



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

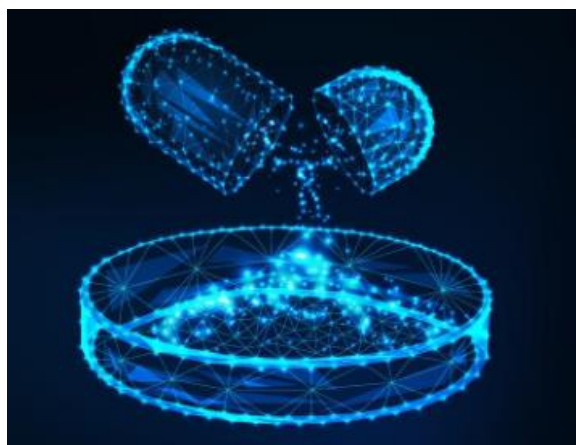
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙ-ΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

(Δ.Π.Μ.Σ.) «ΑΝΟΡΓΑΝΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ ΣΥΖΕΥΓΜΑΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ, ΟΠΩΣ Η ΠΕΝΙΚΙΛΙΝΗ ΜΕ ΙΟΝΤΑ ΑΡΓΥΡΟΥ, ΓΙΑ ΤΗ ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ»



Ζωγραφιά Χριστίνα Φυρίγου

Χημικός

Επιβλέπων Καθηγητής: Δρ. Σωτήριος Χατζηκακού

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2022



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

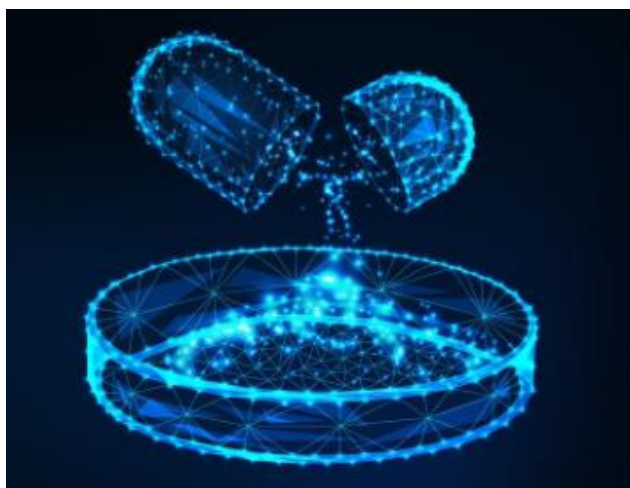
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙ-ΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

(Δ.Π.Μ.Σ.) «ΑΝΟΡΓΑΝΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ ΣΥΖΕΥΓΜΑΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ, ΟΠΩΣ Η ΠΕΝΙΚΙΛΙΝΗ ΜΕ ΙΟΝΤΑ ΑΡΓΥΡΟΥ, ΓΙΑ ΤΗ ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ»



Ζωγραφιά Χριστίνα Φυρίγου

Χημικός

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2022

Εισαγωγή στο ΔΙ-ΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ (Δ.Π.Μ.Σ.)

«ΑΝΟΡΓΑΝΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»

Του/της κ. Ζωγραφιάς Χριστίνας Φυρίγου

Επιβλέπων μέλος ΔΕΠ: Σωτήριος Χατζηκακού

Θέμα: «Σύνθεση και μελέτη αντικαρκινικής δράσης συμπλόκου αργύρου με πενικιλίνη»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ από την Ε.Δ.Ε.:.....^A/...-...-.....

1. Χατζηκακού Σωτήριος, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
(Επιβλέπων)
2. Χριστιάνα Μητσοπούλου, Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και
Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (Μέλος)
3. Γεώργιος Ψωμάς, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Αριστοτέλειο
Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης (Μέλος)

Έγκριση Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας στις _____

Ο Διευθυντής του Δ.Π.Μ.Σ.

Ο/Η Γραμματέας

Καθηγητής _____

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών «Ανόργανη Βιολογική Χημεία» του τμήματος Χημείας, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και εκπονήθηκε στο εργαστήριο της Βιολογικής Ανόργανης Χημείας υπό την επίβλεψη του Δρ. Σωτήριου Χατζηκακού.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Σωτήριο Χατζηκακού, Καθηγητή του τμήματος Χημείας και υπεύθυνο του διδρυματικού μεταπτυχιακού προγράμματος της «Ανόργανης Βιολογικής Χημείας» για την καθοδήγηση, την επιμονή και το ενδιαφέρον που έδειξε για την ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά την κα Χριστίνα Μπαντή, Μεταδιδάκτορα του Εργαστηρίου Βιολογικής Ανόργανης Χημείας και Διδάσκουσα Βιολογίας του τμήματος Χημείας, για την καθοδήγηση και βοήθεια στο βιολογικό εργαστηριακό μέρος.

Ευχαριστώ, επίσης τον κ. Ιωάννη Κωνσταντίνου, Καθηγητή του τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την λήψη του φάσματος TG/DTA.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα του συμφοιτητές μου στο εργαστήριο για την υποστήριξη και τις συμβουλές σε διάφορους τομείς καθώς και τους φίλους μου που ήταν δίπλα μου καθ' όλη τη διάρκεια.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά την οικογένεια μου που με στηρίζει καθημερινά, ψυχολογικά και υλικά σε κάθε βήμα της ζωής μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος του μαστού είναι ένας από τους πιο συνηθισμένους τύπους καρκίνου στον κόσμο. Επομένως, υπάρχει μεγάλη ανάγκη να βρεθούν νέα, αποτελεσματικά αντικαρκινικά φάρμακα, τα οποία να δρουν εκλεκτικά στα καρκινικά κύτταρα για την αποφυγή εμφάνισης παρενεργειών. Σκοπός, λοιπόν, της διπλωματικής είναι η σύνθεση ενός μέταλλο-αντιβιοτικού συμπλόκου, η μελέτη της αντικαρκινικής του δράσης και του τρόπου δράσης του σε καρκινικά κύτταρα μαστού.

Πραγματοποιήθηκε η σύνθεση του φαρμάκου PenAcAg, με την συναρμογή του αργύρου με πενικιλίνη G. Η ένωση χαρακτηρίστηκε με τις φασματοσκοπικές τεχνικές Υπέρυθρης Φασματοσκοπίας Μετασχηματισμού Fourier Ολικής Εσωτερικής Ανάκλασης (ATR-FT-IR), Απορρόφησης Υπέρυθρης-Ορατής Ακτινοβολίας (UV-Vis), Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού Πρωτονίου ($^1\text{H-NMR}$), Φθορισμού Ακτίνων Χ (XRF), με τη μέθοδο της κρυσκοπίας και με Θερμοσταθμική και Διαφορική Θερμική Ανάλυση (TG-DTA). Η αντικαρκινική δράση μελετήθηκε σε θετικά σε ορμονικούς υποδοχείς καρκινικά κύτταρα του μαστού MCF-7 και σε αρνητικά σε ορμονικούς υποδοχείς καρκινικά κύτταρα του μαστού MDA-MB-231. Επίσης, πραγματοποιήθηκαν μελέτες της τοξικότητας σε υγιείς ινοβλάστες πνεύμονα ανθρώπινου εμβρύου (MRC-5), της *in vitro* γενετοξικότητας με την μέθοδο των μικροπυρηνίσκων, του μηχανισμού δράσης του PenAcAg έναντι των MCF-7(HD) κυττάρων μέσω ανάλυσης της μορφολογίας τους και με τη μέθοδο χρώσης πορτοκαλιού ακριδίνης/αιθιδίου βρωμιδίου (AO/EB). Επίσης, ερευνήθηκε ο τρόπος αλληλεπίδρασης του PenAcAg με το DNA με τις μεθόδους ηλεκτρονιακής απορρόφησης

UV-Vis, φθορισμού και ιξωδομετρίας, ενώ μελετήθηκε και η δράση του ως αναστολέας του ενζύμου λιποξυγενάση (LOX).

ABSTRACT

Breast cancer is one of the most common types of cancer in the world. Therefore, there is a great need to find new, effective anti-cancer drugs, which act selectively on cancer cells to avoid side effects. Thus, the purpose of the diploma is the synthesis of a metal-antibiotic complex, the study of its anti-cancer action and the way it acts in breast cancer cells.

The drug PenAcAg was synthesized by coupling the silver to penicillin G. The compound was characterized by the spectroscopic techniques Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR-FT-IR), Ultraviolet-visible spectroscopy (UV-Vis), Proton nuclear magnetic resonance ($^1\text{H-NMR}$), X-ray fluorescence (XRF), by the method of cryoscopy and by Thermogravimetry/Differential Thermal Analysis (TG-DTA). The anti-cancer effect was studied in hormone dependent breast cancer cells MCF-7(HD) and in hormone independent breast cancer cells MDA-MB-231(HI). Moreover, studies were performed to identify the toxicity of PenAcAg to healthy human fetal lung fibroblasts MRC-5, the in vitro genotoxicity by Micronucleus assay, the mechanism of action of PenAcAg against MCF-7 (HD) cells by analysis of their morphology and Acridine Orange/Ethidium Bromide (AO/EB) staining method. Furthermore, the way PenAcAg interacts with DNA was investigated by the methods of electronic absorption UV-Vis, Fluorescence and Viscosity. It was, also, studied its action as an inhibitor of the Lipoyxygenase (LOX) enzyme.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	2
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	3
ABSTRACT	5
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	6
1. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ-ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	9
ΕΙΣΑΓΩΓΗ / ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	11
1.1. Καρκίνος	11
1.1.1. Ο καρκίνος και οι τρόποι θεραπείας του	11
1.1.2. Αιτίες Ανάπτυξης Καρκίνου	16
1.1.3. Καρκίνος του μαστού	18
1.2. Αντικαρκινική δράση και Λιποξυγενάση	20
1.2.1. Λιποξυγενάση και ο μεταβολισμός του αραχιδονικού οξέος	20
1.2.2. Η λιποξυγενάση και η σχέση της με τον καρκίνο	23
1.2.3. Τα ένζυμα και οι αναστολείς τους	27
1.3. DNA και χημειοθεραπευτικά	31
1.3.1. Η δομή του DNA	31
1.3.2. Τρόποι αλληλεπίδρασης μικρών μορίων με το DNA.....	34
1.3.3. Τεχνικές μελέτης της αλληλεπίδρασης φαρμάκων με το DNA	40
1.4. Αντιβιοτικά και αντικαρκινική δράση	41
1.4.1. Τα αντιβιοτικά και οι τρόποι δράσης τους.....	41
1.4.2. Τα αντιβιοτικά και οι αντικαρκινικές του ιδιότητες	42
1.4.3. Η Πενικιλίνη, τα παράγωγά της και η αντικαρκινική δράση	45
1.5. Αντικαρκινική δράση Αργύρου	47
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	49
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	51
3.1. Χημικά Αντιδραστήρια και Όργανα	51

3.2.	Χημικό Μέρος.....	52
3.2.1.	Σύνθεση της ένωσης.....	52
3.2.2.	Σημείο τήξης	53
3.2.3.	Διαλυτότητα.....	53
3.2.4.	Κρυσκοπία	54
3.2.5.	Υπέρυθρη Φασματοσκοπία Μετασχηματισμού Fourier Ολικής Εσωτερικής Ανάκλασης (ATR-FTIR).....	54
3.2.6.	Φθορισμός Ακτίνων Χ (XRF).....	55
3.2.7.	Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός Πρωτονίου (¹ H-NMR)	56
3.2.8.	Απορρόφησης Υπέρυθρης-Ορατής Ακτινοβολίας (UV-Vis),.....	56
3.2.9.	Θερμοσταθμική και Διαφορική Θερμική Ανάλυση (TG-DTA).....	57
3.3.	Βιολογικό μέρος	57
3.3.1.	<i>In vitro</i>	57
3.3.1.1.	Μελέτη της αντικαρκινικής δράσης στα θετικά σε ορμόνες καρκινικά κύτταρα του μαστού MCF-7, στα αρνητικά σε ορμόνες καρκινικά κύτταρα του μαστού (MDA-MB-231) και μελέτη της τοξικότητας σε υγιείς ινοβλάστες πνεύμονα ανθρώπινου εμβρύου (MRC-5)	58
3.3.1.2.	Μελέτη της <i>in vitro</i> γενετοξικότητας με την μέθοδο των μικροπυρηνίσκων (Micronucleus assay)	59
3.3.1.3.	Μελέτη του μηχανισμού δράσης του PenAcAg έναντι των MCF-7(HD) κυττάρων μέσω ανάλυσης της μορφολογίας τους.....	61
3.3.1.4.	Μελέτη του μηχανισμού δράσης του PenAcAg με τη μέθοδο χρώσης πορτοκαλιού ακριδίνης/αιθιδίου βρωμιδίου (Acridine Orange/Ethidium Bromide (AO/EB))	61
3.3.2.	<i>Ex vivo</i>	63
3.3.2.1.	Μελέτη του DNA με το PenAcAg μέσω απορρόφησης UV	63
3.3.2.2.	Μελέτη του DNA με το PenAcAg μέσω φθορισμού.....	65
3.3.2.3.	Μελέτη του DNA με το PenAcAg μέσω ιζωδομετρίας	66
3.3.2.4.	Μελέτη της δράσης του PenAcAg στο ένζυμο λιποξυγενάση	67
3.3.2.4.1.	Προετοιμασία αντιδραστηρίων	67
3.3.2.4.2.	Μελέτη της αναστολής της δράσης του ενζύμου	69
3.3.2.4.3.	Μελέτη του είδους της αναστολής της δράσης του ενζύμου και του μηχανισμού του αναστολέα	70
4.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	73
4.1.	Χημικό μέρος-Χαρακτηρισμός ένωσης	73
4.1.1.	Χημική σύνθεση	73

4.1.2.	Σημείο τήξης	73
4.1.3.	Διαλυτότητα.....	74
4.1.4.	Φάσμα XRF	75
4.1.5.	Κρυσκοπία	76
4.1.6.	Φάσμα FT-IR-ATR	76
4.1.7.	Φάσμα ¹ H-NMR	81
4.1.8.	Μελέτη της σταθερότητας του PenAcAg με φασματοσκοπία ¹ H-NMR.....	85
4.1.9.	Φάσμα UV-Vis	87
4.1.10.	Φάσμα TG/DTA	87
4.1.11.	Προτεινόμενη Δομή.....	89
4.2.	Βιολογική μελέτη.....	90
4.2.1.	<i>In vitro</i> αποτελέσματα	90
4.2.1.1.	Μελέτη της αντικαρκινικής δράσης στα θετικά σε ορμόνες καρκινικά κύτταρα του μαστού MCF-7, στα αρνητικά σε ορμόνες καρκινικά κύτταρα του μαστού MDA-MB-231.....	90
4.2.1.2.	Μελέτη της τοξικότητας σε υγιείς ινοβλάστες πνεύμονα ανθρώπινου εμβρύου (MRC-5)	91
4.2.1.3.	Μελέτη της <i>in vitro</i> γενετοξικότητας με την μέθοδο των μικροπυρηνίσκων (Micronucleus assay)	91
4.2.1.4.	Μελέτη του μηχανισμού δράσης του PenAcAg έναντι των MCF-7(HD) κυττάρων μέσω ανάλυσης της μορφολογίας τους.....	92
4.2.1.5.	Μελέτη του μηχανισμού δράσης του PenAcAg με τη μέθοδο χρώσης πορτοκαλιού ακριδίνης/αιθιδίου βρωμιδίου (Acridine Orange/Ethidium Bromide (AO/EB)) 93	
4.2.2.	<i>Ex vivo</i> αποτελέσματα.....	94
4.2.2.1.	Φασματοσκοπία UV-Vis με CT-DNA και PenAcAg	94
4.2.2.2.	Μελέτη του DNA με το PenAcAg μέσω φθορισμού.....	97
4.2.2.3.	Ιξωδομετρία.....	100
4.2.2.4.	Μελέτη της δράσης του PenAcAg στο ένζυμο λιποξυγενάση	102
4.2.2.5.	Μελέτη του είδους της αναστολής του ενζύμου και του μηχανισμού του αναστολέα 104	
5.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	110
6.	ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ	112
7.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ / ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ.....	113

1. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ-ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

Πίνακας 1: Πίνακας συντομογραφιών Αντιδραστηρίων και Διαλυτών

Συμβολισμός	Ονοματολογία	Μοριακός τύπος
PenNa	Άλας της πενικιλίνης G με νάτριο	$C_{16}H_{17}N_2NaO_4S$
PenH	Πενικιλίνη G	$C_{16}H_{18}N_2O_4S$
AgNO ₃	Νιτρικός άργυρος	-
NaOH	Υδροξείδιο του νατρίου (Καυστικό νάτριο)	-
Et ₂ O	Διαιθυλαιθέρας	$(CH_3CH_2)_2O$
MeOH	Μεθανόλη	CH_3OH
MeCN	Ακετονιτρίλιο	CH_3CN
n-Hexane	Εξάνιο	C_6H_{14}
Toluene	Τολουόλιο	$C_6H_5CH_3$
Χλωροφόρμιο	Τριχλωρομεθάνιο	$CHCl_3$
Διχλωρομεθάνιο	Μεθυλενοδιχλωρίδιο	CH_2Cl_2
Acetone	Ακετόνη (Προπανόλη)	C_3H_6O
EtOH	Αιθανόλη	C_2H_5OH
DMF	Διμεθυλοφορμαμίδιο	C_3H_7NO
DMSO	Διμεθυλοσουλφοξείδιο	C_2H_6OS

Πίνακας 2: Πίνακας συντομογραφιών Μεθόδων και Τεχνικών

Συντομογραφία	Ονομασία (Ελληνικά)	Ονομασία (Αγγλικά)
ATR-FT-IR	Υπέρυθρη Φασματοσκοπία Μετασχηματισμού Fourier Ολικής Εσωτερικής Ανάκλασης	Attenuated Total Reflectance- Fourier Transform -Infrared spectroscopy
UV-Vis	Απορρόφηση Υπέυρης-Ορατής Ακτινοβολίας	Ultraviolet–Visible Spectroscopy
¹ H-NMR	Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός Πρωτονίου	Proton Nuclear Magnetic Resonance
XRF	Φθορισμός Ακτίνων Χ	X-ray Fluorescence
TG-DTA	Θερμοσταθμική και Διαφορική Θερμική Ανάλυση	Thermogravimetry/Differential Thermal Analysis

Πίνακας 3: Πίνακας συντομογραφιών Βιολογικών Αντιδραστηρίων

Συντομογραφία	Ονομασία
MCF-7 (HD)	Θετικά σε ορμονικούς υποδοχείς καρκινικά κύτταρα του μαστού
MDA-MB-231 (HI)	Αρνητικά σε ορμονικούς υποδοχείς καρκινικά κύτταρα του μαστού
MRC-5	Υγιείς ινοβλάστες πνεύμονα ανθρώπινου εμβρύου
AO	Πορτοκαλί ακριδίνης (Acridine Orange)
EB	Αιθίδιο Βρωμίδιο (Ethidium Bromide)
SRB	Σουλφοροδαμίνη Β
CT-DNA	DNA θύμου αδένος μοσχαριού (Calf-thymus DNA)
LOX	Λιποξυγενάση

ΕΙΣΑΓΩΓΗ / ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1. Καρκίνος

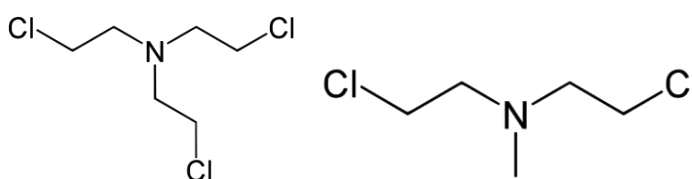
1.1.1. Ο καρκίνος και οι τρόποι θεραπείας του

Ο καρκίνος είναι μια ασθένεια κατά την οποία χάνεται ο έλεγχος του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, έχουμε δηλαδή μη φυσιολογική κυτταρική ανάπτυξη και διαίρεση. Αυτό οδηγεί είτε σε μια συμπαγή μάζα κυττάρων γνωστή ως όγκος είτε σε καρκίνο που σχετίζεται με το αίμα και τον μυελό των οστών. Είναι μία από τις κυριότερες αιτίες θανάτου σε όλο τον κόσμο και οι κύριες θεραπείες περιλαμβάνουν χειρουργική επέμβαση, χημειοθεραπεία και ραδιοθεραπεία [1]. Η χειρουργική επέμβαση αποτελεί μια αποτελεσματική θεραπεία από το 1846 με την ανακάλυψη της αναισθησίας και με την πρόοδο της σύγχρονης θεραπείας περίπου το 50% όλων των ασθενών με καρκίνο υποβάλλονται σε ακτινοθεραπεία [12,18]. Ωστόσο, η χειρουργική επέμβαση και η ακτινοθεραπεία μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνο για κακοήθεις καρκίνους, οι οποίοι περιορίζονται τοπικά σε ένα συγκεκριμένο όργανο. Αντίθετα, η χημειοθεραπεία και η στοχευμένη θεραπεία χρησιμοποιούνται για να σκοτώσουν καρκινικά κύτταρα τα οποία έχουν κάνει μετάσταση σε απομακρυσμένες περιοχές του σώματος [12].

Η χημειοθεραπεία έχει να κάνει με την χρήση φαρμάκων χαμηλού μοριακού βάρους με στόχο την εκλεκτική καταστροφή των καρκινικών κυττάρων ή τουλάχιστον την μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού τους. Με την χρήση όμως αυτών των φαρμάκων προκύπτουν και διάφορες παρενέργειες που οφείλονται σε κυτταροτοξικούς παράγοντες. Κάποιες από αυτές είναι η καταστολή του μυελού των οστών, οι γαστρεντερικές βλάβες, η απώλεια μαλλιών, η ναυτία και η ανάπτυξη μηχανισμών

αντίστασης στη θεραπεία. Όλες αυτές οι παρενέργειες προκύπτουν επειδή τα φάρμακα δεν επηρεάζουν μόνο τα καρκινικά κύτταρα, αλλά στοχεύουν και τα υγιή κύτταρα.

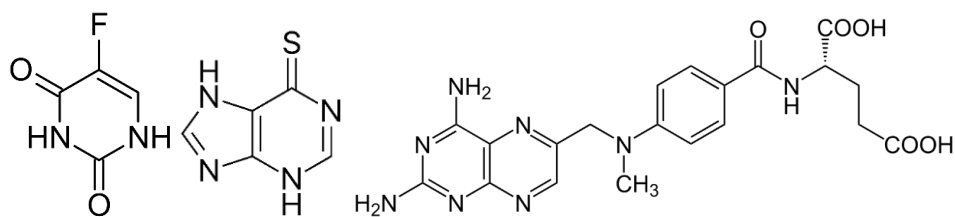
Η χρήση των χημειοθεραπευτικών ξεκίνησε τη δεκαετία του 1940 με τους αζωτούχους υπερίτες (Εικόνα 1), οι οποίοι είναι εξαιρετικά ισχυροί αλκυλιωτικοί παράγοντες και αντιμεταβολίτες. Μετά την επιτυχία αυτών των αρχικών χημειοθεραπευτικών, αναπτύχθηκαν και άλλα πολλά αντικαρκινικά φάρμακα [1].



Εικόνα 1: Αζωτούχοι υπερίτες [20]

Τα αντικαρκινικά φάρμακα μπορούν να καταταχθούν ανάλογα με τον μηχανισμό δράσης τους, όπως είναι οι ουσίες που αλληλεπιδρούν με το DNA, οι αντιμεταβολίτες, οι ορμόνες, τα μονοκλωνικά αντισώματα και άλλοι βιολογικοί παράγοντες [1].

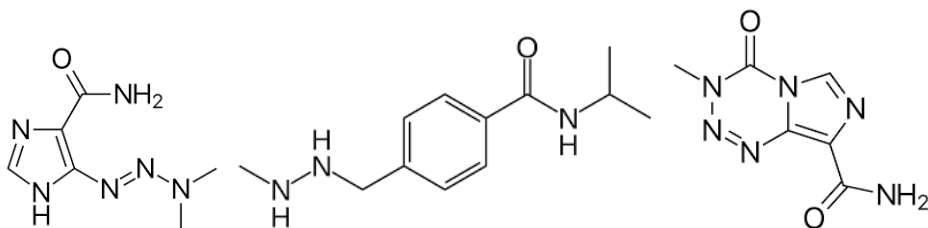
Οι αντιμεταβολίτες είναι από τις πιο παλιές οικογένειες αντικαρκινικών φαρμάκων των οποίων ο μηχανισμός δράσης βασίζεται στην αλληλεπίδραση με βασικές οδούς βιοσύνθεσης. Για παράδειγμα τα δομικά ανάλογα πυριμιδίνης και πουρίνης (5-φθοροουρακίλη, μερκαπτοπουρίνη) ενσωματώνονται σε διάφορα κυτταρικά συστατικά για να παρέμβουν στην σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων, ενώ άλλοι μεταβολίτες όπως η μεθοτρεξάτη παρεμβαίνουν στις ενζυμικές διεργασίες του μεταβολισμού. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν και οι αναστολείς ενζύμων, όπως αυτοί του ενζύμου λιποξυγενάσης, το οποίο διαθέτει σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση και η αναστολή του οδηγεί είτε σε καταστολή, είτε σε θανάτωση του καρκίνου (αναλυτικότερα θα εξηγηθεί στην Ενότητα 1.2.) [1].



Εικόνα 2: 5-φθοροουρακίλη (αριστερά), μερκαπτοπουρίνη (κέντρο), μεθοτρεξάτη (δεξιά) [20]

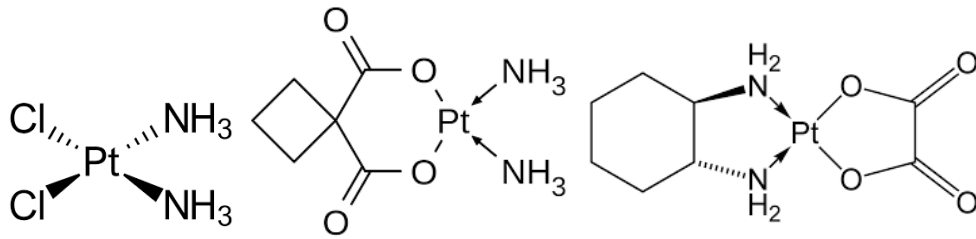
Οι ουσίες που αλληλεπιδρούν με το DNA ανήκουν σε μια από τις μεγαλύτερες και πιο σημαντικές οικογένειες αντικαρκινικών φαρμάκων δρώντας μέσω ποικίλων μηχανισμών:

- Οι αλκυλιωτικοί παράγοντες (δακαρβαζίνη, προκαρβαζίνη και τεμοζολομίδη) οδηγούν στην αλκυλίωση των βάσεων του DNA είτε στην μικρή είτε στην μεγάλη αύλακα.

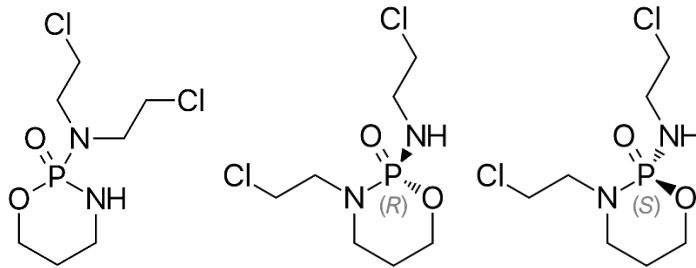


Εικόνα 3: δακαρβαζίνη (αριστερά), προκαρβαζίνη (κέντρο) και τεμοζολομίδη (δεξιά) [20]

- Οι ενώσεις συναρμογής, οι οποίες δεσμεύονται στο DNA διακλωνικά ή ενδοκλωνικά. Τα σύμπλοκα λευκοχρύσου όπως είναι τα cisplatin, carboplatin και oxaliplatin και οι αζωτούχοι υπερίτες (κυκλοφωσφαμίδη, ιφωσφαμίδη) είναι οι δύο κύριες ομάδες αυτής της υπο-οικογένειας αντικαρκινικών φαρμάκων.

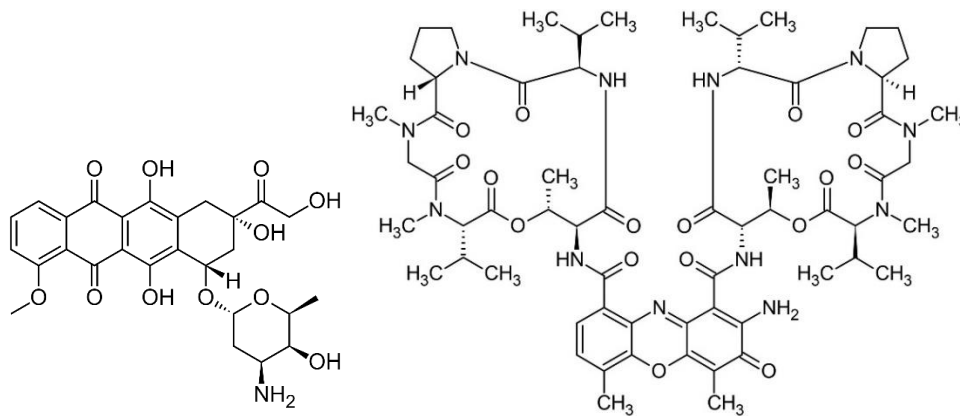


Εικόνα 4: cisplatin(αριστερά), carboplatin (κέντρο) και oxaliplatin (δεξιά) [20]



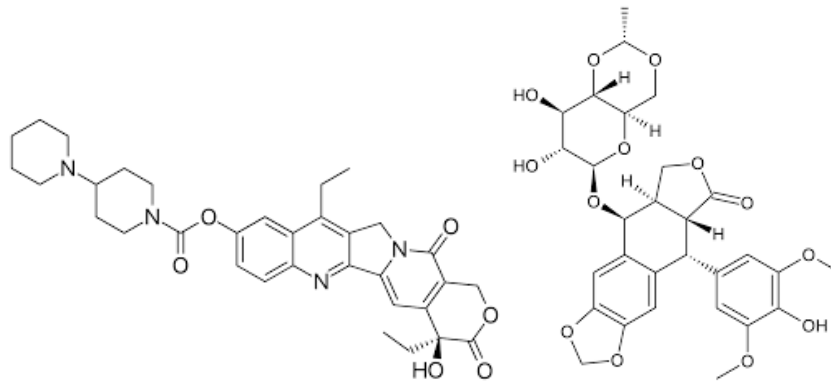
Εικόνα 5: κυκλοφωσφαμίδη (αριστερά), ιφωσφαμίδη(δεξιά, δυο εναντιωμερή, R,S) [20]

- Οι ενώσεις παρεμβολής δεσμεύονται στο DNA καθώς παρεμβάλλονται μεταξύ των ζευγών βάσεων. Στην οικογένεια αυτή των φαρμάκων ανήκουν οι ανθρακυκλίνες όπως η δοξορουβικίνη και ακτινομυκίνη-D.



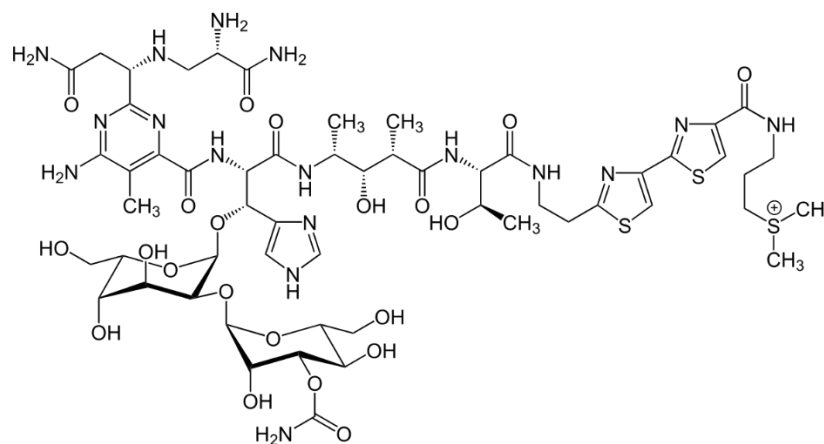
Εικόνα 6: δοξορουβικίνη (αριστερά) και ακτινομυκίνη-D (δεξιά) [20]

- Οι αναστολείς τοποϊσομεράσης περιλαμβάνουν ενώσεις όπως η ιρινοτεκάνη και η ετοποσίδη. Αυτά τα φάρμακα αναστέλλουν τα υπεύθυνα ένζυμα για τη διάσπαση, την επανασυσπείρωση και την τοπολογική κατάσταση του DNA.



Εικόνα 7: ιρινοτεκάνη και η ετοποσίδη [20]

- Οι ενώσεις διάσπασης του DNA, όπως η βλεομυκίνη, αλληλεπιδρούν με το DNA και προκαλούν σχάση του κλώνου στη θέση πρόσδεσης.



Εικόνα 8: βλεομυκίνη [20]

- Οι ουσίες που παρεμβαίνουν στην δυναμική των μικροσωληνίσκων (ουσίες κατά της πρωτεΐνης τουμπουλίνη (Antitubulin agents)) εμποδίζουν έτσι την διαίρεση του πυρήνα και οδηγώντας σε κυτταρικό θάνατο [1].

Αναλυτικότερα θα αναπτυχθούν και κάποιες από τις παραπάνω οικογένειες φαρμάκων και σε επόμενη ενότητα, η οποία αναφέρεται συγκεκριμένα σε φάρμακα που αλληλοεπιδρούν με το DNA και έχουν αντικαρκινική δράση(Ενότητα 1.3.2.).

1.1.2. Αιτίες Ανάπτυξης Καρκίνου

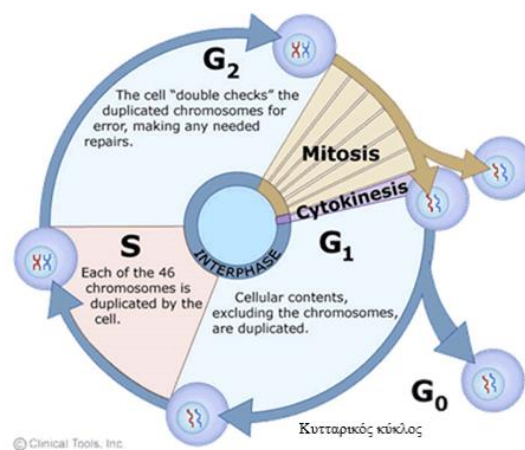
Τα φυσιολογικά κύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν από τα καρκινικά κύτταρα, καθώς τα καρκινικά διαιρούνται ανεξέλεγκτα κυρίως λόγω κάποιων μεταλλάξεων ή αλλαγών στον κυτταρικό κύκλο. Στα κύτταρα, ο κυτταρικός κύκλος χωρίζεται στις ακόλουθες φάσεις και ελέγχεται στενά από πολλούς παράγοντες [13]:

- G0— Γνωστή ως η φάση ηρεμίας όπου τα κύτταρα προετοιμάζονται πριν από τη διαίρεση.
- G1— Επίσης γνωστή ως η φάση ανάπτυξης όπου το κύτταρο αυξάνεται σε μέγεθος και προετοιμάζεται για την αντιγραφή του DNA.
- Φάση S— Φάση σύνθεσης όπου το υλικό κυτταρικής χρωματίνης διπλασιάζεται ακολουθούμενο από τη φάση G2.
- Φάση G2— Η φάση, όπου εμφανίζεται περαιτέρω ανάπτυξη ακολουθούμενη από μίτωση.
- Κυτταροκίνηση: είναι η τελευταία φάση του κυτταρικού κύκλου. Πραγματοποιείται μετά την πυρηνική διαίρεση η οποία καταλήγει στον διαχωρισμό του κυττάρου σε δύο θυγατρικά.

Εκτός από την κυτταρική ανάπτυξη, μια άλλη αυστηρά ρυθμιζόμενη διαδικασία στο κύτταρο, είναι ο κυτταρικός θάνατος που συμβαίνει μέσω απόπτωσης ή νέκρωσης με τη μεσολάβηση ενός μηχανισμού ενζύμων και πρωτεϊνών. Τα καρκινικά κύτταρα παρεμβαίνουν σε αυτές τις διαδικασίες και αλλάζουν τη φυσιολογική λειτουργία τους. Κάποια από τα χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων, λοιπόν είναι [13]:

- Η ανεξέλεγκτη κυτταρική ανάπτυξη από τα κύτταρα του όγκου είναι δυνατή λόγω του ελέγχου στις κυτταρικές διεργασίες ανάπτυξης και θανάτου.

- Η κινητική της ανάπτυξης του όγκου ρυθμίζεται από τον χρόνο του κυτταρικού κύκλου ο οποίος ποικίλλει σε διαφορετικούς ιστούς.
- Τα καρκινικά κύτταρα είναι γνωστό ότι ακολουθούν μια σιγμοειδή καμπύλη ανάπτυξης ανάλογα με το μέγεθος του όγκο.
- Η μετάσταση ενός όγκου είναι δυνατή όταν εξαπλώνεται πέρα από την αρχική του θέση και εισβάλλει στους γύρω ιστούς. Μερικοί παράγοντες που συμβάλλουν σε αυτό είναι ανωμαλίες στη διατήρηση της ακεραιότητας των ιστών και η καταστολή του ογκοκατασταλτικού γονιδίου.



Εικόνα 9: Ο κυτταρικός κύκλος και οι φάσεις από τις οποίες αποτελείται [27]

Ο στόχος των κυτταροτοξικών χημειοθεραπευτικών είναι η διαδοχική μείωση του χάσματος μεταξύ της ανάπτυξης και του θανάτου των καρκινικών κυττάρων σε κάθε κύκλο θεραπείας [13].

1.1.3. Καρκίνος του μαστού

Ο καρκίνος του μαστού είναι από τα πιο συνηθισμένα είδη καρκίνων στον κόσμο. Εκτιμάται ότι εκατομμύρια γυναίκες έχουν διαγνωστεί με καρκίνο του μαστού τα τελευταία χρόνια με τα ποσοστά εμφάνισής αυτού του τύπου να αυξάνονται συνεχώς [2]. Υπάρχουν διάφορα είδη καρκίνου του μαστού. Συγκεκριμένα ο καρκίνος του μαστού χωρίζεται στις ακόλουθες κατηγορίες:

- α. Μπορεί να εξαρτάται από κάποιες ορμόνες, δηλαδή να είναι θετικός σε ορμονικούς υποδοχείς. Ειδικότερα, τα θετικά σε ορμονικούς υποδοχείς καρκινικά κύτταρα του μαστού (ορμονοθετικά) έχουν είτε υποδοχείς οιστρογόνου (ER+), είτε υποδοχείς προγεστερόνης (PR+). Αυτό το είδος καρκίνου μπορεί να θεραπευτεί με φάρμακα ορμονικής θεραπείας, τα οποία μειώνουν τα επίπεδα αυτών των ορμονών ή εμποδίζουν τους υποδοχείς. Επίσης αυτό το είδος αναπτύσσεται πιο αργά από τον καρκίνο που είναι αρνητικός στους ορμονικούς υποδοχείς.
- β. Τα αρνητικά σε ορμονικούς υποδοχείς καρκινικά κύτταρα του μαστού (HR-) (ορμονοαρνητικά), λοιπόν, δεν διαθέτουν υποδοχείς οιστρογόνων ή προγεστερόνης και επομένως η ορμονοθεραπεία δεν έχει αποτελέσματα.
- γ. Τα τριπλά αρνητικά κύτταρα του μαστού, τα οποία δεν διαθέτουν υποδοχείς ορμονών και επίσης παράγουν ελάχιστα ή και καθόλου μια πρωτεΐνη που ονομάζεται HER2 (human epidermal growth factor receptor 2). Η HER2 είναι μια πρωτεΐνη, η οποία βοηθά τα καρκινικά κύτταρα του μαστού να αναπτύσσονται γρήγορα. Το είδος αυτό του καρκίνου εξαπλώνεται πιο γρήγορα από τους περισσότερους τύπους καρκίνου του μαστού και ούτε η ορμονοθεραπεία, ούτε

φάρμακα που στοχεύουν στην HER2 εμφανίζουν αντικαρκινική δράση. Παρόλα αυτά η χημειοθεραπεία μπορεί να έχει αποτελέσματα και σε αυτό το είδος.

- δ. Τέλος υπάρχουν και οι τριπλά θετικοί καρκίνοι του μαστού , οι οποίοι είναι θετικοί στα οιστρογόνα στην προγεστερόνη και στην HER2. Αυτοί οι καρκίνοι μπορούν να αντιμετωπιστούν με ορμονικά φάρμακα καθώς και φάρμακα που στοχεύουν στην HER2 [19].

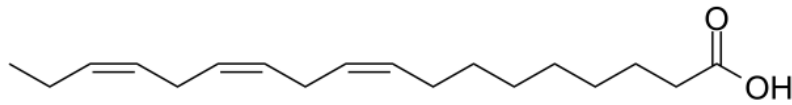
Κάποιες από τις νέες στρατηγικές στην θεραπεία του καρκίνου του μαστού περιλαμβάνουν μεταλλοθεραπευτικά, τα οποία αλληλεπιδρούν με τους ορμονικούς υποδοχείς. Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιούνται ως μοντέλα για τον καρκίνο του μαστού είναι τα κύτταρα ανθρώπινου αδενοκαρκινώματος μαστού θετικά σε ορμονικούς υποδοχείς (MCF-7) και αρνητικά σε ορμονικούς υποδοχείς (MDA-MB-231) [2].

Άλλα θεραπευτικά φάρμακα είναι αυτά που στοχεύουν στο μιτοχόνδριο και για τα οποία χρησιμοποιείται ο όρος μιτοχονδριοτροπικά. Πραγματοποιούνται συνεχείς προσπάθειες για τον σχεδιασμό και σύνθεση μορίων χαμηλού μοριακού βάρους τα οποία να στοχεύουν το μιτοχόνδριο[3]. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα μιτοχόνδρια είναι τα εργοστάσια παραγωγής ενέργειας των καρκινικών κυττάρων και συνεπώς χρησιμοποιούνται ως στόχοι για την ανάπτυξη νέων ουσιών που οδηγούν σε κυτταρικό θάνατο. Επίσης χάρη στη διαπερατότητα της μεμβράνης του μιτοχονδρίου μπορούν να απελευθερωθούν ενεργοποιητές απόπτωσης από το μιτοχόνδριο. Κατά συνέπεια η σύζευξη μιτοχονδριοτροπικών ligands με ειδικά μεταλλοθεραπευτικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να μεταφέρουν το φάρμακο στο μιτοχόνδριο [2].

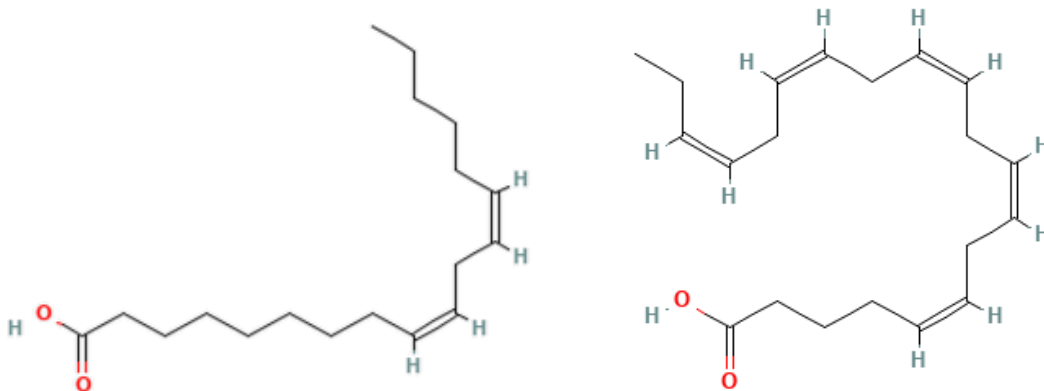
1.2. Αντικαρκινική δράση και Λιποξυγενάση

1.2.1. Λιποξυγενάση και ο μεταβολισμός του αραχιδονικού οξέος

Τα ωμέγα-3 και ωμέγα-6 λιπαρά οξέα είναι μια οικογένεια πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs :polyunsaturated fatty acids) που διαθέτουν ζωτικό ρόλο στις φυσιολογικές δραστηριότητες του οργανισμού εξαιτίας της παρουσίας τους στις κυτταρικές μεμβράνες. Στα PUFAs που προσλαμβάνονται από την διατροφή ανήκουν το αλφαλινολενικό οξύ (ALA: alpha-linolenic acid) και το λινολεϊκό οξύ (LA: linoleic acid) ως ωμέγα-3 λιπαρά οξέα μικρής αλυσίδας, το εικοσαπεντανοϊκό οξύ (EPA: eicosapentaenoic acid), το εικοσιδυαεξανοϊκό οξύ (DHA: docosahexaenoic acid). και το αραχιδονικό οξύ (AA: arachidonic acid) ως ωμέγα-3 PUFAs μεγαλύτερης αλυσίδας.[4]

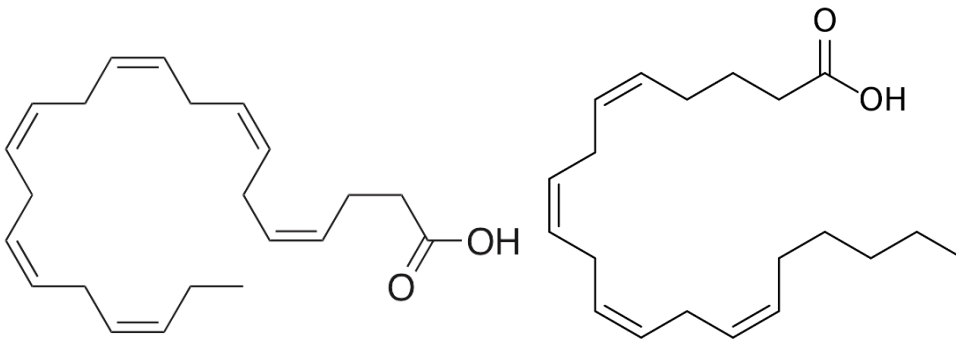


Εικόνα 10: αλφαλινολενικό οξύ [21]



Εικόνα 11: λινολεϊκό οξύ (αριστερά) και εικοσαπεντανοϊκό οξύ (δεξιά) [22]

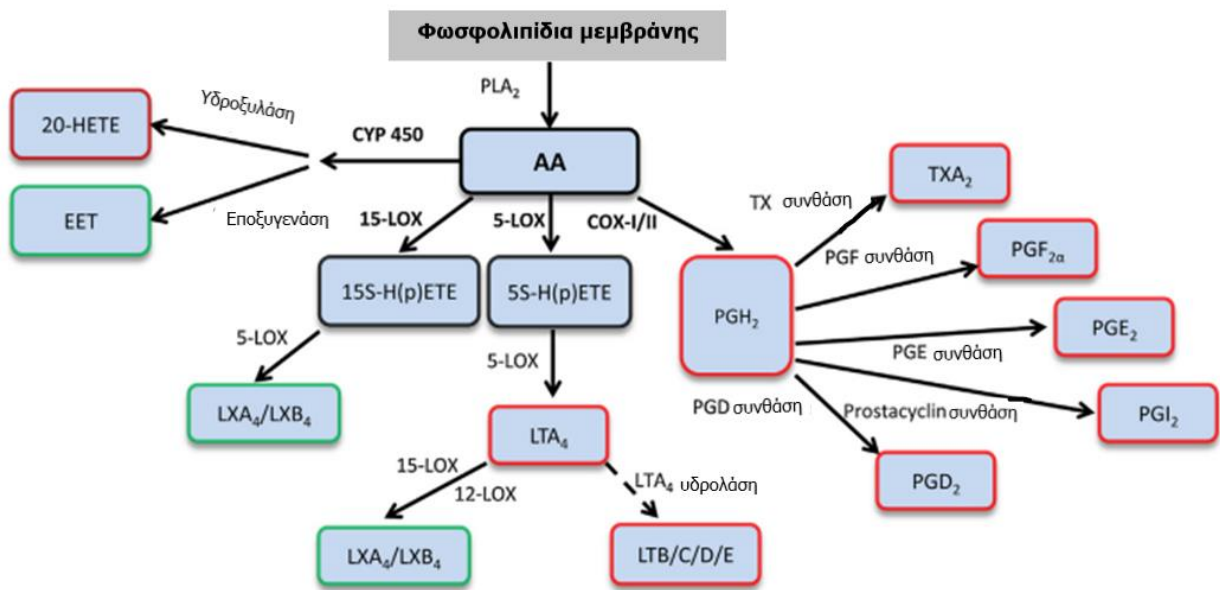
Το αραχιδονικό οξύ (AA) μπορεί να παραχθεί είτε από τα LA και ALA λιπαρά οξέα που προσλαμβάνονται απευθείας από την διατροφή είτε μέσω της απελευθέρωσής του από την δεξαμενή φωσφολιπιδίων μέσω της δράσης του ενζύμου φωσφολιπιδάση A₂. Το αραχιδονικό οξύ είναι ένα λιπαρό οξύ με 20 άτομα ανθρακα και 4 διπλούς δεσμούς. Από το AA μπορούν να παραχθούν και άλλα εικοσανοειδή οξέα μέσω τριών ενζυματικών μονοπατιών.



Εικόνα 12: εικοσιδυαεξανοϊκό οξύ(αριστερά) και αραχιδονικό οξύ (δεξιά) [23, 24]

- Ένας τρόπος μεταβολισμού είναι μέσω της οδού της κυκλοξυγενάσης (COX: cyclooxygenase). Με το ένζυμο αυτό παράγονται διάφορες προσταγλανδίνες (PG: prostaglandin) και θρομβοξάνες (TX: thromboxane) και προστακυκλίνες (prostacyclins), όπως είναι η προσταγλανδίνη E (PGE) και D (PGD), οι θρομβοξάνη A₂ (TXA₂) και A₃ (TXA₃) και οι προστακυκλίνη I₂ και I₃, αντίστοιχα. Υπάρχουν δύο διακριτές ισόμορφες πρωτεΐνες κυκλοξυγενάσης η COX-1 και η COX-2. Η έκφραση της COX-2 προκαλείται σε φλεγμονές και σε ασθένειες που σχετίζονται με τον αλόγιστο πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Επομένως οι αναστολείς της COX φαίνεται να είναι αποτελεσματικοί στη θεραπεία του πόνου, της φλεγμονής, του εγκεφαλικού και του καρκίνου.

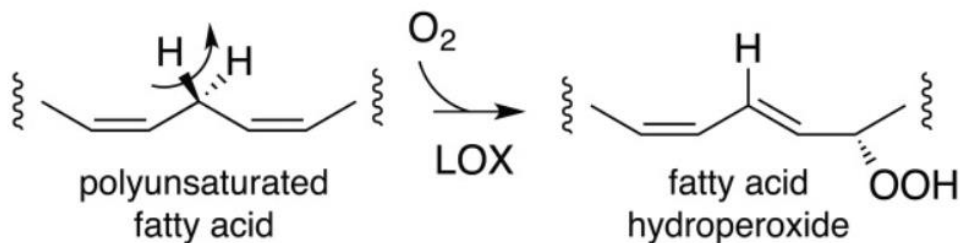
- Η δεύτερη οδός μεταβολισμού του AA είναι το κυτόχρωμα P450 (CYP) όπου παράγονται κυρίως υδροξυεικοσατετραενοϊκά οξέα (HETEs) λόγω της δραστηριότητας του ενζύμου ω-υδροξυλάση. Έπειτα με την δράση της εποξυγενάσης στο κυτόχρωμα παράγονται εποξυεικοσατριενοϊκά οξέα (EETs). Τα EETs έχει αποδειχτεί ότι έχουν αγγειοδιασταλτική επίδραση και διαθέτουν ρυθμιστικό ρόλο στην διαδικασία ογκογένεσης.
- Ο τρίτος τρόπος μεταβολισμού είναι μέσω της ενζυμικής οδού της λιποξυγενάσης (LOX), μέσω της οποίας παράγονται κυρίως λευκοτριένια (LT) και λιποξίνες, όπως είναι τα LTA4, LTB4, LTC4, LTD4 και LTE4 και λιποξίνες A4, B4, C4, D4 και E4, αντίστοιχα. Το μεταβολικό αυτό μονοπάτι της LOX αποτελεί κυρίαρχο θεραπευτικό στόχο σε πολλές ασθένειες λόγω του καθοριστικού του ρόλου στην κυτταρική σηματοδότηση και των νέων μεσολαβητών που σχετίζονται με αυτό το μονοπάτι. Επομένως, η οδός αυτή θα εξεταστεί εκτενέστερα [4].



Εικόνα 13: Μεταβολισμός αραχιδονικού οξέος. Το αραχιδονικό οξύ (AA) οξειδώνεται από τις λιποξυγενάσες (LOX), τις κυκλοοξυγενάσες (COX) και το κυτόχρωμα P450 (CYP 450) για να παράξει είτε προφλεγμονώδεις (κόκκινο περίγραμμα) είτε αντιφλεγμονώδεις και προδιαλυτικούς μεταβολίτες (πράσινο περίγραμμα). Το διακεκομμένο βέλος αντιπροσωπεύει ημιτελή περιγραφή της αλληλουχίας αντίδρασης. 20-HETE: 20-υδροξυεικοσατετραενοϊκό οξύ, EET: εποξυεικοσατετραενοϊκό οξύ, H(p)ETE: υδροϋπεροξυεικοσατετραενοϊκό οξύ, LX: λιποξίνη, LT: λευκοτριένιο, PG: προσταγλανδίνη, PLA: φωσφολιπάση A, TX: θρομβοξάνη [5]

1.2.2. Η λιποξυγενάση και η σχέση της με τον καρκίνο

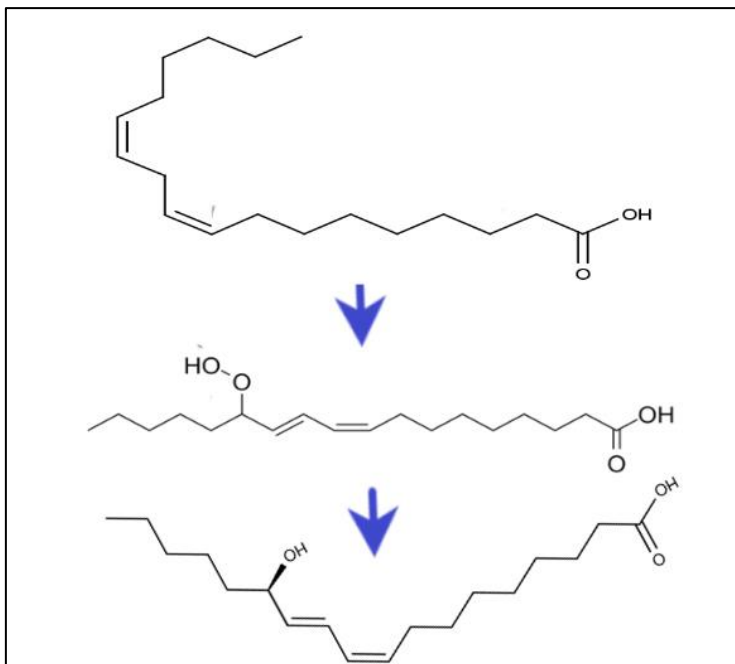
Οι λιποξυγενάσες (LOX) είναι μια οικογένεια ενζύμων διοξυγενασών σιδήρου (μη αιμικού) και μπορούν και μεταφέρουν μόρια οξυγόνου στα ελεύθερα ή εστεροποιημένα ακόρεστα λιπαρά οξέα [4].



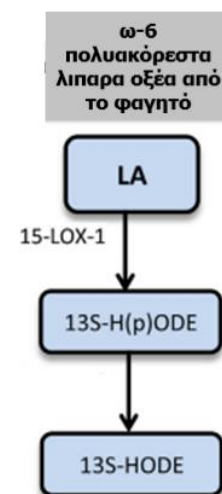
Εικόνα 14: Αντίδραση υπεροξειδωσης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων με τη δράση του ενζύμου λιποξυγενάσης [6].

Τα ένζυμα αυτά χωρίζονται σε τέσσερις κατηγορίες με βάση τη θέση στην οποία εισέρχεται η ομάδα οξυγόνου: λιποξυγενάση 5 (LOX-5), 8 (LOX-8), 12 (LOX-12) και 15 (LOX-15).

Η LOX χρησιμοποιεί δύο κύρια υποστρώματα στα κύτταρα, το αραχιδονικό (AA) πολυακόρεστο ωμέγα-6 λιπαρό οξύ (20:4(5,8,11,14)) και το λινολεϊκό (LA) πολυακόρεστο ωμέγα-6 λιπαρό οξύ (18:2 cis-9, 12). Προηγουμένως αναφέραμε τον τρόπο με τον οποίο μεταβολίζεται το AA σε Υδροξυεικοσατετραενοϊκά οξέα (HETEs) και στη συνέχεια σε λευκοτριένια (LT) και λυποξίνες (LX). Το λινολεϊκό οξύ από την άλλη μετατρέπεται σε 13-υδροξυοκταδεκαδιενοϊκό οξύ (13-HODE) [4].



Εικόνα 15: Μεταβολισμός του λινολεϊκού οξέος σε 13-HpODE και στη συνέχεια σε 13-HODE (με την ροή των βελών) [25, 26]



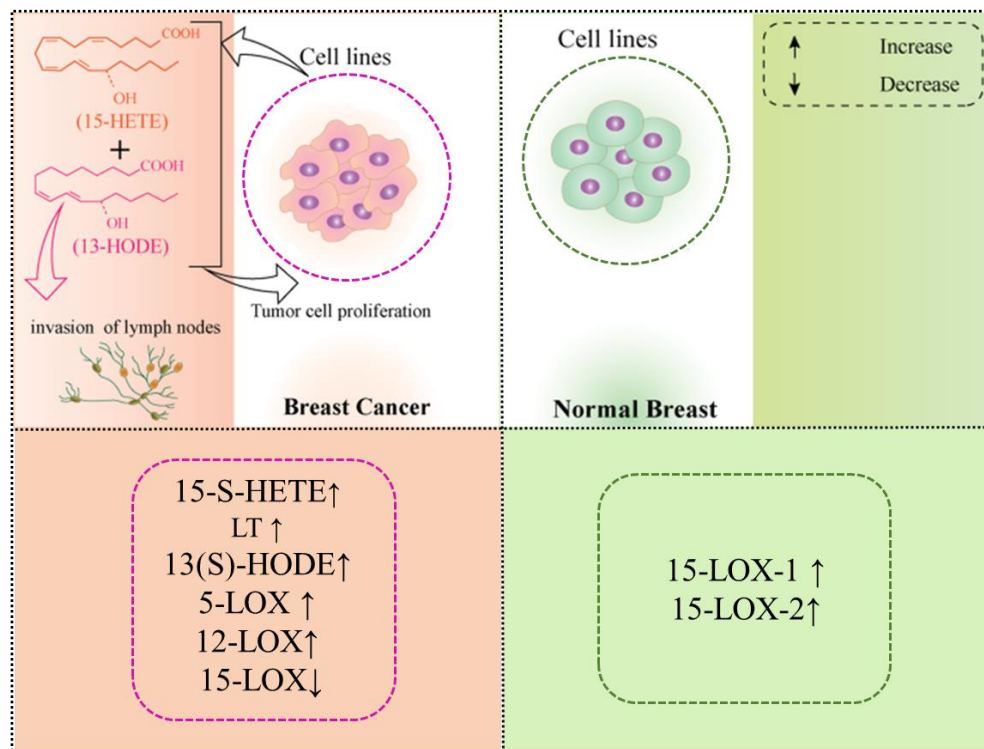
Η LOX εμπλέκεται σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής διαφοροποίησης, της ανάπτυξης και της αποικοδόμησης των μιτοχονδρίων. Επομένως, οι λιποξυγενάσες και οι μεταβολίτες τους μπορούν να αποτελέσουν ένδειξη

καρκινογένεσης ή φλεγμονής ανάλογα με τα ποσοστά δράσης και παραγωγής τους, αντίστοιχα. Κάποιες από αυτές τις ενδείξεις είναι οι ακόλουθες (Εικόνα16):

- Τα επίπεδα των προϊόντων της 15-LOX, δηλαδή τα (15(S)-υδροϋπεροξυ εικοσατετραενοϊκό οξύ (**15-S-HETE**) και 13(S)-υδροξυ 9Z,11E-οκταδεκαδιενοϊκό οξύ (**13(S)-HODE**) τα οποία προκύπτουν από τον μεταβολισμό των AA και LA, αντίστοιχα, συνήθως αυξάνονται κατά τη διάρκεια της φλεγμονής στους ιστούς.
- Έχει παρατηρηθεί ότι στο δείγμα και στον ιστό του καρκίνου του μαστού εκφράζεται ένα υψηλό επίπεδο των ενζύμων 12 και 5-LOX
- Τα αποτελέσματα άλλων μελετών έδειξαν ότι η αύξηση του επιπέδου έκφρασης της 12-LOX και η μείωση του επιπέδου της 15-LOX σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού παίζει προγνωστικό ρόλο.
- Οι 15-LOX-τύπου 1 και 2 εκφράζονται κατά προτίμηση περισσότερο σε φυσιολογικούς/καλοήθεις ιστούς από τους καρκινικούς ιστούς της ουροδόχου κύστης, του μαστού, του πνεύμονα και του προστάτη.
- Η ενεργοποίηση της 15-LOX μέσω εξωγενούς χορήγησης των 15-HETE και 13-HODE οδηγεί σε πολλαπλασιασμό και εισβολή των καρκινικών κυττάρων του μαστού.
- Έχει βρεθεί ότι το επίπεδο του προϊόντος της 15-LOX-2 (15-S-HETE) είναι αυξημένο στα υγιή κύτταρα σε σχέση με τα αντίστοιχα κύτταρα όγκου του μαστού, όπου μειώθηκε [4].
- Αυξημένη σηματοδότηση λευκοτριενίων έχει παρατηρηθεί σε διάφορες μορφές καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του παγκρέατος, του παχέος εντέρου, του στομάχου, του προστάτη, των ωοθηκών και των πνευμόνων. Αυτοί οι προφλεγμονώδεις μεσολαβητές μπορούν να ρυθμίσουν την έναρξη, την εξέλιξη και

τη μετάσταση των όγκων μέσω της ρύθμισης του πολλαπλασιασμού, της απόπτωσης, της μετανάστευσης και της εισβολής των καρκινικών κυττάρων [7].

Ωστόσο, ο ρόλος των ενζύμων λιποξυγενάσης στην ανάπτυξη και εξάπλωση του καρκίνου είναι πολύ περίπλοκος και αμφιλεγόμενος και απαιτείται περαιτέρω έρευνα.



Εικόνα 16: Η έκφραση των διαφόρων τύπων λιποξυγενάσης και οι μεταβολίτες τους σε κυτταρικές σειρές καρκίνων του μαστού. Το επίπεδο έκφρασης των ενζύμων LOX και των κύριων μεταβολιτών τους διαφέρει σε ασθενείς με καρκίνο και σε υγιή άτομα. Με πράσινο αντιστοιχούν οι συνθήκες που επικρατούν στα υγιή κύτταρα και με ροζ στα καρκινικά κύτταρα.

Συμπερασματικά, η λιποξυγενάση (LOX) είναι ένα ένζυμο που βρίσκεται κυρίως στο μιτοχόνδριο και ανάλογα με τον τύπο της λιποξυγενάσης καταλύει την οξείδωση του αραχιδονικού οξέος σε λευκοτριένια, προσταγλανδίνες και λιποξίνες ή του λινολεϊκού οξέος σε 13-υδροξυοκταδεκαδιενοϊκό οξύ. Αναστέλλοντας, λοιπόν, την δράση της λιποξυγενάσης προκύπτει μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και κατά συνέπεια απόπτωση, καθώς εμφανίζεται μειωμένη ικανότητα οξείδωσης των λιπαρών οξέων. Συγκεκριμένα,

το λινολεϊκό οξύ είναι ένα από τα κύρια συστατικά της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, το οποίο οξειδώνεται ενζυματικά κατά την απελευθέρωση από την μεμβράνη. Επομένως, η μελέτη της αναστολής της LOX σχετίζεται με τη μιτοχονδριακή βλάβη στα καρκινικά κύτταρα. Για αυτόν τον λόγο αναζητούνται νέοι αναστολείς του ενζύμου αυτού, ώστε είτε να υπολειπεται το ένζυμο και να οδηγούμαστε σε κυτταρικό θάνατο, είτε να μειώνονται οι μεταβολίτες του όπου όπως προαναφέρθηκε προάγουν την καρκινογένεση [2].

1.2.3. Τα ένζυμα και οι αναστολείς τους

Τα ένζυμα ουσιαστικά είναι πρωτεΐνες, οι οποίες καταλύουν διάφορες χημικές αντιδράσεις. Με τον όρο κατάλυση εννοούμε ότι τα ένζυμα επιταχύνουν τις αντιδράσεις ρίχνοντας την ενέργεια ενεργοποίησης. Τα ένζυμα έχουν πολύ συγκεκριμένη δομή ώστε να δέχονται ειδικά υποστρώματα. Διαθέτουν, δηλαδή μια ειδική θέση που ονομάζεται ενεργό κέντρο, στο οποίο δεσμεύεται το υπόστρωμα και ξεκινάει η κατάλυση. Η ταχύτητα τέτοιων ενζυμικών αντιδράσεων εξαρτάται από τη θερμοκρασία, το pH, τη συγκέντρωση του υποστρώματος και του ενζύμου. Επίσης, η δράση των ενζύμων μπορεί να απενεργοποιηθεί, να μειωθεί ή να ενισχυθεί με την παρουσία κάποιων ενώσεων, οι οποίες δρουν είτε ως αναστολείς ή ως ενεργοποιητές, αντίστοιχα. Όσον αφορά τους αναστολείς είναι ουσίες που μειώνουν ή σταματούν την δράση των ενζύμων και μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως φάρμακα. Όταν ένα ένζυμο υπερεκφράζεται σε μια παθολογική κατάσταση, έχει ως αποτέλεσμα να παράγονται σε υπερβολικό βαθμό τα προϊόντα της αντίδρασης που καταλύει, συνεπάγοντας δημιουργία διαφόρων προβλημάτων στην φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού. Οι αναστολείς, λοιπόν, όπως προαναφέρθηκε δρουν ως φάρμακα, καθώς αναστέλλοντας το ένζυμο δεν

επιτρέπουν το υπόστρωμα να μετατραπεί στα αντίστοιχα προϊόντα και έτσι ελέγχεται ο μεταβολισμός του [3].

Η αναστολή των ενζύμων μπορεί να χωρισθεί σε δύο κύριες κατηγορίες: α) στην αντιστρεπτή αναστολή και β) στην μη αντιστρεπτή αναστολή. Συγκριμένα:

1) Αντιστρεπτή αναστολή (reversible)

Η αντιστρεπτή αναστολή είναι ένα είδος ενζυμικής αναστολής κατά την οποία οι αναστολείς του ενζύμου συνδέονται με το ένζυμο μέσω μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ ενζύμου- αναστολέα είναι κυρίως δεσμοί υδρογόνου, ιονικοί δεσμοί και υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις. Επίσης οι αντιστρεπτοί αναστολείς δεν πραγματοποιούν χημικές αντιδράσεις μεταξύ των αμινοξέων του ενεργού κέντρου του ενζύμου[34]. Οι περισσότεροι αναστολείς που δρουν ως φάρμακα ανήκουν σε αυτήν την κατηγορία[3]. Οι αντιστρεπτοί αναστολείς από την άλλη ταξινομούνται και αυτοί σε τέσσερις κατηγορίες:

a) Ανταγωνιστικοί (competitive)

Ο ανταγωνιστικός αναστολέας συνδέεται στον ενεργό κέντρο του ενζύμου και καταλαμβάνει την θέση του υποστρώματος με αποτέλεσμα να εμποδίζει τον μεταβολισμό του. Εφόσον αναστολέας και υπόστρωμα προσδένονται στο ίδιο σημείο και ανταγωνίζονται για την ίδια θέση, αυτό προϋποθέτει ότι οι δύο αυτές ενώσεις πιθανώς έχουν παρόμοια δομή [3].

b) Μη ανταγωνιστικοί (non-competitive)

Οι μη ανταγωνιστικοί αναστολείς δεν προσδένονται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου αλλά σε μια άλλη θέση του, η οποία είναι κατάλληλα διαμορφωμένη για

τον αναστολέα και ονομάζεται αλλοστερική θέση. Η δέσμευση αυτή του αναστολέα στο ένζυμο αλλάζει την συνολική δομή του ενζύμου με αποτέλεσμα το ενεργό κέντρο να μην είναι πλέον συμβατό με το υπόστρωμα και έτσι να εμποδίζεται η σύνδεσή του και κατά συνέπεια ο μεταβολισμός του. Σε αυτή την κατηγορία η δομή του αναστολέα δεν αναμένεται να είναι παρόμοια με τη δομή του υποστρώματος [3].

c) Μεικτού τύπου (mixed type :competitive/uncompetitive) αναστολείς.

Οι μεικτού τύπου αναστολείς μπορούν να συνδεθούν τόσο στο ένζυμο όσο και στο σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος με αποτέλεσμα να σχηματίζεται ένα σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος-αναστολέα , μπλοκάροντας με αυτόν τον τρόπο την δημιουργία προϊόντων από το υπόστρωμα. Πολλοί αναστολείς μεικτού τύπου έχουν διαφορετική σταθερά σύνδεσης για το ελεύθερο ένζυμο και το σύμπλοκο ενζύμου υποστρώματος. Ωστόσο, υπάρχει μια ειδική περίπτωση μικτών αναστολέων, η οποία είναι οι συναγωνιστικοί ή μη ανταγωνιστικοί (uncompetitive) αναστολείς. Αυτοί οι αναστολείς συνδέονται με ένα ελεύθερο ένζυμο και ένα σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος με την ίδια σταθερά ισορροπίας [2].

2) Μη αντιστρεπτή αναστολή (irreversible)

Η μη αντιστρεπτή αναστολή είναι ένα είδος αναστολής που εμφανίζει μόνιμα ανασταλτικά αποτελέσματα. Το κύριο χαρακτηριστικό είναι ότι οι αντιστρεπτοί αναστολείς συνδέονται ομοιοπολικά με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου του ενζύμου. Βέβαια υπάρχει και η περίπτωση να συνδέονται με το ένζυμο με ισχυρές μη δεσμικές αλληλεπιδράσεις. Με την δέσμευση του αντιστρεπτού αναστολέα στο

ένζυμο το σύμπλοκο που δημιουργείται δεν διασπάται καθώς οι αλληλεπιδράσεις που τα συνδέουν είναι ισχυρές, με αποτέλεσμα αυτό να απενεργοποιείται κατευθείαν, να παραμένει ανενεργό και να μην παράγοντα τα προϊόντα. Έχει βρεθεί ότι σε μερικές περιπτώσεις είναι καλύτερο να σχεδιάζονται αντιστρεπτοί αναστολείς, καθώς η δράση τους μπορεί να ρυθμισθεί ευκολότερα διακόπτοντας τη χορήγησή τους [3].

Οι μη αντιστρεπτοί αναστολείς μπορεί να χωρισθούν σε δύο κατηγορίες:

a) Αναστολείς κατευθυνόμενοι στο ενεργό κέντρο (active site directed inhibitors)

Οι αναστολείς που κατευθύνονται στο ενεργό κέντρο είναι ενώσεις οι οποίες συνδέονται με αμινοξέα του ενεργού κέντρου ή με αμινοξέα κοντά στο ενεργό κέντρο. Οι αναστολείς αυτοί διαθέτουν ηλεκτρονιόφιλες ομάδες με αποτέλεσμα να κάνουν δεσμούς με τις πυρηνόφιλες ομάδες των αμινοξέων κυρίως μέσω μηχανισμών ακυλίωσης ή αλκυλίωσης και έτσι να επιτυγχάνουν ισχυρή δέσμευση. Λόγω όμως αυτής τους της ηλεκτροφιλίας τους μπορούν να δράσουν και με άλλες πυρηνόφιλες ομάδες που ανήκουν σε άλλα ένζυμα ή βιομόρια προκαλώντας έτσι μεγάλη τοξικότητα. Συνεπώς σε αυτούς τους αναστολείς είναι πολύ σημαντικό να βρεθούν μόρια τα οποία να παρουσιάζουν εκλεκτικότητα ως προς ένα συγκεκριμένο ένζυμο. Έχουν βρεθεί αρκετά φάρμακα που ανήκουν σε αυτήν την κατηγορία των αναστολέων και έχουν εκλεκτική δράση με ένα από αυτά να είναι η ασπιρίνη.

b) Αναστολείς βασισμένοι στο μηχανισμό (mechanism-based inhibitors or suicide inhibitors).

Οι αναστολείς αυτοί που βασίζονται στον μηχανισμό είναι ενώσεις παρόμοιες με το υπόστρωμα που συνδέονται στο ένζυμο και μέσω αυτού προκύπτει ένα προϊόν του αναστολέα το οποίο όμως διαθέτει κάποια πολύ δραστική ηλεκτρονιόφιλη ομάδα. Το προϊόν αυτό με την σειρά του αντιδρά μη αντιστρεπτά με το σύμπλοκο ενζύμου-αναστολής με ισχυρές αλληλεπιδράσεις με αποτέλεσμα να απενεργοποιείται και να μην μεταβολίζει το φυσικό του υπόστρωμα.

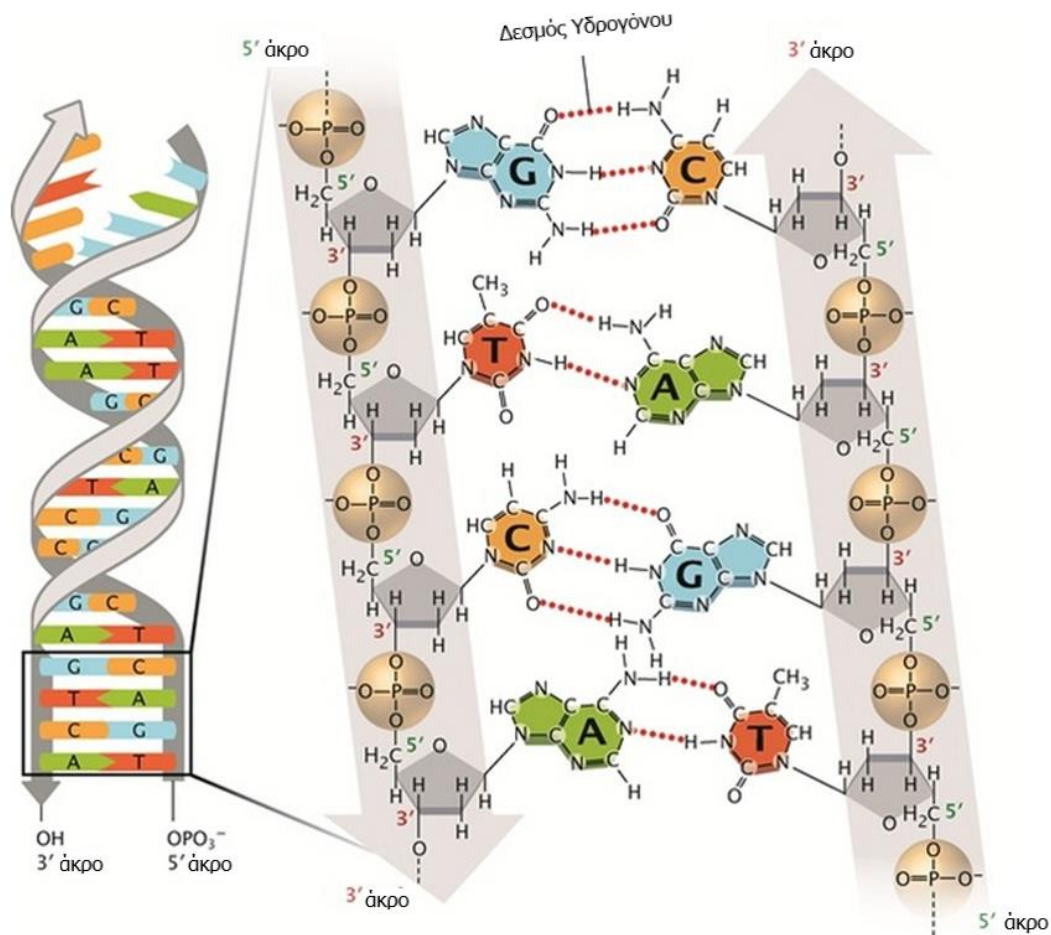
1.3. DNA και χημειοθεραπευτικά

1.3.1. Η δομή του DNA

Η ανακάλυψη του DNA και ο ρόλος του ως βιολογικός φορέας γενετικής πληροφορίας έχει φέρει επανάσταση σε αρκετούς κλάδους και προσέλκυσε το ενδιαφέρον για το σχεδιασμό συγκεκριμένων ενώσεων που στοχεύουν τη δομή του και αλλάζουν τη λειτουργία του.

Το DNA βρίσκεται στο σώμα με τη μορφή διπλής έλικας, όπου κάθε κλώνος αποτελείται από έναν συνδυασμό τεσσάρων νουκλεοτιδίων, αδενίνη (A), θυμίνη (T), γουανίνη (G) και κυτοσίνη (C) (ένα νουκλεοτίδιο είναι ένας νουκλεοζίτης με μία ή περισσότερες φωσφορικές ομάδες ομοιοπολικά συνδεδεμένες με την 3'- και/ή 5'-υδροξυλομάδα). Μέσα σε έναν κλώνο αυτά τα νουκλεοτίδια συνδέονται μέσω φωσφοδιεστερικών δεσμών (τα σάκχαρα δεοξυριβόζης ενώνονται και στις δύο 3'- και 5'-ομάδες υδροξυλίου με φωσφορικές ομάδες μέσω εστερικών δεσμών). Οι δύο κλώνοι συγκρατούνται μεταξύ τους κατά κύριο λόγο μέσω των δεσμών υδρογόνου Watson Crick

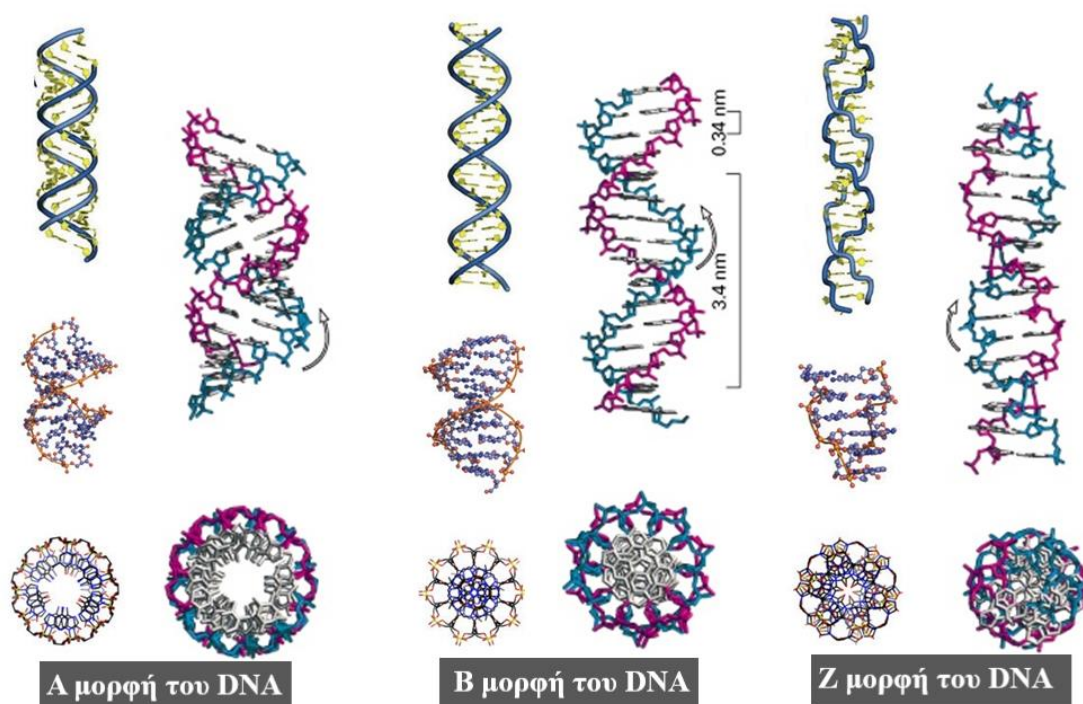
όπου η A σχηματίζει δύο δεσμούς υδρογόνου με την T και η C σχηματίζει τρεις δεσμούς υδρογόνου με την G [8]. Οι βάσεις του DNA συνδέονται μη ομοιοπολικά σύμφωνα με τους κανόνες του Chargaff όπου οι πουρίνες και οι πυριμιδίνες ζευγαρώνουν σε σταθερή αναλογία 1:1 (αδενίνη/θυμίνη και γουανίνη/κυτοσίνη). Η ακαμψία της διπλής έλικας παρέχεται και από τον σχηματισμό δεσμών υδρογόνου μεταξύ των αλυσίδων αλλά και από τις αλληλεπιδράσεις π-π stacking μεταξύ διαδοχικών νουκλεοβάσεων [9].



Εικόνα 17: Η μορφή διπλής έλικας του DNA και οι δομικές μονάδες από τις οποίες αποτελείται [28]

Στη φύση, το DNA μπορεί να υιοθετήσει τρεις βιολογικά ενεργές διπλές ελικοειδείς δομές: την **B-μορφή**, την **A-μορφή** και την **Z-μορφή**. Στην B-μορφή το DNA αποτελείται από μια δεξιόστροφη διπλή έλικα, με 10 βάσεις/στροφή και το βήμα (η απόσταση που

απαιτείται για να ολοκληρωθεί μια ελικοειδής στροφή) είναι 3,4 nm. Η Α-μορφή είναι, επίσης, μια δεξιόστροφη έλικα, με 11 βάσεις/στροφή (αφυδάτωση Β-μορφής, σχηματίζεται σε άνυδρα περιβάλλοντα). Το βήμα της έλικας της Α-μορφής είναι 2,46· επομένως, είναι βραχύτερη, και πλατύτερη δομή συγκριτικά με τη Β-μορφή. Η Ζ-μορφή είναι μια αριστερόστροφη έλικα, με 12 βάσεις/στροφή. Η Β-μορφή είναι η στερεοδιάταξη του DNA, που επικρατεί στα κύτταρα σε φυσιολογικές συνθήκες [10].

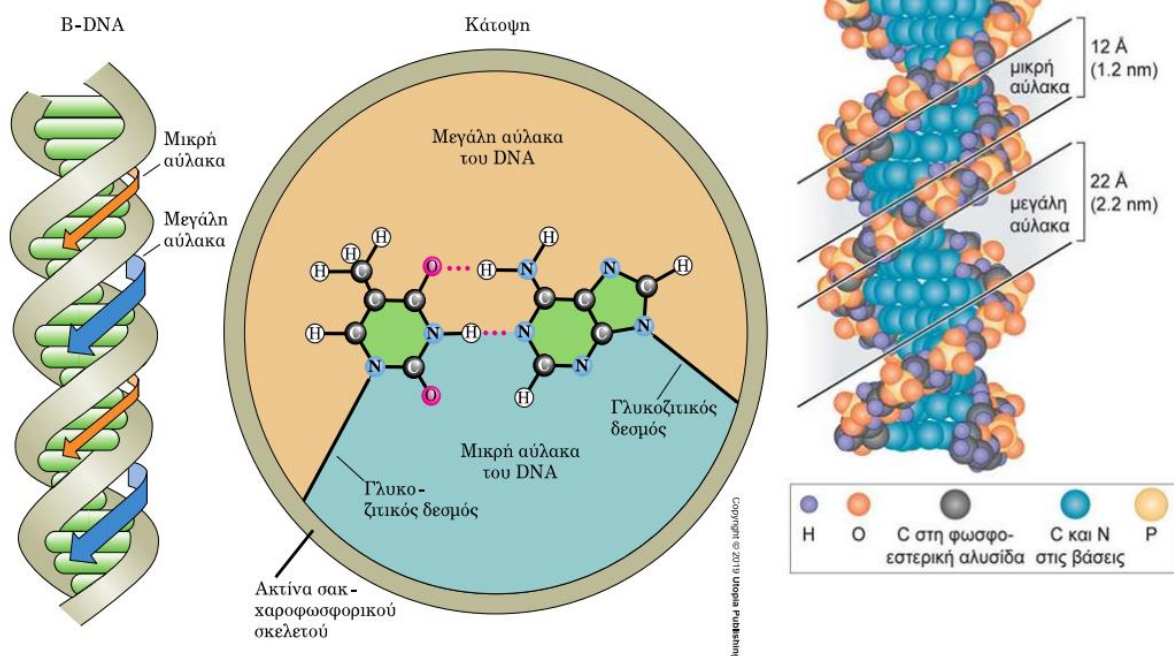


Εικόνα 18: Οι μορφές του DNA ανάλογα με την αναδίπλωση του [29,30]

Πίνακας 4: Συγκριση των δομικών χαρακτηριστικών των Α-, Β-, και Ζ- δομών του DNA [31]

	Β-μορφή	Α-μορφή	Ζ-μορφή
Στροφή έλικας	δεξιόστροφη	δεξιόστροφη	αριστερόστροφη
Ζεύγη βάσεων ανά στροφή	10	11	12
Κατακόρυφη απόσταση ανά ζεύγος βάσεων	3,4Å	2,56Å	19Å
Μέση γωνία περιστροφής ανά ζεύγος βάσεων	+36°	+33°	-30°
Διάμετρος έλικας	19Å	19Å	19Å

Τα εσωτερικό της διπλής έλικας είναι μη πολικό, ενώ η επιφάνειά της πολική-αρνητικά φορτισμένη, λόγω των κατάλοιπων δεσοξυ-ριβόζης και φωσφορικών του κορμού. Μεταξύ των αλυσίδων σε όλο το μήκος του DNA, απαντούν δύο εσοχές-αύλακες, (grooves) που χαρακτηρίζονται ως μικρή (minor), πλάτους ~12 Å και μεγάλη αύλακα (major groove), πλάτους ~22 Å .



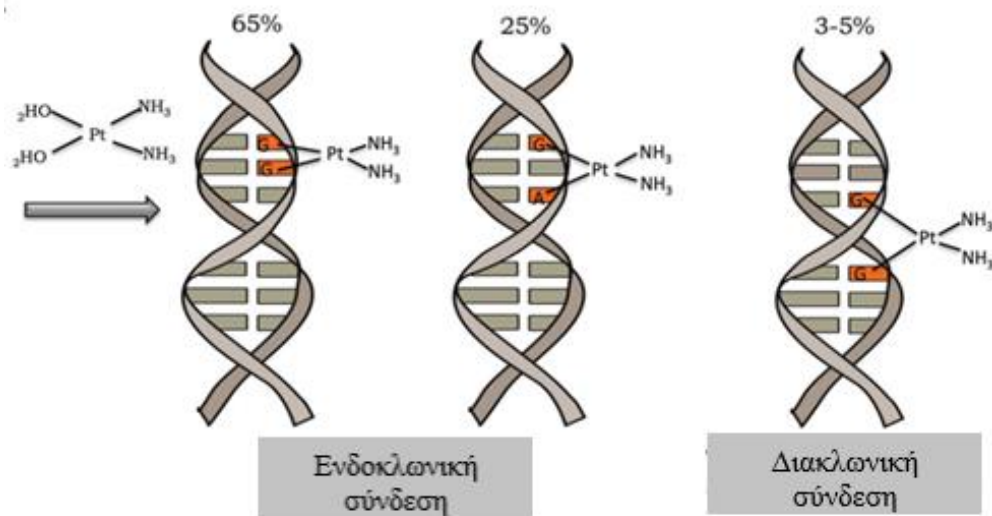
Εικόνα 19: Αναπαράσταση της μικρής και της μεγάλης αύλακας [10]

1.3.2. Τρόποι αλληλεπίδρασης μικρών μορίων με το DNA

Τα χημικά και δομικά αυτά χαρακτηριστικά των νουκλεϊκών οξέων εκθέτουν αρκετές πιθανές θέσεις αλληλεπίδρασης με ενώσεις μικρού μοριακού βάρους. Πρώτον, το φορτίο του φωσφοδιεστέρα στο βασικό σκελετό παρέχει μια ιδανική θέση δέσμευσης για θετικά φορτισμένες ενώσεις όπως σύμπλοκα μετάλλων, πολυκατιονικά μόρια ή

αλυσίδες αμινοξέων. Επιπλέον, το υδρόφοβο περιβάλλον που παρέχεται από τις νουκλεοβάσεις επιτρέπει τη δέσμευση μορίων μέσω μη ομοιοπολικών διαμοριακών αλληλεπιδράσεων όπως οι αλληλεπιδράσεις π-π stacking μεταξύ των ζευγών βάσεων και των επίπεδων αρωματικών ligands (της ένωσης που δεσμεύεται στο DNA). Η δέσμευση τέτοιων ενώσεων με το DNA οδηγεί συχνά σε τροποποίηση της διπλής ελικοειδούς δομής του DNA, όπου ο βαθμός εξαρτάται από τον τύπο και την έκταση της αλληλεπίδρασης [8].

Σε ειδικές συνθήκες διάφοροι τύποι αντιδράσεων (αλκυλίωση, μετάλλωση ή οξείδωση) με νουκλεϊκά οξέα μπορούν να προαχθούν από μικρά μόρια με αποτέλεσμα μια μόνιμη αλλοίωση της δομής και της λειτουργίας του γονιδιώματος. Η δράση αυτών των ενώσεων με το DNA έχει θεραπευτική σημασία, καθώς μπορούν να αλλάξουν την αντιγραφή, την έκφραση των πρωτεϊνών και τον κυτταρικό μεταβολισμό. Επομένως, τα μεταλλικά σύμπλοκα έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον, καθώς οι τρόποι δέσμευσης και η δραστηριότητά τους μπορούν να ρυθμιστούν σύμφωνα με τον αριθμό συντονισμού, το σχήμα και το φορτίο του ανόργανου ικρίωματος. Για παράδειγμα, η σισπλατίνη ($\text{cis-[Pt(NH}_3)_2\text{Cl}_2]$) και τα παράγωγά της αντιδρούν με το άτομο αζώτου (N7) των βάσεων πουρίνης, μέσω κυρίως 1,2-ενδοκλωνικής σταυροσύνδεσης ή και με διακλωνική σύνδεση (Εικόνα 20). Αυτή η χημική τροποποίηση οδηγεί σε συστροφή της έλικας του DNA με αποτέλεσμα την αναστολή της αντιγραφής και της μεταγραφής του. Η βιολογική δραστηριότητα παραγώγων σισπλατίνης τράβηξε γρήγορα την προσοχή για την εφαρμογή τους ως χημειοθεραπευτικοί παράγοντες και κίνησε το ενδιαφέρον για αναζήτηση και σύνθεση και άλλων μεταλλοφαρμάκων [8].



Εικόνα 20: Τρόποι δέσμευσης της σισπλατίνας με το DNA , ενδοκλωνικά (αριστερά) και διακλωνικά (δεξιά)[11]

Συνεπώς, σύμπλοκα με διαφορετικά μέταλλα έχουν αναλυθεί ως προς την δράση τους με τα νουκλεϊκά οξέα. Αρκετά σύμπλοκα ρουθηνίου, σιδήρου και χαλκού έχουν αναφερθεί ότι δεσμεύουν το DNA και προάγουν, υπό συγκεκριμένες συνθήκες αντίδρασης, την παραγωγή αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) ικανών για οξείδωση και διάσπαση του DNA. Η οξείδωση του DNA από τα ROS είναι μια ιδιαίτερα ελκυστική προσέγγιση για μόνιμη καταστροφή του γονιδίου, καθώς οι οξειδωτικώς διασπασμένοι κλώνοι DNA δεν επιδιορθώνονται εύκολα από τα ένζυμα λιγάσης και η βλάβη συχνά οδηγεί σε διαγραφή της αλληλουχίας. Εναλλακτικά, άλλα μέταλλα, όπως το δημήτριο (Ce^{4+}) και το ζirkόνιο (Zr^{4+}) μπορούν να διασπάσουν υδρολυτικά κλώνους ολιγονουκλεοτιδίων δημιουργώντας ανέπαφα άκρα 5'-φωσφορικού και 3'-υδροξυλίου και προσφέροντας μια εναλλακτική λύση στις ενζυμικές νουκλεάσες για την επεξεργασία των γονιδίων [8].

Η φύση, λοιπόν, και ο πολυμορφισμός των νουκλεϊκών οξέων καθιστούν το DNA εξαιρετικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη μικρών μορίων και βιοϋλικών ικανών να αλληλεπιδρούν και να αντιδρούν σε συγκεκριμένους γενετικούς τόπους. Υπάρχουν δύο τρόποι με τους οποίους μπορεί να αλληλεπιδράσει το φάρμακο με το DNA, ο ομοιοπολικός και ο μη ομοιοπολικός.

Οι μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις είναι αναστρέψιμες και μπορούν να χωριστούν περαιτέρω σε εξωτερική ηλεκτροστατική δέσμευση, σε δέσμευση στην αύλακα και παρεμβολή (συμπεριλαμβανομένης της παρεμβολής με σπειρώματα).

Αναλυτικότερα:

α. Εξωτερική ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση

Η εξωτερική ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση είναι ένας μη ομοιοπολικός τρόπος δέσμευσης που συμβαίνει μεταξύ μικρών, θετικά φορτισμένων μορίων και του αρνητικού φορτίου στη φωσφορικό βασικό σκελετό του DNA. Κατιονικά είδη όπως ιόντα μετάλλων, πολυαμίνες διαχέονται κατά μήκος του DNA αλληλεπιδρώντας μη ειδικά με τις φωσφορικές ομάδες στην μικρή αύλακα. Η ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση προκαλεί ασήμαντη διαταραχή στη δομή του DNA και συνήθως αποτελεί ένα στάδιο προ-σύνδεσης στη δέσμευση μεταλλικών συμπλεγμάτων με νουκλεϊκά οξέα. Συνήθως, τα μικρά αυτά μόρια που αλληλεπιδρούν με ηλεκτροστατικό τρόπο με το DNA έχουν βρει εφαρμογές ως παράγοντες συμπύκνωσης του DNA ή ως σταθεροποιητές τριτοταγών δομών νουκλεϊκών οξέων, όπως είναι οι τριπλές έλικες.

β. Δέσμευση στην αύλακα

Η δέσμευση των μορίων αυτών μπορεί να συμβαίνει είτε στην μικρή είτε στην μεγάλη αύλακα του DNA μέσω δεσμών υδρογόνου και αλληλεπιδράσεων Van der Waals [8]. Οι υδρόφοβοι και οι δεσμοί υδρογόνου αποτελούν σημαντικά συστατικά αυτής της διαδικασίας δέσμευσης καθώς παρέχουν σταθεροποίηση στο συμπλοκο φάρμακο-DNA που προκύπτει. Τα φάρμακα που δεσμεύονται στις μικρές αύλακες έχουν τυπικά πολλούς αρωματικούς δακτυλίους, όπως πυρρόλιο, φουράνιο ή βενζόλιο και διαθέτουν ένα στενό καμπυλωτό σχήμα, το οποίο διευκολύνει την σύνδεση αυξάνοντας τις αλληλεπιδράσεις van der Waals. Επίσης, τα φάρμακα αυτά σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με βάσεις, συνήθως με το N(3) της αδενίνης και το O(2) της θυμίνης [9].

γ. Παρεμβολή

Η παρεμβολή είναι ένας χαρακτηριστικός τύπος δέσμευσης για τα επίπεδα αρωματικά μόρια. Αυτές οι ενώσεις παρεμβάλλονται μεταξύ των γειτονικών ζευγών βάσεων και αλληλεπιδρούν με τις νουκλεοβάσεις μέσω υδρόφοβων π-π stacking αλληλεπιδράσεων. Η παρεμβολή προκαλεί επιμήκυνση της δομής του DNA που ακολουθείται από αύξηση του βήματος της έλικας και εκτύλιξη της ελίκωσης. Υπάρχει και ένας εναλλακτικός τύπος παρεμβολής, η παρεμβολή με μορφή σπειρώματος (Threading intercalation), η οποία εμφανίζεται στα επίπεδα αρωματικά συστήματα που αποτελούνται από ογκώδεις υποκαταστάτες [8].

Όσον αφορά τις ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις είναι είναι μη αναστρέψιμες και συχνά έχει προηγηθεί ένα μη ομοιοπολικό βήμα. Αυτό το είδος δέσμευσης περιλαμβάνει μια χημική αντίδραση με το DNA, η οποία δημιουργεί μια μόνιμη τροποποίηση στο

γονιδίωμα αλλάζοντας τη δομή και τη λειτουργία του. Διάφορες ομοιοπολικές τροποποιήσεις μπορούν να πραγματοποιηθούν στα νουκλεϊκά οξέα και συνήθως χωρίζονται σε αλκυλίωση, και οξειδωση [8].

α. Αλκυλίωση

Οι αλκυλιωτικοί παράγοντες είναι από τα παλαιότερα αντικαρκινικά φάρμακα και περιλαμβάνουν μουστάρδες αζώτου και θείου, νιτροζουρίες, τριαζένια και αιθυλενοϊμίμες. Αυτές οι ενώσεις αντιδρούν με τα πυρηνόφιλα τμήματα βιολογικών υλικών, για παράδειγμα τα άτομα N7 ή N1 στις νουκλεοβάσεις γουανίνης ή αδενίνης, αντίστοιχα, προκαλώντας το σχηματισμό ομοιοπολικών προϊόντων προσθήκης που αναστέλλουν την αντιγραφή του DNA και τη μεταγραφή RNA [8].

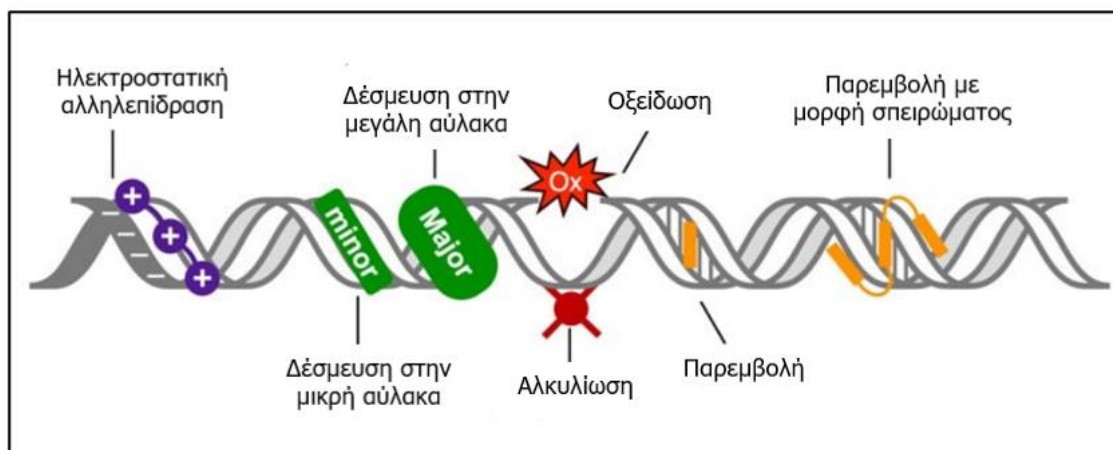
β. Συναρμογή

Ομοίως και τα μεταλλικά σύμπλοκα μπορούν να σχηματίσουν μη αναστρέψιμες ενδοκλωνικές ή διακλωνικές ενώσεις προσθήκης με το DNA. Όπως προαναφέρθηκε η σισπλατίνη (και τα παράγωγα της) είναι η πιο γνωστή ένωση για την αλληλεπίδρασή της με το DNA με αυτόν τον τρόπο. Επίσης, σύμπλοκα και άλλων μεταλλικών ιόντων όπως Ni(II) και Ru(II) μπορούν επίσης να συνδεθούν απευθείας στο DNA [8].

γ. Οξειδωση

Στην περίπτωση της οξειδωσης του DNA, προκαλείται ομοιοπολική τροποποίηση από την αλληλεπίδραση ενεργών ειδών οξυγόνου (ROS). Η παραγωγή ROS καταλύεται συνήθως από ένα οξειδοαναγωγικό μέταλλο που ενεργοποιεί ένα μόριο οξυγόνου μέσω της αναγωγής. Αυτή η διαδικασία δημιουργεί

αντιδραστικά ενδιάμεσα όπως το υπεροξειδίο οξυγόνου (O_2^*) και το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) που μπορούν περαιτέρω να αντιδράσουν παράγοντας ρίζες υδροξυλίου ($*OH$) και άλλα μεταλλοξειδή [8].



Εικόνα 21: Διαφορετικοί τρόποι δέσμευσης φαρμάκου-DNA, από αριστερά προς τα δεξιά: ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση, δέσμευση στην μικρή και μεγάλη αύλακα, ομοιοπολική τροποποίηση (δηλαδή, αλκυλίωση-συναρμογή ή οξειδωση), παρεμβολή και παρεμβολή με σπειρώματα [8]

1.3.3. Τεχνικές μελέτης της αλληλεπίδρασης φαρμάκων με το DNA

Αν και έχουν βρεθεί διάφορα μεταλλοφάρμακα όπως και η σισπλατίνη και τα παράγωγά της που εμφανίζουν ισχυρή αντικαρκινική δράση, εξαιτίας της συστηματικής τοξικότητάς τους και προς τα υγιή κύτταρα αναζητούνται συνεχώς νέα σύμπλοκα με διαφορετικά φαρμακοκινητικά και φαρμακοδυναμικά προφίλ.

Για την μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ DNA και των μικρών μορίων-φαρμάκων χρησιμοποιούνται διάφορες τεχνικές με τις πιο γνωστές να είναι οι:

Υπέρυθρη Φασματοσκοπία (IR), Φασματοσκοπία Raman, Φασματοσκοπία Κυκλικού Διχρωϊσμού (CD), Φασματοσκοπία UV-Visible, Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR), Μικροσκοπία Ατομικής Δύναμης (AFM), X-ray Κρυσταλλογραφία Ηλεκτροφόρηση, Φασματομετρία Μάζας, Μετρήσεις Ιξώδους, Μελέτες Θερμικής Μετουσίωσης, Κυκλική, Τετραγωνική και Διαφορική Παλμική Βολταμετρία. Αυτές οι

τεχνικές έχουν χρησιμοποιηθεί ως κύριο εργαλείο για τον χαρακτηρισμό της φύσης της συμπλοκοποίησης φαρμάκου-DNA και των επιδράσεων αυτής της αλληλεπίδρασης στη δομή του DNA [9].

1.4. Αντιβιοτικά και αντικαρκινική δράση

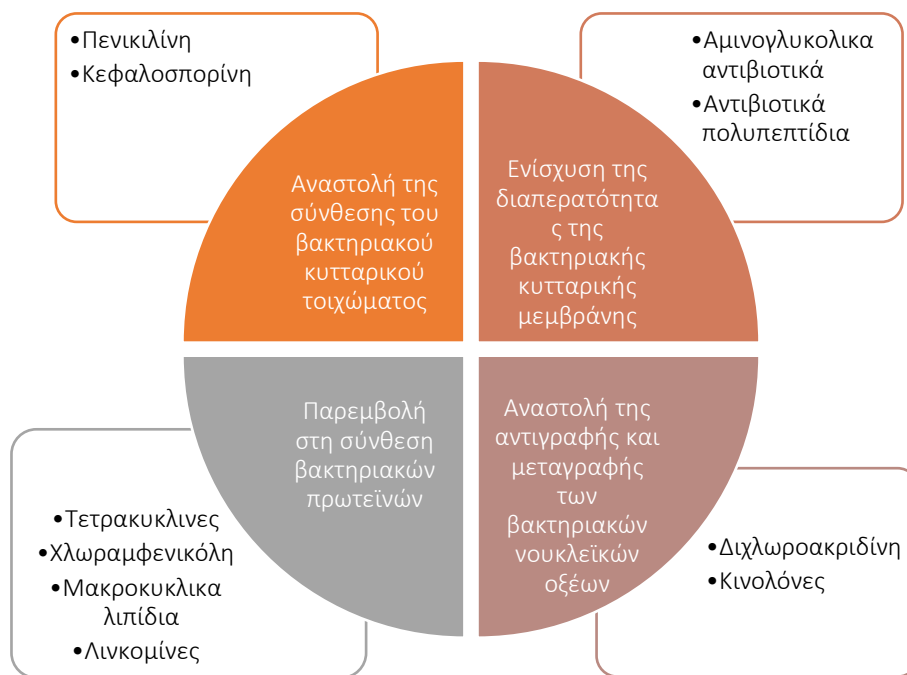
1.4.1. Τα αντιβιοτικά και οι τρόποι δράσης τους

Τα αντιβιοτικά είναι δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται από μικροοργανισμούς (βακτηρία, μύκητες, ακτινομύκητες), ζώα ή φυτά και έχουν αντιπαθόγνο δράση ή παρεμβαίνουν στην ανάπτυξη άλλων ζωντανών κυττάρων. Έχει βρεθεί ότι τα αντιβιοτικά μπορούν να προάγουν την απόπτωση του καρκίνου, να αναστείλουν την ανάπτυξή του και να συμβάλουν στην πρόληψη της μετάστασής του. Για αυτούς τους λόγους, τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο για να βοηθήσουν στη θεραπεία των καρκίνων. Ωστόσο, η χορήγηση αντιβιοτικών μπορεί επίσης να σκοτώσει μη εκλεκτικά πλεονεκτικές βακτηριακές ομάδες, όπως π.χ τα *Lactobacillus* και *Bifidobacterium*, εκτός από τα παθόγνα βακτήρια. Όμως, το εντερικό μικροβίωμα παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη θεραπεία του καρκίνου και στην φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού [12]. Έτσι, η χρήση αντιβιοτικών μπορεί να βοηθήσει στην αντιμετώπιση του καρκίνου όμως θα πρέπει να δοθεί προσοχή στην δόση και να μελετηθεί εκτενέστερα η δράση των αντιβιοτικών-φαρμάκων και ο τρόπος που επηρεάζουν τα κύτταρα, για την αποφυγή παρενεργειών [12].

Όπως προαναφέρθηκε το αντιβιοτικό είναι ένα είδος φαρμάκου που μπορεί να σκοτώσει ή να αναστείλει την ανάπτυξη βακτηρίων. Η πρώτη ανακάλυψη στα αντιβιοτικά χρονολογείται από το 1929 από τον Αλεξάντερ Φλέμινγκ, ο οποίος ανακάλυψε το πρώτο ευρέως αποτελεσματικό αντιβιοτικό, την πενικιλίνη. Τα σύγχρονα

αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται συνήθως απαρτίζονται κυρίως από β-λακτάμες, αμινογλυκάνες, τετρακυκλίνες, χλωραμφενικόλη, μακροκυκλικά λιπίδια, λινκομίνες, πολυπεπτίδια, ριφαμυκίνη και κινολόνες. Οι βακτηριοκτόνες τους επιδράσεις περιλαμβάνουν συνήθως τέσσερις κύριους μηχανισμούς (Εικόνα), οι οποίοι είναι:

- i) η αναστολή της σύνθεσης του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος
- ii) η ενίσχυση της διαπερατότητας της βακτηριακής κυτταρικής μεμβράνης
- iii) η παρεμβολή στη σύνθεση βακτηριακών πρωτεϊνών και
- iv) η αναστολή της αντιγραφής και μεταγραφής των βακτηριακών νουκλεϊκών οξέων [12]



Εικόνα 22: Κατηγοριοποίηση των αντιμικροβιακών μηχανισμών των αντιβιοτικών [12]

1.4.2. Τα αντιβιοτικά και οι αντικαρκινικές του ιδιότητες

Είναι γνωστό ότι διαφορετικοί τύποι καρκίνων συμπεριφέρονται διαφορετικά και προκαλούνται ουσιαστικά από διάφορους παράγοντες, όπως η γενετική, ο τρόπος ζωής

και η περιβαλλοντική έκθεση σε διάφορους τύπους χημικών ουσιών (π.χ.καπνός, αλκοόλ) και σε ακτινοβολία. Ο σκοπός των κυτταροτοξικών χημειοθεραπευτικών είναι η διαδοχική μείωση του χάσματος μεταξύ της ανάπτυξης και του θανάτου των καρκινικών κυττάρων σε κάθε κύκλο θεραπείας. Μεγάλο κομμάτι της έρευνας αποτελεί η δόση του φαρμάκου καθώς οι πολύ χαμηλές δόσεις φαίνεται να είναι αναποτελεσματικές έναντι των όγκων, ενώ οι υπερβολικές δόσεις προκαλούν τεράστια τοξικότητα στον ασθενή [13].

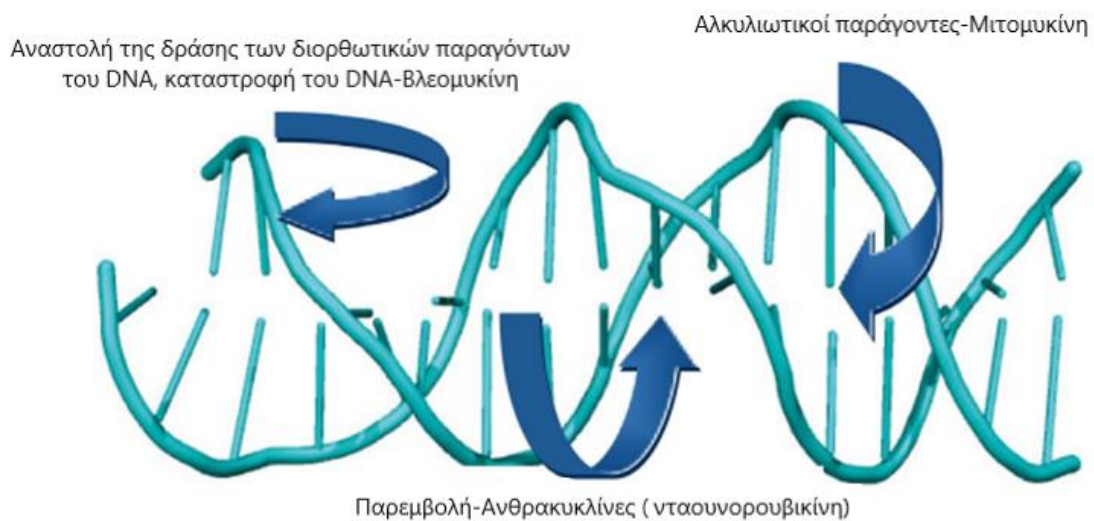
Τα αντικαρκινικά αντιβιοτικά είναι χημικές ουσίες που παράγονται από μικροοργανισμούς με αντικαρκινική δράση. [12]. Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται στη χημειοθεραπεία έχουν διάφορους τρόπους δράσης. Μερικοί είναι ισχυροί παρεμβαλλόμενοι παράγοντες ενώ κάποιοι είναι καταστροφείς του DNA. Η μελέτη διαφορετικών αντιβιοτικών συμπεριλαμβανομένης της Actinomycin, Adriamycin/Doxorubicin και ορισμένων άλλων ουσιών έδειξε ότι η διέγερση και η ενίσχυση των υπάρχοντων αμυντικών μηχανισμών του ξενιστή είναι ένας από τους πρόσθετους τρόπους με τους οποίους δρουν αυτοί οι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες [11].

Το DNA είναι ένας από τους κύριους μοριακούς στόχους για πολλά από αυτά τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα. Η ανακάλυψη νέων ειδικών για το DNA φαρμάκων έχει δείξει πολύ θετικά αποτελέσματα με νέες έρευνες να πραγματοποιούνται συνεχώς. Ωστόσο, υπάρχουν περιορισμοί στη στοχευμένη θεραπεία με DNA, καθώς αν και επηρεάζουν κατά προτίμηση τα καρκινικά κύτταρα λόγω του υψηλού ποσοστού πολλαπλασιασμού και της γονιδιωματικής αστάθειάς τους, μπορούν δυστυχώς να επηρεασούν και τα καλοήγη κύτταρα. Τα φυσιολογικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να

ανέχονται βασικά επίπεδα βλάβης του DNA, αλλά οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης δεν μπορούν να χειριστούν όλες αυτές τις αλλαγές στο DNA που προκύπτουν λόγω της θεραπείας [11].

Οι ανθρακυκλίνες, οι βλεομυκίνες, η ακτινομυκίνη D, οι μιτομυκίνες είναι μερικά αντικαρκινικά αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία και παρουσιάζουν εμφανή και αποτελεσματική ανασταλτική δράση στον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό, την επιθετική ανάπτυξη και τη μετάσταση κακοήθων καρκίνων [11, 12]. Η Εικόνα 23 συνοψίζει τον μηχανισμό δράσης αυτών των αντιβιοτικών:

- Κάποια αντιβιοτικά δρουν ως παράγοντες παρεμβολής σχηματίζοντας ελεύθερες ρίζες και μεταβάλλοντας τη λειτουργία της μεμβράνης (όπως η ανθρακυκλίνες: π.χ. νταουνουροβικίνη). Είναι από τα πιο αποτελεσματικά φάρμακα για τη θεραπεία συμπαγών όγκων, π.χ. καρκίνο του μαστού, καρκίνο του πνεύμονα και των ωοθηκών. Έχουν επίσης δράση κατά του καρκίνου της ουροδόχου κύστης, του στομάχου, του ήπατος και του θυρεοειδούς.
- Άλλα αντιβιοτικά (όπως η μιτομυκίνη) σχηματίζουν ομοιοπολικούς δεσμούς με το DNA και απουσία οξυγόνου λειτουργούν ως αλκυλιωτικοί παράγοντες.
- Υπάρχουν και τα αντιβιοτικά (π.χ. βλεομυκίνη) τα οποία εμποδίζουν την δράση των διορθωτικών παραγόντων του DNA, οδηγούν σε μιτοχονδριακή βλάβη και κατακερματίζουν το DNA [13].

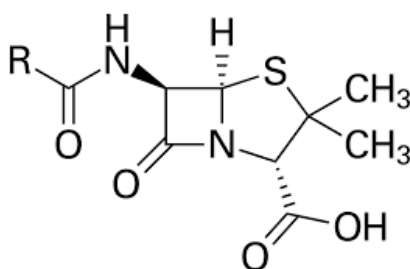


Εικόνα 23: Μηχανισμοί δράσης των αντικαρκινικών αντιβιοτικών [13]

1.4.3. Η Πενικιλίνη, τα παράγωγά της και η αντικαρκινική δράση

Η πενικιλίνη είναι το πρώτο αντιβιοτικό που αναπτύχθηκε για τη θεραπεία βακτηριακών μολυσματικών ασθενειών και έχει επίσης βρει νέες εφαρμογές ως αντικαρκινικό προφάρμακο και αναστολέας ενζύμων [13]. Το 1944, ο Ivor Cornman, πραγματοποίησε ένα πείραμα σε κύτταρα ενός συγκεκριμένου είδους καρκίνου ποντικού που αναπτύσσονταν σε δοκιμαστικό σωλήνα. Αποδείχτηκε ότι η πενικιλίνη κατέστρεψε ή σκότωσε τα καρκινικά κύτταρα και άφησε τα φυσιολογικά κύτταρα άθικτα. Συγκεκριμένα, χρειάστηκε τριπλάσια δόση πενικιλίνης, από αυτήν που χρησιμοποιήθηκε για την θανάτωση του καρκίνου, για να βλάψει τα φυσιολογικά κύτταρα. Επίσης, όταν τα καρκινικά κύτταρα υποβλήθηκαν σε θεραπεία με πενικιλίνη και μεταμοσχεύθηκαν σε καρκινοπαθείς αρουραίους, κανένας δεν προσβλήθηκε από καρκίνο, ενώ αντίθετα τα μη επεξεργασμένα κύτταρα έδωσαν καρκίνο σε όλα. Εκτός από αυτό, δεν έχει δημοσιευτεί ούτε μία εργασία όπου η πενικιλίνη χρησιμοποιείται κατά των καρκινικών κυττάρων [14].

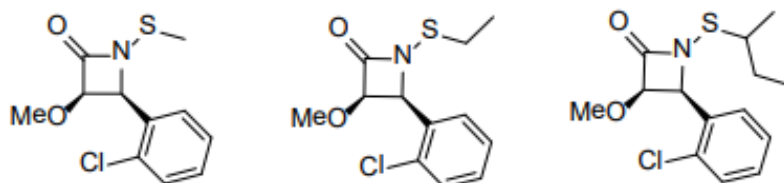
Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες της εξωκυτταρικής μήτρας παίζουν ένα μεγάλο ρόλο στην καρκινογένεση καθώς έχει βρεθεί ότι η αυξημένη σύνθεση αυτών των ενζύμων ανιχνεύεται σε πολλές καταστροφικές ασθένειες. Σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν υποβάλλοντας κύτταρα HeLa σε θεραπεία με πενικιλίνη βρέθηκε ότι η έκφραση της MMP11 μειώνεται. Συνεπώς, η πενικιλίνη έχει σημαντική επίδραση στην αποικοδόμηση της εξωκυτταρικής μήτρας όπου οι μεταλλοπρωτεϊνάσες μήτρας (MMPs) διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο με τελικό στάδιο την θανάτωση των καρκινικών κυττάρων.



Εικόνα 24: Πενικιλίνη[32]

Αρκετές μελέτες έχουν αναφερθεί και στις αντικαρκινικές ιδιότητες των β-λακταμών. Οι N-μεθυλθιο β-λακτάμες (η χημική δομή τους φαίνεται στην Εικόνα 25) είναι μια νέα κατηγορία φαρμάκων, η οποία βρέθηκε ότι επάγει την απόπτωση σε μια σειρά από καρκινικές κυτταρικές σειρές, συμπεριλαμβανομένου του μαστού, του προστάτη, της λευχαιμίας του κεφαλιού και του τραχήλου. Οι β-λακτάμες προκάλεσαν βλάβη στο DNA και στην αναστολή της αντιγραφής του DNA στα Jurkat T κύτταρα. Συνεπακόλουθα, ενεργοποιήθηκε η πρωτεΐνη κινάση p38, διακόπηκε η φάσης S και ενεργοποιήθηκε η κασπάση, με τελικό αποτέλεσμα να προκληθεί κυτταρική απόπτωση. Φάνηκε ότι η διάσπαση του DNA συνέβη με τρόπο εξαρτώμενο από το χρόνο και τη

συγκέντρωση και με τρόπο αντιστρόφως ανάλογο με το μέγεθος της οργανοθειο πλευρικής αλυσίδας της β-λακτάμης. Επιπλέον, πολύ σημαντικό είναι το γεγονός ότι στα αντιβιοτικά β-λακτάμης δεν παρατηρήθηκαν για πρώτη φορά επιβλαβείς επιδράσεις στα ποντίκια ή οποιαδήποτε κυτταρική τοξικότητα σε φυσιολογικά κύτταρα *in vitro* [13].

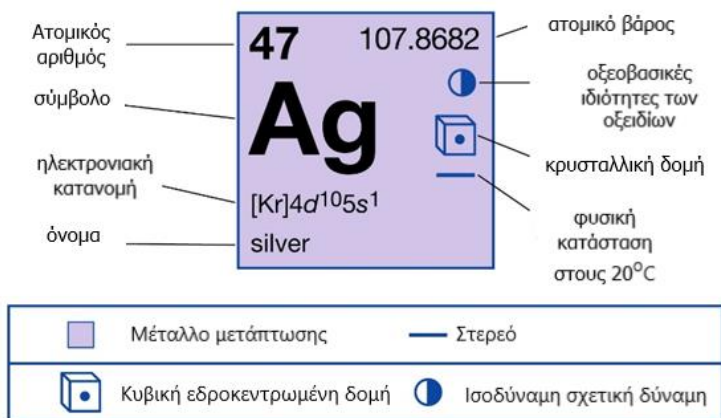


Εικόνα 25: Παράγωγα πενικιλίνης- N-μεθυλθιο β-λακτάμες[13]

1.5. Αντικαρκινική δράση Αργύρου

Ο άργυρος έχει αποδειχτεί ότι διαθέτει μια σειρά από ιατρικές εφαρμογές, όπως είναι η αντιβακτηριακή, αντισηπτική και αντιφλεγμονώδη δράση[15]. Είναι ευρέως γνωστό ότι τα κατιόντα αργύρου διαπερνούν τις μικροβιακές μεμβράνες, συνδέονται με το DNA (νουκλεικά οξέα), τις πρωτεΐνες και τις ελεύθερες ομάδες θειόλης υπολειμμάτων κυστεΐνης. Επίσης παρεμποδίζουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων και τα συστήματα ανταλλαγής ιόντων μεμβράνης [15, 16]. Επιπλέον, έχουν βρεθεί ενώσεις αργύρου (I), οι οποίες αλληλεπιδρούν με το πυρηνικό DNA, την LOX και το μιτοχόνδριο, προκαλώντας απόπτωση των κυττάρων μέσω της μιτοχονδριακής οδού σηματοδότησης. Πολύ σημαντικό είναι το γεγονός ότι τα κατιόντα αργύρου παρουσιάζουν χαμηλή τοξικότητα στα κύτταρα των θηλαστικών με αποτέλεσμα να χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη νέων μεταλλοθεραπευτικών φαρμάκων [17]. Επομένως εκτός από τις παλαιότερες ιατρικές εφαρμογές τους, πλέον έχουν βρεθεί και μελετηθεί σύμπλοκα αργύρου και με αντικαρκινική δράση, λόγω όλων των παραπάνω ιδιοτήτων του αργύρου.

Άργυρος



© Encyclopædia Britannica, Inc.

Εικόνα 26: Το στοιχείο του αργύρου και κάποιες ιδιότητές του[33]

2. ΣΚΟΠΟΣ

Ο καρκίνος του μαστού είναι ένα είδος καρκίνου, το οποίο εμφανίζεται όλο και συχνότερα, κυρίως σε γυναίκες, σε όλο τον κόσμο. Έχουν βρεθεί αντικαρκινικά φάρμακα τα οποία στοχεύουν τα καρκινικά κύτταρα και τα θανατώνουν. Οι θεραπείες αυτές όμως δεν είναι πάντα αποτελεσματικές είτε λόγω μετάστασης είτε εξαιτίας άλλων συνθηκών, με αποτέλεσμα ο καρκίνος να μην υποχωρεί. Επίσης, ακόμα και σε περιπτώσεις που η θεραπεία λειτουργεί, εμφανίζονται πολλές παρενέργειες, γεγονός που οφείλεται στο ότι τα φάρμακα θανατώνουν και υγιή κύτταρα. Για τους λόγους αυτούς γίνονται συνεχώς έρευνες για νέα, αποτελεσματικά αντικαρκινικά φάρμακα, τα οποία να παρουσιάζουν εκλεκτικότητα στα καρκινικά κύτταρα.

Σε αρκετές μελέτες έχουν αναφερθεί οι αντικαρκινικές ιδιότητες των β-λακταμών και συνεπώς και της πενικιλίνης. Βρέθηκε ότι προκαλούν απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα του μαστού, προστάτη, κεφαλής και λαιμού. Επίσης, η δόση αυτών των αντιβιοτικών που απαιτείται για την θανάτωση των καρκινικών κυττάρων δεν επηρεάζει τα υγιή κύτταρα. Επιπλέον, τα κατιόντα του αργύρου μπορούν να εμφανίσουν αντικαρκινική δράση καθώς διαπερνούν τις μικροβιακές μεμβράνες, συνδέονται με DNA, πρωτεΐνες και ελεύθερες ομάδες θειόλης υπολειμμάτων κυστεΐνης και παρεμβαίνουν στη μεταφορά ηλεκτρονίων και στα συστήματα ανταλλαγής ιόντων μεμβράνης. Συνεπώς, σκοπός της διπλωματικής είναι η σύνθεση ενός μέταλλο-αντιβιοτικού συμπλόκου και συγκεκριμένα αργύρου με πενικιλίνη G και η μελέτη της αλληλεπίδρασης του με το DNA, το ένζυμο λιποξυγενάση, της δράσης του σε καρκινικά και υγιή κύτταρα,

της μελέτης της τοξικότητας του και του μηχανισμού δράσης του, με τελικό στόχο την εξαγωγή συμπεράσματος για την αντικαρκινική δράση της ένωσης.

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1. Χημικά Αντιδραστήρια και Όργανα

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν κατάλληλοι ως αντιδραστήρια και δεν υποβλήθηκαν σε περαιτέρω καθαρισμό. Ο νιτρικός άργυρος και το άλας της πενικιλίνης G αγοράστηκαν από την Aldrich-Merck. Το αιθίδιο βρωμίδιο, το λινολεϊκό οξύ 99%, το ένζυμο λιποξυγενάση, το phosphate buffer saline (PBS) και το ιωδιούχο προπίδιο, αγοράστηκαν από την Sigma- Aldrich , το CT DNA και το βορικό οξύ από την Merck-Schuchardt και το DMSO από την Riedel-de Haën. Το θρεπτικό Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), ο εμβρυϊκός βόειος ορός, η γλουταμίνη και η θρυψίνη αγοράστηκαν από την Gibco, Γλασκώβη, Ηνωμένο Βασίλειο.

Για το σημείο τήξης χρησιμοποιήθηκαν ανοιχτά σωληνάκια και η μέτρηση πραγματοποιήθηκε σε συσκευή Stuart Scientific χωρίς να γίνει κάποια διόρθωση. Για την λήψη φάσματος IR (απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας) χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο ATR-FT-IR (Cary 630 FTIR) με μέση υπέρυθρη ακτινοβολία ($4000-400\text{ cm}^{-1}$) της Agilent. Τα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ καταγράφηκαν σε όργανο Bruker AC 400 MHz FT-NMR, αφού πρώτα διαλυτοποιήθηκαν με διάλυμα DMSO- d_6 . Για τα φάσματα XRF χρησιμοποιήθηκε το όργανο XRF (NEXQC) της Rigaku. Οι θερμικές μελέτες πραγματοποιήθηκαν σε συσκευή DTG/TG NETZSCH STA 449C, υπό ροή αέρα (με ρυθμό θέρμανσης $10^\circ\text{C min}^{-1}$). Για την προσεγγιστική μέτρηση του μοριακού βάρους της ένωσης με την μέθοδο της κρυσκοπίας χρησιμοποιήθηκε το οσμόμετρο σημείου πήξης Osmomat 3000 basic. Για την λήψη των φασμάτων ηλεκτρονικής απορρόφησης χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο UV/Vis σειράς PC UV-1600 της VWR. Για τα

φάσματα φθορισμού χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο φθορισμού της JASCO Spectrofluorometer FP-8200. Το κινηματικό ιξώδες μετρήθηκε με την χρήση ιξωδόμετρου Ostwald. Άλλα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν είναι Vortex από την Sanichem, πεχάμετρο (pH meter Basic 20) από την CRISON, ειδική πρέσα για παστίλιες από την Specac και αναλυτικός ζυγός της Scatec.

3.2. Χημικό Μέρος

Το χημικό μέρος περιλαμβάνει την σύνθεση της ένωσης PenAcAg, την εύρεση του σημείου τήξης, της διαλυτότητας, του μοριακού βάρους με την μέθοδο της κρουσκοπίας. Επίσης, λαμβάνονται τα φάσματα υπέρυθρης φασματοσκοπίας μετασχηματισμού Fourier ολικής εσωτερικής ανάκλασης (ATR-FT-IR), φθορισμού ακτίνων X (XRF), απορρόφησης υπέρυθρης-ορατής ακτινοβολίας (UV-Vis), πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου ($^1\text{H-NMR}$) (και για σταθερότητα) και πραγματοποιείται θερμοσταθμική και διαφορική θερμική ανάλυση (TG-DTA).

3.2.1. Σύνθεση της ένωσης

Για την σύνθεση του συμπλόκου PenAcAg πραγματοποιήθηκε αντίδραση ισομοριακών ποσοτήτων νιτρικού αργύρου 0,085 g AgNO_3 (0.5 mmol) με το άλας της πενικιλίνης G με νάτριο 0,18 g PenNa (0.5 mmol) σε διαλύτη δις απεσταγμένο νερό (ddH_2O). Έπειτα από σύντομη ανάδευση (2 min) καταβυθίζεται λευκό ίζημα. Το λευκό ίζημα παραλαμβάνεται με διήθηση αμέσως με διπλό ηθμό και ξηραίνεται για μία μέρα στον απαγωγό. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε κρυστάλλωση, όπου το προϊόν της

αντίδρασης διαλύθηκε σε ακετονιτρίλιο (MeCN), και φυγοκεντρήθηκε για 10 min με 4000στροφές/min, ώστε να απομακρυνθούν οι αδιάλυτες προσμίξεις. Το διάλυμα ακετονιτρίλιου συμπυκνώθηκε σε ρεύμα ψυχρού αέρα και προστέθηκε διαιθυλαιθέρας (Et₂O) για να παραληφθεί το σύμπλοκο από το ποτήρι ζέσεως ύστερα από εξάτμιση μέχρι ξηρού στον απαγωγό. Μεταφέρθηκε σε erendorf και αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτεινό μέρος.

3.2.2. Σημείο τήξης

Για την μέτρηση του σημείου τήξεως χρησιμοποιήθηκαν τριχοειδή σωληνάκια BRIS micro haematocrit tubes (Soda Lime Glass, Vitrex Medical A/S). Με τη χρήση της συσκευής Stuart Scientific μετρήθηκε το σημείο τήξεως με σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας. Το σημείο τήξεως είναι μη διορθωμένο.

3.2.3. Διαλυτότητα

Για την διαλυτότητα προστέθηκε ίση, μικρή ποσότητα του δείγματος σε 10 διαφορετικούς δοκιμαστικούς σωλήνες στους οποίους προστέθηκαν διαδοχικά ίσες ποσότητες από τους ακόλουθους διαλύτες: εξάνιο (n-hexane), τολουόλιο (toluene), διχλωρομεθάνιο (CH₂Cl₂), χλωροφόρμιο (CHCl₃), ακετόνη (Acetone), μεθανόλη (MeOH), ακετονιτρίλιο (MeCN), διμέθυλο-σουλφοξείδιο (DMSO), διμέθυλο-φορμαμίδιο (DMF) και δις απεσταγμένο νερό (ddH₂O). Έπειτα από καλή ανάδευση ελέγχθηκε η διαλυτότητα.

3.2.4. Κρυοσκοπία

Σύμφωνα με την μέθοδο της κρυοσκοπίας οι διαλυμένες ουσίες μειώνουν τα σημεία πήξεως διαφόρων διαλυτών όπως το νερό. Ανάλογα λοιπόν με την ταπείνωση του σημείου πήξεως του διαλύτη μπορεί να βρεθεί το μοριακό βάρος της ουσίας που προστίθεται. Αυτό προκύπτει από δύο σχέσεις: Η ταπείνωση του σημείου τήξεως ισούται με $\Delta T = K \cdot m$, όπου K η κρυοσκοπική σταθερά, η οποία είναι συγκεκριμένη για κάθε διαλύτη και m η μοριακή συγκέντρωση κατά μάζα, δηλαδή $m = \frac{1000 m_1}{M_r m_2}$ (m_1 : μάζα διαλυμένης ουσίας, m_2 : μάζα διαλύτη). Συνεπώς, από τις εξισώσεις $\Delta T = K \cdot m$ και $m = \frac{1000 m_1}{M_r m_2}$ προκύπτει το μοριακό βάρος της διαλυμένης ουσίας.

Πειραματικά, λοιπόν, το δείγμα διαλύεται με DMSO σε συγκέντρωση 10mg/1ml. Από το διάλυμα αυτό λαμβάνεται 1 ml και προστίθεται σε 49 ml ddH₂O. Το δείγμα αυτό μετριέται στη συνέχεια με το όργανο της κρυοσκοπίας OSMOMAT 3000 Freezing Point Osmometer της Gonotec και προσδιορίζεται το μοριακό βάρος.

3.2.5. Υπέρυθρη Φασματοσκοπία Μετασχηματισμού Fourier Ολικής Εσωτερικής

Ανάκλασης (ATR-FTIR)

Η υπέρυθρη φασματοσκοπία IR βασίζεται στην αλληλεπίδραση των ουσιών με την υπέρυθρη ακτινοβολία. Προκαλεί, λοιπόν, χαρακτηριστικές δονήσεις, οι οποίες είναι ανάλογες με το είδος των δεσμών της ένωσης που μελετάται. Το FTIR είναι οποιαδήποτε μέθοδος υπέρυθρης φασματοσκοπίας στην οποία χρησιμοποιείται ο μετασχηματισμός Fourier με αποτέλεσμα να βελτιώνονται τα φάσματα που λαμβάνονται σε σχέση με τα

συμβατικά φασματοφωτόμετρα. Επίσης η τεχνική ATR βασίζεται στο φαινόμενο της ολικής εσωτερικής ανάκλασης και έχει αναπτυχθεί για να ενισχύσει την ευαισθησία της φασματοσκοπίας. Με την χρήση του ATR αναλύονται στερεά και υγρά δείγματα και απλοποιείται η μέτρηση σχεδόν όλων των ουσιών.

Για την λήψη του φάσματος IR τοποθετήθηκε πολύ μικρή ποσότητα ουσίας στο ειδικό εξάρτημα του ATR-FTIR της Agilent, το οποίο είναι ένας διαφανής κρύσταλλος με υψηλό δείκτη διάθλασης. Τελικά, λήφθηκαν και μελετήθηκαν τα φάσματα του PenAcAg και του άλατος της πενικιλίνης G με το φάσμα συχνοτήτων της ακτινοβολίας να κυμαίνεται στα $4000-400\text{ cm}^{-1}$.

3.2.6. Φθορισμός Ακτίνων Χ (XRF)

Η αναλυτική τεχνική του φθορισμού ακτίνων Χ είναι μη καταστρεπτική και χρησιμοποιείται για να προσδιοριστεί η στοιχειακή σύνθεση των υλικών. Για τον προσδιορισμό αυτό προκαλείται στο δείγμα διέγερση μέσω μιας πρωτογενούς πηγής ακτίνων Χ και στη συνέχεια μετρείται η φθορίζουσα ακτινοβολία Χ που εκπέμπεται από το δείγμα. Η εκπεμπόμενη αυτή ακτινοβολία είναι χαρακτηριστική για κάθε στοιχείο με αποτέλεσμα η τεχνική XRF να χρησιμοποιείται ευρέως τόσο στην ποιοτική όσο και στην ποσοτική ανάλυση της σύνθεσης μια ουσίας.

Πειραματικά για την λήψη του φάσματος XRF δημιουργήθηκε πρότυπη καμπύλη αργύρου με την κατασκευή πασιλιών αυξανόμενων συγκεντρώσεων AgNO_3 από βορικό οξύ. Συγκεκριμένα τόσο για την παρασκευή των πασιλιών της πρότυπη καμπύλης όσο και της ουσίας PenAcAg πραγματοποιείται η ίδια διαδικασία. Ζυγίζεται κατάλληλη

ποσότητα ουσίας σε ένα erendorf σε αναλυτικό ζυγό και έπειτα ζυγίζονται 500mg βορικού οξέος στο ίδιο erendorf. Στη συνέχεια με την χρήση ειδικής πρέσας της Specac, αφού πρώτα κονιοποιηθεί το μείγμα ουσίας-βορικού σε γουδί, δημιουργείται η παστίλια, τοποθετείται στο μηχάνημα XRF της Rigaku και λαμβάνεται η μέτρηση και το φάσμα.

3.2.7. Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός Πρωτονίου ($^1\text{H-NMR}$)

Στη φασματοσκοπία του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού το δείγμα βρίσκεται σε ένα μαγνητικό πεδίο και απορροφά ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία σε συγκεκριμένες συχνότητες, οι οποίες είναι χαρακτηριστικές του δείγματος. Για την λήψη των φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ του PenAcAg και του άλατος της πενικιλίνης G ζυγίστηκαν 10mg από το καθένα και διαλύθηκαν έκαστα σε 400μl δευτεριωμένου DMSO ($\text{DMSO-}d^6$). Τα διαλύματα αυτά μεταφέρθηκαν σε ειδικά σωληνάκια για το NMR και μετρήθηκαν στο όργανο της Bruker AC 400 MHz FT-NMR. Το διάλυμα του PenAcAg μετρήθηκε και μετά από 48 ώρες για την μελέτη της σταθερότητας του. Τέλος, μελετήθηκαν και ερμηνεύτηκαν τα φάσματα.

3.2.8. Απορρόφησης Υπέρυθρης-Ορατής Ακτινοβολίας (UV-Vis),

Για την λήψη των φασμάτων του PenAcAg και του άλατος της πενικιλίνης G παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα συγκέντρωσης 10^{-2}M με διαλύτη DMSO. Πραγματοποιήθηκε πρώτα μία μέτρηση με DMSO για το τυφλό και έπειτα παρασκευάστηκαν διαλύματα για την κάθε ουσία συγκέντρωσης 10^{-4}M , με αραιώση και μετρήθηκαν με το φασματοφωτόμετρο UV/Vis σειράς PC UV-1600 της VWR.

3.2.9. Θερμοσταθμική και Διαφορική Θερμική Ανάλυση (TG-DTA).

Η Θερμοσταθμική–Διαφορική Θερμική Ανάλυση (TG–DTA) πραγματοποιήθηκε σε συσκευή DTG/TG NETZSCH STA 449C, υπό ροή αέρα (με ρυθμό θέρμανσης $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, με εύρος θερμοκρασιών 25–500 $^{\circ}\text{C}$).

3.3. Βιολογικό μέρος

Στο βιολογικό μέρος πραγματοποιήθηκαν *ex vivo* πειράματα με τα οποία μελετήθηκε η αλληλεπίδραση του PenAcAg με το CT-DNA μέσω φθορισμού, απορρόφησης UV και ιζωδομετρίας και η επίδρασή του στην δραστικότητα του ενζύμου λιποξυγενάση. Επίσης, επιτελέστηκαν και *in vitro* πειράματα όπου μελετήθηκε η αντικαρκινική δράση στα θετικά σε ορμόνες καρκινικά κύτταρα του μαστού MCF-7, στα αρνητικά σε ορμόνες καρκινικά κύτταρα του μαστού (MDA-MB-231), η τοξικότητα σε υγιείς ινοβλάστες πνεύμονα ανθρώπινου εμβρύου (MRC-5) και η γενετοξικότητα με την μέθοδο των μικροπυρηνίσκων (Micronucleus assay). Επίσης, μελετήθηκε ο μηχανισμός δράσης του PenAcAg έναντι των MCF-7(HD) κυττάρων μέσω ανάλυσης της μορφολογίας τους με τη χρήση αντίστροφου μικροσκοπίου και με τη μέθοδο χρώσης πορτοκαλιού ακριδίνης/αιθιδίου βρωμιδίου (Acridine Orange/Ethidium Bromide (AO/EB)).

3.3.1. *In vitro*

Στα *in vitro* πειράματα πραγματοποιήθηκε μελέτη της αντικαρκινικής δράσης σε καρκινικά κύτταρα του μαστού MCF-7 και σε MDA-MB-231. Επίσης, πραγματοποιήθηκαν μελέτες της τοξικότητας σε υγιή κύτταρα MRC-5, της *in vitro* γενετοξικότητας με την

μέθοδο των μικροπυρηνίσκων, του μηχανισμού δράσης του PenAcAg έναντι των MCF-7(HD) κυττάρων μέσω ανάλυσης της μορφολογίας τους και με τη μέθοδο χρώσης πορτοκαλιού ακριδίνης/αιθιδίου βρωμιδίου (AO/EB). Τα πειράματα αυτά υλοποιήθηκαν στο εργαστήριο της «Βιοανόργανης Χημείας» του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων από την Δρ. Χριστίνα Μπαντή.

3.3.1.1. Μελέτη της αντικαρκινικής δράσης στα θετικά σε ορμόνες καρκινικά κύτταρα του μαστού MCF-7, στα αρνητικά σε ορμόνες καρκινικά κύτταρα του μαστού (MDA-MB-231) και μελέτη της τοξικότητας σε υγιείς ινοβλάστες πνεύμονα ανθρώπινου εμβρύου (MRC-5)

Το σύμπλοκο PenAcAg διαλύθηκε σε DMSO σε συγκέντρωση 10^{-2} M και στη συνέχεια αραιώθηκε με θρεπτικό Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) στις επιθυμητές συγκεντρώσεις (4-20 μ M). Έπειτα κάθε βοθρίο από τα 96 που περιέχονται σε ένα τρυβλίο πρέπει να περιλαμβάνει 6000 κύτταρα για τα MCF-7, 8000 κύτταρα για τα MDA-MB-231 και 2000 για τα MRC-5. Συνεπώς, παραλαμβάνεται ο επιθυμητός όγκος από την κύρια καλλιέργεια κυττάρων, μεταφέρεται στα βοθρία και πραγματοποιείται αραιώση με τελικό όγκο τα 100 μ l. Τα τρυβλία στην συνέχεια παραμένουν για 24 ώρες σε θερμοκρασία 37°C και 5% CO₂ σε κλίβανο για να αναπτυχθούν τα κύτταρα και μετά προστίθεται ποσότητα συμπλόκου αραιωμένη σε θρεπτικό ώστε να επιτευχθούν οι ανάλογες συγκεντρώσεις και 100 μ l θρεπτικού, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως control. Τα κύτταρα επωάζονται πάλι για 48 ώρες και έπειτα αναρροφάται το θρεπτικό μέσο και πραγματοποιείται με προσοχή προσθήκη 50 μ l κρύου διαλύματος τριχλωρικού οξέος (TCA) 10%. Τα τρυβλία παραμένουν μετέπειτα για 30 λεπτά στους 4°C και πραγματοποιούνται πέντε πλύσεις με απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια παραμένουν σε

θερμοκρασία δωματίου μέχρι να στεγνώσουν για τουλάχιστον 24 ώρες και έπειτα προστίθεται σε κάθε βοθρίο 70μl σουλφοροδαμίνης Β (SRB: Sigma) 0,4 (w/v) διαλυμένη σε διάλυμα 1% οξικού οξέος. Επάζονται για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου , έπειτα απομακρύνεται η SRB και πραγματοποιούνται πλύσεις πέντε φορές με 1% οξικού οξέος. Η χρωστική SRB διαλυτοποιείται με 200μl unbuffered Tris-Base (10mM). Η μέτρηση της απορρόφησης, λοιπόν, έγινε στα 540nm και πραγματοποιήθηκε σε συσκευή ανάγνωσης τρυβλίων με 96 βοθρία. Η έκφραση των αποτελεσμάτων γίνεται με τιμές IC₅₀ , το οποίο είναι η συγκέντρωση του μεταλλοφαρμάκου που απαιτείται για την αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης κατά 50% σε σύγκριση με το control [2,51].

Αξίζει να αναφερθεί ότι η δοκιμασία σουλφοροδαμίνης Β (SRB) χρησιμοποιείται για να προσδιοριστεί η τοξικότητα των φαρμάκων τόσο στα καρκινικά όσο και στα υγιή κύτταρα. Η αρχή μεθόδου της ανάλυσης αυτής στηρίζεται στο γεγονός ότι η χρωστική SRB δεσμεύεται σε πρωτεϊνικά συστατικά των κυττάρων και έχοντας μέγιστο απορρόφησης στα 540nm μπορεί να προσδιοριστεί το ποσοστό των κυττάρων που έχουν επιβιώσει. Το πλεονέκτημα της χρωστικής αυτής είναι ότι διαθέτει υψηλό επίπεδο ευαισθησίας και η χρώση είναι ανεξάρτητη της μεταβολικής δραστηριότητας των κυττάρων [2,51].

3.3.1.2. Μελέτη της in vitro γενετοξικότητας με την μέθοδο των μικροπυρηνίσκων (Micronucleus assay)

Η παρουσία μικροπυρηνίσκων (MN) είναι ένας βιοδείκτης μεταλλαξιογόνου, γονιδιοτοξικής ή τερατογόνου επίδρασης. Παρουσία εξωγενών παραγόντων (όπως

χημικοί παράγοντες), σχηματίζονται μικροπυρηνίσκοι κατά τη μετάβαση μετάφασης-ανάφασης της μίτωσης. Οι μικροπυρηνίσκοι εμφανίζονται στο κυτταρόπλασμα ως μικρά θραύσματα DNA που συνδέονται με την κυτταρική μεμβράνη επειδή δεν μπορούν να ενσωματωθούν στα θυγατρικά κύτταρα. Η μέθοδος των μικροπυρηνίσκων χρησιμοποιείται ευρέως για τον έλεγχο της γενετικής βλάβης σε διάφορους ιστούς και κύτταρα για να αποφευχθεί ο έλεγχος της τοξικότητας των ουσιών στα ζώα [2,51].

Η πειραματική διαδικασία είναι η εξής: Τα κύτταρα MRC-5 (20000 κύτταρα/βοθρίο) μεταφέρθηκαν σε γυάλινες καλυπτρίδες, οι οποίες στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε έξι βοθρία ενός τρυβλίου με έξι θέσεις, με 3 mL μέσου κυτταροκαλλιέργειας και επώαστηκαν για 24 ώρες. Έπειτα προστίθεται το σύμπλοκο στην τιμή IC_{50} για 48 ώρες. Στη συνέχεια, τα καλύμματα πλύθηκαν τρεις φορές με PBS και προστέθηκε 1ml διαλύματος KCl (75 mM) και ακολούθησε επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε έκπλυση τρεις φορές με διάλυμα 1/3 οξικού οξέος/μεθανόλης. Οι καλυπτρίδες πλύθηκαν επίσης με ψυχρή μεθανόλη που περιείχε 1% οξικό οξύ. Στη συνέχεια, ακολούθησε χρώση με πορτοκαλί ακριδίνης (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) και επώαση για 15 λεπτά στους 37°C. Αφού έγινε έκπλυση τρεις φορές με PBS για να απομακρυνθεί η περίσσεια του πορτοκαλιού ακριδίνης, προσδιορίστηκε ο αριθμός των μικροπυρηνίσκων ανά 1000 κύτταρα με μικροσκόπιο φθορισμού [2,51].

3.3.1.3. Μελέτη του μηχανισμού δράσης του PenAcAg έναντι των MCF-7(HD) κυττάρων μέσω ανάλυσης της μορφολογίας τους

Η μορφολογία των κυττάρων MCF-7 παρατηρήθηκε κάτω από ένα αντίστροφο μικροσκόπιο, μετά από επώαση των κυττάρων MCF-7 με PenAcAg, για 48 ώρες [51].

3.3.1.4. Μελέτη του μηχανισμού δράσης του PenAcAg με τη μέθοδο χρώσης πορτοκαλιού ακριδίνης/αιθιδίου βρωμιδίου (Acridine Orange/Ethidium Bromide (AO/EB))

Για την ποσοτικοποίηση ζωντανών, αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων, χρησιμοποιείται η μέθοδος χρώσης πορτοκαλιού ακριδίνης/βρωμιούχου αιθιδίου (AO/EB). Αυτή η μέθοδος ανιχνεύει πυρηνικές αλλαγές και σχηματισμό αποπτωτικών κομματιών που είναι χαρακτηριστικά της απόπτωσης. Το πορτοκαλί ακριδίνης (AO) είναι μια διαπερατή από κύτταρα φθορίζουσα χρωστική και χρωματίζει το πυρηνικό DNA και σε ζωντανά και σε νεκρά κύτταρα, ενώ το βρωμιούχο αιθίδιο (EB) είναι μια φθορίζουσα χρωστική που χρωματίζει μόνο το πυρηνικό DNA σε κύτταρα που έχουν χάσει την ακεραιότητα της μεμβράνης τους.

Τα κύτταρα, λοιπόν, ταξινομούνται σε τέσσερις τύπους, ανάλογα με την εκπομπή φθορισμού και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των χρωματισμένων πυρήνων: (i) τα ζωντανά κύτταρα είναι ομοιόμορφα χρωματισμένα πράσινα, (ii) τα πρώιμα αποπτωτικά κύτταρα χρωματίζονται πρασινοκίτρινα ή εμφανίζονται πρασινοκίτρινα θραύσματα, (iii) τα όψιμα αποπτωτικά κύτταρα είναι χρωματισμένα με πορτοκαλί ή εμφανίζονται πορτοκαλί θραύσματα και (iv) τα νεκρωτικά κύτταρα εμφανίζουν πορτοκαλί έως

κόκκινους πυρήνες φθορισμού χωρίς ένδειξη κατακερματισμού χρωματίνης και τα κύτταρα είναι διογκωμένα σε μεγάλο μέγεθος [51].

Πειραματικά, τα κύτταρα MCF-7 μεταφέρθηκαν σε μια πλάκα 24 βοθρίων (70.000 κύτταρα/βοθρίο) και καλλιεργήθηκαν στους 37°C σε επωαστήρα CO₂ για 24 ώρες. Στη συνέχεια, προστέθηκε στα κύτταρα το σύμπλοκο PenAcAg στην τιμή IC₅₀ και ακολούθησε επώαση για 48 ώρες. Τα κύτταρα χωρίς ουσία που χρησιμοποιήθηκαν ως control και τα επεξεργασμένα με ουσία κύτταρα συλλέχθηκαν μετά από 48 ώρες, πλύθηκαν δύο φορές με PBS και φυγοκεντρήθηκαν. Στη συνέχεια, 25 μL εναιωρήματος κυττάρων σε PBS επώαστηκαν με 50 μgr/mL AO και 50 μgr/mL διάλυμα EB. Έπειτα, τα κύτταρα ακατέυθηκαν απαλά και 10 μL κυττάρων σε εναιώρημα τοποθετήθηκαν σε μια γυάλινη πλάκα και μια καλυπτρίδα τοποθετήθηκε πάνω της. Τυχαία, 300 κύτταρα παρατηρήθηκαν αμέσως σε ένα μικροσκόπιο φθορισμού (ανεστραμμένο μικροσκόπιο φθορισμού Optika) και εξετάστηκαν σε μεγέθυνση x60. Υπολογίστηκε το ποσοστό των κυττάρων που αντανακλούν παθολογικές αλλαγές [51].

3.3.2. *Ex vivo*

3.3.2.1. Μελέτη του DNA με το PenAcAg μέσω απορρόφησης UV

A. Παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος (Buffer)

Σε μια γυάλινη φιάλη μεταφέρονται 2,2 gr κιτρικό νάτριο (15 mM) και 4,38 gr χλωριούχο νάτριο (150 mM) και προστίθενται 500 ml dd H₂O. Με πεχάμετρο της CRISON ελέγχεται και ρυθμίζεται το pH=7, με διάλυμα NaOH 1M. Φυλάσσεται στο ψυγείο.

B. Παρασκευή πρότυπου διαλύματος DNA

Για την Παρασκευή του διαλύματος DNA ζυγίζεται μικρή ποσότητα CT-DNA και μεταφέρεται σε κωνική όπου διαλυτοποιείται με dd H₂O και Buffer. Η αναλογία CT-DNA: ddH₂O: Buffer είναι 1: 1: 19. Στη συνέχεια πραγματοποιείται εξαντλητική ανάδευση για τρεις μέρες σε παγόλουτρο (αποφυγή μετουσίωσης). Το CT-DNA φυλάσσεται πάντα στο ψυγείο. Για να ελέγξουμε την καθαρότητα του πρότυπου διαλύματος CT-DNA λαμβάνεται το φάσμα απορρόφησης του διαλύματος CT-DNA από τα 200-450 nm. Θέλουμε η αναλογία του ηλικίου απορροφήσεων στα 260 (απορροφά το DNA) και 280nm (απορροφούν οι πρωτεΐνες) να είναι $\frac{A_{260}}{A_{280}} \geq 1,8$ ώστε το διάλυμα να μην περιέχει προσμίξεις λόγω πρωτεϊνών ή φαινολών. Επίσης, η συγκέντρωση του CT-DNA βρίσκεται από την εξίσωση του Beer: $A = \epsilon \cdot b \cdot C$, για A₂₆₀ αφού λ_{max}= 260 nm , $\epsilon = 6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ και b=1cm.

C. Φασματοφωτομετρία απορρόφησης UV με CT-DNA και PenAcAg

- Τίτλοδοτηση CT-DNA με το σύμπλοκο PenAcAg

Σε αυτήν τη μέθοδο εξετάζεται ο τρόπος με τον οποίον μεταβάλλεται το

λ_{max(απορ.)}= 258 nm του CT-DNA κατά την αυξανόμενη προσθήκη συμπλόκου.

Οποιαδήποτε μεταβολή στο μέγιστο μήκος κύματος απορρόφησης του CT-DNA υποδηλώνει κάποιο είδος αλληλεπίδρασης. Συγκεκριμένα:

- Μείωση της απορρόφησης, δηλαδή υποχρωμία, υποδηλώνει παρεμβολή.
- Αύξηση της απορρόφησης, δηλαδή υπερχρωμία, συνεπάγεται παρεμβολή στην αύλακα, ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση ή ρήξη του DNA.
- Μετατόπιση του λ_{\max} προς μεγαλύτερα μήκη κύματος, δηλαδή βαθυχρωμία, σημαίνει σταθεροποίηση της ελικοειδούς δομής του DNA.
- Μετατόπιση του λ_{\max} προς μικρότερα μήκη κύματος, δηλαδή υψιχρωμία, υποδηλώνει αποσταθεροποίηση της ελικοειδούς δομής του DNA [37].

Στο πείραμα αυτό η συγκέντρωση του CT-DNA παραμένει σταθερή και ίση με 10^{-4}M , ενώ μεταβάλλεται η συγκέντρωση του συμπλόκου. Αρχικά παρασκευάζεται πρότυπο διάλυμα συμπλόκου με συγκέντρωση 10^{-2}M . Στη συνέχεια, πραγματοποιείται η μέτρηση του τυφλού με buffer και μετριέται η απορρόφηση του CT-DNA απουσία συμπλόκου. Έπειτα παρασκευάζονται μείγματα διαλυμάτων με CT-DNA και σύμπλοκο σε αναλογίες

$$r = \frac{[PenAg]}{[CT-DNA]} = 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10.$$

Η λήψη όλων των μετρήσεων και

των φασμάτων UV (από τα 200-450 nm) γίνεται με το φασματοφωτόμετρο UV/Vis σειράς PC UV-1600 της VWR και μελετώνται τα αποτελέσματα.

- Τιτλοδότηση συμπλόκου PenAcAg με CT-DNA

Με αυτήν την τεχνική μπορούμε να λάβουμε πληροφορίες για την ισχύ της δέσμησης του συμπλόκου με το DNA, μέσω της εύρεσης της σταθερά

σύνδεσης συμπλόκου-DNA (K_b). Στην τιτλοδότηση αυτή, λοιπόν, διατηρείται σταθερή η συγκέντρωση του συμπλόκου και ισούται με $4 \cdot 10^{-6}$ M ενώ μεταβάλλεται η συγκέντρωση του CT-DNA. Ακολουθείται η ίδια διαδικασία με τη διαφορά ότι οι αναλογίες είναι $r = \frac{[PenAcAg]}{[CT-DNA]} = 10, 5, 3.34, 2.5, 2$ και επίσης λαμβάνεται και μία μέτρηση με απουσία CT-DNA, με συγκέντρωση συμπλόκου $4 \cdot 10^{-6}$ M.

3.3.2.2. Μελέτη του DNA με το PenAcAg μέσω φθορισμού

Η τεχνική αυτή βασίζεται στην ένωση αιθίδιο βρωμίδιο (EB ethidium bromide, 3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridinium bromide), η οποία είναι μια φαινανθριδίνη με φθορίζουσες ιδιότητες. Το EB συνδέεται με το DNA μέσω παρεμβολής μεταξύ δύο γειτονικών βάσεων της έλικας, λόγω του επίπεδου δακτυλίου της φαινανθριδίνης. Εάν με την προσθήκη μίας ένωσης παρατηρείται μείωση του φθορισμού του συμπλόκου EB-DNA στο $\lambda_{\max(\text{εκπομπ.})} = 588$ nm, αυτό συνεπάγεται ότι η ένωση αντικαθιστά το EB, παίρνοντας την θέση του. Επομένως, η αλληλεπίδραση με το DNA είναι είτε παρεμβολή, είτε δέσμευση στην αύλακα. Σημαντικό είναι η ένωση να μην φθορίζει στο $\lambda_{\max(\text{εκπομπ.})}$ του EB-DNA, διαφορετικά θα έχουμε σφάλμα στις μετρήσεις και δεν θα μπορεί αυτή η τεχνική να μας δώσει ικανοποιητικά αποτελέσματα.

Η παρασκευή του πρότυπου διαλύματος CT-DNA και του buffer είναι η ίδια με παραπάνω. Παρασκευάζεται επίσης πρότυπο διάλυμα συμπλόκου με συγκέντρωση 10^{-2} M. Στη συνέχεια παρασκευάζονται 7 διαφορετικά διαλύματα τα οποία περιέχουν σταθερή συγκέντρωση αιθιδίου βρωμίδιου 2,33 μ M και σταθερή συγκέντρωση CT-DNA

26 μM . Οι συγκεντρώσεις του συμπλόκου είναι αυτές που μεταβάλλονται, οι οποίες είναι 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 μM . Για την λήψη των φασμάτων φθορισμού των 7 αυτών διαφορετικών μειγμάτων γίνεται διέγερση στα 527 nm, διότι είναι το λ_{max} (απορόφησης) του αιθιδίου βρωμιδίου και λαμβάνεται το φάσμα εκπομπής (από τα 550-750nm) με λ_{max} (εκπομπής)= 588nm. Οι μετρήσεις πραγματοποιούνται με φασματοφωτόμετρο φθορισμού (FP-8200) της JASCO και μελετώνται τα φάσματα. Η ίδια ακριβώς διαδικασία πραγματοποιήθηκε και με διάλυμα πενικιλίνης G.

3.3.2.3. Μελέτη του DNA με το PenAcAg μέσω ιζωδομετρίας

Η ιζωδομετρία αποτελεί μία από τις πιο αξιόπιστες μεθόδους για την εύρεση του είδους αλληλεπίδρασης ενός συμπλόκου-φαρμάκου με το DNA. Το σχετικό ιζώδες του DNA είναι ανάλογο του σχετικού μήκους του, επόμενος με συνεχή προσθήκη συμπλόκου παρατηρείται το είδος της μεταβολής του ιζώδους του DNA και κατά συνέπεια το είδος της αλληλεπίδρασης. Συγκεκριμένα:

- Αύξηση του ιζώδους του DNA σημαίνει ότι η έλικα του DNA επιμηκύνεται, επομένως το είδος της αλληλεπίδρασης είναι παρεμβολή.
- Μείωση του ιζώδους του DNA συνεπάγεται μείωση του μήκους της έλικας του, επομένως η ένωση προκαλεί ρήξη του DNA.
- Λιγότερο έντονη αύξηση ή μείωση του ιζώδους, συνεπάγεται κάμψη ή στρέψη στην έλικα του DNA, συνεπώς το σύμπλοκο δεσμεύεται στις αύλακες του DNA.

- Καμία μεταβολή στο ιζώδες υποδηλώνει καμία μεταβολή στο μήκος του DNA, οπότε η ένωση αλληλεπιδρά ηλεκτροστατικά [35].

Η παρασκευή του πρότυπου διαλύματος CT-DNA και του buffer είναι επίσης ίδια με την υποενότητα 3.3.1.1. Παρασκευάζεται πρότυπο διάλυμα συμπλόκου συγκέντρωσης 10^{-3} M. Αρχικά πραγματοποιείται μέτρηση του ιζώδους του CT-DNA, απουσία συμπλόκου. Στη συνέχεια προστίθεται αυξανόμενη ποσότητα συμπλόκου με αναλογία $r = \frac{[PenAcAg]}{[CT-DNA]}$ μέχρι τη μέγιστη αναλογία $r=0.37$. Συνολικά, λαμβάνονται 18 αναλογίες, συμπεριλαμβανομένου και του CT-DNA απουσία συμπλόκου και κάθε αναλογία μετριέται 3 φορές. Η ίδια ακριβώς διαδικασία πραγματοποιείται με την διαφορά ότι τα ml του CT-DNA αντικαθίστανται με buffer. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιούνται με την χρήση γυάλινου τριχοειδούς ιζωδομέτρου τύπου Ubbelohde και οι χρόνοι ροής των διαλυμάτων καταγράφονται με την χρήση του προγράμματος Debut Video Capture Software. Η ίδια ακριβώς διαδικασία πραγματοποιήθηκε και με διάλυμα πενικιλίνης G.

3.3.2.4. Μελέτη της δράσης του PenAcAg στο ένζυμο λιποξυγενάση

3.3.2.4.1. Προετοιμασία αντιδραστηρίων

A. Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος βορικού οξέος

Σε μια γυάλινη φιάλη μεταφέρονται 6,18 gr βορικού οξέος (0,2M) και προστίθενται 300 ml dd H₂O. Παρασκευάζεται διάλυμα καυστικού νατρίου NaOH 50% w/v το οποίο χρησιμοποιείται για την ρύθμιση του pH του διαλύματος στο 9. Η μέτρηση του pH πραγματοποιείται με την βοήθεια πεχαμέτρου. Μόλις

ρυθμιστεί το pH, προστίθενται ακόμα 200 ml dd H₂O και το ρυθμιστικό διάλυμα φυλάσσεται στο ψυγείο.

B. Παρασκευή διαλύματος υποστρώματος λινολεϊκού οξέος

Με την χρήση ογκομετρικής φιάλης τοποθετούνται 50 ml ddH₂O σε ογκομετρικό κύλινδρο. Έπειτα σε μία κωνική μεταφέρονται 50 μl αιθανόλης και 50 μl λινολεϊκού οξέος τα οποία αναδεύονται ήπια και για αρκετά λεπτά μέχρι ομογενοποίησης. Στη συνέχεια προστίθενται σταδιακά τα 50 ml ddH₂O και με αργή συνεχή ανάδευση. Από το πρότυπο αυτό διάλυμα με συγκέντρωση 3,2 mM λαμβάνονται 5 ml και με προσθήκη 30 ml ρυθμιστικού διαλύματος πραγματοποιείται αραίωση στα 0,46 mM. Κατά την διαδικασία αυτή κάθε διάλυμα και σκεύος απαερώνεται με αέριο αργό, ώστε να αποφευχθεί η οξείδωση του υποστρώματος.

C. Παρασκευή του διαλύματος λιποξυγενάσης

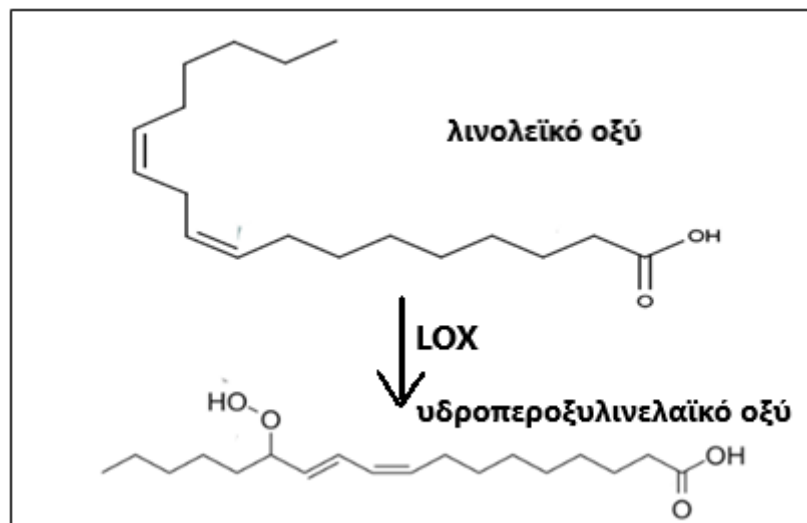
Κάθε 1 mg λιποξυγενάσης που χρησιμοποιήθηκε περιέχει 131000 μονάδες λιποξυγενάσης. Με τον όρο μονάδα ορίζεται η ποσότητα της λιποξυγενάσης, η οποία όταν προστεθεί σε διάλυμα 3ml με το λινολεϊκό οξύ (υπόστρωμα) προκαλεί αύξηση της οπτικής απορρόφησης κατά 0,001/min στα 234nm (εκεί απορροφά το προϊόν της οξείδωσης του λινολεϊκού), σε pH=9 και θερμοκρασία 25°C. Ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης ε ισούται με 25000M⁻¹ cm⁻¹.

Για την παρασκευή του διαλύματος του ενζύμου της λιποξυγενάσης ανά 1 ml περιέχονται 10000 μονάδες λιποξυγενάσης. Συνεπώς, ζυγίζουμε σε αναλυτικό ζυγό μικρή ποσότητα ενζύμου σε erendorff και με αργή σταδιακή ανάδευση προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος σε κωνική φιάλη. Η

ανάδευση γίνεται για 4 ώρες σε παγόλουτρο για να αποφευχθεί η μετουσίωσή του. Έπειτα ανά 1ml διαλύματος ενζύμου μεταφέρεται σε erendorfs τα οποία αποθηκεύονται στον καταψύκτη.

3.3.2.4.2. Μελέτη της αναστολής της δράσης του ενζύμου

Η λιποξυγενάση καταλύει την οξείδωση του λινολεϊκού οξέος σε υδροπεροξυλινελαϊκό οξύ (HrODE). Το λ_{\max} απορρόφησης αυτού του προϊόντος είναι στα 234nm. Συνεπώς, για τον προσδιορισμό της επίδραση του PenAcAg στην καταλυτική δράση του ενζύμου μελετάται κινητικά η αύξηση της απορρόφησης στα 234nm ανά 1 sec για 10 min, η οποία προκύπτει εξαιτίας της παραγωγής του HrODE, με φασματοφωτόμετρο απορρόφησης υπεριώδους ακτινοβολίας. Χρησιμοποιείται κυψελίδα χαλαζία με $b=1\text{cm}$ με τελικό όγκο κάθε μέτρησης 3ml και θερμοκρασία στους 37°C (είναι η φυσιολογική θερμοκρασία στο ανθρώπινο σώμα).



Εικόνα 28: Οξείδωση του λινολεϊκού οξέος σε υδροπεροξυλινελαϊκό οξύ (HrODE)

Για την μελέτη αυτή διατηρείται σταθερή η συγκέντρωση του υποστρώματος λινολειϊκού οξέος στα 0,3mM (2000 μl) και η ποσότητα του ενζύμου στα 100μl, ενώ μεταβάλλονται οι συγκεντρώσεις του συμπλόκου και του ρυθμιστικού διαλύματος. Συνολικά λήφθηκαν 6 διαφορετικές συγκεντρώσεις συμπλόκου (με πρότυπο διάλυμα συμπλόκου 10^{-2} M σε DMSO) , οι οποίες είναι 10, 15, 20, 25, 30, 40 μM. Ως τυφλό (control) λαμβάνεται η μέτρηση, η οποία δεν περιέχει σύμπλοκο (υπόστρωμα: 2000 μl,buffer: 900 μl, ένζυμο: 100 μl). Για όλες τις μετρήσεις το υπόστρωμα, το buffer και το ένζυμο βρίσκονται σε θερμοκρασία 37 °C με την χρήση υδατόλουτρου και το ένζυμο προστίθεται πάντα λίγο πριν την μέτρηση. Επίσης, για κάθε συγκέντρωση συμπεριλαμβανομένου και του τυφλού η μέτρηση λαμβάνεται 3 φορές και στο τέλος προκύπτει ο μέσος όρος των κινητικών μετρήσεων. Από τις μετρήσεις αυτές υπολογίζεται ο βαθμός αναστολής μέσω της σύγκρισής της δράσης που είχε το ένζυμο απουσία συμπλόκου (100% δραστικότητα) και της δράσης του κατά την αυξανόμενη συγκέντρωση του συμπλόκου.

3.3.2.4.3. Μελέτη του είδους της αναστολής της δράσης του ενζύμου και του μηχανισμού του αναστολέα

Για τον προσδιορισμό του είδους της αναστολής, δηλαδή αν η αναστολή που προκαλεί το σύμπλοκο είναι αντιστρεπτή ή μην αντιστρεπτή παρασκευάστηκαν τρία διαφορετικά διαλύματα. Το πρώτο ήταν το control, με προσθήκη 2000 μl υποστρώματος, 900 μl buffer και 100 μl ένζυμο. Αυτό το διάλυμα παρασκευάστηκε και μετρήθηκε τρεις φορές (στο τέλος λήφθηκε ο μέσος όρος). Το δεύτερο διάλυμα ήταν με παρουσία

αναστολέα (PenAcAg: με πρότυπο διάλυμα 10^{-2} M σε DMSO) στην συγκέντρωση IC_{50} όπου η δράση του ενζύμου μειώνεται στο 50%, δηλαδή $C=19,8$ μ M, συγκέντρωση υποστρώματος 2000 μ l, 894 μ l buffer και 100 μ l ένζυμο. Το διάλυμα αυτό παρασκευάστηκε και μετρήθηκε συνολικά 4 φορές, αφού πρωτίστως κάθε ένα από αυτά επώαστηκε σε υδατόλουτρο σε διαφορετικούς χρόνους και συγκεκριμένα για 0, 0,5, 1 και 5 min. Οι ίδιες ακριβώς συγκεντρώσεις και χρόνοι επώασης χρησιμοποιήθηκαν και για μετρήσεις με απουσία αναστολέα με την διαφορά ότι τα μ l του αναστολέα αντικαταστάθηκαν με DMSO. Οι συνθήκες και ο τρόπος που πραγματοποιήθηκε το πείραμα ήταν ίδιος με την παραπάνω πειραματική διαδικασία (3.3.1.4.2.).

Ο προσδιορισμός του μηχανισμού του αναστολέα γίνεται με βάση το μοντέλο Michaelis-Menten, το οποίο περιγράφει τις κινητικές ιδιότητες των ενζύμων. Η εξίσωση Michaelis-Menten είναι: $U = \frac{V_{max}[S]}{[S]+K_M}$, όπου U η ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης, $[S]$ η συγκέντρωση του υποστρώματος, V_{max} η μέγιστη ταχύτητα της αντίδρασης και K_M η σταθερά Michaelis-Menten, η οποία αντιστοιχεί στην συγκέντρωση του υποστρώματος του ενζύμου όταν η ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης ισούται με το μισό της μέγιστης. Από τον μετασχηματισμό της παραπάνω εξίσωσης σε:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]}$$

μπορούν να προσδιοριστούν οι V_{max} και K_M και κατά συνέπεια ο μηχανισμός του αντιστρεπτού αναστολέα (ανταγωνιστικός, μη ανταγωνιστικός, μεικτός).

Πειραματικά, αρχικά, παρασκευάζεται πρότυπο διάλυμα PenAcAg 10^{-2} M σε DMSO. Στη συνέχεια φτιάχνονται διαλύματα τα οποία έχουν σταθερή συγκέντρωση

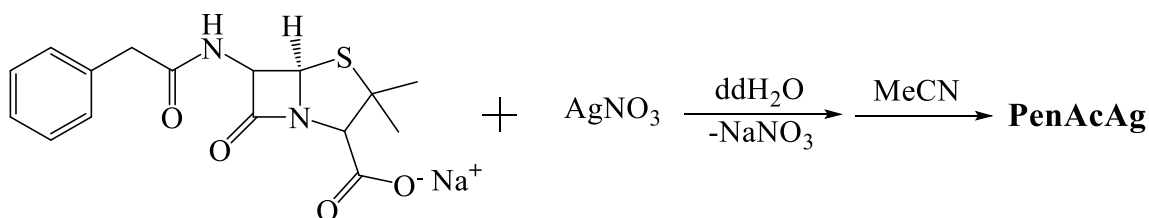
συμπλόκου $C=19,8 \mu\text{M}$ (IC_{50}), σταθερή ποσότητα ενζύμου 100μl και μεταβάλλεται η συγκέντρωση του υποστρώματος. Οι συγκεντρώσεις του υποστρώματος που λήφθηκαν είναι 0.01, 0.0125, 0.025, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3 mM. Ανάλογα με την ποσότητα του υποστρώματος που προστέθηκε για κάθε συγκέντρωση η υπόλοιπη ποσότητα μέχρι τα 3ml συμπληρώθηκε με buffer. Οι συνθήκες και ο τρόπος που πραγματοποιήθηκε το πείραμα ήταν ίδιος με την πειραματική διαδικασία στην υποενότητα 3.3.1.4.2.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. Χημικό μέρος-Χαρακτηρισμός ένωσης

4.1.1. Χημική σύνθεση

Για την σύνθεση του συμπλόκου PenAcAg πραγματοποιήθηκε αντίδραση ισομοριακών ποσοτήτων (1:1) νιτρικού αργύρου (AgNO_3) με το άλας της πενικιλίνης G με νάτριο (Penicillin G sodium) σε διαλύτη δις απεσταγμένο νερό (dd H_2O). Η χημική αντίδραση σύνθεσης φαίνεται παρακάτω.



Εικόνα 27: Αντίδραση για την σύνθεση του συμπλόκου PenAcAg

Έπειτα από την ανακρυστάλλωση της ένωσης με ακετονιτρίλιο και την εξάτμιση του διαλύτη με την διαδικασία που αναφέρθηκε στο πειραματικό κομμάτι, το σύμπλοκο μεταφέρθηκε σε erendorf. Η απόδοση της σύνθεσης είναι 20%. Η ουσία αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου, σε σκοτεινό μέρος (ντουλάπι) και χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση των πειραμάτων.

4.1.2. Σημείο τήξης

Πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός του σημείου τήξεως του PenAcAg υπό κανονική πίεση με εφαρμογή αυξανόμενης θερμότητας. Το σημείο τήξεως είναι μη διορθωμένο. Το σημείο τήξης του συμπλόκου όπως φαίνεται και από τον Πίνακα 5 είναι

διαφορετικό από τον υποκαταστάτη του άλατος της πενικιλίνης και από το αντίστοιχο του νιτρικού αργύρου.

Πίνακας 5: Σημεία τήξης των αντιδρώντων και του συμπλόκου PenAcAg

Ένωση	Σημείο Τήξης
AgNO ₃	212°C
Penicillin G	214-217°C [38]
Penicillin G sodium	208-212°C
PenAcAg	121-125°C

4.1.3. Διαλυτότητα

Σύμφωνα με τον Πίνακα 6 το PenAcAg διαλύεται πλήρως σε MeCN, CH₂Cl₂, CHCl₃ και DMSO, DMF ενώ διαλυτοποιείται μερικώς σε MeOH.

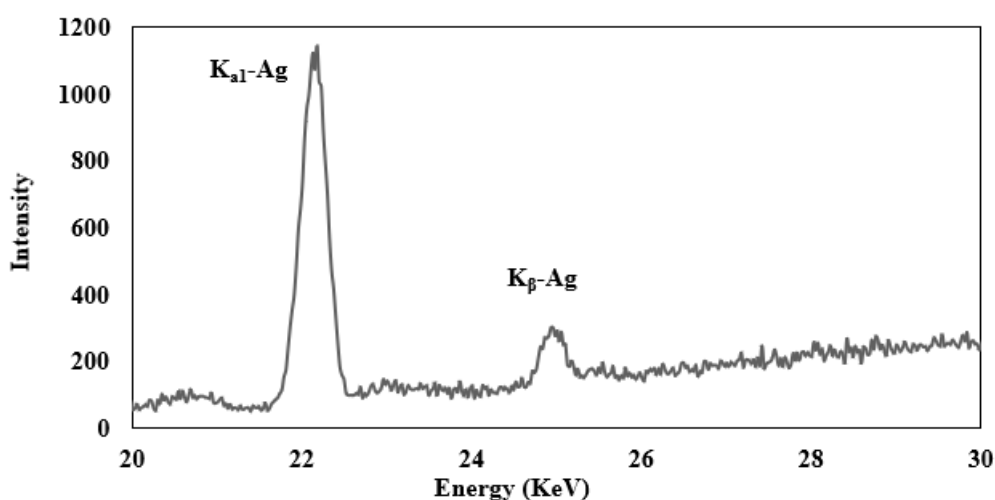
Πίνακας 6: Διαλυτότητα του συμπλόκου PenAcAg

Διαλυτότητα	
<i>n</i> -hexane	x
toluene	x
CH ₂ Cl ₂	✓
CHCl ₃	✓
Acetone	x
MeOH	Μερική διαλυτοποίηση
MeCN	✓
DMSO	✓
DMF	✓
H ₂ O	x

4.1.4. Φάσμα XRF

Στο παρακάτω φάσμα XRF, η χαρακτηριστική ενέργεια του εκπεμπόμενου φωτονίου κατά την αποδιέγερση του ηλεκτρονίου από την στιβάδα L στην κενή από ηλεκτρόνιο στιβάδα K ονομάζεται φασματική γραμμή K-άλφα ($K_{\alpha 1}$) και βρέθηκε να είναι 22,16 eV, ενώ η χαρακτηριστική ενέργεια του εκπεμπόμενου φωτονίου κατά την αποδιέγερση ηλεκτρονίου από τη στιβάδα M στην K, ονομάζεται φασματική γραμμή K-βήτα (K_{β}) και είναι 24, 94 eV (Πίνακας 7).

Το φάσμα XRF κόνεως PenAcAg επιβεβαιώνει την παρουσία Ag, ενώ η περιεκτικότητα σε άργυρο που βρέθηκε προσδιορίστηκε να είναι 19.81% ($\pm 0,27\%$) w/w. Αυτό είναι σύμφωνο με το θεωρητικά υπολογισμένο ποσοστό για τον τύπο $[Ag(Pen)MeCN]_n$ (22,4% w/w). Το υπολογιζόμενο μοριακό βάρος με βάση την ανάλυση από το XRF είναι $545 \times n$ g/mol, που αντιστοιχεί σε εμπειρικό τύπο $[Ag(Pen)MeCN]_n$ (MW=482 $\times n$ g/mol).



Εικόνα 28: Φάσμα XRF του PenAcAg

Πίνακας 7: Εκπεμπόμενες ενέργειες αργύρου

Emission lines	Energy	Intensity
Kα ₁	22,16	1144
Kβ	24,94	299

4.1.5. Κρυοσκοπία



Το μοριακό βάρος προσδιορίστηκε με συσκευή κρυοσκοπίας. Διάλυμα PenAcAg ψύχεται και από την μεταβολή του σημείου πήξεως υπολογίζεται το μοριακό βάρος 912 g/mol. Το μοριακό βάρος αυτό είναι σε συμφωνία με τον μοριακό τύπο [Ag(Pen)MeCN]₂ (θεωρητικό=964 g/mol).

4.1.6. Φάσμα FT-IR-ATR

Παρακάτω παρουσιάζονται τα φάσματα υπέρυθρης φασματοσκοπίας του PenAcAg (Εικόνα 29) και του υποκαταστάτη μετά νατρίου άλατος της πενικιλίνης G (PenNa) με το σύμπλοκο (Εικόνα 30). Σύμφωνα με την Εικόνα 30 και τον Πίνακα 8 στο σύμπλοκο PenAcAg η τάση δόνησης του δεσμού N-H βρίσκεται στα 3284 cm⁻¹, του C-H ο οποίος βρίσκεται σε αρωματικό δακτύλιο στα 3030 cm⁻¹, του C-H σε αλειφατική ομάδα στα 2963 cm⁻¹, της κετονομάδας του δακτυλίου της β-λακτάμης στα 1774 cm⁻¹, του αμιδικού δεσμού N-C στα 1659 cm⁻¹ και η ασύμμετρη τάση δόνησης της καρβοξυλομάδας στα 1577 cm⁻¹, ενώ της συμμετρικής στα 1394 cm⁻¹.

Πίνακας 8 : Χαρακτηριστικές τάσεις δόνησης του PenAcAg

Τάσεις Δόνησης	Κυματάρια (cm ⁻¹) PenNa	Κυματάρια (cm ⁻¹) PenAcAg
N-H	3355	3284
C-H _(αρωμ.)	3030	3030
C-H _(αλειφ.)	2960	2963
C=O _(β-λακταμικού δακτυλίου)	1774	1774
N-C _(αμιδικός)	1696	1659
vas (-COO-)	1618	1577
vs (-COO-)	1416	1394

Για την εύρεση του τρόπου ένταξης του αργύρου στο σύμπλοκο συγκρίνονται τα φάσματα του PenAcAg και του άλατος της πενικιλίνης. Ο τρόπος ένταξης του μετάλλου με την καρβοξυλομάδα εξαρτάται από την διαφορά ασύμμετρης (vas_(-COO-)) με συμμετρικής (vs_(-COO-)) τάσης δόνησης της καρβοξυλομάδας ($\Delta\nu = \text{vas}_{(-\text{COO}^-)} - \text{vs}_{(-\text{COO}^-)}$). Συνεπώς, ο μονοδοντικός συντονισμός της καρβοξυλικής ομάδας οδηγεί σε σημαντικά υψηλότερες τιμές $\Delta\nu$ από εκείνες που παρατηρούνται για τις ιοντικές ενώσεις του ligand . Το ίδιο ισχύει και για ασύμμετρο διδοντικό συντονισμό. Από την άλλη όταν ο ligand χηλικοποιείται, η $\Delta\nu$ είναι σημαντικά μικρότερη από αυτή που παρατηρείται για τις ιοντικές ενώσεις του. Τέλος, όταν η καρβοξυλική ομάδα γεφυρώνει μεταλλικά ιόντα, η τιμή $\Delta\nu$ είναι σχεδόν ίδια με αυτή για την ιοντική ένωση όπως φαίνεται συνολικά και στον Πίνακα 9.

Πίνακας 9: Τρόπος ένταξης των μετάλλων σύμφωνα με την $\Delta\nu = \text{vas}_{(-\text{COO}^-)} - \text{vs}_{(-\text{COO}^-)}$

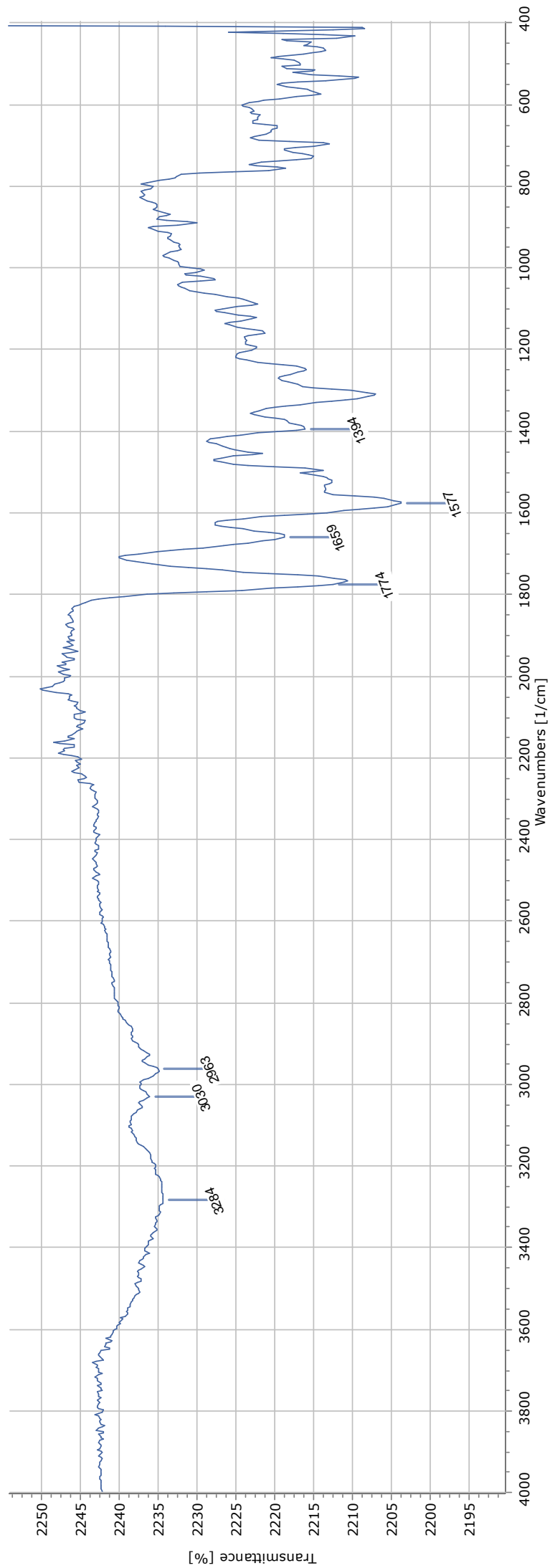
$\Delta\nu$ συμπλόκου >.. $\Delta\nu$ άλατος	Μονοδοντική ή ασύμμετρη διδοντική ένταξη
$\Delta\nu$ συμπλόκου <.. $\Delta\nu$ άλατος	Χηλική ένταξη
$\Delta\nu$ συμπλόκου \approx $\Delta\nu$ άλατος	Γεφυρωτική ένταξη

Όσον αφορά το σύμπλοκο PenAcAg η τιμή $\Delta\nu$ του είναι κοντα στην αντίστοιχη τιμή του άλατος με νατριο της πενικιλίνης όπως φαίνεται και στον Πίνακα 10 . Επομένως, η καρβοξυλική ομάδα γεφυρώνει μεταλλικά ιόντα Ag(I).

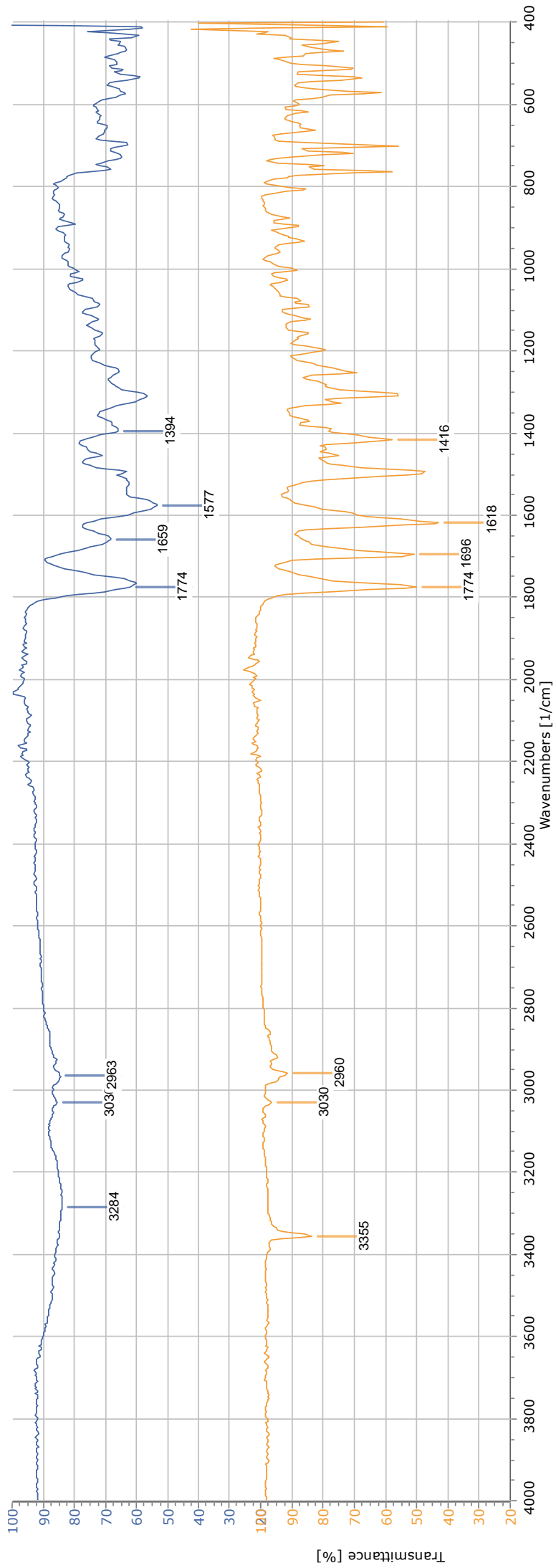
Πίνακας 10: Διαφορά της $\Delta\nu$ για την πενικιλίνη G και το PenAcAg

Τάσεις Δόνησης	Κυματάριθμοι (cm^{-1})	
	PenNa	PenAcAg
vas (-COO-)	1618	1577
vs (-COO-)	1416	1394
$\Delta\nu$	202	183

Τέλος, η ζώνη δόνησης στα 3284 cm^{-1} στο φάσμα IR του PenAcAg αντιστοιχεί στον δεσμό N-H, ο οποίος παρατηρήθηκε στα 3355 cm^{-1} στην περίπτωση του άλατος της πενικιλίνης. Η δόνηση γίνεται ευρεία στο φάσμα του συμπλόκου, επομένως έχουμε ή αποπρωτονίωση ή ισχυρή αλληλεπίδραση δεσμού υδρογόνου με τον διαλύτη (νερό). Η ζώνη δόνησης της κετονομάδας (C=O) της β-λακτάμης στα 1774 cm^{-1} παραμένει ίδια και στο PenAcAg, επομένως δεν υπάρχει κάποια αλληλεπίδραση.



Εικόνα 29: Φάσμα IR του συμπλόκου ΡεπΑΑg

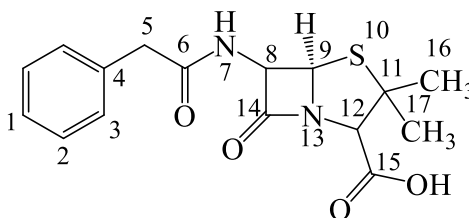


Εικόνα 30: Τα φάσματα ATR-FT-IR του συμπλόκου PenAcAg (μπλε) σε σύγκριση με το άλας νατρίου της πενικιλίνης G

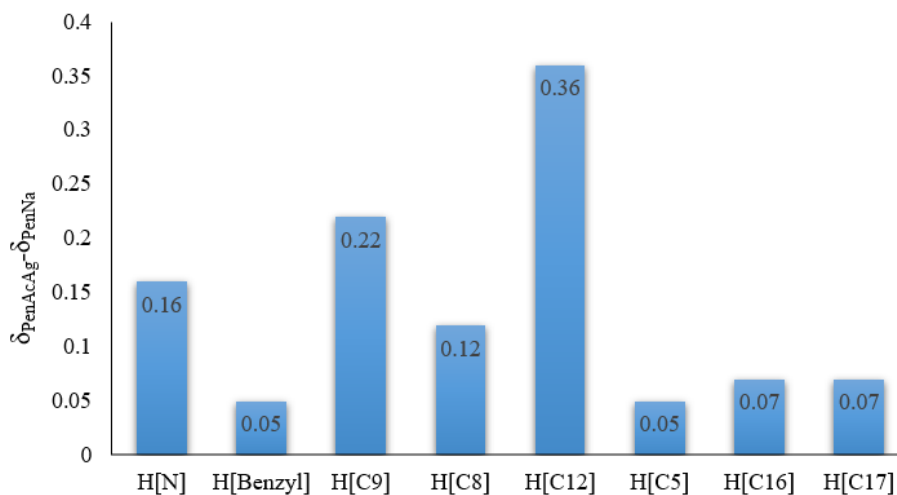
4.1.7. Φάσμα $^1\text{H-NMR}$

Τα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ των PenNa και PenAcAg σε διαλύτη $\text{DMSO-}d^6$ παρουσιάζονται στην Εικόνα 34. Το σήμα συντονισμού στα 8,65 ppm στο φάσμα του PenNa αποδίδεται στο αμιδικό πρωτόνιο $\text{H}[\text{NH-C}(6)=\text{O}]$ (Εικόνα 34) [47]. Αυτό το σήμα μετατοπίζεται στα 8,81 ppm στο φάσμα του PenAcAg. Τα σήματα συντονισμού στα 7,29-7,17 ppm στο φάσμα του PenNa αποδίδονται στα αρωματικά πρωτόνια της βενζολικής ομάδας (Εικόνα 31) [48]. Στην περίπτωση του PenAcAg εντοπίζονται στα 7,32-7,22 ppm. Τα σήματα στα 5,26 ppm και 5,28 ppm στο φάσμα του PenNa αποδίδονται στα πρωτόνια $\text{H}[\text{C}(9)]$ και $\text{H}[\text{C}(8)]$, αντίστοιχα [48]. Αυτά τα σήματα μετατοπίζονται σε 5,48 και 5,40 ppm, αντίστοιχα, στο φάσμα του PenAcAg. Το σήμα συντονισμού στα 3,78 ppm αντιστοιχεί στο πρωτόνιο $\text{H}[\text{C}(12)]$ του PenNa ενώ στο PenAcAg εμφανίζεται στα 4,14 ppm. Αυτή η ισχυρή μετατόπιση ($\Delta\delta=0,36$) επιβεβαιώνει τον συντονισμό της καρβοξυλικής ομάδας με το Ag(I) . Το σήμα στα 3,5 ppm αποδίδεται στο πρωτόνιο $\text{H}[\text{C}5]$ και παραμένει αμετάβλητο στο PenAcAg [48]. Τα σήματα συντονισμού στα 1,53 ppm και 1,41 ppm αποδίδονται στα πρωτόνια $\text{H}[\text{C}(16)]$ και $\text{H}[\text{C}(17)]$ [48], αντίστοιχα, ενώ στο φάσμα του PenAcAg εμφανίζονται σε 1,60 ppm και 1,48 ppm, αντίστοιχα. Η διαφορά των μετατοπίσεων στα σήματα των πρωτονίων μεταξύ του PenAcAg και PenNa ($\Delta\delta=\delta_{\text{PenAcAg}}-\delta_{\text{PenNa}}$) σε $\text{DMSO-}d^6$ φαίνονται στην Εικόνα 32. Συμπερασματικά, η ισχυρότερη μετατόπιση στα σήματα συντονισμού πρωτονίων παρατηρείται στο $\text{H}[\text{C}(12)]$ πρωτόνιο, υποδηλώνοντας συντονισμό του PenNa με την καρβοξυλική ομάδα στον Ag(I) , όπως προσδιορίστηκε και από το ATR- FT-IR. Τα υπόλοιπα πρωτόνια που μετατοπίστηκαν έντονα είναι $\text{H}[\text{C}(12)]$, $\text{H}[\text{C}(9)]$ και $\text{H}[\text{C}(8)]$ λόγω αυτού του συντονισμού (Εικόνα 33). Το σήμα συντονισμού στα 2,09 ppm αποδίδεται στο $\text{H}[\text{MeCN}]$ πρωτόνιο, το οποίο είναι επίσης συντονισμένο στο

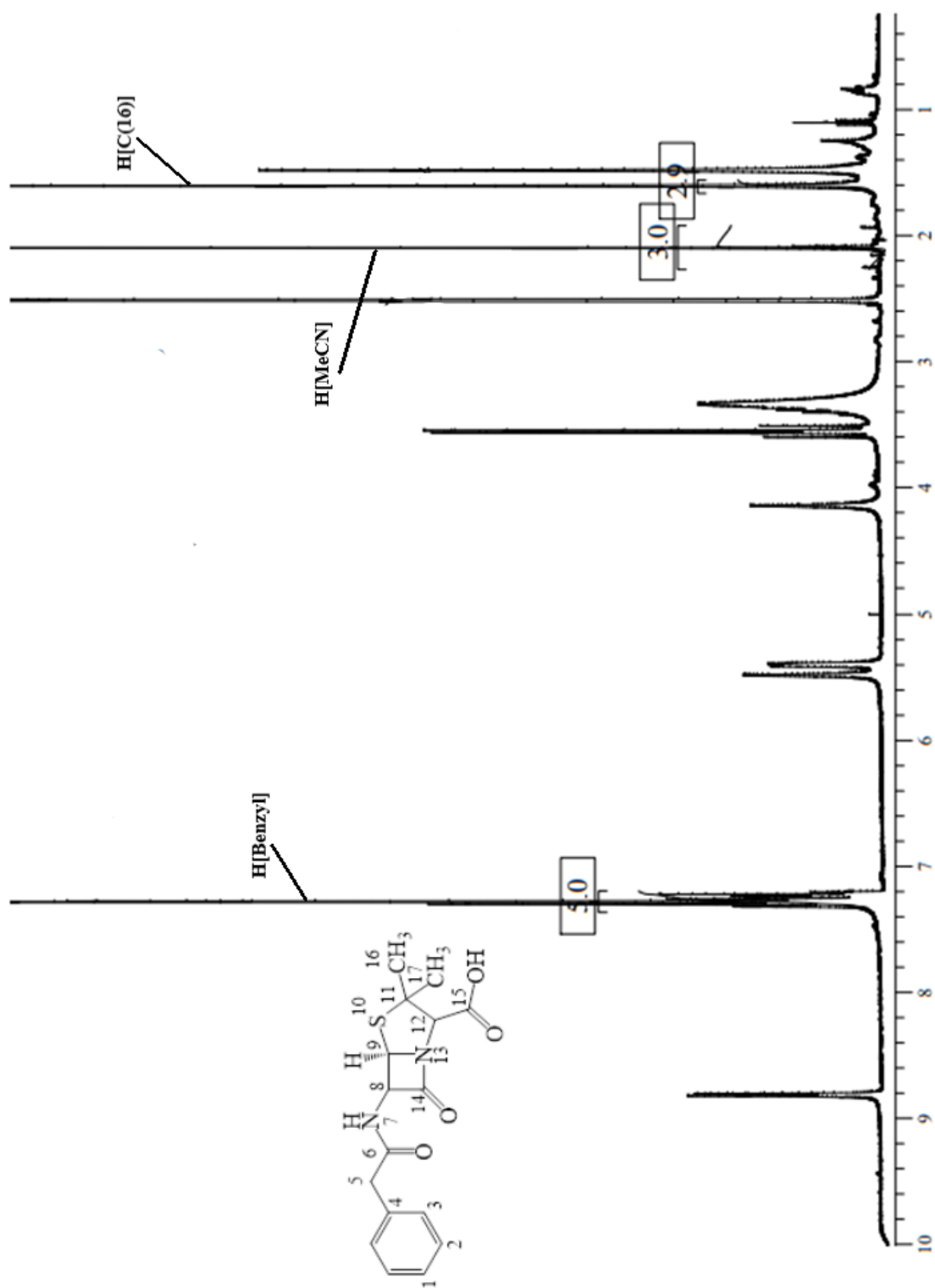
Ag(I). Το αντίστοιχο σήμα ελεύθερου H[MeCN] παρατηρείται στα 2,07 ppm [49]. Η ολοκλήρωση του H[C(16)] (3 πρωτόνια) με αυτά του H[MeCN] (3 πρωτόνια) επιβεβαιώνει τη μοριακή αναλογία 1:1 Ag:PenH στο PenAcAg (Εικόνα 33).



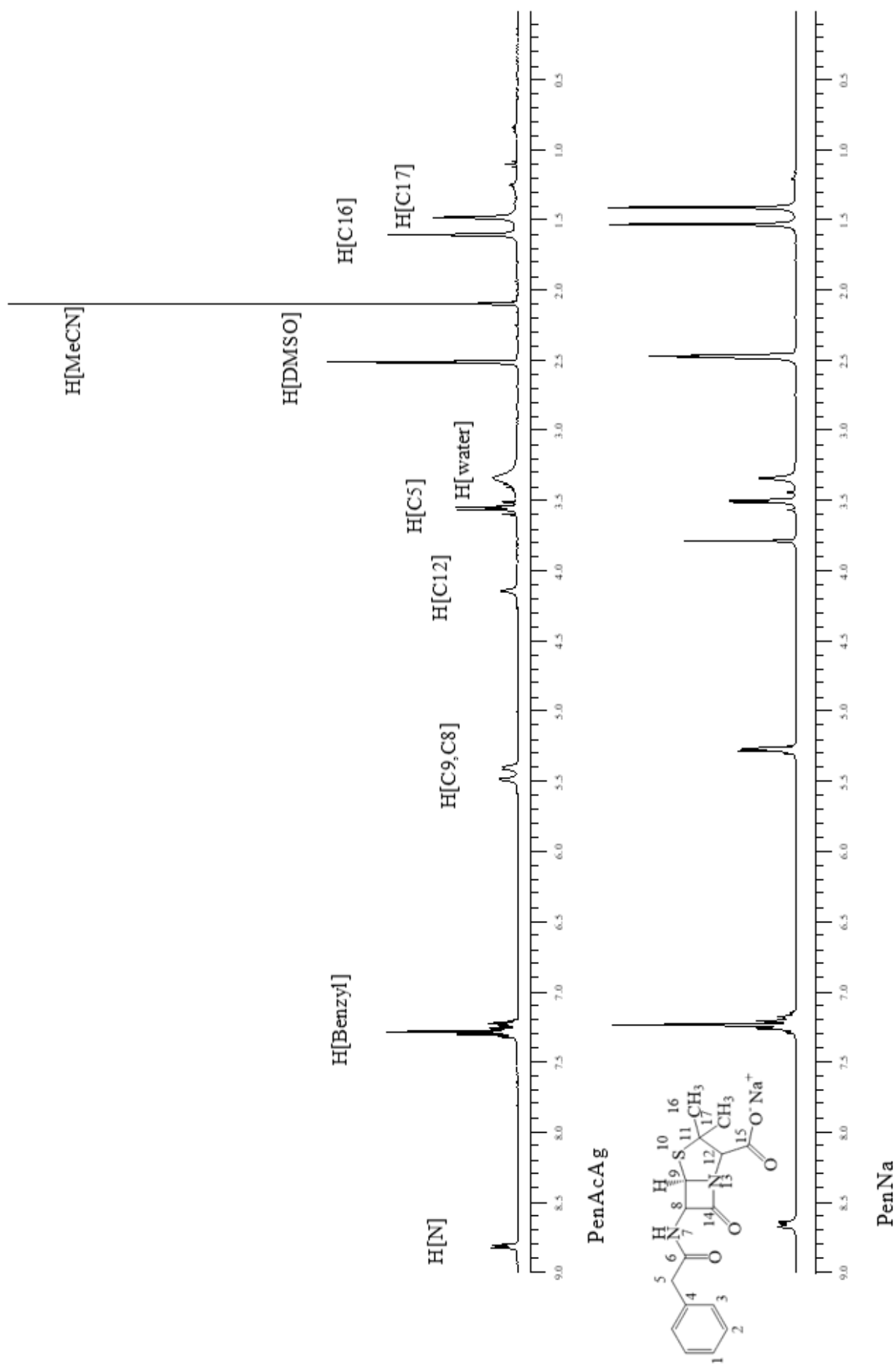
Εικόνα 31: Συντακτικός τύπος της πενικιλίνης G



Εικόνα 32: Διαφορά των μετατοπίσεων στα σήματα των πρωτονίων μεταξύ του PenAcAg και PenNa



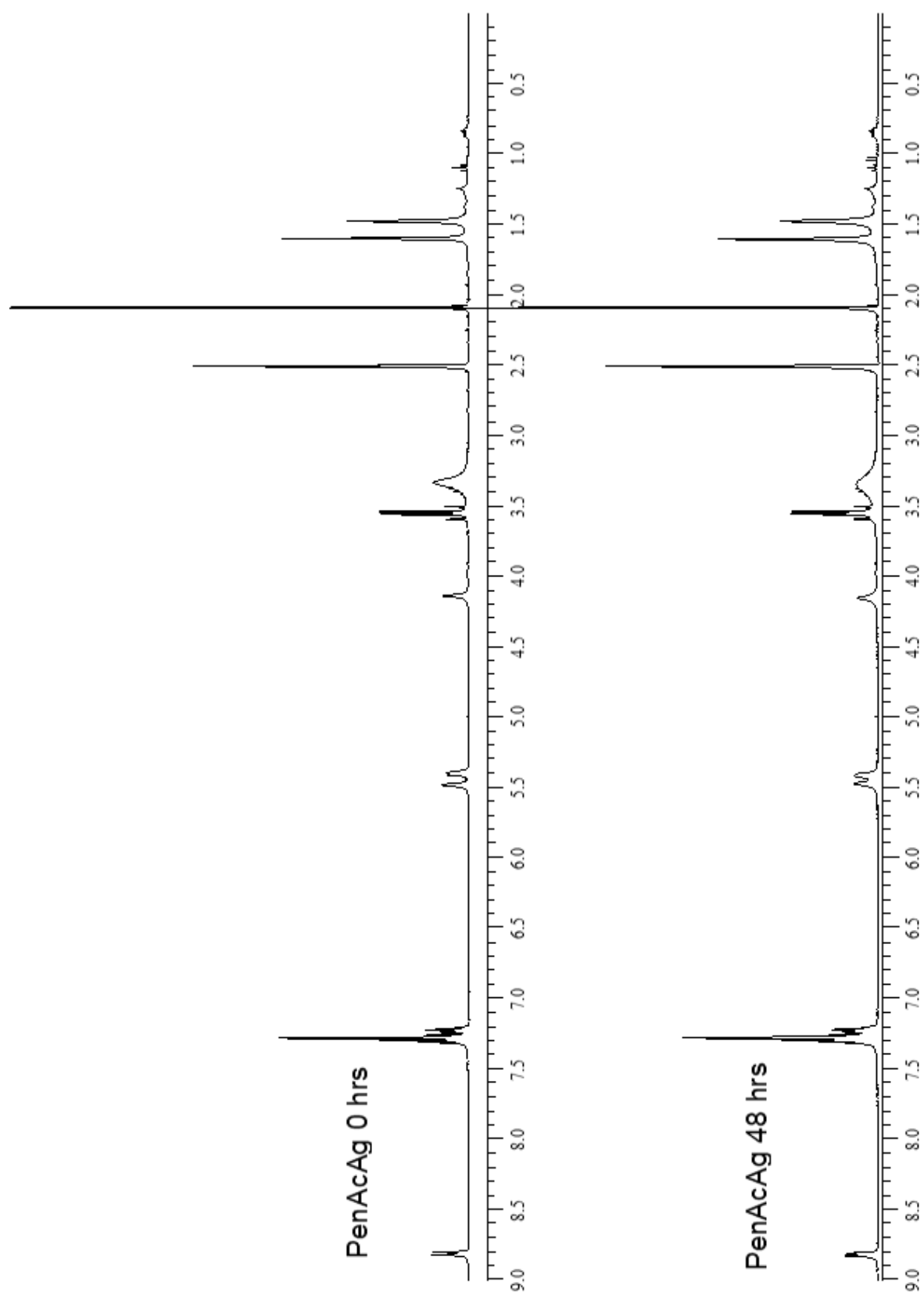
Εικόνα 33: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του PenAcAg σε $\text{DMSO-}d_6$



Εικόνα 34: Φάσματα $^1\text{H-NMR}$ του PenAcAg και του PenNa

4.1.8. Μελέτη της σταθερότητας του RepAcAg με φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$

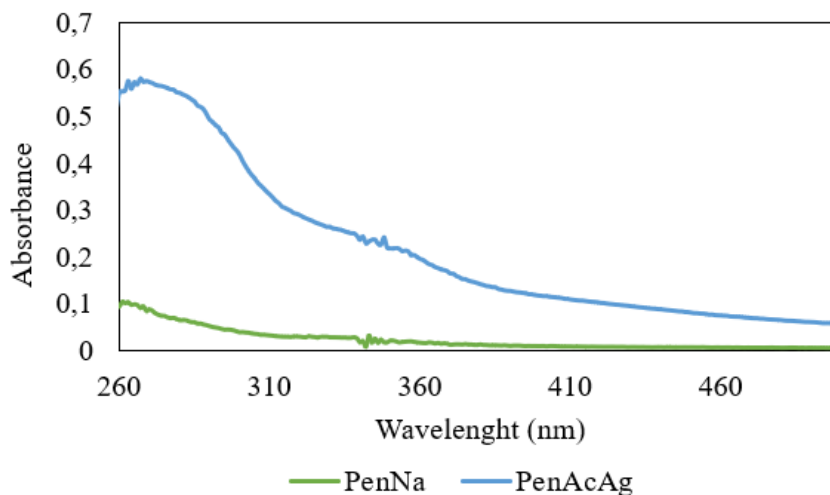
Η σταθερότητα του RepAcAg επιβεβαιώθηκε σε διάλυμα $\text{DMSO-}d^6$, χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$. Δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή μεταξύ του φάσματος του RepAcAg και εκείνου μετά από 48 ώρες (Εικόνα 35). Αυτό υποδηλώνει σταθερότητα του RepAcAg σε διάλυμα DMSO για τουλάχιστον 2 ημέρες. Η περίοδος αυτή επιλέχθηκε επειδή τα βιολογικά πειράματα απαιτούν διάρκεια επώασης των κυτταρικών καλλιέργειών με το σύμπλοκο για 48 ώρες.



Εικόνα 35: Φάσματα $^1\text{H-NMR}$ του PenAcAg σε 0 και 48 ώρες

4.1.9. Φάσμα UV-Vis

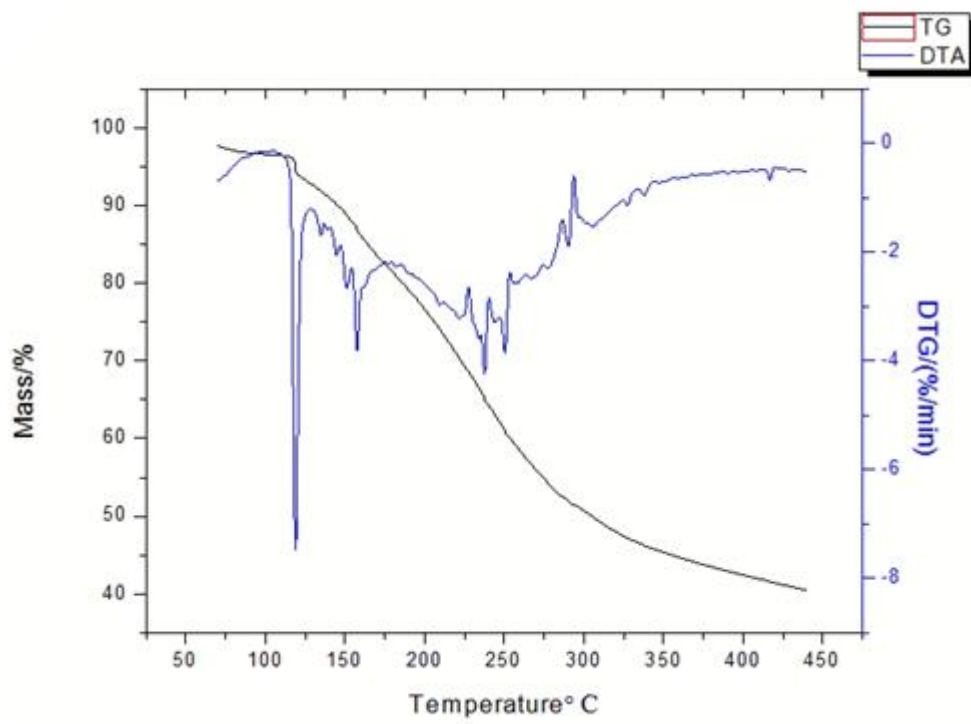
Τα φάσματα UV-Vis των PenAcAg και PenNa σε διάλυμα DMSO εμφανίζουν ζώνες μετάπτωσης στα λ_{\max} 269 nm ($\epsilon = 5795 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) και 262 nm ($\epsilon = 1310 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$), αντίστοιχα, οι οποίες αποδίδονται σε $\pi^* \leftarrow \pi$ intraligand μεταπτώσεις.



Εικόνα 36: Φάσματα UV-Vis PenAcAg (10^{-4} M) και PenNa (10^{-4} M) σε διάλυμα DMSO

4.1.10. Φάσμα TG/DTA

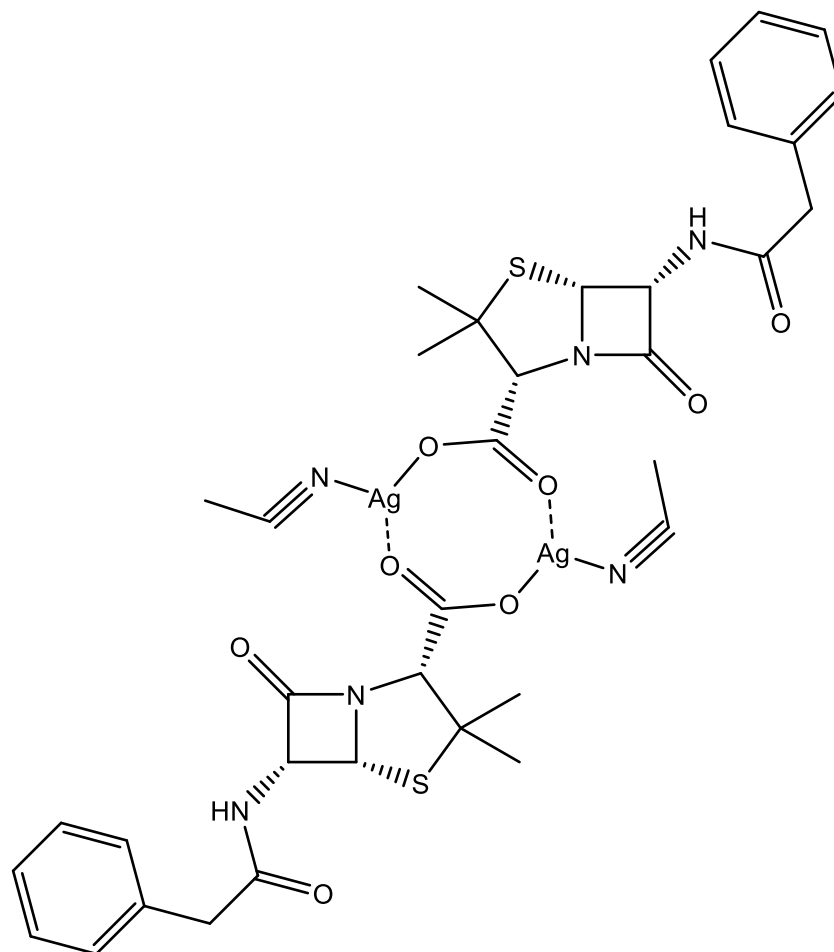
Το φάσμα TG/DTA (Εικόνα 37) δείχνει ότι το PenAcAg αποσυντίθεται σε δύο στάδια: το πρώτο παρατηρείται στους 70-140°C με απώλεια μάζας 6,7%, το οποίο αντιστοιχεί στην έκλυση ενός ακετονιτριλίου (θεωρητικά υπολογισμένο ποσοστό: 8,5%) και το δεύτερο εμφανίζεται στους 140-150°C με 57% απώλεια μάζας, που αντιστοιχεί στην έκλυση μιας PenH (θεωρητικά υπολογισμένο ποσοστό: 69%)



Εικόνα 37: Φάσμα TG/DTA του PenAcAg

4.1.11. Προτεινόμενη Δομή

Λαμβάνοντας υπόψιν όλες τις τεχνικές χαρακτηρισμού η προτεινόμενη δομή του μεταλλοαντιβιοτικού PenAcAg είναι η ακόλουθη:



Εικόνα 38: Προτεινόμενη δομή του PenAcAg

4.2. Βιολογική μελέτη

4.2.1. *In vitro* αποτελέσματα

4.2.1.1. Μελέτη της αντικαρκινικής δράσης στα θετικά σε ορμόνες καρκινικά κύτταρα του μαστού MCF-7, στα αρνητικά σε ορμόνες καρκινικά κύτταρα του μαστού MDA-MB-231

Η *in vitro* αντιπολλαπλασιαστική δράση του PenAcAg δοκιμάστηκε έναντι δύο κυτταρικών σειρών ανθρώπινου αδενοκαρκινώματος μαστού, MCF-7 (εξαρτώμενα από ορμόνες (HD)) και MDA-MB-231 (ανεξάρτητα από ορμόνες (HI)) μέσω της ανάλυσης με σουλφοροδαμίνη Β (SRB), μετά την επώασή τους για 48 ώρες. Οι τιμές IC_{50} του PenAcAg έναντι των MCF-7(HD) και MDA-MB-231(HI) είναι $8,1 \pm 0,2 \mu\text{M}$ και $8,9 \pm 0,2 \mu\text{M}$, αντίστοιχα. Το αντιβιοτικό PenNa δεν εμφάνισε κάποια δράση στις δύο κυτταρικές σειρές, στις συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν (έως $40 \mu\text{M}$). Επομένως η σύζευξη πενικιλίνης με Ag(I) ενισχύει την αντιπολλαπλασιαστική δράση. Η τιμές IC_{50} της σισπλατίνης για τα MCF-7(HD) και MDA-MB-231(HI) είναι $6,8 \pm 0,3 \mu\text{M}$ και $26,7 \pm 1,1 \mu\text{M}$, αντίστοιχα. Συνεπώς, το PenAcAg εμφανίζει 3 φορές ισχυρότερη δραστηριότητα από τη σισπλατίνη έναντι των κακοήθων κυττάρων MDA-MB-231(HI). Επιπλέον, το PenAcAg παρουσιάζει παρόμοια δράση έναντι των κυττάρων MCF-7 (HD) και MDA-MB-(HI), γεγονός που υποδηλώνει ότι οι ορμονικοί υποδοχείς ενδέχεται να μην εμπλέκονται στον μηχανισμό δράσης του.

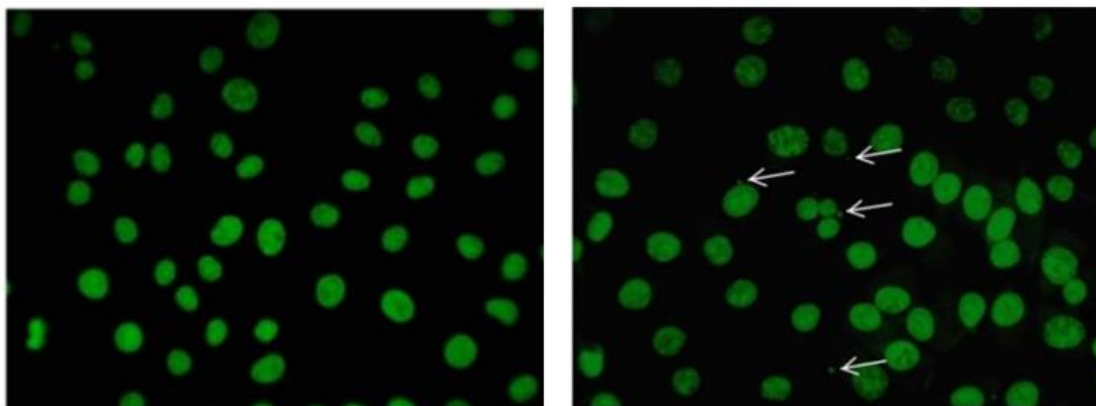
4.2.1.2. Μελέτη της τοξικότητας σε υγιείς ινοβλάστες πνεύμονα ανθρώπινου εμβρύου (MRC-5)

Η τοξικότητα του PenAcAg εξετάστηκε έναντι των φυσιολογικών ανθρώπινων εμβρυϊκών ινοβλαστικών κυττάρων του πνεύμονα (MRC-5). Η τιμή IC_{50} του PenAcAg έναντι των κυττάρων MRC-5 είναι $7,9 \pm 0,2$ μ M, ενώ η αντίστοιχη τιμή της σισπλατίνης είναι $1,1 \pm 0,2$ μ M. Ο Δείκτης Θεραπευτικής Ισχύος (Therapeutic Potency Index (TPI)) ορίζεται ως το πηλίκο του IC_{50} ενός παράγοντα έναντι μη καρκινικών κυττάρων προς το IC_{50} του έναντι καρκινικών κυττάρων. Για το PenAcAg οι τιμές TPI είναι 0,98, έναντι MCF-7 (HD) και 0,89, έναντι MDA-MB-231(HI) κυττάρων. Λαμβάνοντας υπόψιν ότι οι αντίστοιχες τιμές TPI της σισπλατίνης έναντι των MCF-7 (HD) και MDA-MB-231(HI) είναι 0,20 και 0,04, το PenAcAg είναι σημαντικά πιο αποτελεσματικό από τη σισπλατίνη έναντι των καρκινικών κυττάρων από τα φυσιολογικά κύτταρα. Επιπλέον, ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration (FDA)) ορίζει έναν παράγοντα μη τοξικό όταν εμφανίζει τιμή MTC/MEC μικρότερη από 2 (MTC= ελάχιστη τοξική συγκέντρωση και MEC= ελάχιστη αποτελεσματική συγκέντρωση)[48]. Έτσι, το PenAcAg θεωρείται ως τοξικός παράγοντας όπως και η σισπλατίνη, η οποία παρόλα αυτά αποτελεί ένα αντικαρκινικό φάρμακο με κλινική χρήση.

4.2.1.3. Μελέτη της in vitro γενετοξικότητας με την μέθοδο των μικροπυρηνίσκων (Micronucleus assay)

Η in vitro γενετική βλάβη που προκαλείται από το PenAcAg προς τα κύτταρα MRC-5, μελετήθηκε με την μέθοδο των μικροπυρηνίσκων (Micronucleus (MN)). Οι MN

σχηματίζονται κατά τη μετάβαση της αναφάσης-μετάφασης της μίτωσης ενός φυσιολογικού κυττάρου, υπό την επίδραση ξενοβιοτικών παραγόντων (όπως χημικών)[50]. Τα κύτταρα MRC-5 επώαστηκαν με το σύμπλοκο PenAcAg στην τιμή IC₅₀. Η συχνότητα MN των μη επεξεργασμένων κυττάρων είναι 1,0±0,3%. Όταν τα κύτταρα MRC-5 επεξεργάστηκαν με PenAcAg, η συχνότητα MN βρέθηκε 2,0±0,4 %. Συμπερασματικά, η γονοτοξικότητα που προκαλείται από το PenAcAg είναι παρόμοια με εκείνη της σισπλατίνης (συχνότητα MN 1,6%) [50].

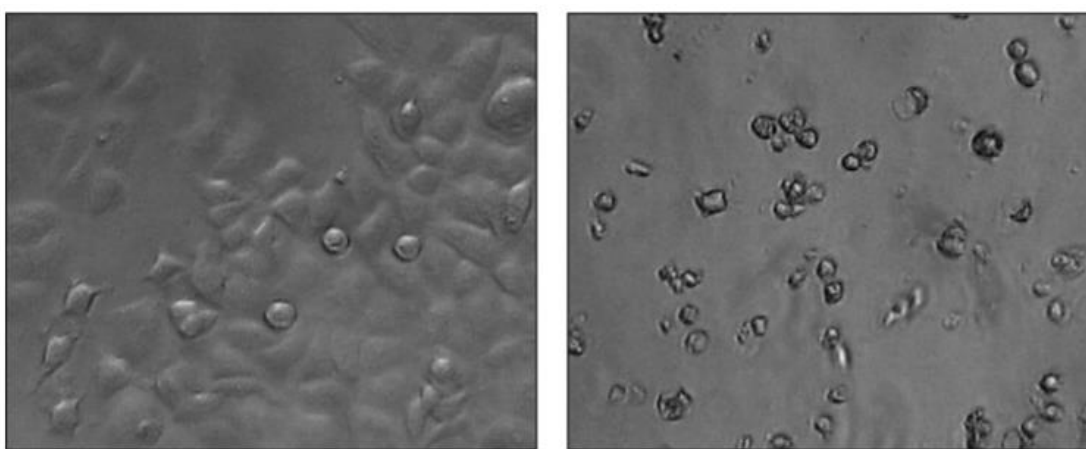


Εικόνα 39: Φωτογραφίες από μη επεξεργασμένα κύτταρα MRC-5 (αριστερά) και έπειτα από επεξεργασία με PenAcAg για 48 ώρες (δεξιά)

4.2.1.4. Μελέτη του μηχανισμού δράσης του PenAcAg έναντι των MCF-7(HD) κυττάρων μέσω ανάλυσης της μορφολογίας τους

Τα κύτταρα MCF-7 υποβάλλονται σε επεξεργασία με PenAcAg στην τιμή IC₅₀ για 48 ώρες και παρατηρούνται σε ανεστραμμένο μικροσκόπιο, με σκοπό να εκτιμηθεί ο τύπος του θανάτου σύμφωνα με τη μορφολογία τους. Η Εικόνα 40 δείχνει τις μορφολογικές αλλαγές. Ο πολλαπλασιασμός των μη επεξεργασμένων κυττάρων MCF-7 (HD) είναι φυσιολογικός αφού τα κύτταρα είναι επιμήκεις, προσκολλώνται στην πλάκα και παρουσιάζουν κυτταρικό συνωστισμό. Ωστόσο, η μορφολογία αυτών που υποβλήθηκαν

σε θεραπεία με PenAcAg μεταβλήθηκε. Η χαρακτηριστική μορφολογία των κυττάρων αλλάζει, συρρικνώθηκαν και στρογγυλοποιήθηκαν, αποσπάζτηκαν από την πλάκα, χάθηκε η κυτταρική επαφή και σχημάτισαν νησίδες πιο στρογγυλεμένων κυττάρων, σε αντίθεση με τα κύτταρα που δεν υποβλήθηκαν σε θεραπεία [50]. Επομένως, πραγματοποιείται ένας αποπτωτικός τύπος κυτταρικού θανάτου μετά την επεξεργασία των MCF-7 με PenAcAg.

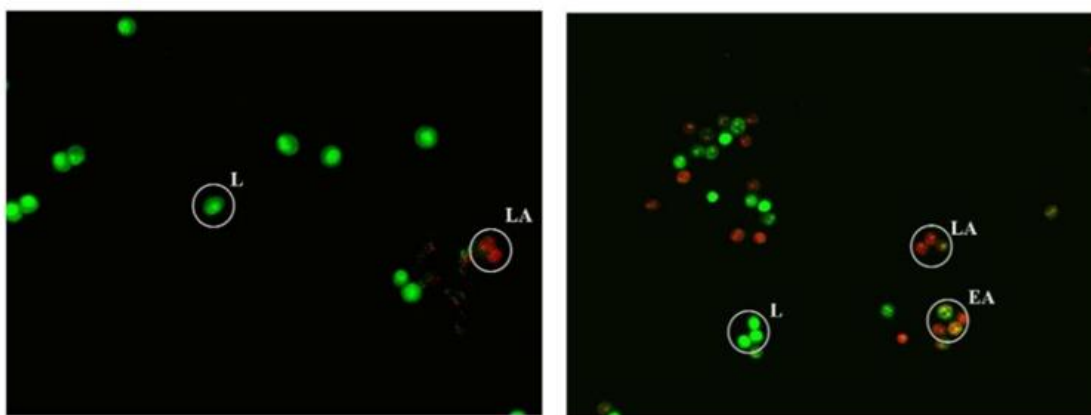


Εικόνα 40: Μορφολογικές αλλαγές σε μη επεξεργασμένα MCF-7 κύτταρα(αριστερά) και έπειτα από επεξεργασία με PenAcAg για 48 ώρες (δεξιά)

4.2.1.5. Μελέτη του μηχανισμού δράσης του PenAcAg με τη μέθοδο χρώσης πορτοκαλιού ακριδίνης/αιθιδίου βρωμιδίου (Acridine Orange/Ethidium Bromide (AO/EB))

Τα μη επεξεργασμένα κύτταρα MCF-7 που εμφάνισαν φωτεινούς ομοιόμορφους πράσινους πυρήνες με οργανωμένες δομές φαίνονται στην Εικόνα 41. Το ποσοστό απόπτωσης και νέκρωσης του control βρέθηκε $26,8 \pm 1,5\%$ και 0% αντίστοιχα. Στην περίπτωση των κυττάρων που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με PenAcAg, παρατηρείται συρρίκνωση, συμπύκνωση χρωματίνης και φυσαλίδες της πλασματικής μεμβράνης,

οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η πλειοψηφία των κυττάρων υφίσταται αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο[50]. Το ποσοστό των αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων κατά την επεξεργασία με PenAcAg είναι $49,3 \pm 0,6\%$ και 0% , αντίστοιχα. Όταν τα κύτταρα MCF-7 επωάζονται με σισπλατίνη, το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων αυξάνεται έως και $96,5\%$. Συνεπώς, το PenAcAg προκαλεί απόπτωση αλλά όχι στο βαθμό που προκαλεί η σισπλατίνη.



Εικόνα 41: Εικόνες φθορισμού από μη επεξεργασμένα κύτταρα MCF-7 (αριστερά) και έπειτα από επεξεργασία με PenAcAg (δεξιά) για 48 ώρες, στους 37°C , στην τιμή IC_{50} και με χρώση με πορτοκαλί ακριδίνης και βρωμιούχο αιθίδιο. (L: Ζωντανά κύτταρα (live cells), EA: πρώιμα αποπτωτικά κύτταρα (early apoptotic cells), LA: όψιμα αποπτωτικά κύτταρα (late apoptotic cells))

4.2.2. Εx vivo αποτελέσματα

4.2.2.1. Φασματοσκοπία UV-Vis με CT-DNA και PenAcAg

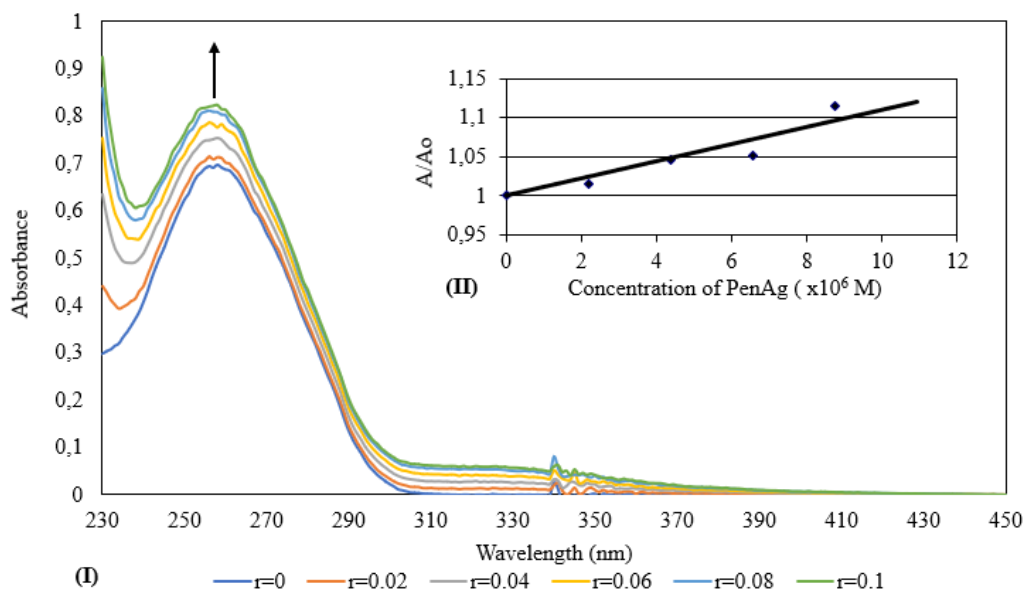
Σε αυτήν τη μέθοδο εξετάζεται ο τρόπος με τον οποίον μεταβάλλεται το $\lambda_{\text{max(απορ.)}} = 258 \text{ nm}$ του CT-DNA κατά την αυξανόμενη προσθήκη συμπλόκου. Οποιαδήποτε μεταβολή στο μέγιστο μήκος κύματος απορρόφησης του CT-DNA υποδηλώνει κάποιο είδος αλληλεπίδρασης. Συγκεκριμένα:

- Μείωση της απορρόφησης, δηλαδή υποχρωμία, υποδηλώνει παρεμβολή.

- Αύξηση της απορρόφησης, δηλαδή υπερχρωμία, συνεπάγεται παρεμβολή στην αύλακα, ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση ή ρήξη του DNA.
- Μετατόπιση του λ_{\max} προς μεγαλύτερα μήκη κύματος, δηλαδή βαθυχρωμία, σημαίνει σταθεροποίηση της ελικοειδούς δομής του DNA.
- Μετατόπιση του λ_{\max} προς μικρότερα μήκη κύματος, δηλαδή υψιχρωμία, υποδηλώνει αποσταθεροποίηση της ελικοειδούς δομής του DNA[37].

Παρακάτω παρουσιάζονται τα φάσματα UV του συμπλόκου PenAcAg παρουσία CT-DNA με αναλογίες r (0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1) όπου $r = \frac{[complex]}{[CT-DNA]}$. Επίσης, αναπαρίσταται και η γραφική παράσταση του πηλίκου A/A_0 συναρτήσει της συγκέντρωσης του συμπλόκου PenAcAg.

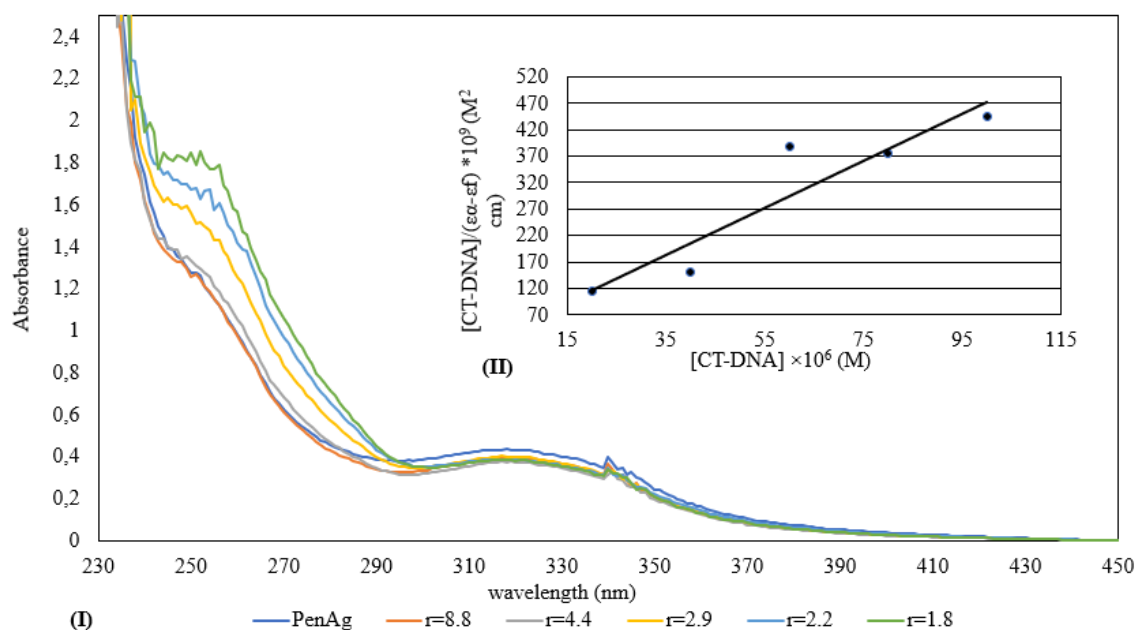
Παρατηρείται πως με την διαδοχική αύξηση του συμπλοκού αυξάνεται η απορρόφηση στο $\lambda_{\max(απορ.)} = 258$ nm του CT-DNA, το οποίο συνεπάγεται υπερχρωμισμό με ποσοστό 9,86%. Αντιθέτως, δεν εμφανίζεται κάποια μετατόπιση στο λ_{\max} του CT-DNA. Ο υπερχρωμισμός λοιπόν μπορεί να δηλώνει παρεμβολή στην αύλακα, ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση ή ρήξη του DNA [37,39].



Εικόνα 42: Φάσματα UV του συμπλόκου PenAcAg παρουσία CT-DNA με αναλογίες r (0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1) όπου $r = \frac{[complex]}{[CT-DNA]}$ και η γραφική παράσταση του πηλίκου A/A_0 συναρτήσει της συγκέντρωσης του συμπλόκου PenAcAg.

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα φάσματα UV απουσία DNA (με συγκέντρωση συμπλόκου $4 \cdot 10^{-6}$ M) και παρουσία του όπου η συγκέντρωση του συμπλόκου παραμένει σταθερή με αναλογίες r (8.8 , 4.4 , 2.9 , 2.2 , 1.8), όπου $r = \frac{[complex]}{[CT-DNA]}$, καθώς και η γραφική παράσταση της συγκέντρωσης του CT-DNA συναρτήσει του πηλίκου $[CT-DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$. Συνεπώς μπορούμε να προσδιορίσουμε την ισχύ της δέσμευσης του συμπλόκου με το DNA, μέσω της εύρεσης της σταθερά σύνδεσης συμπλόκου-DNA (K_b). Για τον προσδιορισμό της K_b χρησιμοποιείται η εξίσωση Wolfe-Shimmer:

$$\frac{[DNA]}{\epsilon_a - \epsilon_f} = \frac{[DNA]}{\epsilon_b - \epsilon_f} + \frac{1}{K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)}, \text{ από την οποία βρέθηκε ότι η } K_b = 15,6 \pm 5,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}.$$



Εικόνα 43: Φάσματα UV απουσία DNA και παρουσία του με αυξανόμενες συγκεντρώσεις CT-DNA με αναλογίες r (8,8 , 4,4 , 2,9 , 2,2 , 1,8), όπου $r = \frac{[complex]}{[CT-DNA]}$ και η γραφική παράσταση της συγκέντρωσης του CT-DNA συναρτήσει του πηλίκου $[CT-DNA]/(\epsilon_{\alpha}-\epsilon_f)$

4.2.2.2. Μελέτη του DNA με το PenAcAg μέσω φθορισμού

Για την μελέτη της ανταγωνιστικής δράσης του PenAcAg με το αιθίδιο βρωμίδιο παρασκευάστηκαν και λήφθηκαν τα φάσματα με σταθερή συγκέντρωση αιθιδίου βρωμιδίου (EtBr) 2,33 μ M, σταθερή συγκέντρωση CT-DNA 26 μ M και αυξανόμενες συγκεντρώσεις του συμπλόκου: 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600 μ M (Εικόνα 44). Η διέγερση πραγματοποιείται στα 527 nm όπου είναι το μέγιστο απορρόφησης $\lambda_{max(απορρόφησης)}$ του αιθιδίου βρωμιδίου και λαμβάνεται το φάσμα εκπομπής (από τα 550-750nm) με $\lambda_{max(εκπομπής)}=588$ nm. Για την εύρεση του βαθμού απόσβεσης του φθορισμού του EtBr χρησιμοποιείται η εξίσωση Stern-Volmer : $\frac{I_0}{I} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q]$ (1), όπου K_{sv} σταθερά Stern-Volmer, k_q σταθερά απόσβεσης φθορισμού και $[Q]$

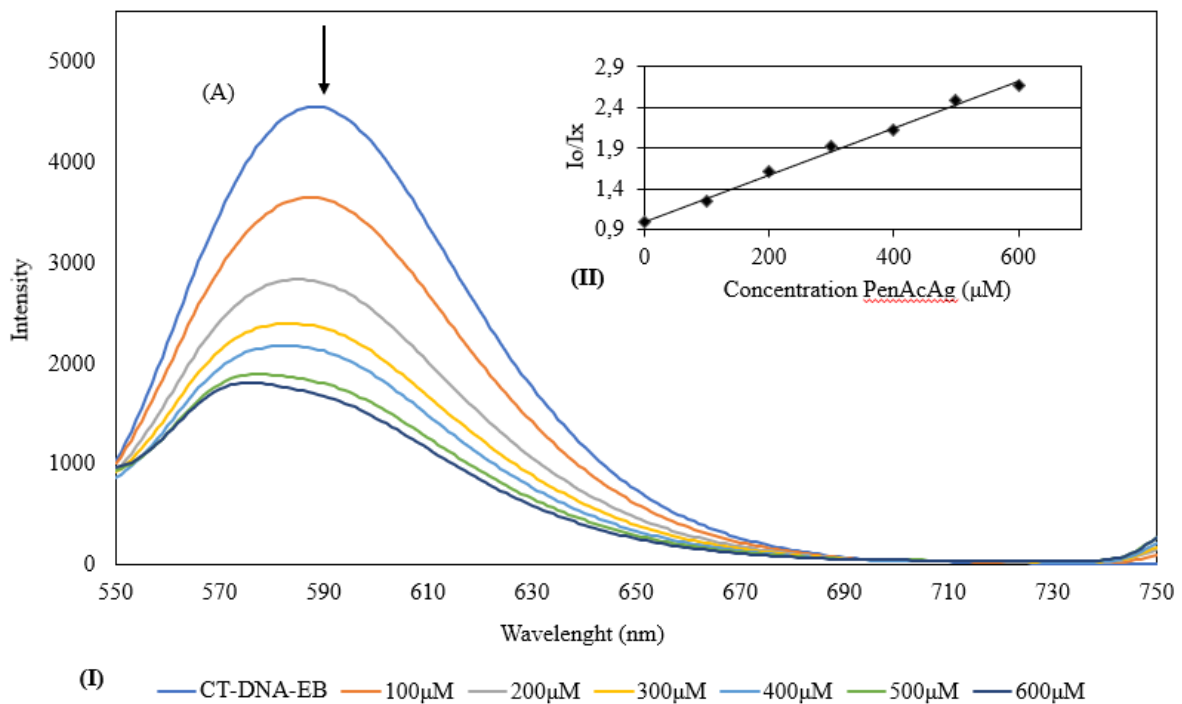
συγκέντρωση PenAcAg (Quencher). Επίσης σημαντικός είναι ο προσδιορισμός της φαινομενικής σταθεράς σύνδεσης K_{app} , η οποία υπολογίζεται από τον τύπο:

$$K_{app} = K_{EB} \times \frac{[EB]}{[Q_{50}]} \quad (2), \text{ όπου } K_{EB} = 10^7 \text{M}^{-1} \text{ και αποτελεί την σταθερά σύνδεσης EtBr-}$$

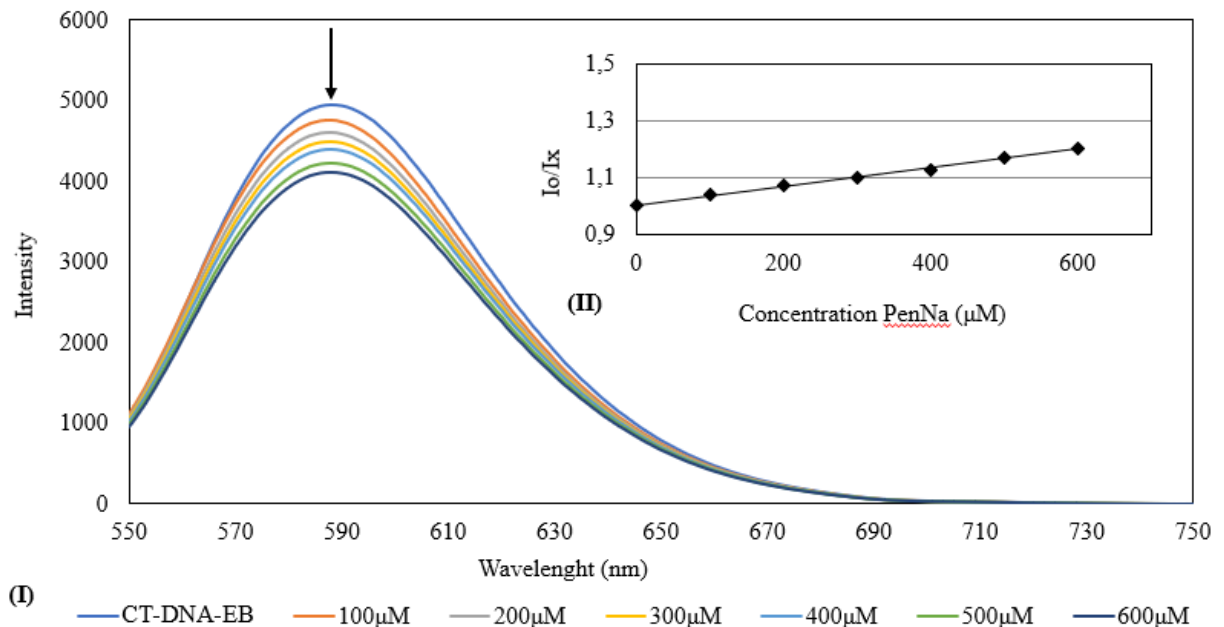
DNA, $[Q_{50}]$ η συγκέντρωση του συμπλόκου-αποσβέστη όταν ο φθορισμός του EtBr-DNA μειώνεται κατά 50%. Από τις εξισώσεις (1) και (2) προκύπτει ότι $K_{app} = K_{EB} \times [EB] \times K_{sv}$.

Επομένως η σταθερά K_{sv} του PenAcAg ισούται με $2,9 \times 10^{-3} \text{M}^{-1}$, ενώ η K_{app} με $6,7 \times 10^{-4} \text{M}^{-1}$. Από το μέγεθος της K_{app} μπορεί να προσδιοριστεί ο τρόπος σύνδεσης του συμπλόκου με το DNA. Όταν η τιμή είναι μεγαλύτερη από 10^6M^{-1} είναι ένδειξη παρεμβολής, ενώ όταν η τιμή κυμαίνεται στην περιοχή 10^4 – 10^5M^{-1} αποτελεί ένδειξη συναρμογής στην αύλακα[40]. Στην περίπτωση του PenAcAg λοιπόν, εφόσον η $K_{app} = 6,7 \times 10^{-4} \text{M}^{-1}$, ο τρόπος που αλληλεπιδρά με το DNA είναι με παρεμβολή στην αύλακα.

Πραγματοποιήθηκε και η ίδια διαδικασία για το PenNa (Εικόνα 45) και βρέθηκε ότι η σταθερά K_{sv} του PenNa ισούται με $0,34 \times 10^{-2} \text{M}^{-1}$, ενώ η K_{app} με $0,78 \times 10^{-3} \text{M}^{-1}$. Επομένως, το PenNa δεν παρεμβάλλεται στο DNA ούτε συναρμόζεται στην αύλακα.



Εικόνα 44: Φάσμα εκπομπής CT-DNA ($C = 26\mu\text{M}$) με EtBr ($C = 2,33\mu\text{M}$), με απουσία PenAcAg και παρουσία του με αυξανόμενες συγκεντρώσεις του και η γραφική παράσταση του πηλίκου I_0/I_x συναρτήσει της συκέντρωσης του PenAcAg.



Εικόνα 45: Φάσμα εκπομπής CT-DNA ($C = 26\mu\text{M}$) με EtBr ($C = 2,33\mu\text{M}$), με απουσία PenH και παρουσία του με αυξανόμενες συγκεντρώσεις του και η γραφική παράσταση του πηλίκου I_0/I_x συναρτήσει της συκέντρωσης του PenNa

4.2.2.3. Ιξωδομετρία

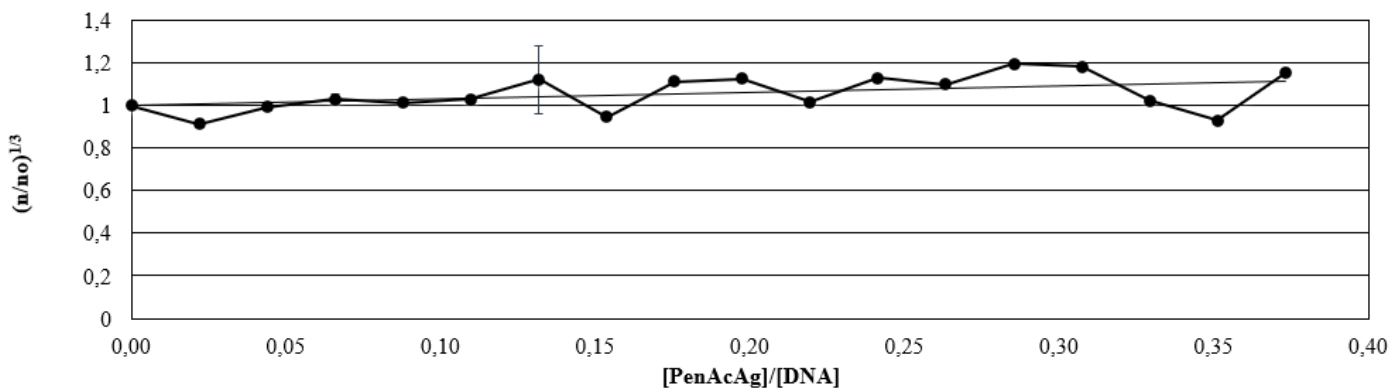
Το σχετικό ιξώδες του DNA είναι ανάλογο του σχετικού μήκους του, επόμενος με συνεχή προσθήκη συμπλόκου παρατηρείται το είδος της μεταβολής του ιξώδους του DNA και κατά συνέπεια το είδος της αλληλεπίδρασης. Συγκεκριμένα:

- Αύξηση του ιξώδους του DNA σημαίνει ότι η έλικα του DNA επιμηκύνεται, επομένως το είδος της αλληλεπίδρασης είναι παρεμβολή.
- Μείωση του ιξώδους του DNA συνεπάγεται μείωση του μήκους της έλικας του, επομένως η ένωση προκαλεί ρήξη του DNA.
- Λιγότερο έντονη αύξηση ή μείωση του ιξώδους, συνεπάγεται κάμψη ή στρέψη στην έλικα του DNA, συνεπώς το σύμπλοκο δεσμεύεται στις αύλακες του DNA.
- Καμία μεταβολή στο ιξώδες υποδηλώνει καμία μεταβολή στο μήκος του DNA, οπότε η ένωση αλληλεπιδρά ηλεκτροστατικά[35].

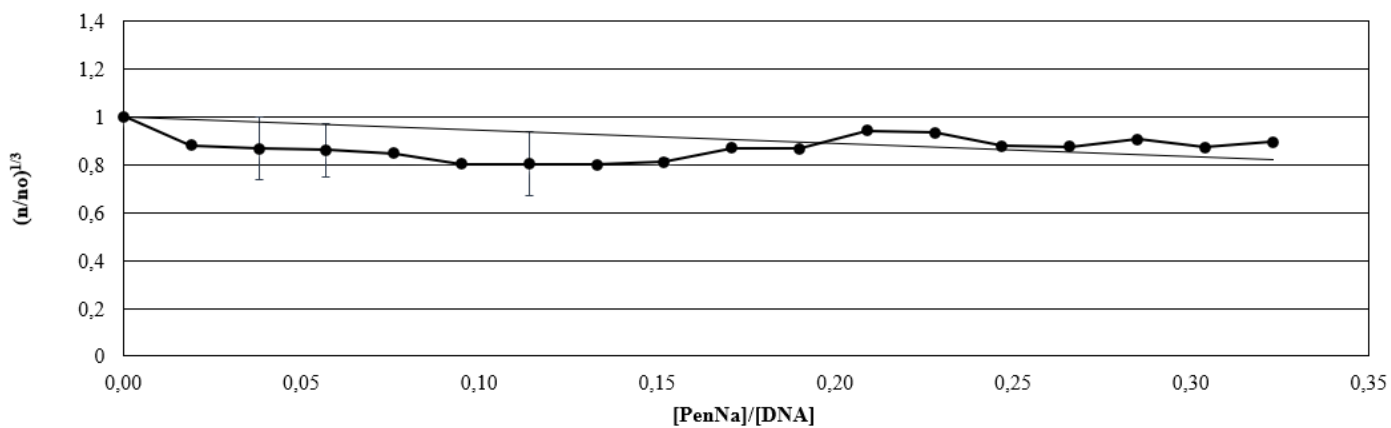
Η μεταβολή του μήκους της έλικας του DNA υπολογίζεται από τους χρόνους ροής των διαφορετικών αναλογιών $r = \frac{[complex]}{[CT-DNA]}$ από την σχέση: $\frac{L}{L_0} = \left(\frac{n}{n_0}\right)^{\frac{1}{3}} = \left(\frac{t-t_0}{t_{DNA}-t_0}\right)^{\frac{1}{3}}$, όπου L: μήκος του DNA παρουσία συμπλόκου, L_0 : μήκος του DNA απουσία συμπλόκου, n: σχετικό ιξώδες παρουσία συμπλόκου, n_0 : σχετικό ιξώδες απουσία συμπλόκου, t: χρόνος ροής του διαλύματος DNA παρουσία συμπλόκου, t_{DNA} : χρόνος ροής του διαλύματος DNA απουσία συμπλόκου, t_0 : χρόνος ροής (εξαρτάται την συγκέντρωση του συμπλόκου).

Στην περίπτωση του συμπλόκου PenAcAg παρατηρείται ελαφριά αύξηση του ιξώδους το οποίο συνεπάγεται δέσμευση στην αύλακα, όπως έδειξαν και τα

αποτελέσματα του φθορισμού και της φασματοσκοπίας UV. Αντίθετα, με την αυξανόμενη προσθήκη του PenNa παρατηρείται μείωση του ιξώδους του DNA, το οποίο σε συνδυασμό με τον φθορισμό του PenNa πρόκειται πιθανώς για ρήξη του DNA.



Εικόνα 46: Επίδραση του PenAcAg στο σχετικό ιξώδες του CT-DNA ($[DNA]=9 \times 10^{-5} \text{ M}$, $r = \frac{[complex]}{[CT-DNA]}$)

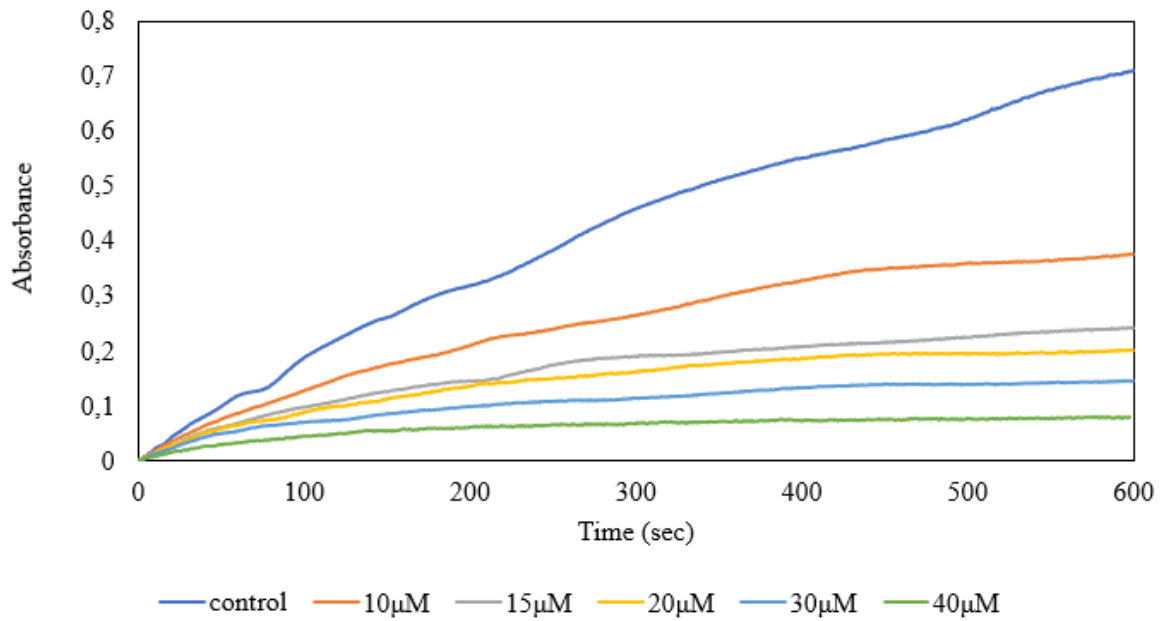


Εικόνα 47: Επίδραση του PenNa στο σχετικό ιξώδες του CT-DNA ($[DNA]=10^{-4} \text{ M}$, $r = \frac{[complex]}{[CT-DNA]}$)

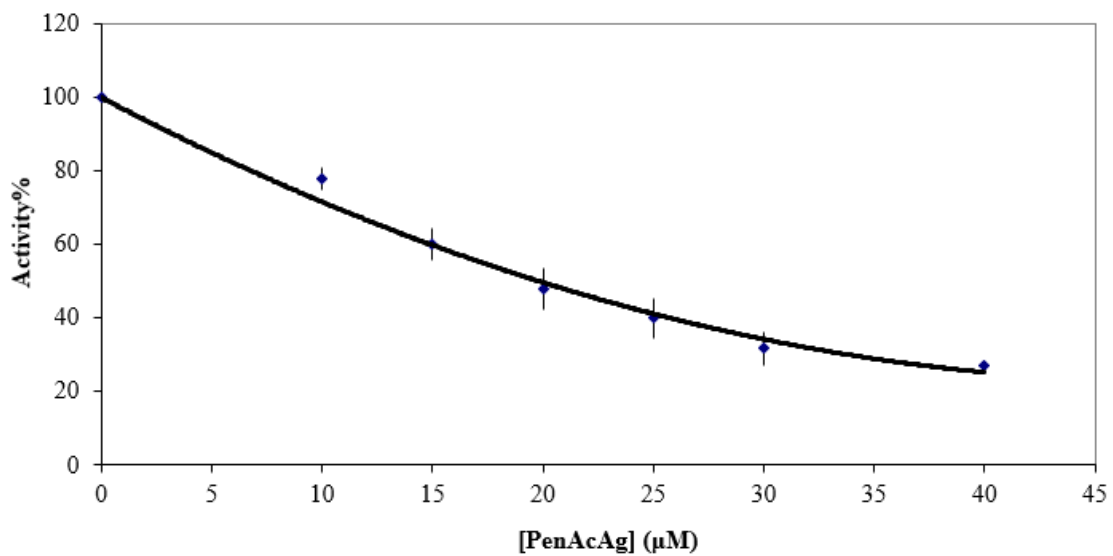
4.2.2.4. Μελέτη της δράσης του PenAcAg στο ένζυμο λιποξυγενάση

Η λιποξυγενάση καταλύει την οξείδωση του λινολεϊκού οξέος σε υδροπεροξυλινελαϊκό οξύ (HrODE). Το λ_{\max} απορρόφησης αυτού του προϊόντος είναι στα 234nm . Συνεπώς, για τον προσδιορισμό της επίδραση του PenAcAg στην καταλυτική δράση του ενζύμου μελετάται κινητικά η αύξηση της απορρόφησης στα 234nm ανά 1 sec για 10 min , η οποία προκύπτει εξαιτίας της παραγωγής του HrODE στους 37 °C.

Για την μελέτη της επίδρασης του PenAcAg στην αναστολή της δράσης του ενζύμου αυτή διατηρείται σταθερή η συγκέντρωση του υποστρώματος λινολεϊκού οξέος στα 0,3mM (2000 μl) και η ποσότητα του ενζύμου στα 100μl, ενώ μεταβάλλονται οι συγκεντρώσεις του συμπλόκου , οι οποίες είναι 10, 15, 20, 25, 30, 40 μM (Εικόνα 48). Από τις μετρήσεις αυτές υπολογίζεται ο βαθμός αναστολής μέσω της σύγκρισής της δράσης που είχε το ένζυμο απουσία PenAcAg (control : 100% δραστικότητα) και της δράσης του κατά την αυξανόμενη συγκέντρωση του(Εικόνα). Η δραστικότητα % υπολογίζεται από τον τύπο : $A(\%) = \left(\frac{U_0 \text{ παρουσία αναστολέα}}{U_0 \text{ απουσία αναστολέα}} \right) \times 100$, όπου U_0 (μM/min) αρχική ταχύτητα και ισούται με: $U_0 = \frac{\Delta C}{\Delta t} = \frac{\Delta A}{\Delta t \cdot \epsilon}$. Βρέθηκε, λοιπόν, ότι το PenAcAg αναστέλλει την δράση της λιποξυγενάσης με IC_{50} , συγκέντρωση όπου η δράση του ενζύμου μειώνεται στο 50%,ίσο με 19,8 μM (Εικόνα 49).



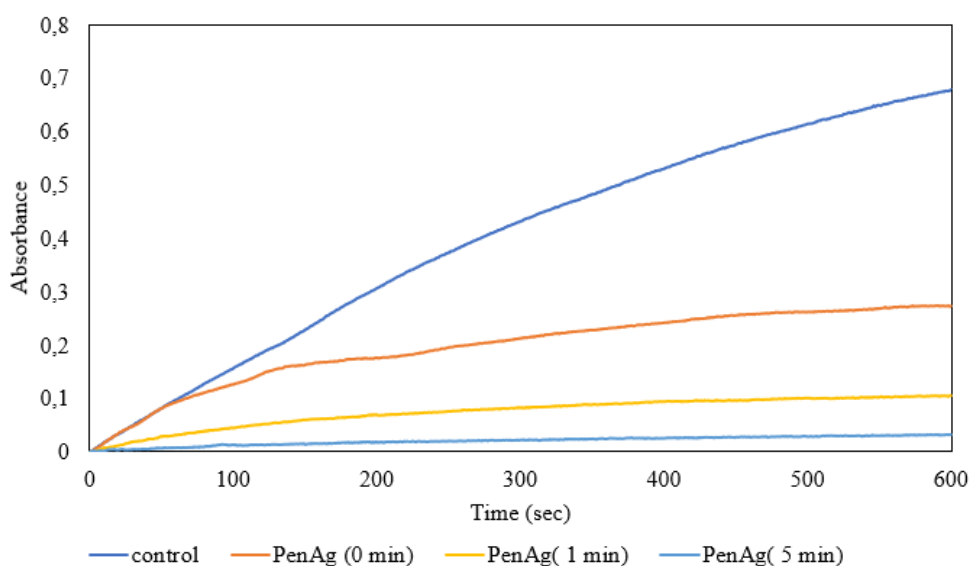
Εικόνα 48: Κινητική μελέτη της δράσης του PenAcAg, με αυξανόμενες συγκεντρώσεις ([PenAcAg]=0μM(control), 10Mμ, 15μM, 20Mμ, 30Mμ, 40μM), στην δραστηκότητα του ενζύμου



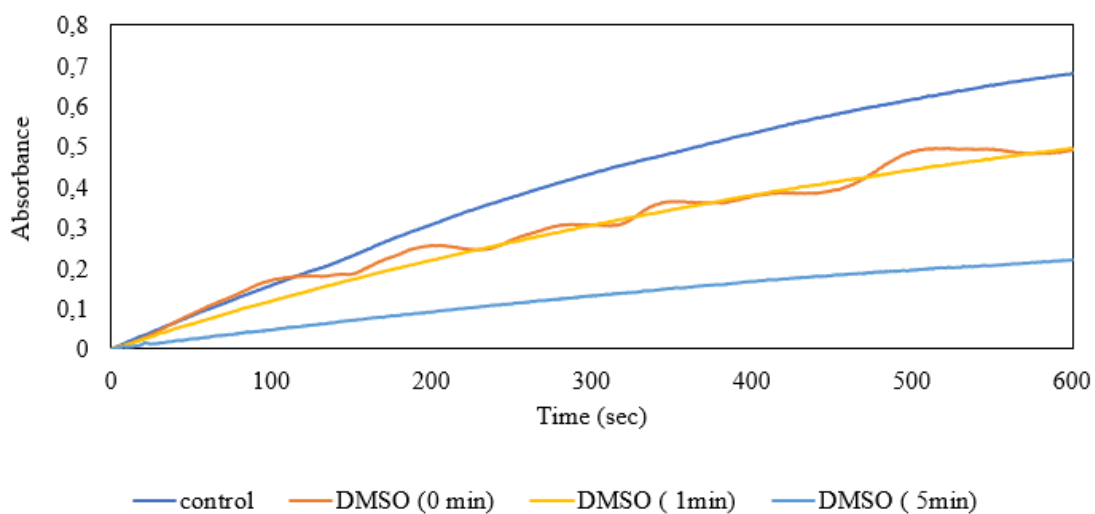
Εικόνα 49: Η % δραστηκότητα του ενζύμου λιποζυγενάση συναρτήκει των διαφορετικών συγκεντρώσεων αναστολέα-PenAcAg

4.2.2.5. Μελέτη του είδους της αναστολής του ενζύμου και του μηχανισμού του αναστολέα

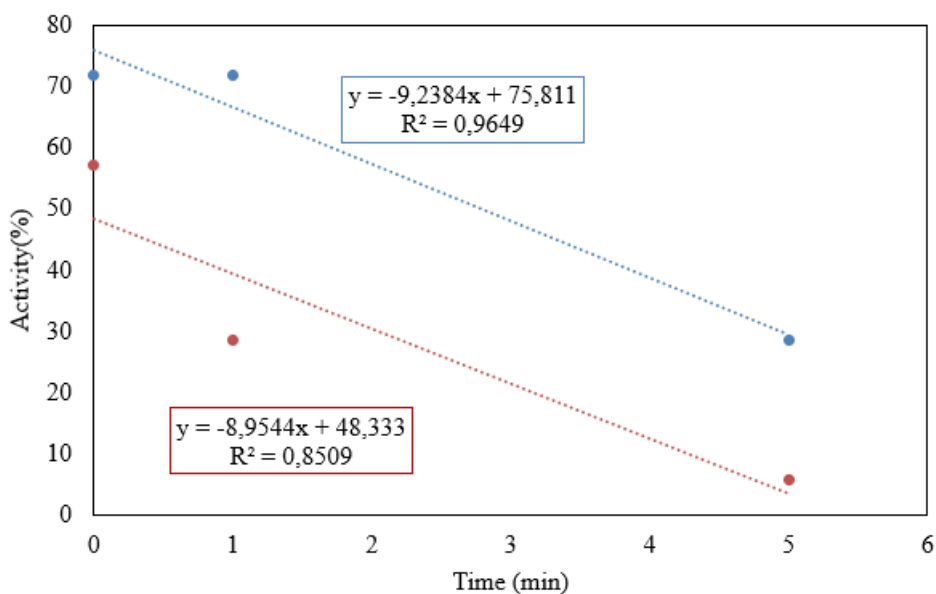
Για τον προσδιορισμό του είδους της αναστολής, δηλαδή αν η αναστολή που προκαλεί το PenAcAg είναι αντιστρεπτή ή μη αντιστρεπτή παρασκευάστηκαν τρία διαφορετικά διαλύματα. Το πρώτο ήταν το control το οποίο δεν περιείχε ούτε σύμπλοκο, ούτε DMSO. Το δεύτερο διάλυμα ήταν με παρουσία αναστολέα PenAcAg στην συγκέντρωση $IC_{50} = 19,8\mu M$ όπου παρασκευάστηκε και μετρήθηκε 4 φορές με διαφορετικούς χρόνους επώασης για 0, 1 και 5 min (Εικόνα 50). Οι ίδιες ακριβώς συγκεντρώσεις και χρόνοι επώασης χρησιμοποιήθηκαν και για μετρήσεις με απουσία αναστολέα με DMSO (Εικόνα 51). Κατασκευάστηκαν δύο διαγράμματα με την % δραστικότητα του PenAcAg και του DMSO και βρέθηκε ότι οι δύο ευθείες είναι παράλληλες με σχεδόν ίδια κλίση με αποτέλεσμα το είδος της αναστολής να είναι αντιστρεπτή (Εικόνα 52).



Εικόνα 50: Κινητική μελέτη της δράσης του PenAcAg με συγκέντρωση στην τιμή IC_{50} και διαφορετικούς χρόνους επώασης



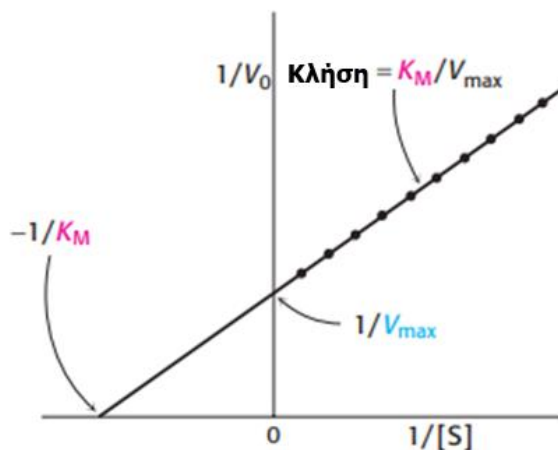
Εικόνα 51: Κινητική μελέτη της δράσης του DMSO με συγκέντρωση στην τιμή IC₅₀ και διαφορετικούς χρόνους επώασης



Εικόνα 52: Διάγραμμα δραστηριότητας (%) του PenAcAg (πορτοκαλί) και του DMSO (μπλε) στις ίδιες συγκεντρώσεις συναρτήσει του χρόνου επώασης

Για τον προσδιορισμό του είδους του μηχανισμού της αναστολής έγινε χρήση της εξίσωσης Michaelis-Menten. Η εξίσωση Michaelis-Menten είναι : $U = \frac{V_{max}[S]}{[S]+K_M}$, όπου U η ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης, $[S]$ η συγκέντρωση του υποστρώματος, V_{max} η

μέγιστη ταχύτητα της αντίδρασης και K_M η σταθερά Michaelis-Menten, η οποία είναι η συγκέντρωση του υποστρώματος του ενζύμου όταν η ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης ισούται με το μισό της μέγιστης. Από την παραπάνω εξίσωση και τον προσδιορισμό της V_{max} και της K_M μέσω του διαγράμματος Lineweaver-Burk όπου η εξίσωση παίρνει την μορφή του διαγράμματος $\frac{1}{V_0} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]}$ (Εικόνα 53) μπορεί να βρεθεί ο μηχανισμός του αντιστρεπτού αναστολέα (ανταγωνιστικός, μη ανταγωνιστικός, μεικτός) [41, 43].

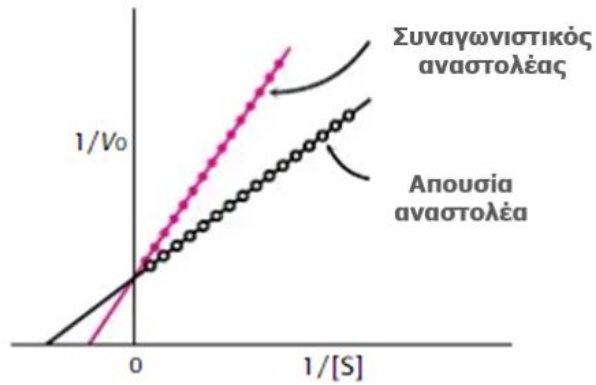


Εικόνα 53: Διάγραμμα Lineweaver-Burk με εξίσωση $\frac{1}{V_0} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]}$ [43]

Συγκεκριμένα, λοιπόν, με την δημιουργία των διαγραμμάτων Lineweaver-Burk με απουσία και παρουσία αναστολέα μπορούν να προκύψουν τα παρακάτω αποτελέσματα:

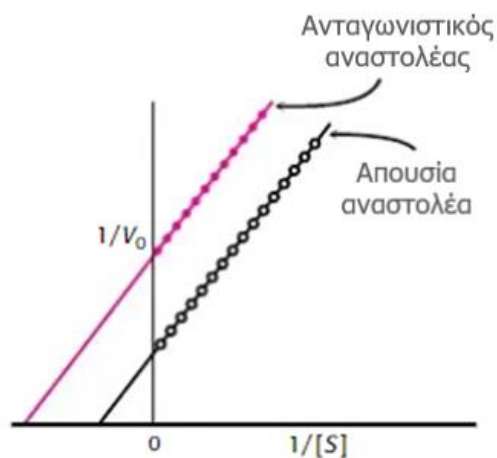
- Εάν η τιμή K_M με παρουσία αναστολέα αυξάνεται σε σχέση με την αντίστοιχη με απουσία αναστολέα και η τιμή V_{max} παραμένει σταθερή και στις δύο περιπτώσεις τότε έχουμε συναγωνιστική αναστολή (competitive) (Εικόνα 54). Συναγωνιστική αναστολή σημαίνει ότι ο αναστολέας

ανταγωνίζεται το υπόστρωμα του ενζύμου για μία θέση στο ενεργό κέντρο του [42, 43].



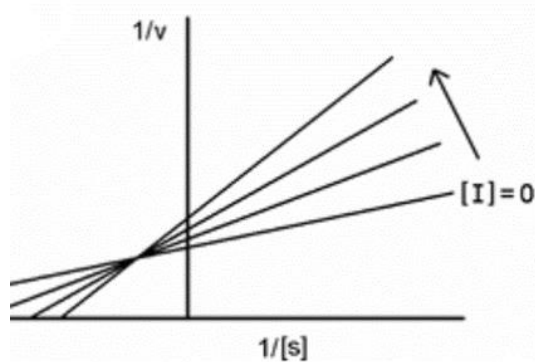
Εικόνα 54: Διάγραμμα συναγωνιστικής αναστολής[43]

- Εάν η τιμές K_M και V_{max} με παρουσία αναστολέα μειώνονται σε σχέση με τις αντίστοιχες με απουσία αναστολέα τότε έχουμε ανταγωνιστική αναστολή (uncompetitive) (Εικόνα 55). Ανταγωνιστική αναστολή σημαίνει ότι ο αναστολέας δεσμεύεται στο ένζυμο σε μία άλλη θέση από αυτήν του υποστρώματος και μάλιστα δεσμεύεται μόνο όταν έχει ήδη δεσμευτεί το υπόστρωμα [42,44].



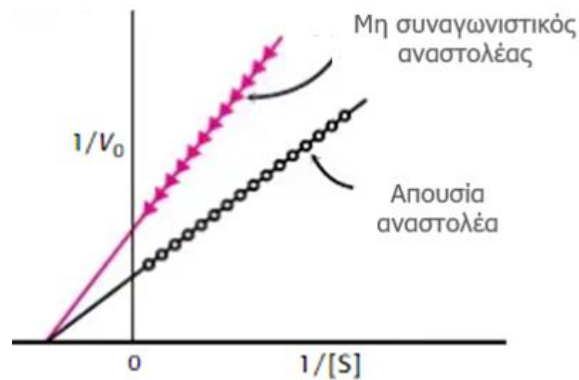
Εικόνα 55: Διάγραμμα ανταγωνιστικής αναστολής[44]

- Εάν η τιμή K_M με παρουσία αναστολέα αυξάνεται σε σχέση με την αντίστοιχη με απουσία αναστολέα και η τιμή V_{max} μειώνεται στις αντίστοιχες περιπτώσεις τότε έχουμε μεικτή αναστολή (mixed) (Εικόνα 56). Μεικτή αναστολή σημαίνει ότι ο αναστολέας μπορεί να συνδεθεί και με το ελεύθερο ένζυμο αλλά και με το σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος [42, 45,46].



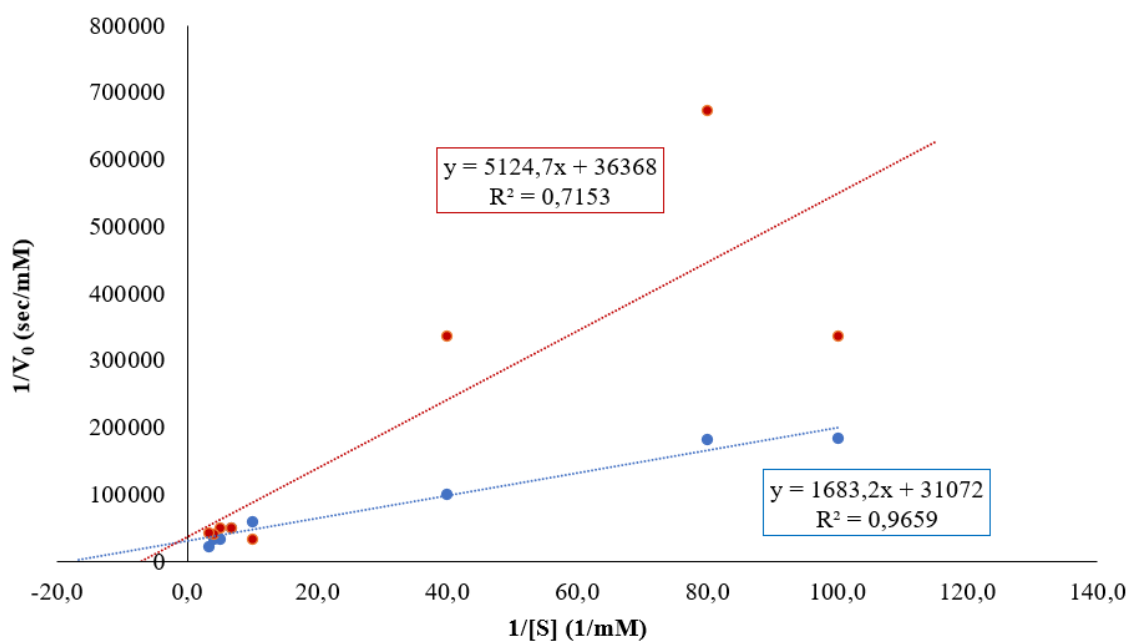
Εικόνα 56: Διάγραμμα μεικτής αναστολής[46]

- Εάν η τιμή V_{max} με παρουσία αναστολέα μειώνεται σε σχέση με την αντίστοιχη με απουσία αναστολέα και η τιμή K_M παραμένει σταθερή και στις δύο περιπτώσεις τότε έχουμε ένα είδος μεικτής αναστολής, την μη συναγωνιστική (non-competitive) (Εικόνα 57) [42,44].



Εικόνα 57: Διάγραμμα μη συναγωνιστικής αναστολής[44]

Παρασκευάστηκαν, λοιπόν, τα διαλύματα με απουσία και παρουσία PenAcAg-αναστολέα με αυξανόμενες συγκεντρώσεις υποστρώματος 0.01, 0.0125, 0.025, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3 mM και με τη δημιουργία του αντίστοιχου διαγράμματος Lineweaver-Burk προέκυψαν τα εξής αποτελέσματα: η V_{max} απουσία αναστολέα βρέθηκε $3,2 \times 10^{-5}$ mM/sec και V_{max} παρουσία αναστολέα $2,7 \times 10^{-5}$ mM/sec, ενώ K_M απουσία αναστολέα βρέθηκε 0,054 mM και η K_M παρουσία αναστολέα 0,141 mM (Πίνακας 11). Αυτό συνεπάγεται ότι η V_{max} παρουσία αναστολέα μειώνεται και η K_M αυξάνεται υποδεικνύοντας μεικτό είδος αναστολέα (Εικόνα 58).



Εικόνα 58: Διάγραμμα Lineweaver-Burk απουσία αναστολέα (μπλε) και παρουσία PenAcAg-αναστολέα (πορτοκαλί)

Πίνακας 11: Οι τιμές της V_{max} και K_m απουσία και παρουσία αναστολέα

	Απουσία αναστολέα	Παρουσία αναστολέα
V_{max} (mM/sec)	$3,2 \times 10^{-5}$	$2,7 \times 10^{-5}$
K_m (mM)	0,054	0,141

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο καρκίνος του μαστού είναι από τα πιο συνηθισμένα είδη καρκίνων στον κόσμο. Κατά συνέπεια, υπάρχει μεγάλη ανάγκη για εύρεση νέων, αποτελεσματικών, αντικαρκινικών φαρμάκων, με εκλεκτικότητα στα καρκινικά κύτταρα για την αποφυγή πολλών παρενεργειών. Το DNA είναι ένας από τους πρωταρχικούς μοριακούς στόχους των φαρμάκων για την πρόκληση απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων.

Τα μεταλλικά σύμπλοκα έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον, καθώς οι τρόποι δέσμευσης τους με το DNA και η δραστικότητά τους μπορούν να ρυθμιστούν σύμφωνα με τον αριθμό συντονισμού, το σχήμα και το φορτίο του ανόργανου ικρίωματος, ενώ τα αντιβιοτικά μπορούν να προκαλέσουν τον θάνατο των καρκινικών κυττάρων με τη διάσπαση των κλώνων του DNA. Συνεπώς, έγινε η σύνθεση ενός μεταλλοαντιβιοτικού φαρμάκου, του PenAcAg, με την συναρμογή του αργύρου με πενικιλίνη. Η ένωση αυτή χαρακτηρίστηκε με τις φασματοσκοπικές τεχνικές ATR-FT-IR, UV-Vis, ¹H-NMR, XRF, πραγματοποιήθηκαν θερμικές αναλύσεις TG-DTA, προσδιορίστηκε το μοριακό βάρος με την μέθοδο της κρυσκοπίας και προτάθηκε μία πιθανή δομή.

Από τα *in vitro* πειράματα βρέθηκε ότι το PenAcAg ανέστειλε και τις δύο κυτταρικές σειρές (MCF-7(HR+), MDA-MB-231 (HR-)) με παρόμοιο τρόπο, το οποίο υποδεικνύει ότι οι ορμονικοί υποδοχείς δεν διαδραματίζουν κάποιον ρόλο στο μηχανισμό δράσης του. Παρόλο που το PenAcAg ταξινομείται ως τοξικός παράγοντας σύμφωνα με τα δεδομένα του FDA, λειτουργεί σημαντικά καλύτερα στα καρκινικά από ότι στα φυσιολογικά κύτταρα, σε σχέση με την σισπλατίνη, η οποία εξακολουθεί να είναι ένα κλινικά

χρησιμοποιούμενο αντικαρκινικό φάρμακο. Επιπλέον, το PenAcAg προκαλεί απόπτωση $49,3 \pm 0,6\%$ των κυττάρων MCF-7 (HD), ενώ η σισπλατίνη, προκαλεί 96,5% απόπτωση.

Όσον αφορά τον τρόπο δράσης του PenAcAg με το DNA , λαμβάνοντας υπόψη τα δεδομένα της φασματοσκοπίας απορρόφησης ηλεκτρονίων και φθορισμού προκύπτει το συμπέρασμα ότι αλληλεπιδρά ισχυρά με το DNA μέσω δέσμησης στην αύλακα. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώθηκε και με τη μέθοδο της ιζωδομετρίας, καθώς το ιζώδες του διαλύματος DNA που υποβλήθηκε σε επεξεργασία με PenAng μεταβλήθηκε ελάχιστα. Επίσης, το PenAcAg εμφανίζει και άλλο τρόπο δράσης, καθώς ανέστειλε τη δραστικότητα του ενζύμου της LOX πιο έντονα από τη σισπλατίνη, υποδεικνύοντας την ενεργοποίηση της αποπτωτικής οδού μέσω του μιτοχονδρίου.

6. ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ

Από την παρούσα διατριβή βρίσκεται σε διαδικασία δημοσίευσης στο περιοδικό:

“Main Group Metal Chemistry”, το άρθρο με τίτλο:

“Conjugation of tetracycline and penicillin with Sb(V) and Ag(I) against breast cancer cells”

P.Z. Trialoni^a, Z-C. M. Fyrigou ^a, C.N. Banti^a, S.K. Hadjikakou^{a,b},

^a Department of Chemistry, University of Ioannina, 45110 Ioannina, Greece

^b Institute of Materials Science and Computing, University Research Center of Ioannina
(URCI), 45110, Ioannina, Greece

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ / ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

- [1] Nussbaumer S, Bonnabry P, Veuthey JL, Fleury-Souverain S. Analysis of anticancer drugs: a review. *Talanta*. 2011 Oct 15;85(5):2265-89
- [2] Banti CN, Papatriantafyllopoulou C, Manoli M, Tasiopoulos AJ, Hadjikakou SK. Nimesulide silver metallodrugs, containing the mitochondriotropic, triaryl derivatives of pnictogen; anticancer activity against human breast cancer cells. *Inorganic chemistry*. 2016 Sep 6;55(17):8681-96.
- [3] Horobin RW, Trapp S, Weissig V. Mitochondriotropics: a review of their mode of action, and their applications for drug and DNA delivery to mammalian mitochondria. *Journal of Controlled Release*. 2007 Aug 28;121(3):125-36.
- [4] Vaezi MA, Safizadeh B, Eghtedari AR, Ghorbanhosseini SS, Rastegar M, Salimi V, Tavakoli-Yaraki M. 15-Lipoxygenase and its metabolites in the pathogenesis of breast cancer: A double-edged sword. *Lipids in Health and Disease*. 2021 Dec;20(1):1-9.
- [5] Klil-Drori AJ, Ariel A. 15-Lipoxygenases in cancer: a double-edged sword?. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*. 2013 Oct 1;106:16-22.
- [6] Newcomer ME, Brash AR. The structural basis for specificity in lipoxygenase catalysis. *Protein Science*. 2015 Mar;24(3):298-309.
- [7] Tian W, Jiang X, Kim D, Guan T, Nicolls MR, Rockson SG. Leukotrienes in tumor-associated inflammation. *Frontiers in Pharmacology*. 2020 Aug 19;11:1289.
- [8] Fantoni NZ, Brown T, Kellett A. DNA-targeted metallodrugs: an untapped source of artificial gene editing technology. *ChemBioChem*. 2021 Jul 1;22(13):2184-205.
- [9] Sirajuddin M, Ali S, Badshah A. Drug–DNA interactions and their study by UV–Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2013 Jul 5;124:1-9.
- [10] Reginald H. Garrett, Charles M. Grisham. *Biochemistry*. Utopia. 2019

- [11] Rocha CR, Silva MM, Quinet A, Cabral-Neto JB, Menck CF. DNA repair pathways and cisplatin resistance: an intimate relationship. *Clinics*. 2018 Sep 6;73.
- [12] Gao Y, Shang Q, Li W, Guo W, Stojadinovic A, Mannion C, Man YG, Chen T. Antibiotics for cancer treatment: A double-edged sword. *Journal of Cancer*. 2020;11(17):5135.
- [13] Bhattacharya B, Mukherjee S. Cancer therapy using antibiotics. *Journal of Cancer Therapy*. 2015;6(10):849.
- [14] Banerjee A, Dahiya M, Anand MT, Kumar S. Inhibition of proliferation of cervical and leukemic cancer cells by penicillin G. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2013;14(3):2127-30.
- [15] Banti CN, Hadjikakou SK. Anti-proliferative and anti-tumor activity of silver (I) compounds. *Metallomics*. 2013 Jun;5(6):569-96.
- [16] Ketikidis I, Banti CN, Kourkoumelis N, Tsiafoulis CG, Papachristodoulou C, Kalampounias AG, Hadjikakou SK. Conjugation of penicillin-G with silver (I) ions expands its antimicrobial activity against gram negative bacteria. *Antibiotics*. 2020 Jan;9(1):25.
- [17] Banti CN, Papatriantafyllopoulou C, Manoli M, Tasiopoulos AJ, Hadjikakou SK. Nimesulide silver metallodrugs, containing the mitochondriotropic, triaryl derivatives of pnictogen; anticancer activity against human breast cancer cells. *Inorganic chemistry*. 2016 Sep 6;55(17):8681-96.
- [18]<https://www.cancer.org/cancer/cancer-basics/history-of-cancer/cancer-treatment-surgery.html>
- [19][https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/understanding-a-breast-cancer-diagnosis/breast-cancer-hormone-receptor-status.html#:~:text=Hormone%20receptor%2Dpositive%20\(or%20hormone,levels%20or%20block%20estrogen%20receptors.](https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/understanding-a-breast-cancer-diagnosis/breast-cancer-hormone-receptor-status.html#:~:text=Hormone%20receptor%2Dpositive%20(or%20hormone,levels%20or%20block%20estrogen%20receptors.)
- [20] Wikipedia: nitrogen mustards, 5-Fluorouracil and mercaptopurine, methotrexate, dacarbazine, procarbazine and temozolomide, cisplatin, carboplatin, oxaliplatin,

cyclophosphamide, ifosfamide, doxorubicin, actinomycin-D, irinotecan and etoposide, bleomycin

[21] <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4444437.html>

[22] PubMed: linoleic acid, eicosapentaenoic acid

[23] <https://lktlabs.com/product/docosahexaenoic-acid-all-cis-4710131619/>

[24] https://en.wikipedia.org/wiki/Arachidonic_acid

[25] <https://www.medchemexpress.com/racemic-13-hpode.html>

[26] https://en.wikipedia.org/wiki/13-Hydroxyoctadecadienoic_acid

[27] <https://le.ac.uk/vgec/topics/cell-cycle>

[28] Pray L. Discovery of DNA structure and function: Watson and Crick. Nature Education. 2008;1(1), (<https://www.sciencephoto.com/media/540537/view/dna-structure-artwork>)

[29] https://www.allometric.com/tom/courses/bil255/bil255goods/09_dna.html

[30] <https://geniticeducation.co.in/dna-deoxyribonucleic-acid-definition-structure-function-evidence-and-types/>

[31] [https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Genetics/Book%3A_Working_with_Molecular_Genetics_\(Hardison\)/Unit_1%3A_Genes_Nucleic_Acids_Genomes_and_Chromosomes/2%3A_Structures_of_Nucleic_Acids/2.5%3A_B-Form_A-Form_and_Z-Form_of_DNA](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Genetics/Book%3A_Working_with_Molecular_Genetics_(Hardison)/Unit_1%3A_Genes_Nucleic_Acids_Genomes_and_Chromosomes/2%3A_Structures_of_Nucleic_Acids/2.5%3A_B-Form_A-Form_and_Z-Form_of_DNA)

[32] <https://en.wikipedia.org/wiki/Penicillin>

[33] <https://www.britannica.com/science/silver>

[34] <https://pediaa.com/difference-between-reversible-and-irreversible-enzyme-inhibition/#:~:text=Four%20types%20of%20reversible%20enzyme%20inhibition%20are%20competitive%2C%20uncompetitive%2C%20non,active%20site%20of%20the%20enzyme.>

[35] Shahabadi N, Mohammadi S. Synthesis characterization and DNA interaction studies of a new Zn (II) complex containing different dinitrogen aromatic ligands. Bioinorganic chemistry and applications. 2012 Aug 26;2012.

[36] G.Psomas, «Mononuclear metal complexes with ciprofloxacin: Synthesis, characterization and DNA-binding properties», Journal of Inorganic Biochemistry, 2008, 1798–1811.

[37] Ζαμπάκου ΜΧ. Αλληλεπίδραση του Mn (II) με φάρμακα που περιέχουν καρβοξυλική ομάδα. Aristotle University of Thessaloniki; 2012.

[38]<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Penicillin-g#section=Physical-Description>

[39] G.Psomas, «Mononuclear metal complexes with ciprofloxacin: Synthesis, characterization and DNA-binding properties», Journal of Inorganic Biochemistry, 2008, 1798–1811.

[40] Sheng X, Lu XM, Chen YT, Lu GY, Zhang JJ, Shao Y, Liu F, Xu Q. Synthesis, DNA-binding, cleavage, and cytotoxic activity of new 1, 7-dioxo-4, 10-diazacyclododecane artificial receptors containing bisguanidinoethyl or diaminoethyl double side arms. Chemistry–A European Journal. 2007 Nov 26;13(34):9703-12.

[41] Ξαπλαντέρη, Μαρία. "Ένζυμα.", 2016.

https://repository.kallipos.gr/bitstream/11419/915/2/02_chapter_23.pdf

[42] Αλέξιος Βλάμης, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, «Ενότητα στ' Κινητική 2 και Αναστολή», Πανεπιστήμιο Πάτρας, Τμήμα Χημείας.

<https://eclass.upatras.gr/modules/document/file.php/CHEM2012/%CE%A0%CE%B1%CF%81%CE%AC%CE%B4%CE%BF%CF%83%CE%B7%206.pdf>

[43] Tymoczko JL, Berg JM, Stryer L. Biochemistry: a short course. Macmillan; 2011 Dec 23.

- [44] Tymoczko JL, Berg JM, Gatto Jr GJ, Stryer L. Loose-leaf Version for Biochemistry: A Short Course. Macmillan Higher Education; 2018 Dec 28
- [45] Τελοπούλου, Α. "Κινητικές μελέτες της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης." Bachelor's thesis, 2015.
- [46] Waldrop GL. A qualitative approach to enzyme inhibition. *Biochemistry and Molecular Biology Education*. 2009 Jan;37(1):11-5.
- [47] Branch SK, Casy AF, Ominde EM. Application of ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy to the analysis of β -lactam antibiotics and their common degradation products. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 1987 Jan 1;5(2):73-103
- [48] Ben Salem I, Mezni M, Boulila A, Hamdi M, Saidi M. Removal of penicillin G and erythromycin with ionizing radiation followed by biological treatment. *Current Microbiology*. 2016 Oct;73(4):582-6
- [49] Gottlieb HE, Kotlyar V, Nudelman A. NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities. *Journal of organic chemistry*. 1997 Oct 17;62(21):7512-5.
- [50] Banti CN, Hadjikakou SK. Evaluation of toxicity with brine shrimp assay. *Bio-protocol*. 2021 Jan 20;11(2):e3895-.
- [51] Banti CN, Raptopoulou CP, Psycharis V, Hadjikakou SK. Novel silver glycinate conjugate with 3D polymeric intermolecular self-assembly architecture; an antiproliferative agent which induces apoptosis on human breast cancer cells. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2021 Mar 1;216:111351.
- [52] Εικόνα εξωφύλλου:<https://www.vecteezy.com/vector-art/641267-pharmaceutical-research-concept-with-medicine-pill-and-petri-dish-and-text-isolated-on-dark-blue>