



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Διπλωματική Εργασία

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

*Effects of grape (Vitis vinifera) extracts on the catalytic activity of wheat  
germ topoisomerase I*

Ματσαρόκη Άννα

**Επιβλέπουσα :** Λιαδάκη Καλλιόπη

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

Λάρισα 2012

<b>Τριμελής εξεταστική επιτροπή</b>	<b>Υπογραφή παραλαβής</b>
Λιαδάκη Καλλιόπη, Λέκτορας Βιοχημικής Φαρμακολογίας	
Κουρέτας Δημήτριος, Καθηγητής Φυσιολογίας Ζώων	
Στάγκος Δημήτριος, Λέκτορας Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών	

### **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.

Μέλη τριμελούς επιτροπής:

Λιαδάκη Καλλιόπη, Λέκτορας Βιοχημικής Φαρμακολογίας

Κουρέτας Δημήτριος, Καθηγητής Φυσιολογίας Ζώων

Στάγκος Δημήτριος, Λέκτορας Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών

### **Ευχαριστίες**

Θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω την κ. 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 μεταπτυχιακών φοιτητών που πραγματοποίησαν τη διπλωματική τους εργασία παράλληλα με εμένα, για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας.

## Περιεχόμενα

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	10
<b><u>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</u></b>	11
1.1 Τοπολογία του DNA	11
1.2 DNA τοποϊσομεράσες	12
1.3 Δομή των τοποϊσομερασών	15
1.3.1 Τοποϊσομεράσες τύπου IA	15
1.3.2 Τοποϊσομεράσες τύπου IB	16
1.3.3 Τοποϊσομεράσες τύπου II	17
1.4 Μηχανισμός δράσης τοποϊσομερασών	18
1.4.1 Τοποϊσομεράσες τύπου I	18
1.4.2 Τοποϊσομεράσες τύπου II	22
1.5 Βιολογικές δράσεις τοποϊσομερασών	24
1.5.1 Αντιγραφή	24
1.5.2 Μεταγραφή	25
1.5.3 Ανασυνδυασμός του DNA	26
1.5.4 Δομή και συμπύκνωση χρωμοσωμάτων	26
1.6 Τοποϊσομεράσες και καρκίνος	26
1.7 Αναστολείς τοποϊσομερασών	27
1.7.1 Αναστολείς δηλητήρια (poisons) των τοποϊσομερασών I	28
1.7.2 Καταλυτικοί αναστολείς (suppressors) των τοποϊσομερασών I	31
1.7.3 Αναστολείς δηλητήρια (poisons) των τοποϊσομερασών II	31
1.7.4 Καταλυτικοί αναστολείς (suppressors) των τοποϊσομερασών II	32
1.8 Πολυσταδιακό μοντέλο καρκινογένεσης	33
1.9 Χημειοπροφύλαξη	34
1.9.1 Πολυφαινόλες ως χημειοπροφυλακτικοί παράγοντες	35
1.9.1.1 Πρόληψη μεταβολικής ενεργοποίησης καρκινογόνων	35
1.9.1.2 Αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού	36
1.9.1.3 Διακοπή του κυτταρικού κύκλου	37
1.9.1.4 Επαγωγή της απόπτωσης	38
1.9.1.5 Προαγωγή της κυτταρικής διαφοροποίησης	38
1.9.1.6 Αντιοξειδωτική δράση	38
1.9.1.7 Αναστολή της αγγειογενετικής διαδικασίας	39
1.9.1.8 Ρύθμιση της πολυφαρμακευτικής αντοχής	39
1.10 Πολυφαινόλες ως αναστολείς τοποϊσομερασών	40
1.11 Πολυφαινόλες	41
1.11.1 Φλαβονοειδή	42
1.11.1.1 Φλαβονόλες	43
1.11.1.2 Φλαβόνες	43
1.11.1.3 Φλαβανόνες	44
1.11.1.4 Ισοφλαβονοειδή	44
1.11.1.5 Ανθοκυανίνες	45
1.11.1.6 Φλαβανόλες	46
1.11.2 Φαινολικά οξέα	47
1.11.3 Φαινολικές αλκοόλες	48
1.11.4 Στιλβένια	49
1.11.5 Λιγνάνες	50
1.12 Πολυφαινόλες στην ανθρώπινη διατροφή	50
1.12.1 Απορρόφηση, μεταβολισμός και βιοδιαθεσιμότητα πολυφαινολών	52

1.13	Φαρμακολογικές δράσεις πολυφαινολών	53
1.13.1	Αντιοξειδωτική δράση	53
1.13.2	Καρδιοπροστατευτική δράση	53
1.13.3	Ηπατοπροστατευτική δράση	54
1.13.4	Αντικαρκινική δράση	54
1.13.5	Αντιμικροβιακή και αντι-ική δράση	55
1.13.6	Προστασία του κεντρικού νευρικού συστήματος	55
1.13.7	Δράση σε οιστρογονικούς υποδοχείς	56
1.13.8	Αντιαγγειογενετική δράση	56
1.14	Σκοπός	57
1.15	Vitis vinifera	58
<b>2.</b>	<b><u>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</u></b>	60
2.1	ΥΛΙΚΑ	60
2.1.1	Εκχυλίσματα	60
2.1.1.1	Εκχυλίσματα βοστρύχων	60
2.1.1.2	Εκχυλίσματα γιγάρτων	61
2.1.2	Χημικά αντιδραστήρια	61
2.1.3	Αντιδραστήρια απομόνωσης πλασμιδιακού DNA	62
2.1.4	Αντιδραστήρια για τη δοκιμή χαλάρωσης πλασμιδιακού DNA από την τοποϊσομεράση I (wheat germ Topoisomerase I plasmid relaxation assay)	62
2.2	ΜΕΘΟΔΟΙ	63
2.2.1	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA	63
2.2.2	Αρχή της μεθόδου δοκιμής χαλάρωσης πλασμιδιακής διαμόρφωσης παρουσία τοποϊσομεράσης I (Wheat germ Topoisomerase I plasmid relaxation assay)	65
2.2.3	Δοκιμή χαλάρωσης πλασμιδιακής διαμόρφωσης παρουσία τοποϊσομεράσης I (Wheat germ Topoisomerase I plasmid relaxation assay)	66
2.2.4	Υπολογισμοί	67
<b>3.</b>	<b><u>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</u></b>	69
3.1	Αναστολή της ενεργότητας της τοποϊσομεράσης I από εκχυλίσματα βοστρύχων	69
3.2	Αναστολή της ενεργότητας της τοποϊσομεράσης I από εκχυλίσματα γιγάρτων	74
<b>4.</b>	<b><u>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</u></b>	79
	<b><u>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u></b>	82

## Περιεχόμενα εικόνων

<u>Εικόνα 1</u> : Κρυσταλλική δομή της <i>E. coli</i> τοποϊσομεράσης I	16
<u>Εικόνα 2</u> : Κρυσταλλική δομή της τοποϊσομεράσης τύπου IB	17
<u>Εικόνα 3</u> : Κρυσταλλική δομή της τοποϊσομεράσης τύπου II	18
<u>Εικόνα 4</u> : Διάσπαση και επανασύνδεση του DNA μέσω μετεστεροποίησης	20
<u>Εικόνα 5</u> : Μηχανισμός δράσης της τοποϊσομεράσης τύπου IA	21
<u>Εικόνα 6</u> : Μηχανισμός δράσης της τοποϊσομεράσης τύπου IB	22
<u>Εικόνα 7</u> : Μηχανισμός δράσης της τοποϊσομεράσης τύπου II	23
<u>Εικόνα 8</u> : Δράσεις τοποϊσομερασών κατά την αντιγραφή	25
<u>Εικόνα 9</u> : Μηχανισμός κυτταροτοξικότητας αναστολέων των τοποϊσομερασών I και II	27
<u>Εικόνα 10</u> : Τρόποι σχηματισμού του συμπλόκου τοποϊσομεράσης-DNA-αναστολέα	28
<u>Εικόνα 11</u> : Σύνδεση της CPT στο σύμπλοκο τοποϊσομεράσης I-DNA	29
<u>Εικόνα 12</u> : Ισορροπία μεταξύ της ενεργής και της ανενεργής μορφής της CPT	30
<u>Εικόνα 13</u> : Χημικές δομές της καμπτοθεκίνης και των αναλόγων της	30
<u>Εικόνα 14</u> : Χημικές δομές μη καμπτοθεκινικών παραγώγων	31
<u>Εικόνα 15</u> : Χημικές δομές αναστολών δηλητήρια των τοποϊσομερασών II	32
<u>Εικόνα 16</u> : Χημικές δομές καταλυτικών αναστολέων τοποϊσομερασών II	32
<u>Εικόνα 17</u> : Πολυσταδιακό μοντέλο καρκίνου	34
<u>Εικόνα 18</u> : Αναστολή της πολυφαρμακευτικής αντοχής που οφείλεται στην P-γλυκοπρωτεΐνη	40
<u>Εικόνα 19</u> : Χημική δομή φλαβονοειδών	42
<u>Εικόνα 20</u> : Χημική δομή κερκετίνης	43
<u>Εικόνα 21</u> : Χημική δομή απιγενίνης	44
<u>Εικόνα 22</u> : Χημική δομή ναριγενίνης	44
<u>Εικόνα 23</u> : Χημική δομή ντεϊζείνης	45
<u>Εικόνα 24</u> : Χημική δομή κυανιδίνης	46
<u>Εικόνα 25</u> : Χημική δομή κατεχίνης	47
<u>Εικόνα 26</u> : Χημική δομή της προανθοκυανιδίνης	47
<u>Εικόνα 27</u> : Χημική δομή υδροξυβενζοϊκών οξέων και χημική δομή υδροξυκιναμικών οξέων	48
<u>Εικόνα 28</u> : Χημική δομή φαινολικών αλκοολών	49

<u>Εικόνα 29</u> : Χημική δομή trans-ρεσβερατρόλης	49
<u>Εικόνα 30</u> : Χημική δομή της σεκοϊσολαρισιρεσινόλης	50
<u>Εικόνα 31</u> : Τομή καρπού σταφυλιού	59
<u>Εικόνα 32</u> : Διαμορφώσεις του πλασμιδιακού DNA κατά την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης	65
<u>Εικόνα 33</u> : Επίδραση του εκχυλίσματος βοστρύχων από το Ασύρτικο 2010 (ΑΣΥ) στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I του σίτου	69
<u>Εικόνα 34</u> : Επίδραση του εκχυλίσματος βοστρύχων από το Μοσχάτο Αμβούργου (ΜΟΣ) στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I του σίτου	71
<u>Εικόνα 35</u> : Επίδραση του εκχυλίσματος βοστρύχων από το Μαυροτράγανο Σαντορίνης (ΜΑΥ) στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I του σίτου	72
<u>Εικόνα 36</u> : Επίδραση του εκχυλίσματος βοστρύχων από το Vinsanto (BIN) στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I του σίτου	73
<u>Εικόνα 37</u> : Επίδραση του εκχυλίσματος γιγάρτων από Ασύρτικο 2010 (ΑΣΥ) στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I του σίτου	74
<u>Εικόνα 38</u> : Επίδραση του εκχυλίσματος γιγάρτων από το Ξινόμαυρο (ΞΙΝ) στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I του σίτου	76
<u>Εικόνα 39</u> : Επίδραση του εκχυλίσματος γιγάρτων από Ρομπόλα (ΡΟΜ) στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I του σίτου	77

## **Περιεγόμενα πινάκων**

<u>Πίνακας 1</u> : Υποοικογένειες των DNA τοποϊσομερασών	13
<u>Πίνακας 2</u> : Παράγωγα της CPT και μη καμπθοθεκινικά παράγωγα	31
<u>Πίνακας 3</u> : Φλαβονοειδή με προστατευτική δράση σε καρκινώματα και καρκινικές κυτταρικές σειρές	36
<u>Πίνακας 4</u> : Υποοικογένειες φλαβονοειδών με τα αντιπροσωπευτικά μέλη τους και τις κύριες διατροφικές πηγές πρόσληψής τους	43
<u>Πίνακας 5</u> : Πολυφαινολικό περιεχόμενο διαφόρων φυτικών τροφών και ποτών	51
<u>Πίνακας 6</u> : Συστηματική κατάταξη της αμπέλου	58
<u>Πίνακας 7</u> : Σύσταση εκχυλισμάτων που απομονώθηκαν από τους βοστρύχους των σταφυλιών	60
<u>Πίνακας 8</u> : Σύσταση εκχυλισμάτων που απομονώθηκαν από τα γίγαρτα των σταφυλιών	61

### **Περιεγόμενα γραφημάτων**

<u>Γράφημα 1:</u> Αναστολή της ενεργότητας της ευκαρυωτικής τοποϊσομεράσης I του σίτου από αυξανόμενες συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος βοστρύχων ΑΣΥ	70
<u>Γράφημα 2:</u> Αναστολή της ενεργότητας της ευκαρυωτικής τοποϊσομεράσης I του σίτου από αυξανόμενες συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος βοστρύχων ΜΟΣ	71
<u>Γράφημα 3:</u> Αναστολή της ενεργότητας της ευκαρυωτικής τοποϊσομεράσης I του σίτου από αυξανόμενες συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος βοστρύχων ΜΑΥ	72
<u>Γράφημα 4:</u> Αναστολή της ενεργότητας της ευκαρυωτικής τοποϊσομεράσης I του σίτου από αυξανόμενες συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος βοστρύχων ΒΙΝ	74
<u>Γράφημα 5:</u> Αναστολή της ενεργότητας της ευκαρυωτικής τοποϊσομεράσης I του σίτου από αυξανόμενες συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος γιγάρτων ΑΣΥ	75
<u>Γράφημα 6:</u> Αναστολή της ενεργότητας της ευκαρυωτικής τοποϊσομεράσης I του σίτου από αυξανόμενες συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος γιγάρτων ΞΙΝ	77
<u>Γράφημα 7:</u> Αναστολή της ενεργότητας της ευκαρυωτικής τοποϊσομεράσης I του σίτου από αυξανόμενες συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος γιγάρτων ΡΟΜ	78
<u>Γράφημα 8:</u> Τιμές IC <sub>50</sub> των εκχυλισμάτων για τους επτά αναστολείς της τοποϊσομεράσης I του σίτου	78

## Περίληψη

Τα σταφύλια αποτελούν βασικό στοιχείο της διατροφής του ανθρώπου και πολλές μελέτες αποδεικνύουν ότι η κατανάλωση σταφυλιών και κρασιού έχει ευεργετική επίδραση στην υγεία λόγω της περιεκτικότητάς τους σε πολυφαινόλες. Οι πολυφαινόλες αποτελούν δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών και έχουν συσχετιστεί με προστατευτικούς μηχανισμούς έναντι διαφόρων παθολογικών καταστάσεων, όπως ο καρκίνος, τα καρδιαγγειακά νοσήματα και οι μικροβιακές λοιμώξεις. Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε η *in vitro* επίδραση επτά εκχυλισμάτων που απομονώθηκαν από τους βοστρύχους και τα γίγαρτα σταφυλιών στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I του σίτου. Οι τοποϊσομεράσες συμμετέχουν σε βασικές λειτουργίες των κυττάρων, όπως η αντιγραφή, η μεταγραφή και η διατήρηση της σταθερότητας του γονιδιώματος, ελέγχοντας την υπερσυσπείρωση του DNA. Είναι ενδεικτικό ότι σε καρκινικά κύτταρα τα επίπεδα των τοποϊσομερασών είναι ιδιαίτερος αυξημένα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής, η ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I αναστέλλεται και από τα επτά εξεταζόμενα εκχυλίσματα, με τιμές  $IC_{50}$  που κυμαίνονται από 0.6 – 2.8  $\mu\text{g/ml}$ . Η αναστολή των ενζύμων αυτών από τα εκχυλίσματα σταφυλιών αποτελεί ένα πιθανό χημειοπροφυλακτικό μηχανισμό έναντι του καρκίνου.

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1. Τοπολογία του DNA

Η δομή της διπλής έλικας των Watson και Crick, γνωστή και ως έλικα του B-DNA, είναι μια δεξιόστροφη διπλή έλικα αποτελούμενη από αντιπαράλληλους κλώνους που συγκρατούνται μεταξύ τους με ζεύγη βάσεων Watson-Crick. Οι γνώσεις σχετικά με τη στερεοδιάταξη του DNA εμπλουτίστηκαν από δεδομένα της τοπολογίας, ενός κλάδου των μαθηματικών που ασχολείται με τις δομικές ιδιότητες οι οποίες δεν τροποποιούνται από παραμορφώσεις. Για την κατανόηση της τοπολογίας του DNA, εισάγονται τρεις καθοριστικές τοπολογικές ιδιότητες ενός μορίου DNA: ο αριθμός συνδέσεων ( $Lk$ ), ο αριθμός στροφών ( $Tw$ ) και ο αριθμός συστροφών ( $Wr$ ).

Ο αριθμός στροφών ( $Tw$ ) είναι ένα μέτρο των ελικοειδών περιστροφών των κλώνων του DNA μεταξύ τους. Ο αριθμός συστροφών ( $Wr$ ) είναι ένα μέτρο των σπειρώσεων του άξονα της διπλής έλικας οι οποίες ονομάζονται υπερελίξεις. Επομένως ένα μερικώς ξετυλιγμένο κυκλικό DNA έχει  $Wr=0$ . Ένα δεξιόστροφο σπείραμα προσδιορίζεται με έναν αρνητικό αριθμό (αρνητική υπερελίκωση), ενώ ένα αριστερόστροφο σπείραμα προσδιορίζεται με έναν θετικό αριθμό (θετική υπερελίκωση). Ο αριθμός των συνδέσεων ( $Lk$ ) 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.

Η τοπολογία μας διδάσκει ότι το άθροισμα των  $Tw$  και  $Wr$  είναι ίσο με  $Lk$ .

$$Lk = Tw + Wr$$

Ο αριθμός συνδέσεων προσδιορίζεται για κλειστά μόρια, δηλαδή κυκλικά μόρια DNA ή γραμμικά μόρια των οποίων τα δύο άκρα είναι ακινητοποιημένα. Μόρια του DNA που έχουν την ίδια τιμή για το  $Lk$  μπορούν να αλληλομετατρέπονται χωρίς να διασπάται η αλυσίδα του DNA. Τα μόρια όμως που διαφέρουν ως προς τον αριθμό συνδέσεων, γνωστά ως τοπολογικά ισομερή ή τοποϊσομερή, μπορούν να αλληλομετατρέπονται μόνο μετά από κόψιμο του ενός ή και των δυο κλώνων του DNA, και στη συνέχεια από την επανασύνδεσή τους. Τα ένζυμα που καταλύουν αυτή την αλληλομετατροπή τοποϊσομερών DNA ονομάζονται DNA τοποϊσομεράσες (Stryer, 2006).

## 1.2. DNA τοποϊσομεράσες

Οι DNA τοποϊσομεράσες βρίσκονται σε όλα τα ευκαρυωτικά και προκαρυωτικά κύτταρα, ενώ κάποιοι φάγοι και ιοί κωδικοποιούν δικές τους τοποϊσομεράσες (Roca, 1995). Οι DNA τοποϊσομεράσες είναι ένζυμα που μεταβάλλουν την τοπολογία τμημάτων του DNA καταλύοντας μια διεργασία τριών βημάτων: (1) τη διάσπαση του ενός ή και των δύο κλώνων του DNA, (2) το πέρασμα ενός τμήματος του DNA δια μέσου του ανοίγματος που δημιουργείται από τη διάσπαση και (3) την επανασύνδεση του διασπασμένου DNA, με αποτέλεσμα την επαναφορά της αρχικής διαμόρφωσης του DNA. Οι DNA τοποϊσομεράσες είναι ένζυμα απαραίτητα για τα κύτταρα διότι εμποδίζουν τη δημιουργία υπερελικώσεων στο DNA, όταν αυτό υποβάλλεται σε διάφορες διεργασίες του κυττάρου όπως αντιγραφή, μεταγραφή και ανασυνδυασμό (Cummings et al, 1993). Επίσης, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της δομής, τη συμπίκνωση και αποσυμπύκνωση και στο διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων (Froelich-Ammons et al., 1995).

Το πρώτο γνωστό μέλος αυτής της τάξης ενζύμων, το οποίο χαλαρώνει αρνητικά υπερελικωμένα DNA, απομονώθηκε το 1971 από το βακτήριο *Escherichia coli*. Την ανακάλυψη αυτή ακολούθησε η εύρεση ενός ενζύμου σε κύτταρα ποντικού που αφαιρεί και θετικές και αρνητικές υπερελικώσεις. Αργότερα, ταυτοποιήθηκε στο *E. coli* ένα ακόμη ένζυμο που είχε την ικανότητα να εισάγει αρνητικές υπερελικώσεις σε χαλαρωμένο DNA και η δράση του ήταν άμεσα εξαρτώμενη από την παρουσία ATP. Τα τρία προαναφερθέντα ένζυμα αντιπροσωπεύουν τις τρεις υποοικογένειες τοποϊσομερασών και είναι γνωστά ως *E. coli* DNA τοποϊσομεράση I, DNA τοποϊσομεράση I του ποντικού, και *E. coli* γυράση ή DNA τοποϊσομεράση II, αντίστοιχα. Η *E. coli* DNA τοποϊσομεράση I και η DNA τοποϊσομεράση I του ποντικού ανήκουν στα ένζυμα τύπου I, τα οποία χαρακτηρίζονται από την ικανότητά τους να αλλάζουν την τοπολογία του DNA δημιουργώντας εγκοπή στη μία αλυσίδα του DNA, επιτρέποντας έτσι το πέρασμα της δεύτερης αλυσίδας του DNA. Τα μέλη της υποοικογένειας της *E. coli* DNA τοποϊσομεράσης I, η οποία αναφέρεται ως υποοικογένεια IA, και τα μέλη της υποοικογένειας της DNA τοποϊσομεράσης I του ποντικού, η οποία αναφέρεται ως υποοικογένεια IB, παρουσιάζουν παρόμοιες δομές και παρόμοιο τρόπο δράσης. Η *E. coli* γυράση ή DNA τοποϊσομεράση II είναι μέλος της υποοικογένειας των DNA τοποϊσομερασών τύπου II. Τα ένζυμα τύπου II προκαλούν αλλαγές στη διαμόρφωση του DNA μέσω της δημιουργίας εγκοπών και στις δύο αλυσίδες του DNA σε ένα συγκεκριμένο σημείο. Το αποτέλεσμα αυτής της

δίκλωνης εγκοπής είναι η δημιουργία μιας πύλης μέσω της οποίας θα διέλθει ένα άλλο δίκλωνο μόριο DNA. Τα ένζυμα τύπου II παρουσιάζουν δομικές και εξελικτικές ομοιότητες, ακόμη κι αυτά που προέρχονται από διαφορετικά είδη.

Η μελέτη των τοποϊσομερασών έχει επεκταθεί στον τομέα της φαρμακολογίας και της κλινικής ιατρικής λόγω της ταυτοποίησης των ευκαρυωτικών DNA τοποϊσομερασών I και II ως στόχους αντικαρκινικών και αντιμικροβιακών παραγόντων (Wang et al., 1996).

Στον πίνακα 1 παρουσιάζονται οι υποοικογένειες των DNA τοποϊσομερασών (Champoux, 2001).

Topoisomerase <sup>a</sup>	Subfamily type
Eubacterial DNA topoisomerase I ( <i>E. coli</i> )	IA
Eubacterial DNA topoisomerase III ( <i>E. coli</i> )	IA
Yeast DNA topoisomerase III ( <i>S. cerevisiae</i> )	IA
Mammalian DNA topoisomerase III $\alpha$ (human)	IA
Mammalian DNA topoisomerase III $\beta$ (human)	IA
Eubacterial and archaeal reverse DNA gyrase ( <i>Sulfolobus acidocaldarius</i> )	IA
Eubacterial reverse gyrase ( <i>Methanopyrus kandleri</i> ) <sup>c</sup>	IA
Eukaryotic DNA topoisomerase I (human)	IB
Poxvirus DNA topoisomerase (vaccinia)	IB
Hyperthermophilic eubacterial DNA topoisomerase V ( <i>Methanopyrus kandleri</i> ) <sup>d</sup>	IB
Eubacterial DNA gyrase ( <i>E. coli</i> )	IIA
Eubacterial DNA topoisomerase IV ( <i>E. coli</i> )	IIA
Yeast DNA topoisomerase II ( <i>S. cerevisiae</i> )	IIA
Mammalian DNA topoisomerase II $\alpha$ (human)	IIA
Mammalian DNA topoisomerase II $\beta$ (human)	IIA
Archaeal DNA topoisomerase VI ( <i>Sulfolobus shibatae</i> )	IIB

Πίνακας 1 : Υποοικογένειες των DNA τοποϊσομερασών

Στη συνέχεια αναφέρονται συνοπτικά τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά για την κάθε υποοικογένεια τοποϊσομερασών.

### *Τοποϊσομεράσες τύπου IA*

Οι τοποϊσομεράσες αυτής της υποοικογένειας μοιράζονται τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

- (1) Είναι όλες μονομερείς με εξαίρεση την αντίστροφη γυράση (reverse gyrase) του *Methanopyrus kandleri*
- (2) Η ρήξη της μιας αλυσίδας του DNA συνοδεύεται από ομοιοπολική σύνδεση του ενός άκρου του DNA στο ένζυμο μέσω ενός 5' φωσφοδιεστερικού δεσμού στην τυροσίνη του ενεργού κέντρου του ενζύμου
- (3) Προϋποθέτουν την ύπαρξη  $Mg^{2+}$  για την αφαίρεση των υπερελικώσεων
- (4) Τα πλασμίδια που περιέχουν αρνητικές, αλλά όχι θετικές, υπερελικώσεις είναι υποστρώματα για την αντίδραση της αφαίρεσης των υπερελικώσεων
- (5) Προϋποθέτουν μια εκτεθειμένη μονόκλωνη περιοχή στο DNA

### *Τοποϊσομεράσες τύπου IB*

Τα μέλη της υποοικογένειας τύπου IB δεν παρουσιάζουν ομολογία στην ακολουθία των αμινοξέων ή στη δομή με τις υπόλοιπες τοποϊσομεράσες και διαφέρουν ως προς τη λειτουργία τους με τα μέλη της υποοικογένειας IA. Σε αντίθεση με τις τοποϊσομεράσες τύπου IA, οι τοποϊσομεράσες IB μπορούν να αφαιρέσουν και θετικές και αρνητικές υπερελικώσεις και δεν είναι απαραίτητο το DNA να είναι μονόκλωνο σε μία περιοχή. Επίσης, σχηματίζουν ένα ομοιοπολικό ενδιάμεσο στο οποίο η τυροσίνη του ενεργού κέντρου συνδέεται στο 3' φωσφορικό άκρο της σπασμένης αλυσίδας, και όχι στο 5' φωσφορικό άκρο που βρέθηκε στις τοποϊσομεράσες IA. Τα ένζυμα αυτής της υποοικογένειας δεν συνδέονται με μεταλλικά ιόντα, και προφανώς δεν απαιτούν  $Mg^{2+}$  για την αφαίρεση των υπερελικώσεων.

### *Τοποϊσομεράσες τύπου II*

Όλα τα μέλη αυτής της υποοικογένειας μοιράζονται τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

- (1) Είναι διμερή και έχουν την ιδιότητα να δεσμεύουν δίκλωνο DNA και να προκαλούν εγκοπές και στους δύο κλώνους
- (2) Η δημιουργία ρήγματος περιλαμβάνει ομοιοπολική πρόσδεση κάθε υπομονάδας του διμερούς στο 5' άκρο του DNA μέσω ενός φωσφοτυροσυλικού δεσμού
- (3) Για την αφαίρεση των υπερελικώσεων απαιτείται  $Mg^{2+}$  και υδρόλυση του ATP

(4) Οι τυροσίνες του ενεργού κέντρου βρίσκονται σε ένα μοτίβο έλικας-στροφής-έλικας (HTH)

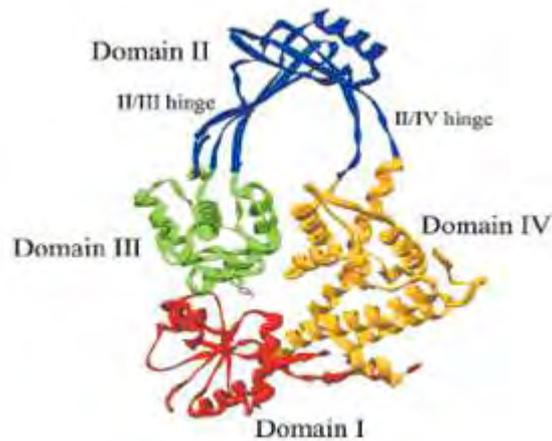
(5) Όπως και με τις τοποϊσομεράσες τύπου I, ένα συντηρημένο κατάλοιπο αργινίνης εμπλέκεται στην κατάλυση λόγω της θέσης του κοντά στην τυροσίνη του ενεργού κέντρου

Όλες οι τοποϊσομεράσες τύπου II των προκαρυωτών περιέχουν δύο διαφορετικές υπομονάδες και είναι επομένως ετεροτετραμερείς, ενώ οι αντίστοιχες ευκαρυωτικές τοποϊσομεράσες είναι ομοδιμερείς. Η DNA γυράση είναι το μόνο ένζυμο τύπου II που χρησιμοποιεί την ενέργεια από την υδρόλυση του ATP για να εισάγει αρνητικές υπερελικώσεις στο DNA (Champroux, 2001).

### **1.3. Δομή των τοποϊσομερασών**

#### 1.3.1. Τοποϊσομεράσες τύπου IA

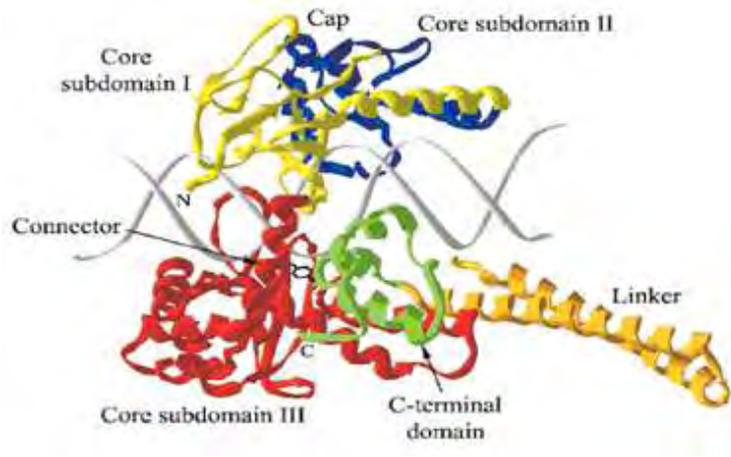
Αν και έχει παρατηρηθεί σημαντική ποικιλομορφία στην αλληλουχία μεταξύ των ενζύμων τύπου IA, υπάρχουν δομικά χαρακτηριστικά που είναι κοινά μεταξύ των μελών της υποοικογένειας αυτής (Champroux, 2001). Η γενική δομή των τοποϊσομερασών τύπου IA ανακαλύφθηκε πρώτα στην τοποϊσομεράση I της *E.coli* (Lima et al, 1994). Το ένζυμο αυτό έχει μοριακό βάρος 67 kDa και αποτελείται από τέσσερις διακριτές επικράτειες, οι οποίες συγκροτούν μια δακτυλιοειδή δομή. Η επικράτεια I, η οποία περιλαμβάνει τα πρώτα 160 κατάλοιπα, αποτελείται από τέσσερα αντιπαράλληλα β-φύλλα που περιβάλλονται από τέσσερις α-έλικες, οι οποίες είναι οργανωμένες σε μια πτυχή Rossman. Ακολουθεί η επικράτεια IV, η οποία αποτελείται από α-έλικες και αντιπροσωπεύει το καρβοξυτελικό άκρο του ενζύμου. Η επικράτεια II που βρίσκεται στο ανώτερο σημείο της δομής αποτελείται από αντιπαράλληλα β-φύλλα. Τέλος, διαμορφώνεται η επικράτεια III που αποτελείται από α-έλικες και περιλαμβάνει το ενεργό κέντρο με το κατάλοιπο τυροσίνης στη θέση 319 (Tyr319). Οι επικράτειες φαίνονται στην εικόνα 1.



Εικόνα 1: Κρυσταλλική δομή της *E. coli* τοποϊσομεράσης I

### 1.3.2. Τοποϊσομεράσες τύπου IB

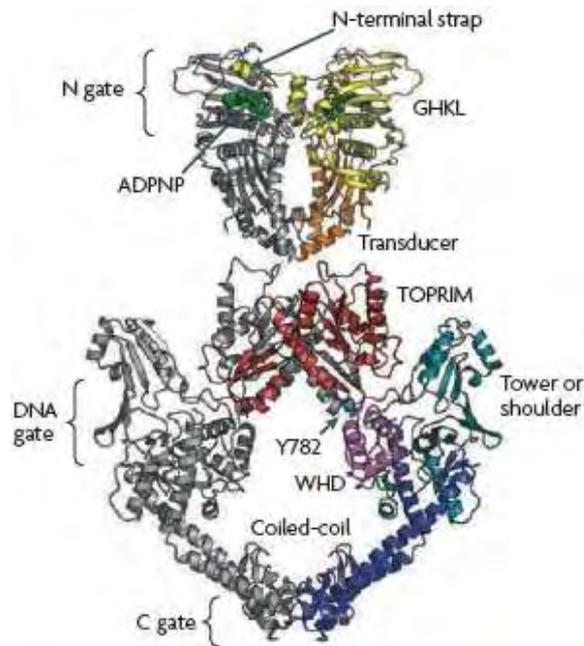
Οι τοποϊσομεράσες IB των ευκαρυωτών είναι σχετικά μεγάλες με μοριακό βάρος περίπου 90 kDa, ενώ αυτές των βακτηρίων και των ιών έχουν μέσο μοριακό βάρος 36 kDa. Παρά τις διαφορές τους στο μέγεθος, όλα τα ένζυμα τύπου IB διαθέτουν παρόμοιες δομές γύρω από τις ενεργές τους περιοχές και παρουσιάζουν όμοιο τρόπο δράσης (Redinbo et al, 1998). Η καλύτερα μελετημένη είναι η δομή της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I (Champroux, 2001). Το ένζυμο αυτό αποτελείται κυρίως από τρεις πυρηνικές υποεπικράτειες (I, II, III) (core subdomains), οι οποίες σχηματίζουν τον πυρήνα του ενζύμου, και την καρβοξυτελική περιοχή, όπως φαίνεται στην εικόνα 2. Μια δομή, γνωστή ως συνδέτης (linker), η οποία αποτελείται από ένα ζευγάρι α-ελίκων, συνδέει τον πυρήνα του ενζύμου με την καρβοξυτελική περιοχή. Μεταξύ των υποεπικρατειών I και II κυριαρχεί μια δομή, γνωστή ως καλύπτρα (cap) της πρωτεΐνης (Champroux, 2001, Baker et al., 2009). Η ενεργή περιοχή του ενζύμου αποτελείται από μια συντηρημένη σειρά καταλοίπων (τυροσίνη, αργινίνη, αργινίνη, λυσίνη και ιστιδίνη/ασπαραγίνη), από τα οποία το κατάλοιπο τυροσίνης βρίσκεται στην καρβοξυτελική περιοχή, ενώ όλα τα υπόλοιπα κατάλοιπα απαντώνται στον πυρήνα του ενζύμου (Baker et al., 2009).



Εικόνα 2: Κρυσταλλική δομή της τοποϊσομεράσης τύπου IB

### 1.3.3. Τοποϊσομεράσες τύπου II

Το βασικό μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε για τις μελέτες σχετικά με τη δομή των τοποϊσομερασών τύπου II ήταν η τοποϊσομεράση II του *S. cerevisiae* (Nitiss, 2009). Το ένζυμο αυτό έχει μοριακό βάρος 320 kDa και είναι ένα ομοδιμερές που περιέχει τις A και B υπομονάδες της βακτηριακής γυράσης (Berger et al., 1998). Η αμινοτελική επικράτεια της πρωτεΐνης αποτελεί την περιοχή όπου συνδέεται και υδρολύεται το ATP αλλά και την περιοχή σύνδεσης στο DNA. Το κεντρικό τμήμα της πρωτεΐνης περιλαμβάνει την περιοχή TOPRIM, η οποία ακολουθείται από το ενεργό κέντρο το οποίο περιλαμβάνει ένα κατάλοιπο τυροσίνης. Η καρβοξυτελική επικράτεια διαφέρει μεταξύ των τοποϊσομερασών τύπου II διαφορετικών ειδών, όπως και μεταξύ των τοποϊσομερασών IIα και IIβ. Η καρβοξυτελική περιοχή είναι απαραίτητη για τον πυρηνικό εντοπισμό, τη ρύθμιση της ενζυμικής δραστηριότητας και τη ρύθμιση των αλληλεπιδράσεων του ενζύμου με άλλες πρωτεΐνες (Berger et al., 1998, Nitiss, 2009). Η κρυσταλλική δομή του ενζύμου φαίνεται στην εικόνα 3.



Εικόνα 3: Κρυσταλλική δομή της τοποϊσομεράσης τύπου II

## 1.4. Μηχανισμός δράσης τοποϊσομερασών

### 1.4.1. Τοποϊσομεράσες τύπου I

Γενικά ο μηχανισμός δράσης των τοποϊσομερασών I περιλαμβάνει τέσσερα διακριτά στάδια.

#### 1) Σύνδεση στο DNA.

Η ευκαρυωτική τοποϊσομεράση I προσδένεται αποτελεσματικά κυρίως σε δίκλωνο DNA το οποίο είναι υπερελικωμένο ή παρουσιάζει κάμψη. Ωστόσο, μπορεί να προσδεθεί και σε μονόκλιωνα τμήματα τα οποία σχηματίζουν δίκλωνες δομές μέσω αλληλεπίδρασης των παλίνδρομων αλληλουχιών τους. Η ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I επηρεάζεται άμεσα από τροποποιήσεις του DNA που συμβαίνουν κοντά στη θέση δράσης του ενζύμου. Για παράδειγμα, η μεθυλίωση της κυτοσίνης που βρίσκεται κοντά στο σημείο όπου η τοποϊσομεράση δημιουργεί την εγκοπή μπορεί είτε να αυξήσει είτε να αναστείλει την δράση της τοποϊσομεράσης, ανάλογα με την ακριβή θέση της μεθυλίωσης.

#### 2) Διάσπαση της αλυσίδας του DNA

Η τοποϊσομεράση I συνδέεται ομοιοπολικά στο 5' άκρο της μιας αλυσίδας του DNA, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός πρωτεϊνικού συμπλόκου με το DNA (cleavage complex). Η δημιουργία εγκοπής στη μία αλυσίδα προκαλείται μέσω μιας αντίδρασης μετεστεροποίησης, σύμφωνα με την οποία η υδροξυλική ομάδα της τυροσίνης της

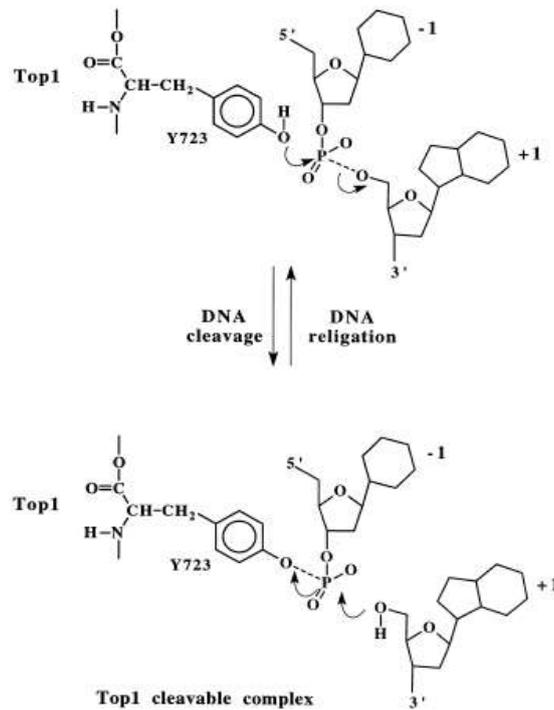
τοποϊσομεράσης I συνδέεται στην φωσφορική ομάδα του φωσφοδιεστερικού δεσμού στο 3' άκρο, αφήνοντας ελεύθερη την υδροξυλική ομάδα του 5' άκρου, όπως φαίνεται στην εικόνα 4.

### 3) Πέρασμα του μονόκλωνου DNA

Για τη διεκπεραίωση αυτού του σταδίου, το ένζυμο υφίσταται δομικές αλλαγές. Κυριαρχούν δύο μηχανισμοί μέσω των οποίων η τοποϊσομεράση I καταλύει το πέρασμα της δεύτερης αλυσίδας του DNA. Σύμφωνα με τον πρώτο μηχανισμό, η τοποϊσομεράση I περικυκλώνει το DNA και γεφυρώνει το κενό στην αλυσίδα του DNA που έχει διασπασθεί, αλληλεπιδρώντας ομοιοπολικά και μη ομοιοπολικά και με τα δύο άκρα του DNA. Σύμφωνα με τον δεύτερο μηχανισμό, γνωστό και ως 'μοντέλο περιστροφής' (rotation model), η δεύτερη αλυσίδα παραμένει σταθερή, ενώ η αλυσίδα του DNA που έχει διασπασθεί περιστρέφεται αλλάζοντας έτσι τον αριθμό συνδέσεων.

### 4) Επανασύνδεση του DNA

Για την επανασύνδεση της αλυσίδας που έχει διασπασθεί πραγματοποιείται μία δεύτερη αντίδραση μετεστεροποίησης σύμφωνα με την οποία η ελεύθερη υδροξυλική ομάδα στο 5' άκρο του σπασμένου κλώνου του DNA δρα ως πυρηνόφιλο προσβάλλοντας τον φωσφοτυροσινικό δεσμό που είχε δημιουργηθεί κατά την αποκοπή της αλυσίδας (Εικόνα 4). Ένας δεύτερος μηχανισμός για την επανένωση των άκρων της αλυσίδας αφορά μία ενδογενή φωσφοδιεστεράση, η οποία δημιουργεί μια υδροξυλική ομάδα στο 3' άκρο. Αυτή η ομάδα μπορεί να χρησιμοποιηθεί από την DNA πολυμεράση ως υπόστρωμα (Pommier et al., 1998).



Εικόνα 4: Διάσπαση και επανασύνδεση του DNA μέσω μετεστεροποίησης

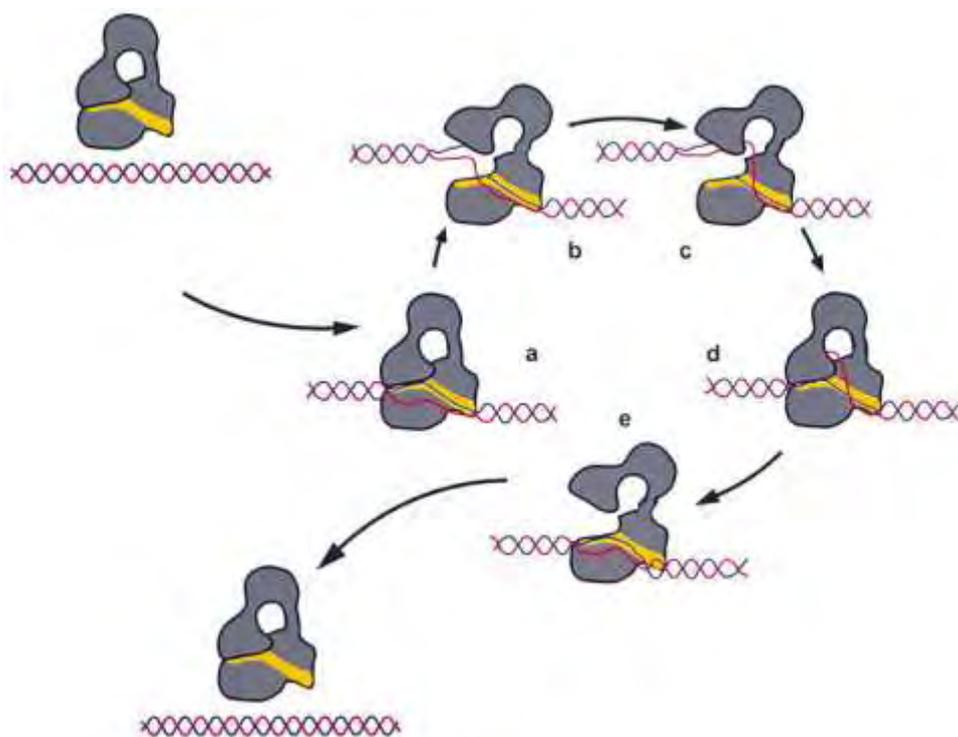
Οι τοποϊσομεράσες IA έχουν διαφορετικό μηχανισμό δράσης από τις τοποϊσομεράσες IB.

#### *Τοποϊσομεράσες τύπου IA*

Για την αφαίρεση των αρνητικών υπερελικώσεων του DNA από την τοποϊσομεράση IA, η διπλή έλικα ξετυλίγεται τοπικά λόγω της σύνδεσης του ενζύμου σ' αυτή, και δημιουργείται ένα παροδικό ρήγμα στον έναν κλώνο του DNA. Όσο λιγότερο αρνητικά υπερελικωμένο είναι το DNA, τόσο πιο δύσκολο είναι για την τοποϊσομεράση IA να ξετυλίξει τη διπλή έλικα. Για το λόγο αυτό, η ικανότητα του ενζύμου μειώνεται προοδευτικά κατά την διάρκεια της αντίδρασης. Στη περίπτωση των θετικά υπερελικωμένων DNA, η τοποϊσομεράση IA δεν μπορεί να δράσει, εκτός αν προϋπάρχει μια μονόκλωνη περιοχή. Οι τοποϊσομεράσες IA μπορούν επίσης να καταλύουν το πέρασμα μιας διπλής έλικας DNA μέσω μιας άλλης, εάν τουλάχιστον ο ένας κλώνος περιέχει μια εγκοπή ή ένα κενό. Σ' αυτή τη περίπτωση, το ένζυμο προκαλεί ένα παροδικό ρήγμα απέναντι από την εγκοπή ή το κενό.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 5, οι τοποϊσομεράσες IA καταλύουν το πέρασμα της αλυσίδας του DNA μέσω ενός μηχανισμού “γέφυρας”, σύμφωνα με τον οποίο τα άκρα του DNA που δημιουργούνται από το ρήγμα συνδέονται, καθώς το ένζυμο

δημιουργεί μια γέφυρα μεταξύ τους. Έτσι οι κινήσεις των άκρων του DNA στα οποία είναι συνδεδεμένη η τοποϊσομεράση μεσολαβούν στο άνοιγμα και στο κλείσιμο της πύλης και το πέρασμα της αλυσίδας του DNA από αυτήν. Κατά το παροδικό ρήγμα της μιας αλυσίδας του DNA από την τοποϊσομεράση IA, το 5' άκρο της σπασμένης αλυσίδας είναι ομοιοπολικά προσδεδεμένο στην ενεργή περιοχή της τυροσίνης στην καμπή (lid) του ενζύμου, και το 3' άκρο είναι μη ομοιοπολικά συνδεδεμένο στη βάση (base) του ενζύμου. Απομακρύνοντας την καμπή από τη βάση ανοίγει η πύλη στο DNA για το πέρασμα της δεύτερης αλυσίδας. Η δεύτερη αλυσίδα περνάει από την κεντρική κοιλότητα του ενζύμου, η πύλη κλείνει και τα άκρα της διερρηγμένης αλυσίδας επανασυνδέονται. Τέλος, η πύλη ανοίγει και αποσυνδέεται το σύμπλοκο ενζύμου-DNA (Wang et al, 2002).

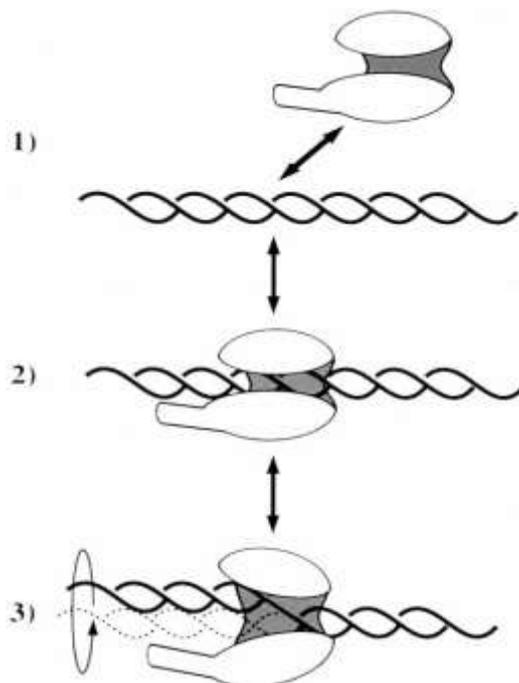


Εικόνα 5: Μηχανισμός δράσης της τοποϊσομεράσης τύπου IA (Li et al, 2001)

#### *Τοποϊσομεράσες τύπου IB*

Οι τοποϊσομεράσες τύπου IB είναι πολύ αποτελεσματικές στην αφαίρεση τόσο αρνητικών όσο και θετικών υπερελικώσεων του DNA. Οι τοποϊσομεράσες IB δρουν μέσω ενός μηχανισμού 'περιστροφής' (rotation), και όχι μέσω του μηχανισμού 'γέφυρας' (bridge) που προαναφέρθηκε. Αρχικά, η τοποϊσομεράση IB συνδέεται στο δίκλωνο μόριο DNA. Στη συνέχεια, η μία αλυσίδα του DNA διασπάται και μόνο το 3'

άκρο συνδέεται ομοιοπολικά με το ένζυμο. Το σύμπλοκο ενζύμου-DNA χαλαρώνει ελαφρώς και επιτρέπει στο 5' άκρο του DNA, που δεν είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο, να περιστραφεί σε σχέση με το άλλο άκρο (Berger, 1998, Wang et al., 2002). Ο μηχανισμός δράσης του ενζύμου φαίνεται στην εικόνα 6.



Εικόνα 6: Μηχανισμός δράσης της τοποϊσομεράσης τύπου IB

#### 1.4.2. Τοποϊσομεράσες τύπου II

Σε αντίθεση με τις τοποϊσομεράσες τύπου I, η καταλυτική δραστηριότητα των τοποϊσομερασών τύπου II εξαρτάται από την παρουσία ενός δισθενούς κατιόντος, π.χ.  $Mg^{2+}$  και από την παρουσία ATP (Burden et. al, 1998, Berger et al. 1996). Ο καταλυτικός κύκλος τους μπορεί να χωριστεί σε έξι διακριτά βήματα, όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 7.

1) Κατά την έναρξη, η τοποϊσομεράση II δεσμεύει μη ομοιοπολικά δύο δίκλινα μόρια DNA. Αρχικά, το ένζυμο δεσμεύει το τμήμα G (G-segment) που είναι η διπλή έλικα στην οποία το ένζυμο δημιουργεί το ρήγμα και είναι ανοιχτή σαν 'πύλη'. Στη συνέχεια, στο σύμπλοκο δεσμεύεται μια δεύτερη διπλή έλικα, το τμήμα T (T-segment), το οποίο μεταφέρεται μέσω της ανοιχτής πύλης.

2) Η κάθε μία υπομονάδα της τοποϊσομεράσης II διασπά από μία αλυσίδα του τμήματος G, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός παροδικού δίκλωνου ρήγματος στο DNA. Για να διατηρηθεί η ακεραιότητα του γονιδιώματος, η τυροσίνη στο ενεργό

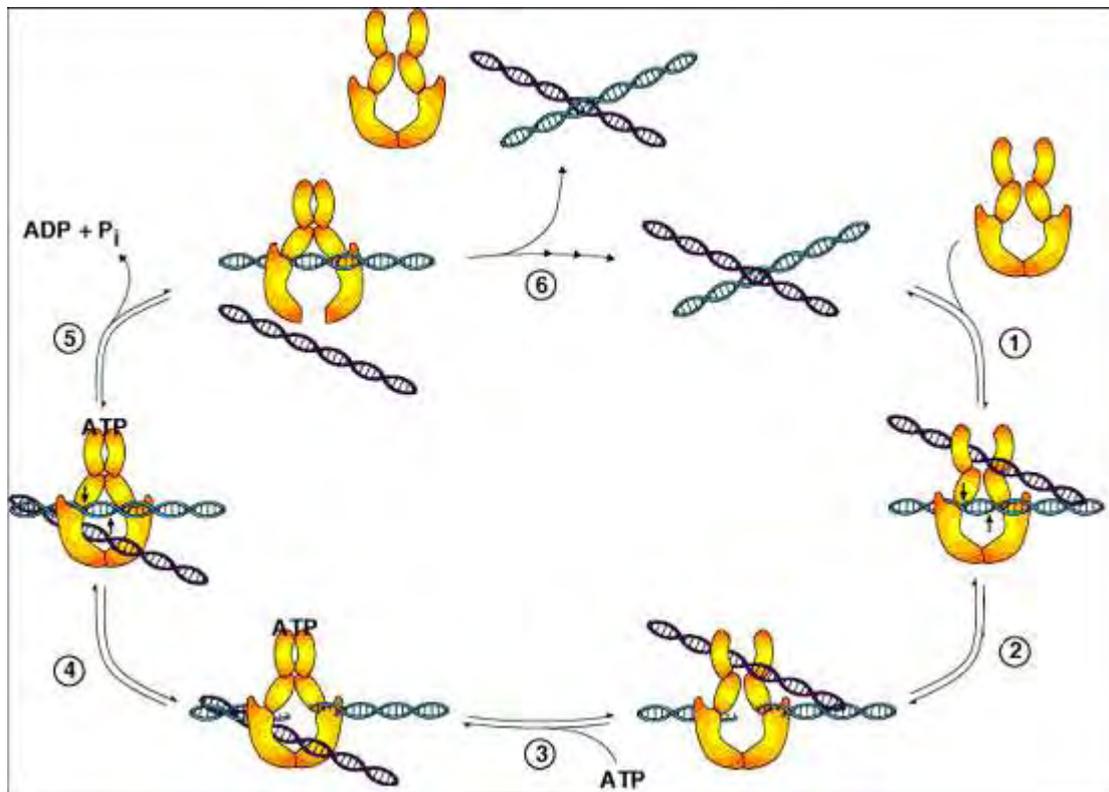
κέντρο κάθε υπομονάδας συνδέεται ομοιοπολικά με τα νέα 5' άκρα των κλώνων του σπασμένου DNA, δημιουργώντας ένα σύμπλοκο ενζύμου-DNA (cleavage complex).

3) Κάθε υπομονάδα της τοποϊσομεράσης II δεσμεύει και υδρολύει ένα μόριο ATP, με αποτέλεσμα μια αλλαγή στη δομή της και το πέρασμα του τμήματος T μέσω του ρήγματος στο τμήμα G. Η μετατόπιση του τμήματος G μέσω της αμινοτελικής πύλης της τοποϊσομεράσης II και το κλείσιμο της πύλης σχηματίζουν τον πρωτεϊνικό 'σφιγκτήρα' (protein clamp). Αυτή η διαμόρφωση επιτρέπει στο ένζυμο να μεταφέρεται κατά μήκος της διπλής έλικας χωρίς να αποσυνδέεται από αυτή.

4) Η τοποϊσομεράση II ενώνει τις δύο αλυσίδες του τμήματος G.

5) Κατά την υδρόλυση ενός δεύτερου μορίου ATP, η τοποϊσομεράση II υφίσταται μία ακόμη αλλαγή στη δομή, η οποία έχει ως αποτέλεσμα το άνοιγμα της καρβοξυτελικής πύλης και την απελευθέρωση του τμήματος T.

6) Το ένζυμο επιστρέφει στην αρχική του διαμόρφωση και μπορεί είτε να παραμείνει συνδεδεμένο με το DNA για έναν νέο κύκλο κατάλυσης, είτε να αποσυνδεθεί και να ξεκινήσει έναν καταλυτικό κύκλο με νέο υπόστρωμα DNA (Lindsley et al, 1993, Roca et al, 1992).



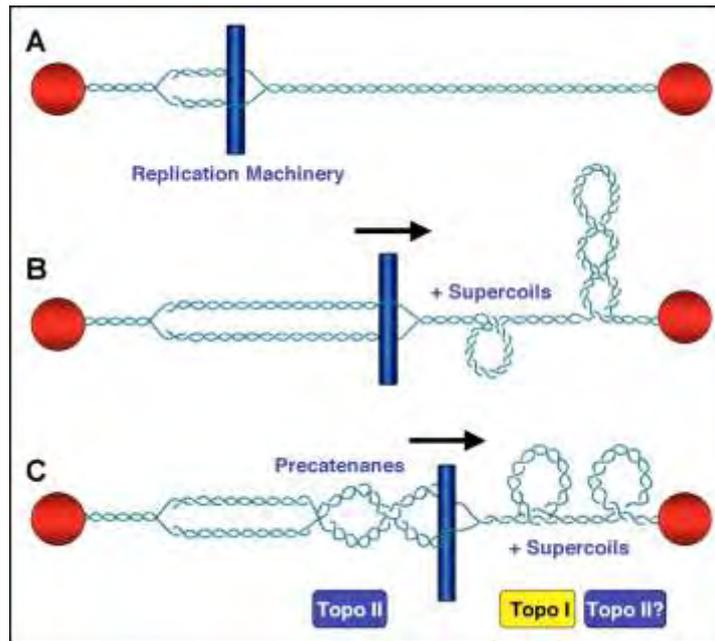
Εικόνα 7: Μηχανισμός δράσης της τοποϊσομεράσης τύπου II

## **1.5. Βιολογικές δράσεις τοποϊσομερασών**

### 1.5.1. Αντιγραφή

Το DNA όλων των ειδών, από των βακτηρίων μέχρι και των ανθρώπων, είναι αρνητικά υπερελικωμένο. Αυτή η αρνητική υπερελίκωση κάνει πιο εύκολο το διαχωρισμό των συμπληρωματικών αλυσίδων του DNA και διευκολύνει σε μεγάλο βαθμό την έναρξη της αντιγραφής και τη συναρμολόγηση των αντιγραφικών διχάλων. Από τη στιγμή που η διχάλα αρχίζει να μετακινείται κατά μήκος του DNA, αρχίζουν να εκδηλώνονται οι αρνητικές επιπτώσεις στην τοπολογία. Όπως φαίνεται στην εικόνα 8, η κίνηση της διχάλας έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία θετικών υπερελικώσεων στο DNA μπροστά από τη μηχανή αντιγραφής. Αυτές οι θετικές υπερελικώσεις έχουν δύο αρνητικές συνέπειες. Πρώτον, αυξάνουν τη δυσκολία του διαχωρισμού των αλυσίδων της διπλής έλικας με αποτέλεσμα τη συσσώρευση θετικών υπερελικώσεων οι οποίες μπλοκάρουν τη μετακίνηση της διχάλας. Δεύτερον, οι θετικές υπερελικώσεις μπροστά από τη διχάλα οδηγούν στη δημιουργία αντισταθμιστικών αρνητικών υπερελικώσεων πίσω από τη μηχανή αντιγραφής. Αν η αντιγραφική μηχανή περιστραφεί γύρω από τον άξονα της έλικας, αυτές οι αρνητικές υπερελικώσεις οδηγούν στην αναδίπλωση των νεοσυντιθέμενων θυγατρικών μορίων (precatenates).

Οι τοποϊσομεράσες βοηθούν στην αποφυγή αυτών των τοπολογικών προβλημάτων που παρουσιάζονται κατά την αντιγραφή με το να απομακρύνουν τις θετικές υπερελικώσεις. Στη διεργασία αυτή, παίρνουν μέρος κυρίως οι τοποϊσομεράσες IB και οι τοποϊσομεράσες II. Οι τοποϊσομεράσες IA δεν είναι αποτελεσματικές στην αφαίρεση των θετικών υπερελικώσεων, αφού για τη δράση τους απαιτούν την ύπαρξη μιας μονόκλωνης περιοχής (Schvartzman et al, 2004, Wang, 2002).



Εικόνα 8: Δράσεις τοποϊσομερασών κατά την αντιγραφή

### 1.5.2. Μεταγραφή

Μελέτες υποστηρίζουν ότι η μεταγραφή είναι πιο περίπλοκη από την αντιγραφή, κυρίως λόγω του γεγονότος ότι κατά την μεταγραφή, η RNA πολυμεράση, το νεοσυντιθέμενο μετάγραφο, και οι πρωτεΐνες που είναι συνδεδεμένες σε αυτό μπορούν να περιστρέφονται ελεύθερα γύρω από το μόριο DNA που μεταγράφεται (Wang, 2002). Η κίνηση του DNA γύρω από τη μεταγραφική μηχανή αυξάνει την περιστροφή του DNA μπροστά από την RNA πολυμεράση, και μειώνει την περιστροφή πίσω απ' αυτή. Έτσι κατά τη διάρκεια της μεταγραφής, το DNA είναι περισσότερο θετικά υπερελικωμένο μπροστά από την RNA πολυμεράση, και περισσότερο αρνητικά υπερελικωμένο πίσω από αυτή.

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η δράση των τοποϊσομερασών μπροστά και πίσω από την RNA πολυμεράση εμποδίζει τη συσσώρευση υπερελικώσεων, και επιτρέπει στην RNA πολυμεράση να συνεχίσει τη μεταγραφή (Nitiss, 1998). Πιο συγκεκριμένα, η τοποϊσομεράση I συμμετέχει στην έναρξη της μεταγραφής αλληλεπιδρώντας με την πρωτεΐνη TBP (TATA binding protein) και διευκολύνοντας το σχηματισμό ενός ενεργού TFIID-TFIIA πρωτεϊνικού συμπλόκου στον υποκινητή. Συνεπώς, η τοποϊσομεράση I καταστέλλει τη μεταγραφή απουσία ενεργοποιητή και την επάγει παρουσία ενεργοποιητή σε γονίδια που περιέχουν την TATA αλληλουχία (Wang, 2002).

### 1.5.3. Ανασυνδυασμός του DNA

*In vitro* μελέτες υποδεικνύουν ότι η τοποϊσομεράση I μπορεί να προκαλέσει μη ομόλογο ανασυνδυασμό ανάμεσα σε εξωγενές DNA και το σύμπλοκο ενζύμου-DNA, ενώ είναι ικανή να δημιουργεί και να αποσυγκροτεί τις δομές Holliday, οι οποίες δημιουργούνται κατά τον ανασυνδυασμό του DNA (Pommier et al., 1998).

### 1.5.4. Δομή και συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων

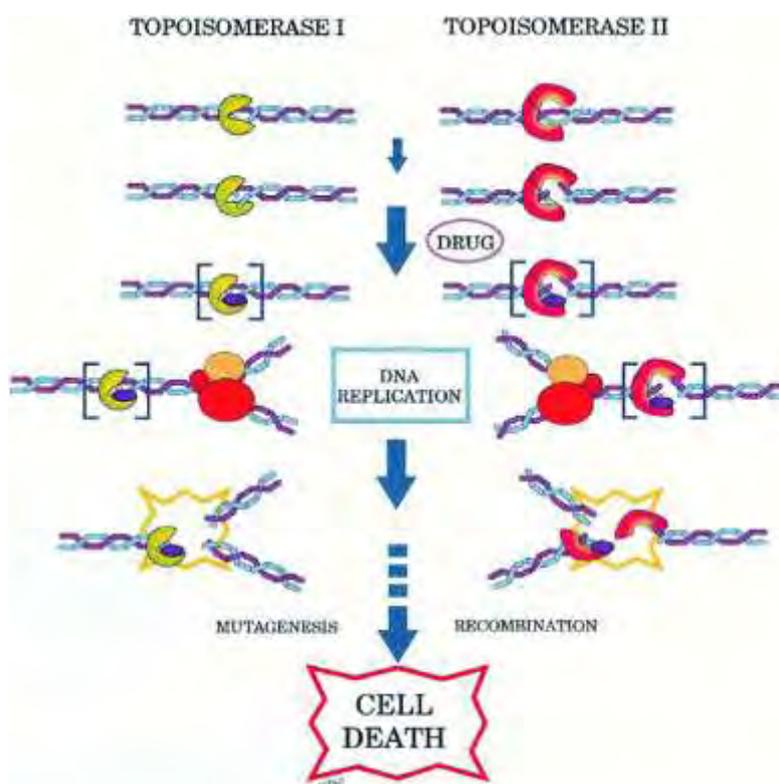
Η τοποϊσομεράση II παίζει σημαντικό ρόλο στη δομή των χρωμοσωμάτων. Ταυτοποιήθηκε μια δομή στα μεταφασικά χρωμοσώματα που ονομάζεται χρωμοσωμικό σύμπλεγμα-ικρίωμα (scaffold) η οποία περιλαμβάνει την τοποϊσομεράση IIa και ένα πρωτεϊνικό σύμπλεγμα γνωστό ως κοντενσίνη (condensin). Μέσω αυτού του συμπλέγματος η τοποϊσομεράση IIa παίρνει μέρος στην οργάνωση της δομής των χρωμοσωμάτων (Nitiss, 2009, Wang, 2002).

Διάφορες μελέτες σχετικά με τη συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων εμπλέκουν την τοποϊσομεράση II στη συμπύκνωση της χρωματίνης και των χρωμοσωμάτων κατά τη μίτωση. Επίσης, η τοποϊσομεράση II των θηλαστικών εμπλέκεται στη συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων κατά την απόπτωση (Wang, 2002). Πειράματα έχουν δείξει ότι η αναστολή της τοποϊσομεράσης II αναστέλλει το τελικό στάδιο της συμπύκνωσης του χρωμοσώματος. Τα κύτταρα τα οποία εισέρχονται στον κυτταρικό κύκλο και στα οποία δεν έχει ολοκληρωθεί η συμπύκνωση και ο διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων, εμφανίζουν πολυπλοειδία και οδηγούνται σε κυτταρικό θάνατο (Wang, 1996).

## **1.6. Τοποϊσομεράσες και καρκίνος**

Σε μια προσπάθεια να διατηρηθεί η ακεραιότητα του γονιδιώματος κατά τη δημιουργία ρήγματος στο DNA, οι τοποϊσομεράσες συνδέονται ομοιοπολικά στο 5' άκρο που δημιουργήθηκε από το ρήγμα μέσω φωσφοτυροσινικών δεσμών. Εξαίρεση αποτελεί η ευκαρυωτική τοποϊσομεράση I που συνδέεται στο 3' άκρο. Υπό κανονικές συνθήκες, αυτά τα σύμπλοκα DNA-ενζύμου είναι παροδικά ενδιάμεσα και βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Συνεπώς, είναι ανεκτά από τα κύτταρα. Ωστόσο, καταστάσεις που αυξάνουν σημαντικά τη φυσιολογική συγκέντρωση ή τη διάρκεια ζωής αυτών των ρηγμάτων έχουν ως αποτέλεσμα την εμφάνιση πολλών επιβλαβών παρενεργειών, όπως μεταλλάξεις, προσθήκες, ελλείψεις, και χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Συνεπώς, οι τοποϊσομεράσες έχουν διττό χαρακτήρα στη φύση: παρόλο που καταλύουν αντιδράσεις απαραίτητες για τη φυσιολογική λειτουργία των

κυττάρων, είναι ικανές να προκαλέσουν βλάβες στο γονιδίωμα, οι οποίες είναι πιθανό να οδηγήσουν στην εμφάνιση καρκίνων. Έχει παρατηρηθεί ότι τα επίπεδα των τοποϊσομερασών I και II είναι γενικά αυξημένα σε κύτταρα που πολλαπλασιάζονται με γρήγορο ρυθμό. Κατά συνέπεια, παράγοντες οι οποίοι αναστέλλουν τη δράση τόσο της τοποϊσομεράσης I και όσο και της II θεωρούνται σημαντικοί αντικαρκινικοί παράγοντες (Froelich-Ammon et al., 1995). Στην εικόνα 9 παρουσιάζεται ο μηχανισμός των αναστολέων των τοποϊσομερασών I και II μέσω του οποίου επέρχεται ο κυτταρικός θάνατος.

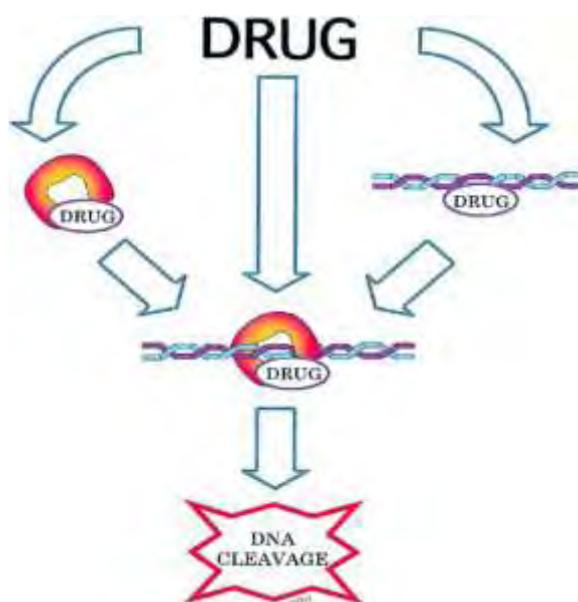


Εικόνα 9: Μηχανισμός κυτταροτοξικότητας αναστολέων των τοποϊσομερασών I και II

### 1.7. Αναστολείς τοποϊσομερασών

Υπάρχουν δύο κατηγορίες αναστολέων των τοποϊσομερασών I και II: οι αναστολείς δηλητήρια (poisons) και οι καταλυτικοί αναστολείς (suppressors). Οι αναστολείς δηλητήρια συνδέονται στο σύμπλοκο ενζύμου-DNA και το σταθεροποιούν, εμποδίζοντας την επανένωση των αλυσίδων του DNA. Οι καταλυτικοί αναστολείς συνδέονται είτε στο ένζυμο είτε στο DNA, εμποδίζοντας τη δημιουργία του συμπλόκου ενζύμου-DNA.

Το σύμπλοκο τοποϊσομεράσης-DNA-αναστολέα μπορεί να δημιουργηθεί με τρεις διαφορετικούς τρόπους, όπως φαίνεται στην εικόνα 10. Ο αναστολέας είτε συνδέεται πρώτα στην τοποϊσομεράση και μετά δημιουργείται το σύμπλοκο με το DNA, είτε συνδέεται στο DNA και μετά δημιουργείται το σύμπλοκο με την τοποϊσομεράση. Εναλλακτικά, δημιουργείται πρώτα το σύμπλοκο τοποϊσομεράσης-DNA και στη συνέχεια συνδέεται ο αναστολέας (Froelich-Ammon et al., 1995, Corbett et al, 1993).

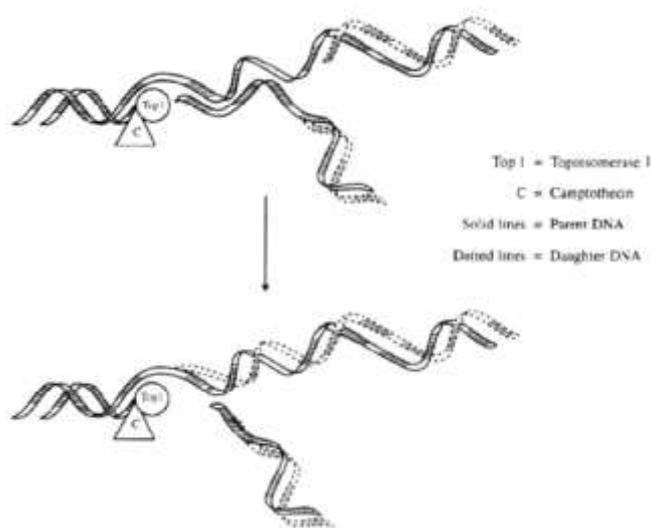


Εικόνα 10: Τρόποι σχηματισμού του συμπλόκου τοποϊσομεράσης-DNA-αναστολέα

#### 1.7.1. Αναστολείς δηλητήρια (poisons) των τοποϊσομερασών I

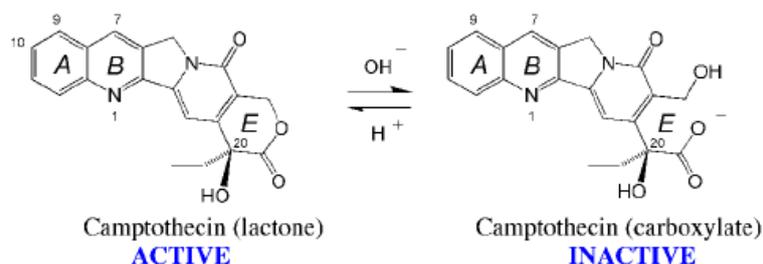
Ο πιο γνωστός αναστολέας αυτής της κατηγορίας είναι η καμπτοθεκίνη και τα παράγωγά της. Η καμπτοθεκίνη (CPT) είναι ένα φυτικό αλκαλοειδές που ανακαλύφθηκε στο κινέζικο δέντρο *Camptotheca acuminata*. Ο τρόπος δράσης της CPT είναι αντιπροσωπευτικός των αναστολέων που δρουν ως δηλητήρια. Τα μόρια αυτά σταθεροποιούν τον ομοιοπολικό δεσμό στο σύμπλοκο DNA-τοποϊσομεράση I, αυξάνοντας τη θετική υπερελίκωση στο γενετικό υλικό (Hsiang et al, 1985). Τα αποτελέσματα της CPT και των αναλόγων της μπορούν να εξηγηθούν μέσω του μοντέλου δράσης της. Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, η CPT συνδέεται στο παροδικό σύμπλοκο DNA-τοποϊσομεράση I που σχηματίζεται κατά την αντιγραφή και το σταθεροποιεί (Εικόνα 11). Αν και δεν επηρεάζεται η δράση της τοποϊσομεράσης I να

δημιουργεί ρήγματα, η CPT αναστέλλει το στάδιο επανασύνδεσης των αλυσίδων του DNA. Η σύγκρουση της διχάλας αντιγραφής με τη σπασμένη αλυσίδα του DNA προκαλεί μη αντιστρέψιμο δίκλωνο ρήγμα στο DNA το οποίο σταματάει την κυτταρική διαίρεση και οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο. Αυτά τα γεγονότα συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της φάσης S του κυτταρικού κύκλου, και η δράση της CPT θεωρείται ότι εξαρτάται από τον κυτταρικό κύκλο. Ωστόσο έχουν αναφερθεί μελέτες, οι οποίες δείχνουν ότι οι CPTs έχουν ανάλογες επιδράσεις και σε κύτταρα που δεν βρίσκονται στη φάση σύνθεσης DNA. Οι μηχανισμοί κυτταροτοξικότητας που εξαρτώνται από την αντιγραφή ίσως περιλαμβάνουν πρωτεάσες σερίνης και ενδονουκλεάσες.



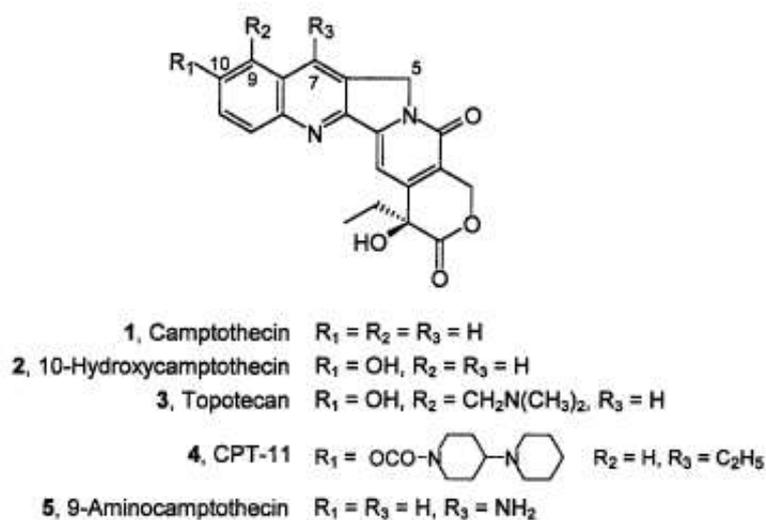
Εικόνα 11: Σύνδεση της CPT στο σύμπλοκο τοποϊσομεράσης I-DNA

Οι καμπτοθεκίνες είναι οι μόνοι κλινικά εγκεκριμένοι αναστολείς της τοποϊσομεράσης I. Παρά τη δράση τους ενάντια στον καρκίνο του παχέος εντέρου, του πνεύμονα και των ωοθηκών έχουν τέσσερις βασικούς περιορισμούς: (1) είναι χημικά ασταθείς και απενεργοποιούνται γρήγορα μετά από καρβοξυλίωση στο αίμα (Εικόνα 12), (2) η πρόσδεσή τους στο σύμπλοκο DNA-τοποϊσομεράσης I είναι αντιστρεπτή, γεγονός που απαιτεί παρατεταμένες εγχύσεις, (3) κύτταρα που υπερεκφράζουν τους μεμβρανικούς μεταφορείς εκροής των φαρμάκων ABCG2 και ABCB1 είναι ανθεκτικά στις CPTs και (4) οι παρενέργειες τους είναι δοσο-εξαρτώμενες και αρκετά σοβαρές σε μερικές περιπτώσεις (π.χ. ουδετεροπενία).



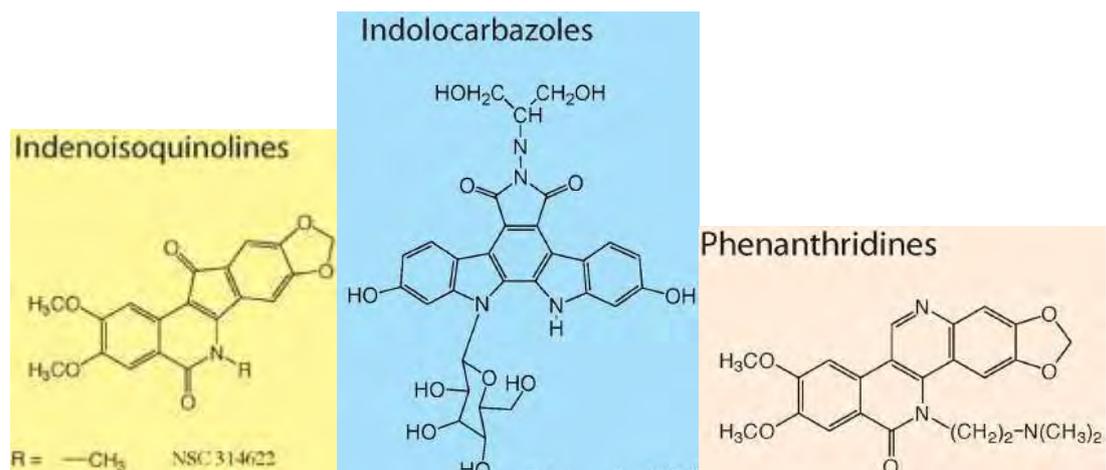
Εικόνα 12: Ισορροπία μεταξύ της ενεργής και της ανενεργής μορφής της CPT

Λόγω της μεγάλης τοξικότητας της CPT και της χαμηλής διαλυτότητας της σε νερό οι έρευνες εστίαστηκαν στην ανακάλυψη αναλόγων της CPT με βελτιωμένες ιδιότητες. Μερικά από τα σημαντικότερα ανάλογα αποτελούν η ιρινοτεκάνη (CPT-11), η τοποτεκάνη και η 9-αμινοκαμπτοθεκίνη (9-AC), η χημική δομή των οποίων παρουσιάζεται στην εικόνα 13 (Πίνακας 2) (Rothenberg, 1997).



Εικόνα 13: Χημικές δομές της καμπτοθεκίνης και των αναλόγων της

Τα τελευταία χρόνια, εκτός από τις καμπτοθεκίνες, ανακαλύφθηκαν και άλλες ενώσεις που μπορούν να δράσουν ως αναστολείς των τοποϊσομερασών I. Αυτές περιλαμβάνουν τις ινδενοσοκινολόνες (indenoisoquinolines), τις ινδολοκαρβαζόλες (indolocarbazoles) και τις φαινανθριδίνες (phenanthridines) και η χημική τους δομή φαίνεται στην εικόνα 14 (Πίνακας 2) (Pommier, 2009).



Εικόνα 14: Χημικές δομές μη καμπτοθεκινικών παραγώγων

Clinically relevant camptothecin derivatives	Noncamptothecin derivatives
Topotecan (Hycamtin)	Indolocarbazoles (NB-506, rebeccamycin)
Irinotecan (CPT-11, Camptosar)	Intoplicine
Exatecan mesylate (DX-8951f)	Ecteinascedin 743
9-Aminocamptothecin	Hoechst 33342
Rubitecan (9-nitrocamptothecin)	Nitidine, fagaronine
Homocamptothecin	Indenoisoquinolines

Πίνακας 2: Παράγωγα της CPT και μη καμπτοθεκινικά παράγωγα

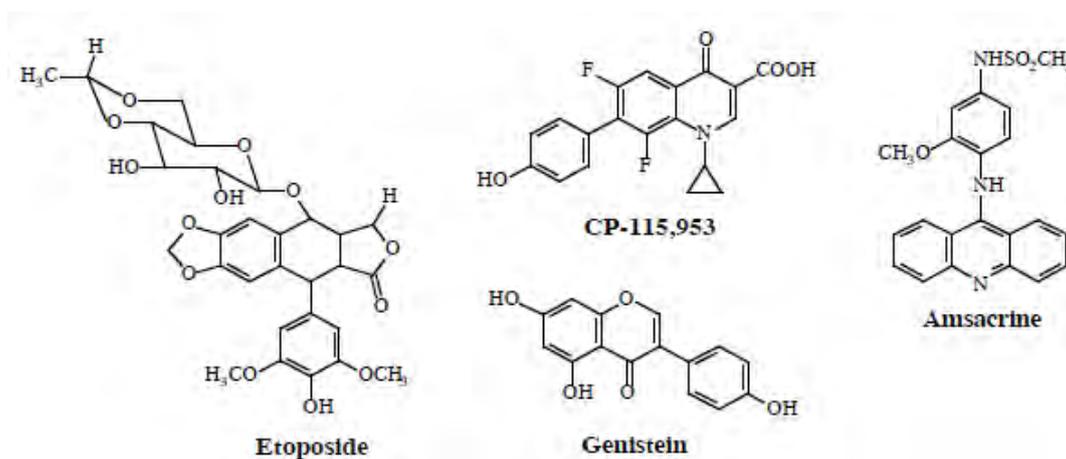
### 1.7.2. Καταλυτικοί αναστολείς (suppressors) των τοποϊσομερασών I

Σε αντίθεση με τους αναστολείς δηλητήρια (poisons), οι καταλυτικοί αναστολείς (suppressors) δεν σταθεροποιούν το σύμπλοκο DNA-ενζύμου, αλλά συνδέονται στο DNA και αλλάζουν τη δομή του, εμποδίζοντας την πρόσδεση της τοποϊσομεράσης I. Γνωστοί αναστολείς της κατηγορίας αυτής είναι η δοξορουβικίνη, η ακλασινομυκίνη A, και οι TAN-1518 A και B. Ωστόσο δεν υπάρχουν συγκεκριμένα δεδομένα που να υποστηρίζουν πως οι αναστολείς αυτοί είναι ειδικό για τις τοποϊσομεράσες τύπου I (Pommier et al, 1998).

### 1.7.3. Αναστολείς δηλητήρια (poisons) των τοποϊσομερασών II

Οι αναστολείς δηλητήρια των τοποϊσομερασών II χρησιμοποιούν και τους δύο μηχανισμούς δράσης, δηλαδή κάποια μόρια προάγουν τη δημιουργία συμπλόκου και άλλα μόρια δρουν στο ήδη δημιουργημένο σύμπλοκο DNA-ενζύμου, αντίθετα από τους αναστολείς δηλητήρια των τοποϊσομερασών I, οι οποίοι κυρίως αναστέλλουν την επανασύνδεση των κλώνων (Froelich-Ammon et al, 1995).

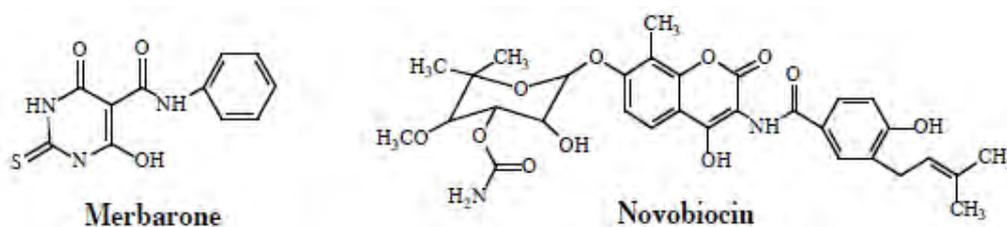
Μερικά από τα πιο γνωστά φάρμακα που δρουν ως αναστολείς δηλητήρια των τοποϊσομερασών II είναι η ετοποσίδη, η γενιστεΐνη, η CP-115,953 και η αμσακρίνη. Η ετοποσίδη είναι ένας από τους πρώτους αντικαρκινικούς παράγοντες που ταυτοποιήθηκαν και στοχεύουν ενάντια στην τοποϊσομεράση II (Εικόνα 15) (Baldwin et al, 2005). Η γενιστεΐνη ανήκει στην κατηγορία των φλαβονοειδών και θεωρείται ότι έχει χημειοπροστατευτική δράση.



Εικόνα 15: Χημικές δομές αναστολών δηλητήρια των τοποϊσομερασών II

#### 1.7.4. Καταλυτικοί αναστολείς (suppressors) των τοποϊσομερασών II

Τα φάρμακα αυτά δεν βοηθούν στη δημιουργία συμπλόκου DNA-ενζύμου, αλλά αναστέλλουν συγκεκριμένα στάδια του καταλυτικού κύκλου της τοποϊσομεράσης II. Για παράδειγμα, παράγοντες όπως η νοβοβιοκίνη αναστέλλουν τη δέσμευση του μορίου ATP. Από την άλλη, η μερβαρόνη (merbarone) μπλοκάρει τη δημιουργία ρήγματος στο DNA από την τοποϊσομεράση II (Fortune et al, 1998). Οι χημικές δομές των προαναφερθέντων ενώσεων παρατηρούνται στην εικόνα 16.



Εικόνα 16: Χημικές δομές καταλυτικών αναστολέων τοποϊσομερασών II

## 1.8. Πολυσταδιακό μοντέλο καρκινογένεσης

Έχει αποδειχθεί ότι η μετατροπή ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό δεν αποτελεί διαδικασία ενός σταδίου. Το πολυσταδιακό μοντέλο καρκινογένεσης περιλαμβάνει την ανάπτυξη διάφορων φαινοτυπικών αλλοιώσεων, όπως την απώλεια της ικανότητας του κυττάρου να φτάσει σε τελική διαφοροποίηση, την απώλεια της ρύθμισης του πολλαπλασιασμού ή της αναστολής πολλαπλασιασμού, την απώλεια της ικανότητας να επικοινωνεί με τα γειτονικά κύτταρα και την ικανότητα διήθησης και μετάστασης.

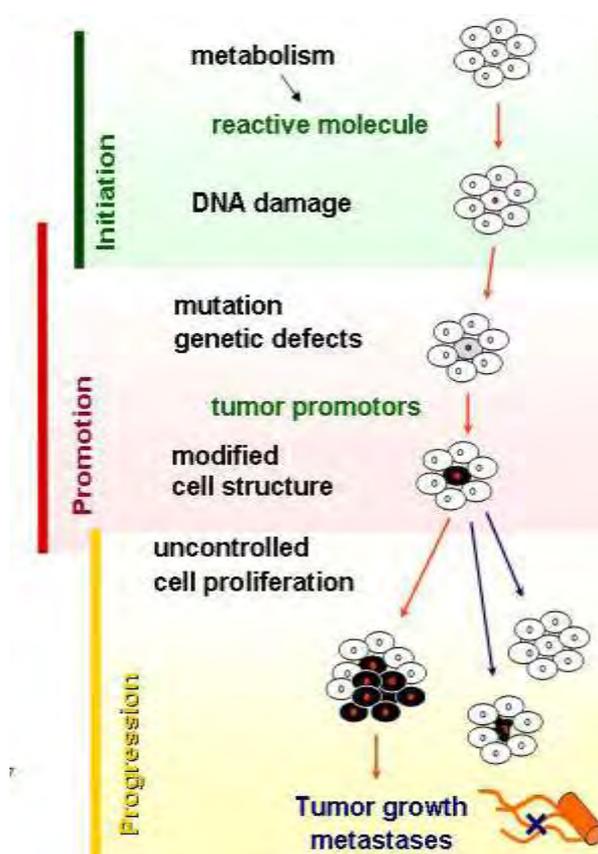
Το πολυσταδιακό μοντέλο καρκινογένεσης περιλαμβάνει τρία στάδια, που στηρίζονται σε διαφορετικούς μηχανισμούς εξέλιξης.

α) Ο βασικός μηχανισμός που διέπει το πρώτο στάδιο ή στάδιο έναρξης (initiation) της καρκινογενετικής διαδικασίας είναι η πρόκληση μεταλλάξεων σε ένα μη διαφοροποιημένο κύτταρο (stem cell). Κάτω από την επίδραση ενός μεταλλαξιγόνου παράγοντα, προκαλείται μετάλλαξη, πιθανότατα σε γονίδια που σχετίζονται με την ικανότητα του κυττάρου να φτάσει σε τελική διαφοροποίηση, δίνοντας γένεση σε ένα κύτταρο που έχει την ικανότητα συνεχούς αυτοανανέωσης (self renewal) ή αλλιώς ένα κύτταρο, που κάτω από τις κατάλληλες συνθήκες μπορεί να εκτελεί μεγαλύτερο αριθμό μιτώσεων, από ότι θα έκανε υπό φυσιολογικές συνθήκες.

β) Ο βασικός μηχανισμός που διέπει το δεύτερο στάδιο της προαγωγής (promotion) της καρκινογενετικής διαδικασίας, είναι ο κλωνικός πολλαπλασιασμός των αρχικά μεταλλαγμένων (initiated) κυττάρων μέσω της επίδρασης παραγόντων που προάγουν την μίτωση (προαγωγείς). Το στάδιο αυτό είναι αντιστρεπτό με την απομάκρυνση του μιτογόνου παράγοντα. Καθώς το μεταλλαγμένο (initiated) κύτταρο διαιρείται, αντί να οδηγηθεί προς θάνατο, προχωρά στην επόμενη κυτταρική διαίρεση, με αποτέλεσμα να προστίθενται βλάβες στο γονιδίωμα των θυγατρικών κυττάρων. Από τα κύτταρα που προκύπτουν κάποιο αποκτά μια κρίσιμη μετάλλαξη, η οποία το μετατρέπει στο πρώτο προκαρκινικό κύτταρο.

γ) Στο τρίτο στάδιο της προόδου (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 γενετικές μεταλλάξεις που αθροιστικά δίνουν τον καρκινικό φαινότυπο. Τουλάχιστον δύο γενετικές βλάβες είναι απαραίτητες για την καρκινική εξαλλαγή και υπάρχουν ενδείξεις ότι η δεύτερη βλάβη αφορά την απαλοιφή ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι στην ανάπτυξη των

περισσότερων καρκίνων είναι απαραίτητες περισσότερες από δύο γενετικές βλάβες (Εικόνα 17).



Εικόνα 17: Πολυσταδιακό μοντέλο καρκίνου

### 1.9. Χημειοπροφύλαξη

Ο όρος χημειοπροφύλαξη, όπως προτάθηκε από τον Sporn το 1976, είναι η αντιστροφή, η αναστολή ή η πρόληψη της καρκινογενετικής διαδικασίας με τη χορήγηση φυσικών, συνθετικών ή βιολογικών χημικών παραγόντων. Η χημειοπροφύλαξη βασίζεται στο πολυσταδιακό μοντέλο της καρκινογένεσης (Tsao et al, 2004). Οι χημειοπροφυλακτικοί παράγοντες ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες με βάση τη χρονική περίοδο στην οποία εμφανίζουν τη δράση τους: (1) αναστολείς σχηματισμού του καρκινογόνου, (2) παράγοντες παρεμπόδισης της δράσης του καρκινογόνου, οι οποίοι αναστέλλουν το στάδιο έναρξης (initiation) της καρκινογενετικής διαδικασίας και (3) παράγοντες καταστολής και παρεμπόδισης της νεοπλασματικής ανάπτυξης, οι οποίοι αναστέλλουν την προαγωγική/προοδευτική φάση της καρκινογένεσης (promotion/progression) (Wattenberg, 1985).

Πολλές χημικές ενώσεις που είναι συστατικά των φυτικών τροφών παρουσιάζουν σημαντικές χημειοπροφυλακτικές ιδιότητες.

#### 1.9.1. Πολυφαινόλες ως χημειοπροφυλακτικοί παράγοντες

Ένας μεγάλος αριθμός *in vivo* (ζωϊκά μοντέλα) και *in vitro* (κυτταροκαλλιέργειες) μελετών υποστηρίζουν ότι αρκετές πολυφαινόλες, ενδεικτικά η κερκετίνη, οι κατεχίνες και οι λιγνάνες, δρουν ως χημειοπροφυλακτικοί παράγοντες. Διαφορετικοί μηχανισμοί έχουν προταθεί για να εξηγήσουν τη δράση των πολυφαινολών ενάντια στη καρκινογένεση (Scalbert et al, 2005). Οι μηχανισμοί που αναφέρονται παρακάτω αφορούν κυρίως τα φλαβονοειδή.

##### *1.9.1.1. Πρόληψη μεταβολικής ενεργοποίησης καρκινογόνων*

Μελέτες υποδεικνύουν ότι μερικά φλαβονοειδή ρυθμίζουν τον μεταβολισμό των καρκινογόνων και με τον τρόπο αυτό μπορούν να συμβάλλουν στην πρόληψη του καρκίνου. Ένας μηχανισμός μέσω του οποίου τα φλαβονοειδή ασκούν τη δράση τους είναι αλληλεπιδρώντας με τα ένζυμα μεταβολισμού της φάσης I (ισοένζυμα του κυτοχρώματος P450), τα οποία ενεργοποιούν μέσω του μεταβολισμού έναν μεγάλο αριθμό προκαρκινογόνων σε ενεργά ενδιάμεσα. Αυτά τα ενεργά ενδιάμεσα μπορούν να αλληλεπιδράσουν με πυρηνόφιλα των κυττάρων και τελικά να προκαλέσουν καρκινογένεση. Έχει αποδειχθεί ότι τα φλαβονοειδή αναστέλλουν τη δράση συγκεκριμένων ισοενζύμων του κυτοχρώματος P450, όπως το CYP1A1 και το CYP1A2, και επομένως παρέχουν προστασία ενάντια στην επαγωγή κυτταρικής βλάβης από την ενεργοποίηση των καρκινογόνων.

Ένας άλλος μηχανισμός δράσης των φλαβονοειδών είναι η επαγωγή των ενζύμων μεταβολισμού της φάσης II, όπως η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης, η ρεδουκτάση της κινόνης και η UDP-γλυκουρονυλοτρανσφεράση. Μέσω αυτών των ενζύμων τα καρκινογόνα αποτοξινώνονται κι επομένως αποβάλλονται πιο εύκολα από τον οργανισμό.

Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι μερικά φλαβονοειδή δρουν ως ισχυροί αναστολείς της αρωματάσης. Η οιστραδιόλη, το πιο ισχυρό ενδογενές οιστρογόνο, βιοσυντίθενται από ανδρογόνα μέσω του ενζυμικού συμπλόκου του κυτοχρώματος P450 που ονομάζεται αρωματάση. Μέσω της αναστολής της αρωματάσης μειώνονται οι αυξητικές επιδράσεις των οιστρογόνων στους ορμονο-εξαρτώμενους καρκίνους.

### 1.9.1.2. Αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού

Η πρόληψη του καρκίνου σχετίζεται με την αναστολή, την αντιστροφή ή την επιβράδυνση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Τα περισσότερα φλαβονοειδή έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό σε πολλά είδη ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών (Πίνακας 3).

<i>Cancer</i>	<i>Cell</i>	<i>Flavonoid</i>
Human oral cancer	HSC-2, HSG, SCC-25	Flavanones, isoflavans, EGC, chalcones, EGCG, curcumin, genistein, ECG, quercetin, cisplatin
Human breast cancer	MCF-7	Flavanones, daidzein, genistein, quercetin, luteolin
Human thyroid cancer	ARO, NPA, WRO	Genistein, apigenin, kaempferol, chrysin, luteolin, biochanin A
Human lung cancer	SK-LUI, SW900, H441, H661, haGo-K-1, A549	Flavone, quercetin
Human prostate cancer	LNCaP, PC3, DU145	Catechin, epicatechin, quercetin, kaempferol, luteolin, genistein, apigenin, myricetin, silymarin
Human colon cancer	Caco-2, HT-29, IEC-6, HCT-15	Flavone, quercetin, genistein, anthocyanin
Human leukaemia	HL-60, K562, Jurkat	Apigenin, quercetin, myricetin, chalcones
B16 mouse melanoma	4A5	Chalcones

Πίνακας 3: Φλαβονοειδή με προστατευτική δράση σε καρκινώματα και καρκινικές κυτταρικές σειρές

Ο μοριακός μηχανισμός της προστατευτικής δράσης των φλαβονοειδών περιλαμβάνει την αναστολή της προοξειδωτικής διαδικασίας που προκαλεί την προαγωγή του καρκίνου (promotion). Ο σχηματισμός δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) είναι ο κύριος καταλύτης των φάσεων προαγωγής και προόδου (progression) της καρκινογενετικής διαδικασίας. Τα προοξειδωτικά ένζυμα που ενεργοποιούνται από διάφορους προαγωγείς καρκίνου (tumor promoters) περιλαμβάνουν τα ένζυμα που μεταβολίζουν το αραχιδονικό (arachidonate), τις κυκλοοξυγενάσες (COX), και τις λιποξυγενάσες (LOX). Τα φλαβονοειδή είναι αποτελεσματικά στην αναστολή της οξειδάσης της ξανθίνης, των COX και των LOX και συνεπώς αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων.

Επιπλέον, η αναστολή της βιοσύνθεσης των πολυαμινών μπορεί να συμβάλει στην αναστολή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων. Η αποκαρβοξυλάση

της ορνιθίνης είναι ένα ένζυμο της βιοσύνθεσης πολυαμινών, η οποία σχετίζεται με το ρυθμό της σύνθεσης DNA και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε διάφορους ιστούς. Μελέτες έδειξαν ότι τα φλαβονοειδή αναστέλλουν την αποκαρβοξυλάση της ορνιθίνης που επάγεται από προαγωγείς του καρκίνου, και επομένως προκαλούν μείωση των πολυαμινών και αναστολή της σύνθεσης DNA και πρωτεϊνών.

Τα φλαβονοειδή είναι επίσης αποτελεσματικά στην αναστολή ενζύμων μεταγωγής σήματος, όπως της πρωτεϊνικής κινάσης της τυροσίνης (PTK), της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) και των 3-κινασών των φωσφοϊνοσιτιδίων (PIP3), τα οποία εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Ren et al, 2003, Scalbert et al, 2005).

### *1.9.1.3. Διακοπή του κυτταρικού κύκλου*

Μιτογόνα σήματα αναγκάζουν τα κύτταρα να πραγματοποιήσουν μια σειρά συντονισμένων βημάτων για τη διεξαγωγή του κυτταρικού κύκλου. Η σύνθεση του DNA (S φάση) και ο διαχωρισμός των δύο θυγατρικών κυττάρων (M φάση) είναι τα κύρια σημεία της προόδου του κυτταρικού κύκλου. Το χρονικό διάστημα μεταξύ των φάσεων S και M είναι γνωστό ως G2 φάση. Αυτή η φάση είναι σημαντική διότι επιτρέπει στα κύτταρα να διορθώσουν τα λάθη που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια του διπλασιασμού του DNA, αποτρέποντας την εμφάνιση αυτών των λαθών στα θυγατρικά κύτταρα. Αντιθέτως, η φάση G1 αντιπροσωπεύει την περίοδο μεταξύ των φάσεων M και S κατά την οποία τα κύτταρα προετοιμάζονται για το διπλασιασμό του DNA κατόπιν δράσης μιτογόνων σημάτων.

Οι CDKs (κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες) έχουν αναγνωριστεί ως ρυθμιστές της προόδου του κυτταρικού κύκλου. Τυχόν τροποποίηση ή απορρύθμιση της δράσης των CDKs μπορεί να προκαλέσει νεοπλασία. Διάφοροι τύποι καρκίνων σχετίζονται με αυξημένα επίπεδα CDKs ως αποτέλεσμα μετάλλαξης των γονιδίων τους ή των γονιδίων των αναστολέων τους. Επομένως, οι αναστολείς ή οι ρυθμιστές αυτών των πρωτεϊνών θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως θεραπευτικοί παράγοντες ενάντια στον καρκίνο.

Σε πειράματα καρκινικών κυτταρικών σειρών βρέθηκε ότι τα σημεία ελέγχου G1/S και G2/M του κυτταρικού κύκλου διαταράσσονται από φλαβονοειδή όπως η γενιστεΐνη και η κερκετίνη. Μελέτες αποκάλυψαν ότι η φλαβοπιριδόλη (flavopiridol) μπορεί να επάγει την διακοπή του κυτταρικού κύκλου είτε κατά την φάση G1 είτε κατά την G2/M αναστέλλοντας όλες τις CDKs (Ren et al, 2003).

#### *1.9.1.4. Επαγωγή της απόπτωσης*

Η απόπτωση είναι μια ενεργή μορφή κυτταρικού θανάτου που παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και την επιβίωση μέσω εξάλειψης των ανεπιθύμητων κυττάρων ή των κυττάρων που έχουν υποστεί βλάβη. Ρυθμίζεται άμεσα από μία ομάδα γονιδίων τα οποία προάγουν είτε την απόπτωση είτε την επιβίωση του κυττάρου. Αυτά τα γονίδια ενεργοποιούνται μέσω ενός καλά οργανωμένου δικτύου αλληλεπιδρώντων πρωτεασών και των αναστολέων τους σε απόκριση από επιβλαβή ερεθίσματα εντός ή εκτός του κυττάρου. Η απορρύθμιση της απόπτωσης μπορεί να οδηγήσει στην ογκογένεση.

Έχει αποδειχθεί ότι τα φλαβονοειδή επάγουν την απόπτωση σε μερικές καρκινικές κυτταρικές σειρές, ενώ δεν έχουν την ίδια επίδραση σε φυσιολογικά κύτταρα. Οι μοριακοί μηχανισμοί μέσω των οποίων τα φλαβονοειδή επάγουν την απόπτωση δεν έχουν διευκρινιστεί ακόμη. Θεωρείται ότι εμπλέκονται διάφοροι μηχανισμοί, όπως η αναστολή της δράσης των τοποϊσομερασών I και II, η μείωση των δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS), η ρύθμιση της έκφρασης των πρωτεϊνών θερμικού σοκ, η ρύθμιση μονοπατιών σηματοδότησης, η απελευθέρωση του κυτοχρώματος c με επακόλουθη ενεργοποίηση της κασπάσης-9 και της κασπάσης-3, αρνητική ρύθμιση της έκφρασης των πρωτεϊνών Bcl-2 και Bcl-X(L) αλλά προαγωγή της έκφρασης των Bax και Bak, του πυρηνικού παράγοντα μεταγραφής kappaB (NF kappaB), ενεργοποίηση ενδονουκλεασών, και καταστολή της πρωτεΐνης Mcl-1.

#### *1.9.1.5. Προαγωγή της κυτταρικής διαφοροποίησης*

Συγκεκριμένα φλαβονοειδή έχουν την δυνατότητα να προκαλούν τη διαφοροποίηση μη-διαφοροποιημένων καρκινικών κυτταρικών σειρών σε κύτταρα με ώριμα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά. Οι φλαβόνες γενιστεΐνη, απιγενίνη, λουτεολίνη, κερκετίνη και φλορετίνη βρέθηκε ότι επάγουν τη διαφοροποίηση ανθρώπινων λευχαιμικών κυττάρων HL-60 (οξείας μυελογενούς λευχαιμίας) σε κοκκιοκύτταρα και μονοκύτταρα. Η ισοφλαβόνη ντεΐζεΐνη παρουσιάζει ανάλογη δραστηριότητα. Η επαγωγή της τελικής διαφοροποίησης από τα φλαβονοειδή οδηγεί σε εξάλειψη των ογκογενετικών κυττάρων και εξισορρόπηση της κυτταρικής ομοιόστασης.

#### *1.9.1.6. Αντιοξειδωτική δράση*

Τα φλαβονοειδή είναι φυσικά αντιοξειδωτικά. Εμφανίζουν τις αντικαρκινικές τους ιδιότητες περιορίζοντας τις βλαβερές επιπτώσεις των οξειδωτικών αντιδράσεων στα κύτταρα, οι οποίες πιθανόν προδιαθέτουν την ανάπτυξη καρκίνου. Οι ελεύθερες ρίζες

οξυγόνου εμπλέκονται στα στάδια της έναρξης (initiation) και προαγωγής (promotion) της καρκινογενετικής διαδικασίας. Τα προϊόντα της λιπιδικής υπεροξειδωσης που προέρχονται από κύτταρα που βρίσκονται σε απόπτωση εμπλέκονται επίσης στο στάδιο της προαγωγής. Η οξειδωση του DNA είναι μία σημαντική αιτία μετάλλαξης η οποία δυνητικά μπορεί να μειωθεί μέσω της δράσης των αντιοξειδωτικών.

Τα φλαβονοειδή είναι δότες ενός ηλεκτρονίου. Έχουν την ικανότητα να λειτουργούν ως αντιοξειδωτικά απομακρύνοντας ανιόντα υπεροξειδίου, ρίζες οξυγόνου, ρίζες λιπιδικών υπεροξειδίων, και/ή σταθεροποιώντας τις ελεύθερες ρίζες που εμπλέκονται σε οξειδωτικές διαδικασίες. Μελέτες *in vitro* δείχνουν ότι οι φλαβόνες, οι φλαβονόλες και οι ανθοκυανίνες παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση, κυρίως απομακρύνοντας ρίζες οξυγόνου. Επίσης *in vivo* μελέτες έχουν δείξει ότι τα φλαβονοειδή αναστέλλουν την οξειδωση της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL), πιθανόν μέσω αναγωγής ή σύνδεσης με πρωτεΐνες.

#### 1.9.1.7. Αναστολή της αγγειογενετικής διαδικασίας

Τα φλαβονοειδή είναι γνωστοί αναστολείς της αγγειογένεσης. Η ικανότητα συγκεκριμένων φλαβονοειδών να περιορίζουν την ανάπτυξη στερεών όγκων οφείλεται στο γεγονός ότι αναστέλλουν την νεοαγγειογενετική διαδικασία.

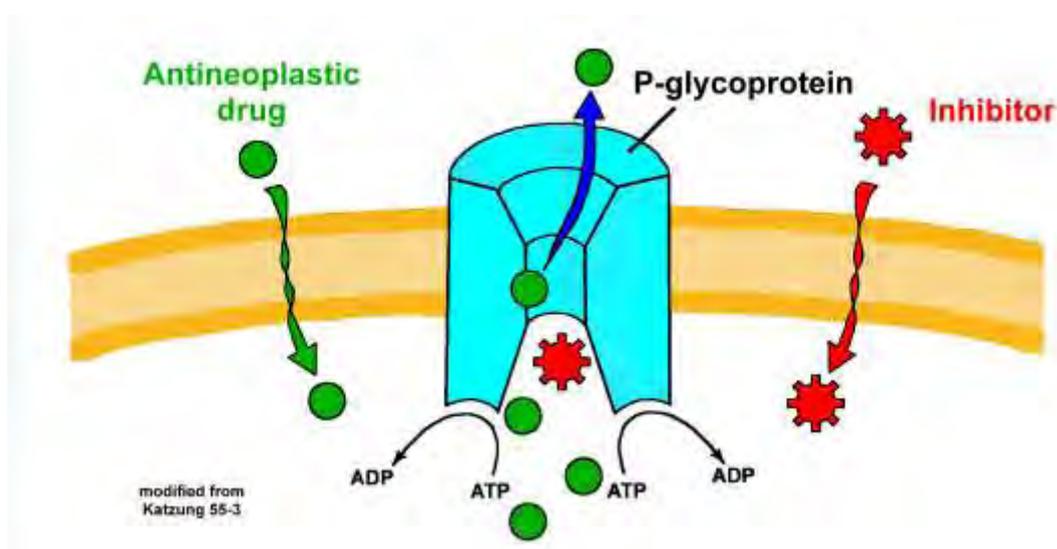
Η αγγειογένεση είναι μια αυστηρά ελεγχόμενη διαδικασία που συμβαίνει φυσιολογικά στον οργανισμό των ενηλίκων, και η οποία ρυθμίζεται από μια ποικιλία ενδογενών αγγειογενετικών και αγγειοστατικών παραγόντων. Ωστόσο, παθολογική αγγειογένεση μπορεί να εμφανιστεί και σε όγκους διότι καθώς αυξάνεται ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυττάρων, είναι απαραίτητη η συνεχής παροχή θρεπτικών συστατικών και οξυγόνου. Οι αναστολείς της αγγειογένεσης, όπως τα φλαβονοειδή, είναι ικανοί να παρεμβαίνουν στα διάφορα στάδια της αγγειογένεσης, όπως ο πολλαπλασιασμός και η μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Επομένως, τα φλαβονοειδή μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως θεραπευτικοί παράγοντες στερεών όγκων.

#### 1.9.1.8. Ρύθμιση της πολυφαρμακευτικής αντοχής

Η πολυφαρμακευτική αντοχή που οφείλεται στην P-γλυκοπρωτεΐνη (Pgp), γνωστή και ως MRP (multidrug resistance associated protein), εμποδίζει την επιτυχή χημειοθεραπεία κατά του καρκίνου. Έχουν γίνει αρκετές προσπάθειες για ρύθμιση της πολυφαρμακευτικής αντοχής με τη χρήση συγκεκριμένων αναστολέων, αλλά με

σχετικά μικρή επιτυχία επειδή οι αναστολείς αυτοί είχαν και άλλους κυτταρικούς στόχους.

Έχει αναφερθεί ότι συγκεκριμένα φλαβονοειδή παρουσιάζουν ανασταλτική δράση ενάντια στην Pgp. Η Pgp είναι μια ATP-εξαρτώμενη μεμβρανική πρωτεΐνη αντλία (ATP-binding cassette transporter) που μεταφέρει το φάρμακο εκτός του κυττάρου μέσω υδρόλυσης ATP. Αποτελείται από δύο ομόλογες υπομονάδες που η κάθε μία περιέχει μια διαμεμβρανική δομή η οποία εμπλέκεται στη δέσμευση και την εκροή του φαρμάκου, και μια κυτταροπλασματική δομή που εμπλέκεται στη δέσμευση και την υδρόλυση ATP. Τα φλαβονοειδή ρυθμίζουν την πολυφαρμακευτική αντοχή μέσω (α) αναστολής της υπερέκφρασης του γονιδίου MDR1 (multidrug resistance gene-1), (β) σύνδεσης στην κυτταροπλασματική περιοχή της Pgp, (γ) αναστολής της δράσης της ATPάσης (Εικόνα 18) (Ren et al, 2003).



Εικόνα 18: Αναστολή της πολυφαρμακευτικής αντοχής που οφείλεται στην P-γλυκοπρωτεΐνη

### 1.10. Πολυφαινόλες ως αναστολείς τοποϊσομερασών

Αρκετές πολυφαινόλες όπως ταννίνες, κατεχίνες, φλαβόνες και ισοφλαβόνες έχουν ταυτοποιηθεί ως αναστολείς δηλητήρια των τοποϊσομερασών τύπου II. Φλαβονοειδή όπως η μυρικετίνη, η κερκετίνη, η φισετίνη και η μορίνη αναστέλλουν τις τοποϊσομεράσες I και II, ενώ η φλορετίνη, η καμπφερόλη και η 4',6,7-τριυδροξυισοφλαβόνη αναστέλλουν μόνο την τοποϊσομεράση II. Όλα τα φλαβονοειδή εξετάστηκαν περαιτέρω σχετικά με την ικανότητά τους να δρουν ως αναστολείς δηλητήρια των τοποϊσομερασών I ή II. Κανένα φλαβονοειδές δε φάνηκε να σταθεροποιεί το σύμπλοκο τοποϊσομεράσης I-DNA. Αντιθέτως, η προυνετίνη, η

κερκετίνη, η καιμπερόλη, και η απιγενίνη σταθεροποίησαν το σύμπλοκο τοποϊσομεράσης II-DNA. Εκτός των φλαβονοειδών, άλλες πολυφαινόλες όπως το ελλαγικό οξύ αλληλεπιδρούν και με τους δύο τύπους τοποϊσομερασών (Ferguson, 2001).

Επίσης πολλά γλυκοσίδια φλαβονών, όπως η οριεντίνη, έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν την δράση της τοποϊσομεράσης I. Πολλά από αυτά τα πολυφαινολικά μόρια είναι ικανά να δρουν ταυτόχρονα και ως καταλυτικοί αναστολείς (suppressors), αλλά και ως αναστολείς δηλητήρια (poisons), παρεμβαίνοντας τόσο στο DNA όσο και στο σύμπλοκο που σχηματίζει με το ένζυμο (Webb et al., 2004).

### **1.11. Πολυφαινόλες**

Οι πολυφαινόλες είναι μια μεγάλη και ετερογενής κατηγορία χημικών ενώσεων που παράγονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες από τα φυτά. Οι γνωστές πολυφαινόλες υπολογίζονται σήμερα σε περισσότερες από 8000. Είναι απαραίτητες για τη φυσιολογία του φυτού διότι συμβάλλουν στην μορφολογία, την αναπαραγωγή και παρέχουν προστασία στα φυτά από διάφορα παθογόνα. Στην πλειοψηφία τους οι πολυφαινόλες εμφανίζονται συζευγμένες με υδατάνθρακες μέσω των υδροξυλίων τους. Τα σάκχαρα αυτά μπορεί να είναι μονοσακχαρίτες, δισακχαρίτες ή ολιγοσακχαρίτες. Το σάκχαρο που εμφανίζεται συχνότερα είναι η γλυκόζη (Bravo, 1998).

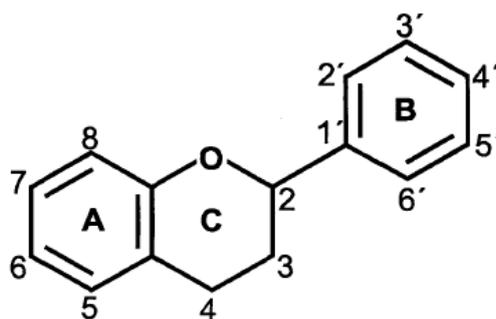
Οι πολυφαινόλες εμπεριέχονται σε φρούτα, λαχανικά, δημητριακά, ελαιόλαδο, ξηρούς καρπούς, σοκολάτα και σε ποτά όπως το τσάι, ο καφές και το κρασί. Ενδεικτικά, τα σταφύλια είναι πλούσια σε πολυφαινόλες και το 60-70% περίπου των πολυφαινολών βρίσκεται στους σπόρους (Nassiri-Asl et al, 2009). Η συγκέντρωση πολυφαινολών στα τρόφιμα είναι συνάρτηση τόσο γενετικών όσο και περιβαλλοντικών παραμέτρων.

Οι πολυφαινόλες περιλαμβάνουν μια ευρεία ποικιλία μορίων που αποτελούνται από αρωματικούς δακτυλίους με αρκετές υδροξυλικές ομάδες, αλλά και μόρια με έναν φαινολικό δακτύλιο, όπως τα φαινολικά οξέα και οι φαινολικές αλκοόλες. Οι πολυφαινόλες χωρίζονται σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με τον αριθμό των φαινολικών δακτυλίων που περιέχουν και με τα δομικά στοιχεία που συνδέουν αυτούς τους δακτυλίους μεταξύ τους. Οι κύριες ομάδες πολυφαινολών είναι τα φλαβονοειδή,

τα φαινολικά οξέα, οι φαινολικές αλκοόλες, τα στυλβένια και οι λιγνάνες (D' Archivio et al, 2007).

### 1.11.1. Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή αποτελούν περίπου τα 2/3 της συνολικής πρόσληψης πολυφαινολών μέσω της διατροφής (Scalbert et al, 2000). Βιοσυντίθενται από τη φαινυλαλανίνη και το μαλονυλοσυνένζυμο Α μέσω της βιοσυνθετικής οδού του οξικού-μαλονικού οξέος (Winkel-Shirley, 2001). Διαθέτουν μία κοινή δομή η οποία περιλαμβάνει δύο βενζολικούς δακτυλίους (Α και Β) που συνδέονται με μία γραμμική αλυσίδα τριών ανθράκων. Η κεντρική αυτή αλυσίδα μπορεί να σχηματίζει έναν πυρανικό δακτύλιο (C) με τον έναν από τους δύο βενζολικούς δακτυλίους, όπως φαίνεται στην εικόνα 19 (D' Archivio et al, 2007). Περιστασιακά, εμφανίζονται στα φυτά ως αγλυκόνες, αλλά κυρίως απαντώνται συζευγμένα με σάκχαρα (Bravo, 1998).



Εικόνα 19: Χημική δομή φλαβονοειδών

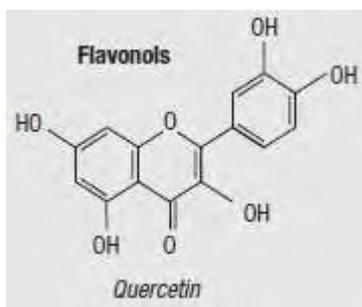
Μέχρι στιγμής, περισσότερα από 4000 φλαβονοειδή έχουν ταυτοποιηθεί στα φυτά. Τα φλαβονοειδή χωρίζονται σε έξι υποκατηγορίες, ανάλογα με την οξειδωτική κατάσταση του δακτυλίου C: τις φλαβονόλες, τις φλαβόνες, τις φλαβανόνες, τα ισοφλαβονοειδή, τις ανθοκυανιδίνες και τις φλαβανόλες (Πίνακας 4) (D' Archivio et al, 2007, Ren et al, 2003).

<i>Flavonoid subgroup</i>	<i>Representative flavonoids</i>	<i>Major food sources</i>
Flavonols	Kaempferol, myricetin, quercetin, rutin	Onions, cherries, apples, broccoli, kale, tomato, berries, tea, red wine, tartary buckwheat
Flavones	Apigenin, chrysin, luteolin	Parsley, thyme
Isoflavones	Daidzein, genistein, glycitein, formononetin	Soya beans, legumes
Flavanols	Catechin, gallocatechin	Apples, tea
Flavanones	Eriodictyol, hesperitin, naringenin	Oranges, grapefruit
Flavanonols	Taxifolin	Limon, aurantium

Πίνακας 4: Υποοικογένειες φλαβονοειδών με τα αντιπροσωπευτικά μέλη τους και τις κύριες διατροφικές πηγές πρόσληψής τους

#### 1.11.1.1. Φλαβονόλες

Οι φλαβονόλες έχουν έναν διπλό δεσμό μεταξύ των ανθράκων C<sub>2</sub> και C<sub>3</sub>, με μία υδροξυλική ομάδα στη θέση C<sub>3</sub> του δακτυλίου C. Είναι τα πιο ευρέως διαδεδομένα φλαβονοειδή στα τρόφιμα, με την κερκετίνη να θεωρείται η πιο αντιπροσωπευτική ένωση (Εικόνα 20). Οι κύριες πηγές φλαβονολών είναι τα κρεμμύδια, τα πράσα, το μπρόκολο, το λάχανο και τα βατόμουρα. Το τσάι και το κρασί επίσης περιέχουν μέχρι και 45 mg και 30 mg φλαβονολών/L αντίστοιχα. Η βιοσύνθεση των φλαβονολών είναι άμεσα εξαρτώμενη από το ηλιακό φως, με αποτέλεσμα να υπάρχουν διαφορές στη συγκέντρωση μεταξύ φρούτων του ίδιου φυτού και μεταξύ διαφορετικών πλευρών του ίδιου φρούτου (D' Archivio et al, 2007).



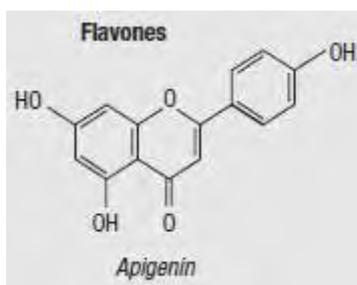
Εικόνα 20: Χημική δομή κερκετίνης

Οι φλαβονόλες που έχουν βρεθεί σε σπόρους σταφυλιών περιλαμβάνουν 3-O-γλυκοσίδα της καιμπερόλης και 3-O-γλυκοσίδα της κερκετίνης και της μυρικετίνης (Nassiri-Asl et al, 2009).

#### 1.11.1.2. Φλαβόνες

Οι φλαβόνες έχουν έναν διπλό δεσμό μεταξύ των ανθράκων C<sub>2</sub> και C<sub>3</sub> του δακτυλίου C και είναι τα λιγότερο κοινά φλαβονοειδή. Ο μαϊντανός και το σέλινο

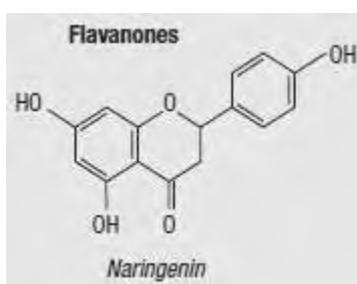
αντιπροσωπεύουν τις κυριότερες πηγές φλαβονών. Οι κύριοι εκπρόσωποι αυτής της κατηγορίας είναι η λουτεολίνη και η απιγενίνη, η χημική δομή της οποίας φαίνεται στην εικόνα 21. Επίσης, ο φλοιός των φρούτων περιέχει μεγάλες ποσότητες πολυμεθοξυλιωμένων (CH<sub>3</sub>O-) φλαβονών. και ενδεικτικά ο φλοιός του μανταρινιού περιέχει μέχρι και 6.5 g/L φλαβονών.



Εικόνα 21: Χημική δομή απιγενίνης

#### 1.11.1.3. Φλαβανόνες

Οι φλαβανόνες χαρακτηρίζονται από την παρουσία ενός ατόμου οξυγόνου στον άνθρακα C<sub>4</sub>. Γενικά απαντώνται σε γλυκοσυλιωμένη μορφή, συνδεδεμένες με έναν δισακχαρίτη στον άνθρακα C<sub>7</sub>. Οι φλαβανόνες βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις μόνο στα εσπεριδοειδή, αλλά έχουν βρεθεί και στη ντομάτα και σε ορισμένα αρωματικά φυτά, όπως η μέντα. Οι κύριες αγλυκονικές μορφές είναι η εσπερετίνη στο πορτοκάλι, η εριοδικτυόλη στο λεμόνι και η ναριγενίνη στο γκρέιπφρουτ (Εικόνα 22). Τα στερεά μέρη των εσπεριδοειδών έχουν μεγάλη περιεκτικότητα σε φλαβανόνες, και αυτός είναι ο λόγος που ολόκληρο το φρούτο έχει έως και 5 φορές μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε φλαβανόνες απ' ό,τι ένα ποτήρι χυμού.



Εικόνα 22: Χημική δομή ναριγενίνης

#### 1.11.1.4. Ισοφλαβονοειδή

Τα ισοφλαβονοειδή παρουσιάζουν δομικές ομοιότητες με τα οιστρογόνα. Συγκεκριμένα, έχουν υδροξυλικές ομάδες συνδεδεμένες στις θέσεις C<sub>7</sub> και C<sub>4</sub>, όπως

και το μόριο της οιστραδιόλης. Κατατάσσονται στα φυτοοιστρογόνα λόγω της ικανότητας τους να συνδέονται σε οιστρογονικούς υποδοχείς. Τα ισοφλαβονοειδή περιέχονται σχεδόν αποκλειστικά στα ψυχανθή. Η σόγια και τα κατεργασμένα προϊόντα της αντιπροσωπεύουν την κύρια πηγή ισοφλαβονοειδών, και περιλαμβάνουν τα τρία κυριότερα μόρια αυτής της κατηγορίας, τη γενιστεΐνη, τη γλυκιτεΐνη και την ντεΐζεΐνη που φαίνεται στην εικόνα 23. Οι ενώσεις αυτές απαντώνται ως αγλυκόνες ή, πιο συχνά, συζευγμένες με γλυκόζη. Οι ισοφλαβόνες είναι ευαίσθητες στη θερμότητα και υδρολύονται συχνά κατά τη βιομηχανική επεξεργασία και την αποθήκευσή τους.

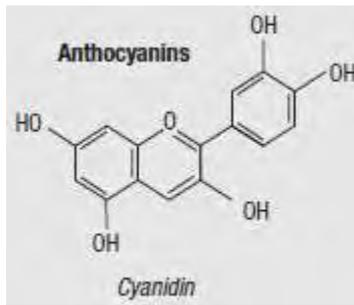


Εικόνα 23: Χημική δομή ντεΐζεΐνης

#### 1.11.1.5. Ανθοκυανίνες

Οι ανθοκυανίνες είναι υδατοδιαλυτές χρωστικές ουσίες, υπεύθυνες για το κόκκινο, το μπλε και το μωβ χρώμα των περισσότερων φρούτων, λαχανικών, λουλουδιών, και άλλων φυτικών ιστών και προϊόντων. Απαντώνται κυρίως ως γλυκοσΐδια των αντίστοιχων αγλυκονικών μορίων, που ονομάζονται ανθοκυανιδίνες, με το σάκχαρο συνδεδεμένο στον άνθρακα C<sub>3</sub> του δακτυλίου C.

Οι ανθοκυανίνες είναι ευρέως διαδεδομένες στην ανθρώπινη διατροφή. Απαντώνται στο κόκκινο κρασί και σε συγκεκριμένες ποικιλίες δημητριακών και λαχανικών όπως το λάχανο, τα φασόλια και τα κρεμμύδια. Ωστόσο, τα φρούτα διαθέτουν την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ανθοκυανίνες. Η περιεκτικότητα των τροφίμων σε ανθοκυανίνες είναι ανάλογη με την ένταση του χρώματός τους και με το στάδιο ωρίμανσης του φρούτου. Οι ανθοκυανίνες απαντώνται κυρίως στο φλοιό, εκτός από κάποια φρούτα κόκκινου χρώματος, όπως τα κεράσια και οι φράουλες, στα οποία ανθοκυανίνες απαντώνται και στη σάρκα. Το κρασί περιέχει έως και 350 mg ανθοκυανινών/L, οι οποίες, καθώς το κρασί ωριμάζει, μετατρέπονται σε διάφορες πολύπλοκες δομές (D' Archivio et al, 2007).



Εικόνα 24: Χημική δομή κυανιδίνης

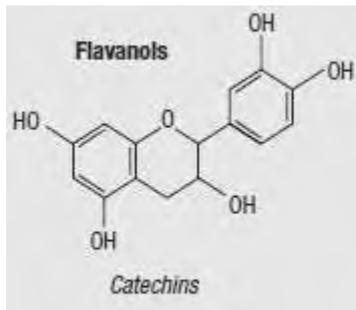
Ο κύριος εκπρόσωπος της κατηγορίας αυτής είναι η κυανιδίνη (Εικόνα 24). Σε σταφύλια έχουν ταυτοποιηθεί οι ακόλουθες ανθοκυανίνες: 3-γλυκοσίδα, 3-ακετυλογλυκοσίδα, 3-κουμαροϋλγλυκοσίδα, 3-καφεοϋλγλυκοσίδα, 3,5-διγλυκοσίδα, 3-ακετυλ-5-διγλυκοσίδα, 3-κουμαροϋλ-5-διγλυκοσίδα και 3-καφεοϋλ-5-διγλυκοσίδα της κυανιδίνης, της δελφινιδίνης, της πεονιδίνης, της πετουνιδίνης και της μαλβιδίνης (Nassiri-Asl et al, 2009).

#### 1.11.1.6. Φλαβανόλες

Οι φλαβανόλες περιέχουν μία υδροξυλική ομάδα στον άνθρακα C<sub>3</sub> του δακτυλίου C. Σε αντίθεση με άλλες κατηγορίες φλαβονοειδών, οι φλαβανόλες δεν απαντώνται σε γλυκοσυλιωμένη μορφή στα τρόφιμα. Οι κύριες αντιπροσωπευτικές φλαβανόλες στα φρούτα είναι η κατεχίνη (Εικόνα 25) και η επικατεχίνη, ενώ η γαλλοκατεχίνη και η επιγαλλοκατεχίνη απαντώνται κυρίως στο τσάι. Απαντώνται τόσο ως μονομερή, όπως οι κατεχίνες, όσο και ως πολυμερή, όπως οι προανθοκυανιδίνες (Εικόνα 26).

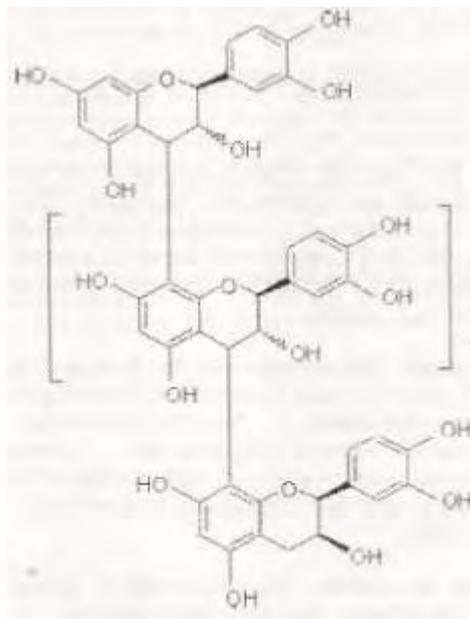
Οι κατεχίνες απαντώνται σε πολλά φρούτα όπως στα βερίκοκα και στα κέρασια. Το πράσινο τσάι και η σοκολάτα είναι οι πλουσιότερες πηγές κατεχινών, ενώ κατεχίνες απαντώνται επίσης και στο κόκκινο κρασί.

Οι προανθοκυανιδίνες, γνωστές και ως συμπυκνωμένες ταννίνες, είναι διμερή, ολιγομερή ή πολυμερή κατεχινών. Είναι δύσκολο να εκτιμηθεί η περιεκτικότητα των προανθοκυανιδινών στα τρόφιμα διότι ποικίλλουν ως προς το μοριακό βάρος και τη δομή. Οι προανθοκυανιδίνες είναι υπεύθυνες για το στυφό χαρακτήρα των φρούτων (π.χ. σταφυλιών, μήλων) και των ποτών (π.χ. κρασί, τσάι, μύρα) και για τη πικρή γεύση της σοκολάτας. Αξίζει να σημειωθεί ότι αυτή η στυφότητα αλλάζει κατά την ωρίμανση των φρούτων και συχνά εξαφανίζεται όταν τα φρούτα ωριμάσουν πλήρως (D' Archivio et al, 2007).



Εικόνα 25: Χημική δομή κατεχίνης

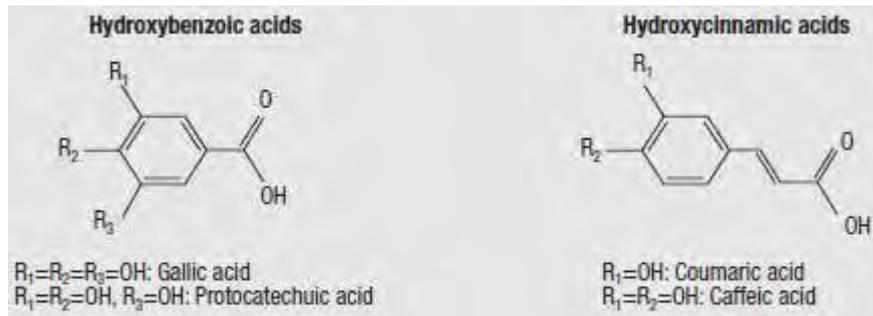
Παράγωγα φλαβανολών έχουν βρεθεί σε σπόρους σταφυλιών, με κύριες ενώσεις τις κατεχίνες, την επικατεχίνη, την 3-O-επιγαλλοκατεχίνη, διμερή προκυανιδινών (B1-B5), την προκυανιδίνη C1, και το B5-3'-gallate της προκυανιδίνης (Nassiri-Asl et al, 2009).



Εικόνα 26: Χημική δομή της προανθοκυανιδίνης

### 1.11.2. Φαινολικά οξέα

Τα φαινολικά οξέα αποτελούν μία ομάδα οργανικών ενώσεων που έχουν τουλάχιστον μία καρβοξυλομάδα και ένα φαινολικό υδροξύλιο. Διαιρούνται σε δύο κατηγορίες: τα παράγωγα του βενζοϊκού οξέος και τα παράγωγα του κινναμικού οξέος, οι χημικές δομές των οποίων παρατηρούνται στην εικόνα 27.



Εικόνα 27: Χημική δομή υδροξυβενζοϊκών οξέων και χημική δομή υδροξυκινναμικών οξέων

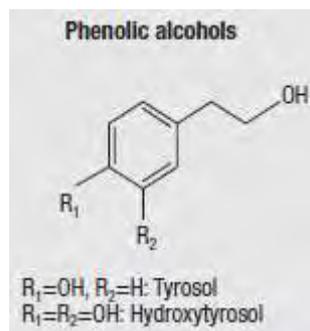
Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα, όπως το γαλλικό οξύ, απαντώνται σε ελάχιστα φυτά σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, εκτός από κάποια κόκκινα φρούτα. Αυτός είναι και ο κύριος λόγος που δεν θεωρούνται αυτή τη στιγμή αρκετά σημαντικά ως προς τη θρεπτική τους αξία. Το τσάι θεωρείται η κυριότερη πηγή γαλλικού οξέος.

Τα υδροξυκινναμικά οξέα αποτελούνται κυρίως από το κουμαρικό, το καφεϊκό και το φερουλικό οξύ, τα οποία σπάνια απαντώνται σε ελεύθερη μορφή. Οι συζευγμένες μορφές τους είναι γλυκοσυλιωμένα παράγωγα ή εστέρες του κινικού, του σικιμικού ή του ταρταρικού οξέος. Το καφεϊκό και το κινικό οξύ συνδυάζονται για να σχηματίσουν το χλωρογενικό οξύ, που απαντάται σε διάφορα φρούτα και σε μεγάλες συγκεντρώσεις στον καφέ. Το καφεϊκό οξύ είναι το πιο άφθονο από τα φαινολικά οξέα, και αντιπροσωπεύει το 75-100% της ολικής περιεκτικότητας των φρούτων σε υδροξυκινναμικά οξέα. Τα υδροξυκινναμικά οξέα βρίσκονται σε όλα τα μέρη του φρούτου, με τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις να απαντώνται στο φλοιό των ώριμων φρούτων. Η συγκέντρωσή τους μειώνεται κατά την ωρίμανση, αλλά η ολική ποσότητα τους αυξάνεται καθώς το φρούτο μεγαλώνει σε μέγεθος.

### 1.11.3. Φαινολικές αλκοόλες

Η τυροσόλη (4-hydroxyphenylethanol) και η υδροξυτυροσόλη (3,4-dihydroxyphenylethanol) είναι οι κυριότερες φαινολικές αλκοόλες (Εικόνα 28), οι οποίες περιέχονται κυρίως στο παρθένο ελαιόλαδο. Η συγκέντρωση των ολικών φαινολών στο παρθένο ελαιόλαδο έχει μία μέση τιμή περίπου 180 mg/kg και εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως η ποικιλία, το κλίμα, η περιοχή όπου παράγεται, το γεωγραφικό πλάτος, και η ωρίμανση. Η τυροσόλη απαντάται επίσης στο κόκκινο και άσπρο κρασί και στη μπύρα. Η υδροξυτυροσόλη βρίσκεται στο κόκκινο

κρασί και επιπλέον παράγεται *in vino* μετά την κατανάλωση του κρασιού (D' Archivio et al, 2007).

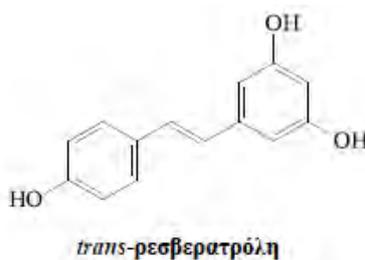


Εικόνα 28: Χημική δομή φαινολικών αλκοολών

#### 1.11.4. Στιλβένια

Τα στιλβένια παράγονται από τα φυτά ως απόκριση σε μόλυνση από παθογόνα ή σε συνθήκες στρες. Όταν ένα φυτό αντιμετωπίζει ένα εξωτερικό παράγοντα κινδύνου (μικρόβια, δυσμενείς καιρικές συνθήκες) κινεί τους μηχανισμούς σύνθεσης αυτών των ουσιών. Τα στιλβένια, αλλά και τα υπόλοιπα μόρια με αμυντικές ικανότητες, περιγράφονται ως φυτοαλεξίνες και η παραγωγή τους εξαρτάται άμεσα από τις εξωτερικές συνθήκες (Schultz et al., 1990). Οι ποσότητες στιλβενίων είναι χαμηλές στην ανθρώπινη διατροφή.

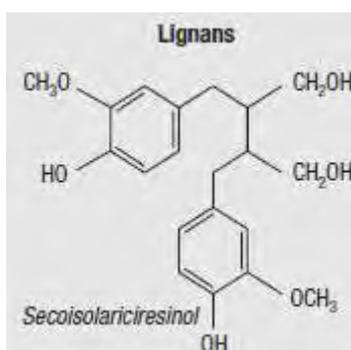
Η κύρια αντιπροσωπευτική ένωση των στιλβενίων είναι η ρεσβερατρόλη, η οποία απαντάται τόσο σε *cis* όσο και σε *trans* μορφή, κυρίως ως γλυκοζίτης. Έχει ανιχνευτεί σε περισσότερα από 70 είδη φυτών, συμπεριλαμβανομένων των σταφυλιών, των μούρων και των φυστικιών. Ο φλοιός των κόκκινων σταφυλιών είναι ιδιαίτερα πλούσιος σε ρεσβερατρόλη, γεγονός που συμβάλλει σε υψηλή συγκέντρωση ρεσβερατρόλης στο κόκκινο κρασί και στο χυμό σταφυλιού (D' Archivio et al, 2007). Στα σταφύλια κυριαρχεί η *trans*-ρεσβερατρόλη (Εικόνα 29) (Nassiri-Asl et al, 2009).



Εικόνα 29: Χημική δομή *trans*-ρεσβερατρόλης

### 1.11.5. Λιγνάνες

Οι λιγνάνες παράγονται από τον οξειδωτικό διμερισμό δύο φαινυλοπροπανιακών μονάδων. Στη φύση απαντώνται κυρίως σε ελεύθερη μορφή, παρά συζευγμένες με υδατάνθρακες. Ο λιναρόσπορος είναι η κύρια πηγή λιγνανών και περιέχει μέχρι και 3.7 g σεκοΐσολαρισρεσινόλης (secoisolariciresinol)/kg ξηρού βάρους. Η χημική δομή της σεκοΐσολαρισρεσινόλης παρουσιάζεται στην εικόνα 30. Η εντερική μικροχλωρίδα έχει την ικανότητα να μεταβολίζει τις λιγνάνες σε εντεροδιόλη και εντερολακτόνη. Οι χαμηλές ποσότητες λιγνανών που φυσιολογικά περιέχονται στη διατροφή του ανθρώπου δεν αντιστοιχούν στις συγκεντρώσεις των μεταβολιτών εντεροδιόλη και εντερολακτόνη που έχουν μετρηθεί στο πλάσμα και στα ούρα. Επομένως, υπάρχουν και άλλες λιγνάνες, άγνωστες μέχρι στιγμής, οι οποίες δρουν ως πρόδρομα μόρια αυτών των δύο μεταβολιτών. Το ενδιαφέρον για τις λιγνάνες και τα συνθετικά τους παράγωγα έχει αυξηθεί καθώς υποστηρίζεται ότι μπορούν να συμβάλλουν στη χημειοθεραπεία του καρκίνου (D' Archivio et al, 2007).



Εικόνα 30: Χημική δομή της σεκοΐσολαρισρεσινόλης

### 1.12. Πολυφαινόλες στην ανθρώπινη διατροφή

Οι κύριες πηγές πολυφαινόλων είναι τα φρούτα, το τσάι και το κόκκινο κρασί. Μερικές από αυτές απαντώνται σε συγκεκριμένα τρόφιμα, όπως οι ισοφλαβόνες στη σόγια, ενώ άλλες, όπως η κερκετίνη, απαντώνται σε όλα τα φυτικά προϊόντα. Γενικά, τα τρόφιμα περιέχουν σύνθετα μείγματα πολυφαινόλων (Πίνακας 5).

Διάφοροι παράγοντες επηρεάζουν το περιεχόμενο των φυτών σε πολυφαινόλες. Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως οι κλιματικοί (έκθεση στον ήλιο, βροχοπτώσεις) ή οι αγρονομικοί (διαφορετικοί τύποι καλλιέργειας, απόδοση καρπών ανά δέντρο) διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο όσον αφορά την περιεκτικότητα των φυτών σε πολυφαινόλες. Συγκεκριμένα, η έκθεση στον ήλιο επηρεάζει τα φλαβονοειδή. Επίσης, ο βαθμός ωρίμανσης επηρεάζει τις συγκεντρώσεις και τις αναλογίες των διαφόρων

πολυφαινολών. Για παράδειγμα, κατά την ωρίμανση οι συγκεντρώσεις των φαινολικών οξέων μειώνονται, ενώ αυτές των ανθοκυανινών αυξάνονται. Επιπλέον, η αποθήκευση συμβάλλει στη περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες που οξειδώνονται εύκολα και οδηγεί στο σχηματισμό περισσότερο ή λιγότερο πολύπλοκων μορίων τα οποία μεταβάλλουν το χρώμα και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των φρούτων. Από την άλλη, η αποθήκευση σε χαμηλές θερμοκρασίες δεν έχει καμία επίδραση στην περιεκτικότητα των τροφίμων σε πολυφαινόλες.

Food/Beverage <sup>a</sup>	Total Polyphenols	Food/Beverage <sup>a</sup>	Total Polyphenols
<b>Cereals (mg/100 g dm)</b>		<b>Fruits (mg/100 g fm)</b>	
Barley	1200–1500	Blackcurrant	140–1200
Corn	30.9	Blueberry	135–280
Millet	590–1060	Cherry	60–90
Oats	8.7	Cowberry	128
Rice	8.6	Cranberry	77–247
Sorghum	170–10,260	Gooseberry	22–75
Wheat	22–40	Grape	50–490
		Grapefruit	50
<b>Legumes (mg/100 g dm)</b>		Orange	50–100
Black gram	540–1200	Peach	10–150
Chickpeas	78–230	Pear	2–25
Cowpeas	175–590	Plum	4–225
Common beans	34–280	Raspberry	37–429
Green gram	440–800	Red currant	17–20
Pigeon peas	380–1710	Strawberry	38–218
		Tomato	85–130
<b>Nuts (% dm)</b>		<b>Fruit juices (mg/L)</b>	
Betel nuts	26–33	Apple juice	2–16
Cashew nuts	33.7	Orange juice <sup>b</sup>	370–7100
Peanuts	0.04		660–1000
Pecan nuts	8–14		
<b>Vegetables (mg/100 g fm)</b>		<b>Beverages</b>	
Brussels sprouts	6–15	Tea leaves (% dm)	
Cabbage	25	Green	20–35
Leek	20–40	Black	22–33
Onion	100–2025	Tea, cup (mg/200 mL)	150–210
Parsley	55–180	Coffee beans (% dm)	0.2–10
Celery	94	Coffee, cup (mg/150 mL)	200–550
		Cacao beans (% dm)	12–18
<b>Fruits (mg/100 g fm)</b>		Wine (mg/L)	
Apple	27–298	White	200–300
Apricot	30–43	Red	1000–4000 (6500)
		Beer (mg/L)	60–100

<sup>a</sup>dm=dry matter; fm=fresh matter.

<sup>b</sup>Values for different orange varieties.

Πίνακας 5: Πολυφαινολικό περιεχόμενο διαφόρων φυτικών τροφών και ποτών

Η περιεκτικότητα των τροφών σε πολυφαινόλες μπορεί να επηρεαστεί και από τις μεθόδους μαγειρικής παρασκευής. Το ξεφλούδισμα φρούτων και λαχανικών μπορεί να μειώσει σημαντικά την περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες, διότι αυτές οι ουσίες απαντώνται συχνά σε υψηλές συγκεντρώσεις στη φλούδα. Τέλος, η θερμική επεξεργασία μπορεί να μειώσει την περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες μέχρι και 100% (D' Archivio et al, 2007).

### **1.12.1. Απορρόφηση, μεταβολισμός και βιοδιαθεσιμότητα πολυφαινολών**

Ο βαθμός απορρόφησης και μεταβολισμού των πολυφαινολών εξαρτάται από τους εξής παράγοντες: α) χημική δομή της πολυφαινόλης (βαθμός γλυκοσυλίωσης/ακετυλίωσης), β) βασική δομή της πολυφαινόλης, γ) σύζευξη με άλλες πολυφαινόλες, δ) μοριακό βάρος, ε) βαθμός πολυμερισμού και στ) διαλυτότητα της πολυφαινόλης.

Οι γλυκοσυλιωμένες πολυφαινόλες απαιτούν ειδικά ένζυμα, τις γλυκοσιδάσες, οι οποίες διασπούν τον γλυκοζιτικό δεσμό και βοηθούν στην απορρόφηση. Η *trans*-ρεσβερατρόλη, η (+)-κατεχίνη και η κερκετίνη, ενώσεις που έχουν βρεθεί στα σταφύλια, απαντώνται στον ορό του αίματος και στα ούρα, είτε σε ελεύθερη μορφή είτε ως συμπλέγματα γλυκόζης και θείου, και χαρακτηρίζονται από ταχεία απορρόφηση (Goldberg et al, 2003). Η επικατεχίνη απαντάται συνήθως ακυλιωμένη με γαλλικό οξύ, γεγονός που παρεμποδίζει την απορρόφησή της. Οι πολυμερείς προανθοκυανιδίνες, οι οποίες χαρακτηρίζονται από μεγάλο μοριακό βάρος, δεν απορροφώνται εύκολα από τον οργανισμό.

Τα κύρια όργανα που συμμετέχουν στον μεταβολισμό των πολυφαινολών είναι το ήπαρ, τα νεφρά και ο εντερικός βλεννογόνο. Οι πολυφαινόλες που δεν απορροφώνται από το λεπτό έντερο και αυτές που μεταβολίζονται από το ήπαρ και εκκρίνονται στη χολή μεταφέρονται στο παχύ έντερο. Στο παχύ έντερο μεταβολίζονται οι ραμνογλυκοζίτες (π.χ. ρουτίνη) και αποσυντίθεται ο πολυφαινολικός σκελετός σε απλούστερες ενώσεις με τη βοήθεια της μικροχλωρίδας.

Ως βιοδιαθεσιμότητα αναφέρεται η αναλογία των θρεπτικών συστατικών που απορροφάται και μεταβολίζεται μέσω των κανονικών οδών. Συνεπώς, είναι σημαντικό να γνωρίζουμε τη ποσότητα ενός θρεπτικού σε ένα τρόφιμο, αλλά και κατά πόσο αυτό το θρεπτικό είναι βιοδιαθέσιμο. Ο βασικός στόχος των μελετών σχετικά με τη βιοδιαθεσιμότητα είναι να καθοριστεί ποιές πολυφαινόλες απορροφούνται καλύτερα, ποιοί είναι οι ενεργοί μεταβολίτες και ποιές πολυφαινόλες οδηγούν στο σχηματισμό ενεργών μεταβολιτών. Η χημική δομή των πολυφαινολών καθορίζει το ρυθμό και την έκταση της απορρόφησης και τη φύση των μεταβολιτών που κυκλοφορούν στο πλάσμα. Οι πιο κοινές πολυφαινόλες στη διατροφή μας δεν είναι απαραίτητα αυτές που οδηγούν σε υψηλές συγκεντρώσεις ενεργών μεταβολιτών στους ιστούς-στόχους. Συνεπώς, οι βιολογικές ιδιότητες διαφέρουν ανάλογα με την πολυφαινόλη (D' Archivio et al, 2007).

### **1.13. Φαρμακολογικές δράσεις πολυφαινολών**

Οι φαρμακολογικές και βιολογικές ιδιότητες των πολυφαινολών έχουν διερευνηθεί σε βάθος, με αποτέλεσμα να υπάρχουν αρκετές πληροφορίες σχετικά με τη βιοδραστικότητά τους. Στη συνέχεια αναφέρονται οι δράσεις που παρατηρήθηκαν σε ενώσεις οι οποίες απομονώθηκαν από σταφύλια και σε εκχυλίσματα σταφυλιών.

#### **1.13.1. Αντιοξειδωτική δράση**

Ως αντιοξειδωτική αναφέρεται η ικανότητα των πολυφαινολών να εξουδετερώνουν ελεύθερες ρίζες οι οποίες συντίθενται στα κύτταρα ως παραπροϊόντα του αερόβιου μεταβολισμού και εμπλέκονται στην ανάπτυξη διαφόρων ασθενειών. Τα εκχυλίσματα σπόρων σταφυλιού έχουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Οι προκυανιδίνες εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες και αναστέλλουν την δραστηριότητα της οξειδάσης της ξανθίνης, ένα ένζυμο που διεγείρει τη δημιουργία ριζών οξυγόνου. Έχει αποδειχθεί ότι χαμηλές συγκεντρώσεις προανθοκυανιδινών από σπόρους σταφυλιού αναστέλλουν την υπεροξειδωση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και παρέχουν προστασία ενάντια σε ελεύθερες ρίζες και σε οξειδωτική βλάβη προκαλούμενη από TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate). Επιπλέον, η προκυανιδίνη B4, η κατεχίνη, και το γαλλικό οξύ σε χαμηλές συγκεντρώσεις προστατεύουν τα κύτταρα από οξειδωτική βλάβη. Ωστόσο, αυτές οι ενώσεις είναι ικανές, σε μεγάλες συγκεντρώσεις, να προκαλέσουν βλάβη στο DNA. Επίσης, η ρεσβερατρόλη έχει προστατευτική δράση λόγω της αντιοξειδωτικής ικανότητάς της (Nassiri-Asl et al, 2009). Τέλος, οι ανθοκυανιδίνες, σε συνέργεια με άλλες αντιοξειδωτικές ουσίες που περιέχονται σε εκχυλίσματα σταφυλιών, μπορούν να παρεμποδίσουν την οξείδωση των κυττάρων του παγκρέατος που παράγουν ινσουλίνη, παρέχοντας έτσι προστασία ενάντια στην εμφάνιση διαβήτη (Rahimi et al., 2005).

#### **1.13.2. Καρδιοπροστατευτική δράση**

Οι πολυφαινόλες που έχουν απομονωθεί από το σταφύλι, εμφανίζουν ευεργετική δράση στην υπέρταση, τη στεφανιαία νόσο και άλλες καρδιαγγειακές παθήσεις. Έχει διαπιστωθεί μία αντίστροφη σχέση μεταξύ της πρόσληψης πολυφαινολών και της εκδήλωσης καρδιαγγειακών παθήσεων, καθώς μέσω διαφόρων πιθανών μηχανισμών προκαλούν αγγειοδιαστολή και καλύτερη λειτουργία της καρδιάς (Dell' Agli et al., 2004, Stoclet et al., 2004).

Ενδεικτικά, οι προκυανιδίνες εμποδίζουν την οξείδωση της LDL (Low Density Lipoprotein) και κατά συνέπεια τη δημιουργία αθηροσκλήρυνσης, προστατεύοντας

την ομαλή καρδιακή λειτουργία (Da Silva et al., 2003). Επίσης, η προκυανιδίνη μειώνει την ισχαιμική βλάβη και εμποδίζει την προσβολή των αγγειακών κυττάρων από υπεροξυνιτρικό (ONOO<sup>-</sup>), καλύπτοντας την επιφάνεια των στεφανιαίων ενδοθηλιακών κυττάρων, και προάγοντας την μεσολαβούμενη από συνθάση του NO ενδοθηλιακή χαλάρωση των αορτικών δακτυλίων. Επίσης, η κερκετίνη και η κατεχίνη, συνεργιακά, αναστέλλουν την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο κολλαγόνο και την επαγόμενη από κολλαγόνο συσσώρευση αιμοπεταλίων. Τέλος, έχει παρατηρηθεί ότι αναστολή της συσσώρευσης αιμοπεταλίων παρουσία ρεσβερατρόλης.

#### 1.13.3. Ηπατοπροστατευτική δράση

Εκχυλίσματα σπόρων σταφυλιού, μετά από έκθεση σε ηπατοτοξικές δόσεις ακεταμινοφαίνης, μείωσαν την βλάβη του DNA στο ήπαρ, τον κυτταρικό θάνατο των ηπατοκυττάρων, και τις αλλαγές στην έκφραση της bcl-XL σε ποντίκια. Σε μία μελέτη, εκχύλισμα σπόρων σταφυλιού προστάτευσε το ήπαρ από οξειδωτική βλάβη. Επίσης, μείωσε την ηπατική ισχαιμική βλάβη σε ποντίκια (Nassiri-Asl et al, 2009).

#### 1.13.4. Αντικαρκινική δράση

Τα σταφύλια αποτελούν μία σημαντική πηγή πρόσληψης ουσιών με προστατευτικές ικανότητες ενάντια στον καρκίνο (Chen et al, 2005). Ενδεικτικά, η κερκετίνη έχει την ικανότητα να παρεμποδίζει την ανάπτυξη κυττάρων σε καρκίνο του στομάχου, του παχέος εντέρου, του προστάτη και του μαστού. Επιπλέον, καταστέλλει την ανάπτυξη καρκίνων του τραχήλου, της μήτρας, του μελανώματος και του εντέρου (Yoshida et al, 1990, Hosokawa et al, 1990, Pawlikowska-pawlega et al, 2001, Kampa et al, 2000, Damianaki et al, 2000). Κλινικές έρευνες έδειξαν ότι η κατεχίνη παρεμποδίζει την ανάπτυξη καρκίνου του προστάτη, του μαστού και του ήπατος. Επιπλέον, αποδείχτηκε ότι η (+)-κατεχίνη μειώνει την ανάπτυξη όγκων στο έντερο (Chung et al, 2001, Weyant et al, 2001). Η trans-ρεσβερατρόλη έχει βρεθεί ότι εμποδίζει την ανάπτυξη καρκίνων του δέρματος και του μαστού όπως επίσης και τη μετάσταση όγκων μέσω καταστολής της αγγειογένεσης. Το γαλλικό οξύ παρέχει σημαντική κυτταροστατική δράση ενάντια σε όγκους του πνεύμονα, του στομάχου και του εντέρου και επάγει την απόπτωση των λεμφοκυττάρων του αίματος σε περιπτώσεις λευχαιμιών (Li et al, 2000). Το καφεϊκό και το φερουλικό οξύ παρεμποδίζουν την καρκινογενετική διαδικασία, με το καφεϊκό οξύ να παρουσιάζει μεγαλύτερη δραστηριότητα απ' ότι το

φερουλικό. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω αναστολής του σχηματισμού N-νιτροσπροϊόντων στον οργανισμό (Kuenzig et al, 1984).

#### 1.13.5. Αντιμικροβιακή και αντι-ική δράση

Αντιμικροβιακή δράση έχει παρατηρηθεί για αρκετές ενώσεις του σταφυλιού, συμπεριλαμβανομένου του γαλλικού οξέος, των υδροξυκινναμικών οξέων, των φλαβονολών, των φλαβονολών και της trans-ρεσβερατρόλης. Πιο συγκεκριμένα, σκόνη από ερυθρές ποικιλίες σταφυλιού εκχυλίστηκε σε διάφορους διαλύτες και τα εκχυλίσματα ήταν δραστικά έναντι αρκετών στελεχών μικροοργανισμών, όπως *Bacillus brevis*, *Escherichia coli* και *Pseudomonas aeruginosa*. Η δράση αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς τα εκχυλίσματα σταφυλιών μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αντιβακτηριακοί παράγοντες για την προστασία των τροφίμων από την αλλοίωση που προκαλούν τα βακτήρια. Μ' αυτόν τον τρόπο διατηρούνται και οι οργανοληπτικές ιδιότητες των τροφίμων (Baydar et al., 2004). Επιπλέον, αναφέρθηκε ότι εκχυλίσματα σπόρων σταφυλιού δρουν ενάντια στην λιστερίωση, καθώς παρατηρήθηκε ότι μπορούν να μειώσουν τον αριθμό των *Listeria monocytogenes* σε μη ανιχνεύσιμες ποσότητες εντός 10 λεπτών (Nassiri-Asl et al, 2009).

#### 1.13.6. Προστασία του κεντρικού νευρικού συστήματος.

Η κατανάλωση σταφυλιών προσφέρει σε κάποιο ποσοστό, προστασία από παθήσεις νευρογενούς φύσης. Αυτό οφείλεται στην υψηλή περιεκτικότητά τους σε αντιοξειδωτικές ουσίες (Russo et al., 2003).

Εκχύλισμα σπόρων σταφυλιού μείωσε την πιθανότητα λιπιδικής υπεροξειδωσης από ελεύθερες ρίζες στο κεντρικό νευρικό σύστημα σε ποντικούς μεγάλης ηλικίας και επίσης μείωσε την υποξική ισχαιμική βλάβη του εγκεφάλου σε νεογνικούς ποντικούς. Επίσης, παρουσίασε νευροπροστατευτική δράση σε νευρωνική βλάβη από παροδική ισχαιμία του πρόσθιου εγκεφάλου μέσω αναστολής της βλάβης του DNA. Επιπλέον, το εκχύλισμα ανέστειλε την συσσώρευση οξειδωτικής βλάβης του DNA στο νωτιαίο μυελό και σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου. Εκχύλισμα σπόρων σταφυλιού σε γερασμένους ποντικούς αύξησε την ικανότητα μνήμης και μείωσε την παραγωγή δραστικών ειδών οξυγόνου.

Πιστεύεται ότι η προανθοκυανιδίνη συμβάλλει στην ενίσχυση της μάθησης και της μνήμης καθώς δρα αντιοξειδωτικά (μειώνει την λιπιδική υπεροξειδωση και την οξείδωση των πρωτεϊνών σε εγκεφάλους ενήλικων πειραματοζώων) και η

κατανάλωσή της έχει συσχετιστεί με αύξηση στη συγκέντρωση της ακετυλοχολίνης (ACh) και ταυτόχρονη μείωση της δράσης της ακετυλοχολινεστεράσης (AChE) (Nassiri-Asl et al, 2009). Επιπρόσθετα, έχει διαπιστωθεί ότι η ρεσβερατρόλη προστατεύει τον εγκέφαλο από τις καταστροφές που προκαλούν οι οξειδωτικές καταστάσεις, γεγονός που υποδεικνύει ότι το μόριο διέρχεται του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Θεωρείται ακόμα αποδεκτό ότι η ρεσβερατρόλη είναι αποτελεσματική στην νόσο Alzheimer λόγω της αντιοξειδωτικής δράσης της (Russo et al., 2003).

#### 1.13.7. Δράση σε οιστρογονικούς υποδοχείς

Η ρεσβερατρόλη σε χαμηλές συγκεντρώσεις είναι ισχυρός οιστρογονικός αγωνιστής, η κατεχίνη εμφανίζει ασθενή οιστρογονική δράση, ενώ η κερκετίνη αποτελεί ισχυρό ανταγωνιστή. Επομένως, μόρια αυτά με οιστρογονική δράση μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη μετεμμηνοπαυσιακή οιστρογονική θεραπεία υποκατάστασης, περιορίζοντας τον κίνδυνο εμφάνισης οστεοπόρωσης και καρδιαγγειακών παθήσεων στις γυναίκες, ενώ μόρια με αντιοιστρογόνο δράση σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού ή καρκίνο του προστάτη (Ratna et al, 2002).

#### 1.13.8. Αντιαγγειογενετική δράση

Η αγγειογένεση είναι η διαδικασία ανάπτυξης νέων αιμοφόρων αγγείων. Εμπλέκεται σε διάφορες φυσιολογικές λειτουργίες του οργανισμού, όπως η επούλωση τραυμάτων και οι αναπαραγωγικοί κύκλοι, και σε παθολογικές καταστάσεις, όπως η ανάπτυξη και η μετάσταση όγκων, ο διαβήτης και οι χρόνιες λοιμώξεις. Επομένως, η καταστολή της μη φυσιολογικής αγγειογένεσης μπορεί να αποτελέσει στόχο για τη θεραπεία των προαναφερθέντων νοσημάτων.

Έχει αποδειχτεί ότι πολλές φυτικές πολυφαινόλες δρουν ως αναστολείς της αγγειογενετικής διαδικασίας, με αποτέλεσμα να παρεμποδίζουν και την ανάπτυξη καρκίνων. Η trans-ρεσβερατρόλη καταστέλλει την αγγειογένεση που επάγεται από τους παράγοντες FGF-2 (Fibroblast Growth Factor-2) και VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Επιπλέον, έχει την ικανότητα να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και τη μετάσταση όγκων. Παρόμοια δράση έχει αναφερθεί και για την κερκετίνη, αλλά σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (Igura et al, 2001).

#### 1.14. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της επίδρασης εκχυλισμάτων σταφυλιών (*Vitis vinifera*) πλούσιων σε πολυφαινολικές ενώσεις στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I του σίτου. Η τοποϊσομεράση I αποτελεί σημαντικό ένζυμο καθώς συμμετέχει σε βασικές λειτουργίες των κυττάρων, όπως αντιγραφή και μεταγραφή, και εμφανίζει αυξημένη έκφραση σε καρκινικά κύτταρα. Επομένως, η αναστολή του ενζύμου από τα εκχυλίσματα σταφυλιών υποδεικνύει πιθανές αντικαρκινικές και χημειοπροστατευτικές ιδιότητες των περιεχόντων φαινολικών ενώσεων. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν συνολικά επτά εκχυλίσματα, από τα οποία τα τέσσερα απομονώθηκαν από τους βοστρύχους και τα τρία από τα γίγαρτα του σταφυλιού. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι μελετήθηκε η επίδραση των μειγμάτων στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I, και όχι η επίδραση των μεμονωμένων φαινολικών συστατικών.

### 1.15. *Vitis vinifera*

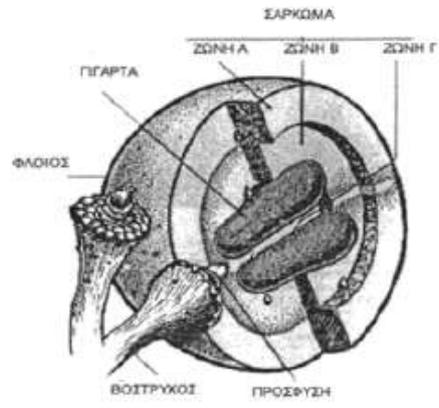
Η άμπελος (*Vitis vinifera*) ανήκει στην οικογένεια των Αμπελίδων (*Vitaceae*) και έχει την ακόλουθη συστηματική κατάταξη (Πίνακας 6).

<b>Βασίλειο</b>	<i>Plantae</i>
<b>Άθροισμα</b>	<i>Magnoliophyta</i>
<b>Κλάση</b>	<i>Rosidae</i>
<b>Υποκλάση</b>	<i>Dicotyledones</i>
<b>Τάξη</b>	<i>Rhamnales</i>
<b>Οικογένεια</b>	<i>Vitaceae</i>
<b>Γένος</b>	<i>Vitis</i>
<b>Είδος</b>	<i>Vinifera</i>

Πίνακας 6: Συστηματική κατάταξη της αμπέλου

Η οικογένεια *Vitaceae* κυριαρχεί σε τροπικά και υποτροπικά κλίματα και περιέχει περισσότερα από 1.000 είδη. Ο αριθμός των ειδών του γένους *Vitis* κυμαίνεται γύρω στα πενήντα. Από αυτά, τα 35 ανήκουν στα «βορειοαμερικανικά» αμπέλια, 15 στα είδη της Ανατολικής Ασίας ενώ το *vinifera* στην Ευρώπη. Το σύνολο σχεδόν των καλλιεργούμενων ποικιλιών αμπέλου ανήκουν στο είδος αυτό. Το *V. vinifera* περιλαμβάνει περίπου 6.000 ποικιλίες και είναι το είδος που έχει περισσότερο ενδιαφέρον από αγρονομικής και οικονομικής άποψης.

Το σταφύλι αποτελείται από το βόστρυχο, που αποτελεί το ξυλώδες μέρος (τσαμπί), και τον καρπό, που είναι το εδώδιμο και οινοποιήσιμο τμήμα του σταφυλιού (Εικόνα 31). Ο καρπός αποτελείται από το φλοιό, τη σάρκα και τα γίγαρτα. Στον φλοιό, ο οποίος αποτελείται κατά 80% από νερό, απαντώνται οι ουσίες που χαρακτηρίζουν την ποικιλία της αμπέλου και διαμορφώνουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των παραγόμενων οίνων. Η σάρκα, η οποία αποτελεί το μεγαλύτερο ποσοστό του καρπού, αποτελείται από το μεσοκάρπιο και το ενδοκάρπιο και περιέχει το χυμό του σταφυλιού. Το γίγαρτο (κουκούτσι) είναι ο σπόρος της αμπέλου και βρίσκεται εντός του ενδοκαρπίου της σάρκας. Έχει αποδειχθεί ότι τα γίγαρτα έχουν την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες, και ακολουθούν ο φλοιός και η σάρκα.



Εικόνα 31: Τομή καρπού σταφυλιού

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2. 1. ΥΛΙΚΑ

#### 2.1.1. Εκχυλίσματα

Συνολικά μελετήθηκαν επτά εκχυλίσματα σταφυλιών από τα οποία τα τέσσερα εκχυλίσματα απομονώθηκαν από βοστρύχους και τα τρία εκχυλίσματα απομονώθηκαν από γίγαρτα. Ο όρος βόστρυχος (βότρυς, τσαμπί) αναφέρεται στο ξυλώδες μέρος που αποτελεί το 30% του όγκου του φυτού. Τα γίγαρτα (κουκούτσια) αναφέρονται στα όργανα αναπαραγωγής της αμπέλου και αποτελούν το 3-6% του όγκου του κύριου καρπού.

##### 2.1.1.1. Εκχυλίσματα βοστρύχων

Τα εκχυλίσματα των βοστρύχων προέρχονται από τις εξής ποικιλίες:

1. Ασύρτικο 2010 (ΑΣΥ)
2. Μοσχάτο Αμβούργου (ΜΟΣ)
3. Β1 Μαυροτράγανο Σαντορίνης (ΜΑΥ)
4. Vinsanto (BIN)

Η σύσταση των εκχυλισμάτων που απομονώθηκαν από βοστρύχους σε πολυφαινολικές ενώσεις δίνεται στον πίνακα 7.

Σύσταση (mg/g εκχυλίσματος)	Ασύρτικο 2010 (ΑΣΥ)	Μοσχάτο Αμβούργου (ΜΟΣ)	Μαυροτράγανο Σαντορίνης (ΜΑΥ)	Vinsanto (BIN)
Γαλλικό οξύ	8,38	14,82	11,48	7,32
Συριγγικό οξύ	0,80	32,23	17,44	0,80
Καφεϊκό οξύ	0,31	0,58	0,54	0,42
Κατεχίνη	7,35	9,33	12,18	4,74
Επικατεχίνη	15,23	13,32	19,13	4,74
π-κουμαρικό οξύ	0,41	0,93	0,75	0,90
Φερουλικό οξύ	0,31	0,51	3,59	2,55
Ρουτίνη	16,00	41,83	15,93	1,92
trans- ρεσβερατρόλη	2,15	15,32	9,09	7,78
Κερκετίνη	7,54	8,21	3,94	4,63
Καμπφερόλη	1,04	0,67	0,74	0,84

Πίνακας 7: Σύσταση εκχυλισμάτων που απομονώθηκαν από τους βοστρύχους των σταφυλιών

### 2.1.1.2. Εκχυλίσματα γιγάρτων

Τα εκχυλίσματα των γιγάρτων προέρχονται από τις εξής ποικιλίες:

1. Ασύρτικο 2010 (ΑΣΥ)
2. Ξινόμαυρο (ΞΙΝ)
3. Ρομπόλα (ΡΟΜ)

Η σύσταση των εκχυλισμάτων που απομονώθηκαν από γίγαρτα σε πολυφαινολικές ενώσεις δίνεται στον πίνακα 8.

Σύσταση (mg/g εκχυλίσματος)	Ασύρτικο 2010 (ΑΣΥ)	Ξινόμαυρο (ΞΙΝ)	Ρομπόλα (ΡΟΜ)
Γαλλικό οξύ	2,15	7,08	1,52
Συριγγικό οξύ	0,00	11,56	1,15
Καφεϊκό οξύ	0,00	0,00	0,24
Κατεχίνη	0,00	13,75	2,37
Επικατεχίνη	0,00	28,31	0,00
π-κουμαρικό οξύ	0,00	0,00	0,00
Φερουλικό οξύ	0,00	0,52	0,28
Ρουτίνη	0,00	0,00	0,82
trans-ρεσβερατρόλη	0,44	0,43	0,33
Κερκετίνη	0,00	0,00	0,00
Καμπφερόλη	0,00	0,00	0,00

Πίνακας 8: Σύσταση εκχυλισμάτων που απομονώθηκαν από τα γίγαρτα των σταφυλιών

### 2.1.2. Χημικά αντιδραστήρια

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας και ήταν προϊόντα των εταιρειών Sigma (Γερμανία) (Αμπικιλίνη-Ampicilin, SDS 10%, Οξικό κάλιο-Potassium acetate, RNάση-RNase, Βορικό οξύ-Boric acid), Merck (Γερμανία) (Tris, NaOH, Οξικό οξύ, Ισοπροπανόλη, Αιθανόλη, HCl, Βρωμιούχο αιθίδιο-Ethidium bromide), Applichem (Γερμανία) (DTT-DiThioThreitol-Διθειοθρεϊτόλη, Αγαρόζη-Agarose), Panreac (Ισπανία) (NaCl, Γλυκόζη-Glucose, EDTA, Γλυκερόλη) Scharlau (Ισπανία) (LB Broth), Research Organics (Η.Π.Α) (Κυανό της βρωμοφαινόλης-Bromophenol blue).

### 2.1.3. Αντιδραστήρια απομόνωσης πλασμιδιακού DNA

- Πλασμιδιακό DNA: Χρησιμοποιήθηκε πλασμίδιο Bluescript-SK+ ενσωματωμένο σε βακτήρια *Escherichia coli*.
- Διάλυμα I (Sol I): 50 mM γλυκόζη, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0). Παρασκευάζεται μία μέρα πριν την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA. Αποστειρώνεται με υγρή αποστείρωση και διατηρείται στους 4° C μέχρι τη χρήση του.
- Διάλυμα II (Sol II): 0,2 N NaOH και 1% SDS. Πρέπει να χρησιμοποιείται φρέσκο και παρασκευάζεται την ημέρα της απομόνωσης του πλασμιδιακού DNA.
- Διάλυμα III (Sol III): 60 ml από 5 M οξικό κάλιο και 11,5 ml οξικό οξύ σε τελικό όγκο 100 ml με διπλά απιονισμένο νερό. Παρασκευάζεται μία μέρα πριν την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA και διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.
- Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας βακτηριακών κυττάρων: 1,5 gr LB broth και 1 gr NaCl σε 100 ml διπλά απιονισμένου νερού. Μετά την παρασκευή του αποστειρώνεται με υγρή αποστείρωση στους 120° C για 20 λεπτά.
- Διάλυμα TE: 10 mM Tris-Cl (pH 8.0) και 1 mM EDTA (pH 8.0)
- Διάλυμα αιθανόλης 70%. Διατηρείται στους -20° C.
- Αμπικιλίνη, συγκέντρωσης 100 mg/ml. Το διάλυμα της αμπικιλίνης μετά την παρασκευή του αποστειρώνεται με πέρασμα από φίλτρο πόρων 0,45 μM και διατηρείται στους -20° C.
- Ισοπροπανόλη. Διατηρείται στους -20° C.
- RNase- RNάση συγκέντρωσης 10 mg/ml.

### 2.1.4. Αντιδραστήρια για την δοκιμή χαλάρωσης πλασμιδιακού DNA από την τοποϊσομεράση I (wheat germ Topoisomerase I plasmid relaxation assay)

- Ένζυμο: τοποϊσομεράση I από σπόρο σίτου (Promega-H.P.A.)
- Διάλυμα A: 20 mM DTT (DiThioThreitol). Μετά την παρασκευή του αποστειρώνεται με πέρασμα από φίλτρο πόρων 0,45 μM και διατηρείται στους -20° C.
- Διάλυμα B: 50% γλυκερόλη σε διπλά απιονισμένο νερό. Μετά την παρασκευή του το διάλυμα αποστειρώνεται με υγρή αποστείρωση και διατηρείται στους 4° C.
- Διάλυμα Γ<sub>1</sub>(20X): 1 M Tris-HCl (pH 7.5), 1 M NaCl, 2 mM EDTA (pH 8.0). Μετά την παρασκευή του αποστειρώνεται με υγρή αποστείρωση και διατηρείται στους 4° C.
- Διάλυμα αραίωσης ενζύμου (Enzyme Dilution buffer): 1 mM DTT, 20% γλυκερόλη, 1x Διάλυμα Γ (50 mM Tris-HCl pH=7.5, 50 mM NaCl, 0.1 mM EDTA pH=8.0)

- Διάλυμα φόρτωσης (Loading buffer): 30% γλυκερόλη και 0,25% χρωστική κυανό της βρωμοφαινόλης σε διπλά απιονισμένο νερό.
- Διάλυμα TBE (1X): 10 mM Tris-Cl, 90 mM βορικό οξύ, 0,5 M EDTA (pH 8.0).
- Βρωμιούχο αιθίδιο (Ethidium Bromide) (συγκέντρωση 10 µg/ml)

## 2.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.2.1. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Για την ανάπτυξη των βακτηρίων παρασκευάστηκε θρεπτικό μέσο καλλιέργειας το οποίο αποστειρώθηκε με υγρή αποστείρωση στους 120° C για 20 λεπτά και αφέθηκε να κρυώσει και να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε προσθήκη διαλύματος αμπικιλίνης ώστε η τελική συγκέντρωση του αντιβιοτικού στο θρεπτικό μέσο να είναι 100 µg/ml. Κατόπιν, 5 ml από το θρεπτικό μέσο επιμολύνθηκαν με μικρή ποσότητα βακτηρίων *Escherichia coli* μετασχηματισμένων με το Bluescript-SK+ πλασμιδιακό DNA (διατηρούνται σε απόθεμα (stock) γλυκερόλης στους -80° C) και η καλλιέργεια έφθασε σε εκθετικό στάδιο ανάπτυξης, μετά από συνεχή ανάδευση, στις 210 στροφές και σε θερμοκρασία 37° C για 4-6 ώρες. Στη συνέχεια αυτή η μικρή καλλιέργεια βακτηρίων μεταφέρθηκε στο υπόλοιπο θρεπτικό μέσο (100 ml) και αφέθηκε να αναπτυχθεί με συνεχή ανάδευση στις 210 στροφές, σε θερμοκρασία 37° C για περίπου 12-13 ώρες.

Η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA από την βακτηριακή καλλιέργεια περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια. Η συνολική καλλιέργεια χωρίστηκε σε δυο σωληνάρια falcon των 50 ml και φυγοκεντρήθηκε στις 4.000 στροφές για 20 λεπτά στους 4° C. Τα βακτήρια απομονώθηκαν ως ίζημα μετά από την απομάκρυνση του υπερκείμενου, το οποίο περιείχε κομμάτια του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων. Το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 8 ml Διαλύματος I (Sol I). Χρησιμοποιήθηκαν 8 ml Διαλύματος I ανά 50 ml καλλιέργειας και η επαναδιάλυση του ιζήματος έγινε αρχικά με πιπέτα τύπου Gilson και στη συνέχεια με έντονη αλλά σύντομη ανάδευση (vortex) για να αποφευχθεί το βίαιο σπάσιμο των κυττάρων. Τα δείγματα παρέμειναν για περίπου 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστέθηκαν 8 ml Διαλύματος II (Sol II) ανά 50 ml καλλιέργειας και ακολούθησε ήπια ανάδευση των δειγμάτων. Επειδή το Διάλυμα II είναι πολύ αλκαλικό, μπορεί να προκαλέσει τη χαλάρωση της υπερελικομένης διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA και γι' αυτό μόλις το διάλυμα γίνει διαυγές, προστίθεται το επόμενο διάλυμα. Ακολούθησε

προσθήκη 6 ml Διαλύματος III (Sol III) ανά 50 ml καλλιέργειας, ανάδευση αρχικά με έντονο αναποδογύρισμα του σωληναρίου falcon και μια έντονη ανάδευση (vortex) για να γίνει το διάλυμα ομοιογενές. Τα δείγματα επώαστηκαν για 7-8 λεπτά στον πάγο και φυγοκεντρήθηκαν στις 5.000 στροφές, σε θερμοκρασία 4° C για 20 λεπτά. Μετά την φυγοκέντρωση το υπερκείμενο συλλέχθηκε και μεταφέρθηκε σε καινούριο σωληνάριο falcon και πραγματοποιήθηκε επανάληψη της προηγούμενης φυγοκέντρωσης για να είναι το διάλυμα πλήρως διαυγές. Μετρήθηκε ο όγκος του υπερκείμενου και ακολούθησε προσθήκη παγωμένης ισοπροπανόλης σε ποσό ίσο με το 60% του όγκου του υπερκείμενου. Ακολούθησε έντονη ανάδευση και τα δείγματα επώαστηκαν για 3-5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση στις 5.000 στροφές, στους 4° C για 20 λεπτά και το ίζημα ξεπλύθηκε με 70% παγωμένη αιθανόλη με όγκο ίσο με το 50% του όγκου του υπερκείμενου της προηγούμενης φυγοκέντρωσης και ακολούθησε έντονη ανάδευση (vortex). Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 5.000 στροφές στους 4° C για 20 λεπτά, και μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου ακολούθησε το στέγνωμα του ιζήματος σε κλίβανο 37° C. Τέλος, το ίζημα επαναδιαλύθηκε με την προσθήκη 1,5 ml διαλύματος TE ανά 50 ml καλλιέργειας, το οποίο περιέχει ένζυμο RNάση σε τελική συγκέντρωση 10 µg/ml για την διάσπαση του RNA.

Για τη μέτρηση της ποσότητας και της καθαρότητας του πλασμιδιακού DNA που απομονώθηκε υπολογίστηκε η απορρόφηση OD σε μήκη κύματος 260 και 280 nm (στα 280 nm απορροφούν οι πρωτεΐνες και στα 260 nm το DNA). Η καθαρότητα του πλασμιδίου θεωρείται ικανοποιητική όταν ο λόγος απορρόφησης 260/280 είναι μεγαλύτερος από 1,8. Η συγκέντρωση του πλασμιδιακού DNA υπολογίστηκε βάσει του τύπου:

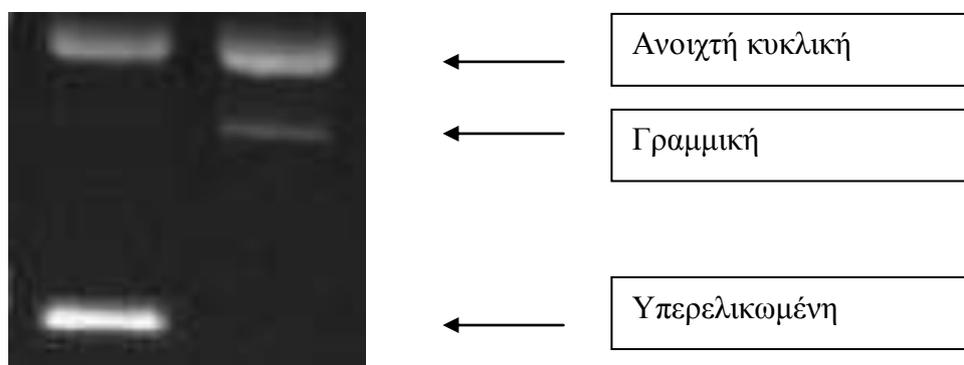
$$\text{Συγκέντρωση (}\mu\text{g/ml)} = \text{OD}_{260\text{nm}} \times \text{συντελεστής αραίωσης του δείγματος} \times 50$$

Η εκτίμηση των διαμορφώσεων του πλασμιδιακού DNA έγινε μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 0.8% και επιλέχθηκαν τα δείγματα στα οποία το πλασμιδιακό DNA βρίσκεται στην υπερελικωμένη διαμόρφωση σε ποσοστό 90%. Κατόπιν, το πλασμίδιο διαχωρίστηκε σε μικρότερες ποσότητες (aliquots) και διατηρείται στους -20° C, δεδομένου ότι το συχνό ξεπάγωμα μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια της υπερελικωμένης διαμόρφωσης.

### 2.2.2. Αρχή της μεθόδου δοκιμής χαλάρωσης πλασμιδιακής διαμόρφωσης παρουσία τοποϊσομεράσης I (Wheat germ Topoisomerase I plasmid relaxation assay)

Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα της τοποϊσομεράσης I να δημιουργεί μονόκλιωνα σπασίματα στο πλασμιδιακό DNA. Το πλασμιδιακό DNA είναι ένα κυκλικό δίκλωνο μόριο DNA, το οποίο φυσιολογικά βρίσκεται κυρίως σε βακτήρια και μπορεί και ηλεκτροφορείται διότι φέρει φωσφορικές ομάδες που το φορτίζουν αρνητικά με αποτέλεσμα κατά την ηλεκτροφόρηση να κινείται προς το θετικό πόλο. Το πλασμιδιακό DNA εμφανίζει διαφορετική ηλεκτροφορητική κινητικότητα σε ένα πήκτωμα αγαρόζης, ανάλογα με τη διαμόρφωσή του (Εικόνα 32):

1. Την υπερελικωμένη διαμόρφωση στην οποία το πλασμίδιο είναι άθικτο (χωρίς σπασίματα) και αποτελεί την πιο συμπυκνωμένη του μορφή.
2. Την ανοιχτή κυκλική, στην οποία μεταβαίνει το πλασμίδιο όταν προκαλούνται μονόκλιωνα ρήγματα και
3. Την γραμμική διαμόρφωση, στην οποία μεταβαίνει το πλασμίδιο όταν φέρει δίκλιωνα ρήγματα.



Εικόνα 32: Διαμορφώσεις του πλασμιδιακού DNA κατά την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

Οι διαμορφώσεις αυτές τρέχουν με διαφορετική ταχύτητα κατά την ηλεκτροφόρηση. Όσο πιο μικρή σε μέγεθος είναι η διαμόρφωση, τόσο πιο γρήγορα διαπερνά τους πόρους του πηκτώματος της αγαρόζης και τόσο περισσότερο αυξάνεται η απόσταση που διανύει. Συγκεκριμένα, το υπερελικωμένο DNA που είναι πιο συμπαγές διαπερνά πιο γρήγορα τους πόρους του πηκτώματος, ενώ η ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση, που προκύπτει από τη δράση της τοποϊσομεράσης I, κινείται πολύ πιο αργά με αποτέλεσμα να παραμένει κοντά στο σημείο φόρτωσης. Τέλος, η γραμμική

διαμόρφωση εμφανίζεται ανάμεσα στην υπερελικωμένη και την ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση. Έτσι, βασιζόμενοι στις διαφορετικές διαμορφώσεις του πλασμιδιακού DNA και στη δράση του ενζύμου, μπορούμε να παρατηρήσουμε αν κάποιο εκχύλισμα δρα ως αναστολέας του συγκεκριμένου ενζύμου. Στην περίπτωση που το εκχύλισμα αποτελεί αναστολέα του ενζύμου αναμένεται ότι το πλασμιδιακό DNA θα παραμένει στην υπερελικωμένη διαμόρφωση χωρίς να μεταβαίνει στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση.

### **2.2.3. Δοκιμή χαλάρωσης πλασμιδιακής διαμόρφωσης παρουσία τοποϊσομεράσης I (Wheat germ Topoisomerase I plasmid relaxation assay)**

Τα εκχυλίσματα εξετάστηκαν σε ένα εύρος συγκεντρώσεων 0.1 µg/ml – 20 µg/ml, ανάλογα με το εκχύλισμα, για να προσδιοριστεί η επίδρασή τους στη ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I. Για την εύρεση της μικρότερης ποσότητας (units) του ενζύμου, κατά την οποία υπάρχει ικανοποιητική μείωση των υπερελικώσεων του πλασμιδιακού DNA, πραγματοποιήθηκε τιτλοδότηση του ενζύμου. Εξετάστηκαν 1 unit, 1.5 units και 2 units ενζύμου όσον αφορά την ικανότητά τους να προκαλούν χαλάρωση συγκεκριμένης ποσότητας (1 µg πλασμιδίου) σε συγκεκριμένες συνθήκες πειράματος (μία ώρα επώασης σε 37° C). Λόγω της χρήσης διαφορετικών παρτίδων (stock) τοποϊσομεράσης I σε μερικές αντιδράσεις απαιτούνταν 1.23 units και σε άλλες 1.42 units ώστε η υπερελικωμένη διαμόρφωση να μετατραπεί κατά 90% περίπου σε ανοιχτή κυκλική. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι υπήρξε διαφορά στην ενζυμική ενεργότητα ανάλογα με την παρτίδα του ενζύμου (stock) του παρασκευαστή.

Οι αντιδράσεις έγιναν σε τελικό όγκο 20 µl και περιείχαν 1 µg πλασμιδίου Bluescript SK+, 1.23 ή 1.42 units του ενζύμου (ανάλογα την παρτίδα του ενζύμου όπως προαναφέρθηκε) σε διάλυμα 20% γλυκερόλης, 1 mM DTT, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl, 0,1 mM EDTA. Η κάθε αντίδραση περιελάμβανε α) τον αρνητικό μάρτυρα που αποτελούνταν από το πλασμιδιακό DNA, β) το θετικό μάρτυρα που αποτελούνταν από το πλασμιδιακό DNA και το ένζυμο, και γ) πλασμιδιακό DNA, ένζυμο και τα υπό εξέταση εκχυλίσματα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

Τα δείγματα επώαστηκαν στους 37° C για μία ώρα και η αντίδραση τερματίστηκε με προσθήκη 5 µl διαλύματος φόρτωσης. Η ανάλυση των δειγμάτων έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 0.8% και σε διάλυμα TBE 1X, αρχικά στα 60 Volt και στη συνέχεια στα 100 Volt για περίπου 45 λεπτά. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης πραγματοποιήθηκε χρώση του πηκτώματος σε

διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (τελικής συγκέντρωσης 0.5 μg/ml) με συνεχή ανάδευση για 30 λεπτά. Για τον αποχρωματισμό του πήκτωματος, απομακρύνονταν το διάλυμα του βρωμιούχου αιθιδίου και το πήκτωμα αναδευόταν για 30 λεπτά με 250 ml διπλά απιονισμένου νερού. Στο τέλος του αποχρωματισμού, το πήκτωμα τοποθετήθηκε κάτω από υπεριώδες φως (UV) και φωτογραφίστηκε μέσω του προγράμματος Alpha View (Alpha Innotech, San Leandro, California).

#### 2.2.4. Υπολογισμοί

Το πρόγραμμα Gel-Pro χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό, με βάση την οπτική πυκνότητα, των ποσοστών υπερελικωμένης και ανοιχτής κυκλικής διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA για κάθε συγκέντρωση εκχυλίσματος. Το επί της εκατό (%) ποσοστό της αναστολής για κάθε δείγμα υπολογίστηκε σύμφωνα με τον τύπο:

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

Όπου:

$S_p$  είναι το ποσοστό της υπερελικωμένης διαμόρφωσης στο θετικό μάρτυρα, ο οποίος περιέχει το πλασμιδιακό DNA και το ένζυμο,

$S$  είναι το ποσοστό της υπερελικωμένης διαμόρφωσης στο εξεταζόμενο δείγμα, το οποίο περιέχει το πλασμιδιακό DNA, το ένζυμο και το εκχύλισμα,

$S_o$  είναι το ποσοστό της υπερελικωμένης διαμόρφωσης στον αρνητικό μάρτυρα, ο οποίος περιέχει το πλασμιδιακό DNA.

Τα ποσοστά της αναστολής για κάθε εκχύλισμα υπολογίστηκαν σε 2-5 πειράματα. Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα ανάλυσης Statistical Package for Social Sciences (SPSS) 13.0. Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων υπολογίστηκαν η μέση τιμή (mean), η τυπική απόκλιση (standard deviation) και το τυπικό σφάλμα (standard error). Η ανεξάρτητη μεταβλητή ήταν οι συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων.

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 τη συγκριτική μελέτη των εκχυλισμάτων υπολογίστηκε η τιμή  $IC_{50}$  για κάθε εκχύλισμα. Η τιμή  $IC_{50}$  (Inhibitory Concentration) αντιστοιχεί στην συγκέντρωση

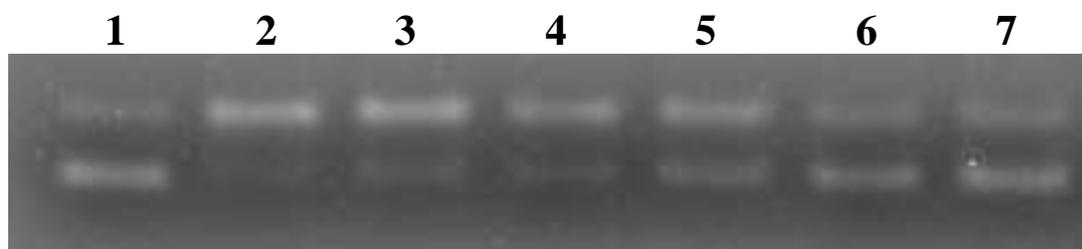
του εκχυλίσματος κατά την οποία παρατηρείται 50% αναστολή της ενεργότητας της τοποϊσομεράσης I. Κατά συνέπεια, εκχυλίσματα με μικρή τιμή  $IC_{50}$  αποτελούν ισχυρούς αναστολείς της ενεργότητας της τοποϊσομεράσης I.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1. Αναστολή της ενεργότητας της τοποϊσομεράσης I από εκχυλίσματα βοστρύχων

##### 1) Ασύρτικο 2010 (ΑΣΥ)

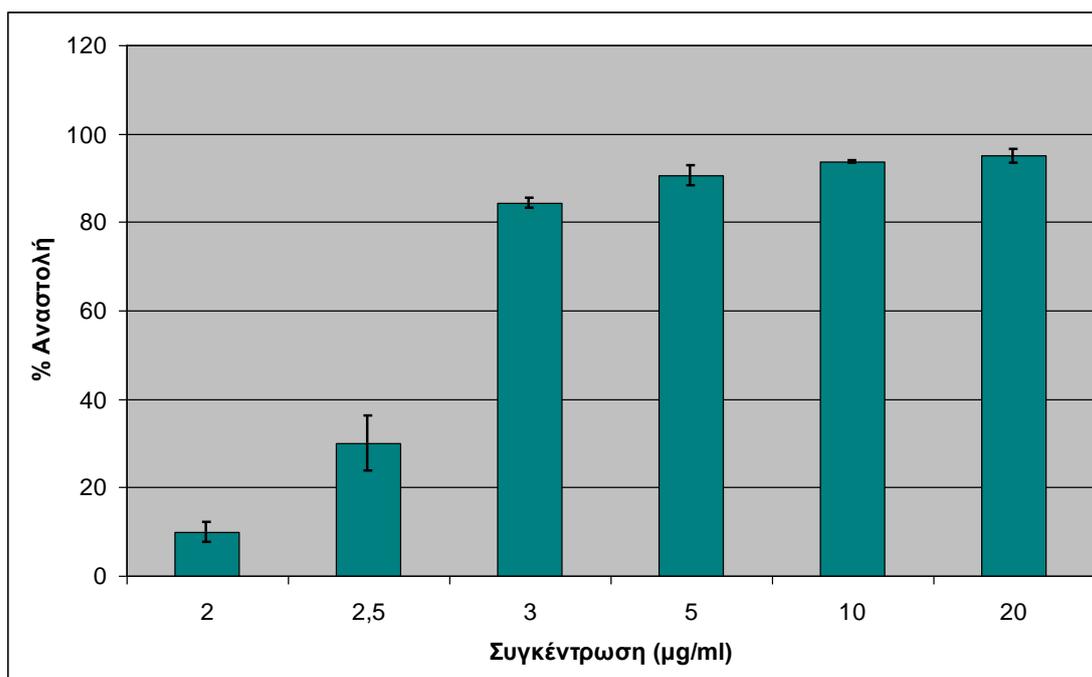
Εξετάστηκε σε συγκεντρώσεις 1, 2, 2.5, 3, 5, 10 και 20  $\mu\text{g/ml}$ . Σε συγκέντρωση 2  $\mu\text{g/ml}$  παρατηρείται αναστολή της ενεργότητας της τοποϊσομεράσης I σε ποσοστό 10%, ενώ σε συγκέντρωση 20  $\mu\text{g/ml}$  επιτυγχάνεται η αναστολή του ενζύμου σε ποσοστό 95%. Στην εικόνα 33 παρατηρείται η επίδραση του εκχυλίσματος ΑΣΥ στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I.



1. 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου (αρνητικός μάρτυρας)
2. 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1.23 units ενζύμου (θετικός μάρτυρας)
3. 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1.23 units ενζύμου + ΑΣΥ (2  $\mu\text{g/ml}$ )
4. 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1.23 units ενζύμου + ΑΣΥ (2.5  $\mu\text{g/ml}$ )
5. 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1.23 units ενζύμου + ΑΣΥ (3  $\mu\text{g/ml}$ )
6. 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1.23 units ενζύμου + ΑΣΥ (5  $\mu\text{g/ml}$ )
7. 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1.23 units ενζύμου + ΑΣΥ (10  $\mu\text{g/ml}$ )

Εικόνα 33: Επίδραση του εκχυλίσματος βοστρύχων από το Ασύρτικο 2010 (ΑΣΥ) στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I του σίτου

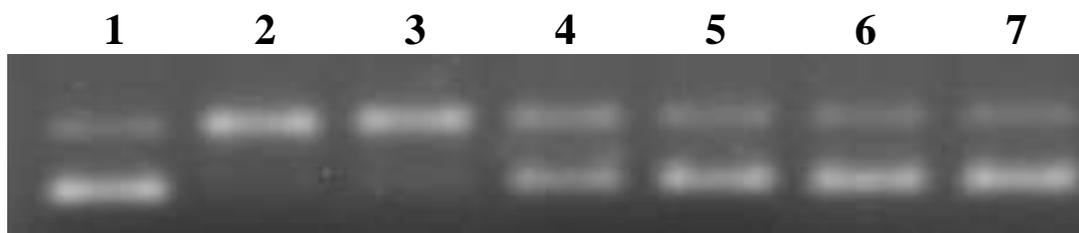
Στο γράφημα 1 απεικονίζονται τα ποσοστά αναστολής της ενεργότητας της τοποϊσομεράσης I σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος ΑΣΥ. Η τιμή του  $\text{IC}_{50}$  εκτιμάται σε 2.6  $\mu\text{g/ml}$ .



Γράφημα 1: Αναστολή της ενεργότητας της ευκαρυωτικής τοποϊσομεράσης I του σίτου από αυξανόμενες συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος βοστρύχων ΑΣΥ.

## 2) Μοσχάτο Αμβούργου (ΜΟΣ)

Εξετάστηκε σε συγκεντρώσεις: 1, 2,5, 5, 10 και 20 µg/ml. Σε συγκέντρωση 1 µg/ml παρατηρείται αναστολή της ενεργότητας της τοποϊσομεράσης I σε ποσοστό 13%, ενώ στις συγκεντρώσεις 10 µg/ml και 20 µg/ml επιτυγχάνεται η πλήρης αναστολή του ενζύμου (ποσοστό 98%). Στην εικόνα 34 παρατηρείται η επίδραση του εκχυλίσματος ΜΟΣ στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I.

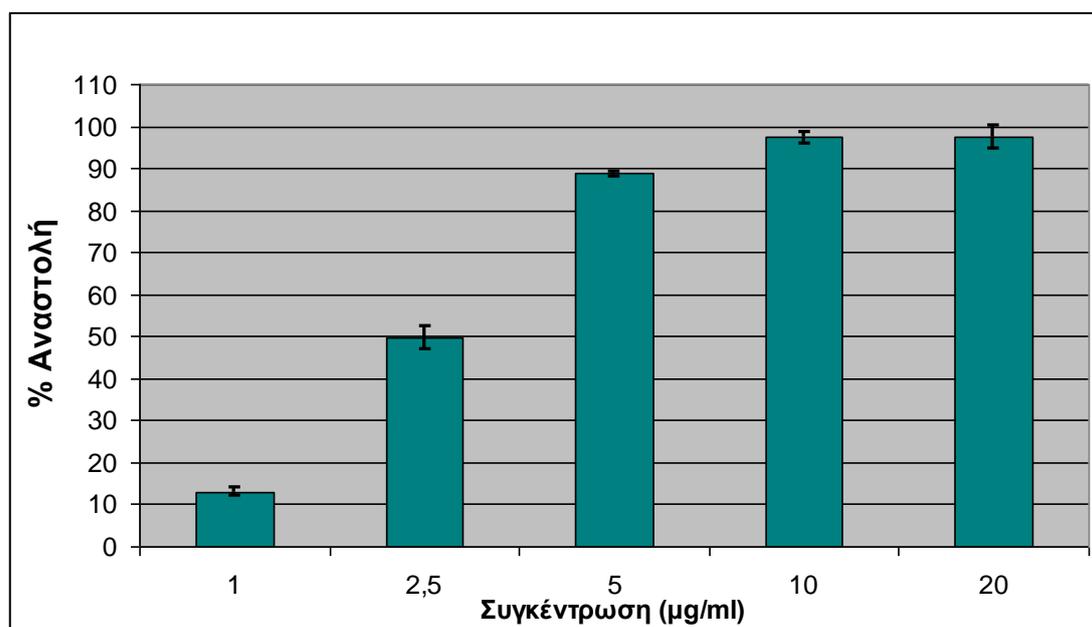


1. 1 µg πλασμιδίου (αρνητικός μάρτυρας)
2. 1 µg πλασμιδίου + 1.23 units ενζύμου (θετικός μάρτυρας)
3. 1 µg πλασμιδίου + 1.23 units ενζύμου + ΜΟΣ (1 µg/ml)
4. 1 µg πλασμιδίου + 1.23 units ενζύμου + ΜΟΣ (2.5 µg/ml)
5. 1 µg πλασμιδίου + 1.23 units ενζύμου + ΜΟΣ (5 µg/ml)
6. 1 µg πλασμιδίου + 1.23 units ενζύμου + ΜΟΣ (10 µg/ml)

7. 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1.23 units ενζύμου + ΜΟΣ (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

Εικόνα 34: Επίδραση του εκχυλίσματος βοστρύχων από το Μοσχάτο Αμβούργου (ΜΟΣ) στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I του σίτου

Στο γράφημα 2 απεικονίζονται τα ποσοστά αναστολής της ενεργότητας της τοποϊσομεράσης I σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος ΜΟΣ. Η τιμή του  $\text{IC}_{50}$  εκτιμάται σε 2.6  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

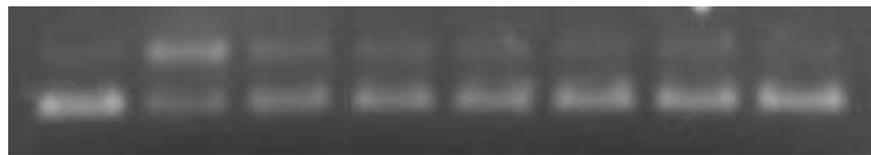


Γράφημα 2: Αναστολή της ενεργότητας της ευκαρυωτικής τοποϊσομεράσης I του σίτου από αυξανόμενες συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος βοστρύχων ΜΟΣ.

### 3) Μαυροτράγανο Σαντορίνης (MAY)

Εξετάστηκε σε συγκεντρώσεις: 0.1, 0.5, 1, 2, 2.5, 4, 5 και 7.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Σε συγκέντρωση 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  παρατηρείται αναστολή της ενεργότητας της τοποϊσομεράσης I σε ποσοστό 8%, ενώ σε συγκέντρωση 7.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  επιτυγχάνεται η αναστολή του ενζύμου σε ποσοστό περίπου 95%. Στην εικόνα 35 παρατηρείται η επίδραση του εκχυλίσματος MAY στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I.

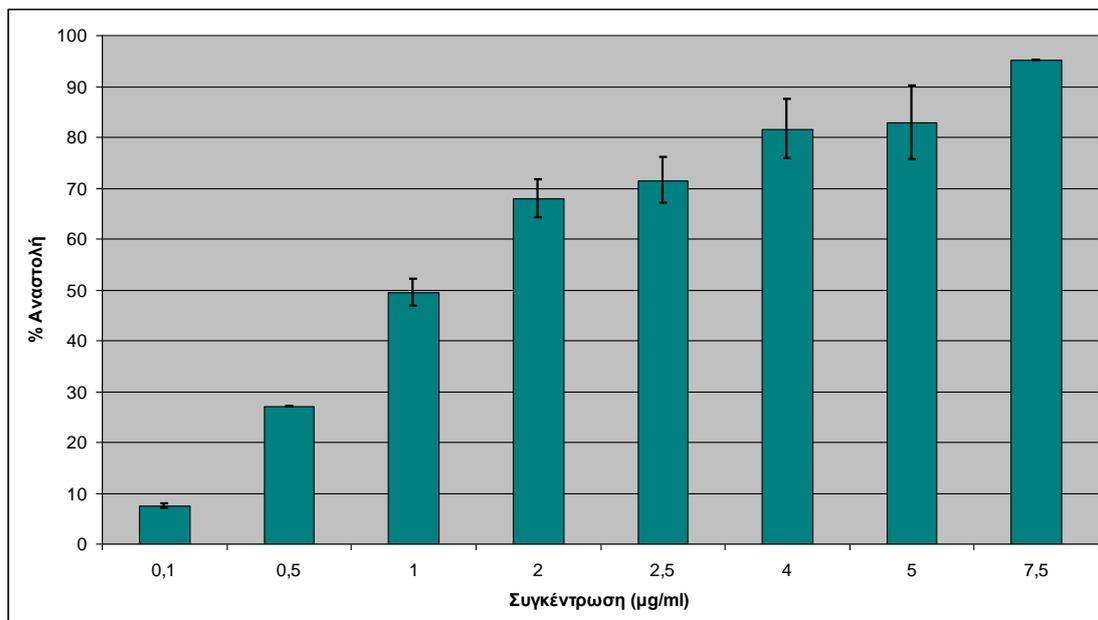
1 2 3 4 5 6 7 8



1. 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου (αρνητικός μάρτυρας)
2. 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1.23 units ενζύμου (θετικός μάρτυρας)
3. 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1.23 units ενζύμου + MAY (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
4. 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1.23 units ενζύμου + MAY (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
5. 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1.23 units ενζύμου + MAY (2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
6. 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1.23 units ενζύμου + MAY (4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
7. 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1.23 units ενζύμου + MAY (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
8. 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1.23 units ενζύμου + MAY (7.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

Εικόνα 35: Επίδραση του εκχυλίσματος βοστρύχων από το Μαυροτράγανο Σαντορίνης (MAY) στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I του σίτου

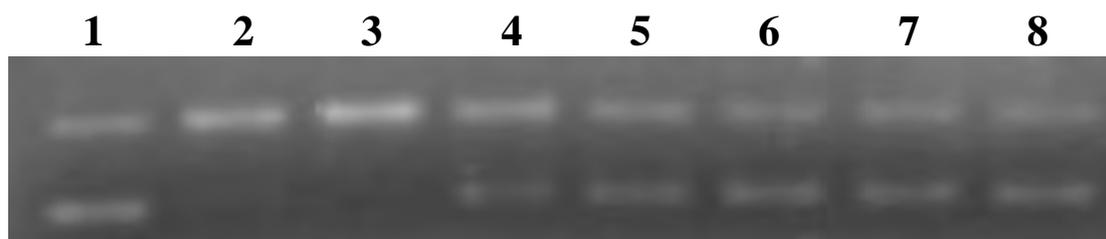
Στο γράφημα 3 απεικονίζονται τα ποσοστά αναστολής της ενεργότητας της τοποϊσομεράσης I σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος MAY. Η τιμή του  $\text{IC}_{50}$  εκτιμάται σε 0.9  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .



Γράφημα 3: Αναστολή της ενεργότητας της ευκαρυωτικής τοποϊσομεράσης I του σίτου από αυξανόμενες συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος βοστρύχων MAY.

#### 4) Vinsanto (BIN)

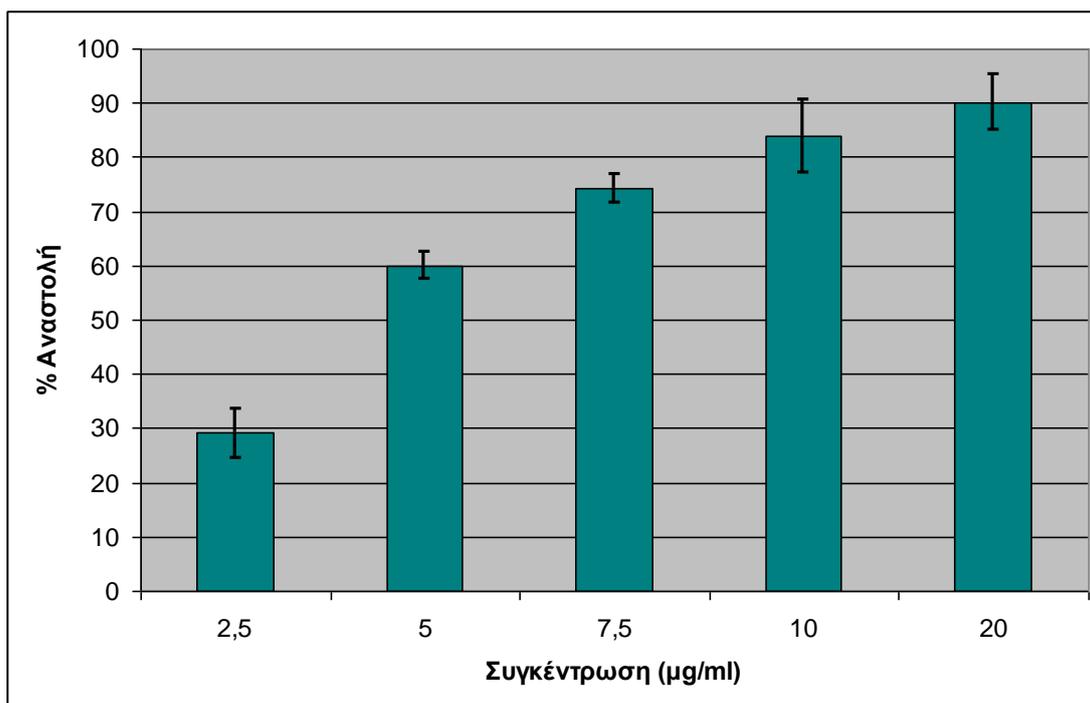
Εξετάσθηκε σε συγκεντρώσεις: 1, 2.5, 5, 7.5, 10 και 20  $\mu\text{g/ml}$ . Σε συγκέντρωση 2.5  $\mu\text{g/ml}$  παρατηρείται αναστολή της ενεργότητας της τοποϊσομεράσης I σε ποσοστό περίπου 30%, ενώ σε συγκέντρωση 20  $\mu\text{g/ml}$  επιτυγχάνεται η αναστολή του ενζύμου σε ποσοστό 90%. Στην εικόνα 36 παρατηρείται η επίδραση του εκχυλίσματος BIN στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I.



1. 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου (αρνητικός μάρτυρας)
2. 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1.23 units ενζύμου (θετικός μάρτυρας)
3. 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1.23 units ενζύμου + BIN (1  $\mu\text{g/ml}$ )
4. 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1.23 units ενζύμου + BIN (2.5  $\mu\text{g/ml}$ )
5. 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1.23 units ενζύμου + BIN (5  $\mu\text{g/ml}$ )
6. 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1.23 units ενζύμου + BIN (7.5  $\mu\text{g/ml}$ )
7. 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1.23 units ενζύμου + BIN (10  $\mu\text{g/ml}$ )
8. 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1.23 units ενζύμου + BIN (20  $\mu\text{g/ml}$ )

Εικόνα 36: Επίδραση του εκχυλίσματος βοστρύχων από το Vinsanto (BIN) στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I του σίτου

Στο γράφημα 4 απεικονίζονται τα ποσοστά αναστολής της ενεργότητας της τοποϊσομεράσης I σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος BIN. Η τιμή του  $\text{IC}_{50}$  εκτιμάται σε 2.8  $\mu\text{g/ml}$ .



Γράφημα 4: Αναστολή της ενεργότητας της ευκαρυωτικής τοποϊσομεράσης I του σίτου από αυξανόμενες συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος βοστρύχων BIN.

### 3.2. Αναστολή της ενεργότητας της τοποϊσομεράσης I από εκχυλίσματα γυγάρτων

#### 1) Ασύρτικο 2010 (ΑΣΥ)

Εξετάσθηκε σε συγκεντρώσεις: 1, 1.5, 2, 2.5, 4, 5, 7.5 και 10 µg/ml. Σε συγκέντρωση 1 µg/ml παρατηρείται αναστολή της ενεργότητας της τοποϊσομεράσης I σε ποσοστό περίπου 24%, ενώ σε συγκέντρωση 5 µg/ml επιτυγχάνεται η αναστολή του ενζύμου σε ποσοστό περίπου 96%. Στην εικόνα 37 παρατηρείται η επίδραση του εκχυλίσματος ΑΣΥ στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I.

**1      2      3      4      5      6      7      8**

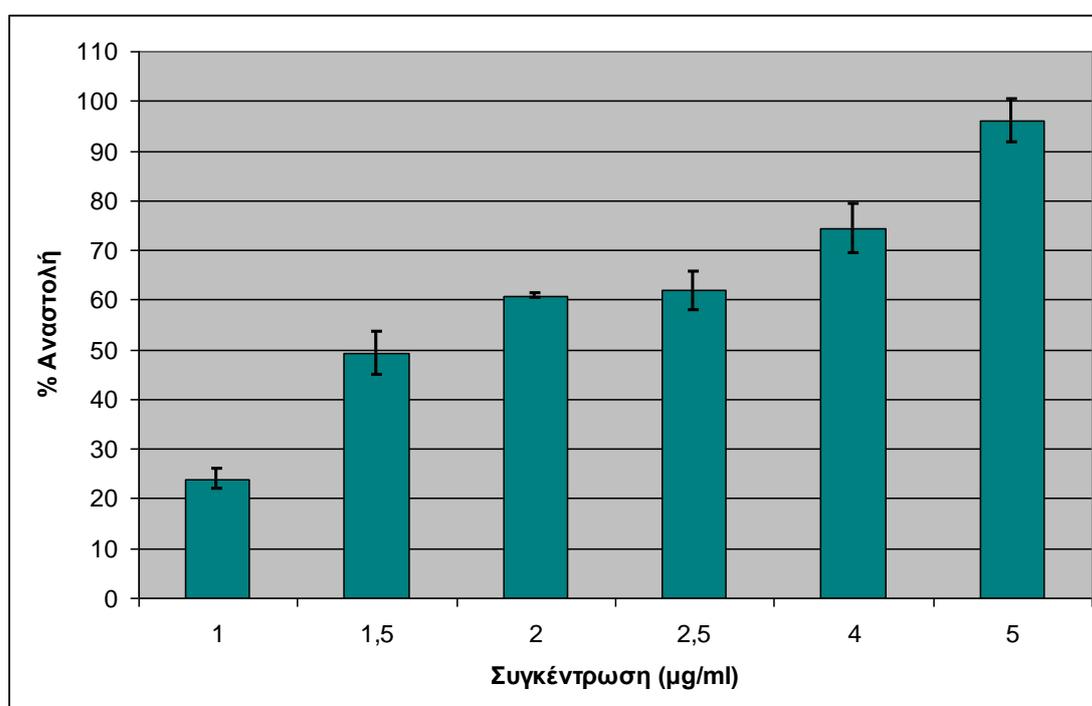


1. 1 µg πλασμιδίου (αρνητικός μάρτυρας)
2. 1 µg πλασμιδίου + 1.4 units ενζύμου (θετικός μάρτυρας)
3. 1 µg πλασμιδίου + 1.4 units ενζύμου + ΑΣΥ (1 µg/ml)
4. 1 µg πλασμιδίου + 1.4 units ενζύμου + ΑΣΥ (1.5 µg/ml)

5. 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1.4 units ενζύμου + ΑΣΥ (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
6. 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1.4 units ενζύμου + ΑΣΥ (2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
7. 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1.4 units ενζύμου + ΑΣΥ (4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
8. 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1.4 units ενζύμου + ΑΣΥ (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

Εικόνα 37: Επίδραση του εκχυλίσματος γιγάρτων από Ασύρτικο 2010 (ΑΣΥ) στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I του σίτου

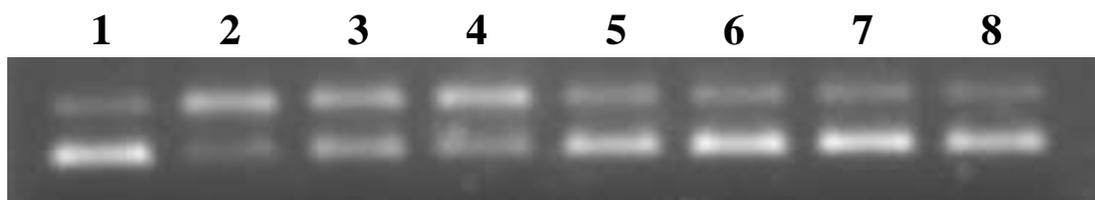
Στο γράφημα 5 απεικονίζονται τα ποσοστά αναστολής της ενεργότητας της τοποϊσομεράσης I σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος ΑΣΥ. Η τιμή του  $\text{IC}_{50}$  εκτιμάται σε 1.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .



Γράφημα 5: Αναστολή της ενεργότητας της ευκαρυωτικής τοποϊσομεράσης I του σίτου από αυξανόμενες συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος γιγάρτων ΑΣΥ.

## 2) Ξινόμαυρο (ΞΙΝ)

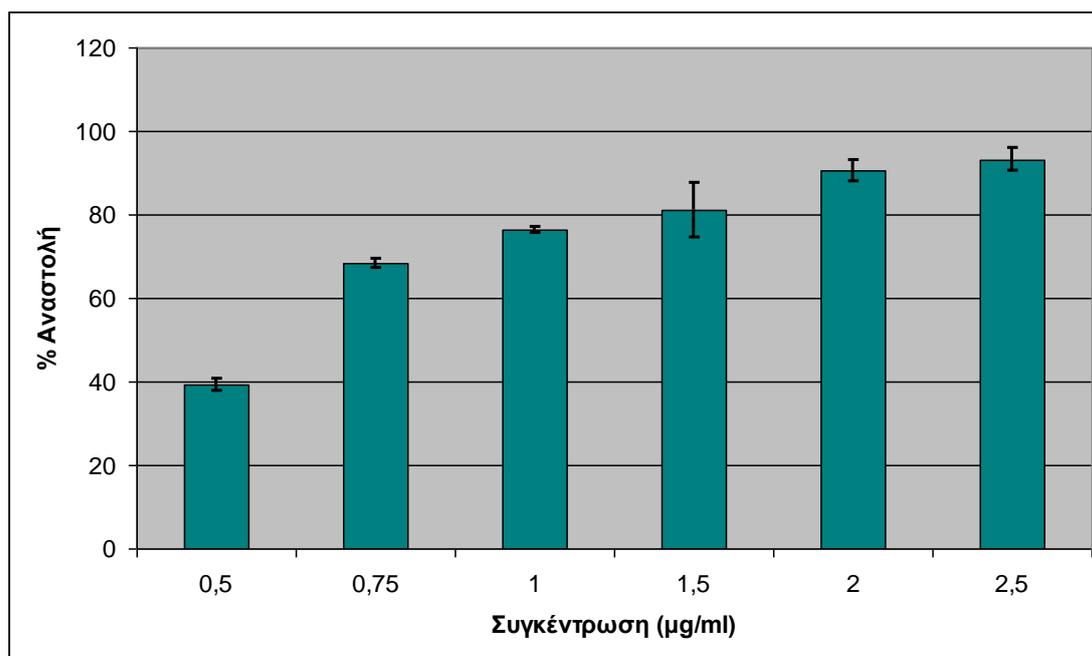
Εξετάσθηκε σε συγκεντρώσεις 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2 και 2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Σε συγκέντρωση 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  παρατηρείται αναστολή της ενεργότητας της τοποϊσομεράσης I σε ποσοστό 40%, ενώ σε συγκέντρωση 2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  επιτυγχάνεται η αναστολή του ενζύμου σε ποσοστό περίπου 96%. Στην εικόνα 38 παρατηρείται η επίδραση του εκχυλίσματος ΞΙΝ στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I.



1. 1 μg πλασμιδίου (αρνητικός μάρτυρας)
2. 1 μg πλασμιδίου + 1.4 units ενζύμου (θετικός μάρτυρας)
3. 1 μg πλασμιδίου + 1.4 units ενζύμου + ΞIN (0.5 μg/ml)
4. 1 μg πλασμιδίου + 1.4 units ενζύμου + ΞIN (0.75 μg/ml)
5. 1 μg πλασμιδίου + 1.4 units ενζύμου + ΞIN (1 μg/ml)
6. 1 μg πλασμιδίου + 1.4 units ενζύμου + ΞIN (1.5 μg/ml)
7. 1 μg πλασμιδίου + 1.4 units ενζύμου + ΞIN (2 μg/ml)
8. 1 μg πλασμιδίου + 1.4 units ενζύμου + ΞIN (2.5 μg/ml)

Εικόνα 38: Επίδραση του εκχυλίσματος γιγάρτων από το Ξινόμαυρο (ΞIN) στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I του σίτου

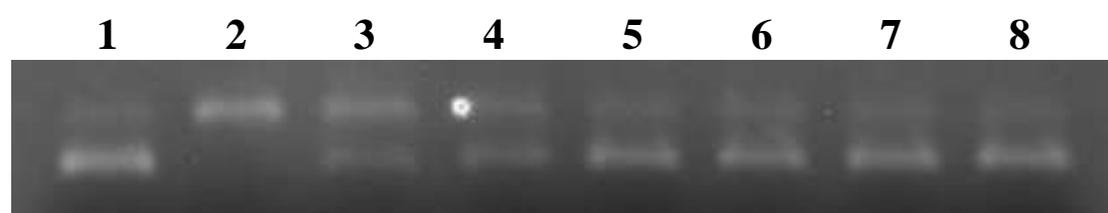
Στο γράφημα 6 απεικονίζονται τα ποσοστά αναστολής της ενεργότητας της τοποϊσομεράσης I σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος ΞIN. Η τιμή του  $IC_{50}$  εκτιμάται σε 0.6 μg/ml.



Γράφημα 6: Αναστολή της ενεργότητας της ευκαρυωτικής τοποϊσομεράσης I του σίτου από αυξανόμενες συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος γιγάρτων ΞΙΝ.

### 3) Ρομπόλα (POM)

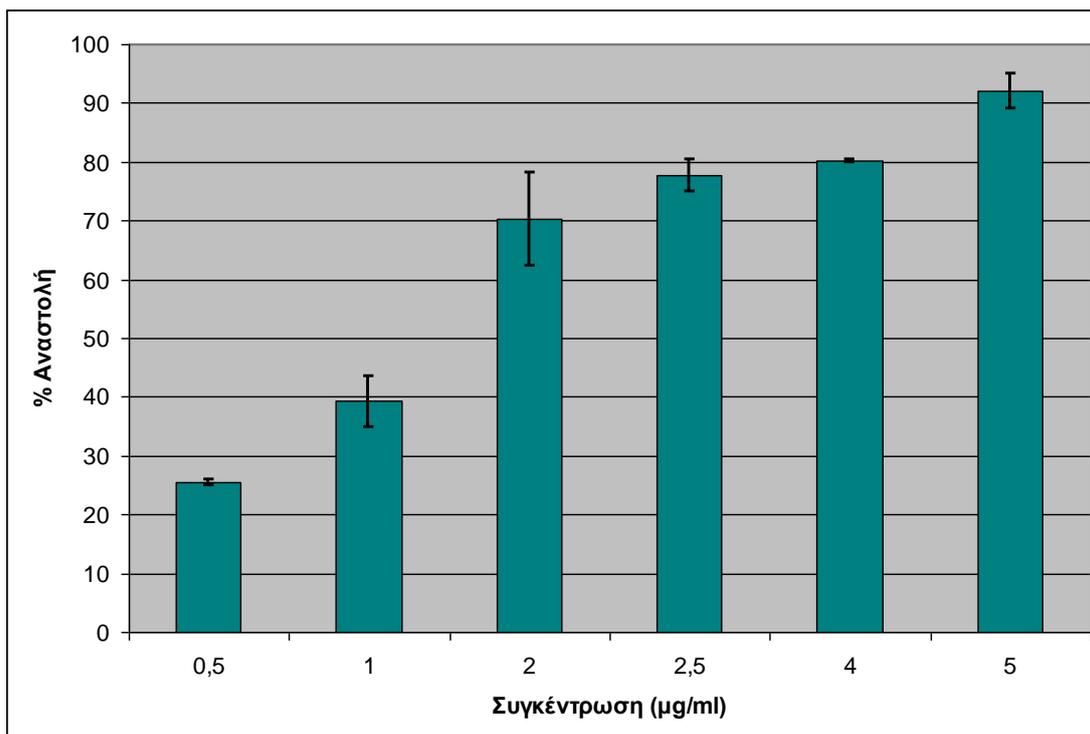
Εξετάσθηκε σε συγκεντρώσεις 0.5, 1, 2, 2.5, 4 και 5  $\mu\text{g/ml}$ . Σε συγκέντρωση 0.5  $\mu\text{g/ml}$  παρατηρείται αναστολή της ενεργότητας της τοποϊσομεράσης I σε ποσοστό 26%, ενώ σε συγκέντρωση 5  $\mu\text{g/ml}$  επιτυγχάνεται η αναστολή του ενζύμου σε ποσοστό περίπου 92%. Στην εικόνα 39 παρατηρείται η επίδραση του εκχυλίσματος POM στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I.



1. 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου (αρνητικός μάρτυρας)
2. 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1.4 units ενζύμου (θετικός μάρτυρας)
3. 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1.4 units ενζύμου + POM (0.5  $\mu\text{g/ml}$ )
4. 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1.4 units ενζύμου + POM (1  $\mu\text{g/ml}$ )
5. 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1.4 units ενζύμου + POM (2  $\mu\text{g/ml}$ )
6. 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1.4 units ενζύμου + POM (2.5  $\mu\text{g/ml}$ )
7. 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1.4 units ενζύμου + POM (4  $\mu\text{g/ml}$ )
8. 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου + 1.4 units ενζύμου + POM (5  $\mu\text{g/ml}$ )

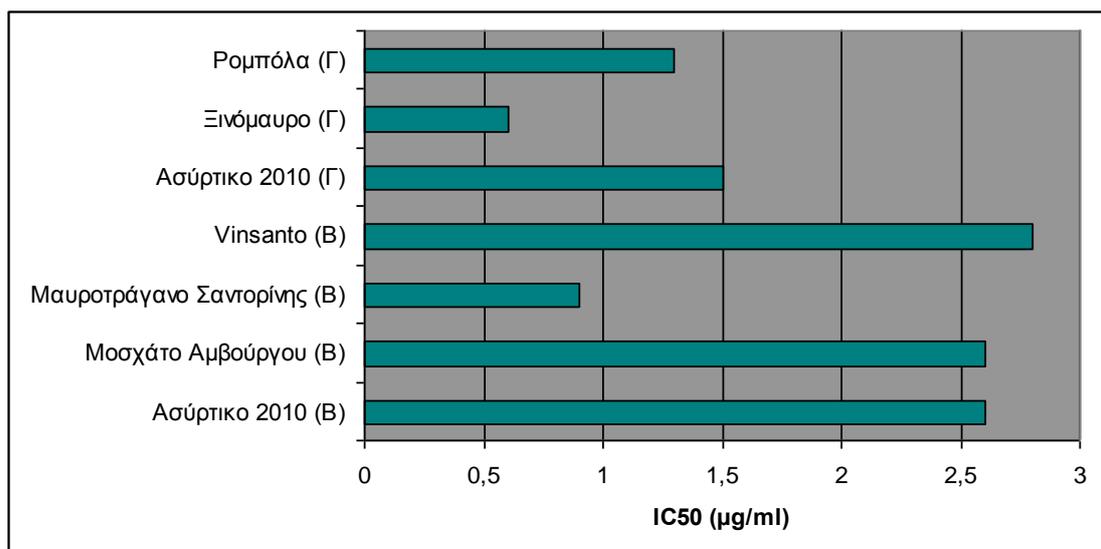
Εικόνα 39: Επίδραση του εκχυλίσματος γιγάρτων από Ρομπόλα (POM) στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I του σίτου

Στο γράφημα 7 απεικονίζονται τα ποσοστά αναστολής της ενεργότητας της τοποϊσομεράσης I σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος POM. Η τιμή του  $\text{IC}_{50}$  εκτιμάται σε 1.3  $\mu\text{g/ml}$ .



Γράφημα 7: Αναστολή της ενεργότητας της ευκαρυωτικής τοποϊσομεράσης I του σίτου από αυξανόμενες συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος γιγάρτων POM.

Συνοψίζοντας, όλα τα εκχυλίσματα των βοστρύχων και των γιγάρτων είναι ικανά να αναστέλλουν την ενεργότητα της ευκαρυωτικής τοποϊσομεράσης I του σίτου. Στο γράφημα 8 παρουσιάζονται συνοπτικά οι τιμές  $IC_{50}$  των επτά εκχυλισμάτων που εξετάστηκαν.



Γράφημα 8: Τιμές  $IC_{50}$  των εκχυλισμάτων για τους επτά αναστολείς της τοποϊσομεράσης I του σίτου

#### 4. Συζήτηση

Τα σταφύλια αποτελούν σημαντικό συστατικό της Μεσογειακής διατροφής καθώς είναι πλούσια σε θρεπτικά στοιχεία. Έχει βρεθεί ότι τα σταφύλια έχουν σημαντική χημειοπροστατευτική δράση, η οποία έχει αποδοθεί στο περιεχόμενό τους σε πολυφαινόλες. Οι πολυφαινόλες είναι οργανικές ενώσεις που απαντώνται σε πολλές τροφές, όπως φρούτα, λαχανικά, τσάι και δημητριακά και κατηγοριοποιούνται ανάλογα με τη χημική τους δομή σε φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα, φαινολικές αλκοόλες, στυλβένια και λιγνάνες. Είναι γνωστές για την ευεργετική τους επίδραση στην ανθρώπινη υγεία, κυρίως λόγω των αντιοξειδωτικών και χημειοπροστατευτικών τους ιδιοτήτων. Η ικανότητα των πολυφαινολών να αναστέλλουν τη δράση των τοποϊσομερασών είναι ένας από τους λόγους για τον οποίο οι πολυφαινόλες αποτελούν σήμερα έναν από τους σημαντικότερους χημειοπροφυλακτικούς παράγοντες. Οι τοποϊσομεράσες ρυθμίζουν την τοπολογία του DNA και συμμετέχουν σε σημαντικές κυτταρικές διεργασίες, όπως η αντιγραφή, η μεταγραφή και η συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων. Έχει παρατηρηθεί σημαντική αύξηση στην έκφραση των ενζύμων αυτών σε καρκινικά κύτταρα, γεγονός που οδήγησε στην αναζήτηση αναστολέων τους.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση επτά εκχυλισμάτων σταφυλιών, που αποτελούν μείγματα πολυφαινολικών ενώσεων, στην ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I του σίτου. Τα εκχυλίσματα απομονώθηκαν από βοστρύχους, οι οποίοι αποτελούν το ξυλώδες μέρος του φυτού, και από γιγάρτα, δηλαδή από τους σπόρους του φρούτου. Βρέθηκε ότι όλα τα εκχυλίσματα που εξετάστηκαν αναστέλλουν την ενεργότητα της τοποϊσομεράσης I του σίτου. Πιο συγκεκριμένα, από τα εκχυλίσματα από βοστρύχους, το πιο δραστικό ήταν το Μαυροτράγανο Σαντορίνης με  $IC_{50}$  0.9  $\mu\text{g/ml}$ , ενώ λιγότερο δραστικό ήταν το εκχύλισμα από το Vinsanto με  $IC_{50}$  2.8  $\mu\text{g/ml}$ . Τα εκχυλίσματα βοστρύχων από τις ποικιλίες Ασύρτικο 2010 και Μοσχάτο Αμβούργου ήταν εξίσου δραστικά στην αναστολή της τοποϊσομεράσης I ( $IC_{50}$  2.6  $\mu\text{g/ml}$ ). Από τα εκχυλίσματα γιγάρτων, πιο δραστικό ήταν το Ξινόμαυρο με  $IC_{50}$  0.6  $\mu\text{g/ml}$ , ενώ λιγότερο δραστικό ήταν το εκχύλισμα Ασύρτικο 2010 με  $IC_{50}$  1.5  $\mu\text{g/ml}$ . Το εκχύλισμα γιγάρτων από σταφύλια της ποικιλίας Ρομπόλα παρουσίασε ενδιάμεση τιμή  $IC_{50}$  1.3  $\mu\text{g/ml}$ . Συμπερασματικά, δεν παρατηρήθηκε διαφορά μεταξύ των εκχυλισμάτων βοστρύχων και γιγάρτων στην αναστολή της ενεργότητας της τοποϊσομεράσης I.

Η διαφορετική δράση των εκχυλισμάτων ως προς την ικανότητα αναστολής της τοποϊσομεράσης I πιθανώς οφείλεται στη διαφορετική τους χημική σύσταση. Κάθε εκχύλισμα αποτελείται από διαφορετικές πολυφαινολικές ενώσεις και υπάρχουν διαφορές στην συγκέντρωση της κάθε ένωσης σε κάθε μείγμα. Για παράδειγμα, η κερκετίνη, η καιμπφερόλη και το π-κουμαρικό οξύ που περιέχονται στα εκχυλίσματα βοστρύχων, δεν ταυτοποιούνται στα εκχυλίσματα γιγάρτων. Επίσης, η trans-ρεσβερατρόλη και το γαλλικό οξύ, απαντώνται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στα εκχυλίσματα βοστρύχων από αυτά των γιγάρτων. Γενικά, τα εκχυλίσματα των γιγάρτων έχουν πολύ μικρότερη ποικιλία πολυφαινολικών ενώσεων, σε σύγκριση με τα εκχυλίσματα των βοστρύχων. Ενδεικτικά, το εκχύλισμα βοστρύχων από την ποικιλία Ασύρτικο περιέχει 11 διαφορετικές ενώσεις, ενώ το εκχύλισμα γιγάρτων από την ίδια ποικιλία περιέχει μόνο δύο ενώσεις (γαλλικό οξύ και trans-ρεσβερατρόλη), εντούτοις το εκχύλισμα των γιγάρτων είναι πιο αποτελεσματικός αναστολέας της τοποϊσομεράσης I. Είναι λοιπόν πιθανό η δραστηριότητα των εκχυλισμάτων να οφείλεται σε συγκεκριμένες πολυφαινόλες, αλλά μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο η συγκέντρωση της κάθε ένωσης καθώς και πιθανές συνεργικές ή/και ανταγωνιστικές δράσεις μεταξύ των πολυφαινολικών ενώσεων ή μεταξύ πολυφαινολών και άλλων βιοδραστικών συστατικών που περιέχονται στα εκχυλίσματα. Επίσης, παρόλο που ο αριθμός των δειγμάτων που εξετάστηκαν είναι μικρός, η ανασταλτική δράση ανάμεσα στα εκχυλίσματα βοστρύχων άσπρων και ερυθρών ποικιλιών δεν παρουσιάζει ιδιαίτερες διαφορές.

Όσον αφορά τις πολυφαινολικές ενώσεις που περιέχονται στα εκχυλίσματα, είναι γνωστό ότι οι φλαβονόλες κερκετίνη και καιμπφερόλη (Constantinou et al, 1995), καθώς και το στυλβένιο ρεσβερατρόλη (Jo et al, 2006) αποτελούν ισχυρούς αναστολείς των τοποϊσομερασών I και II. Σε αντίθεση με την κερκετίνη, η ρουτίνη (που είναι η γλυκοσυλιωμένη μορφή της κερκετίνης) έχει δειχθεί ότι αποτελεί ειδικό αναστολέα μόνο της τοποϊσομεράσης IV, αλλά όχι της *E. coli* DNA γυράσης ή της ευκαρυωτικής τοποϊσομεράσης II (Bernard et al, 1997). Επίσης, γνωστό αναστολέα των τοποϊσομερασών I και II αποτελεί η EGCG (epigallocatechin gallate), που είναι ο εστέρας της επιγαλοκατεχίνης και του γαλλικού οξέος (Suzuki et al, 2001). Το καφεϊκό οξύ αναστέλλει τη δράση της τοποϊσομεράσης I, σε αντίθεση με τα άλλα δύο υδροξυκιναμικά οξέα (φερουλικό και κουμαρικό οξύ), ενώ από τα υδροξυβενζοϊκά οξέα, το γαλλικό δεν αποτελεί αναστολέα της τοποϊσομεράσης I. Συνεπώς, η παρατηρούμενη αναστολή στο εκχύλισμα γιγάρτων της ποικιλίας Ασύρτικο, οφείλεται

αποκλειστικά στην παρουσία της ρεσβερατρόλης. Τέλος, ενώ δεν υπάρχουν μελέτες στη βιβλιογραφία για το π-κουμαρικό οξύ και το συριγγικό οξύ, που να αφορούν στην αναστολή των τοποϊσομερασών, οι ενώσεις αυτές είναι γνωστές για τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες και την προστατευτική δράση έναντι διαφόρων τύπων καρκίνου (Ferguson et al, 2005).

Εκχυλίσματα βοστρύχων και γιγάρτων από διαφορετικές ποικιλίες σταφυλιών έχουν χρησιμοποιηθεί και σε άλλες μελέτες στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζώων του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και έχειδειχθεί ότι διαθέτουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Η αναστολή της τοποϊσομεράσης I που παρατηρήθηκε στην παρούσα εργασία αποτελεί ένα επιπλέον μηχανισμό μέσω του οποίου τα εκχυλίσματα αυτά μπορούν να δράσουν ως χημειοπροστατευτικοί παράγοντες. Ωστόσο, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι έχουν αναφερθεί μελέτες που δείχνουν ότι οι πολυφαινόλες σε υψηλές συγκεντρώσεις όχι μόνο δεν αποτρέπουν την εκδήλωση ασθενειών, αλλά μπορεί και να προκαλέσουν σημαντικές παρενέργειες στον ανθρώπινο οργανισμό. Συνεπώς, μία διατροφή με τροφές πλούσιες σε φυτοχημικά συστατικά σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις προστατεύει τον οργανισμό από την εμφάνιση διαφόρων νοσημάτων και επομένως από την ανάπτυξη καρκίνου.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Stryer., Biochemistry, (2006)
- Roca J. 1995. The mechanisms of DNA topoisomerases, *Trends in Biochemical Sciences*, 20:151-160
- 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
- Froelich-Ammon S., Neil Osheroff, Topoisomerase Poisons: Harnessing the Dark Side of Enzyme Mechanism (1995)
- Wang J. C., (1996), DNA Topoisomerases, *Annual Reviews of Biochemistry*, 65: 635-92
- Champoux, J.J. (2001) DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.*, 70, 369–413.
- 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.
- 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.
- Baker Nicole M., Rakhi Rajan, Alfonso Mondragon, Structural studies of type I topoisomerases, *Nucleic Acids Research*, 2009, Vol. 37, No. 3 693–701
- Nitiss John L., Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy, *Nat Rev Cancer*. 2009 (5): 338–350
- Berger J.M., Fass D., Wang J.C., Harrison S.C. 1998. Structural similarities between topoisomerases that cleave one or both DNA strands, *National Academy of Sciences*, 95:7876-7881
- 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., (2002), Cellular roles of DNA Topoisomerases: a molecular perspective, *Nature Publishing*, 3: 430-440
- Berger, J. M., and Wang, J. C. (1996) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6, 84-90
- Burden, D. A., and Osheroff, N. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* 1400(1-3), 139-154
- Lindsley, J. E., and Wang, J. C. (1993) *J. Biol. Chem.* 268(11), 8096-8104
- Roca, J., and Wang, J. C. (1992) *Cell* 71(5), 833-840
- Schwartzman, J. B., and Stasiak, A. (2004) *EMBO Rep.* 5(3), 256-261
- Nitiss J, (1998) Investigating the biological functions of DNA topoisomerases in eukaryotic cells, *Biochimica et Biophysica Acta*
- Pommier Yves, DNA Topoisomerase I Inhibitors: Chemistry, Biology and Interfacial Inhibition, *Chem Rev.* 2009 109(7): 2894–2902.
- Hsiang YH, Hertzberg R, Hecht S, Liu LF. *J Biol Chem* 1985;260:14873–8
- Rothenberg M. L., (1997), Topoisomerase I inhibitors: Review and update, *Annals of Oncology*, 8: 837-855
- Pommier Y., (1998), Diversity of DNA topoisomerases I and inhibitors, *Biochimie*, 80:255-270
- Baldwin, E. L., and Osheroff, N. (2005) *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents* 5(4), 363-372

- Fortune J. M., Osheroff N., (1998), Merbarone inhibits the catalytic activity of human topoisomerase II $\alpha$  by blocking DNA cleavage, *The Journal of Biological Chemistry*, 273:17643-17650
- Tsao Anne S., Kim Edward S., Waun Ki Hong, Chemoprevention of Cancer, *CA Cancer J Clin* 2004;54:150–180
- Wattenberg LW: Chemoprevention of cancer (1985) *Cancer Res*, 45: 1-8
- Scalbert A., Manach C., Morand C., Remesy C., (2005), Dietary polyphenols and the prevention of diseases, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45: 287-306
- Wenying Ren, Zhenhua Qiao, Honwei Wang, Lei Zhu, Li Zhang., Flavonoids: Promising Anticancer Agents., *Medicinal Research Reviews*, Vol. 23, No. 4, 519-534, 2003
- Berger M. James, Structure of DNA topoisomerases, *Biochimica et Biophysica Acta* 1400 (1998) 3-18
- Bravo Laura, Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance, *Nutrition reviews*, Vol. 56, No. 11, 1998
- 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
- Augustin Scalbert , Gary Williamson,(2000) Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols
- Nassiri-Asl Marjan and Hosseinzadeh Hossein, Review of the pharmacological effects of *Vitis vinifera* (grape) and its bioactive compounds, *Phytother. Res.* 23, 1197-1204, 2009
- Ferguson R. Lynnette, Role of plant polyphenols in genomic stability, *Mutation Research*, 475, 89-111, 2001
- Rahimi R., Nikfar S., Larijani B., Abdollahi M. Review on the role of antioxidants in the management of diabetes and its complications *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2005, 59, 365-373.
- Dell' Agli M., Busciala A., Bosisio E. Vascular effects of wine polyphenols. *Cardiovascular Res.*, 2004, 63, 593-602.
- Stoclet J.C., Chataigneau T., Ndiaye M., Oak M.H., Bedoui J.E., Chataigneau M., Kerth V.B.S. Vascular protection by dietary polyphenols. *European Journal of Pharmacology*, 2004, 500, 299-313.
- Da Silva P.A.L., Laranjinha J.A.N., De Freitas V.A.P. Antioxidant protection of low density lipoprotein by procyanidins: structure/activity relationships. *Biochemical Pharmacology*, 2003, 66, 947-954.
- Chen C. & Kong A.N.T. Dietary cancer-chemopreventive compounds: from signaling and gene expression to pharmacological effects. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2005, 26 (6), 318-325.
- Russo A., Palumbo M., Aliano C., Lempereur L., Scoto G., Renis M. Red wine micronutrients as protective agents in Alzheimer-like induced insult. *Life Sciences*, 2003, 72, 2369-2379.
- Baydar N.G., Ozkan G., Sagdic O. Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts. *Food Control*, 2004, 15, 335-339.
- Ratna W.N. & Simonelli J.A. The action of dietary phytochemicals quercetin, catechin, resveratrol and naringenin on estrogen-mediated gene expression. *Life Sciences*, 2002, 70, 1577-1589.

- Schultz T.P., Hubbard T.M.JR., Jin Le H., Fisher T.H., Nicholas D.D. Role of stilbenes in the natural durability of wood: Fungicidal structure-activity relationships. *Phytochemistry*. 1990, 29 (5), 1501-1507.
- Winkel-Shirley B. Flavonoid biosynthesis. A colourful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant physiol*. 2001, 126, 485-493
- Yoshida M, Sakai T, Hosokawa N, Marui N, Matsumoto K, Fujioka A, Nishino H, Aoike A, The effect of quercetin cell cycle progression and growth of human gastric cancer cells, *FEBS Lett*. 1990, 260, 10-13
- Hosokawa N, Hosokawa Y, Sakai T, Yoshida M, Aoike A, Kawai K, Nishino H, Fukushima M. Inhibitory effect of quercetin the synthesis of a possible cell-cycle-related 17 kDa protein in human colon cancer cells, *Int. J. Cancer* 1990, 45, 1119-1124
- Pawlikowska-Pawlega B, Jakubowicz-Gil J, Rzymowska J, Gawron A. The effect of quercetin apoptosis and necrosis induction in human colon adenocarcinoma cell line LS180. *Folia Histochem. Cytobiol*. 2001, 39, 217-218
- Kampa M, Hatzoglou A, Notas G, Damianaki A, Bakogeorgou E, Gemetzi C, Kouroumalis E, Martin P, Castanas E. Wine antioxidant polyphenols inhibit the proliferation of human prostate cancer cell lines. *Nutr. Cancer* 2000, 37, 223-233
- Damianaki A, Bakogeorgou, Kampa, Notas, Hatzoglou, Panagiotou, Gemetzi, Kouroumalis, Martin, Castanas. Potent inhibitory action of red wine polyphenols on human breast cancer cells. *J. Cell Biochem* 2000, 78, 429-441
- Chung L, Cheung T, Kong S, Fung P, Choy Y, Chan Z, Kwok T. Induction of apoptosis by green tea catechins in human prostate cancer DU145 cells. *Life science*, 2001
- Weyant, Carothers, Dannenberg, Bertagnolli. (+)-catechin inhibits intestinal tumor formation, and suppresses focal adhesion kinase activation in the min/+ mouse. *Cancer Res* 2001
- Li, Yashiki, Sonoda, Lou, Ghosh, Byrnes, Lema, Fujiyoshi, Karasuyama. Green tea polyphenols induce apoptosis in vitro in peripheral blood T lymphocytes of adult T-cell leukemia patients. *Cancer res*. 2000, 91, 34-40
- Kuenzig W, Chan J, Norkus E, Caffeic acid and ferulic acid as blockers of nitrosamine formation, *Carcinogenesis* 1984
- Igura K, Ohta T, Kuroda Y, Kaji K. Resveratrol and quercetin inhibit angiogenesis in vitro. *Cancer lett* 2001, 171, 11-16.
- Goldberg M, Yan J, Soleas J. Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by health subjects. *Clin. Biochem*. 2003, 36, 79-87
- Constantinou A, Mehta R, Runyan C, Rao K, Vaughan A, Moon R. Flavonoids as DNA topoisomerase antagonists and poisons: structure-activity relationships. *J Nat Prod*. 1995;58(2):217-25),
- Jo JY, Gonzalez de Mejia E, Lila MA (2006). "Catalytic inhibition of human DNA topoisomerase II by interactions of grape cell culture polyphenols". *J. Agric. Food Chem*. 54 (6): 2083–7)
- F X Bernard, S Sablé, B Cameron, J Provost, J F Desnottes, J Crouzet and F Blanche. Glycosylated flavones as selective inhibitors of topoisomerase IV. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1997, 41 (5), pp: 992-998)

- Suzuki, K; Yahara, S; Hashimoto, F; Uyeda, M (2001). "Inhibitory activities of (-)-epigallocatechin-3-O-gallate against topoisomerases I and II". *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 24 (9): 1088–90.
- Ferguson LR, Shuo-tun Z, Harris PJ (2005). "Antioxidant and antigenotoxic effects of plant cell wall hydroxycinnamic acids in cultured HT-29". *Molecular Nutrition & Food Research* 49 (6): 585–693.