙΙ, αλλά και για τη δράση τους κατά των μικροβίων.

Στην εικόνα 23 φαίνονται πιθανές πορείες των πολυφαινόλων στον ανθρώπινο οργανισμό:



Εικόνα 23: Πιθανή πορεία των πολυφαινόλων μετά την κατανάλωσή τους.

Στην εικόνα 24 φαίνεται μία υπόθεση σχετικά με την απορρόφηση των πολυφαινολών στον άνθρωπο.



Εικόνα 24: Μία υπόθεση σχετική με την απορρόφηση των πολυφαινολών από τον ανθρώπινο οργανισμό, βασισμένη σε *in vitro* και *in vivo* μελέτες (Scalbert et al., 2000).

1.7.3 Συγκέντρωση πολυφαινολών στο πλάσμα

Στον πίνακα 2 φαίνονται συνοπτικά οι μέγιστες συγκεντρώσεις συγκεκριμένων πολυφαινολών στο πλάσμα μετά την κατανάλωση συγκεκριμένων τροφών ή καθαρών μορίων.

Είναι σημαντικό να σημειωθεί πως η συγκέντρωση των καθαρών μορίων των φλαβονοειδών αλλά και των πολυφαινολών γενικά, σπάνια ξεπερνά το 1 μM μετά τη κατανάλωση 10-100 mg καθарού μορίου (Scalbert and Williamson., 2000). Μάλιστα, προκειμένου η μέγιστη αυτή συγκέντρωση η οποία επιτυγχάνεται 1-2 ώρες μετά την κατανάλωση, να διατηρηθεί σε υψηλά επίπεδα, θα πρέπει η κατανάλωσή τους να επαναλαμβάνεται ανά διαστήματα (Aziz et al., 1998, Hollman et al., 1996, Kivits et al., 1997).

Polyphenols	Source	Quantity of polyphenol ingested (mg)	Maximum concentration in plasma (nM)	Urinary excretion (% of intake)
Anthocyanins				
Cyanidine 3-glucoside	Orange juice (1 L)	71 mg Cy-3-glc	0.002	
Malvidin 3-glucoside	Red wine (500 mL)	68 mg Mal-3-glc	0.001	0.016 6h
Malvidin 3-glucoside	Red grape juice (500 mL)	117 mg Mal-3-glc	0.003	0.019 6h
Cyanidine 3-glucoside	Red fruit extract (1.6 g)	2.7 mg Cy-3-glc/kg bw	0.03	
Flavanols				
Epigallocatechin gallate	Green tea infusion (5 g)	105 mg	0.13-0.31	
Catechin	Red wine (120 mL)	34 mg	0.072	
Epicatechin	Chocolate (80 g)	137 mg	0.26	
Catechin	Pure compound	0.36 mg/kg bw	0.14-0.49	1.2-3
Epigallocatechin gallate	Pure compound	50-1600 mg	0.28-7.4	
Epigallocatechin gallate	Green tea extract	110-328 mg	0.26-0.7	
Catechins	Black tea	140 mg	0.34	
Procyanidin B1	Grapeseed extract	18 mg	0.011	
Flavanones				
Hesperidin	Orange juice	61 mg	0.48	4.1
Hesperetin	Orange juice	110-220 mg	0.46-1.28	4.1-6.4
Naringenin	Orange juice	22.6-45 mg	0.06-0.2	7.1-7.8
Naringenin	Grapefruit juice	199 mg	5.99	30.2
Naringenin	Pure compound	135 mg	7.4	5.8
Hesperetin	Pure compound	135 mg	2.7	3.3
Flavonols				
Quercetin	Apples	107 mg	0.3	3.5
Quercetin	Onions	100 mg	7.6	6.4
Quercetin 4'-glucoside	Pure compound	100 mg	7.0	4.5
Quercetin	Buckwheat tea	200 mg	2.1	1.0
Quercetin	Pure rutin	200 mg	1.1	0.9
Isoflavones				
Daidzein	Soy milk	108 mg	0.47	37.3
Genistein	Soy milk	102 mg	0.41	20.2
Glycitein	Soy milk	114 mg	0.09	
Daidzein	Pure compound	50 mg	0.76	
Genistein	Pure compound	50 mg	1.26	
Glycitein	Pure compound	25 mg	0.72	
Daidzein	Soy extract	0.28-0.84 mg/kg bw	1.7-9.0	26-42
Genistein	Soy extract	2-16 mg/kg bw	3.4-25.4	9.5-14
Daidzein	Soy nuts	6.6-26.4 mg	0.4-1.65	63-44
Genistein	Soy nuts	9.8-39.2 mg	0.59-2.21	25.2-15.8
Hydroxybenzoic acids				
Gallic acid	Pure compound	50 mg	1.8GA+2.3 MeGA	
Gallic acid	Assam black tea	50 mg	1.8GA+2.3 MeGA	36.4
Gallic acid	Red wine (300 mL)	4 mg	1.8GA+2.3 MeGA	39.6
Hydroxycinnamic acids				
Chlorogenic acid	Coffee (200 mL)	96 mg	0.5 caffeic acid	
Caffeic acid	Red wine (200 mL)	1.8 mg	0.06	
Caffeic acid	Red wine	0.06 mg	0.08	
Hydroxycinnamic acids	Apple cider (1.1 L)	15 mg	0.43	

GA: gallic acid; MeGA: methylgallic acid; bw: body weight.

Πίνακας 2: Βιοδιαθεσιμότητα πολυφαινόλων στον άνθρωπο (D'Archivio et al., 2007)

1.7.4 Κατανομή και Απέκκριση

Ο προσδιορισμός της βιοδιαθεσιμότητας των πολυφαινολών στους ιστούς ίσως να είναι πιο σημαντικός από τον προσδιορισμό της συγκέντρωσής τους στο πλάσμα. Ωστόσο, υπάρχουν ελάχιστες έρευνες που να αναφέρονται στην κατανομή των πολυφαινολών στους ιστούς στον άνθρωπο.

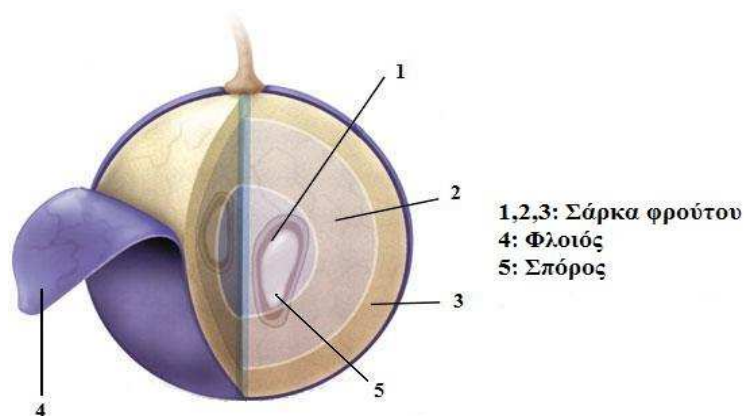
Όπως γίνεται με τις περισσότερες ξеноβιοτικές ουσίες, οι πολυφαινόλες απεκκρίνονται είτε από τη χολή, είτε από το ουροποιητικό σύστημα. Συγκεκριμένα, τα μόρια τα οποία έχουν μεταβολιστεί εκτεταμένα απομακρύνονται κυρίως μέσω της χολής ενώ τα μόρια τα οποία φέρουν για παράδειγμα μόνο μία θειϊκή ομάδα απεκκρίνονται κυρίως με τα ούρα. Η συνολική ποσότητα που απομακρύνεται κάθε φορά σχετίζεται με τη συνολική μέγιστη συγκέντρωση των αντίστοιχων μορίων στο πλάσμα. (D'Archivio et al, 2007).

1.8 Βιολογικές Δράσεις των Φλαβονοειδών

Οι βιολογικές δράσεις που αναφέρονται παρακάτω έχουν διαπιστωθεί από μόρια απομονωμένα από σταφύλια ή από εκχυλίσματα σταφυλιών, στα οποία στηρίζεται και η μελέτη της παρούσας εργασίας που πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών.

A. Αντιοξειδωτική ικανότητα

Με διάφορες μεθόδους όπως είναι η μέθοδος ABTS (Cano et al., 1998), TBARS (Ruiter et al., 1982) και DPPH (Brand-williams et al., 1995) έχει αποδειχθεί ότι το κρασί, ο χυμός του σταφυλιού αλλά και εκχυλίσματα από διάφορα μέρη του φυτού διαθέτουν αξιοσημείωτες αντιοξειδωτικές ικανότητες. Είναι σημαντικό πως από τα διάφορα μέρη των σταφυλιών, τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα επιδεικνύουν οι σπόροι (seed), ακολουθεί ο φλοιός, ενώ τη μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα διαθέτει η σάρκα των φρούτων (Pastrana-Bonilla et al., 2003).



Εικόνα 25: Τομή καρπού σταφυλιού. Αυξημένη συγκέντρωση πολυφαινολών παρατηρείται στα τμήματα 3, 4 και 5.

B. Καρδιοπροστατευτική δράση

Έχει αποδειχθεί πως η μετα-γευματική υπερλιπιδαιμία και διάφοροι οξειδωτικοί παράγοντες όπως η LDL-μαλονδιαλδεΐδη που σχετίζονται με αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης αθηροσκλήρωσης, μειώνονται μετά την κατανάλωση εκχυλίσματος σπόρων από σταφύλια (En-Quin et al, 2010). Σε άλλη μελέτη έχει αποδειχθεί πως μετά την κατανάλωση 100 ml χυμού από κόκκινα σταφύλια για 14 ημέρες, τα επίπεδα της υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (HDL), της απολιποπρωτεΐνης A-I και η αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος αυξήθηκαν σημαντικά ενώ η λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας (LDL), αυξημένη ποσότητα της οποίας ενδέχεται να προκαλέσει συσσώρευση των λιπιδίων που μεταφέρει στις αρτηρίες επιβραδύνοντας τη ροή του αίματος, αλλά και η οξειδωμένη μορφή της, παρουσίασαν σημαντική μείωση (Castilla et al., 2006). Επιπρόσθετα, η κατανάλωση κόκκινου κρασιού έχει σχετιστεί με αυξημένη συγκέντρωση της HDL χοληστερόλης η οποία μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίας νόσου (Tsanga et al., 2005).

Γ. Αντιφλεγμονώδης Δράση

Τα φαινορικά συστατικά των σταφυλιών, όπως οι φλαβονόλες και οι φλαβανόλες και ιδιαίτερα τα συστατικά των σπόρων έχει δείχθει πως έχουν αντιφλεγμονώδη επίδραση στον άνθρωπο. Η αναστολή ή η μείωση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων των κυτοκινών ενδέχεται να είναι από τα βασικότερα μονοπάτια της αντιφλεγμονώδους επίδρασης των πολυφαινολών που προέρχονται από σταφύλια (Chacona et al., 2009). Συγκεκριμένα, κυτταρικές σειρές που εμπλέκονται άμεσα στην ανοσολογική απάντηση, όπως αδιποκύτταρα και μακροφάγα, επώαστηκαν με εκχυλίσματα σπόρων σταφυλιών και ακολούθησε διέγερση των κυττάρων με φλεγμονώδη σήματα και παρατηρήθηκε ότι παρήχθησαν λιγότερες ποσότητες ιντερλευκίνης 6 (IL-6), η οποία επάγει τη διαφοροποίηση των Β λεμφοκυττάρων, και χημειοτακτικής πρωτεΐνης 1 των μακροφάγων (MCP-1), ενώ παρατηρήθηκαν αυξημένες ποσότητες αδιπονεκτίνης, η οποία είναι ορμόνη του λιπώδους ιστού. Η αδιπονεκτίνη όταν βρίσκεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις, ασκεί την αντιφλεγμονώδη της δράση μέσω καταστολής της δραστηριότητας των μακροφάγων, τα οποία είναι η κύρια πηγή προφλεγμονοδών κυτοκινών. Υπάρχουν αρκετές παρόμοιες μελέτες που υποστηρίζουν τη συγκεκριμένη δράση των πολυφαινολών και αναφέρουν διαφορετικά ευρήματα όπως για παράδειγμα τη μείωση της προσταγλαδίνης E2, η οποία αποτελεί διαμεσολαβητή της φλεγμονής. Ωστόσο, παρόμοια αποτελέσματα έχουν προκύψει και από μελέτες σε ζωϊκά μοντέλα. Συγκεκριμένα, εκχυλίσματα από το φλοιό και τους σπόρους των σταφυλιών βρέθηκε πως περιορίζουν της εξέλιξη της φλεγμονής του ωτός (ωτίτιδα) αλλά και οιδήματα σε ποντίκια (Terra et al., 2009, Bralley et al., 2007, Li et al., 2001).

Δ. Αντιμικροβιακή Δράση

Οι φυτικές πολυφαινόλες έχει δειχθεί πως διαθέτουν αντιβακτηριακές, αντιμυκητιακές και αντι-ϊικές ιδιότητες. Οι Rodriguez et al απέδειξαν το 2007 πως το κρασί αναστέλλει την ανάπτυξη μικροβίων και ιδιαίτερα της *E.coli* και μάλιστα η αναστολή είναι δοσο-εξαρτώμενη. Επιπλέον, εκχυλίσματα από λευκό και κόκκινο κρασί χωρίς αλκοόλ ανέστειλαν την ανάπτυξη και της *E. coli* αλλά και των *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* και *Listerial monocytogenes*. Βέβαια, τα διάφορα βακτηριακά είδη δεν είναι εξίσου ευαίσθητα στην έκθεση σε φαινολικές ενώσεις (Sivarooban et al., 2008) και αξίζει να σημειωθεί πως σε ορισμένες μελέτες έχει δειχθεί πως τα εκχυλίσματα από τους σπόρους των σταφυλιών είναι πολύ πιο αποτελεσματικά έναντι των βακτηριακών κυττάρων συγκριτικά με εκχυλίσματα της σάρκας του φρούτου, κάτι το οποίο ισχύει και για την αντιοξειδωτική ικανότητα (Yigit et al., 2009).

Φαινολικά συστατικά σταφυλιών όπως η ρεσβερατρόλη, αναστέλλουν σε συγκέντρωση 10-20 μL τον παθογόνο για τον άνθρωπο μύκητα *Candida albicans* (Papadopoulou et al., 2005).

Τέλος, στην παρούσα εργασία αλλά και σε άλλες έχει αποδειχτεί πως διάφορα μόρια πολυφαινολών μπορούν και αναστέλλουν τη δράση των τοποϊσομερασών μέσω διαφόρων μηχανισμών. Παράλληλα έχει δειχθεί πως η τοποϊσομεράση I ενισχύει την αντίστροφη μεταγραφή διαφόρων ιών όπως του *Epstein-Barr* και άλλων ερπητοϊών, αδενοϊών, αλλά και του HIV-1. Έτσι λοιπόν, αν τα κύτταρα ξενιστές οδηγούνται σε θάνατο μετά την επίδραση αυτών των φυτικών μορίων τότε σίγουρα οι πολυφαινόλες διαθέτουν και μία ιδιαίτερη αντι-ϊική δράση (Pommier et al., 1998).

E. Αντικαρκινική δράση

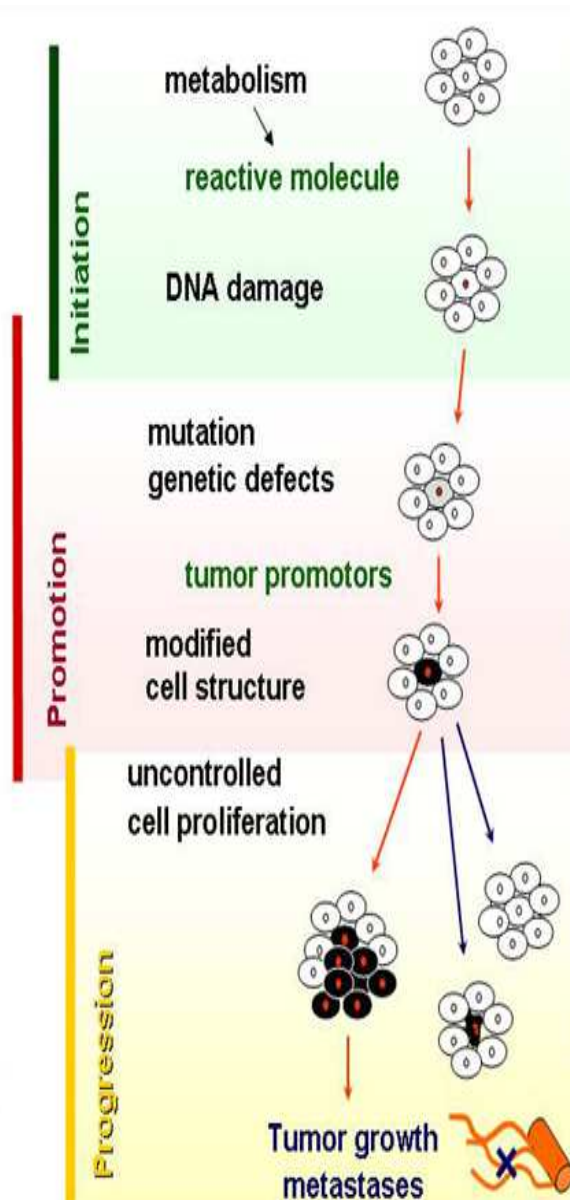
Από τις σημαντικότερες βιολογικές δράσεις είναι η αντικαρκινική.

1.9 Πολυσταδιακό μοντέλο καρκίνου

Το πολυσταδιακό μοντέλο καρκίνου φαίνεται ότι περιλαμβάνει τρία στάδια, που στηρίζονται σε διαφορετικούς μηχανισμούς εξέλιξης.

Ο βασικός μηχανισμός που διέπει το πρώτο στάδιο (Initiation) της καρκινογενετικής διαδικασίας, είναι η πρόκληση μεταλλάξεων σε ένα κύτταρο αδιαφοροποίητο (stem cell). Κάτω από την επίδραση ενός μεταλλαξιγόνου παράγοντα, προκαλείται μετάλλαξη, πιθανότατα σε γονίδια που σχετίζονται με την ικανότητα του κυττάρου να φτάσει στην τελική διαφοροποίηση, δίνοντας γένεση σε ένα κύτταρο, που κάτω από τις κατάλληλες συνθήκες μπορεί να εκτελεί μεγαλύτερο αριθμό μιτώσεων από ότι φυσιολογικά ήταν προγραμματισμένο να κάνει.

Ο βασικός μηχανισμός που διέπει το δεύτερο στάδιο (Promotion) της καρκινογενετικής διαδικασίας, είναι ο κλωνικός πολλαπλασιασμός των αρχικά



μεταλλαγμένων κυττάρων λόγω επίδρασης παραγόντων που προάγουν τη μίτωση. Το στάδιο αυτό είναι αντιστρεπτό με την απόσυρση του μιτογόνου παράγοντα.

Καθώς το μεταλλαγμένο κύτταρο διαιρείται, όταν πλησιάζει στην κυτταρική διαίρεση που κανονικά θα πέθαινε για παράδειγμα στην 40^η, και προχωρά στην 41^η ή και 42^η κ.ο.κ., και προστίθενται γενωμικές βλάβες στα κύτταρα απογόνους οι οποίες κανονικά δεν θα συνέβαιναν αφού τα κύτταρα θα πέθαιναν στην 40^η διαίρεση. Οι γενωμικές βλάβες είναι ραγδαίες αφού η γενωμική αστάθεια μετά την κρίσιμη 40^η διαίρεση αυξάνεται δραματικά. Από τα κύτταρα που προκύπτουν κάποιο και μόνο ένα αποκτά μία κρίσιμη μετάλλαξη η οποία και το μετατρέπει στο πρώτο προκαρκινικό κύτταρο.

Εικόνα 26: Τα τρία στάδια του πολυσταδιακού μοντέλου του καρκίνου.

Στο τρίτο στάδιο (Progression), το μεταλλαγμένο και εξαρτώμενο από τον προαγωγέα κύτταρο, μετατρέπεται σε ένα καρκινικό, ανεξάρτητο από προαγωγέα κύτταρο. Φαίνεται ότι κάτω από τη συνεχή μιτογόνο επίδραση του προαγωγέα, κάποιο κύτταρο εμφανίζει επιπλέον επιγενετικές μεταλλάξεις που αθροιστικά δίνουν τον καρκινικό φαινότυπο. Τα αποτελέσματα των ερευνών δείχνουν ότι τουλάχιστον δύο γενετικές βλάβες είναι απαραίτητες για την καρκινική εξαλλαγή και υπάρχουν αρκετές ενδείξεις ότι η δεύτερη βλάβη αφορά απάλειψη αντι-ογκογονιδίων. Βέβαια, φαίνεται ότι στην ανάπτυξη των περισσότερων τύπων καρκίνου είναι απαραίτητες περισσότερες από δύο γενετικές βλάβες. Συχνά, οι φάσεις της προαγωγής και προόδου, δηλαδή τα δύο τελευταία στάδια, περιγράφονται σαν μία κοινή φάση που ίσως τελικά να είναι και πιο κοντά στην πραγματικότητα (Σημειώσεις Βιοχημικής Τοξικολογίας, Mehta et al., 2010).

1.9.1 Χημειοπροστασία

Το πολυσταδιακό μοντέλο της καρκινογένεσης επομένως, απαιτεί την προοδευτική συσσώρευση σωματικών μεταλλάξεων σε μία συγκεκριμένη κυτταρική σειρά προκειμένου ο φυσιολογικός φαινότυπος σε έναν ιστό να χαρακτηριστεί υπερπλαστικός, δυσπλαστικός και τελικά κακοήθης. Ωστόσο, τα σταδιακά αυτά γεγονότα εξελίσσονται σε βάθος χρόνου το οποίο επιτρέπει τη δράση χημειοπροστατευτικών παραγόντων. Η χημειοπροστασία συνίσταται στην πρόληψη, την αναστολή ή και την αντιστροφή της καρκινογένεσης μέσω της χορήγησης χημικών ενώσεων με τη μορφή φαρμάκων ή ως συστατικά φυτικών τροφών. Η χημειοπροφύλαξη ως στρατηγική πρόληψης από τον καρκίνο μπορεί να εφαρμοστεί είτε σε άτομα που βρίσκονται σε υψηλό κίνδυνο λόγω περιβαλλοντικών παραγόντων, όπως είναι το κάπνισμα, είτε σε άτομα με προδιάθεση για καρκίνο, όπως άτομα με αδενώματα στο πεπτικό σύστημα, είτε τέλος, σε άτομα που έχουν ήδη εμφανίσει τη νόσο. Οι μέθοδοι χημειοπροστασίας, χρησιμοποιώντας διάφορους συνθετικούς ή φυτικούς παράγοντες, στοχεύουν κυρίως στη διακοπή σημαντικών βιολογικών διεργασιών που συντελούν στην πρόοδο του καρκίνου.

1.9.2 Πολυφαινόλες ως χημειοπροστατευτικοί παράγοντες – Μηχανισμοί δράσης

Μία από τις σημαντικότερες κατηγορίες φυτοχημικών συστατικών είναι οι φυτικές πολυφαινόλες. Υπάρχουν δεκάδες επιδημιολογικές μελέτες που υποστηρίζουν πως η αυξημένη πρόσληψη των φλαβονοειδών ενδεχομένως να σχετίζεται με μειωμένη πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου στον άνθρωπο. Αυτό σημαίνει πως στα φλαβονοειδή δίνεται ένας προστατευτικός ρόλος ενάντια στον καρκίνο, το οποίο αποδεικνύεται από *in vitro* αλλά και από *in vivo* μελέτες. Στον πίνακα 3 παρουσιάζονται συγκεκριμένα μόρια φλαβονοειδών τα οποία έχει δειχθεί ότι αναστέλλουν την ανάπτυξη διαφόρων καρκινικών κυτταρικών σειρών.

Τύπος Καρκίνου	Κυτταρικός Τύπος	Φλαβονοειδή
Στόματος	HSC-2, HSG, SCC-25	Flavanones, isoflavans, EGC, chalcones, EGCG, curcumin, genistein, ECG, quercetin, cisplatin
Μαστού	MCF-7	Flavanones, daidzein, genistein, quercetin, luteolin
Θυρεοειδούς	ARO, NPA, WRO	Genistein, apigenin, kaempferol, chrysin, luteolin, biochanin A
Πνευμόνων	SK-LU1, SW900, H441, H661, haGo-K-1, A549	Flavone, quercetin
Προστάτη	LNCaP, PC3, DU145	Catechin, epicatechin, quercetin, kaempferol, luteolin, genistein, apigenin, myricetin, silymarin
Πεπτικού Συστήματος	Caco-2, HT-29, IEC-6, HCT-15	Flavone, quercetin, genistein, anthocyanin
Λευχαιμία	HL-60, K562, Jurkat	Apigenin, quercetin, myricetin, chalcones

Πίνακας 3: Αντικαρκινική δράση φλαβονοειδών σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές στον άνθρωπο.

Έχουν προταθεί κατά καιρούς διάφοροι μηχανισμοί δράσης των φλαβονοειδών μέσω των οποίων εκφράζεται η αντικαρκινική δράση των αντιοξειδωτικών αυτών μορίων. Οι σημαντικότεροι από αυτούς είναι:

A. Ακίνητοποίηση-Διακοπή του κυτταρικού κύκλου

Διάφορα μιτογόνα σήματα αναγκάζουν τα κύτταρα να πραγματοποιήσουν μια σειρά από συντονισμένα βήματα προκειμένου να διεξαχθεί και να ολοκληρωθεί ο κυτταρικός κύκλος. Η σύνθεση του DNA, η οποία πραγματοποιείται στη φάση S, και ο διαχωρισμός των θυγατρικών κυττάρων, που πραγματοποιείται στη φάση M, αποτελούν τα κυριότερα σημεία του κυτταρικού κύκλου. Το διάστημα μεταξύ των φάσεων S και M είναι γνωστό ως φάση G2. Στη φάση G2 δίνεται στα κύτταρα ο απαιτούμενος χρόνος προκειμένου να διορθωθούν ενδεχόμενα λάθη τα οποία συμβαίνουν κατά τον διπλασιασμό του DNA, έτσι ώστε τα λάθη αυτά να μην διαιωνίζονται στα θυγατρικά κύτταρα. Αντίθετα, η φάση G1 αντιπροσωπεύει το διάστημα μεταξύ των φάσεων M και S στο οποίο το κύτταρο προετοιμάζεται προκειμένου να διπλασιαστεί.

Οι CDKs (κινάσες εξαρτώμενες από κυκλίνες) αποτελούν ένζυμα που διαδραματίζουν έναν πολύ σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Οποιαδήποτε μεταβολή ή απορύθμιση της δραστηριότητας των CDK αποτελεί παθογόνο χαρακτηριστικό και σχετίζεται με νεοπλασματικές καταστάσεις. Μεταλλάξεις είτε στα γονίδια των CDK, είτε στα γονίδια των αναστολέων των μορίων αυτών, οι οποίες οδηγούν στην υπερενεργοποίηση των CDK σχετίζονται με διάφορους τύπους καρκίνου. Για αυτό το λόγο μόρια που λειτουργούν ως αναστολείς των CDK θα είχαν ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως θεραπευτικοί παράγοντες κατά του καρκίνου (Senderowich et al, 1999, Senderowich et al., 2001).

Έχει δειχθεί πως φλαβονοειδή όπως η γενιστεΐνη, η κερκετίνη, η ντεζεΐνη και η κεμπφερόλη διαταράσσουν τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (G1/S και G2/M) σε καλλιέργειες καρκινικών κυτταρικών σειρών (Zin et al, 1998, Choi et al., 2001, Casagrande et al., 2001).

B. Προώθηση της Διαφοροποίησης

Τα καρκινικά κύτταρα προκύπτουν από φυσιολογικά κύτταρα τα οποία συσσωρεύουν μεταλλάξεις που σταδιακά οδηγούν στην ανικανότητα του κυττάρου να ανταποκρίνεται σε εξωγενείς αυξητικούς παράγοντες. Έτσι προκύπτουν κλώνοι κυττάρων που μοιάζουν με εμβρυϊκά κύτταρα καθώς δεν ανταποκρίνονται σε σήματα που προάγουν τη διαφοροποίηση και την ωρίμανση. Έτσι, μόρια που θα προωθούσαν την τελική διαφοροποίηση των κυττάρων θα μπορούσαν να αποτελέσουν παράγοντες για τη θεραπεία ή και την πρόληψη του καρκίνου.

Οι φλαβόνες γενιστεΐνη, απιγενίνη, λουτεολίνη, κερκετίνη και πλωρετίνη έχει δειχθεί πως επάγουν τη διαφοροποίηση ανθρώπινων λευχαιμικών κυττάρων HL-60

(οξείας μυελογενούς λευχαιμίας) σε κοκκιοκύττατρα και μονοκύτταρα (Takahashi et al., 1998). Επίσης άλλα μόρια φλαβονών έχει δειχθεί πως επάγουν τη διαφοροποίηση σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του πεπτικού συστήματος (Wenzel et al., 2000). Έτσι, η επαγωγή της τελικής διαφοροποίησης των κυττάρων από τα φλαβονοειδή ενδέχεται να μειώνει τα νεοπλασματικά κύτταρα και να επαναφέρει τη φυσιολογική ομοιότητα των κυττάρων.

Γ. Αναστολή της αγγειογενετικής διαδικασίας

Η αγγειογένεση είναι μία αυστηρά ελεγχόμενη διαδικασία στον οργανισμό η οποία ρυθμίζεται από πολλούς αγγειογενετικούς και αγγειοστατικούς παράγοντες και συμβαίνει εκτεταμένα κατά την εμβρυογένεση. Ωστόσο παθολογική αγγειογένεση μπορεί να παρατηρηθεί εκτεταμένα και σε όγκους καθώς λόγω του έντονου πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων είναι απαραίτητη η συνεχής παροχή θρεπτικών συστατικών και οξυγόνου. Επομένως παράγοντες που θα ανέστειλαν την αγγειογένεση σε διακριτά στάδια της, όπως ο πολλαπλασιασμός και η μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων, θα είχαν ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως αντικαρκινικά φάρμακα. Έχει δειχθεί πως διάφορα φλαβονοειδή μπορούν και σταματούν την ανάπτυξη όγκων μέσω αναστολής της νεοαγγειογενετικής διαδικασίας (Tosetti et al., 2002, Fotsis et al., 1998).

Ωστόσο υπάρχουν και καλύτερα εδραιωμένοι μηχανισμοί μέσω των οποίων τα φλαβονοειδή δρουν κατά του καρκίνου.

Δ. Πρόληψη Μεταβολικής Ενεργοποίησης των Καρκινογόνων

Πολλές *in vitro* και *in vivo* μελέτες έχουν δείξει πως ορισμένα φλαβονοειδή ρυθμίζουν με διάφορους μηχανισμούς τον μεταβολισμό των καρκινογόνων προστατεύοντας έτσι τον οργανισμό από τις βλαπτικές τους συνέπειες.

Έναν σημαντικό μηχανισμό αποτελεί η αναστολή της δράσης των ενζύμων της Φάσης I του μεταβολισμού από τα φλαβονοειδή. Τα ένζυμα της Φάσης I σε πολλές περιπτώσεις μεταβολίζουν προκαρκινογόνα μόρια σε δραστικά ενδιάμεσα. Τα δραστικά ενδιάμεσα μπορούν με τη σειρά τους να αλληλεπιδράσουν με πυρηνόφιλα μόρια του κυττάρου δημιουργώντας ελεύθερες ρίζες και κατ' επέκταση να προκαλέσουν καρκινογένεση. Συγκεκριμένα, τα φλαβονοειδή έχει δειχθεί πως αναστέλλουν τη δράση διαφόρων ισοενζύμων του P450 όπως το CYP1A1 και CYP1A2 (Lahiri-Chatterjee et al., 1999, Tsyrllov et al., 1994, Le Marchand et al., 2000).

Ένας δεύτερος σημαντικός μηχανισμός είναι η ενεργοποίηση των ενζύμων του μεταβολισμού της φάσης II όπως η τρανσφεράση της γλουταθειόνης, τα οποία αποτοξινώνουν και αυξάνουν την υδροφιλικότητα σε πιθανά καρκινογόνα μόρια, αυξάνοντας το ρυθμό απομάκρυνσής τους από τον οργανισμό (Bu-Abbas et al., 1998, Sun et al., 1998).

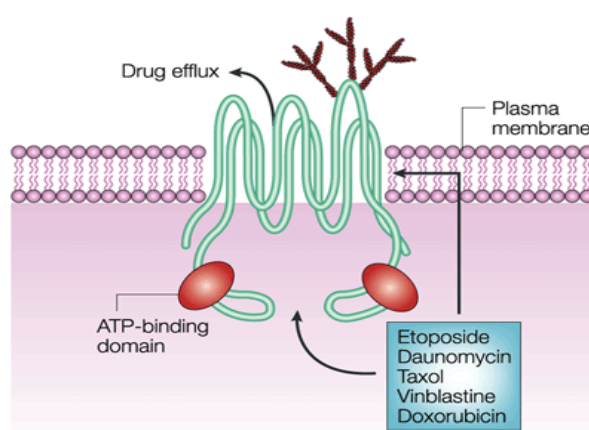
Ε. Αντιοξειδωτική Δράση

Οι διαιτητικές πολυφαινόλες και τα φλαβονοειδή αποτελούν τα πλέον φυσικά αντιοξειδωτικά. Τα μόρια αυτά από χημική άποψη είναι δότες ενός ηλεκτρονίου. Έτσι έχουν την ικανότητα να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες που προκύπτουν από διάφορους παράγοντες όπως το κάπνισμα, η ατμοσφαιρική ρύπανση, η φλεγμονή και ο μεταβολισμός. Οι πολυφαινόλες δρουν προστατευτικά καθώς μειώνουν τις οξειδωτικές αντιδράσεις μέσα στα κύτταρα, οι οποίες ενδέχεται να προάγουν την καρκινογένεση.

In vitro μελέτες έχουν δείξει πως οι φλαβονόλες, οι φλαβόνες και οι ανθοκυανίνες διαθέτουν μία αξιοσημείωτη αντιοξειδωτική δράση, ειδικά ενάντια των ριζών οξυγόνου (Dragsted LO., 2003).

ΣΤ. Αναστολή της Φαρμακευτικής Αντοχής

Η φαρμακευτική αντοχή αναφέρεται στην ανθεκτικότητα ορισμένων κυττάρων σε πολλά φάρμακα, η οποία οφείλεται στην Ρ-γλυκοπρωτεΐνη (Pgp). Η Ρ-γλυκοπρωτεΐνη είναι ένας διαμεμβρανικός μεταφορέας ο οποίος μεταφέρει ποικίλες ουσίες εκτός του κυττάρου, όπως τοξικά φάρμακα και τοξίνες, καταναλώνοντας ATP. Δομικά η πρωτεΐνη αποτελείται από δύο ομόλογες υπομονάδες, όπου η κάθε μία αποτελείται από μία διαμεμβρανική περιοχή που ευθύνεται για την πρόσδεση και την εκροή του φαρμάκου και μία κυτταροπλασματική η οποία ευθύνεται για την πρόσδεση και την υδρόλυση του ATP. Η ανθεκτικότητα αυτή που προσδίδεται στα κύτταρα από την Pgp αποτελεί ένα πολύ σημαντικό εμπόδιο των χημειοθεραπειών κατά του καρκίνου. Αν κι έχουν γίνει αρκετές μελέτες ώστε να ανακαλυφθούν αναστολείς της Pgp, οι περισσότερες ήταν ανεπιτυχείς λόγω του ότι οι αναστολείς αυτοί επηρέαζαν και άλλους κυτταρικούς στόχους με επιβλαβείς συνέπειες για το κύτταρο.



Εικόνα 27: Σχηματική απεικόνιση της δομής και της δράσης της Ρ-γλυκοπρωτεΐνης.

Για πολλά φλαβονοειδή έχει αναφερθεί πως διαθέτουν ανασταλτική δραστηριότητα έναντι της Pgp. Η ρύθμιση της ανθεκτικότητας των κυττάρων στα φάρμακα από τα φλαβονοειδή ενδέχεται να πραγματοποιείται, μέσω:

- i. Αναστολής της έκφρασης του υπεύθυνου γονιδίου
- ii. Άμεσης πρόσδεσης στην κυτταροπλασματική πλευρά της πρωτεΐνης με μεγάλη συγγένεια ή
- iii. Αναστολής της δραστηριότητας ATPάσης του μεταφορέα (Ren et al., 2003).

Τέλος, από τους πιο άμεσους μηχανισμούς που συμβάλλουν στην επιβράδυνση της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων είναι η αναστολή του πολλαπλασιασμού και η επαγωγή της απόπτωσης.

H. Αναστολή του πολλαπλασιασμού

Η πρόληψη κατά του καρκίνου γενικά σχετίζεται με την αναστολή ή την επιβράδυνση του εκτεταμένου πολλαπλασιασμού των κυττάρων.

Η αποκαρβοξυλάση της ορνιθίνης παίζει έναν πολύ σημαντικό ρόλο στη βιοσύνθεση των πολυαμινών, η οποία σχετίζεται άμεσα με τη σύνθεση του DNA και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε διάφορους ιστούς. Η παραγωγή του συγκεκριμένου ενζύμου επάγεται από promoters που απαντώνται στα καρκινικά κύτταρα. Ωστόσο, διάφορα φλαβονοειδή φαίνεται να αναστέλλουν το ένζυμο αποκαρβοξυλάση της ορνιθίνης αναστέλλοντας με αυτόν τον τρόπο τη σύνθεση των πρωτεϊνών και του DNA (Makita et al, 1996, Tanaka et al., 1997). Επιπλέον τα μόρια αυτά έχει βρεθεί πως αναστέλλουν διάφορα ένζυμα που συμμετέχουν στη μεταγωγή σήματος όπως η πρωτεϊνική κινάση C και η πρωτεϊνική κινάση τυροσίνης, αλλά και ένζυμα υπεύθυνα για την σταθερότητα του γενώματος που είναι οι τοποϊσομεράσες. Όλα αυτά τα ένζυμα συμμετέχουν ενεργά στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και η απορρύθμισή τους από τα φλαβονοειδή οδηγεί το κύτταρο σε θάνατο. Πράγματι, τα περισσότερα φλαβονοειδή έχει δειχθεί πως αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό σε καλλιέργειες καρκινικών σειρών και είναι ελάχιστα έως και καθόλου τοξικά για τα ανθρώπινα φυσιολογικά κύτταρα (Kuntz et al., 1999, Wenzel et al, 2000, Pouget et al., 2001).

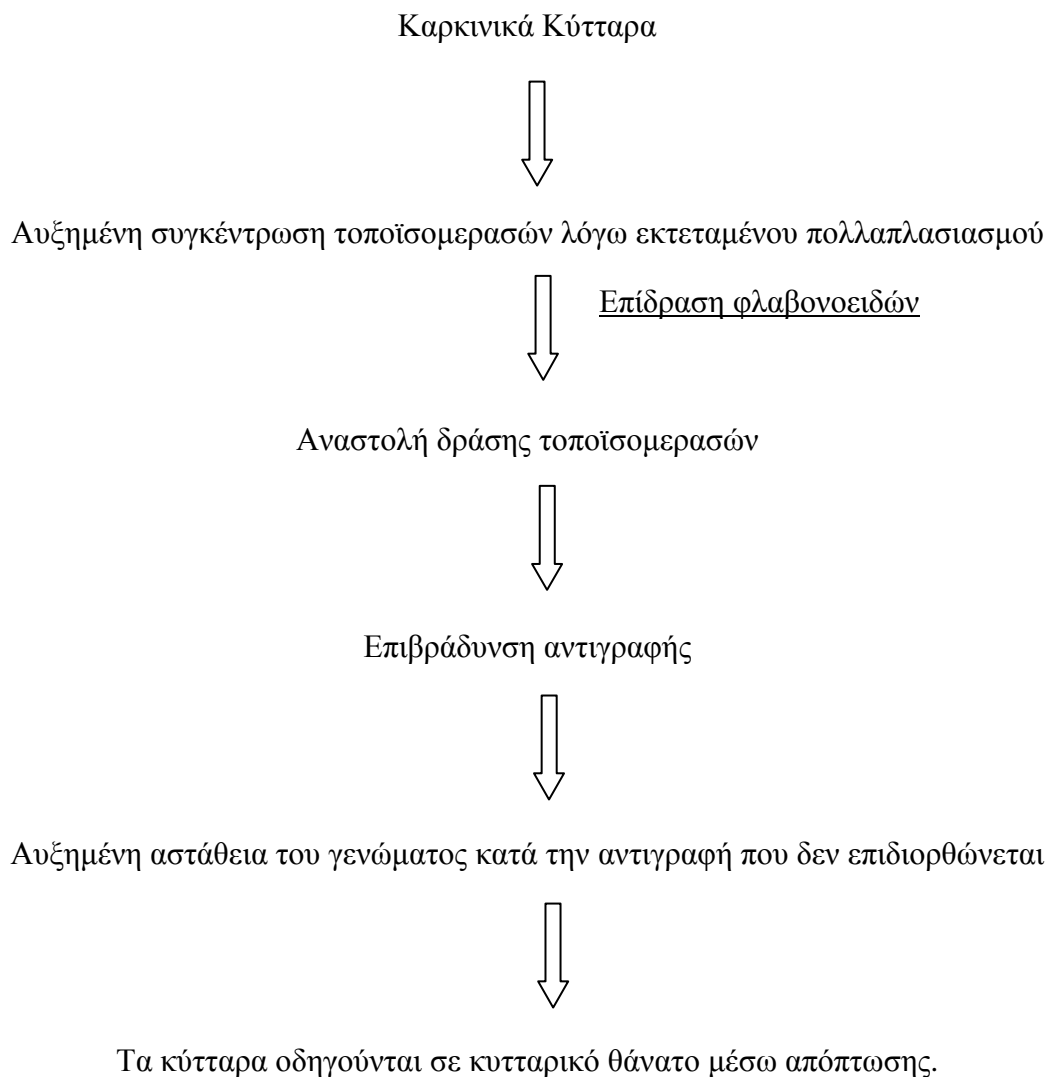
Θ. Επαγωγή της απόπτωσης

Η απόπτωση είναι ένας τύπος κυτταρικού θανάτου που παίζει σημαντικό ρόλο στη θωράκιση της ακεραιότητας ενός ιστού, καθώς περιορίζει την ανάπτυξη κατεστραμμένων ή γενικά ανεπιθύμητων κυττάρων για τον οργανισμό. Η απόπτωση ρυθμίζεται από πολλά γονίδια και επάγεται από σήματα “κινδύνου” τα οποία προέρχονται είτε από τον εξωκυττάριο χώρο είτε από το εσωτερικό του κυττάρου. Η απόπτωση πραγματοποιείται από την ενεργοποίηση πολλαπλών πρωτεασών οι οποίες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους.

Η απορρύθμιση της απόπτωσης προάγει άμεσα την ογκογένεση, καθώς αν το κύτταρο που θα έπρεπε να οδηγηθεί σε θάνατο, επιβιώσει, ενδέχεται να διαιωνίσει

μεταλλάξεις που σταδιακά θα οδηγήσουν στη δημιουργία καρκινικών κυττάρων. Για το λόγο αυτό, οι περισσότερες, αν όχι όλες, οι υπάρχουσες χημειοθεραπείες κατά του καρκίνου στοχεύουν στην επαγωγή της απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων στόχων.

Τα φλαβονοειδή έχει δειχθεί πως επάγουν το αποπτωτικό μονοπάτι σε ορισμένες καρκινικές σειρές, ενώ δεν έχουν την ίδια επίδραση στα φυσιολογικά κύτταρα. Οι ακριβείς μηχανισμοί αυτής τους της δράσης δεν είναι ακόμα απόλυτα γνωστοί. Ωστόσο, είναι γνωστό πως ορισμένα φλαβονοειδή καταστέλλουν την έκφραση των γονιδίων της “κυτταρικής επιβίωσης” Bcl-2 και Bcl-X(L), ενεργοποιούν ενδονουκλεάσες, απελευθερώνουν από τα μιτοχόνδρια το κυτόχρωμα c με συνέπεια την ενεργοποίηση των κασπασών 9 και 3, οι οποίες συμμετέχουν ενεργά στην απόπτωση ενός κυττάρου και φυσικά αναστέλλουν τη δράση των τοποϊσομερασών τύπου I και II (Ren et al., 2003). Συνοπτικά, σε ότι αφορά τις τοποϊσομεράσες ισχύει:



1.10 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η παρατήρηση της επίδρασης εκχυλισμάτων σταφυλιών πλούσιων σε πολυφαινολικές ενώσεις στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I του σίτου. Η αναστολή του ενζύμου από τα μόρια αυτά υποδεικνύει πιθανές αντικαρκινικές και χημειοπροστατευτικές ιδιότητες των φαινολικών αυτών μορίων.

Παράλληλα, κρίνεται απαραίτητη η μελέτη της επίδρασης των μεμονωμένων μορίων, που αποτελούν τα μείγματα, στην ενεργότητα του ενζύμου. Αξίζει ωστόσο να σημειωθεί πως από τα εκχυλίσματα είναι πιο πιθανό να παρατηρήσουμε την επίδραση των πολυφαινολών στην δραστηριότητα της τοποϊσομεράσης I, είτε λόγω συνεργατικής δράσης, ακόμα και ανάμεσα σε μη δραστικά μόρια, είτε διότι αυξάνεται η πιθανότητα να περιέχεται κάποια αναγνωρισμένα δραστική φαινολική ένωση. Επιπλέον, με τη χρήση μειγμάτων μπορούμε να κάνουμε μία καλύτερη υπόθεση σχετικά με το τι ενδεχομένως να συμβαίνει σε ένα βιολογικό σύστημα, μετά την κατανάλωση τροφών πλούσιων σε πολυφαινολικές ενώσεις.

1.11 Σταφύλια

Vitis είναι ένα γένος αναρριχώμενων φυτών το οποίο περιλαμβάνει περίπου 60 είδη και το οποίο ανήκει στην οικογένεια των αγγειόσπερμων φυτών *Vitaceae*. Τα είδη του γένους *Vitis* είναι πολύ σημαντικά για την παγκόσμια οικονομία καθώς τα σταφύλια, που αποτελούν τους καρπούς τους, είτε προορίζονται για άμεση κατανάλωση, είτε χρησιμοποιούνται στην παραγωγή κρασιού. Υπάρχουν τέσσερις κύριες κατηγορίες σταφυλιών:

- Τα σταφύλια της Νοτίου και Ανατολικής Αμερικής και του Καναδά όπως τα *Vitis labrusca* και *Vitis rotundifolia*
- Τα σταφύλια που ευδοκούν στη Ανατολική Ασία (*Vitis coignetiae*) και αυτά που ευδοκούν κυρίως στην Κίνα και τη Σιβηρία (*Vitis amurensis*)
- Τα Γαλλικά υβρίδια και
- Τα Ευρωπαϊκά σταφύλια (*Vitis vinifera*).

Τα μείγματα πολυφαινολικών ενώσεων που δοκιμάστηκαν ως αναστολείς της τοποϊσομεράσης I του σίτου ανήκουν στο είδος *Vitis vinifera* που ευδοκμεί στην Νότια Ευρώπη (Μεσόγειος) και τη Νοτιοδυτική Ασία. Τα σταφύλια του είδους αυτού συνεπώς μπορούν να καλλιεργηθούν σε διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές και περιλαμβάνουν διάφορες ποικιλίες.

Συνήθως, για την απομόνωση φαινολικών συστατικών από τα σταφύλια, χρησιμοποιείται η εκχύλιση σε υγρούς διαλύτες (liquid-liquid extraction), κατά την οποία πραγματοποιείται διαχωρισμός ενώσεων ανάλογα με τη σχετική διαλυτότητά τους σε διαφορετικά υγρά. Ως διαλύτες της απόσταξης χρησιμοποιούνται οργανικές ενώσεις όπως η αιθανόλη, η μεθανόλη, η ακετόνη και το φορμικό οξύ, και νερό σε διαφορετικές αναλογίες. Από το φλοιό των καρπών, το ακατέργαστο εκχύλισμα περιέχει κυρίως ανθοκυανίνες και φλαβονόλες. Οι σπόροι μπορούν να απομονωθούν

μετά από εφαρμογή μηχανικής πίεσης και θέρμανσης και με αυτόν τον τρόπο παράλληλα απομονώνονται φλαβανόλες και παράγωγα των υδροξυκιναμικών οξέων. Αν και η απόσταξη με υγρούς διαλύτες εγγυάται μεγάλη απόδοση στην απομόνωση των πολυφαινολών από σταφύλια, η χρήση μεγάλων ποσοτήτων οργανικών διαλυτών δεν είναι ούτε ασφαλής για τους ερευνητές αλλά ούτε και φιλική προς το περιβάλλον. Για το λόγο αυτό έχουν αναπτυχθεί εναλλακτικές μέθοδοι για την εκχύλιση των φαινολικών ενώσεων όπως η εκχύλιση με βοήθεια φούρνου μικροκυμάτων (microwave-assisted extraction), η εκχύλιση με τη βοήθεια υπερήχων (ultrasound-assisted extraction), η supercritical fluid extraction και η subcritical water extraction, στις οποίες η χρήση οργανικών διαλυτών είναι περιορισμένη.

Το ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο (TPC=total polyphenolic content) προσδιορίζεται συνήθως με χρωματομετρία, η οποία αποτελεί μία φυσικοχημική μέθοδο ποσοτικού προσδιορισμού έγχρωμων ενώσεων που βρίσκονται σε μορφή διαλύματος. Η μέθοδος στηρίζεται στην ύπαρξη φαινολικών δακτυλίων που απορροφούν ορισμένες ακτινοβολίες από αυτές που περνούν δια μέσω του διαλύματός τους.

Αξίζει να σημειωθεί πως στο κρασί, η περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες αυξάνεται ανάλογα με την ποσότητα και την ποιότητα των περικαρπίων (φλοιός) που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή του, καθώς και από τη διάρκεια της ζύμωσης. Για το λόγο αυτό και οι πολυφαινόλες βρίσκονται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στο κόκκινο κρασί, δεδομένου ότι στη διάρκεια της οινοποίησης, οι φλούδες παραμένουν και ζυμώνονται μαζί με τον χυμό του σταφυλιού για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από ότι στο άσπρο κρασί. Η συγκέντρωση των πολυφαινολών στο κρασί εξαρτάται επίσης από την ποικιλία των σταφυλιών που χρησιμοποιείται, όσο και από τις συνθήκες οινοποίησης και παλαίωσής του. Γενικά, οι ερυθροί οίνοι περιέχουν 7 - 10 φορές περισσότερες πολυφαινόλες σε σχέση με τα λευκά.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Υλικά

2.1.1 Εκχυλίσματα που μελετήθηκαν

Στη συγκεκριμένη μελέτη συνολικά δοκιμάστηκαν 11 εκχυλίσματα σταφυλιών που αποτελούν μείγματα πολυφαινολικών ενώσεων και συγκεκριμένα 3 εκχυλίσματα καρπών σταφυλιών, 3 εκχυλίσματα στέμφυλων και 5 εκχυλίσματα βόστρυχων. Στα εκχυλίσματα των καρπών των σταφυλιών περιλαμβάνονται και οι πολυφαινολικές ενώσεις από τους σπόρους του καρπού, ενώ οι όροι στέμφυλα και βόστρυχοι αναφέρονται αντίστοιχα σε ότι απομένει μετά την οινοποίηση (περιλαμβάνονται και ξυλώδη μέρη του φυτού και καρποί) και σε αποκλειστικά ξυλώδη μέρη.

Εκχυλίσματα Καρπών

Μελετήθηκαν εκχυλίσματα από καρπούς που προέρχονται από:

1. Μπατίκι Τυρνάβου (ΜΤ)
2. Ασύρτικο Σαντορίνης 2003 (ΑΣ)
3. Μανδηλαριά Ρόδου 2003 (ΜΔΡ)

Η σύσταση των εκχυλισμάτων σε πολυφαινολικές ενώσεις και το TPC του κάθε εκχυλίσματος δίνονται στον πίνακα 4.

ΣΥΣΤΑΣΗ	Μπατίκι Τυρνάβου (ΜΤ)	Ασύρτικο Σαντορίνης 2003 (ΑΣ)	Μανδηλαριά Ρόδου 2003 (ΜΔΡ)
Γαλλικό οξύ	4,58	1,03	2,24
(+)-κατεχίνη	10,87	151,67	95,92
(-)-επικατεχίνη	ND	31,35	40,49
Προανθοκυανιδίνη Β1	0,96	ND	ND
Προανθοκυανιδίνη Β3	ND	24,51	20,35
Προανθοκυανιδίνη Β2	ND	10,63	17,4
Επιγαλλοκατεχίνη	ND	40,39	30,57
trans-καφαρικό οξύ	1,2	4,31	1,05
trans-Ρεσβερατρόλη	ND	ND	ND
ε-Βινιφερίνη	ND	0,17	0,57
aQ 3-O-γαλακτοσίδιο	ND	3,49	2,73
aQ 3-O- γλυκοσίδιο	ND	1,12	1,08
aQ 3-O- ραμνοσίδιο	ND	4,73	ND
Κερκετίνη	0,35	ND	ND
Κεμπφαιρόλη	0,03	ND	ND
Καφεϊκό οξύ	0,24	ND	ND
Συριγκικό οξύ	ND	ND	ND
p-Κουμαρικό οξύ	ND	ND	ND
Φερουλικό οξύ	ND	ND	ND
TPC*	648	493	467

Πίνακας 4: Σύσταση εκχυλισμάτων που απομονώθηκαν από τους καρπούς των σταφυλιών. TPC*: Ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο σε mg γαλλικού οξέος/gr εκχυλίσματος, ND: no detection (δεν ανιχνεύθηκε)

Εκχυλίσματα Στέμφυλων

Μελετήθηκαν εκχυλίσματα από στέμφυλα που προέρχονται από:

1. Μανδηλαριά Σαντορίνης 2003 (ΜΔΣ)
2. Ασύρτικο Ρόδου 2003 (ΑΡ)
3. Ασύρτικο Σαντορίνης 2003 (ΑΣ)

Η σύσταση των εκχυλισμάτων σε πολυφαινολικές ενώσεις και το TPC του κάθε εκχυλίσματος δίνονται στον πίνακα 5.

ΣΥΣΤΑΣΗ	Μανδηλαριά Σαντορίνης 2003 (ΜΔΣ)	Ασύρτικο Ρόδου 2003 (ΑΡ)	Ασύρτικο Σαντορίνης 2003 (ΑΣ)
Γαλλικό οξύ	13,64	10,78	22,21
(+)-κατεχίνη	9,32	105,57	47,4
(-)-επικατεχίνη	8,72	37,39	12,5
προκυανιδίνη Β3	3,61	9,96	5,22
προκυανιδίνη Β2	3,22	24,01	21,32
Επιγαλλοκατεχίνη	0,53	2,93	12,21
trans-καφταρικό οξύ	6,4	ND	0,44
trans-Ρεσβερατρόλη	2	0,33	0,29
ε-Βινιφερίνη	7,55	0,83	1,41
αQ 3-O-γαλακτοσίδιο	4,63	1,56	4,25
αQ 3-O- γλυκοσίδιο	2,62	7,29	4,63
αQ 3-O- ραμνοσίδιο	1,78	3,34	1,9
Κερκετίνη	3,26	4,75	3,52
Κεμπφαιρόλη	0,06	0,54	0,54
Καφεϊκό οξύ	0,38	0,05	0,23
Συριγκικό οξύ	4,16	0,17	0,25
p-Κουμαρικό οξύ	0,47	0,25	0,26
Φερουλικό οξύ	0,06	ND	0,09
TPC*	208	465	167

Πίνακας 5: Σύσταση εκχυλισμάτων που απομονώθηκαν από στέμφυλα. TPC*: Ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο σε mg γαλλικού οξέος/gr εκχυλίσματος, ND: no detection (δεν ανιχνεύθηκε)

Εκχυλίσματα Βοστρύχων

Μελετήθηκαν εκχυλίσματα από βόστρυχους που προέρχονται από:

1. Μαυροτράγανο Σαντορίνης 2004 (ΜΣ)
2. Βοϊδόματο Σαντορίνης 2003 (ΒΣ)
3. Ασύρτικο Σαντορίνης 2004 (ΑΣ #1)
4. Ασύρτικο Σαντορίνης 2003 (ΑΣ)
5. Ασύρτικο Σαντορίνης 2004 (ΑΣ #2)

Η σύσταση των εκχυλισμάτων σε πολυφαινολικές ενώσεις και το TPC του κάθε εκχυλίσματος δίνονται στον πίνακα 6.

ΣΥΣΤΑΣΗ	Μαυροτράγανο Σαντορίνης 2004 (ΜΣ)	Βοϊδόματο Σαντορίνης 2003 (ΒΣ)	Ασύρτικο Σαντορίνης 2004 (ΑΣ #1)	Ασύρτικο Σαντορίνης 2003 (ΑΣ)	Ασύρτικο Σαντορίνης 2004 (ΑΣ #2)
Γαλλικό οξύ	8,33	11,49	1,78	22,65	2,27
(+)-κατεχίνη	66,28	46,74	68,85	75,87	98,29
(-)-επικατεχίνη	5,21	11,14	0	1,27	0
προκυανιδίνη Β3	21,04	20,54	30,02	31,59	25,79
προκυανιδίνη Β2	3,36	ND	2,48	2,52	8,55
Επιγαλλοκατεχίνη	2,68	5,61	3,25	4,12	4,46
trans-καφταρικό οξύ	2,33	16,11	2,15	4,84	12,25
trans-Ρεσβερατρόλη	4,85	5,47	5,13	6,1	11,42
ε-θινιφερίνη	15,82	12,79	8,54	15,54	14,53
αQ3-O-γαλακτοσίδιο	11,04	12,06	9,09	13,47	19,22
αQ3-O- γλυκοσίδιο	5,84	3,86	5,15	4,53	7,16
αQ3-O- ραμνοσίδιο	0,63	0,9	0,71	0,32	1,53
Κερκετίνη	0,96	0,8	0,19	2,16	0,32
Κεμπφαιρόλη	0,17	ND	ND	0,09	0,04
Καφεϊκό οξύ	0,05	0,51	0,01	0	0
Ευριγκικό οξύ	0,01	0,14	ND	0,13	ND
p-Κουμαρικό οξύ	0,07	0,12	0,04	0,08	0,01
Φερουλικό οξύ	0	ND	0	0	0
TPC*	584	494	574	451	372

Πίνακας 6: Σύσταση εκχυλισμάτων που απομονώθηκαν από βόστρυχους. TPC*: Ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο σε mg γαλλικού οξέος/gr εκχυλίσματος, ND: no detection (δεν ανιχνεύθηκε)

2.1.2 Πλασμιδιακό DNA

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

2.1.3 Απομόνωση πλασμιδίου

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

2.1.4 Wheat Germ Topoisomerase I relaxation assay

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

2.2. Μέθοδοι

2.2.1 Topoisomerase I relaxation assay - Αρχή της μεθόδου

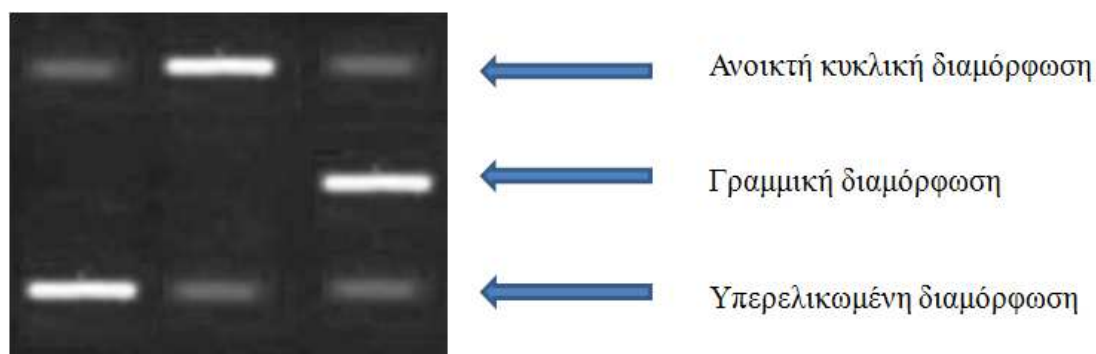
Η μέθοδος στηρίζεται στην ικανότητα της τοποϊσομεράσης να προκαλεί μονόκλιωνα σπασίματα στο πλασμιδιακό DNA, το οποίο αποτελεί πρότυπο γενετικού υλικού που μας επιτρέπει να εκτιμήσουμε τη δράση των αναστολέων των τοποϊσομερασών. Το πλασμιδιακό DNA είναι ένα κυκλικό δίκλωνο DNA, το οποίο φυσιολογικά απαντάται κυρίως στα βακτήρια.

Όταν το πλασμιδιακό DNA μετακινείται σε ηλεκτρικό πεδίο δηλαδή ηλεκτροφορεύεται, εμφανίζεται κυρίως σε τρεις διαφορετικές διαμορφώσεις:

1. Την υπερελικωμένη διαμόρφωση στην οποία το πλασμίδιο είναι άθικτο (χωρίς σπασίματα) και η οποία αποτελεί την πιο συμπαγή του μορφή.
2. Την ανοιχτή κυκλική, στην οποία μεταβαίνει όταν προκαλούνται μονόκλιωνα σπασίματα από ενζυμικούς (τοποϊσομεράση I) ή άλλους παράγοντες και
3. Την γραμμική διαμόρφωση στην οποία μεταβαίνει όταν φέρει δίκλιωνα σπασίματα.

Οι διαμορφώσεις αυτές κινούνται με διαφορετική ταχύτητα σε ένα πήκτωμα, καθώς η πηκτική λειτουργεί ως μοριακός ηθμός που ευνοεί την διαφορετική αυτή μετακίνηση. Επομένως, όσο πιο μικρή σε μέγεθος είναι η διαμόρφωση, τόσο πιο γρήγορα διαπερνά την πορώδη πηκτική της αгарόζης και τόσο περισσότερο αυξάνεται η απόσταση που διανύει στο πήκτωμα στη μονάδα του χρόνου.

Συγκεκριμένα, η υπερελικωμένη διαμόρφωση που είναι και αρκετά συμπαγής, εύκολα διαπερνά τους πόρους της πηκτής και για αυτό εμφανίζεται στο πιο μακρινό σημείο από το σημείο φόρτωσης μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης. Η ανοιχτή κυκλική που προκύπτει μετά τη δράση της τοποϊσομεράσης I κινείται πιο αργά, παραμένει σχετικά κοντά στο σημείο φόρτωσης και άρα εμφανίζεται πιο ψηλά στο πήκτωμα. Τέλος, η γραμμική διαμόρφωση εμφανίζεται ενδιάμεσα στην υπερελικωμένη και την ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση (εικόνα 27).



Εικόνα 27: Διαμορφώσεις του πλασμιδιακού DNA κατά την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης.

Αξίζει να σημειωθεί πως το πλασμιδιακό DNA μπορεί και ηλεκτροφορείται, καθώς ως νουκλεϊκό οξύ φέρει φωσφορικές ομάδες που το φορτίζουν αρνητικά. Επομένως, το ρεύμα που εφαρμόζεται στην ηλεκτροφορητική συσκευή το αναγκάζει να κινηθεί προς την άνοδο, δηλαδή προς τον θετικό πόλο.

2.2.2 Πειραματική διαδικασία

2.2.2.1 Απομόνωση πλασμιδίου

Η διαδικασία ξεκινάει με καλλιέργεια βακτηρίων *E. coli* τα οποία έχουν αρχικά μετασηματιστεί με το πλασμίδιο. Το θρεπτικό μέσο για την καλλιέργεια των βακτηρίων περιείχε 1,5 gr LB broth και 1gr NaCl αραιωμένα σε 100 ml απιονισμένο νερό. Το θρεπτικό μέσο αποστειρώθηκε στους 120° C με υγρή αποστείρωση για 20 min. Ακολούθησε προσθήκη διαλύματος 100 ml αμπικιλίνης αρχικής συγκέντρωσης 100 mg/ml, ώστε να επιτευχθεί στο θρεπτικό μέσο αμπικιλίνης τελική συγκέντρωση 100 µg/ml. Στη συνέχεια, 3 με 4 ml από το θρεπτικό μέσο επιμολύνθηκαν με βακτήρια *E. coli* μετασηματισμένα με το Bluescript-SK+ πλασμιδιακό DNA και η καλλιέργεια έφθασε σε εκθετικό στάδιο ανάπτυξης, μετά από συνεχή ανάδευση, σε 210 στροφές και σε θερμοκρασία 37° C για περίπου 4 ώρες. Στη συνέχεια η καλλιέργεια των βακτηρίων μεταφέρθηκε στην φιάλη των 100ml που περιείχε το θρεπτικό μέσο και αφέθηκε να αναπτυχθεί, με συνεχή ανάδευση, στις 210 στροφές και σε θερμοκρασία 37° C για περίπου 12-13 ώρες.

Η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA από τη βακτηριακή καλλιέργεια περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- Τα βακτήρια διαχωρίστηκαν από το μέσο με φυγοκέντρηση σε 4000 στροφές για 20 λεπτά και απομονώθηκαν ως ίζημα.
- Τα βακτήρια διαλύθηκαν σε 8 ml διαλύματος 1 (50 mM γλυκόζη, 25 mM Tris-HCl pH=8.0 και 10 mM EDTA pH=8.0)
- Προστέθηκαν 16 ml διαλύματος 2 (0,2 N NaOH και 1% SDS) και ακολούθησε απαλή ανάδευση
- Προστέθηκαν 12 ml διαλύματος 3 (45 ml από 5M οξικό κάλιο, 11,5 ml οξικό οξύ, 28,5 ml νερό)
- Ακολούθησε ανάδευση και φυγοκέντρηση σε 5000 στροφές και στους 4° C για 20 λεπτά
- Μετά την φυγοκέντρηση το υπερκείμενο συλλέχθηκε και μεταφέρθηκε σε καινούριο σωλήνα και πραγματοποιήθηκε επανάληψη της τελευταίας φυγοκέντρησης
- Μετρήθηκε ο όγκος του υπερκείμενου και ακολούθησε η προσθήκη παγωμένης ισοπροπανόλης σε ποσό ίσο με το 60% του όγκου του υπερκείμενου.
- Μετά από έντονη ανάδευση του μείγματος ακολούθησε φυγοκέντρηση σε 5000 στροφές και σε 4° C για 20 λεπτά
- Το ίζημα ξεπλύθηκε με 70% παγωμένη αιθανόλη (50% του όγκου) και ακολούθησε ανάδευση.
- Τέλος πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση σε 5000 στροφές για 20 λεπτά και μετά από στέγνωμα στους 37° C σε επωαστήρα, το ίζημα διαλυτοποιήθηκε από την προσθήκη διαλύματος TE (10 mM Tris-Cl, 1mM EDTA) και ενζύμου RNase με τελική συγκέντρωση 10 µg/ml για την αποδόμηση του RNA.

Η εκτίμηση της ποσότητας και της καθαρότητας του πλασμιδιακού DNA πραγματοποιήθηκε με μέτρηση της απορρόφησης ABS σε μήκη κύματος 260 και 280 nm. Αξίζει να σημειωθεί πως στα 280 nm απορροφούν οι πρωτεΐνες, ενώ στα 260 nm το DNA. Η συγκέντρωση του πλασμιδιακού DNA υπολογίζεται βάσει του τύπου:

$$c(\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \text{Απορρόφηση στα } 260 \times 50 \times \text{συντελεστής αραίωσης}$$

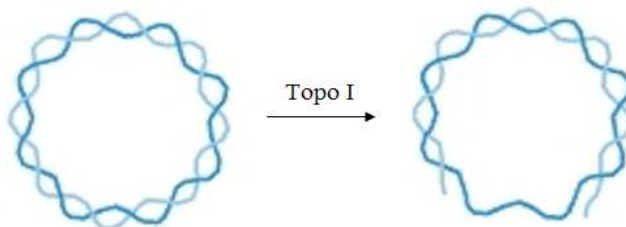
Η εκτίμηση των διαμορφώσεων του πλασμιδιακού DNA γίνεται μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης 1%. Επιλέγονται δείγματα στα οποία το πλασμιδιακό DNA βρίσκεται σε ποσοστό 90 % στην υπερελικωμένη διαμόρφωση.

Το πλασμίδιο διατηρείται στους -20°C , αφού έχει πραγματοποιηθεί διαχωρισμός του σε μικρότερες ποσότητες (aliquots), δεδομένου ότι το συχνό ξεπάγωμα μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια της υπερελικωμένης διαμόρφωσης.

2.2.2.2 *Wheat germ Topoisomerase I relaxation assay*

Τα εκχυλίσματα δοκιμάστηκαν αρχικά σε μία υψηλή ενδεικτική συγκέντρωση της τάξεως των 100 ή 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ για την εύρεση πιθανών αναστολέων. Όσα εκχυλίσματα έδωσαν αναστολή της Topo I εξετάστηκαν στη συνέχεια σε ένα εύρος συγκεντρώσεων από 0.5-50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (ανάλογα με την περίπτωση) για τον υπολογισμό του IC_{50} . Η τιμή IC_{50} (Inhibitory Concentration) αντιστοιχεί στη συγκέντρωση του μείγματος-αναστολέα, στην οποία παρατηρείται 50% αναστολή στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I.

Συνολικά, χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα stock ενζύμου. Με τιτλοδότηση του ενζύμου προέκυψε ότι περίπου 1 unit ενζύμου απαιτείται ώστε το 90% της υπερελικωμένης μορφής του πλασμιδίου να μετατραπεί στην ανοιχτή χαλαρωμένη λόγω του μονόκλωνου σπασίματος που προκαλεί το ένζυμο, όπως φαίνεται και στην εικόνα 28. Για αυτό και σε ορισμένες αντιδράσεις αντί για 1unit, έχουν χρησιμοποιηθεί 1,3 units, 1,5 units ή και 1,667 units.



Εικόνα 28: Επίδραση της Τοποϊσομεράσης I στο πλασμιδιακό DNA. Η διαμόρφωση που προκύπτει αλλάζει την ηλεκτροφορητική ικανότητα του μορίου.

Το μείγμα κάθε αντίδρασης είχε τελικό όγκο 20 μl και περιείχε 20% γλυκερόλη, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 μg Bluescript

SK+ και 1-1.6 unit της τοποϊσομεράσης I, ανάλογα με το stock του ενζύμου. Κάθε αντίδραση περιελάμβανε τα εξής δείγματα: τον αρνητικό μάρτυρα δηλαδή το πλασμιδιακό DNA, το θετικό μάρτυρα δηλαδή το πλασμιδιακό DNA με το ένζυμο και τα δείγματα που περιείχαν πλασμιδιακό DNA, ένζυμο και μείγμα διαφόρων μορίων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

Τα δείγματα επωάζονταν στους 37° C για 45 λεπτά - μία ώρα σε ορισμένες περιπτώσεις, και η αντίδραση τερματιζόταν με την προσθήκη 4 μl διαλύματος φόρτωσης (Stop Buffer) που περιέχει 0,25% κυανό της βρωμοφαινόλης και 30% γλυκερόλη. Αξίζει να σημειωθεί πως το διάλυμα φόρτωσης χρησιμοποιείται για 3 κύριους λόγους: προκειμένου να σταματήσει την αντίδραση λόγω διαφορετικής θερμοκρασίας από αυτή των δειγμάτων, καθώς διατηρείται στους 4° C, προκειμένου να αυξήσει το βάρος των δειγμάτων αλλά και προκειμένου τα δείγματα να χρωματιστούν. Οι δύο τελευταίοι λόγοι διευκολύνουν κατά πολύ την ηλεκτροφόρηση η οποία αποτελεί το επόμενο βήμα του πειράματος.

Η ανάλυση των δειγμάτων γινόταν με ηλεκτροφόρηση στα 80 V για περίπου 1 ώρα, σε πήκτωμα αγαρόζης 1 % και σε διάλυμα TBE 1× (10mM Tris-Cl, 90 mM βορικό οξύ, 0,5 M EDTA με pH =8). Στη συνέχεια το πήκτωμα της αγαρόζης χρωματιζόταν σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου τελικής συγκέντρωσης 0,5μg/ml για 30 λεπτά και αποχρωματιζόταν σε 250ml απιονισμένο νερό για άλλα 30 λεπτά. Τελικά το πήκτωμα φωτογραφιζόταν κάτω από υπεριώδες φως (UV) και η αποθήκευση των εικόνων γινόταν με το πρόγραμμα Alpha View (Alpha Innotech, San Leandro, California). Κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν.

2.2.3 Υπολογισμοί

Η επεξεργασία των φωτογραφιών των πηκτωμάτων έγινε με το πρόγραμμα Gel-Pro. Σε κάθε περίπτωση υπολογίζονταν τα ποσοστά της υπερελικωμένης και της ανοιχτής κυκλικής διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA, μετά την επίδραση των αναστολέων, βάσει της οπτικής πυκνότητάς τους. Από τις τιμές που προέκυπταν, το ποσοστό αναστολής υπολογιζόταν με τον εξής τύπο:

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

Το S_p αντιπροσωπεύει το ποσοστό της υπερελικωμένης μορφής στο θετικό μάρτυρα, ο οποίος περιείχε το πλασμιδιακό DNA και το ένζυμο στη συγκέντρωση που έχει χρησιμοποιηθεί σε όλα τα δείγματα της συγκεκριμένης κάθε φορά αντίδρασης.

Το S_o αντιπροσωπεύει το ποσοστό της υπερελικωμένης μορφής στον αρνητικό μάρτυρα, ο οποίος περιέχει μόνο το πλασμιδιακό DNA.

Το S αντιπροσωπεύει το ποσοστό της υπερελικωμένης μορφής σε κάθε ένα δείγμα, το οποίο περιείχε πλασμιδιακό DNA, ένζυμο και συγκεκριμένη ποσότητα αναστολέα.

Τα ποσοστά αναστολής για το κάθε εξεταζόμενο μόριο μετρήθηκαν σε τρία ανεξάρτητα πειράματα. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πρόγραμμα ανάλυσης Statistical Package for Social Sciences (SPSS) 13.0. 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). Η ανεξάρτητη μεταβλητή ήταν οι συγκεντρώσεις των καθαρών πολυφαινολικών ενώσεων.

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε μέσω ανάλυσης διακύμανσης ενός παράγοντα, 1-way ANOVA. Οι διαφορές θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$. Στα γραφήματα των αποτελεσμάτων παρουσιάζονται μόνο οι στατιστικά σημαντικές τιμές.

Για σύγκριση της ανασταλτικής δράσης των φυτικών μειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη αυτή, προσδιορίστηκε η τιμή IC_{50} . Η τιμή IC_{50} (Inhibitory Concentration) αντιστοιχεί στη συγκέντρωση του μείγματος-αναστολέα, στην οποία παρατηρείται 50% αναστολή στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I. Αξίζει να σημειωθεί πως όσο μικρότερη είναι η τιμή της σταθεράς αυτής, τόσο ισχυρότερη είναι η ανασταλτική δράση του κάθε μείγματος πολυφαινολών.

3.Αποτελέσματα

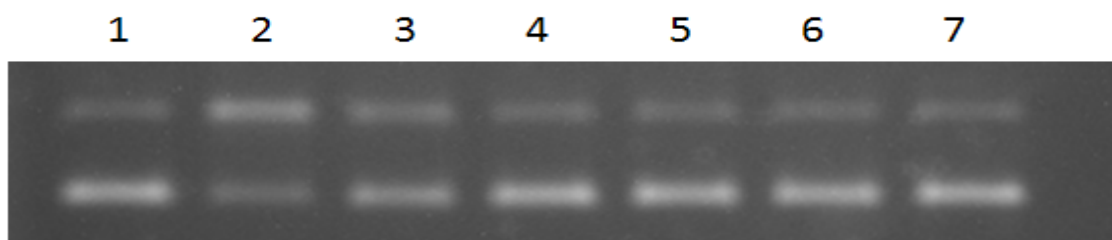
3.1 Επίδραση εκχυλισμάτων σταφυλιών στην τοποϊσομεράση I του σίτου

Τα εκχυλίσματα δοκιμάστηκαν σε ένα εύρος συγκεντρώσεων που κυμαίνεται από 0.5 $\mu\text{g/ml}$ έως 50 $\mu\text{g/ml}$. Ωστόσο, η μικρότερη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε διαφέρει για το κάθε εκχύλισμα και αυτό καθορίστηκε βάσει της ανασταλτικής του ικανότητας στην ενεργότητα του ενζύμου. Όσο μικρότερη συγκέντρωση του αναστολέα απαιτείται για αναστολή του ενζύμου, τόσο ισχυρότερος χαρακτηρίζεται ένας αναστολέας. Για τη σύγκριση των αναστολέων, υπολογίστηκε η τιμή IC_{50} .

3.1.1 Εκχυλίσματα από Σταφύλια-Καρπούς

A) Μπατίκι Τυρνάβου (MT)

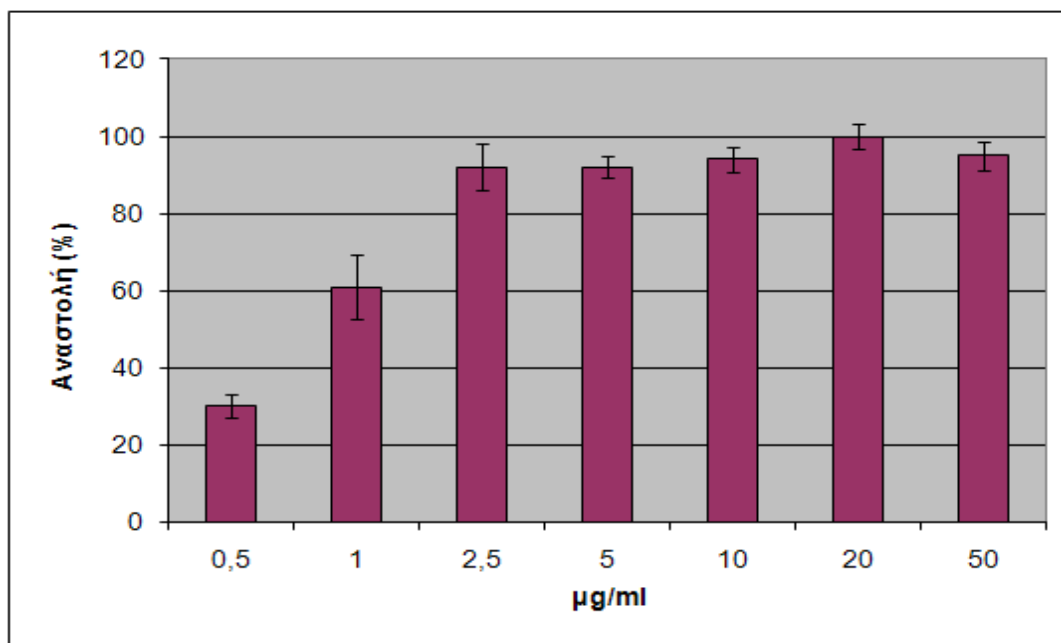
Δοκιμάστηκε στις συγκεντρώσεις 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 2.5 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$ και 50 $\mu\text{g/ml}$. Σε συγκέντρωση 0.5 $\mu\text{g/ml}$ παρατηρείται αναστολή στη δραστικότητα του ενζύμου σε ποσοστό 30%, ενώ σε συγκέντρωση 20 $\mu\text{g/ml}$ επιτυγχάνεται το μέγιστο ποσοστό αναστολής του ενζύμου (100%). Στην εικόνα 29 φαίνεται η επίδραση του εκχυλίσματος MT στην δραστικότητα της ευκαρωτικής τοποϊσομεράσης και στις 5 από τις 6 προαναφερθείσες συγκεντρώσεις.



1. 1 μg πλασμιδίου – αρνητικός μάρτυρας
2. 1 μg πλασμιδίου + 1.667 units ενζύμου– θετικός μάρτυρας
3. 1 μg πλασμιδίου + 1.667 units ενζύμου + MT (1 $\mu\text{g/ml}$)
4. 1 μg πλασμιδίου + 1.667 units ενζύμου + MT (5 $\mu\text{g/ml}$)
5. 1 μg πλασμιδίου + 1.667 units ενζύμου + MT (10 $\mu\text{g/ml}$)
6. 1 μg πλασμιδίου + 1.667 units ενζύμου + MT (20 $\mu\text{g/ml}$)
7. 1 μg πλασμιδίου + 1.667 units ενζύμου + MT (50 $\mu\text{g/ml}$)

Εικόνα 29: Επίδραση του εκχυλίσματος από το Μπατίκι Τυρνάβου (MT) στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I του σίτου.

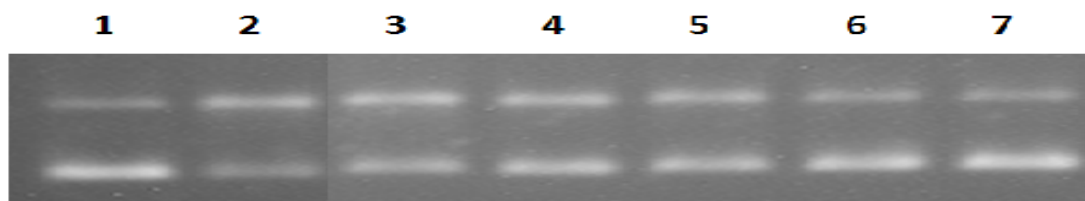
Τα ποσοστά αναστολής της δράσης της Τορο Ι του σίτου από διαφορετικές συγκεντρώσεις εκχυλίσματος ΜΤ δίνονται στο γράφημα 1. Η τιμή του IC₅₀ εκτιμάται σε 0.8 µg/ml.



Γράφημα 1: Ποσοστά αναστολής της ενεργότητας της ευκαρυωτικής τοποϊσομεράσης Ι σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος ΜΤ.

Β) Ασύρτικο Σαντορίνης του 2003 (ΑΣ)

Δοκιμάστηκε στις συγκεντρώσεις 1µg/ml, 2.5µg/ml, 5µg/ml, 10µg/ml και 20µg/ml. Σε συγκέντρωση 1µg/ml παρατηρείται αναστολή στη δραστηριότητα του ενζύμου σε ποσοστό 29%, ενώ σε συγκέντρωση 20µg/ml επιτυγχάνεται μεγάλο ποσοστό αναστολής του ενζύμου (84.25%). Στην εικόνα 30 φαίνεται η επίδραση του εκχυλίσματος ΑΣ 2003 στην δραστηριότητα της ευκαρυωτικής τοποϊσομεράσης και στις 5 προαναφερθείσες συγκεντρώσεις.

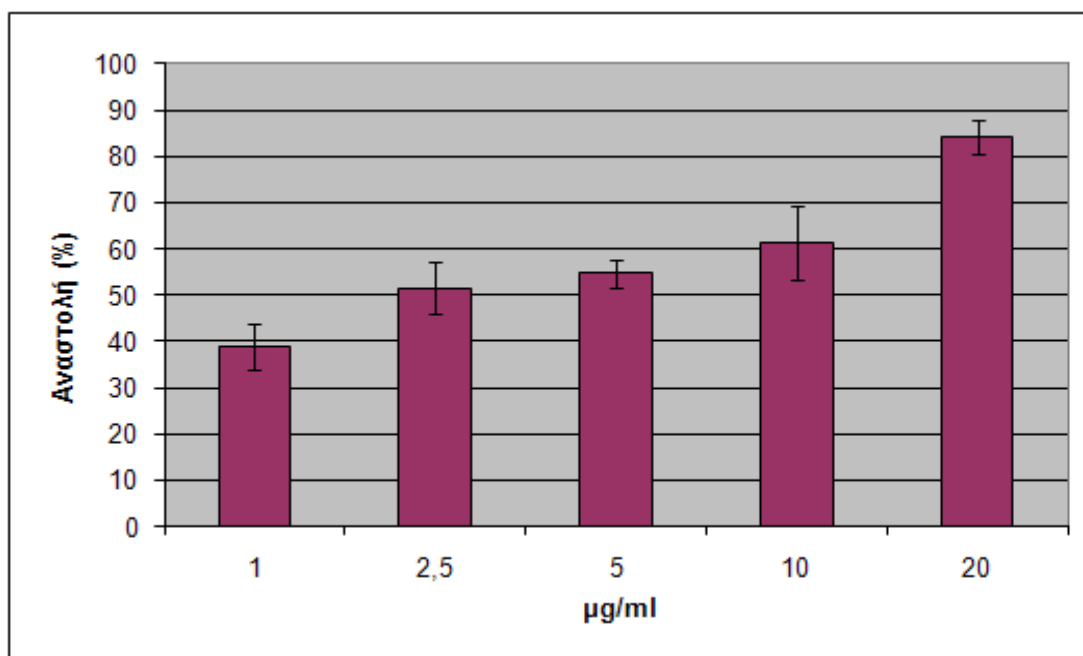


1. 1 µg πλασμιδίου – αρνητικός μάρτυρας
2. 1 µg πλασμιδίου + 1 unit ενζύμου (0.5 unit/µl) – θετικός μάρτυρας
3. 1 µg πλασμιδίου + 1 unit ενζύμου + ΑΣ (1 µg/ml)

4. 1 μg πλασμιδίου + 1 unit ενζύμου + ΑΣ (2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
5. 1 μg πλασμιδίου + 1 unit ενζύμου + ΑΣ (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
6. 1 μg πλασμιδίου + 1 unit ενζύμου + ΑΣ (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
7. 1 μg πλασμιδίου + 1 unit ενζύμου + ΑΣ (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

Εικόνα 30: Επίδραση του εκχυλίσματος από το Ασύρτικο Σαντορίνης στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I του σίτου.

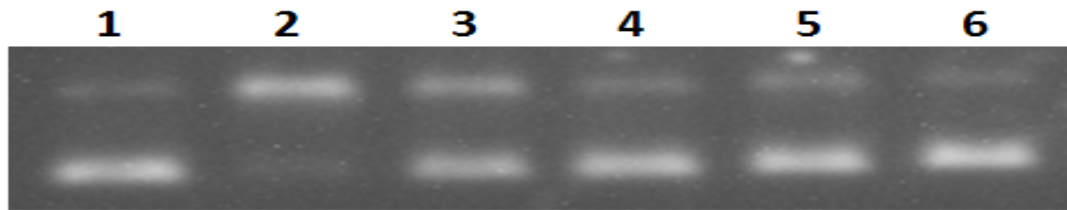
Τα ποσοστά αναστολής της δράσης της Τορο I του σίτου από διαφορετικές συγκεντρώσεις εκχυλίσματος ΑΣ 2003 δίνονται στο γράφημα 2. Η τιμή του IC_{50} εκτιμάται σε 2.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$.



Γράφημα 2: Ποσοστά αναστολής της ενεργότητας της ευκαρυωτικής τοποϊσομεράσης I σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος ΑΣ 2003.

Γ) Μανδηλαριά Ρόδος του 2003 (ΜΔΡ)

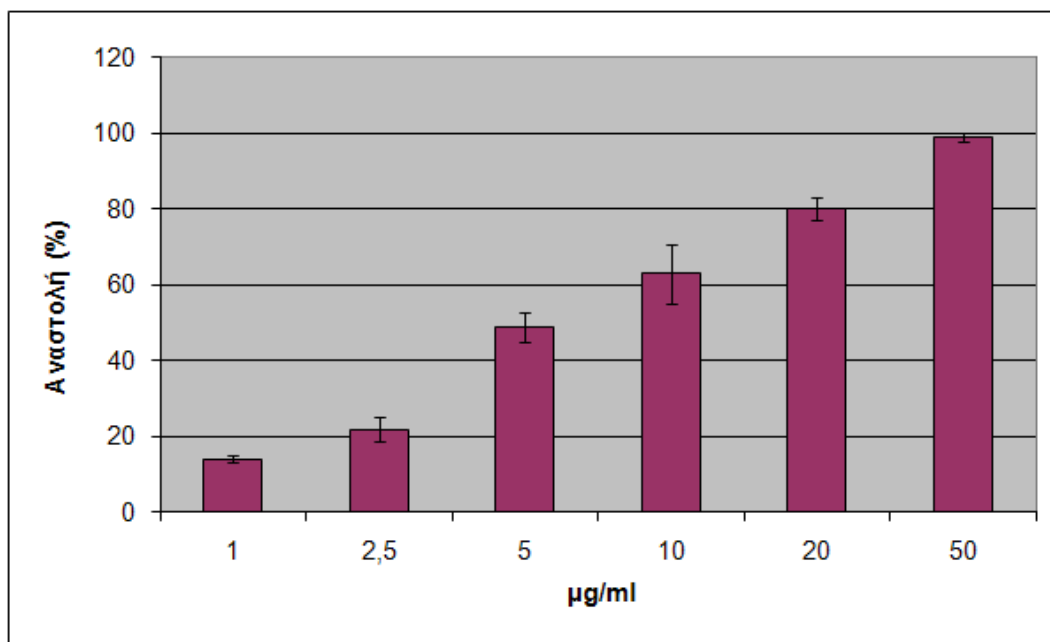
Δοκιμάστηκε στις συγκεντρώσεις 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ και 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Σε συγκέντρωση 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ παρατηρείται αναστολή στη δραστηριότητα του ενζύμου σε ποσοστό 14%, ενώ σε συγκέντρωση 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ επιτυγχάνεται μέγιστο ποσοστό αναστολής του ενζύμου (99%). Στην εικόνα 31 φαίνεται η επίδραση του εκχυλίσματος ΜΔΡ στην δραστηριότητα της ευκαρυωτικής τοποϊσομεράσης και σε 4 από τις 6 προαναφερθείσες συγκεντρώσεις.



1. 1 μg πλασμιδίου – αρνητικός μάρτυρας
2. 1 μg πλασμιδίου + 1 unit ενζύμου – θετικός μάρτυρας
3. 1 μg πλασμιδίου + 1 unit ενζύμου + ΜΔΡ (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
4. 1 μg πλασμιδίου + 1 unit ενζύμου + ΜΔΡ (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
5. 1 μg πλασμιδίου + 1 unit ενζύμου + ΜΔΡ (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
6. 1 μg πλασμιδίου + 1 unit ενζύμου + ΜΔΡ (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

Εικόνα 31: Επίδραση του εκχυλίσματος από την ποικιλία Μανδηλαριά Ρόδου στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I του σίτου.

Τα ποσοστά αναστολής της δράσης της Τορο I του σίτου από διαφορετικές συγκεντρώσεις εκχυλίσματος ΜΔΡ δίνονται στο γράφημα 3. Η τιμή του IC_{50} εκτιμάται σε 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

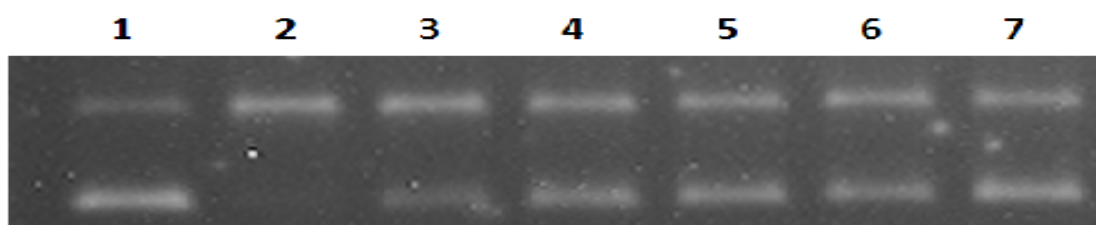


Γράφημα 3: Ποσοστά αναστολής της ενεργότητας της ευκαρυωτικής τοποϊσομεράσης I σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του ΜΔΡ.

3.1.2 Εκχυλίσματα από Στέμφυλα

A) Μανδηλαριά Σαντορίνης (ΜΔΡ)

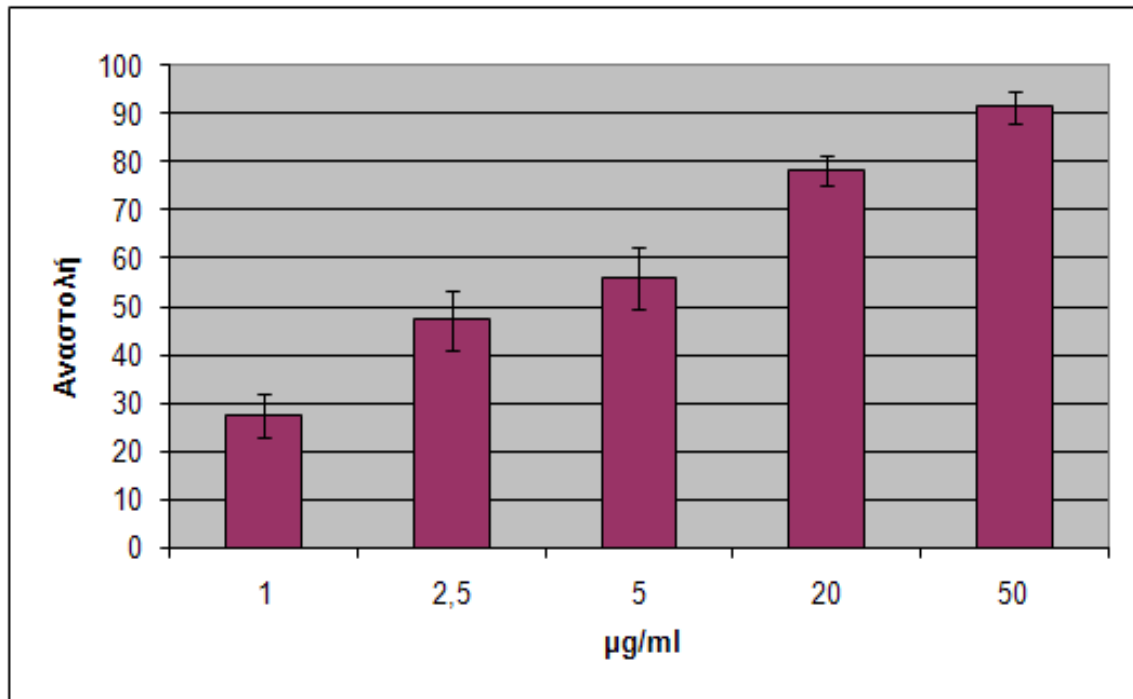
Δοκιμάστηκε σε συγκεντρώσεις 1μg/ml, 2.5μg/ml, 5μg/ml, 10μg/ml, 20μg/ml και 50μg/ml. Στη μικρότερη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε (1μg/ml) το εκχύλισμα από την ποικιλία Μανδηλαριά Σαντορίνης προκαλούσε αναστολή της δραστηρότητας του ενζύμου σε ποσοστό 27.5%, συγκριτικά με το θετικό μάρτυρα και φθάνει στο μέγιστο ποσοστό (90%) σε 50 μg/ml.



1. 1 μg πλασμιδίου - αρνητικός μάρτυρας
2. 1 μg πλασμιδίου + 1.58 units ενζύμου – θετικός μάρτυρας
3. 1 μg πλασμιδίου + 1.58 units ενζύμου + ΜΔΣ (1 μg/ml)
4. 1 μg πλασμιδίου + 1.58 units ενζύμου + ΜΔΣ (2.5 μg/ml)
5. 1 μg πλασμιδίου + 1.58 units ενζύμου + ΜΔΣ (5 μg/ml)
6. 1 μg πλασμιδίου + 1.58 units ενζύμου + ΜΔΣ (10 μg/ml)
7. 1 μg πλασμιδίου + 1.58 units ενζύμου + ΜΔΣ (20 μg/ml)

Εικόνα 32: Επίδραση του εκχυλίσματος από την ποικιλία Μανδηλαριά Σαντορίνης στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I του σίτου.

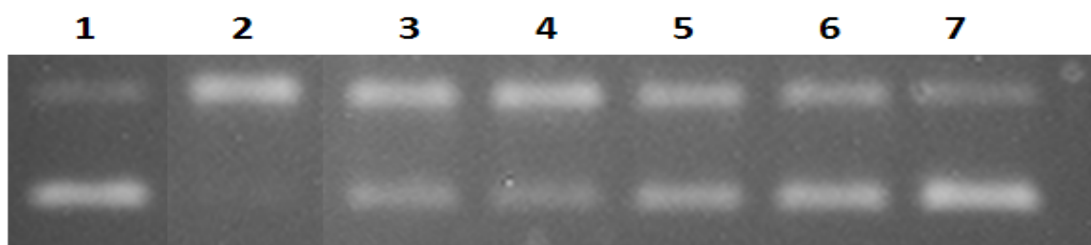
Τα ποσοστά αναστολής της δράσης της Τορο I του σίτου από διαφορετικές συγκεντρώσεις εκχυλίσματος ΜΔΡ δίνονται στο γράφημα 4. Η τιμή του IC₅₀ εκτιμάται σε 2 μg/ml.



Γράφημα 4: Ποσοστά αναστολής της ενεργότητας της ευκαρυωτικής τοποϊσομεράσης I σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος ΜΔΡ.

B) Ασύρτικο Ρόδου (AP)

Δοκιμάστηκε στις συγκεντρώσεις 1µg/ml, 2.5µg/ml, 5µg/ml, 10µg/ml, 20µg/ml και 50µg/ml. Σε συγκέντρωση 1µg/ml παρατηρείται αναστολή στη δραστηριότητα του ενζύμου σε ποσοστό περίπου 26%, ενώ σε συγκέντρωση 50µg/ml επιτυγχάνεται αναστολή του ενζύμου μεγάλο σε ποσοστό 88.588%. Στην εικόνα 33 φαίνεται η επίδραση του εκχυλίσματος AP στην δραστηριότητα της ευκαρυωτικής τοποϊσομεράσης και στις 5 από τις 6 αυτές προαναφερθείσες συγκεντρώσεις

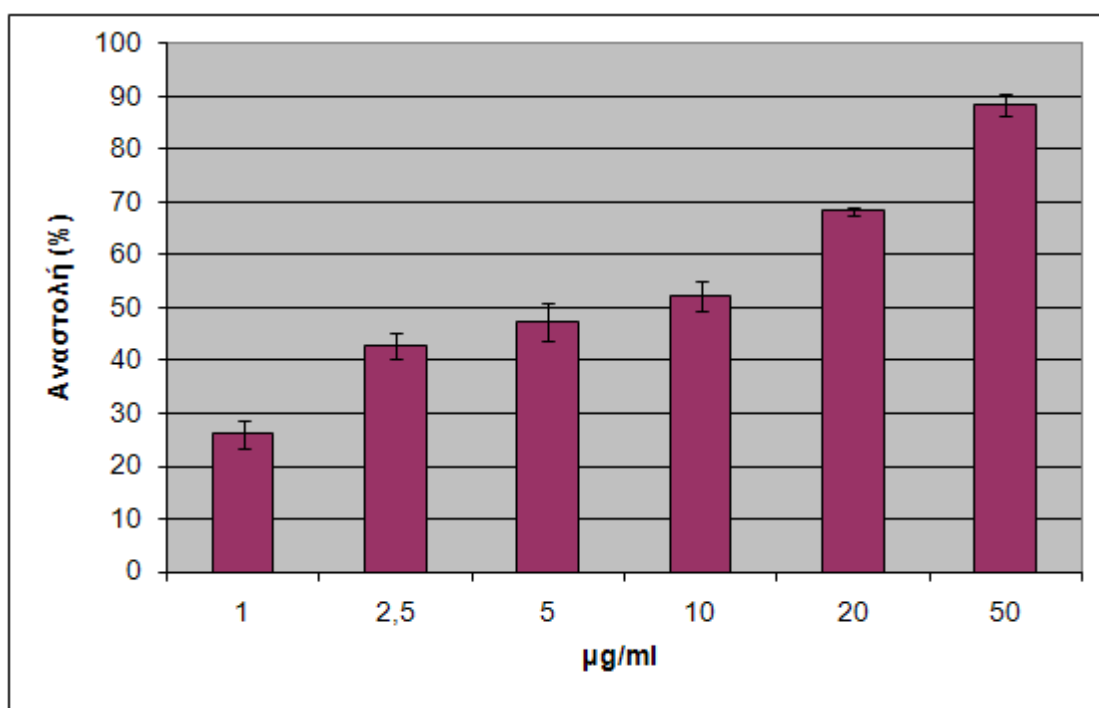


1. 1 µg πλασμιδίου – αρνητικός μάρτυρας
2. 1 µg πλασμιδίου + 1.3 units ενζύμου – θετικός μάρτυρας
3. 1 µg πλασμιδίου + 1.3 units ενζύμου + AP (2.5 µg/ml)

4. 1 μg πλασμιδίου + 1.3 units ενζύμου + AP (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
5. 1 μg πλασμιδίου + 1.3 units ενζύμου + AP (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
6. 1 μg πλασμιδίου + 1.3 units ενζύμου + AP (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
7. 1 μg πλασμιδίου + 1.3 units ενζύμου + AP (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

Εικόνα 33: Επίδραση του εκχυλίσματος από την ποικιλία Ασύρτικο Ρόδου στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I του σίτου.

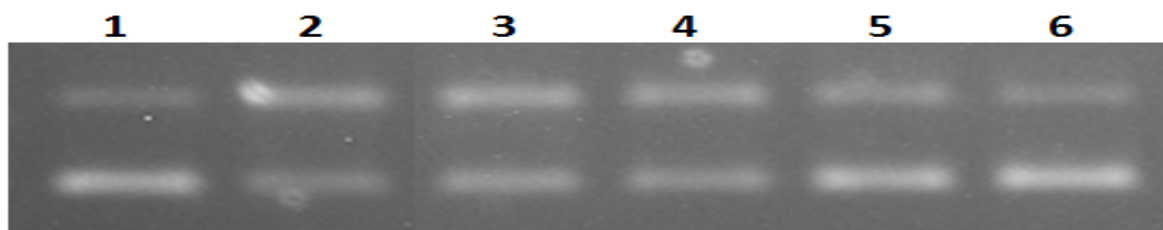
Τα ποσοστά αναστολής της δράσης της Τορο I του σίτου από διαφορετικές συγκεντρώσεις εκχυλίσματος AP δίνονται στο γράφημα 5. Η τιμή του IC_{50} εκτιμάται σε 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$.



Γράφημα 5: Ποσοστά αναστολής της ενεργότητας της ευκαρυωτικής τοποϊσομεράσης I σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος AP

Γ) Ασύρτικο Σαντορίνη (ΑΣ)

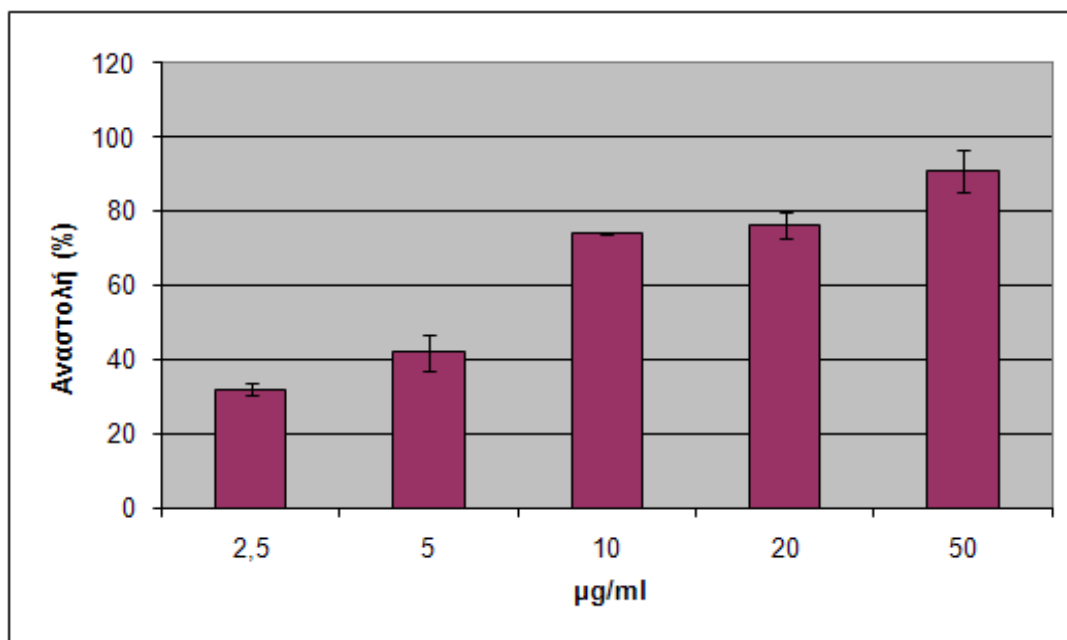
Δοκιμάστηκε στις συγκεντρώσεις 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ και 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Σε συγκέντρωση 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ παρατηρείται αναστολή στη δραστηριότητα του ενζύμου σε ποσοστό 32%, ενώ σε συγκέντρωση 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ επιτυγχάνεται αναστολή του ενζύμου σε ποσοστό 91%. Στην εικόνα 34 φαίνεται η επίδραση του εκχυλίσματος ΑΣ στην δραστηριότητα της ευκαρυωτικής τοποϊσομεράσης και στις 5 προαναφερθείσες συγκεντρώσεις.



1. 1 μg πλασμιδίου – αρνητικός μάρτυρας
2. 1 μg πλασμιδίου + 1.667 units ενζύμου – θετικός μάρτυρας
3. 1 μg πλασμιδίου + 1.667 units ενζύμου + ΑΣ (2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
4. 1 μg πλασμιδίου + 1.667 units ενζύμου + ΑΣ (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
5. 1 μg πλασμιδίου + 1.667 units ενζύμου + ΑΣ (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
6. 1 μg πλασμιδίου + 1.667 units ενζύμου + ΑΣ (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

Εικόνα 34: Επίδραση του εκχυλίσματος από την ποικιλία Ασυρτικό Σαντορίνης στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I του σίτου.

Τα ποσοστά αναστολής της δράσης της Τορο I του σίτου από διαφορετικές συγκεντρώσεις εκχυλίσματος ΑΣ δίνονται στο γράφημα 6. Η τιμή του IC_{50} εκτιμάται σε περίπου 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

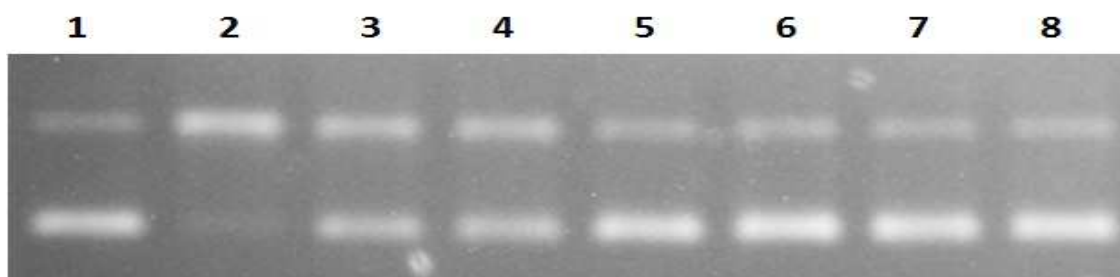


Γράφημα 6: Ποσοστά αναστολής της ενεργότητας της ευκαρυωτικής τοποϊσομεράσης I σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος ΑΣ.

3.1.3 Εκχυλίσματα από Βόστρυχους

A) Μαυροτράγανο Σαντορίνης 2004 (ΜΣ)

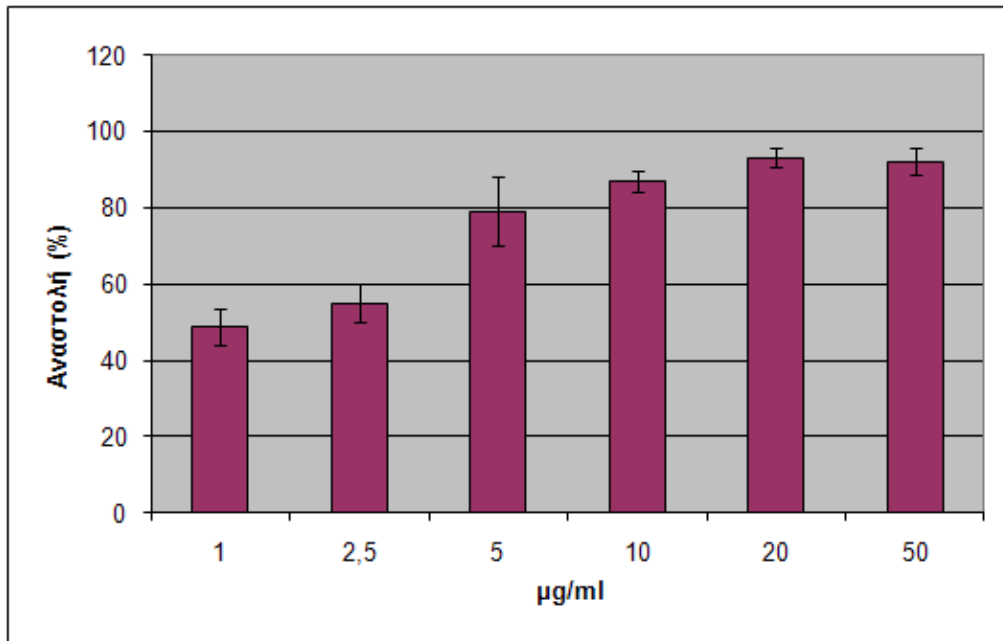
Δοκιμάστηκε στις συγκεντρώσεις 1μg/ml, 2.5μg/ml, 5μg/ml, 10μg/ml, 20μg/ml και 50μg/ml. Σε συγκέντρωση 1μg/ml παρατηρείται αναστολή στη δραστηριότητα του ενζύμου σε ποσοστό 49%, ενώ σε συγκέντρωση 20μg/ml επιτυγχάνεται το μέγιστο ποσοστό αναστολής του ενζύμου (93%). Στην εικόνα 35 φαίνεται η επίδραση του εκχυλίσματος ΜΣ και στις 6 αυτές αυξανόμενες συγκεντρώσεις.



1. 1 μg πλασμιδίου – αρνητικός μάρτυρας
2. 1 μg πλασμιδίου + 1.3 units ενζύμου – θετικός μάρτυρας
3. 1 μg πλασμιδίου + 1.3 units ενζύμου + ΜΣ (1 μg/ml)
4. 1 μg πλασμιδίου + 1.3 units ενζύμου + ΜΣ (2.5 μg/ml)
5. 1 μg πλασμιδίου + 1.3 units ενζύμου + ΜΣ (5 μg/ml)
6. 1 μg πλασμιδίου + 1.3 units ενζύμου+ ΜΣ (10 μg/ml)
7. 1 μg πλασμιδίου + 1.3 units ενζύμου+ ΜΣ (20 μg/ml)
8. 1 μg πλασμιδίου + 1.3 units ενζύμου+ ΜΣ (50 μg/ml)

Εικόνα 35: Επίδραση του εκχυλίσματος από την ποικιλία Μαυροτράγανο Σαντορίνης στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I του σίτου.

Τα ποσοστά αναστολής της δράσης της Τοπο I του σίτου από διαφορετικές συγκεντρώσεις εκχυλίσματος ΜΣ δίνονται στο γράφημα 7. Η τιμή του IC₅₀ εκτιμάται σε 0.8 μg/ml.

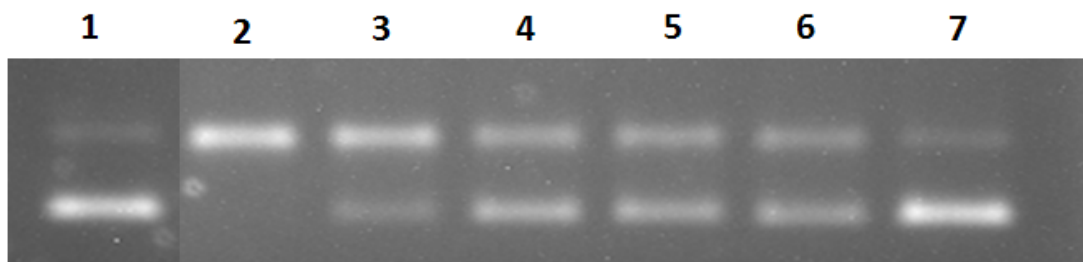


Γράφημα 7: Ποσοστά αναστολής της ενεργότητας της ευκαρυωτικής τοποϊσομεράσης I σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος ΜΣ.

B) Βοηδόματο Σαντορίνης 2003 (BΣ)

Δοκιμάστηκε στις συγκεντρώσεις 1μg/ml, 2.5μg/ml, 5μg/ml, 10μg/ml και 20μg/ml.

Στη συγκέντρωση των 20μg/ml η δραστηκότητα του ενζύμου αναστέλλεται σε ποσοστό 97%, ενώ στη μικρότερη συγκέντρωση (1μg/ml) το ποσοστό αναστολής εκτιμάται στο 23%.



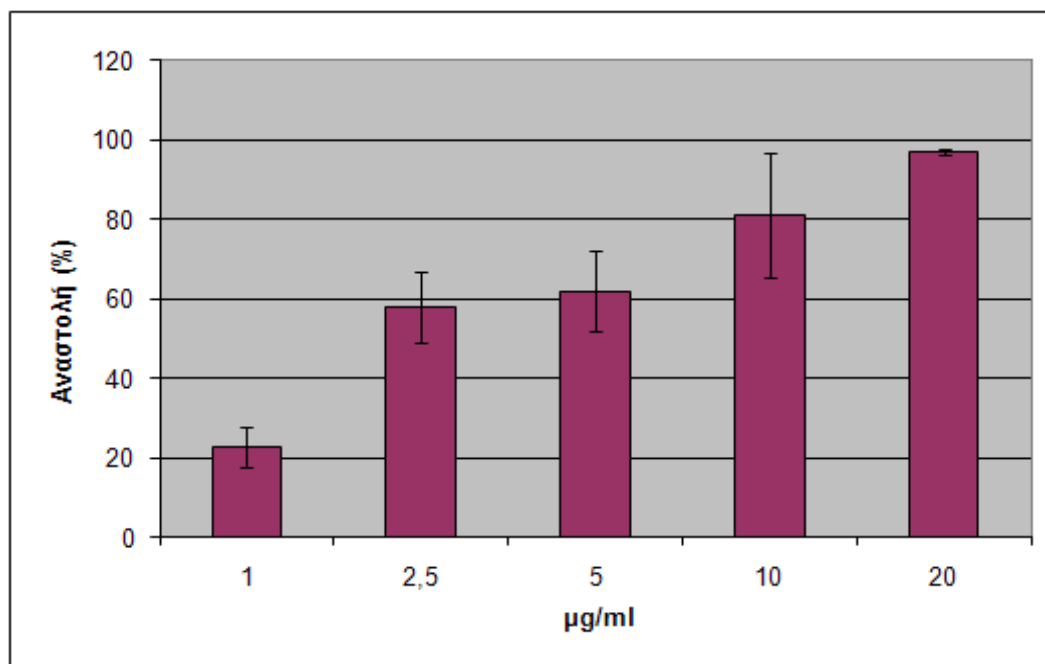
1. 1 μg πλασμιδίου - αρνητικός μάρτυρας
2. 1 μg πλασμιδίου + 1.667 units ενζύμου – θετικός μάρτυρας
3. 1 μg πλασμιδίου + 1.667 units ενζύμου + BΣ (1 μg/ml)
4. 1 μg πλασμιδίου + 1.667 units ενζύμου + BΣ (2.5 μg/ml)
5. 1 μg πλασμιδίου + 1.667 units ενζύμου + BΣ (5 μg/ml)

6. 1 μg πλασμιδίου + 1.667 units ενζύμου + ΒΣ (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

7. 1 μg πλασμιδίου + 1.667 units ενζύμου + ΒΣ (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

Εικόνα 36: Επίδραση του εκχυλίσματος από την ποικιλία Βοηδόματο Σαντορίνης στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I του σίτου.

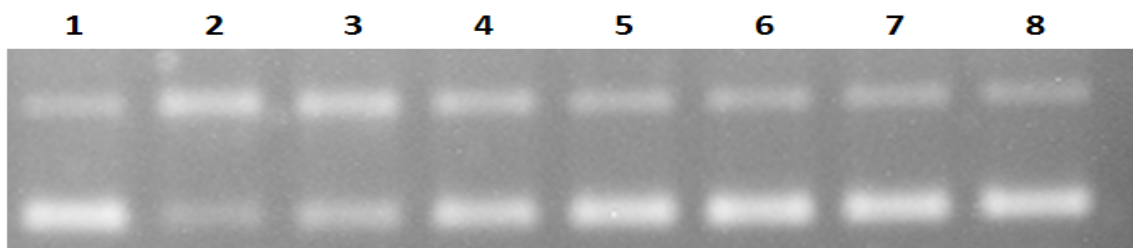
Τα ποσοστά αναστολής της δράσης της Τορο I του σίτου από διαφορετικές συγκεντρώσεις εκχυλίσματος ΒΣ δίνονται στο γράφημα 8. Η τιμή του IC_{50} εκτιμάται σε 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$.



Γράφημα 8: Ποσοστά αναστολής της ενεργότητας της ευκαρυωτικής τοποϊσομεράσης I σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος ΒΣ

Γ) Ασύρτικο Σαντορίνης του 2004 (ΑΣ #1)

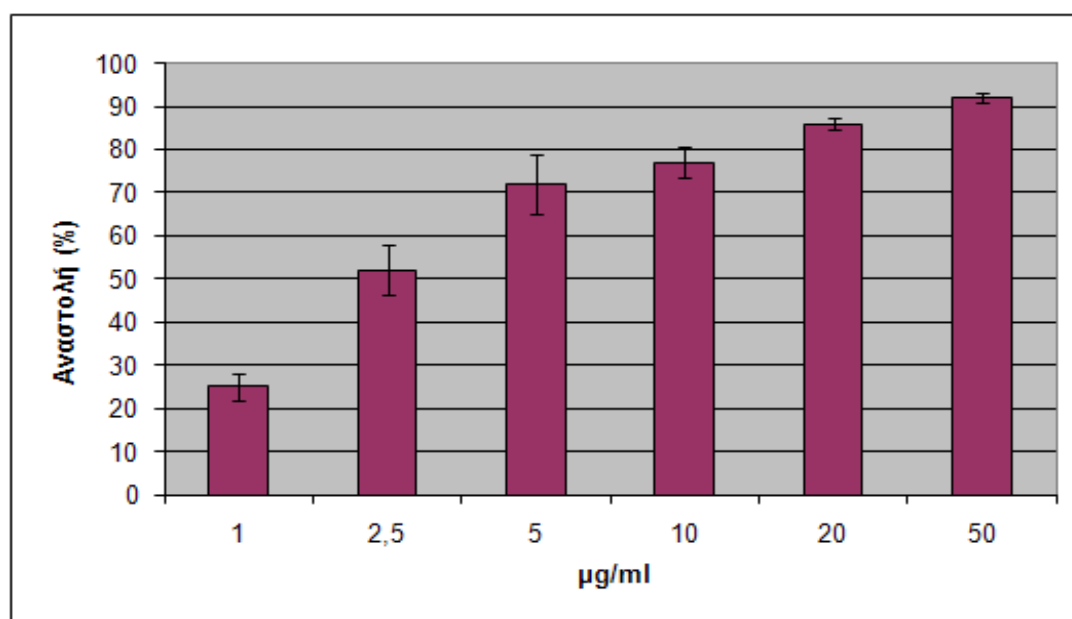
Δοκιμάστηκε στις συγκεντρώσεις 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ και 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Σε συγκέντρωση 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ παρατηρείται αναστολή στη δραστηριότητα του ενζύμου σε ποσοστό 25%, ενώ σε συγκέντρωση 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ επιτυγχάνεται μεγάλο ποσοστό αναστολής του ενζύμου (86%). Στην εικόνα 37 φαίνεται η επίδραση του εκχυλίσματος ΑΣ #1 στην δραστηριότητα της ευκαρυωτικής τοποϊσομεράσης και στις προαναφερθείσες συγκεντρώσεις.



1. 1 µg πλασμιδίου – αρνητικός μάρτυρας
2. 1 µg πλασμιδίου + 1.3 units ενζύμου – θετικός μάρτυρας
3. 1 µg πλασμιδίου + 1.3 units ενζύμου + ΑΣ #1 (1 µg/ml)
4. 1 µg πλασμιδίου + 1.3 units ενζύμου + ΑΣ#1 (2.5 µg/ml)
5. 1 µg πλασμιδίου + 1.3 units ενζύμου + ΑΣ#1 (5 µg/ml)
6. 1 µg πλασμιδίου + 1.3 units ενζύμου + ΑΣ#1 (10 µg/ml)
7. 1 µg πλασμιδίου + 1.3 units ενζύμου + ΑΣ#1 (20 µg/ml)
8. 1 µg πλασμιδίου + 1.3 units ενζύμου + ΑΣ#1 (50 µg/ml)

Εικόνα 37: Επίδραση του εκχυλίσματος από την ποικιλία Ασύρτικο Σαντορίνης (ΑΣ #1) στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I του σίτου.

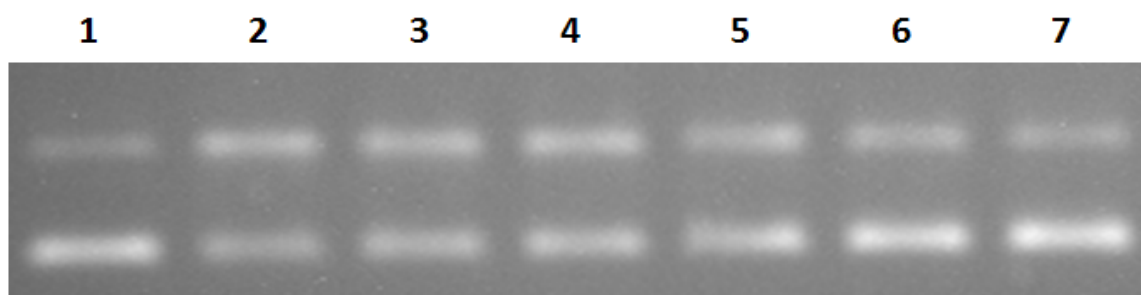
Τα ποσοστά αναστολής της δράσης της Τορο I του σίτου από διαφορετικές συγκεντρώσεις εκχυλίσματος ΑΣ #1 δίνονται στο γράφημα 9. Η τιμή του IC₅₀ εκτιμάται σε 2 µg/ml περίπου.



Γράφημα 9: Ποσοστά αναστολής της ενεργότητας της ευκαρυωτικής τοποϊσομεράσης I σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος ΑΣ #1.

Δ) Ασύρτικο Σαντορίνης του 2003 (ΑΣ)

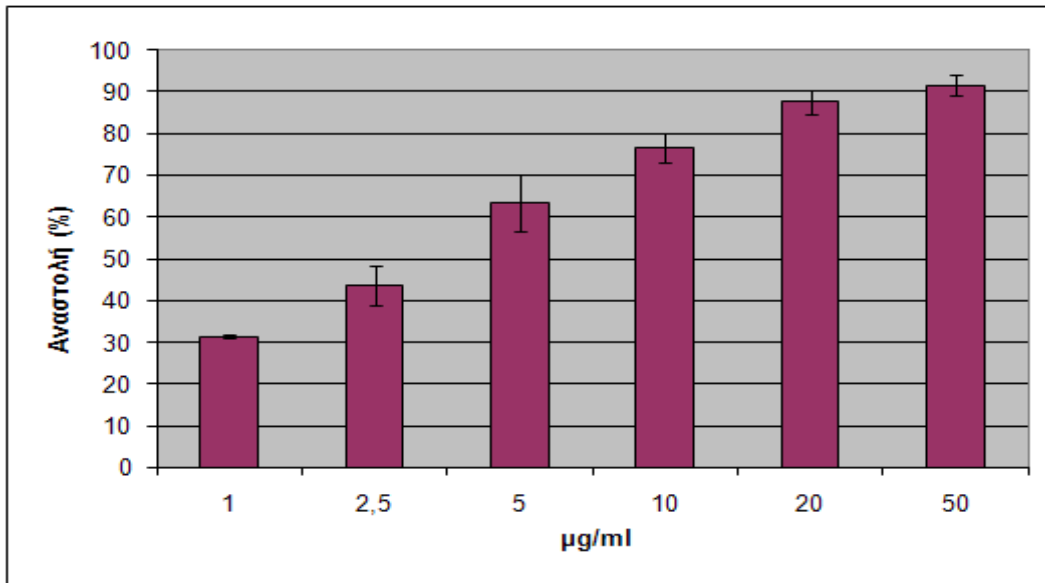
Δοκιμάστηκε στις συγκεντρώσεις 1μg/ml, 2.5μg/ml, 5μg/ml, 10μg/ml, 20μg/ml και 50μg/ml. Σε συγκέντρωση 1μg/ml παρατηρείται αναστολή στη δραστηριότητα του ενζύμου σε ποσοστό 31.50%, ενώ σε συγκέντρωση 20μg/ml επιτυγχάνεται ένα αρκετά μεγάλο ποσοστό αναστολής του ενζύμου και συγκεκριμένα η δραστηριότητά του αναστέλλεται κατά 87.67%. Στην εικόνα 38 φαίνεται η επίδραση του εκχυλίσματος ΑΣ στην δραστηριότητα της ευκαρυωτικής τοποϊσομεράσης I.



1. 1 μg πλασμιδίου – αρνητικός μάρτυρας
2. 1 μg πλασμιδίου + 1.3 units ενζύμου – θετικός μάρτυρας
3. 1 μg πλασμιδίου + 1.3 units ενζύμου + ΑΣ (1 μg/ml)
4. 1 μg πλασμιδίου + 1.3 units ενζύμου + ΑΣ (2.5 μg/ml)
5. 1 μg πλασμιδίου + 1.3 units ενζύμου + ΑΣ (5 μg/ml)
6. 1 μg πλασμιδίου + 1.3 units ενζύμου + ΑΣ (10 μg/ml)
7. 1 μg πλασμιδίου + 1.3 units ενζύμου + ΑΣ (20 μg/ml)

Εικόνα 38: Επίδραση του εκχυλίσματος από την ποικιλία Ασύρτικο Σαντορίνης (ΑΣ 2003) στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I του σίτου.

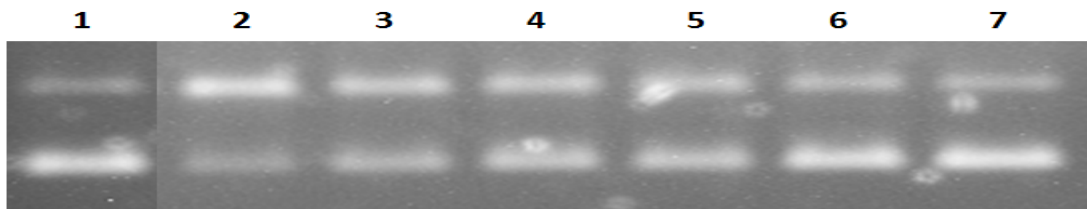
Τα ποσοστά αναστολής της δράσης της Topo I του σίτου από διαφορετικές συγκεντρώσεις εκχυλίσματος ΑΣ 2003 δίνονται στο γράφημα 10. Η τιμή του IC₅₀ εκτιμάται σε 2.8 μg/ml.



Γράφημα 10: Ποσοστά αναστολής της ενεργότητας της ευκαρυωτικής τοποϊσομεράσης I σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος ΑΣ 2003.

Ε) Ασύρτικο Σαντορίνης του 2004 (ΑΣ #2)

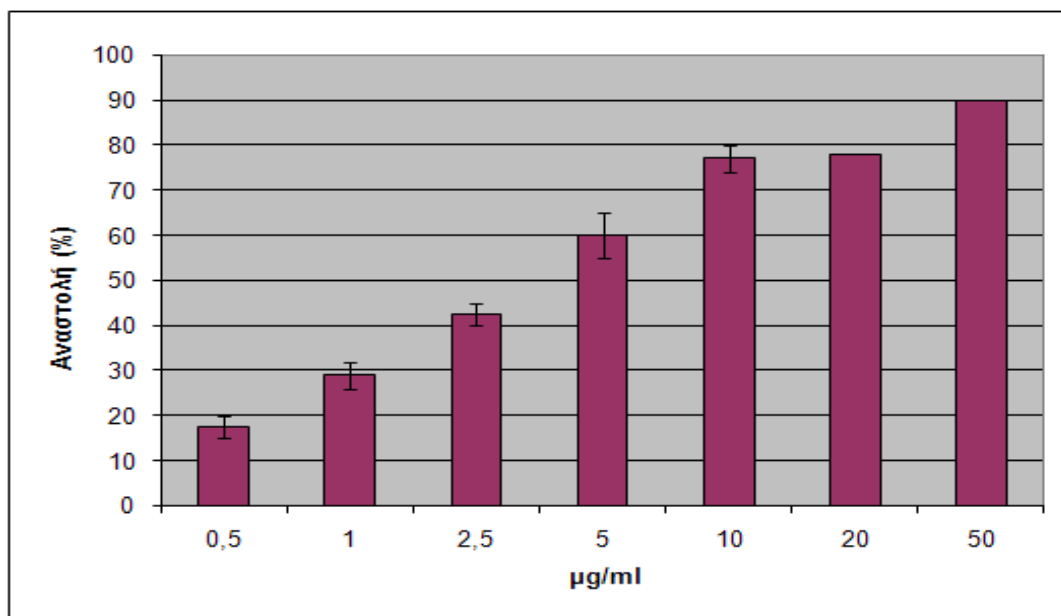
Δοκιμάστηκε στις συγκεντρώσεις 0.5µg/ml, 1µg/ml, 2.5µg/ml, 5µg/ml, 10µg/ml, 20µg/ml και 50µg/ml. Σε συγκέντρωση 0.5µg/ml παρατηρείται αναστολή στη δραστικότητα του ενζύμου σε ποσοστό μόλις 17.5%, ενώ σε συγκέντρωση 50µg/ml επιτυγχάνεται το μέγιστο ποσοστό αναστολής του ενζύμου (90%).



1. 1 µg πλασμιδίου – αρνητικός μάρτυρας
2. 1 µg πλασμιδίου + 1.667 units ενζύμου – θετικός μάρτυρας
3. 1 µg πλασμιδίου + 1.667 units ενζύμου + ΑΣ #2 (1 µg/ml)
4. 1 µg πλασμιδίου + 1.667 units ενζύμου + ΑΣ #2 (2.5 µg/ml)
5. 1 µg πλασμιδίου + 1.667 units ενζύμου + ΑΣ #2 (5 µg/ml)
6. 1 µg πλασμιδίου + 1.667 units ενζύμου + ΑΣ #2 (10 µg/ml)
7. 1 µg πλασμιδίου + 1.667 units ενζύμου + ΑΣ #2 (20 µg/ml)

Εικόνα 39: Επίδραση του εκχυλίσματος από την ποικιλία Ασύρτικο Σαντορίνης (ΑΣ #2) στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I του σίτου.

Τα ποσοστά αναστολής της δράσης της Τορο Ι του σίτου από διαφορετικές συγκεντρώσεις εκχυλίσματος ΑΣ #2 δίνονται στο γράφημα 11. Η τιμή του IC_{50} εκτιμάται σε 3.8 $\mu\text{g/ml}$.



Γράφημα 11: Ποσοστά αναστολής της ενεργότητας της ευκαρυωτικής τοποϊσομεράσης I σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του B8

Συνοψίζοντας, τα 11 αυτά μεγmata πολυφαινολών αναστέλλουν την δραστικότητα του ενζύμου με διαφορετική το κάθε ένα ισχύ. Χρησιμοποιώντας τις τιμές IC_{50} που υπολογίστηκαν με βάση τα ποσοστά αναστολής του ενζύμου σε κάθε συγκέντρωση εκχυλίσματος, είναι δυνατή η εκτίμηση της σχετικής ισχύς του κάθε αναστολέα. Στον πίνακα που ακολουθεί αναγράφονται το χρώμα κάθε ποικιλίας από την οποία προέρχεται κάθε εκχύλισμα και οι τιμές IC_{50} των εκχυλισμάτων αυτών.

Αναστολέας	Χρώμα Ποικιλίας	IC_{50} κατά προσέγγιση ($\mu\text{g/ml}$)
Μπατίκι Τυρνάβου	Λευκό	0.8
Ασύρτικο Σαντορίνης	Λευκό	2.4
Μανδηλαριά Ρόδου	Ερυθρό	5.0
Μανδηλαριά	Ερυθρό	2.0
Ασύρτικο Ρόδου	Λευκό	3.0
Ασύρτικο	Λευκό	6.0
Μαυροτράγανο Σαντορίνης	Ερυθρό	0.8
Βοηδόματο Σαντορίνης	Ερυθρό	1.8
Ασύρτικο Σαντορίνης 2004 (1)	Λευκό	2.0
Ασύρτικο Σαντορίνης 2003	Λευκό	2.8
Ασύρτικο Σαντορίνης 2004 (2)	Λευκό	3.8

Πίνακας 7: Τιμές IC_{50} για τους 11 αναστολείς της τοποϊσομεράσης I του σίτου.

4.Συζήτηση

Τα σταφύλια και το κρασί, που παράγονται και καταναλώνονται παγκοσμίως, έχει βρεθεί ότι έχουν αντιοξειδωτική και χημειοπροστατευτική δράση και αυτό αποδίδεται στις πολυφαινόλες που περιέχουν. Οι πολυφαινόλες αποτελούν σημαντικούς διαιτητικούς παράγοντες οι οποίοι είναι διαδεδομένοι κυρίως στη Μεσογειακή διατροφή. Υπάρχουν εκτενείς αναφορές στη βιβλιογραφία σχετικά με τις ευεργετικές δράσεις των φυτικών αυτών μορίων στον ανθρώπινο οργανισμό.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση 11 εκχυλισμάτων σταφυλιών, που αποτελούν μείγματα πολυφαινολικών ενώσεων, στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I του σίτου. Τα εκχυλίσματα απομονώθηκαν τόσο από σταφύλια, δηλαδή από τους καρπούς του συγκεκριμένου φρούτου, όσο από στέμφυλα, δηλαδή από τα υπολείμματα της οινοποίησης στα οποία περιλαμβάνονται τα ξυλώδη μέρη του φυτού και οι καρποί, αλλά και από βόστρυχους, οι οποίοι αντιπροσωπεύουν αποκλειστικά τα ξυλώδη μέρη του φυτού.

Όλα τα εκχυλίσματα των σταφυλιών που εξετάστηκαν εμφάνισαν αναστολή της τοποϊσομεράσης I του σίτου. Το πιο δραστικό ήταν το εκχύλισμα σταφυλιού Μπατίκι Τυρβάβου και το λιγότερο ισχυρό το εκχύλισμα Μανδηλαριάς Ρόδου με τιμές IC_{50} 0.8 και 5 $\mu\text{g/ml}$, αντίστοιχα. Τα εκχυλίσματα που απομονώθηκαν από στέμφυλα έχουν τιμές IC_{50} 2 $\mu\text{g/ml}$ (Μανδηλαριά), 3 $\mu\text{g/ml}$ (Ασύρτικο Ρόδου) και 6 $\mu\text{g/ml}$ (Ασύρτικο). Τέλος, τα εκχυλίσματα από βόστρυχους έχουν τιμές IC_{50} από 0.8 έως 3.8 $\mu\text{g/ml}$. Το πιο ισχυρό είναι το Μαυροτράγανο Σαντορίνης και το λιγότερο δραστικό το Ασύρτικο Σαντορίνης 2004 (2).

Παρατηρούνται διαφορές στη δραστικότητα μεταξύ των εκχυλισμάτων που πιθανώς να οφείλονται στη διαφορετική χημική τους σύσταση, αφού προέρχονται τόσο από διαφορετικές ποικιλίες, όσο και από διαφορετικά τμήματα του φυτού (σταφύλια, στέμφυλα, βόστρυχοι). Για παράδειγμα, οι πολυφαινόλες trans-ρεσβερατρόλη, ε-βινιφερίνη, αQ3-Ο-γαλακτοσίδη και trans-καφταρικό οξύ εντοπίστηκαν σε μεγάλες συγκεντρώσεις στους βόστρυχους παρά στα εκχυλίσματα που προήλθαν από άλλα τμήματα του φυτού. Παρομοίως, η κερκετίνη βρέθηκε σε αυξημένες συγκεντρώσεις στα στέμφυλα.

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι τα εκχυλίσματα στέμφυλων και βόστρυχων, που αποτελούν τμήματα της αμπέλου μη εκμεταλλεύσιμα για καταναλωτικούς σκοπούς, εμφάνισαν ανασταλτική δράση έναντι της ευκαρυωτικής τοποϊσομεράσης I του σίτου. Ουσιαστικά, τα στέμφυλα και οι βόστρυχοι είναι παραπροϊόντα οινοποίησης. Περίπου το 80% της ποσότητας των σταφυλιών χρησιμοποιείται στην οινοποιία, και αυτό σημαίνει πως το ποσοστό των παραπροϊόντων είναι αρκετά σημαντικό. Ορισμένα από αυτά τα παραπροϊόντα, όπως τα στέμφυλα και οι βόστρυχοι, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως πηγή βιοδραστικών συστατικών με φαρμακευτική και εμπορική αξία.

Υπάρχουν ωστόσο και μελέτες που αναφέρουν πως οι πολυφαινόλες σε ορισμένες περιπτώσεις και υπό ορισμένες συνθήκες, όχι μόνο δεν αποτρέπουν την εκδήλωση ασθενειών στον άνθρωπο, όπως καρδιαγγειακών νοσημάτων, καρκίνου και ηπατοτοξικότητας, αλλά μπορούν ακόμα και να προκαλέσουν την εμφάνισή τους, λειτουργώντας στις περισσότερες περιπτώσεις ως προ-οξειδωτικοί παράγοντες (Halliwell., 2006). Η καλύτερη απάντηση στην άποψη αυτή δίνεται από την βασικότερη αρχή της τοξικολογίας: “Οποιαδήποτε μόριο, τρόφιμο ή γενικά οποιαδήποτε ουσία είναι εν δυνάμει τοξική και αυτό εξαρτάται από τη συγκέντρωσή της”.

Επομένως, όταν οι πολυφαινόλες εντάσσονται στο καθημερινό διαιτολόγιο, είναι πιο πιθανό να ωφελούν τον οργανισμό παρά να τον βλάπτουν. Μάλιστα, είναι προτιμότερο να ακολουθείται μία ισορροπημένη διατροφή πλούσια σε φυτοχημικά μόρια, παρά να καταναλώνονται ορισμένα από αυτά σε συμπληρώματα διατροφής. Ο συνδυασμός διαφορετικών χημειοπροστατευτικών φυτοχημικών παραγόντων, τα οποία βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις στα τρόφιμα, επιφέρει το επιθυμητό βιολογικό αποτέλεσμα μέσω συνεργατικών δράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ των διαφορετικών μορίων και παράλληλα, μειώνει την πιθανότητα εμφάνισης τοξικότητας που θα παρατηρούταν από τη χορήγηση μεμονωμένων μορίων σε υψηλές συγκεντρώσεις. Όταν όμως τα μόρια αυτά χρησιμοποιούνται για θεραπευτικούς σκοπούς, και άρα σε υψηλές συγκεντρώσεις, είναι αναμενόμενο να προκαλέσουν επιπλοκές και παρενέργειες στον οργανισμό εφόσον επιδρούν σε βασικές κυτταρικές λειτουργίες, όπως αναφέρεται και στην ενότητα 1.8.

Η *in vitro* ανασταλτική δράση των εκχυλισμάτων στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I υποστηρίζει ακόμα περισσότερο την χημειοπροστατευτική δράση των πολυφαινολών και μεταφράζεται σε *in vivo* επαγωγή της απόπτωσης, καθώς ενεργοποιείται η ενδογενής “ικανότητα” των τοποϊσομερασών να δρουν ως τοξίνες. Επομένως, στις ποικίλες δράσεις των πολυφαινολικών ενώσεων, που χρησιμοποιήθηκαν ως αναστολείς της ευκαρυωτικής τοποϊσομεράσης, προστίθεται πιθανώς και η αντικαρκινική.

Καθώς ένα από τα βασικότερα χαρακτηριστικά του καρκίνου είναι ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός των κυττάρων, είναι ουσιαστικό μία φαρμακευτική αγωγή να στοχεύει στις τοποϊσομεράσες για τρεις βασικούς λόγους:

1. Όσο πιο υψηλά είναι τα επίπεδα των τοποϊσομερασών στο κύτταρο, τόσο πιο θανατηφόρα για τα κύτταρα είναι τα φάρμακα που στοχεύουν τα ένζυμα αυτά. Οι ταχέως αναπτυσσόμενοι ιστοί συνήθως περιέχουν υψηλότερα επίπεδα τοποϊσομερασών τύπου I και II συγκριτικά με τους βραδέως αναπτυσσόμενους και μάλιστα τα καρκινικά κύτταρα εκφράζουν ακόμα υψηλότερα επίπεδα. Επομένως τα φάρμακα είναι περισσότερο τοξικά στα καρκινικά κύτταρα.
2. Στα καρκινικά κύτταρα εξαιτίας του έντονου πολλαπλασιασμού τους, το σύμπλοκο τοποϊσομεράσης-DNA-φαρμάκου συγκρούεται πιο συχνά με την αντιγραφική

μηχανή με αποτέλεσμα να δημιουργούνται, εκτεταμένα, σπασίματα στο γενετικό υλικό.

3. Συνήθως, τα καρκινικά κύτταρα δεν διαθέτουν τόσο άρτιους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA ή αξιόπιστα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, συγκριτικά με τα φυσιολογικά κάτι το οποίο, επίσης, τα καθιστά περισσότερο ευαίσθητα σε τέτοιους παράγοντες (Deweese et al., 2008).

Για τα 11 μείγματα πολυφαινολών που χρησιμοποιήθηκαν, δεν μπορεί να ειπωθεί με ακρίβεια κατά πόσο κάποιο μεμονωμένο μόριο έπαιξε ρόλο στην ανασταλτική επίδραση των μειγμάτων στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I. Είναι πολύ πιθανό να αναπτύσσονται συνεργατικές σχέσεις μεταξύ των μορίων, οι οποίες οδηγούν στην τελική κατάργηση της δράσης του συγκεκριμένου ενζύμου.

Ωστόσο, είναι σημαντικό πως και τα 11 εκχυλίσματα περιείχαν σε μεγάλο ποσοστό κατεχίνες, είτε ως μονομερή ((+)- κατεχίνη), είτε ως πολυμερή που αναφέρονται ως προανθοκυανιδίνες, είτε εστεροποιημένες με γαλλικό οξύ που αναφέρονται ως επιγαλλοκατεχίνη. Οι κατεχίνες, όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα 1.5.1, ανήκουν στις φλαβονόλες και υπάρχουν διάφορες μελέτες, με διαφορετικά ευρήματα η κάθε μία, που υποστηρίζουν την αντικαρκινική τους δράση. Για παράδειγμα, έχει βρεθεί πως οι κατεχίνες αυξάνουν την έκφραση του γονιδίου BAX και του γονιδίου της κασπάσης 3 (CASP3), τα προϊόντα των οποίων συμμετέχουν ενεργά στην επαγωγή της απόπτωσης. Επίσης, οι κατεχίνες αυξάνουν τα επίπεδα των κινασών MAPK1 (mitogen-activated protein kinase 1) και MAPK2 (mitogen-activated protein kinase 2), οι οποίες είναι ένζυμα που συμμετέχουν στη μεταγωγή σήματος σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες, όπως είναι η διαφοροποίηση. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν πως οι πολυφαινολικές ενώσεις των 11 εκχυλισμάτων ενδεχομένως να μπορούν να αποτελέσουν αντικαρκινικούς παράγοντες σε καλλιέργειες κυττάρων αλλά και σε επίπεδο οργανισμού, καθώς είναι σημαντικό από τη μία πλευρά να αναστέλλεται ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων (δράση στην τοποϊσομεράση I και στα γονίδια BAX και CASP3) και από την άλλη να επάγεται η διαφοροποίηση τους (αλληλεπίδραση με MAPK1 και MAPK2). Ο καρκίνος είναι μία πολύπλοκη ασθένεια στην οποία υπάρχει γενετική ποικιλότητα, όχι μόνο ανάμεσα στις διαφορετικές μορφές στις οποίες εμφανίζεται αλλά και ανάμεσα στα άτομα που εμφανίζουν τον ίδιο τύπο καρκίνου ή ακόμα και ανάμεσα σε κύτταρα που αποτελούν έναν κακοήγη όγκο. Συνεπώς, οι θεραπευτικοί παράγοντες θα έπρεπε να στοχεύουν σε πολλαπλούς και όχι σε μεμονωμένους μοριακούς στόχους και αυτό είναι λογικό καθώς, εφόσον ο καρκίνος κατατάσσεται στα πολυπαραγοντικά νοσήματα, δηλαδή προκύπτει ως αποτέλεσμα πολλών αιτιών και παραγόντων, η αντιμετώπισή του οφείλει να είναι εξίσου πολύπλευρη.

Συνοψίζοντας, είναι προτιμότερο και ίσως ευκολότερο να δίνεται έμφαση και προσοχή στην χημειοπροστατευτική επίδραση διαφόρων φυτοχημικών ενώσεων στον ανθρώπινο οργανισμό και αυτό διότι υπάρχουν δεκάδες ευκαιρίες αναστολής της ανάπτυξης καρκίνου. Σύμφωνα με το πολυσταδιακό μοντέλο, η επαγωγή της καρκινογένεσης και η εμφάνιση πλήρους κακοήθειας απαιτεί την εκπλήρωση τριών διακριτών, αλλά στενά συνδεδεμένων σταδίων τα οποία μπορεί να διαρκέσουν ακόμη και χρόνια.

Βιβλιογραφία

- Τσέκος Ι., Φυσιολογία Φυτών, 2004 Β' έκδοση, Εκδοτικός οίκος Αδελφών Κυριακίδη α.ε.
- Halliwell B, 2001. Free radicals and other reactive species in disease, Encyclopedia of life sciences, pages: 1-7
- Le Marchand L, Murphy SP, Hankin JH, Wilkens LR, Kolonel LN. Intake of flavonoids and lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:154–160.
- Wenzel U, Kuntz S, Brendel MD, Daniel H. Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. *Cancer Res* 2000;60:3823–3831.
- Kuntz S, Wenzel U, Daniel H. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *Eur J Nutr* 1999;38:133–142.
- Tanaka T, Makita H, Kawabata K, Mori H, Kakumoto M, Satoh K, Hara A, Sumida T, Tanaka T, Ogawa H. Chemoprevention of azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis by the naturally occurring flavonoids, diosmin and hesperidin. *Carcinogenesis* 1997;18:957–965.
- Tanaka T, Makita H, Ohnishi M, Mori H, Satoh K, Hara A, Sumida T, Fukutani K, Tanaka T, Ogawa H. Chemoprevention of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced oral carcinogenesis in rats by flavonoids diosmin and hesperidin, each alone and in combination. *Cancer Res* 1997;57:246–252.
- Makita H, Tanaka T, Fujitsuka H, Tatematsu N, Satoh K, Hara A, Mori H. Chemoprevention of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat oral carcinogenesis by the dietary flavonoids chalcone, 2-hydroxychalcone, and quercetin. *Cancer Res* 1996;56:4904–4909.
- Pouget C, Lauthier F, Simon A, Fagnere C, Basly JP, Delage C, Chulia AJ. Flavonoids: Structural requirements for antiproliferative activity on breast cancer cells. *Bioorg Med Chem Lett* 2001;11:3095–3097.
- Senderowicz AM. Flavopiridol: The first cyclin-dependent kinase inhibitor in human clinical trials. *Invest New Drugs* 1999;17:313–320.
- Senderowicz AM. Development of cyclin-dependent kinase modulators as novel therapeutic approaches for hematological malignancies. *Leukemia* 2001;15:1–9.
- Lahiri-Chatterjee M, Katiyar SK, Mohan RR, Agarwal R. A flavonoid antioxidant, silymarin, affords exceptionally high protection against tumor promotion in the SENCAR mouse skin tumorigenesis model. *Cancer Res* 1999;59:622–632.
- Tsyrllov IB, Mikhailenko VM, Gelboin HV. Isozyme- and species-specific susceptibility of cDNA-expressed CYP1A P-450s to different flavonoids. *Biochim Biophys Acta* 1994;1205:325–335.
- Bu-Abbas A, Clifford MN, Walker R, Ioannides C. Contribution of caffeine and flavanols in the induction of hepatic Phase II activities by green tea. *Food Chem Toxicol* 1998;36:617–621.
- Sun XY, Plouzek CA, Henry JP, Wang TT, Phang JM. Increased UDP-glucuronosyltransferase activity and decreased prostate specific antigen production by biochanin A in prostate cancer cells. *Cancer Res* 1998;58:2379–2384.
- Zi X, Feyes DK, Agarwal R. Anticarcinogenic effect of a flavonoid antioxidant, silymarin, in human breast cancer cells MDA-MB 468: Induction of G1 arrest through an increase in Cip1/p21 concomitant with a decrease in kinase activity of cyclin-dependent kinases and associated cyclins. *Clin Cancer Res* 1998;4:1055–1064.
- Choi JA, Kim JY, Lee JY, Kang CM, Kwon HJ, Yoo YD, Kim TW, Lee YS, Lee SJ. Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells by quercetin. *Int J Oncol* 2001;19:837–844.
- Casagrande F, Darbon JM. Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: Regulation of cyclin-dependent kinases CDK2 and CDK1. *Biochem Pharmacol* 2001;61:1205–1215.
- Takahashi T, Kobori M, Shinmoto H, Tsushida T. Structure-activity relationships of flavonoids and the induction of granulocytic- or monocytic-differentiation in HL60 human myeloid leukemia cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 1998;62:2199–2204.
- Tosetti F, Ferrari N, De Flora S, Albini A. Angioprevention: Angiogenesis is a common and key target for cancer chemopreventive agents. *FASEB J* 2002;16:2–14.
- Fotsis T, Pepper MS, Montesano R, Aktas E, Breit S, Schweigerer L, Rasku S, Wahala K, Adlercreutz H. Phytoestrogens and inhibition of angiogenesis. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1998;12:649–666.
- Wenying Ren, Zhenhua Qiao, Honwei Wang, Lei Zhu, Li Zhang., Flavonoids: Promising Anticancer Agents., *Medicinal Research Reviews*, Vol. 23, No. 4, 519-534, 2003
- Halliwell B., Dietary polyphenols: Good, bad or indifferent for your health? Department of Biochemistry, Yong Loo Lin School of Medicine, National University of Singapore, 8 Medical Drive, MD7 Level 2, 117597 Singapore, Singapore.
- Halliwell B., *Biochemistry of oxidative stress* (2007) (A)

- Halliwell B., Oxidative stress and cancer: have we moved forward? , *Biochem. J* (2007) 401, 1-11 (B)
- En-Qin Xia, Gui-Fang Deng, Ya-Jun Guo , Hua-Bin Li, Biological Activities of Polyphenols from Grapes, *Int. J. Mol. Sci.* 2010, *11*, 622-646; doi:10.3390/ijms11020622
- Chacona, M.R.; Ceperuelo-Mallafrea, V.; Maymo-Masipa, E.; Mateo-Sanzb, J.M.; Arolac, L.; Guitierrez, C.; Fernandez-Reald, J.M.; Ardevolc, A.; Simona, I.; Vendrella, J. Grape-seed procyanidins modulate inflammation on human differentiated adipocytes *in vitro*. *Cytokine* 2009.
- Tsanga, C.; Higginsa, S.; Duthiea, G.G.; Duthiea, S.J.; Howiea, M.; Mullena, W.; Leana, M.E.J.; Crozier, A. The influence of moderate red wine consumption on antioxidant status and indices of oxidative stress associated with CHD in healthy volunteers. *Br. J. Nutr.* 2005, *93*, 233–240.
- Pastrana-Bonilla, E.; Akoh, C.C.; Sellappan, S.; Krewer, G. Phenolic content and antioxidant capacity of muscadine grapes. *J. Agric. Food Chem.* 2003, *51*, 5497–4503.
- Brand-williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci. Technol.* 1995, *28*, 25–30.
- Cano, A.; Hernandez-Ruiz, J.; Garcia-Canovas, F.; Acosta, M.; Arnao, M.B. An end-point method for estimation of the total antioxidant activity in plant material. *Phytochem. Anal.* 1998, *9*, 196–202.
- de Ruiter, N.; Ottenwalder, O.; Muliawan, H.; Kappus, H. Lipid peroxidation in isolated rat hepatocytes measured by ethane and n-pentane formation. *Arch. Toxicol.* 1982, *49*, 265–273.
- Luther, M.; Parry, J.; Moore, J.; Meng, J.H.; Zhang, Y.F.; Cheng, Z.H.; Yu, L. Inhibitory effect of chardonnay and black raspberry seed extracts on lipid oxidation in fish oil and their radical scavenging and antimicrobial properties. *Food Chem.* 2007, *104*, 1065–1073.
- Castilla, P.; Echarri, R.; Davalos, A.; Cerrato, F.; Ortega, H.; Teruel, J.L.; Lucas, M.F.; Gomez-Coronado, D.; Ortuno, J.; Lasuncion, M.A. Concentrated red grape juice exerts antioxidant, hypolipidemic, and anti-inflammatory effects in both hemodialysis patients and healthy subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 2006, *84*, 252–262.
- Terra, X.; Montagut, G.; Bustos, M.; Llopiz, N.; Ardevol, A.; Blade, C.; Fernandez-Larrea, J.; Pujadas, G.; Salvado, J.; Arola, L. Grape-seed procyanidins prevent low-grade inflammation by modulating cytokine expression in rats fed a high-fat diet. *J. Nutr. Biochem.* 2009, *20*, 210–218.
- Bralley, E.E.; Hargrove, J.L.; Greenspan, P.; Hartle, D.K. Topical anti-inflammatory activities of vitis rotundifolia (*Muscadine Grape*) extracts in the tetradecanoylphorbol acetate model of ear inflammation. *J. Med. Food.* 2007, *10*, 636–642.
- Li, W.G.; Zhang, X.Y.; Wu, Y.J.; Tian, X. Anti-inflammatory effect and mechanism of proanthocyanidins from grape seeds. *Acta Pharmacol. Sin.* 2001, *22*, 1117–1120.
- Rodriguez-Vaquero, M.J.; Alberto, M.R.; Manca-de-Nadra, M.C. Influence of phenolic compounds from wines on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Control.* 2007, *18*, 587–593.
- Papadopoulou, C.; Soulti, K.; Roussis, I.G. Potential antimicrobial activity of red and white wine phenolic extracts against strains of *Taphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. *Food Technol. Biotechnol.* 2005, *43*, 41–46.
- Sivarooban, T.; Hettiarachchy, N.S.; Johnson, M.G. Physical and antimicrobial properties of grape seed extract, nisin, and EDTA incorporated soy protein edible films. *Food Res. Int.* 2008, *41*, 781–785.
- Yigit, D.; Yigit, N.; Mavi, A.; Yildirim, A.; Guleryuz, M. Antioxidant and antimicrobial activities of methanol and water extracts of fruits, leaves and seeds of *Vitis vinifera* L. cv. Karaerik. *Asian J. Chem.* 2009, *21*, 183–194.
- Tagurt, T.; Tanaka, T.; Kouno, I. Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. *Biol. Pharm. Bull.* 2004, *27*, 1965–1969.
- D'Archivio Massimo, Carmela Filesi, Roberta Di Benedetto, Raffaella Gargiulo, Claudio Giovannini, Roberta Masella, Polyphenols, dietary sources and bioavailability, *Ann Ist Super Sanità* 2007 | Vol. 43, No. 4: 348-361
- Harborne JB, Williams CA. Advances in flavonoid research since. *Phytochemistry* 2000;55:481-504.
- Cortell JM, Kennedy JA. Effect of shading on accumulation of flavonoid compounds in (*Vitis vinifera* L.) pinot noir fruit and extraction in a model system. *J Agric Food Chem* 2006;54:8510-20.
- Reinli K, Block G. Phytoestrogen content of foods. A compendium of literature values. *Nutr Cancer* 1996;26:123-48.
- Eisen B, Ungar Y, Shimoni E. Stability of isoflavones in soy milk stored at elevated and ambient temperatures. *J Agric Food Chem* 2003;51:2212-5.
- Es-Safi NE, Cheynier V, Moutounet M. Interactions between cyanidin 3-O-glucoside and furfural derivatives and their impact on food color changes. *J Agric Food Chem* 2002;50:5586-95.
- Brouillard R, George F, Fougereusse A. Polyphenols produced during red wine ageing. *Biofactors* 1997;6:403-10.
- Cabrini L, Barzanti V, Cipollone M, Fiorentini D, Grossi G, Tolomelli B, Zamboni L, Landi L. Antioxidants and total peroxyl radical-trapping ability of olive and seed oils. *J Agric Food Chem* 2001;49:6026-32.
- Sosulski F, Krygier K, Hogge L. Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. Composition of phenolic acids in cereal and potato flours. *J Agric Food Chem* 1982;30:337-40.

- Lempereur I, Rouau X, Abecassis J. Genetic and agronomic variation in arabinoxylan and ferulic acid contents of durumwheat (*Triticum durum* L.) grain and its milling fractions. *J Cereal Sci* 1997;25:103-10.
- Boskou D. Olive oil. *World Rev Nutr Diet* 2000;87:56-77.
- Delmas D, Lancon A, Colin D, Jannin B, Latruffe N. Resveratrol as a chemopreventive agent: a promising molecule for fighting cancer. *Curr Drug Targets* 2006;7:423-42.
- Bavaresco L. Role of viticultural factors on stilbene concentrations of grapes and wine. *Drugs Exp Clin Res* 2003;29:181-7.
- Bertelli A, Bertelli AA, Gozzini A, Giovannini L. Plasma and tissue resveratrol concentrations and pharmacological activity. *Drugs Exp Clin Res* 1998;24:133-8.
- Bhat KP, Pezzuto JM. Cancer chemopreventive activity of resveratrol. *Ann N Y Acad Sci* 2002;957:210-29.
- Heinonen S, Nurmi T, Liukkonen K, Poutanen K, Wahala K, Deyama T, Nishibe S, Adlercreutz H. *In vitro* metabolism of plant lignans: new precursors of mammalian lignans enterolactone and enterodiol. *J Agric Food Chem* 2001;49:3178-86.
- Crespy V, Morand C, Besson C, Manach C, Demigne C, Remesy C. Quercetin, but not its glycosides, is absorbed from the rat stomach. *J Agric Food Chem* 2002;50:618-21.
- Piskula MK, Yamakoshi J, Iwai Y. Daidzein and genistein but not their glucosides are absorbed from the rat stomach. *FEBS Lett* 1999;447:287-91.
- Matuschek MC, Hendriks WH, McGhie TK, Reynolds GW. The jejunum is the main site of absorption for anthocyanins in mice. *J Nutr Biochem* 2006;17:31-6.
- Day AJ, DuPont MS, Ridley S, Rhodes M, Rhodes MJ, Morgan MR, Williamson G. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity. *FEBS Lett* 1998;436:71-5.
- Nemeth K, Plumb GW, Berrin JG, Juge N, Jacob R, Naim HY, Williamson G, Swallow DM, Kroon PA. Deglycosylation by small intestinal epithelial cell beta-glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *Eur J Nutr* 2003;42:29-42.
- Halliwell B, Zhao K, Whiteman M. The gastrointestinal tract: a major site of antioxidant action? *Free Radic Res* 2000;33:819-30.
- Olthof MR, Hollman PC, Katan MB. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J Nutr* 2001;131:66-71.
- Gonthier MP, Verny MA, Besson C, Remesy C, Scalbert A. Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats. *J Nutr* 2003;133:1853-9.
- Piskula MK, Terao J. Accumulation of (-)-epicatechin metabolites in rat plasma after oral administration and distribution of conjugation enzymes in rat tissues. *J Nutr* 1998;128:1172-8.
- Tilgmann C, Ulmanen I. Purification methods of mammalian catechol-O-methyltransferases. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1996;684:147-61.
- Falany CN. Enzymology of human cytosolic sulfotransferases. *Faseb J* 1997;11:206-16.
- Spencer JP, Chowrimootoo G, Choudhury R, Debnam ES, Srari SK, Rice-Evans C. The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids. *FEBS Lett* 1999; 458:224-30.
- Augustin Scalbert, Gary Williamson, (2000) Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols
- Aziz, A. A., Edwards, C. A., Lean, M.E.J. & Crozier, A. (1998) Absorption and excretion of conjugated flavonols, including quercetin-4-O-b-glucoside and isorhamnetin-4-O-b-glucoside by human volunteers after the consumption of onions. *Free Radic. Res.* 29: 257-269.
- Clifford, M. N. (1999) Chlorogenic acids and other cinnamates: nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food. Agric.* 79: 362-372.
- Harborne, J. B., Ed. (1994) *The Flavonoids: Advances in Research since 1986*. Chapman & Hall, London, U.K.
- Hollman, P.C.H., van der Gaag, M., Mengelers, M.J.B., van Trijp, J.M.P., de Vries, J. H. & Katan, M. B. (1996) Absorption and disposition kinetics of the dietary antioxidant quercetin in man. *Free Radic. Biol. Med.* 21: 703-707.
- Kivits, G.A.A., van der Sman, F.J.P. & Tijburg, L.B.M. (1997) Analysis of catechins from green and black tea in humans: a specific and sensitive colorimetric assay of total catechins in biological fluids. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 48: 387-392.
- Kroon, P. A., Faulds, C. B., Ryden, P., Robertson, J. A. & Williamson, G. (1997) Release of covalently bound ferulic acid from fiber in the human colon. *J. Agric. Food Chem.* 45: 661-667.
- Joseph E. Dewese, Michael A. Osheroff, Neil Osheroff, DNA Topology and Topoisomerases: Teaching a "Knotty" Subject, *Biochem Mol Biol Educ.* 2008 ; 37(1): 2-10. doi:10.1002/bmb.20244.
- Fortune JM, Osheroff N. Topoisomerase II as a target for anticancer drugs: when enzymes stop being nice. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol* 2000;64:221-253. [PubMed: 10697411]
- Leppard JB, Champoux JJ. Human DNA topoisomerase I: relaxation, roles, and damage control. *Chromosoma* 2005;114:75-85. [PubMed: 15830206]
- McClendon AK, Osheroff N. DNA topoisomerase II, genotoxicity, and cancer. *Mutat. Res* 2007;623:83-97. [PubMed: 17681352]

- Pommier Y. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat. Rev. Cancer* 2006;6:789–802. [PubMed: 16990856].
- Bender, RP.; Osheroff, N. DNA topoisomerases as targets for the chemotherapeutic treatment of cancer. In: Dai, W., editor. *Checkpoint Responses in Cancer Therapy*. New Jersey: Humana Press, Totowa; 2008. p. 57-91.
- Yves Pommier, DNA Topoisomerase I Inhibitors: Chemistry, Biology and Interfacial Inhibition, *Chem Rev.* 2009 July ; 109(7): 2894–2902. doi:10.1021/cr900097c.
- 25. Wall ME, Wani MC, Cooke CE, Palmer KH, McPhail AT, Slim GA. *J Am Chem Soc* 1966;88:3888–3890.
- Wall ME, Wani MC. *Cancer Res* 1995;55:753–760. [PubMed: 7850785]
- Hsiang YH, Hertzberg R, Hecht S, Liu LF. *J Biol Chem* 1985;260:14873–8. [PubMed: 2997227]
- Dexheimer TS, Pommier Y. *Nat Protoc* 2008;3:1736–50. [PubMed: 18927559]
- Hsiang YH, Liu LF, Wall ME, Wani MC, Nicholas AW, Manikumar G, Kirschenbaum S, Silber R, Potmesil M. *Cancer Res* 1989;49:4385–4389. [PubMed: 2545341]
- Eng WK, Faucette L, Johnson RK, Sternglanz R. *Mol Pharmacol* 1988;34:755–760. [PubMed:2849043]
- Nitiss J, Wang JC. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:7501–7505. [PubMed:2845409]
- Bjornsti MA, Benedetti P, Viglianti GA, Wang JC. *Cancer Res* 1989;49:6318–6323. [PubMed:2553253]
- Pommier Y, Pourquier P, Urasaki Y, Wu J, Laco G. *Drug Resist Updat* 1999;2:307–318. [PubMed:11504505]
- Teicher BA. *Biochem Pharmacol* 2008;75:1262–1271. [PubMed: 18061144].
- Antony S, Agama KK, Miao ZH, Takagi K, Wright MH, Robles AI, Varticovski L, Nagarajan M, Morrell A, Cushman M, Pommier Y. *Cancer Res* 2007;67:10397–405. [PubMed: 17974983]
- Stacie J. Froelich-Ammons, Neil Osheroff, *Topoisomerase Poisons: Harnessing the Dark Side of Enzyme Mechanism* (1995).
- Nicole M. Baker, Rakhi Rajan, Alfonso Mondragon, *Structural studies of type I topoisomerases*, *Nucleic Acids Research*, 2009, Vol. 37, No. 3 693–701
- Champoux, J.J. (2001) DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.*, 70, 369–413.
- Corbett, K.D. and Berger, J.M. (2004) Structure, molecular mechanisms, and evolutionary relationships in DNA topoisomerases. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 33, 95–118.
- Domanico, P.L. and Tse-Dinh, Y.C. (1991) Mechanistic studies on E. coli DNA topoisomerase I: divalent ion effects. *J. Inorg. Biochem.*, 42, 87–96.
- Kirkegaard, K. and Wang, J.C. (1985) Bacterial DNA topoisomerase I can relax positively supercoiled DNA containing a single stranded loop. *J. Mol. Biol.*, 185, 625–637.
- Cheng, C., Kussie, P., Pavletich, N. and Shuman, S. (1998) Conservation of structure and mechanism between eukaryotic topoisomerase I and site-specific recombinases. *Cell*, 92, 841–850.
- Redinbo, M.R., Stewart, L., Kuhn, P., Champoux, J.J. and Hol, W.G. (1998) Crystal structures of human topoisomerase I in covalent and noncovalent complexes with DNA. *Science*, 279, 1504–1513.
- Stewart, L., Ireton, G.C. and Champoux, J.J. (1996) The domain organization of human topoisomerase I. *J. Biol. Chem.*, 271, 7602–7608.
- Koster, D.A., Croquette, V., Dekker, C., Shuman, S., Dekker, N.H. (2005) Friction and torque govern the relaxation of DNA supercoils by eukaryotic topoisomerase I. *Nature*, 434, 671–674.
- Koster, D.A., Palle, K., Bot, E.S., Bjornsti, M.A. and Dekker, N.H. (2007) Antitumor drugs impede DNA uncoiling by topoisomerase I. *Nature*, 448, 213–217.
- Patrick Forterre, Danie le Gadelle, *Phylogenomics of DNA topoisomerases: their origin and putative roles in the emergence of modern organisms*, *Nucleic Acids Research*, 2009, Vol. 37, No. 3 679–692
- Constantinou Andreas, Rajendra Mehta, Constance Runyan, Kandala Rao, Andrew Vaughan, Richard Moon, *FLAVONOIDS AS TOPOISOMERASE ANTAGONISTS AND POISONS: STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIPS*, (1995)
- Nitiss John L., Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy, *Nat Rev Cancer*. 2009 May ; 9(5): 338–350. doi:10.1038/nrc2607.
- Cummings J., Smyth J. F., DNA topoisomerase I and II as targets for rational design of new anticancer drugs, *Annals of Oncology* 4: 533-543, 1993
- Wang J. C., (2002), Cellular roles of DNA Topoisomerases: a molecular perspective, *Nature Publishing*, 3: 430-440
- 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
- Wang J. C., (1996), DNA Topoisomerases, *Annual Reviews of Biochemistry*, 65: 635-92
- Tsao Anne S., Kim Edward S., Waun Ki Hong, Chemoprevention of Cancer, *CA Cancer J Clin* 2004;54:150–180
- Stryer., *Biochemistry*, (2004)
- Lewin., *Genes VIII*, (2004)

- Lima, C.D., Wang, J.C. and Mondragon, A. (1994) Three-dimensional structure of the 67K N-terminal fragment of E. coli DNA topoisomerase I. *Nature*, 367, 138–146.
- MONIKA TSAI-PFLUGFELDER, LEROY F. LIUD, ANGELA A. LIUT, KATHLEEN M. TEWEY, JACQUELINE WHANG-PENG, TURID KNUTSEN, KAY HUEBNER, CARLO M. CROCE, AND JAMES C. WANG, Cloning and sequencing of cDNA encoding human DNA topoisomerase II and localization of the gene to chromosome region 17q21-22, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 85, pp. 7177-7181, October 1988
- Bugreev D. V., Nevinsky G. A., Structure and Mechanism of Action of Type IA DNA Topoisomerases, *published in Uspekhi Biologicheskoi Khimii*, 2009, Vol. 49, pp. 129-158.
- Corbett, A. H., and Osheroff, N. (1993) *Chem. Res. Toxicol.* 6, 585–597
- Chen, A. Y., and Liu, L. F. (1994) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 34, 191–218
- Liu, L. F. (ed) (1994) *Adv. Pharmacol.* 29
- Madden, K. R., and Champoux, J. J. (1992) *Cancer Res.* 52, 525–532
- Nitiss, J. L., Liu, Y. X., Harbury, P., Jannatipour, M., Wasserman, R., and Wang, J. C. (1992) *Cancer Res.* 52, 4467–4472
- Ishida, R., Hamatake, M., Wasserman, R. A., Nitiss, J. L., Wang, J. C., and Andoh, T. (1995) *Cancer Res.* 55, 2299–2303
- Froelich-Ammon, S. J., Patchan, M. W., Osheroff, N., and Thompson, R. B. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 14998–15005
- Corbett, A. H., Hong, D., and Osheroff, N. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 14394–14398
- Nitiss, J., and Wang, J. C. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 7501–7505
- Nitiss, J. L., Liu, Y. X., and Hsiung, Y. (1993) *Cancer Res.* 53, 89–93
- Hertzberg, R. P., Caranfa, M. J., and Hecht, S. M. (1989) *Biochemistry* 28, 4629–4638
- Nabiev, I., Chourpa, I., Riou, J.-F., Nguyen, C. H., Lavelle, F., and Manfait, M. (1994) *Biochemistry* 33, 9013–9023
- Osheroff, N., Corbett, A. H., Elsea, S. H., and Westergaard, M. (1994) *Cancer Chemother. Pharmacol.* 34, S19–S25
- Wenying Ren, Zhenhua Qiao, Hongwei Wang, Lei Zhu, Li Zhang, Flavonoids: Promising Anticancer Agents, *Medicinal Research Reviews*, Vol. 23, No. 4, 519–534, 2003
- Mehta Rajendra G., Genoveva Murillo., Rajesh Naithani., Xinjian Peng., Cancer Chemoprevention by Natural Products: How Far Have We Come? *Pharm Res* (2010) 27:950–961.
- www.wikipedia.com