



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

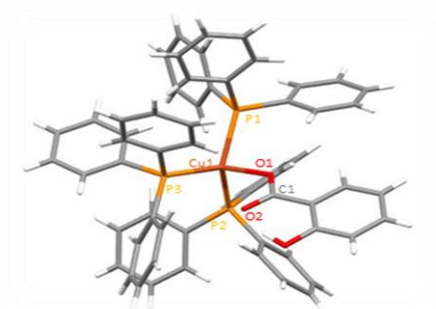
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

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

«ΑΝΟΡΓΑΝΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Σχεδιασμός και ανάπτυξη νέων συζευγμάτων μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων (ΜΣΑΦ) όπως σαλικυλικό οξύ με ιόντα χαλκού για τη στοχευμένη χημειοθεραπεία του καρκίνου του μαστού.



της Αγγελικής Πιπερούδη

Χημικός

Επιβλέπων Καθηγητής: Δρ Σωτήριος Χατζηκακού

Ιωάννινα 2022



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

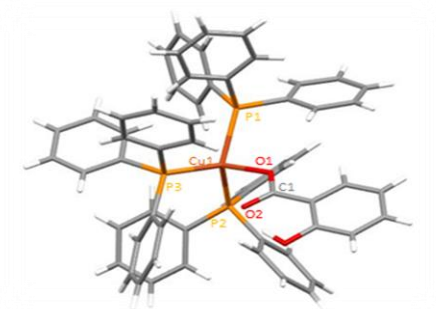
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

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

«ΑΝΟΡΓΑΝΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Σχεδιασμός και ανάπτυξη νέων συζευγμάτων μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων (ΜΣΑΦ) όπως σαλικυλικό οξύ με ιόντα χαλκού για τη στοχευμένη χημειοθεραπεία του καρκίνου του μαστού.



της Αγγελικής Πιπερούδη

Χημικός

Επιβλέπων Καθηγητής: Δρ Σωτήριος Χατζηκακού

Ιωάννινα 2022

**Εισαγωγή στο ΔΙ-ΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ
ΣΠΟΥΔΩΝ (Δ.Π.Μ.Σ.) «ΑΝΟΡΓΑΝΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»**

Της κ. Αγγελική Πιπερούδη

Επιβλέπων μέλος ΔΕΠ: Δρ Σωτήριος Χατζηκακού

Θέμα: «Σχεδιασμός και ανάπτυξη νέων Συζευγμάτων Μη Στεροειδών

Αντιφλεγμονωδών Φαρμάκων (ΜΣΑΦ) όπως σαλικυλικό οξύ με ιόντα χαλκού για τη
στοχευμένη χημειοθεραπεία του καρκίνου του μαστού.»

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

1 Χατζηκακού Σωτήριος, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων,
(Επιβλέπων)

2 Κουτσολέλος Αθανάσιος, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης
(Μέλος)

3 Τασιόπουλος Αναστάσιος, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κύπρου
(Μέλος)

Έγκριση Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας στις

Ο Διευθυντής του Δ.Π.Μ.Σ.

Ο/Η Γραμματέας

Καθηγητής Σωτήριος Χατζηκακού

Ευχαριστίες

Πρώτα απ' όλα θα ήθελα να ευχαριστήσω το Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Ειδίκευσης «Ανόργανη Βιολογική Χημεία» του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων που μέσα απ' αυτό μου δόθηκε η ευκαιρία να εκπονήσω τη παρούσα διπλωματική εργασία στο Εργαστήριο Ανόργανης Βιολογικής Χημείας υπό την επίβλεψη του Καθηγητή, κ. Χατζηκακού Κ. Σωτήριου.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Χατζηκακού Κ. Σωτήριο, Καθηγητή του τμήματος Χημείας και υπεύθυνο του διδρυματικού μεταπτυχιακού προγράμματος της «Ανόργανης Βιολογικής Χημείας», για την καθοδήγηση, τις χρήσιμες συμβουλές και υποδείξεις, τις πολύτιμες γνώσεις, την στήριξη και την ευκαιρία που μου έδωσε μέσα από το μεταπτυχιακό πρόγραμμα να ανοίξω τους ορίζοντες μου.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κα. Μπαντή Ν. Χριστίνα, Μεταδιδάκτορα του Εργαστηρίου Βιολογικής Ανόργανης Χημείας και Διδάσκουσα Βιολογίας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την πολύτιμη βοήθεια, καθοδήγηση και επεξήγηση σε όλα τα ερευνητικά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Κουτσολέλο Γ. Αθανάσιο, καθηγητή του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης και τον κ. Τασιόπουλο Γ. Αναστάσιο, καθηγητή του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κύπρου που συμφώνησαν να είναι μέλη της τριμελούς επιτροπής αξιολόγησης της μεταπτυχιακής διπλωματικής μου εργασίας.

Ακολούθως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Ψυχάρη Βασίλειο και την κα. Ραπτοπούλου Π. Κατερίνα, ερευνητές Α ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος για την επίλυση της κρυσταλλικής δομής της ένωσης με ανάλυση Περίθλασης Ακτινών Χ (XRD).

Ευχαριστώ πολύ τους συναδέλφους μου και μέλη του Εργαστηρίου Ανόργανης Βιολογικής Χημείας για τη συνεργασία, τη βοήθεια και τις συμβουλές τους καθ' όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ολόψυχα τους γονείς μου για την αμέριστη υποστήριξη και εμπιστοσύνη που έδειξαν στο πρόσωπο μου, καθώς και τους δικούς μου ανθρώπους και φίλους που στάθηκαν δίπλα μου καθ' όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Περίληψη

Τα τελευταία χρόνια, ο καρκίνος του μαστού είναι ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα της δημόσιας υγείας. Συνεπώς, στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας σχεδιάστηκε ένα νέο χημειοθεραπευτικό μεταλλοφάρμακο, συνδέοντας ένα μιτοχονδριοτροπικό τριάρυλ παράγωγο πνικτιδίων με ένα φάρμακο-οδηγό για τη στοχευμένη χημειοθεραπεία του καρκίνου του μαστού. Συγκεκριμένα, η ένωση $[\text{Cu}(\text{TPP})_3(\text{SAL})]$ (COSAL) συντέθηκε κατά την αντίδραση οξικού χαλκού(II) με το μη στεροειδές αντιφλεγμονώδες φάρμακο (ΜΣΑΦ), ακετυλοσαλικυλικό οξύ (ASPH) και την μιτοχονδριοτροπική ουσία, τριφαινυλοφωσφίνη (TPP) σε διάλυμα τολουολίου/διχλωρομεθανίου (toluene/DCM). Ο χαρακτηρισμός του συμπλόκου έγινε με σημείο τήξεως και τις ακόλουθες φασματοσκοπικές μεθόδους: Φθορισμός Ακτίνων Χ (XRF), Υπέρυθηρη Φασματοσκοπία Μετασχηματισμού Fourier με Αποσβένουσα Ολική Ανάκλαση (ATR-FTIR), Θερμοβαρυντική-Διαφορική Θερμική Ανάλυση/ Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (TG-DTA/ DSC), Υπεριώδους-Ορατού (UV-Vis), Φθορισμού και Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού Πρωτονίου ($^1\text{H-NMR}$). Επίσης, έγινε προσδιορισμός του μοριακού βάρους σε διάλυμα με εφαρμογή της κρυσκοπικής μεθόδου. Η κρυσταλλική δομή επιλύθηκε με Περίθλαση Ακτίνων Χ μονοκρυστάλλου (XRD). Το ορθορομβικό κρυσταλλικό σύστημα της ένωσης αποτελείται από 3 TPP και ένα σαλικυλικό οξύ (SALH_2) που εντάσσονται στο ιόν $\text{Cu}(\text{I})$ μέσω των ατόμων του φωσφόρου και της αποπρωτονιωμένης καρβοξυλικής ομάδας, αντίστοιχα. Ο τύπος του ορθορομβικού πλέγματος είναι $[\text{Cu}(\text{TPP})_3(\text{SAL})]$. Κατά τη βιολογική μελέτη ελέγχθηκε η *in vitro* κυτταροτοξική δράση έναντι θετικών (MCF-7, (HD)) και αρνητικών σε ορμονικούς υποδοχείς (MDA-MB-231, (HI)) ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων του

μαστού, καθώς και η *in vitro* μη τοξική συμπεριφορά σε φυσιολογικά κύτταρα ινοβλαστών του εμβρυϊκού πνεύμονα (MRC-5). Επιπλέον, ερευνήθηκε ο *ex vivo* μοριακός μηχανισμός δράσης ως προς την συγγένεια δέσμευσης με το DNA θύμου αδένα μόσχου (CT-DNA) με μεθόδους ηλεκτρονιακής απορρόφησης (UV-Vis και φθορισμού) και ιξωδομετρία αλλά και ως προς την ανασταλτική δράση του ενζύμου της λιποξυγενάσης (LOX). Τέλος, ο τρόπος αλληλεπίδρασης του COSAL με το CT-DNA επιβεβαιώθηκε με *in silico* πειράματα Μοριακής Πρόσδεσης.

Abstract

In recent years, breast cancer is one of the most important public health problems. Therefore, in the context of the present thesis, a new chemotherapeutic metallodrug was designed by connecting a mitochondriotropic agent (warhead) to a drug-driver for targeted breast cancer chemotherapy. Specifically, the conjugate [Cu(TPP)₃(SAL)] (**COSAL**) was synthesized by reacting of copper(II) acetate with the non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) acetylsalicylic acid (ASPH) and triphenylphosphine (TPP) in toluene/dichloromethane (PhMe/DCM) solution. The **COSAL** was characterized by melting point and spectroscopic methods: X-Ray Fluorescence (XRF), Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR), Thermogravimetric-Differential Thermal Analysis/ Differential Scanning Calorimetry (TG-DTA/ DSC), Ultraviolet-Visible (UV-Vis), Fluorescence and Proton Nuclear Magnetic Resonance (¹H-NMR). The molecular weight of compound was determined by cryoscopic method. The crystal structure was resolved by the single-crystal X-ray diffraction analysis (XRD). The compound is orthorhombic. Three TPP ligands coordinate copper (I) ion through their phosphorus atoms. The coordination sphere is completed by a deprotonated carboxyl oxygen atom from a salicylic acid (SALH₂). The formula of the orthorhombic unit is [Cu(TPP)₃(SAL)]. The biological activity of **COSAL** was clarified by *in vitro* cytotoxicity against hormone-positive (MCF-7) and hormone-negative (MDA-MB-231) human breast cancer cells, while *in vitro* non-toxic behavior was tested in fetal lung fibroblasts (MRC-5) cells. Moreover, *ex vivo* binding affinity study of Calf Thymus (CT)-DNA was assessed by using electron spectroscopy techniques (UV-Vis and fluorescence) and viscometry. In

addition, *ex vivo* inhibitory activity against lipoxygenase (LOX) was determined. Finally, *in silico* Molecular Docking calculations confirm the interaction mode type between COSAL and CT-DNA.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	7
Abstract	9
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	15
Α. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	18
1. Καρκίνος του μαστού.....	18
1.2. Μικροπεριβάλλον όγκου	19
1.3. Τύποι	20
1.4. Μέθοδοι θεραπείας.....	22
1.4.1. Χημειοθεραπεία.....	22
2. Αντικαρκινικά Μεταλλοφάρμακα	25
2.1. DNA	25
2.2. Μιτοχόνδριο	27
2.2.1. Τριφαινυλοφωσφίνη (TPP).....	28
2.3. Απόπτωση	29
2.3.1. Ενδογενής οδός.....	30
2.3.2. Εξωγενής οδός.....	31
3 Φλεγμονή.....	33
3.1. Ορισμός.....	33
3.2. Μηχανισμός Φλεγμονής.....	33
3.2.1. Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs).....	34
3.2.2. Μεταβολισμός Αραχιδονικού Οξέος (AA)	34
3.2.2.1 Οδός Κυκλοοξυγενάσης (COX)	35
3.2.2.2. Οδός Λιποξυγενάσης (LOX)	36
3.2.3. Μεταβολισμός Λινολεϊκού Οξέος (LA).....	38
3.3. Μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (ΜΣΑΦ)	39
3.3.1. Ορισμός	39

3.3.2.	Αναστολή ενζύμων (COX, LOX).....	41
3.3.2.1	Αντιστρεπτή αναστολή	41
3.3.3.	Ασπιρίνη/ σαλικυλικό οξύ.....	44
3.3.4.	Καρκίνος του μαστού-ΜΣΑΦ	45
4.	Χαλκός.....	46
4.1.	Βλάβη στο DNA.....	47
4.2.	Βλάβη στο μιτοχόνδριο	49
4.3.	Αντικαρκινικά μεταλλοφάρμακα Cu με TPP και SALH ₂	51
4.3.1.	Ετεροκυκλικά σύμπλοκα Cu με TPP.....	51
4.3.2.	Ετεροκυκλικά σύμπλοκα Cu με SALH ₂	56
4.3.3.	Ετεροκυκλικά σύμπλοκα Cu με TPP και SALH ₂	57
	B. ΣΚΟΠΟΣ.....	58
	Γ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	60
5.	Υλικά και Μέθοδοι.....	60
5.1.	Χημικά Αντιδραστήρια	60
5.2.	Όργανα	60
6.	Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης.....	62
6.1.	Σύνθεση και κρυστάλλωση	62
6.2.	Σημείο τήξης	63
6.3.	Διαλυτότητα	63
6.4.	Φασματοσκοπία XRF.....	64
6.5.	Κρυσκοπία.....	65
6.6.	XRD	66
6.7.	Φασματοσκοπία ATR-FTIR	67
6.8.	Φασματοσκοπία TG-DTA/DSC.....	68
6.9.	Φασματοσκοπία UV-Vis.....	68
6.10.	Φασματοσκοπία Φθορισμού	69

6.11.	Φασματοσκοπία ¹ H-NMR.....	70
7.	Βιολογικές μελέτες	71
7.1.	Μελέτη της <i>in vitro</i> αντιπολλαπλασιαστικής δραστηριότητας σε MCF-7, MDA-MB-231 και MRC-5 κύτταρα.	71
7.2.	<i>Ex vivo</i> πειράματα	72
7.2.1.	Αλληλεπίδραση COSAL με CT-DNA	72
7.2.1.1.	Μελέτη αλληλεπίδρασης με Φασματοσκοπία UV-Vis	74
7.2.1.2.	Μελέτη της ανταγωνιστικής δράσης του COSAL με το EB με Φασματοσκοπία Φθορισμού.....	75
7.2.1.3.	Μελέτη αλληλεπίδρασης με Ιξωδομετρία	76
7.2.2.	Αλληλεπίδραση του COSAL με την LOX	77
7.2.2.1.	Μελέτη αναστολής της καταλυτικής δράσης του ενζύμου LOX	78
7.2.2.2.	Μελέτη του μηχανισμού του αναστολέα του ενζύμου LOX.....	79
	7.2.2.2.1. Προσδιορισμός τύπου αναστολής (αντιστρεπτή ή μη)	79
	7.2.2.2.2. Προσδιορισμός του είδους του μηχανισμού αντιστρεπτού αναστολέα.....	80
7.3.	<i>In silico</i> πείραμα–Μοριακή Πρόσδεση (Molecular Docking) μεταξύ CT-DNA και COSAL	81
	Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	82
8.	Χημικό μέρος	82
8.1.	Σύνθεση και κρυστάλλωση του COSAL	82
8.2.	Σημείο τήξης	83
8.3.	Διαλυτότητα	83
8.4.	Φασματοσκοπία XRF.....	84
8.5.	Κρυσκοπία.....	85
8.6.	XRD	85
8.7.	ATR-FTIR.....	87
8.8.	TG-DTA/DSC	92

8.9. Φασματοσκοπία UV-Vis.....	93
8.10. Φασματοσκοπία Φθορισμού	94
8.11. Φασματοσκοπία ¹ H-NMR.....	95
8.12. Μελέτες σταθερότητας του COSAL.....	99
8.12.1 Φασματοσκοπία UV-Vis	99
8.12.2. Φασματοσκοπία ¹ H-NMR	99
9. Βιολογικές μελέτες	101
9.1. Μελέτη της <i>in vitro</i> αντιπολλαπλασιαστικής δραστηριότητας σε MCF-7 (HD) και MDA-MB-231 (HI) κύτταρα.....	101
9.2. Μελέτη της <i>in vitro</i> τοξικότητας σε MRC-5 κύτταρα	102
9.3. <i>Ex vivo</i> Αλληλεπίδραση COSAL με CT-DNA	103
9.3.1. Μελέτη αλληλεπίδρασης με φασματοσκοπία UV-Vis.....	103
9.3.2. Μελέτη της ανταγωνιστικής δράσης του COSAL με το EB με Φασματοσκοπία Φθορισμού	109
9.3.3. Μελέτη αλληλεπίδρασης με Ίξωδομετρία	112
9.4. <i>In silico</i> πείραμα–Μοριακή Πρόσδεση (Molecular Docking) μεταξύ CT-DNA και COSAL	114
9.5. <i>Ex vivo</i> αλληλεπίδραση COSAL με LOX.....	116
9.5.1. Μελέτη αναστολής της καταλυτικής δράσης του ενζύμου της LOX.....	116
9.5.2. Μελέτη του μηχανισμού του αναστολέα του ενζύμου LOX.....	118
9.5.2.1. Προσδιορισμός τύπου αναστολής (αντιστρεπτή ή μη).....	118
9.5.2.2. Προσδιορισμός του είδους του μηχανισμού αντιστρεπτού αναστολέα	
120	
E. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	125
ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	127

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

Πίνακας Συντομογραφιών

13-(S)-HPODE	13-(S)-υδροϋπεροξοκταδεκαδιενοϊκό οξύ
¹H-NMR	πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός πρωτονίου
AA	αραχιδονικό οξύ
ADP	διφωσφορική αδενοσίνη
APAF-1	παράγοντας ενεργοποίησης της αποπτωτικής πρωτεάσης 1
ASPH	ακετυλοσαλικυλικό οξύ
ATP	τριφωσφορική αδενοσίνη
ATR-FTIR	υπέρυθρη φασματοσκοπία μετασχηματισμού Fourier με αποσβένουσα ολική ανάκλαση
Bcl-2	πρωτεΐνη 2 των B-λεμφοκυττάρων
BCS	επέμβαση διατήρησης του μαστού
buffer	ρυθμιστικό διάλυμα
CAFs	Ινοβλάστες
CcO	οξειδάση του κυτοχρώματος C
CHCl₃	Χλωροφόρμιο
COX	Κυκλοοξυγενάση
cPLA₂	κυτοσολική φωσφολιπάση A ₂
CT-DNA	DNA θύμου αδένος μόσχου
CuCl₂	χλωριούχος χαλκός(II)
Cyt C	κυτόχρωμα C
dATP	δεοξυ φωσφορική αδενοσίνη
DCM	Διχλωρομεθάνιο
DD	περιοχή θανάτου
ddH₂O	δισ απεσταγμένο νερό
DMEM	θρεπτικό μέσο κυτταροκαλλιέργειας
DMSO	Διμεθυλοσουλφοξείδιο

E	Ένζυμο
EB	αιθίδιο βρωμίδιο
ECM	εξωκυττάρια μήτρα
ER	Οιστρογόνα
Et₂O	Διαιθυλαιθέρας
GSH	Γλουταθειόνη
GSSG	δισουλφίδιο γλουταθειόνης
H₃BO₃	βορικό οξύ
HER2	ανθρώπινος επιδερμικός αυξητικός παράγοντας 2
HPETE	υδροϋπεροξυεικοσατετραενοϊκό οξύ
I	Αναστολέας
IAPs	αναστολείς αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών
LA	λινολεϊκό οξύ
LMS	Λειομυοσάρκωμα
LOX	Λιποξυγενάση
LTs	Λευκοτριένια
MCF-7	κύτταρα αδenoκαρκινώματος του μαστού θετικά σε ορμόνες
MDA-MB-231	κύτταρα αδenoκαρκινώματος του μαστού αρνητικά σε ορμόνες
Me₂CO	Ακετόνη
MeCN	Ακετονοτρίλιο
MeOH	Μεθανόλη
MMP	μιτοχονδριακή μεμβράνη
MOMP	διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης
MRC-5	φυσιολογικά κύτταρα ινοβλαστών του εμβρυϊκού πνεύμονα
NaCl	χλωριούχο νάτριο
MSCs	μεσεγχυματικά κύτταρα
NaOH	καυστικό νάτριο
n-hexane	Εξάνιο
NSAIDs	non steroidal anti-Inflammatory drugs

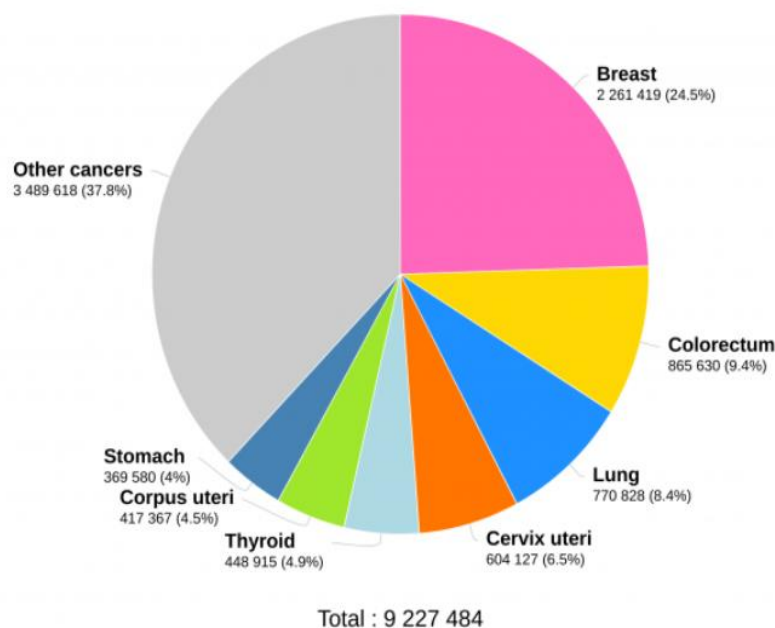
OXPHOS	οξειδωτική φωσφορυλίωση
PAH	πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες
PGI₂	Προστακυκλίνη
PGs	Προσταγλανδίνες
PR	Προγεστερόνες
PUFAs	πολυακόρεστα λιπαρά οξέα
ROS	δραστικές ρίζες οξυγόνου
S	Υπόστρωμα
SALH₂	σαλικυλικό οξύ
SOD	δισμουτάση υπεροξειδίου υδρογόνου
SRB	σουλφοροδαμίνη Β
TBNCs	τριπλά αρνητικοί καρκίνοι του μαστού σε υποδοχείς ορμονών
TCA	τριχλωροξικό οξύ
TG-DTA/ DSC	Θερμοβαρυτική-Διαφορική Θερμική Ανάλυση/ Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης
T_m	θερμοκρασία τήξης
TME	μικροπεριβάλλον όγκου
TMS	Τετραμεθυλοσιλάνιο
TNF-1	υποδοχέας νέκρωσης όγκου-1
TPP	Τριφαινυλοφωσφίνη
TXA₂	θρομβοξάνη A ₂
UV-Vis	υπεριώδες-ορατό
XRD	περίθλαση ακτινών X
XRF	φθορισμός ακτινών X
Δψ_m	δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης
Δψ_p	δυναμικό της πλασματικής μεμβράνης
ΜΣΑΦ	μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα

Α. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Καρκίνος του μαστού

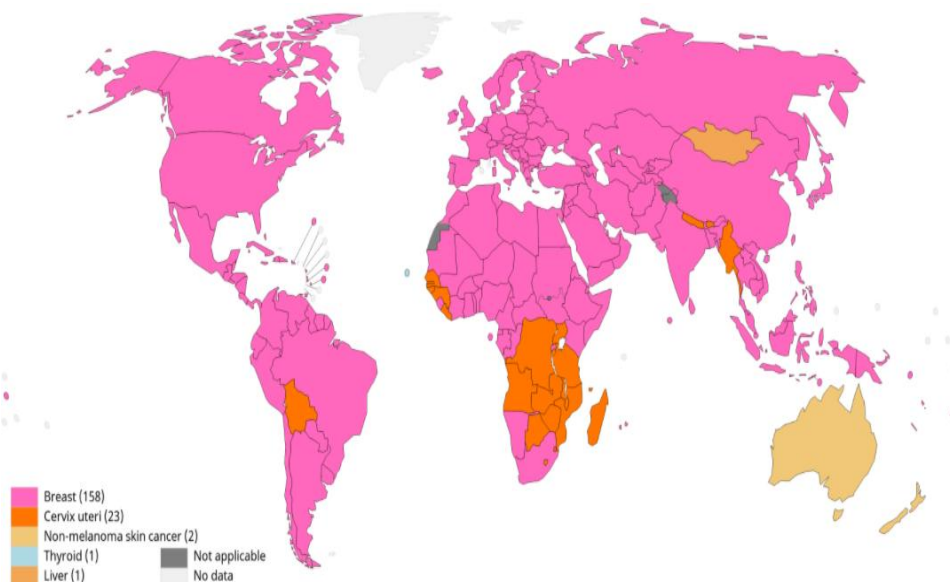
1.1. Ορισμός

Ο καρκίνος του μαστού είναι μία νόσος που οφείλεται στον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό κυττάρων σε μέρη του μαστού όπως είναι ο συνδετικός ιστός, οι λοβοί και οι πόροι. Τα καρκινογόνα κύτταρα, μέσω του λεμφικού συστήματος και των αιμοφόρων αγγείων, μπορούν να αποσπαστούν από τον πρωτοπαθή καρκινικό όγκο και να μεταφερθούν σε άλλα όργανα του σώματος. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται μετάσταση. [1] Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, περίπου 2 εκατομμύρια γυναίκες διαγιγνώσκονται με καρκίνο του μαστού, ετησίως. Το 2020, ο καρκίνος του μαστού χαρακτηρίστηκε ως ο πιο συνηθισμένος τύπος καρκίνου στις γυναίκες, σε παγκόσμια κλίμακα (Εικόνα 1). [2]



Εικόνα 1. Ποσοστά εμφάνισης καρκίνων στις γυναίκες, το 2020. [2]

Αποτελεί σημαντική αιτία θνησιμότητας και εμφανίζεται κυρίως στην Ευρώπη, την Αμερική, την Ασία και την Αφρική (Εικόνα 2). [2]



Εικόνα 2. Ο πιο κοινός τύπος καρκίνου μεταξύ των γυναικών σε κάθε χώρα, το 2020.

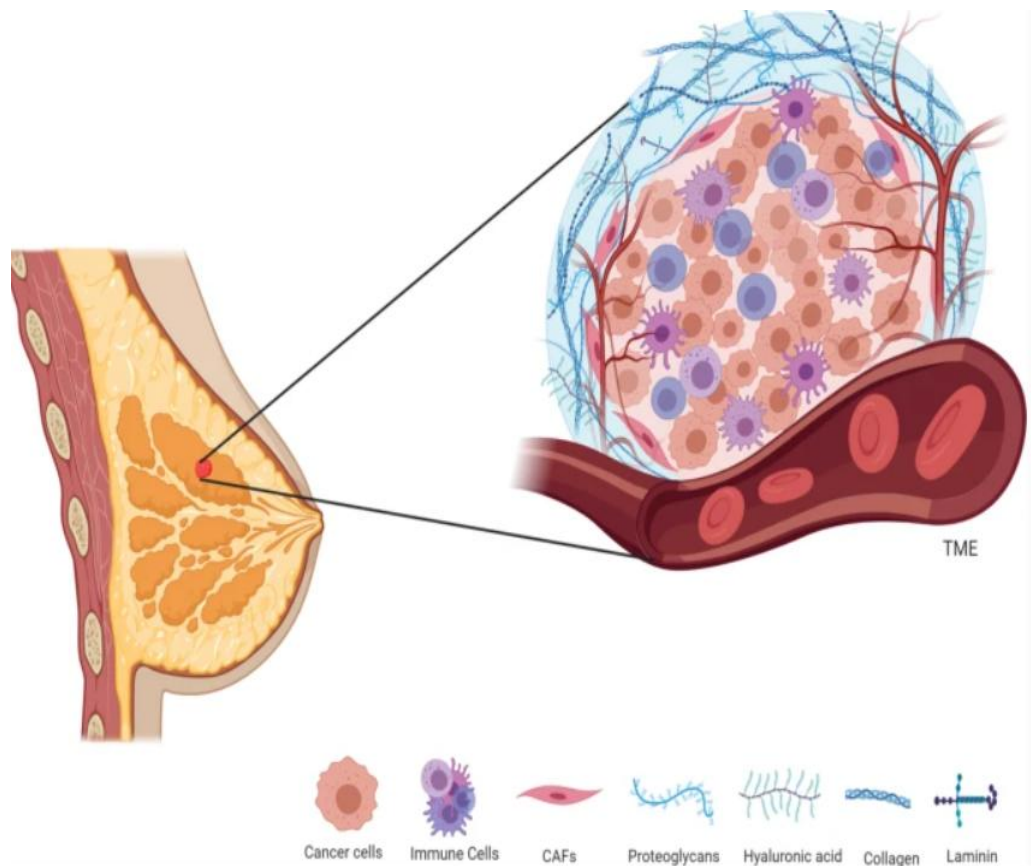
[2]

1.2. Μικροπεριβάλλον όγκου

Ο καρκίνος του μαστού είναι ένας ετερογενής ιστός όγκου που αποτελείται από καρκινικά και μη καρκινικά συστατικά. Συγκεκριμένα, αυτός ο τύπος καρκίνου πρόκειται για ένα οργανωμένο οικοσύστημα που περιλαμβάνει τον όγκο και ένα μικροπεριβάλλον (TME) που υποστηρίζει την εξέλιξη του. [3]

Το TME απαρτίζεται από επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα και μη καρκινικά όπως είναι αιμοφόρα αγγεία, διάφορα στρωματικά κύτταρα όπως είναι οι ινοβλάστες (CAFs), μεσεγχυματικά κύτταρα (MSCs), ανοσοκύτταρα και μη στρωματικά κύτταρα όπως η εξωκυττάρια μήτρα (ECM), η οποία είναι μια βασική μεμβράνη που περιλαμβάνει πρωτεογλυκάνες, ίνες κολλαγόνου και συνδετικές πρωτεΐνες (Εικόνα 3). Παρά τις

εξελιγμένες αντικαρκινικές θεραπείες για τον μαστό, τα συστατικά του TME αλληλεπιδρούν και οδηγούν σε μετάσταση ενώ παράλληλα αντιστέκονται σε φαρμακευτικές αγωγές. [3]



Εικόνα 3. Μικροπεριβάλλον όγκου του μαστού [3]

1.3. Τύποι

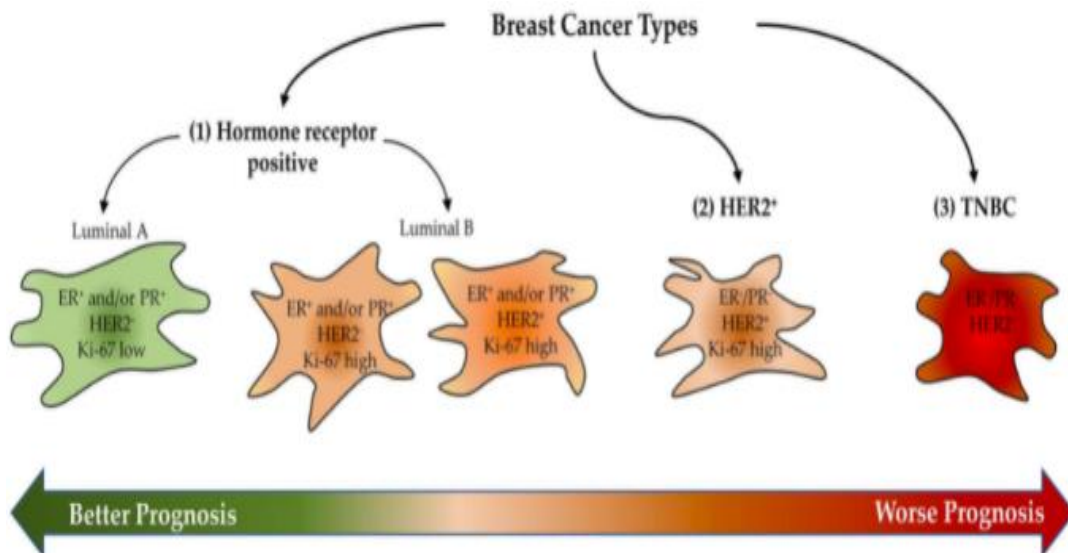
Γενικά, υπάρχουν τρεις τύποι καρκίνου του μαστού που ταξινομούνται ανάλογα με το βαθμό εκδήλωσης και την ορμονική ανταπόκριση. Συγκεκριμένα, είναι:

1. Οι ορμονο-ευαίσθητοι καρκίνοι του μαστού που είναι θετικοί σε υποδοχείς οιστρογόνων (ER+) και προγεστερονών (PR+), οι οποίοι βρίσκονται είτε στο

εσωτερικό είτε στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων, με το μεγαλύτερο ποσοστό εμφάνισης (85%) και την καλύτερη πρόγνωση. [4]

2. Οι εξαρτώμενοι από το γονίδιο που ονομάζεται υποδοχέας ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα 2 (HER2-θετικός) και εκφράζει την πρωτεΐνη HER2, η οποία υφίσταται στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων, που επίσης αναπτύσσονται γρήγορα. [4]
3. Οι τριπλά αρνητικοί σε υποδοχείς ορμονών (TNBCs), δηλαδή οι ER-/PR-/HER2- που εμφανίζονται σπανιότερα αλλά αντιμετωπίζονται πιο δύσκολα. [4]

Ο συνδυασμός των εξαρτώμενων ή μη από τους υποδοχείς καρκίνων του μαστού (ER+, PR+, HER2+ ή ER-, PR-, HER2-) καθώς και της έκφρασης του δείκτη Ki-67, που είναι μια πρωτεΐνη ενδεικτική του ποσοστού των διαιρούμενων των καρκινικών κυττάρων κατατάσσει τον καρκίνο του μαστού σε 5 υπότυπους (Εικόνα 4). [4]



Εικόνα 4. Υπότυποι καρκίνου του μαστού και πρόγνωση [4]

1.4. Μέθοδοι θεραπείας

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι θεραπείας του καρκίνου του μαστού, όπως:

- Χειρουργική θεραπεία
 - i. μαστεκτομή, ή
 - ii. επέμβαση διατήρησης του μαστού (BCS)
- Ακτινοθεραπεία
- Χημειοθεραπεία
- Ορμονοθεραπεία
- Ανοσοθεραπεία

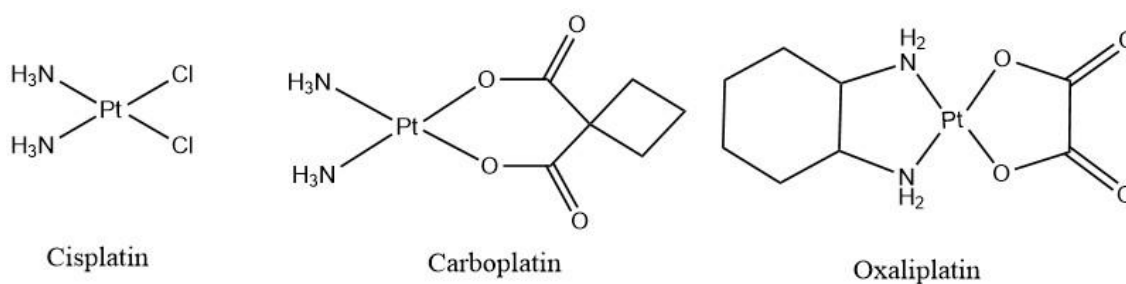
Οι παραπάνω μέθοδοι έχουν ως αποτέλεσμα την τοπική ή την συστηματική θεραπεία του καρκίνου του μαστού. Η τοπική θεραπεία περιλαμβάνει την χειρουργική επέμβαση και την ακτινοθεραπεία, ενώ η συστηματική θεραπεία τη χημειοθεραπεία, την ορμονοθεραπεία και την ανοσοθεραπεία. Η κατάλληλη μέθοδος θεραπείας επιλέγεται ανάλογα με το στάδιο του καρκίνου του μαστού (I-III). Όταν ο καρκίνος βρίσκεται σε πρώιμο στάδιο συνίσταται η τοπική θεραπεία ενώ όταν ο ασθενής διατρέχει υψηλό κίνδυνο υποβάλλεται σε συστηματική θεραπεία. [5]

1.4.1. Χημειοθεραπεία

Η χημειοθεραπεία είναι μια συστηματική φαρμακευτική θεραπεία, κατά την οποία χρησιμοποιούνται χημικές ουσίες (φάρμακα) που δρουν στα καρκινικά κύτταρα με σκοπό να τα καταστρέψουν ή να μειώσουν την ανάπτυξη τους. Η χημειοθεραπεία ταξινομείται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με τη δράση της:

- 1) Επικουρική θεραπεία. Χρησιμοποιείται μετά την χειρουργική επέμβαση για την πρόληψη επανεμφάνισης του καρκίνου του μαστού.
- 2) Νέο-επικουρική θεραπεία. Χρησιμοποιείται πριν από τη χειρουργική επέμβαση για την συρρίκνωση του όγκου.
- 3) Αντιμεταστατική θεραπεία. Καταστροφή καρκινικών κυττάρων και παρεμπόδιση εξάπλωσης αυτών σε άλλα μέρη του σώματος.

Τα κυριότερα φάρμακα που χρησιμοποιούνται είναι οι ανθρακυκλίνες και οι ταξάνες. Η ενσωμάτωση ενός μετάλλου αυξάνει την αντικαρκινική δράση και μειώνει τις παρενέργειες της χημειοθεραπείας. [6]



Σχήμα 1. Συντακτικοί τύποι αντικαρκινικών φαρμάκων με μέταλλο τον λευκόχρυσο.

[7]

Το 1965, ανακαλύφθηκε το πρώτο αντικαρκινικό μεταλλοφάρμακο, η σισπλατίνη από τον B. Rosenberg και στη συνέχεια τα παράγωγα της, καρβοπλατίνη (δεύτερης γενιάς φάρμακο) και οξαλιπλατίνη (τρίτης γενιάς φάρμακο) ως αναστολείς της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων (Σχήμα 1). Οι ενώσεις λευκοχρύσου ενώνονται κατά κύριο λόγο με το ετεροάτομο N7 των πουρινών στο DNA, εμποδίζοντας την αντιγραφή, και προκαλώντας τελικά προγραμματισμένο θάνατο των καρκινικών κυττάρων. Παρά τις κλινικές εφαρμογές, οι ενώσεις αυτές είναι

κυτταροτοξικές και παρουσιάζουν σοβαρές παρενέργειες σε ζωτικά όργανα, όπως τα νεφρά, η καρδιά και το συκώτι. [8]

Λόγω των διαφόρων παρενεργειών, ο κλάδος της επιστήμης έχει στραφεί στην ανάπτυξη νέων μεταλλοφαρμάκων με διαφορετικούς ligand και μέταλλα, με σκοπό να ερευνηθεί η αντικαρκινική τους δράση. [9]

2. Αντικαρκινικά Μεταλλοφάρμακα

Τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα με βάση το μέταλλο μπορούν να συμμετέχουν σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις και να ενώνονται με μεγάλο αριθμό προσδεμάτων ενώ σε αντίθεση με τα οργανικά φάρμακα, τα μεταλλο οργανικά φάρμακα είναι «προφάρμακα» που ενεργοποιούνται σ' ένα σημείο στόχο. [10] Αν και πολλά μεταλλοφάρμακα έχουν σχεδιαστεί για να αλληλεπιδρούν με το γονιδιωματικό DNA και να οδηγούν σε κυτταρικό θάνατο μέσω της απόπτωσης, τα μιτοχόνδρια αποτελούν επίσης κύριο στόχο για τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού, δεδομένου ότι στα καρκινικά κύτταρα ο μιτοχονδριακός μεταβολισμός απορυθμίζεται. [9, 11]

2.1. DNA

Πολλά μέταλλα όπως Ru(III,IV), Fe(II,III), Cu(I,II) κ.α. έχουν αντικαταστήσει τον Pt(II,IV) με σκοπό να ερευνηθεί η αντικαρκινική τους δράση. Τα προαναφερθέντα μέταλλα λόγω του οξειδοαναγωγικού χαρακτήρα παράγουν δραστικές ρίζες οξυγόνου (ROS), οι οποίες μέσω της οξειδωτικής οδού διασπών το DNA. Ταυτόχρονα, μελέτες για άλλα ιόντα μετάλλων όπως το Ce(III,IV) έχουν αποδείξει τη διάσπαση του DNA μέσω της υδρολυτικής οδού. [12]

Το DNA είναι ένα νουκλεϊκό οξύ που έχει ως βιολογικό ρόλο την μεταφορά της γενετικής πληροφορίας. Για το λόγο αυτό, το DNA αποτελεί στόχο πολλών νέων αντικαρκινικών μεταλλοφαρμάκων που αποσκοπούν στην μεταβολή της δομής και κατ' επέκταση της λειτουργίας του. Στο δίκλωνο DNA, οι αζωτούχες βάσεις στοιβάζονται με $\pi^* \leftarrow \pi$ αλληλεπιδράσεις ενώ ταυτόχρονα σχηματίζουν μη ομοιοπολικούς δεσμούς

υδρογόνων (δεσμοί H), μεταξύ των αλυσιδών, σε σταθερή αναλογία 1:1 (αδενίνη/θυμίνη και γουανίνη/κυτοσίνη). Στη φύση, η δομή του δεξιόστροφου B-DNA είναι η πιο κοινή. Σε αυτή τη δομή, ο δακτύλιος του σακχάρου 2'-δεοξυριβόζης έχει διαμόρφωση C2'-ενδό και οι αλληλεπιδράσεις στοιβάξης μεταξύ των νουκλεοβάσεων είναι κάθετα ως προς τον άξονα της διπλής έλικας. [12]

Οι πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μεταλλοφαρμάκων και του DNA μπορεί να είναι είτε μη ομοιοπολικές είτε ομοιοπολικές (Εικόνα 5). [12]

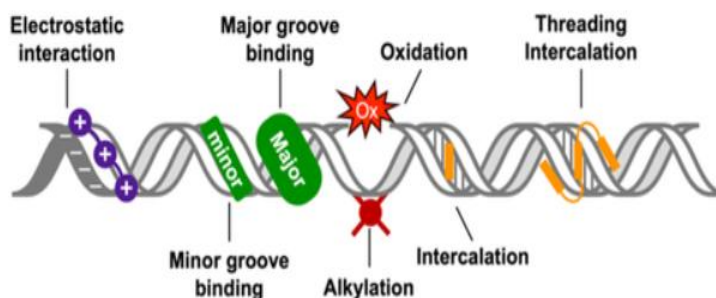
Οι μη ομοιοπολικές αντιστρεπτές αλληλεπιδράσεις ταξινομούνται σε:

1. Ηλεκτροστατικής φύσεως που συμβαίνουν μεταξύ του αρνητικού φορτίου του φωσφοδιεστερικού δεσμού και των θετικά φορτισμένων ιόντων (κατιόντα μετάλλων). Οι ηλεκτροστατικής φύσεως αλληλεπιδράσεις συνήθως συρρικνώνουν το DNA.
2. Δέσμευση σε μικρή ή μεγάλη αύλακα. Γίνεται μέσω δεσμών H και van der Waals με ετεροάτομα νουκλεοβάσεων.
3. Παρεμβολή. Ογκώδεις επίπεδοι αρωματικοί ligands παρεμβάλλονται μέσω υδρόφοβων και $\pi^* \leftarrow \pi$ διαμοριακών αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στις αζωτούχες βάσεις. Συνεπώς, αυξάνεται το βήμα της διπλής έλικας του DNA και ξετυλίγεται. [12]

Οι ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις αφορούν μία χημική αντίδραση με το DNA, η οποία προκαλεί μόνιμη αλλοίωση της δομής του DNA και μη αντιστρεπτή αναστολή της αντιγραφής του DNA, μεταγραφής σε RNA και μετάφρασης σε πρωτεΐνες. Οι χημικές αντιδράσεις που συμβαίνουν ταξινομούνται σε:

1. Αλκυλίωση. Πυρηνόφιλη αντίδραση με ετεροάτομα των πουρινών.

2. Μετάλλωση. Ορισμένα ligands μεταλλικών συμπλόκων υποκαθίστανται με νουκλεοβάσεις.
3. Οξειδωση. Παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) οι οποίες δρουν είτε στη διεπιφάνεια του DNA οπότε προκαλούν μεταλλάξεις είτε στη δεοξυριβόζη, μέσω της υδρολυτικής και της οξειδωτικής οδού αποικοδομούν το DNA. [12]



Εικόνα 5. Τρόποι δέσμευσης φαρμάκου-DNA. [12]

2.2. Μιτοχόνδριο

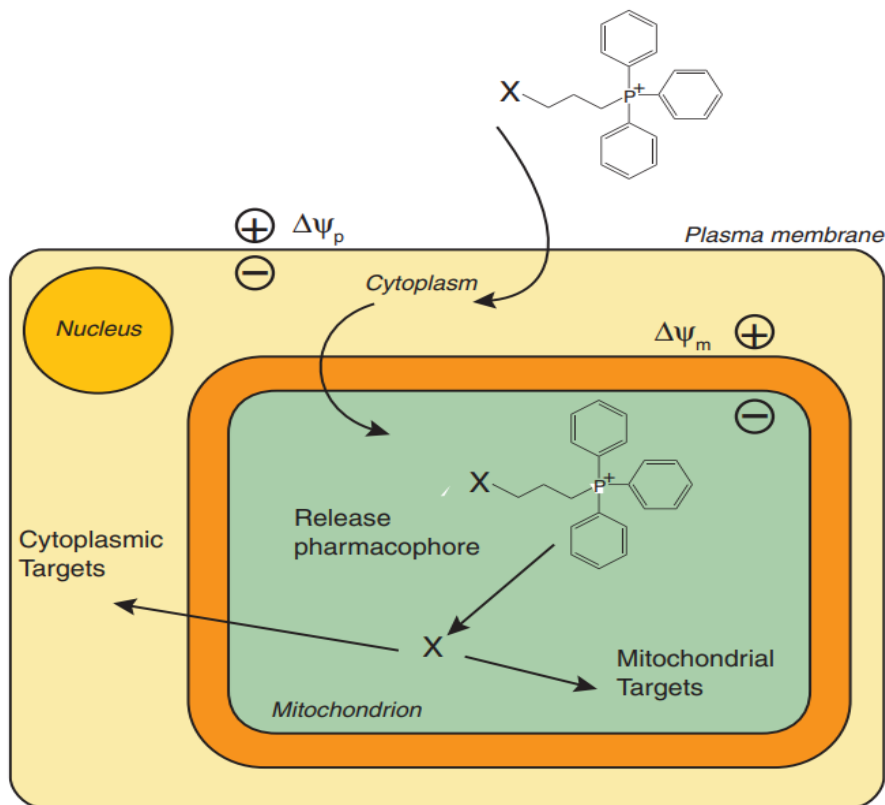
Το μιτοχόνδριο είναι βασικό οργανίδιο ενός ευκαρυωτικού κυττάρου, το οποίο διεξάγει σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες, όπως είναι η παραγωγή τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), που αποτελεί πηγή ενέργειας για την κυτταρική αναπνοή. Μία άλλη βιολογική λειτουργία του μιτοχονδρίου είναι η απελευθέρωση προ-αποπτωτικών παραγόντων, όπως το κυτόχρωμα C (Cyt C), στην ενδογενή αποπτωτική οδό. [13]

Σύμφωνα με το φαινόμενο Warburg, τα καρκινικά κύτταρα απαιτούν υψηλότερη ενέργεια για να επιβιώσουν σε σύγκριση με τα υγιή κύτταρα. Η ενέργεια προέρχεται από την οξειδωτική φωσφορυλίωση (OXPHOS) της διφωσφορικής αδενοσίνης (ADP) σε ATP στα μιτοχόνδρια. Επιπλέον, οι μιτοχονδριακές μεμβράνες των καρκινικών

κυττάρων έχουν υψηλότερο αρνητικό δυναμικό σε σύγκριση με αυτές των φυσιολογικών κυττάρων. Αυτή η υπερπόλωση μπορεί να οφείλεται στα αυξημένα ενδοκυτταρικά επίπεδα ιόντων ασβεστίου Ca^{2+} και στην άνοδο της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης 2 των Β-λεμφοκυττάρων (Bcl-2) στα καρκινικά κύτταρα. Συνεπώς, θεμελιώνεται ο σχεδιασμός νέων χημειοθεραπευτικών μεταλλοφαρμάκων που στοχεύουν στην αποσταθεροποίηση των μιτοχονδριακών μεμβρανών, στην καταστροφή του μιτοχονδριακού DNA, στην αύξηση του οξειδωτικού στρες και στην ενεργοποίηση προ-αποπτωτικών παραγόντων με σκοπό να πυροδοτηθεί η προγραμματισμένη οδός θανάτου των καρκινικών κυττάρων, η απόπτωση. [14]

2.2.1. Τριφαινυλοφωσφίνη (TPP)

Για το σχεδιασμό μεταλλο οργανικών συμπλοκών που διαθέτουν αντικαρκινική δράση, ο προσδέτης διαθέτει σημαντικό ρόλο στη λιπόφιλη ή υδρόφιλη ισορροπία με αποτέλεσμα να τροποποιεί τις μαλακές ή σκληρές ιδιότητες ενός μετάλλου, αυξάνοντας τη διαλυτότητά τους και ενισχύοντας τις κυτταρικές διεργασίες που επιτελούνται. Η λιποφιλία ενός φαρμάκου βοηθά στη διαπερατότητα των βιολογικών μεμβρανών. Επομένως, ένας αποτελεσματικός τρόπος μεταφοράς φαρμάκων στα μιτοχόνδρια είναι η σύνδεση ενός φαρμάκου με λιπόφιλα κατιόντα TPP που βιοσυσσωρεύονται στην αρνητικά φορτισμένη μιτοχονδριακή μεμβράνη, λόγω της μιτοχονδριοτροπικής τους δραστηριότητας. [15, 16]

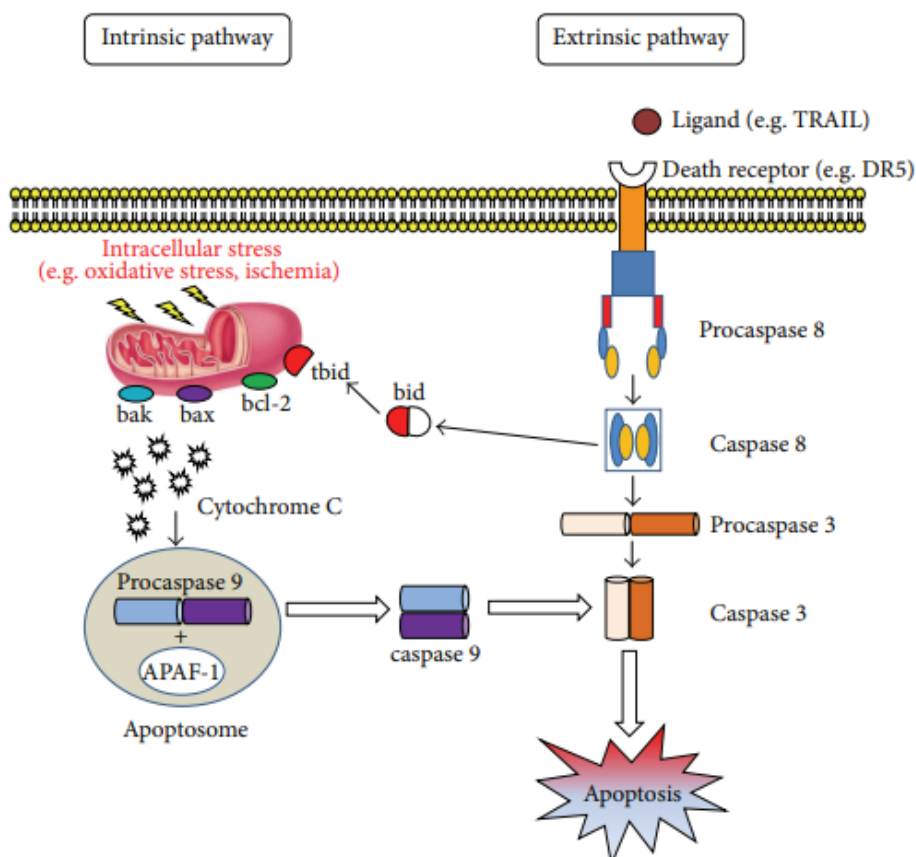


Εικόνα 6. Μία ένωση (προ-φάρμακο) που στοχεύει στο μιτοχόνδριο, εισέρχεται μέσα στο κύτταρο και οδηγείται από το δυναμικό της πλασματικής μεμβράνης ($\Delta\psi_p$) στο δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης ($\Delta\psi_m$) μέσω του κυτταροπλάσματος. Η ένωση αυτή αποτελείται από την TPP συνδεδεμένη με ένα φάρμακο X, το οποίο μόλις εισέλθει στο μιτοχόνδριο απελευθερώνεται και δρα στον εκάστοτε στόχο. [17]

2.3. Απόπτωση

Η απόπτωση είναι ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος που έχει ως αποτέλεσμα την μορφολογική αλλαγή και την αποικοδόμηση του DNA. Σε αντίθεση με την νέκρωση, δεν προκαλείται φλεγμονή στον περιβάλλοντα ιστό του κυττάρου, διότι δεν διασπάται η κυτταρική μεμβράνη. Είναι μία διαδικασία κατά την οποία

συρρικνώνεται και κατακερματίζεται τόσο ο πυρήνας όσο και το κύτταρο μέσω της ενδογενούς ή της εξωγενούς οδού. Συνεπώς, πολλές χημειοθεραπείες για τον καρκίνο του μαστού στοχεύουν στην εκμετάλλευση αυτών των δύο αποπτωτικών μονοπατιών. [18]



Εικόνα 7. Ενδογενής και εξωγενής οδός απόπτωσης [19]

2.3.1. Ενδογενής οδός

Η χημειοθεραπεία προκαλεί προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο μέσω του ενδογενούς αποπτωτικού μονοπατιού (Εικόνα 7). Στην ενδογενή οδό, η απόπτωση σηματοδοτείται από την διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης (MOMP),

οπότε απελευθερώνεται το Cyt C στο κυτταρόπλασμα. Στη συνέχεια, το Cyt C και η δεοξυ-τριφωσφορική αδενοσίνη (dATP) συνδέονται με τον παράγοντα ενεργοποίησης της αποπτωτικής πρωτεάσης 1 (APAF), σχηματίζοντας ένα απόπλωμα. Αυτό το πολυμερές σύμπλοκο οδηγεί την υδρόλυση του ATP, που διασπά και ενεργοποιεί την προκασπάση-9 σε κασπάση-9. Έπειτα, η κασπάση-9 διασπά και ενεργοποιεί τις εκτελεστικές κασπάσες-3/6/7. Οι κασπάσες-3/7 αναστέλλουν την επιδιόρθωση του DNA και επάγουν τον κατακερματισμό του. Επιπλέον, η κασπάση-6 διασπά τον κυτταροσκελετό. Παράλληλα, το μιτοχόνδριο εκκρίνει μια πρωτεΐνη Smac/DIABLO στο κυτταρόπλασμα, η οποία σταματά την δράση των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών (IAPs). Η Bcl-2 συμβάλλει είτε στην ενεργοποίηση της προ-αποπτωτικής είτε στην αναστολή της αντι-αποπτωτικής διαδικασίας. Στα καρκινικά κύτταρα η σηματοδότηση από το γονίδιο p53, μετά από βλάβη του DNA, οδηγεί σε απόπτωση, διότι ενεργοποιεί την προ-αποπτωτική πρωτεΐνη Bax, η οποία σχηματίζει ετερομερή με την Bcl-2. Η αναλογία Bcl-2/Bax καθορίζει την επιβίωση ή τον κυτταρικό θάνατο. [19]

Τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα στοχεύουν κατά κύριο λόγο στην απόπτωση των καρκινικών κυττάρων μέσω του ενδογενούς μιτοχονδριακού μονοπατιού, γι' αυτό και απαραίτητη είναι η MOMP. Αν και κάποια καρκινικά κύτταρα αντιστέκονται στη χημειοθεραπεία λόγω κάποιων αλλαγών στο γονίδιο p53, το ενδογενές μιτοχονδριακό αποπτωτικό μονοπάτι αντιπροσωπεύει έναν πολλά υποσχόμενο στόχο για νέες χημειοθεραπείες. [19]

2.3.2. Εξωγενής οδός

Η εξωτερική οδός ενεργοποιείται μέσω του υποδοχέα θανάτου (Εικόνα 7). Ο υποδοχέας νέκρωσης όγκου-1 (TNF-1), που βρίσκεται στην εξωτερική επιφάνεια του

κυττάρου, αλληλεπιδρά με έναν ligand που σχετίζεται με τον TNF-1 (TRAIL). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την στρατολόγηση των πρωτεϊνών προσαρμογής όπως είναι η πρωτεΐνη Fas που σχετίζεται με την περιοχή θανάτου (FADD) και η πρωτεΐνη που σχετίζεται με τον TNF-1 και την περιοχή θανάτου (TRADD). Η περιοχή θανάτου (DD), που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και αποτελείται από 80 αμινοξέα (κυρίως κυστεΐνη), είναι υπεύθυνη για την μετάδοση του σήματος από την εξωτερική επιφάνεια στις ενδοκυττάριας οδούς σηματοδότησης. Στη συνέχεια, ενεργοποιούνται οι προκασπάσες-8/10 σε κασπάσες-8/10, οι οποίες παρουσιάζουν διττό ρόλο. Είτε μπορούν να ενεργοποιήσουν την προκασπάση-3 σε κασπάση-3 και να προκληθεί απευθείας απόπτωση, είτε να απελευθερώσουν την προ-αποπτωτική πρωτεΐνη BID, η οποία ενεργοποιεί την ενδογενή αποπτωτική οδό. [20]

3 Φλεγμονή

3.1.Ορισμός

Η φλεγμονή είναι ένας αμυντικός μηχανισμός κατά τον οποίο ο ανθρώπινος οργανισμός προσπαθεί να προστατευθεί από επιβλαβή ερεθίσματα και να διατηρήσει την κυτταρική ομοιόσταση. Η φλεγμονή μπορεί να ταξινομηθεί είτε σε οξεία είτε σε χρόνια ανάλογα με την χρονική διάρκεια. Η οξεία φλεγμονή διαρκεί από λεπτά έως μέρες, αλλά αν η ίδια εμφανίζεται ανεξέλεγκτα, εξελίσσεται σε χρόνια φλεγμονή. Η χρόνια φλεγμονή έχει ως συνέπεια την μόνιμη κυτταρική βλάβη και την αναπαραγωγή κάποιας ασθένειας όπως είναι ο καρκίνος, το Alzheimer, ο διαβήτης κ.α. [21]

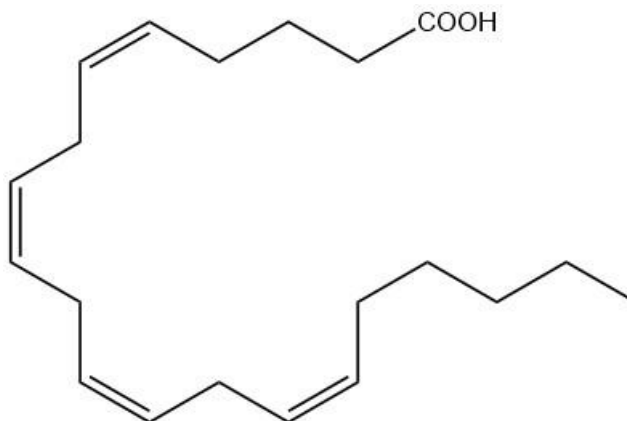
3.2.Μηχανισμός Φλεγμονής

Το ανοσοποιητικό σύστημα αφού αναγνωρίσει παθογόνους μικροοργανισμούς, τοξικές ενώσεις, ακτινοβολία και κατεστραμμένα κύτταρα, εκκινεί την φλεγμονώδη απόκριση. Η διαδικασία αυτή περιγράφεται από τη διαστολή αιμοφόρων αγγείων, την έκκριση ανοσοκυττάρων και πρωτεϊνών πλάσματος που χρησιμοποιούνται ως πηκτικές ουσίες. Έπειτα, ακολουθεί η επανορθωτική φάση (αναγέννηση του τραυματισμένου ιστού) και η φάση αναδιαμόρφωσης (ωρίμανση νέου ιστού). [22] Η φλεγμονώδης απόκριση είναι απόρροια της ενεργοποίησης των οδών που ρυθμίζουν τα επίπεδα φλεγμονωδών μεσολαβητών σε κυτταρικούς ιστούς. [23]

3.2.1. Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs)

Τα PUFAs περιέχουν τουλάχιστον δύο διπλούς δεσμούς και είναι δομικά συστατικά της κυτταρικής μεμβράνης. Το απλούστερο ωμέγα-6 PUFA είναι το λινολεϊκό οξύ (LA) το οποίο μεταβολίζεται από ορισμένα ένζυμα όπως οι κυκλοοξυγενάσες (COX) και οι λιποξυγενάσες (LOX) σε αραχιδονικό οξύ (AA). Με την οξείδωση του AA συντίθενται λιπιδικοί μεταβολίτες, εικοσανοειδή που ρυθμίζουν την διαδικασία της φλεγμονής. Συνεπώς, η μείωση των φλεγμονώδων μεταβολιτών που παράγονται από τον μεταβολισμό των ω-6 PUFAs αντιμετωπίζει τον καρκίνο του μαστού μέσω του μηχανισμού της φλεγμονής και του οξειδωτικού στρες. [24,25,26]

3.2.2. Μεταβολισμός Αραχιδονικού Οξέος (AA)



Σχήμα 2. Συντακτικός τύπος αραχιδονικού οξέος [28]

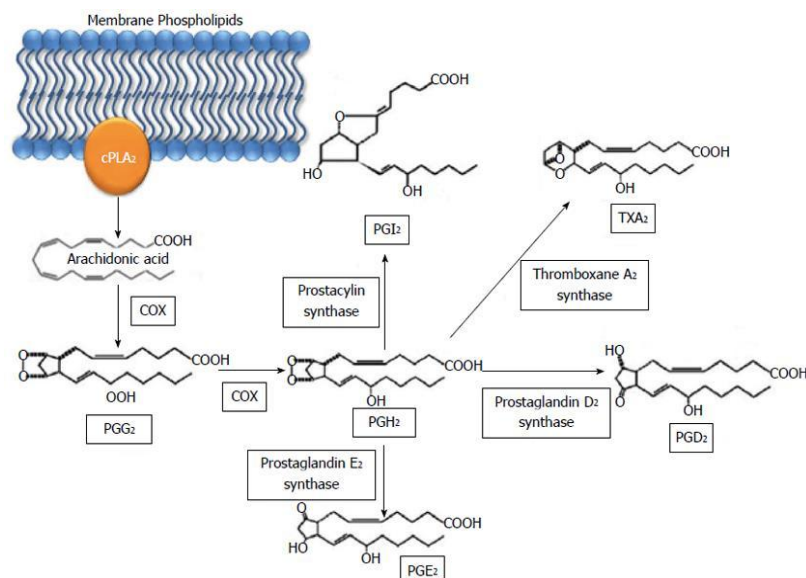
Το AA (Σχήμα 2) είναι ένα ω-6 τετραακόρεστο λιπαρό οξύ, που αποτελεί βασικό συστατικό των φωσφολιπιδίων στην κυτταρική μεμβράνη του ανθρώπινου οργανισμού. [28]

Όταν κάποιο εξωτερικό ερέθισμα εκκινεί τη διαδικασία της φλεγμονής, η κυτοσολική φωσφολιπάση A_2 (cPLA₂), διασπά το AA από τα φωσφολιπίδια. Η cPLA₂ είναι ένα ένζυμο υδροξυλάσης που υδρολύει τον εστερικό sn-2 εστερικό δεσμό των γλυκεροφωσφολιπιδίων. Αποτέλεσμα της υδρόλυσης αυτής είναι η απελευθέρωση ελεύθερων λιπαρών οξέων (όπως το AA) και λυσοφωσφολιπιδίων. [24] Έπειτα, το AA δρα ως υπόστρωμα των ενζύμων COX και LOX και μεταβολίζεται σε προσταγλανδίνες (PGs) και λευκοτριένια (LTs), αντιστοίχως. [25]

3.2.2.1 Οδός Κυκλοοξυγενάσης (COX)

Τα ένζυμα της COX είναι μονοτοπικές μεμβρανικές πρωτεΐνες και υπάρχουν σε δύο βασικές μορφές, COX-1 και COX-2. Η COX-1 είναι απαραίτητη για την ομοιόσταση του βιολογικού συστήματος, ενώ η υπερέκφραση της COX-2, που προέρχεται από κυτοκίνες και αυξητικούς παράγοντες στο σημείο φλεγμονής, επάγει την καρκινογένεση. [21,29]

Η COX-1 και COX-2 δρουν στο υπόστρωμα του AA και σχηματίζουν την προσταγλανδίνη G₂ (PGG₂), παρουσία οξυγόνου. Με την COX, η PGG₂ ανάγεται σε προσταγλανδίνη H₂ (PGH₂), η οποία διασπάται ταχέως με τις αντίστοιχες συνθάσες σε προσταγλανδίνες E₂/D₂ (PGE₂/PGD₂), θρομβοξάνη A₂ (TXA₂) και προστακυκλίνη (PGI₂) (Εικόνα 8). [29] Η TXA₂ συστέλλει τα αιμοφόρα αγγεία και συσσωρεύει τα αιμοπετάλια, ενώ οι PGI₂ και PGE₂ λειτουργούν ακριβώς αντίθετα, με αποτέλεσμα να αυξάνουν τη ροή του αίματος στις φλεγμονώδεις περιοχές. [21]



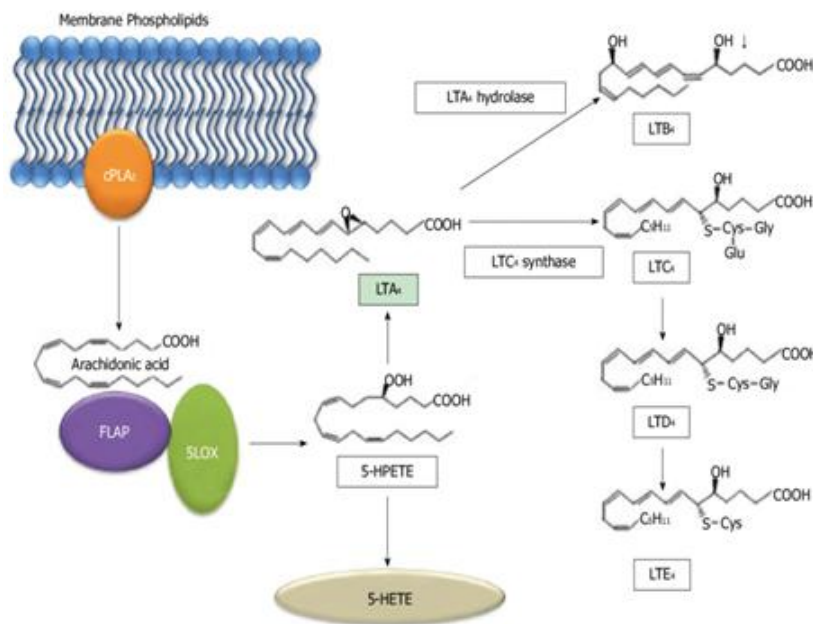
Εικόνα 5. Μεταβολισμός του αραχιδονικού οξέος σε προσταγλανδίνες μέσω της οδού της κυκλοοξυγενάσης. [29]

3.2.2.2. Οδός Λιποξυγενάσης (LOX)

Οι LOX ανήκουν στην οικογένεια των μη αιμικών διοξυγενασών σιδήρου και καταλύουν την οξειδωση των PUFAs σε προϊόντα που σχετίζονται με τις φλεγμονώδεις αποκρίσεις. Η LOX βρίσκεται κυρίως στο μιτοχόνδριο στο οποίο εδράζεται ο μηχανισμός της φλεγμονής. Το ένζυμο της LOX, ανάλογα με τη θέση εισαγωγής του οξυγόνου στον άνθρακα των λιπαρών οξέων υφίσταται σε τέσσερις κοινές μορφές, την 5/8/12/15-LOX. Επομένως, η εξειδίκευση της LOX να δεσμεύεται σε ένα υπόστρωμα, είτε είναι το LA είτε το AA, εξαρτάται από την μορφή της. Η αναστολή της LOX βρέθηκε ότι οδηγεί σε απόπτωση των καρκινικών κυττάρων. [21, 29,30]

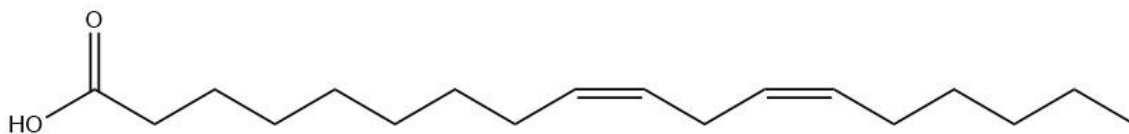
Η 5-LOX δεσμεύεται στο AA οπότε σχηματίζεται το υδροϋπεροξυεικοσατετραενοϊκό οξύ (HPETE) και απελευθερώνονται LTs. Αρχικά, η 5-

LOX ενώνεται με μια ενσωματωμένη πρωτεΐνη στην πυρηνική μεμβράνη, την FLAP η οποία συμβάλλει στην οξυγόνωση της C5-θέσης του AA και στην αφυδάτωση του ενδιάμεσου προϊόντος HPETE σε ένα ασταθές εποξειδίου, το LTA₄. Το LTA₄ μεταβολίζεται σε LTB₄ με το ένζυμο της υδρολάσης είτε σε LTC₄ με τη σύζευξη της γλουταθειόνης μέσω το ενζύμου, LTC₄ συνθάση. Στη συνέχεια, το LTC₄ απομακρύνοντας το γλουταμικό οξύ, μετατρέπεται σε LTD₄ και με την προσθήκη γλυκίνης τελικά παράγεται το LTE₄ (Εικόνα 9). Τα LTC₄, LTD₄ και LTE₄ αποτελούν μεσολαβητές της φλεγμονής. [21,30]



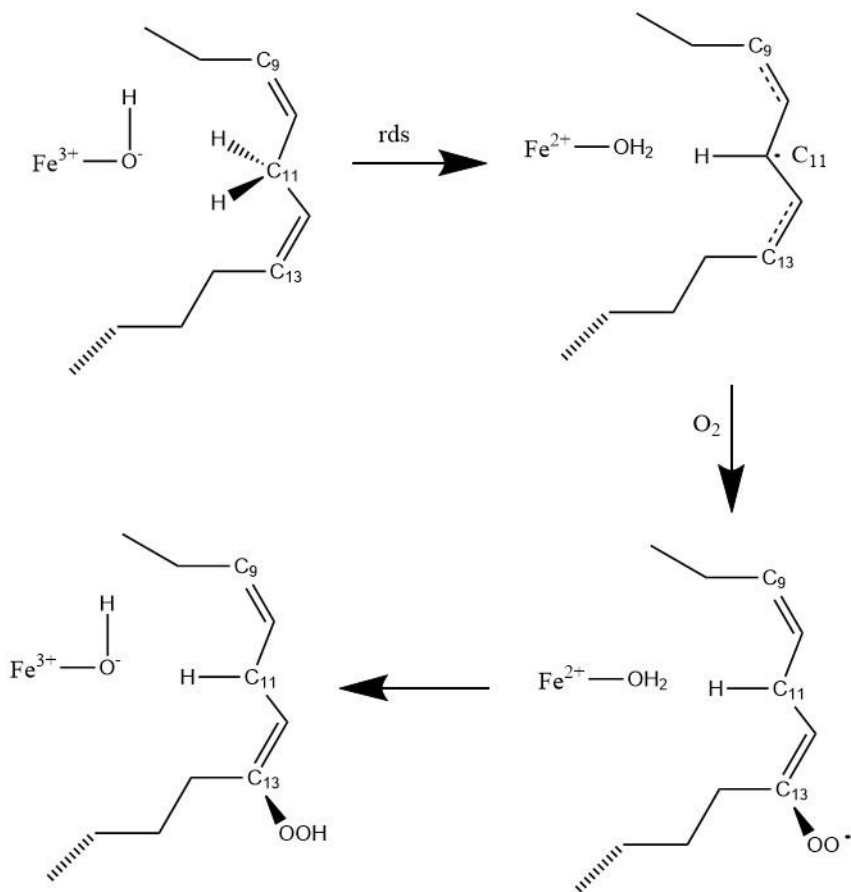
Εικόνα 9. Μεταβολισμός του αραχιδονικού οξέος σε λευκοτριένια μέσω της οδού της λιποξυγενάσης [30]

3.2.3. Μεταβολισμός Λινολεϊκού Οξέος (LA)



Σχήμα 3. Συντακτικός τύπος λινολεϊκού οξέος [31]

Το LA διαφέρει ως προς τον αριθμό ατόμων C και ως προς τον βαθμό ακορεστότητας σε σύγκριση με το AA (Σχήμα 3). [32]



Σχήμα 4. Καταλυτικός μηχανισμός υδροϋπεροξειδωσης του λινολεϊκού οξέος από το ένζυμο 15-LOX-1. [32]

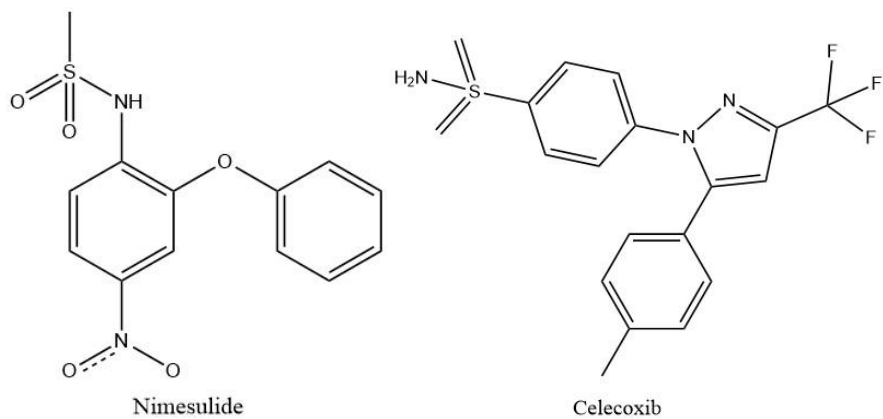
Η 15-LOX-1 μεταβολίζει κυρίως το LA. Αρχικά, ο συμπαράγοντας Fe(III)-OH⁻ δεσμεύει στερεοεκλεκτικά ένα H από τον C₁₁ του LA και σχηματίζεται μία ρίζα και ταυτόχρονα ανάγεται σε Fe(II). Στο δεύτερο στάδιο, ακολουθεί η τοποστεροειδική προσθήκη μοριακού οξυγόνου στον C₁₃ του πενταδιενυλίου οπότε σχηματίζεται οξυγονοκεντρική υπεροξυ ρίζα. Τελικά, στο τρίτο στάδιο γίνεται μεταφορά υδρογόνου από το Fe(II)-OH₂ στην ρίζα του υπεροξυλίου και σχηματίζεται το 13-(S)-υδροϋπεροξυοκταδεκαδιενοϊκό οξύ (13-(S)-HPODE) και ο Fe(II) οξειδώνεται σε Fe(III) (Σχήμα 4). [33]

3.3. Μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (ΜΣΑΦ)

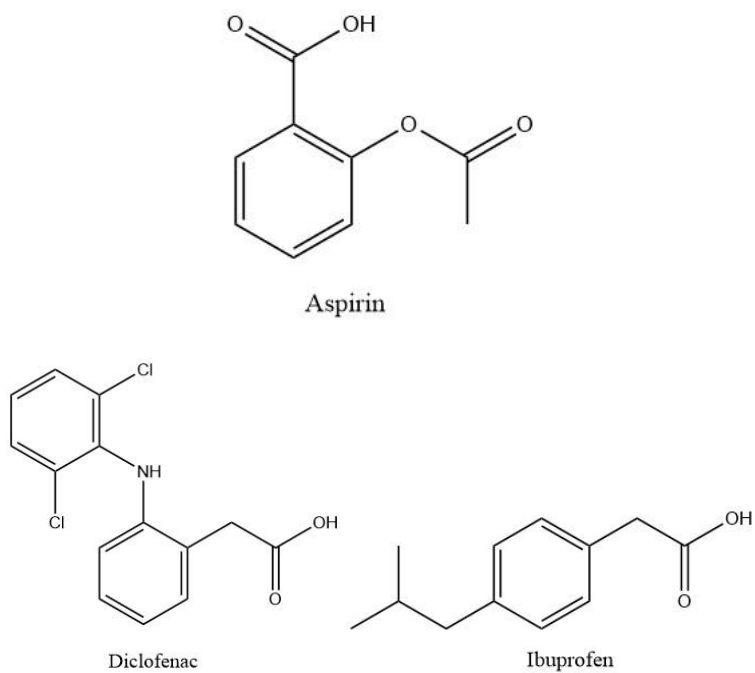
3.3.1. Ορισμός

Τα ΜΣΑΦ διαθέτουν αναλγητικές ιδιότητες και παρουσιάζουν σημαντική αντιφλεγμονώδη δράση σε χρόνιες διαταραχές, όπως ο καρκίνος. [25] Τα ΜΣΑΦ είναι οργανικές ενώσεις με υδρόφοβο χαρακτήρα, ο οποίος διευκολύνει την διαπερατότητα τους στη μιτοχονδριακή μεμβράνη σε σημεία φλεγμονής και την κατεύθυνση τους προς τα ένζυμα της COX και της 5-LOX, σημειώνοντας ανασταλτική δράση. [34]

Η ταξινόμηση των ΜΣΑΦ γίνεται ανάλογα με τις χημικές ιδιότητες τους και την εκλεκτικότητα τους στην COX-2 (Σχήμα 5) ή μη (Σχήμα 6). [34]



Σχήμα 5. Μοριακές δομές ορισμένων αντιπροσωπευτικών ΜΣΑΦ εκλεκτικών αναστολέων της COX-2. [34]



Σχήμα 6. Συντακτικοί τύποι ορισμένων αντιπροσωπευτικών ΜΣΑΦ αναστολέων και των δύο μορφών της COX (COX-1 και COX-2).[34]

3.3.2. Αναστολή ενζύμων (COX, LOX)

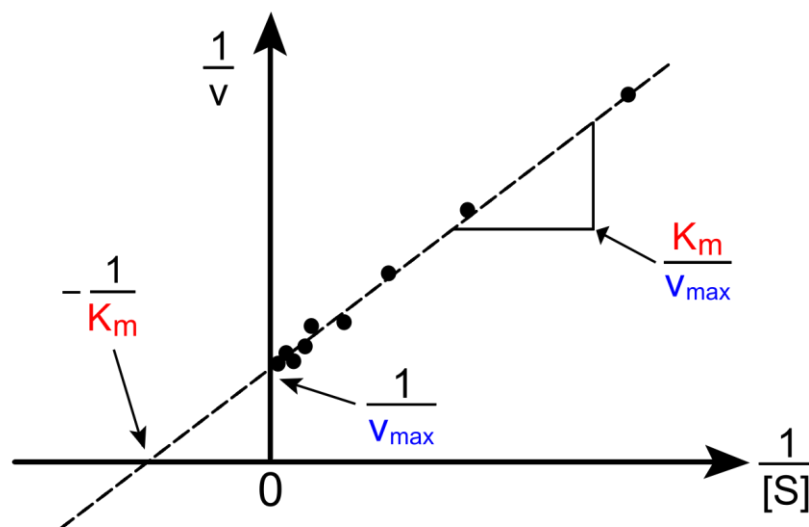
Οι αναστολείς ΜΣΑΦ μειώνουν τον ρυθμό κατάλυσης των ενζύμων και μπορεί να αναστέλλουν αντιστρεπτά ή μη αντιστρεπτά τις COX, LOX:

1. Μη αντιστρεπτή αναστολή. Συμβαίνει ομοιοπολική αλληλεπίδραση των ΜΣΑΦ με το εκάστοτε ένζυμο οπότε η ενζυματική δραστηριότητα δεν αναδημιουργείται.
2. Αντιστρεπτή αναστολή. Μη ομοιοπολική αλληλεπίδραση με το ένζυμο και στη συνέχεια απελευθέρωση από αυτό, οπότε στο ένζυμο πλέον επανέρχεται ο αρχικός καταλυτικός του ρόλος. [35]

3.3.2.1 Αντιστρεπτή αναστολή

Οι τιμές των K_m και V_{max} μπορούν να υποδείξουν το είδος του μηχανισμού αναστολής του ενζύμου. [35]

Οι K_m και V_{max} απορρέουν από τις ταχύτητες κατάλυσης που μετρώνται σε μια ποικιλία συγκεντρώσεων του [S] και υπολογίζονται από την γραφική παράσταση Lineweaver-Burk $1/V=f(1/[S])$, η οποία είναι η μετασχηματισμένη εξίσωση Michaelis-Menten (Εικόνα 10). [35]



Εικόνα 10. Γραφική παρασάση Lineweaver-Burk.[36]

Όταν η αναστολή είναι αντιστρεπτή ταξινομείται σε τέσσερις υποκατηγορίες (Εικόνα 11):

1) Competitive inhibition

Ο αναστολέας (I) συναγωνίζεται με το υπόστρωμα (S) για το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Σε αυτή την περίπτωση, υπάρχουν δύο τύποι συμπλεγμάτων: αναστολέας ενζύμου (EI) και ενζυμικό υπόστρωμα (ES). Το σύμπλοκο EI δεν έχει ενζυμική δραστηριότητα. Το S και ο I δεν μπορούν να συνδεθούν με το E ταυτόχρονα. Το αποτέλεσμα ενός συναγωνιστικού αναστολέα είναι να αυξήσει τη φαινομενική τιμή K_m . Ένα ένζυμο θα έχει την ίδια τιμή V_{max} όταν υπάρχει competitive αναστολέας καθώς και όταν δεν υπάρχει. [35]

2) Uncompetitive inhibition

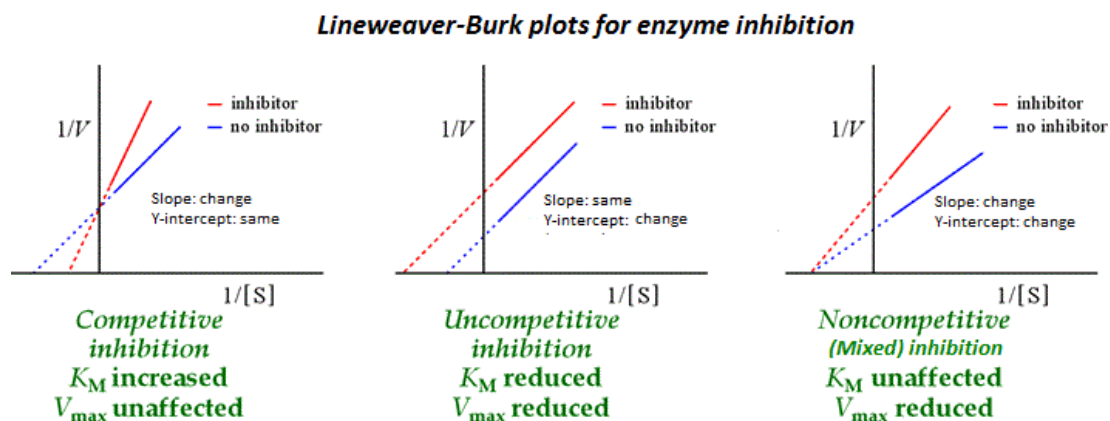
Ο I προσδένεται στο σύμπλεγμα υποστρώματος-ενζύμου (ES) και γίνεται σύμπλοκο ESI. Το ESI δε δίνει κάποιο προϊόν. Δεν παρεμβαίνει στη δέσμευση του S με τη δραστική θέση, αλλά αποτρέπει τη διάσπαση του ESI. Αυτός ο τύπος αναστολής προκαλεί ταυτόχρονη μείωση V_{max} και K_m . [35]

3) Non-competitive inhibition

Ο Ι δεσμεύεται στο Ε ή στο ES. Η δέσμευση του Ι με το Ε μειώνει τη δραστηριότητά του αλλά δεν επηρεάζει τη σύνδεση του S. Ως αποτέλεσμα, η έκταση της αναστολής εξαρτάται μόνο από τη συγκέντρωση του αναστολέα. Ωστόσο, το ESI δεν παράγει προϊόν. Σε αυτήν την περίπτωση, το V_{max} θα μειωθεί, αλλά το K_m θα παραμείνει σταθερό (Εικόνα 11). [35]

4) Mixed inhibition

Η mixed inhibition είναι ένα μίγμα competitive και uncompetitive inhibition. Ο Ι μπορεί να συνδεθεί με το Ε και ταυτόχρονα με το ES. Οπότε σχηματίζονται τα EI και ESI. Ωστόσο, η δέσμευση του Ι επηρεάζει τη δέσμευση του S και αντίστροφα. Αυτός ο τύπος αναστολής μπορεί να μειωθεί, αλλά όχι να ξεπεραστεί με την αύξηση των συγκεντρώσεων του υποστρώματος. Αν και γενικά μπορεί οι αναστολείς μικτού τύπου να δεσμεύονται στη δραστική θέση, αυτή η αναστολή κυρίως προκύπτει από μια αλλοστερική επίδραση του αναστολέα. Ένας αναστολέας αυτού του είδους θα μειώσει το V_{max} , αλλά θα αυξήσει τα K_m (Εικόνα 11). [35]



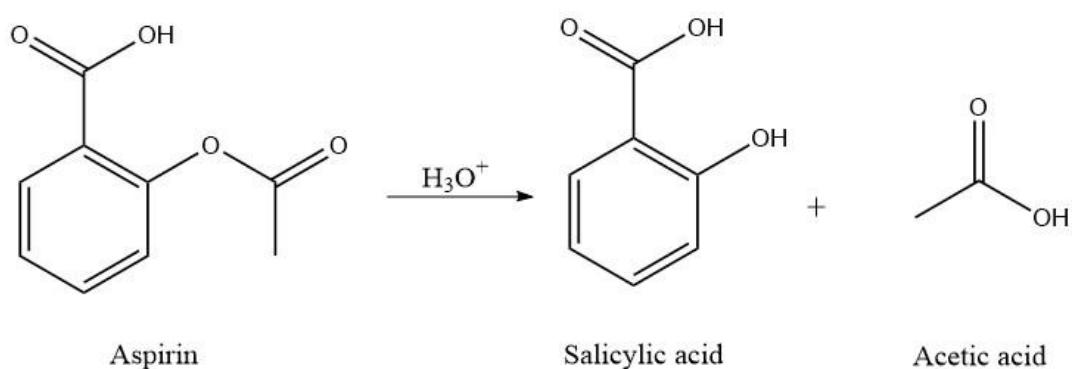
Εικόνα 11. Γραφικές παραστάσεις Lineweaver-Burk ενός ενζύμου παρουσία

αυξανόμενων συγκεντρώσεων κάποιου αναστολέα. [36]

3.3.3. Ασπιρίνη/ σαλικυλικό οξύ

Το ASPH ή ασπιρίνη είναι το πιο κοινό ΜΣΑΦ που παρουσιάζει αντιπυρετική, αναλγητική και αντιφλεγμονώδη δραστηριότητα παγκοσμίως. [29]

Η αντιφλεγμονώδη δράση του ASPH οφείλεται στον πρόδρομο μεταβολίτη της, το SALH₂ ή το 2-υδροξυβενζοϊκό οξύ (Σχήμα 7), που χρησιμοποιείται επίσης ως φάρμακο. [29]



Σχήμα 7. Όξινη υδρόλυση της ASPH σε SALH₂ και οξικό οξύ.

Το ASPH έχει την ιδιότητα να ακετυλιώνει το αμινοξύ σερίνη στο ενεργό κέντρο της COX-1 ή της COX-2 ανάλογα με τις συνθήκες και να τις αδρανοποιεί.[37,38] Η αποδεδειγμένη αλληλεπίδραση των σαλικυλικών αλάτων με ιόντα σιδήρου επιβεβαιώνει την επιπλέον ανασταλτική τους δράση στο ένζυμο της LOX [37]. Επιπλέον, τα σαλικυλικά άλατα και οι εκλεκτικοί αναστολείς της COX-2 προκαλούν απόπτωση των καρκινικών κυττάρων του μαστού κυρίως αυτών που έχουν ορμονικούς υποδοχείς ER και PR.[39,40]

3.3.4. Καρκίνος του μαστού-ΜΣΑΦ

Δεδομένο ότι η σισπλατίνη, είναι γνωστό ότι δεσμεύεται στο DNA, αναστέλλοντας την αντιγραφή και τη μεταγραφή στα καρκινικά κύτταρα του μαστού, προκαλώντας προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση), έχει στραφεί το ενδιαφέρον στον σχεδιασμό νέων μεταλλικών συμπλόκων που περιέχουν ΜΣΑΦ ώστε να μελετηθεί η χημειοθεραπευτική τους δράση για τον καρκίνο του μαστού [41]. Πολλές κλινικές και εργαστηριακές βιοδοκιμές υποστηρίζουν την προστατευτική δράση των μεταλλικών συμπλόκων με ΜΣΑΦ για τον καρκίνο του μαστού. [16, 25,29,42-52]

4. Χαλκός



Εικόνα 12. Χαλκός [53]

Ο χαλκός (Cu) είναι ένα ενδογενές και άμεσα διαθέσιμο μέταλλο. Μία βασική χημική ιδιότητα του χαλκού είναι ότι συμμετέχει σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, αφού μεταβάλλεται ο αριθμός οξείδωσης από την ανηγμένη Cu(I) στην οξειδωμένη μορφή Cu(II) και αντίστροφα. Στον ανθρώπινο οργανισμό είναι ένα ιχνοστοιχείο που πρέπει να βρίσκεται σε μικρή ποσότητα, ειδάλλως ως οξειδοαναγωγικό μέταλλο αντιδρά απευθείας με το μοριακό οξυγόνο και παράγονται ROS, εμφανίζοντας αυξημένη τοξική δράση. Σε βιολογικά συστήματα, ο χαλκός εμπλέκεται στη λειτουργία πολλών μεταλλοενζύμων που ρυθμίζουν τον ενεργειακό μεταβολισμό, όπως τη μιτοχονδριακή αναπνοή (οξειδάση του κυτοχρώματος C,CcO) ή το οξειδωτικό στρες (χαλκού/ψευδαργύρου δισμουτάση υπεροξειδίου υδρογόνου, Cu/Zn SOD). [54,55] Η εισαγωγή ενός μετάλλου, όπως ο χαλκός σε ένα σύμπλοκο που δρα ως αντικαρκινικό φάρμακο (ΜΣΑΦ), ενισχύει την αντικαρκινική και την αντιφλεγμονώδη δράση του συμπλόκου. Έρευνες έχουν αποδείξει ότι μεταλλοφάρμακα με χαλκό αναστέλλουν τα

καρκινικά κύτταρα είτε μέσω της βλάβης του DNA είτε με την μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. [42]

4.1. Βλάβη στο DNA

Τα ιόντα χαλκού μεσολαβούν μέσω των οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων στο σχηματισμό ROS), οι οποίες βλάπτουν βιομόρια, όπως το DNA. Ο χαλκός βρίσκεται κυρίως στον πυρήνα των κυττάρων, σχετίζεται με την χρωματίνη και σε μεγάλες ποσότητες μπορεί να προκαλέσει αναδίπλωση του DNA και να μεταβάλλει τη δομή και τον αριθμό των χρωμοσωμάτων. Η κύρια αλληλεπίδραση DNA-Cu οφείλεται στη δέσμευση του Cu με την αζωτούχα βάση, γουανίνη. Επιπλέον, βλάβη στο DNA προκαλείται με αναγωγικά μέσα όπως είναι το ασκορβικό οξύ και τη γλουταθειόνη (GSH), που ανάγουν τον δισθενή χαλκό σε μονοσθενή. [56]

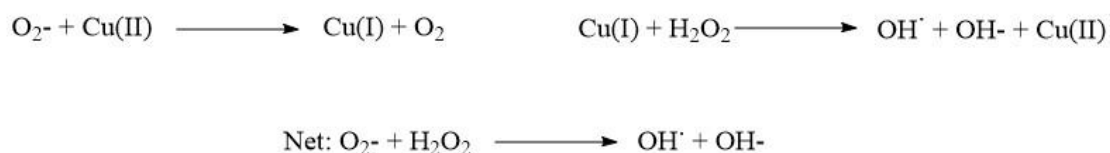
Η οξειδοαναγωγική δράση του χαλκού μπορεί να αποικοδομήσει το DNA με τρεις τρόπους: (1) Οξείδωση αζωτούχων βάσεων DNA. (2) Σχηματισμός δεσμών μεταξύ των αντίθετων γειτονικών βάσεων (Γουανίνη-Θυμίνη). (3) Ρήξη της διπλής αλυσίδας που οφείλεται στην αναγωγή του Cu(II) σε Cu(I).

Συνεπώς, αυτές οι αλληλεπιδράσεις παρακινούν πολλούς επιστήμονες στη μελέτη και στον σχεδιασμό νέων αντικαρκινικών μεταλλοφαρμάκων με χαλκό. Οι ρίζες υδροξυλίου που προκαλούν τη διάσπαση του δίκλωνου DNA, προέρχονται από μία σειρά αλληπάλληλων αντιδράσεων οξειδοαναγωγής μεταξύ του Cu(II) και Cu(I) και του οξυγόνου. Η πηγή ηλεκτρονίων προέρχεται είτε από την GSH είτε το ασκορβικό οξύ. Αυτές οι αντιδράσεις είναι γνωστές ως Fenton ή Haber-Weiss. [56]

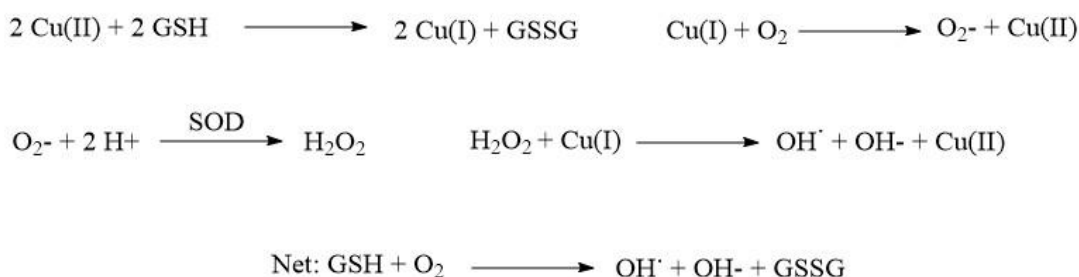
Οι ROS μπορούν να παραχθούν:

- 1) Απευθείας από τα ιόντα υπεροξειδίου, τα οποία προέρχονται από την κυτταρική αναπνοή στα μιτοχόνδρια και μετατρέπονται σε υπεροξείδιο. Το υπεροξείδιο οξειδώνει τον μονοσθενή χαλκό σε δισθενή και σχηματίζεται η πιο δραστική ρίζα $\text{OH}\cdot$ (Σχήμα 8, I).
- 2) Από την οξείδωση της GSH σε δισουλφίδιο (GSSG), οπότε ο μονοσθενής χαλκός αντιδρά με το μοριακό οξυγόνο και παράγεται το υπερφορτωμένο σε ηλεκτρόνια O_2^- ανιόν υπεροξειδίου, το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε H_2O_2 με ενζυμική επέμβαση Cu/Zn και Mn-SOD (Σχήμα 8, II). [56]

I



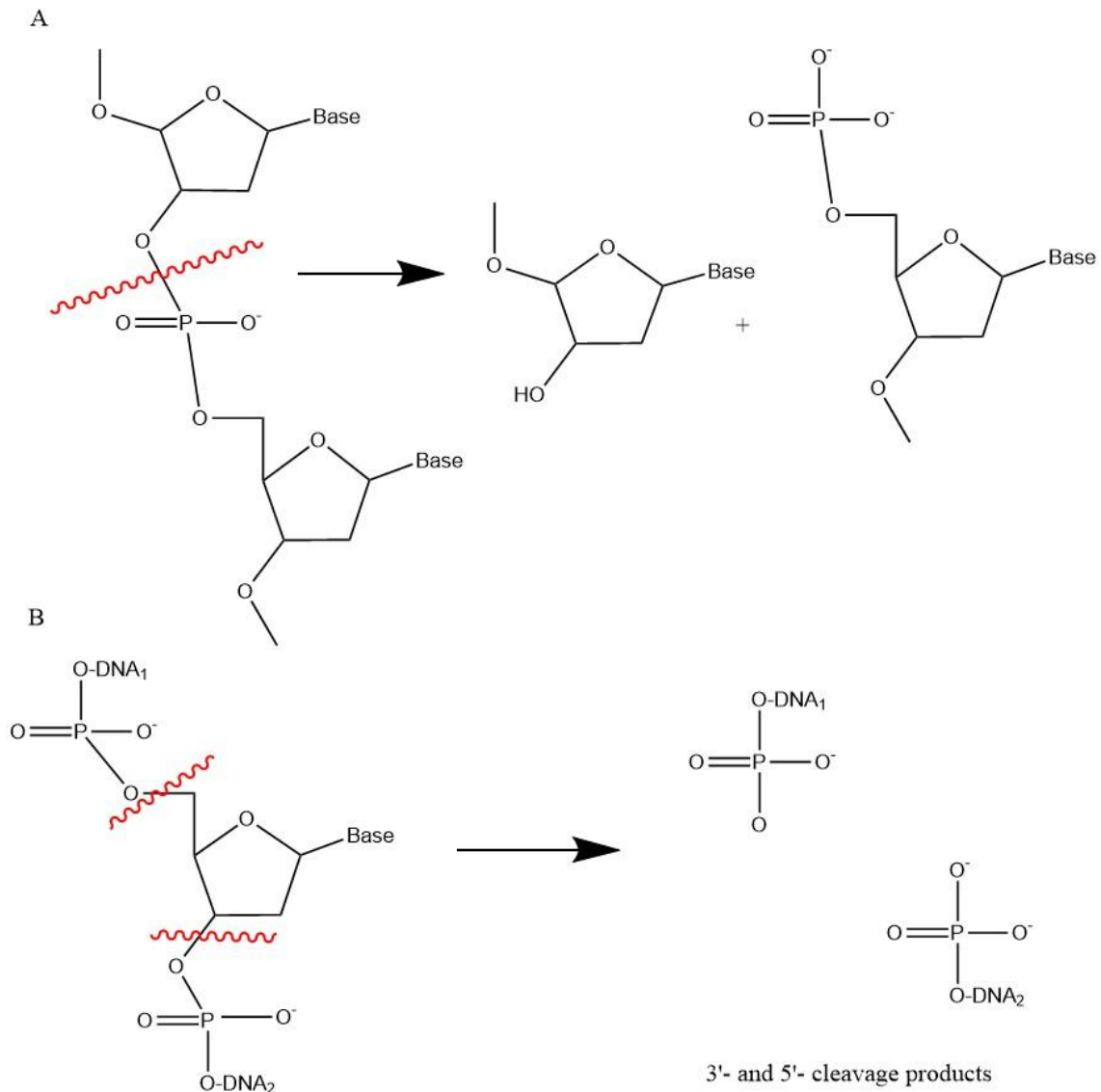
II



Σχήμα 8. Αντιδράσεις με χαλκό που καταλήγουν σε σχηματισμό ROS. [56]

Επιπλέον, οι ROS διασπούν φωσφοδιεστερικούς δεσμούς μεταξύ νουκλεοτιδίων, μέσω της οξειδωτικής οδού (Σχήμα 9A) ή της υδρόλυσης (Σχήμα 9B).

[57]

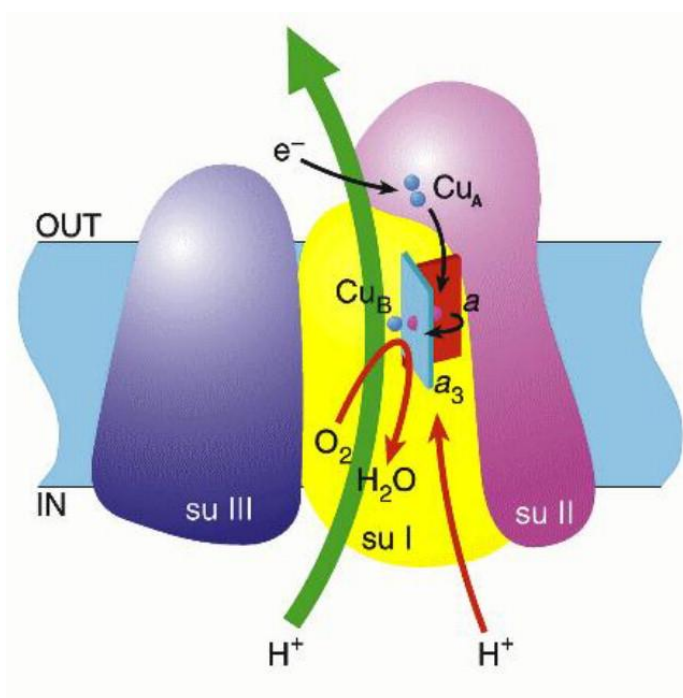


Σχήμα 9. (A) Υδρολυτική διάσπαση DNA (B) Οξειδωτική διάσπαση DNA [57]

4.2. Βλάβη στο μιτοχόνδριο

Υπό κανονικές συνθήκες, το Cyt C είναι μία πρωτεΐνη μεταφοράς ηλεκτρονίων που συντελεί στην μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα. Αν όμως το μιτοχόνδριο υποβληθεί σε κάποια βλάβη, διασπάται η μιτοχονδριακή μεμβράνη, οπότε απελευθερώνεται το Cyt C και ενεργοποιείται η διαδικασία της απόπτωσης. [58]

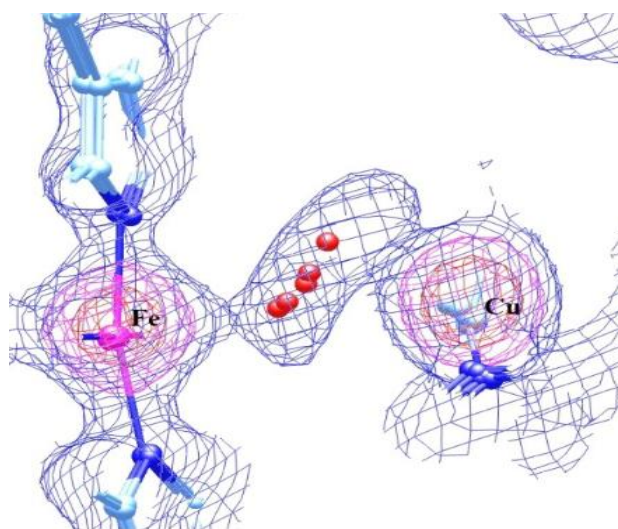
Η οξειδάση του κυτοχρώματος c, (CcO) είναι ένα τερματικό ένζυμο της αναπνευστικής αλυσίδας που βρίσκεται στην μιτοχονδριακή μεμβράνη και συμβάλλει στην αναπνοή των κυττάρων, καταλύοντας την αναγωγή του μοριακού οξυγόνου σε νερό. [60] Η CcO είναι ένα πολυμερές πρωτεϊνικό σύμπλεγμα που απαρτίζεται από τρεις υπομονάδες, δύο ενεργά κέντρα των οποίων είναι η COX-1 και COX-2. Η COX-2 περιλαμβάνει δύο ιόντα χαλκού σχηματίζοντας την διπυρηνική θέση CuA (Εικόνα 13) [61].



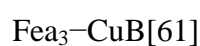
Εικόνα 13. Οξειδάση του κυτοχρώματος C [59]

Το ενεργό κέντρο της CcO, το οποίο δεσμεύει και ανάγει το O_2 κατά $4e^-/4H^+$, είναι η COX-2 που αποτελείται από ένα ιόν χαλκού και ένα ιόν αίμης a_3 (Fea_3) και έτσι δημιουργείται η ενεργή θέση Fea_3-CuB , που ονομάζεται διπυρηνικό κέντρο/σύμπλεγμα (Εικόνα 14). Τα ηλεκτρόνια προέρχονται από την άντληση πρωτονίων από την μήτρα

στον ενδομεμβανικό χώρο. Με τα πρωτόνια παράγεται ενέργεια με τη μορφή ATP. Ο χαλκός είναι απαραίτητος για τη δραστηριότητα της CcO. Ως δραστικό μέταλλο που συμμετέχει σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις παράγει ROS. [61] Η υπερφόρτωση των κυττάρων με το τοξικό μέταλλο του χαλκού προκαλεί ανισορροπία στο δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης (MMP) αλλαγή στη δομή των κυττάρων και συρρίκνωση του πυρήνα. [62]



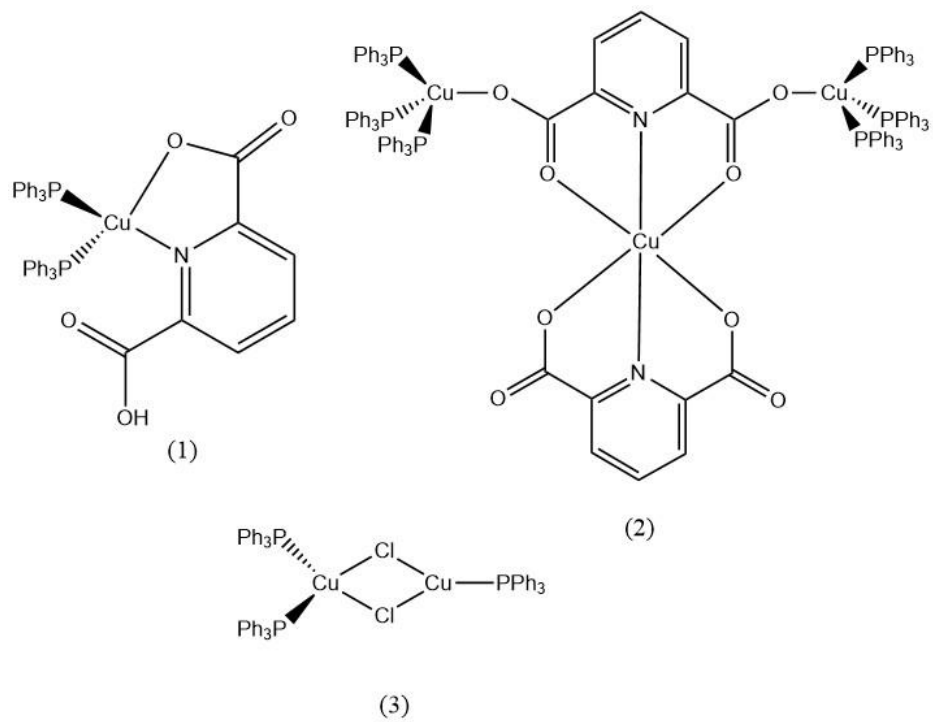
Εικόνα 14. Χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας του ενεργού κέντρου



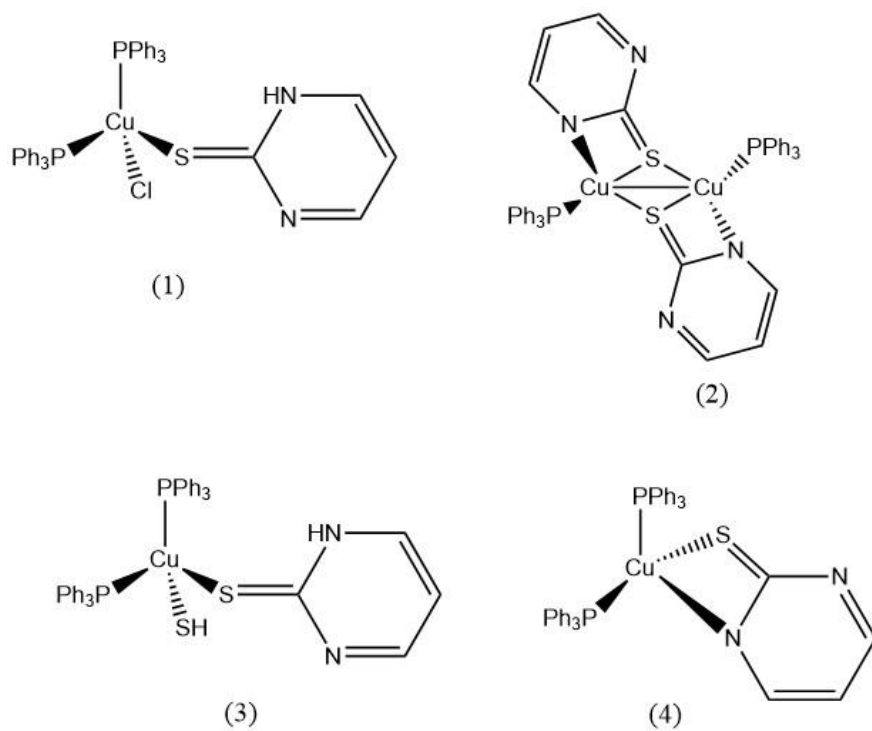
4.3. Αντικαρκινικά μεταλλοφάρμακα Cu με TPP και SALH₂.

4.3.1. Ετεροκυκλικά σύμπλοκα Cu με TPP.

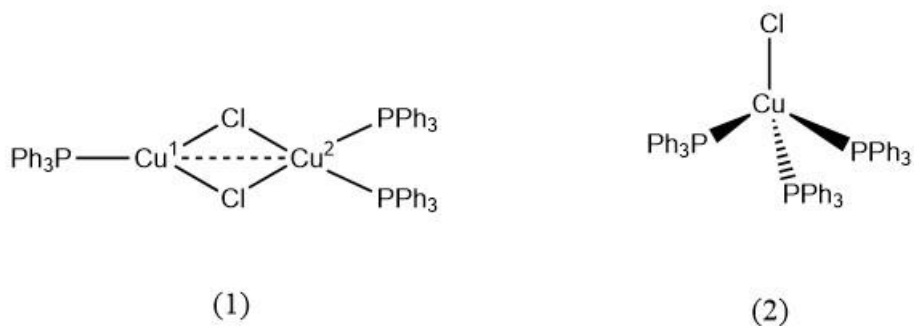
Ένας υδρόφοβος ligand όπως η TPP παρουσιάζει υψηλή κυτταροτοξικότητα, όταν συνδεθεί με κάποιο μέταλλο, όπως ο χαλκός. Ορισμένα σύμπλοκα χαλκού που περιλαμβάνουν TPP έχουν χαρακτηριστεί με αντικαρκινική δράση. [15]



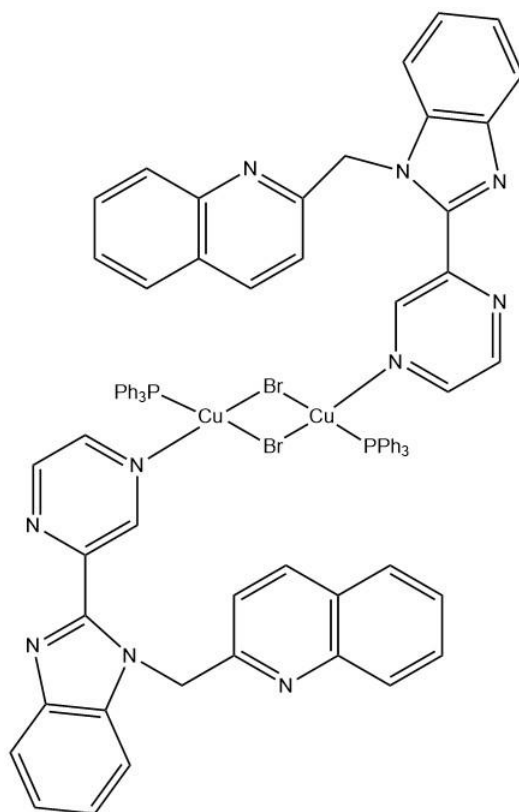
Σχήμα 10. Μελέτη καταλυτικής δράσης της οξείδωσης της κατεχόλης [63]



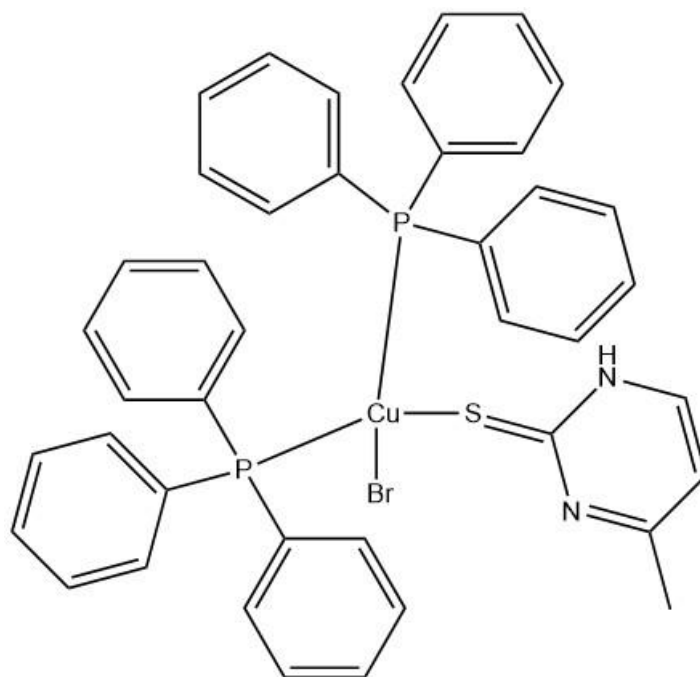
Σχήμα 11. Μελέτη της υπεροξειδωσης του LA με το ένζυμο της LOX παρουσία συμπλόκων. [64]



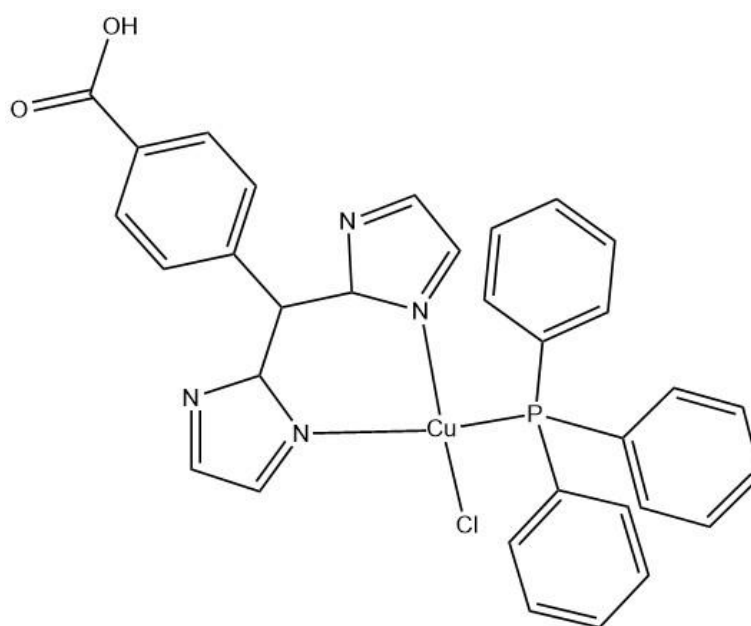
Σχήμα 12. Μελέτη της *in vitro* κυτταροτοξικής δράσης των συμπλόκων έναντι καρκινικών κυττάρων λειομυοσάρκωματος (LMS), MCF-7 και πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (PAH). [65]



Σχήμα 13. Μελέτη αλληλεπίδρασης με DNA, *in vitro* αντικαρκινικής δράσης και μηχανισμού προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. [66]

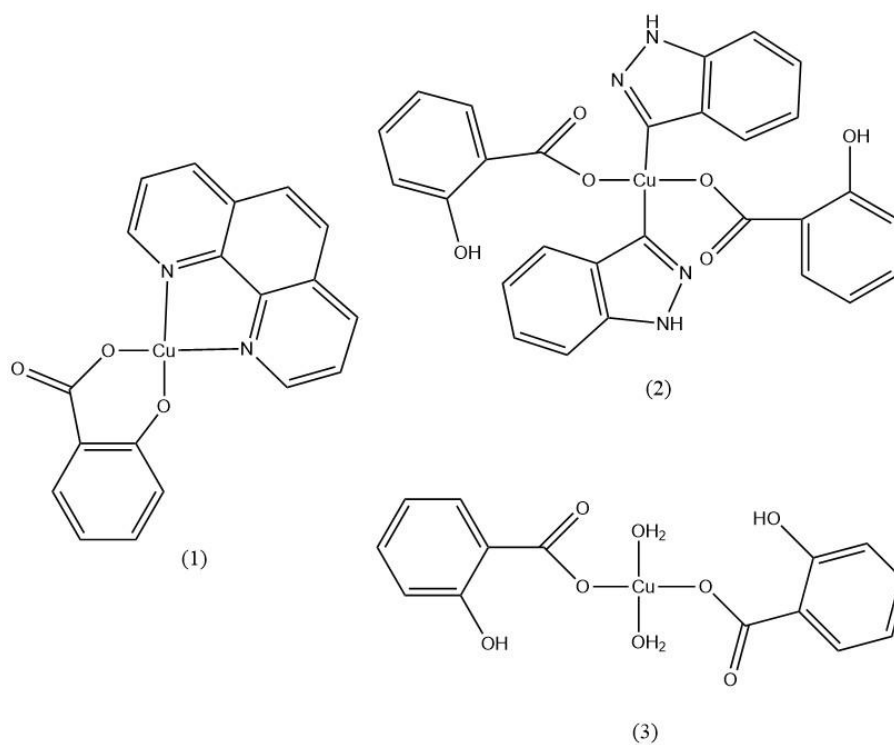


Σχήμα 14. *In vivo* μελέτη σε καρκινικά κύτταρα MCF-7 και PC3. [67]

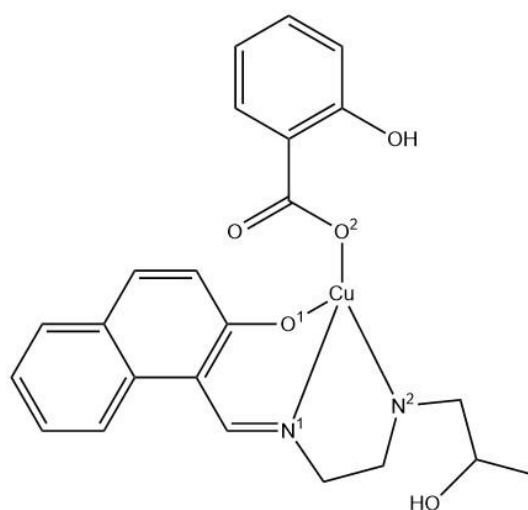


Σχήμα 15. *In vitro* μελέτη δέσμησης με DNA και κυτταροτοξικής δράσης έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών HepG2. [68]

4.3.2. Ετεροκυκλικά σύμπλοκα Cu με SALH₂.

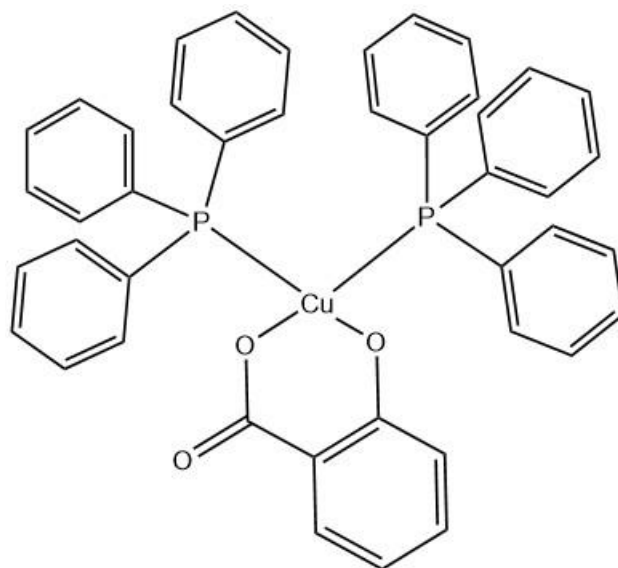


Σχήμα 16. *In vitro* αντικαρκινική δράση, αλληλεπίδραση με SOD και καταλάση, αναστολή της COX. Μελέτη δέσμευσης με DNA και νουκλεάση. [69]

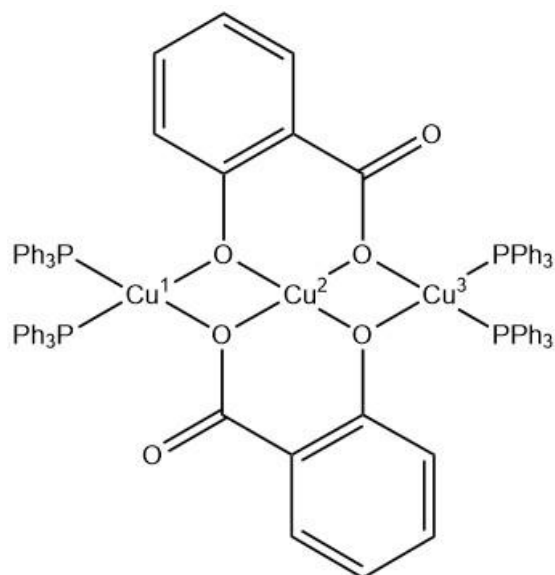


Σχήμα 17. Μελέτη αλληλεπίδρασης με DNA και αντι-πολλαπλασιαστικής δράσης έναντι καρκινικών κυττάρων HeLA και HepG-2. [70]

4.3.3. Ετεροκυκλικά σύμπλοκα Cu με TPP και SALH₂.



Σχήμα 18. [71]



Σχήμα 19. [72]

B. ΣΚΟΠΟΣ

Ο καρκίνος του μαστού είναι ο πιο διαδεδομένος στις γυναίκες με μεγάλο ποσοστό θνησιμότητας. Παρά τη χρήση παραδοσιακών χημειοθεραπευτικών φαρμάκων όπως το cisplatin και τα παράγωγα του, η παρουσία σοβαρών παρενεργειών στρέφει το ενδιαφέρον στην ανάπτυξη νέων αντικαρκινικών μεταλλοφαρμάκων που στοχεύουν εκλεκτικά σε βασικά οργανίδια των καρκινικών κυττάρων, όπως το DNA και το μιτοχόνδριο, με σκοπό την ενεργοποίηση του μηχανισμού απόπτωσης.

Έρευνες έχουν αποδείξει ότι τα ΜΣΑΦ παρουσιάζουν αντικαρκινικές ιδιότητες, διότι δρουν στον μηχανισμό φλεγμονής που εδράζεται στο μιτοχόνδριο. Επιπρόσθετα, μιτοχονδριοτροπικές ουσίες έχουν την ιδιότητα να αλληλεπιδρούν μέσω του θετικού φορτίου με την αρνητικά φορτισμένη μιτοχονδριακή μεμβράνη, προκαλώντας δυσλειτουργία στο μιτοχόνδριο. Η λιποφιλία των μιτοχονδριοτροπικών ουσιών συμβάλλει στην ασφαλή μεταφορά των φαρμάκων στο εσωτερικό των κυττάρων. Ακόμη, ένα μεταβατικό μέταλλο με οξειδοαναγωγικές ιδιότητες αποτελεί τον συνδετικό κρίκο των διαφόρων ligand επηρεάζοντας παράλληλα τις βιολογικές λειτουργίες που λαμβάνουν χώρα στο DNA και το μιτοχόνδριο.

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής είναι η σύνθεση και η μελέτη ενός νέου ετεροληπτικού μεταλλικού συμπλόκου και συγκεκριμένα του $SALH_2$ με ιόντα Cu και TPP για τη στοχευμένη χημειοθεραπεία του καρκίνου του μαστού. Αρχικά, ερευνάται η *in vitro* κυτταροτοξικότητα έναντι κυτταρικών σειρών αδενοκαρκινώματος ανθρώπινου μαστού MCF-7 και MDA-MB-231 και *in vitro* μη τοξική δράση σε MRC-5. Επιπλέον, πραγματοποιείται η *ex vivo* μελέτη του μοριακού μηχανισμού δράσης του νεοσυντιθέμενου συμπλόκου ως προς (i) τη συγγένεια

δέσμευσής με το CT-DNA (ii) την ανασταλτική δράση έναντι της LOX. Τέλος, η αλληλεπίδραση με το CT-DNA καθορίζεται με *in silico* θεωρητικές μεθόδους.

Γ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

5. Υλικά και Μέθοδοι

5.1. Χημικά Αντιδραστήρια

Όλοι οι διαλύτες και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν δεν χρειάστηκαν περαιτέρω καθαρισμό. Ο ένυδρος οξικός χαλκός(II), το ASPH και η TPP αγοράστηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich ενώ το διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO), η μεθανόλη (MeOH), το ακετονιτρίλιο (MeCN), ο διαιθυλαιθέρας (Et₂O) το toluene και το DCM από την Riedel-de Haën. Επίσης το CT-DNA, το αιθίδιο βρωμίδιο (EB), η LOX και το βορικό οξύ (H₃BO₃) προμηθεύτηκαν από την Sigma-Aldrich καθώς οι κυτταρικές σειρές MDA-MB-231, MCF-7 και MRC-5 από το American Type Culture Collection και από το Imperial Cancer Research Fund.

5.2. Όργανα

Η μέτρηση του σημείου τήξεως έγινε με τη χρήση της συσκευής Stuart Scientific χωρίς να ακολουθήσει κάποια διόρθωση. Η λήψη των φασμάτων XRF πραγματοποιήθηκε σε αναλυτή Rigaku NEX QC EDXRF. Ο προσδιορισμός του μοριακού βάρους του συμπλόκου έγινε με την μέθοδο της κρυσκοπίας χρησιμοποιώντας το οσμόμετρο σημείου πήξης Osmomat 3000 basic. Τα δεδομένα περίθλασης ακτίνων X μονοκρυστάλλου της ένωσης συλλέχθηκαν σε διαθλασίμετρο Rigaku R-Axis SPIDER με μονοχρωματική ακτινοβολία Mo K α από γραφίτη. Η παραλαβή του φάσματος IR (απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας) έγινε με το φασματοφωτόμετρο ATR-FT-IR (Cary 630 FTIR) της εταιρείας Agilent Technologies

στην περιοχή του φάσματος μεταξύ 4000-370 cm^{-1} . Οι τεχνικές θερμικής ανάλυσης πραγματοποιήθηκαν σε συσκευή Shimadzu DTG-60, υπό ροή N_2 ($50 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$) με ρυθμό θέρμανσης $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$. Για την καταγραφή των φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ χρησιμοποιήθηκε το όργανο Bruker AC 400 MHz FT-NMR, σε διάλυμα $\text{DMSO-}d_6$ με χημικές μετατοπίσεις που δίνονται ως προς το τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS). Τα UV-Vis φάσματα καταγράφηκαν σε ένα φασματοφωτόμετρο UV/Vis σειράς PC UV-1600 της εταιρείας VWR, ενώ τα φάσματα φθορισμού σε φασματοφθορισμόμετρο σειράς FP-8200 της JASCO. Η μέτρηση του ιξώδους έγινε με γυάλινο τριχοειδές ιξωδομέτρο τύπου Ostwald. Περαιτέρω όργανα που χρειάστηκαν για τη διεξαγωγή των πειραμάτων: θερμαινόμενοι μαγνητικοί αναδευτήρες, θερμοστατικό υδατόλουτρο, περιστροφικός εξατμιστήρας, αναλυτικός ζυγός της εταιρείας Scatec, πιπέτες ακριβείας (1000, 100 και 10 μL), Vortex από την Sanichem, πεχάμετρο (pH meter Basic 20) από την CRISON, ειδική πρέσα για παστίλιες.

6. Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης

6.1. Σύνθεση και κρυστάλλωση

Η σύνθεση της ένωσης COSAL πραγματοποιήθηκε σε σφαιρική φιάλη των 50 mL χρησιμοποιώντας 0.5 mmol (0.0998 g) ένυδρου οξικού χαλκού(II), 1 mmol ASPH (0.18 g) και 4 mmol TPP (1.051 g) σε 20 mL toluene/DCM (10/10 mL). Εφαρμόστηκε σύστημα βρασμού με επαναρροή και ανάδευση για 5 ώρες. Το διάλυμα αφού απέκτησε θερμοκρασία περιβάλλοντος, συμπυκνώθηκε σε περιστροφικό εξατμιστήρα και απομονώθηκε λάδι. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 5 mL Et₂O για την καταβύθιση λευκού ιζήματος. Το λευκό ίζημα κρυσταλλώθηκε σε 20 mL μίγματος διαλυτών MeCN/MeOH (10/10 mL) υπό ήπια ανάδευση. Οι λευκοί κρύσταλλοι δημιουργήθηκαν μετά από 3-4 μέρες και αποθηκεύτηκαν στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου (Εικόνα 15).



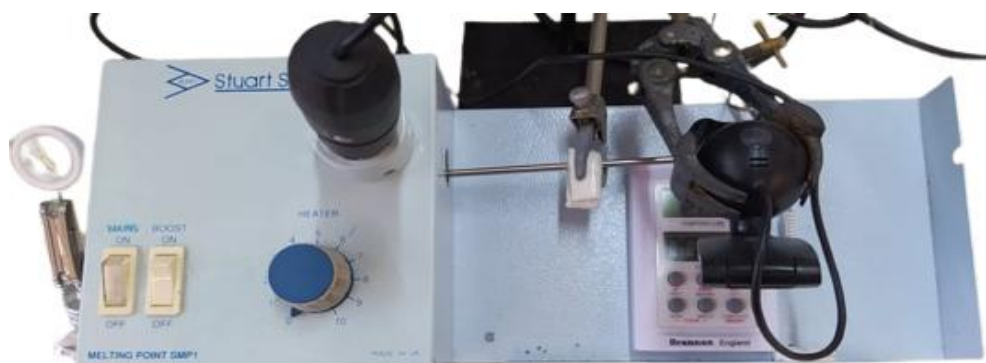
Εικόνα 15. Σύνθεση και κρυστάλλωση της ένωσης COSAL.

Η ποσοστιαία απόδοση της αντίδρασης της σύνθεσης υπολογίστηκε από τον τύπο:

$$a (\%) = \frac{n \text{ (mmol)πρακτικά}}{n \text{ (mmol)θεωρητικά}} \times 100 = \frac{0.39}{0.5} \times 100 = 78$$

6.2. Σημείο τήξης

Για τη μέτρηση του σημείου τήξης χρησιμοποιήθηκε ανοικτό τριχοειδές σωληνάκι BRIS, στο οποίο προστέθηκε ελάχιστη ποσότητα από την μετρούμενη ένωση. Το τριχοειδές τοποθετήθηκε στη συσκευή Stuart scientific (Εικόνα 16) και καταγράφηκε η θερμοκρασία τήξης (T_m).



Εικόνα 16. Συσκευή Stuart Scientific.

6.3. Διαλυτότητα

Ορισμένη ποσότητα της ουσίας μοιράστηκε σε 9 δοκιμαστικούς σωλήνες με σκοπό να εξεταστεί η διαλυτότητα στους ακόλουθους διαλύτες: εξάνιο (n-hexane), PhMe, DCM, χλωροφόρμιο (CHCl_3), ακετόνη (Me_2CO), MeOH, MeCN, DMSO, δις απεσταγμένο νερό (dd H_2O). Για το σωστό έλεγχο της διαλυτότητας, τα διαλύματα αναδεύτηκαν και κάποια υποβλήθηκαν σε ήπια θέρμανση.

6.4. Φασματοσκοπία XRF

Η τεχνική φθορισμού ακτινών X χρησιμοποιείται για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των στοιχείων του περιοδικού πίνακα με ατομικό αριθμό $Z= 14-92$. Από κάθε στοιχείο εκπέμπονται ακτίνες φθορισμού που είναι μοναδικές, δηλαδή αποτελούν δακτυλικό αποτύπωμα. Η φασματοσκοπία XRF παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία με όρια που κυμαίνονται σε περιοχή ppm. Οι πρωτογενείς ακτινοβολίες X προήλθαν από μία ραδιοϊσοτοπική πηγή Am-241 με ενέργεια διέγερσης 59.5 keV. Η ανίχνευση της φθορίζουσας (δευτερογενούς) ακτινοβολίας έγινε από ανιχνευτή τύπου Si (Li) που λειτουργεί σε θερμοκρασία υγρού N₂. Ο χρόνος μέτρησης ρυθμίστηκε έτσι ώστε να συλλεχθούν 2000 δεδομένα για την ασθενέστερη κορυφή K_α. Πειραματικά, κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη της TPP για τον προσδιορισμό του P. Αρχικά, ζυγίστηκαν μέσα σε erpendorf περίπου 10mg του συμπλόκου και 500 mg H₃BO₃. Στη συνέχεια το δείγμα ομογενοποιήθηκε με Vortex και κονιοποιήθηκε σε γουδί. Τέλος, με τη συμπίεση ειδικής πρέσας (Scatec) σχηματίστηκε η παστίλια, η οποία μετρήθηκε στον αναλυτή Rigaku NEX QC EDXRF (Εικόνα 17).



Εικόνα 17. Αναλυτής Rigaku NEX QC EDXRF.

6.5. Κρυοσκοπία

Ο προσδιορισμός της σχετικής μοριακής μάζας της νεοσυντιθέμενης ένωσης πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της κρυοσκοπίας. Οι πειραματικές μετρήσεις βασίζονται στην εξίσωση ΔT_f

$$\Delta T_f = K_f m = K_f \frac{m_{\text{διαλυμ. ένσης ουσίας}} \cdot 1000}{M_r \text{ διαλυμ. ένσης ουσίας} \cdot m_{\text{διαλύτη}}}$$

Όπου: ΔT_f = η ταπείνωση του σημείου πήξης του εκάστοτε διαλύτη (σημείο πήξης διαλύτη – σημείο πήξης διαλύματος), m = η μοριακότητα κατά βάρος του διαλύματος, K_f = μοριακή ταπείνωση σημείου πήξης του διαλύτη και αντιστοιχεί στην ταπείνωση που προκαλείται από τη διάλυση 1 mole διαλυμένης ουσίας σε 1000 g διαλύτη. Η ταπείνωση του σημείου πήξης εξαρτάται από τη συγκέντρωση τους διαλύματος. Συνεπώς παρασκευάστηκε πρότυπο διάλυμα συγκέντρωσης 10 mg/1 mL σε διαλύτη DMSO. Ακολούθησε αραίωση 1 μL του συμπυκνωμένου δείγματος σε 49 μL ddH₂O. Η οσμωτικότητα του διαλύματος μετρήθηκε στη συσκευή OSMOMAT 3000 Freezing Point Osmometer της Gonotec (Εικόνα 18) και καταγράφηκαν 9 τιμές εκφρασμένες σε mOsmol/kg.



Εικόνα 18. Συσκευή OSMOMAT 3000 Freezing Point Osmometer της Gonotec.[73]

6.6. XRD

Για την επίλυση της ατομικής και μοριακής δομής των κρυστάλλων COSAL χρησιμοποιήθηκε η τεχνική XRD, κατά την οποία περιθλώμενες ακτίνες X προέρχονται από τα κρυσταλλικά άτομα όταν προσπίπτει σε αυτά μία δέσμη ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας X. Από τις εντάσεις και τις γωνίες των περιθλώμενων δεσμών προκύπτει η τρισδιάστατη εικόνα της ηλεκτρονιακής πυκνότητας του κρυστάλλου και έτσι προσδιορίζονται οι μέσες θέσεις των ατόμων και οι χημικοί δεσμοί μεταξύ τους. Πρώτα, συλλέχθηκε ένας κατάλληλος κρύσταλλος από το μητρικό υγρό του COSAL και ψύχθηκε απευθείας στους $-113\text{ }^{\circ}\text{C}$. Το δείγμα ακτινοβολήθηκε με μονοχρωματική δέσμη από γραφίτη και τα δεδομένα περίθλασης ακτινών X καταγράφηκαν σε διαθλασίμετρο Rigaku R-AXIS SPIDER. Τελικά, λύθηκε η κρυσταλλική δομή του COSAL με το πρόγραμμα SHELXS v.2013/1 και τελειοποιήθηκε με υπολογισμούς ελαχίστων τετραγώνων πλήρους μήτρας επί του F2 χρησιμοποιώντας το SHELXL-2014/6. Μ' αυτόν τον τρόπο προσδιορίστηκαν τα κρυσταλλικά δεδομένα (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Κρυσταλλικά δεδομένα του COSAL.

Μοριακός Τύπος	$\text{C}_{61}\text{H}_{50}\text{CuO}_3\text{P}_3$
Μοριακό Βάρος (g/mol)	987.47
Κρυσταλλικό σύστημα	Ορθορομβικό
Space Group	Pbca
a (Å)	19.7627(4)
b (Å)	19.7716(4)
c (Å)	24.9975(5)
Volume (Å³)	9767.5(3)
Z	8
P_{calc} (mg/m³)	1.343
F (000)	4112

6.7. Φασματοσκοπία ATR-FTIR

Η φασματοσκοπική μέθοδος υπερύθρου στηρίζεται στην απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας από τα μόρια μίας στερεής, υγρής ή αέριας ένωσης και κατ' επέκταση τη διέγερση αυτών σε υψηλότερες ενεργειακά στάθμες δόνησης. Η αλληλεπίδραση με την υπέρυθρη ακτινοβολία οδηγεί σε αλλαγές στη διπολική ροπή του μορίου δημιουργώντας δονήσεις που λαμβάνονται σε ένα φάσμα και είναι χαρακτηριστικές των χημικών στοιχείων που υπάρχουν σε ένα δείγμα. Στα φασματοφωτόμετρα FTIR τα φάσματα υπερύθρου λαμβάνονται σε βελτιωμένη μορφή μετά από μετασχηματισμό Fourier των πρωταρχικών δεδομένων. Επιπλέον, η τεχνική αποσβένουσας ανάκλασης (ATR) ενισχύει την ευαισθησία των φασματοφωτομετρών FTIR για τη μέτρηση δειγμάτων έναντι των συμβατικών φασματοφωτομέτρων διασποράς. Μικρή ποσότητα κρυστάλλων COSAL και των αντίστοιχων ligand τοποθετήθηκαν στο ATR εξάρτημα δηλαδή σ' ένα διαφανή κρύσταλλο (ως προς την υπέρυθρη ακτινοβολία) με υψηλό δείκτη διάθλασης. Τα φάσματα λήφθηκαν από το φασματοφωτόμετρο FTIR της εταιρείας Agilent, εφαρμόζοντας το πρόγραμμα MicroLab Expert.



Εικόνα 19. Φασματοφωτόμετρο FTIR της Agilent.

6.8. Φασματοσκοπία TG-DTA/DSC

Η θερμοβαρυτική ανάλυση (TGA) μελετά τη μεταβολή μάζας της ένωσης συναρτήσει της θερμοκρασίας ενώ η διαφορική θερμική ανάλυση (DTA) τις αλλαγές φάσης του δοκιμίου οι οποίες καταγράφονται ως εξώθερμες και ενδόθερμες κορυφές σε ένα διαφορικό θερμογράφημα. Ταυτόχρονα, η θερμιδομετρική ανάλυση (DSC) είναι μία θερμιδομετρική μέθοδος κατά την οποία μετράται η μεταβολή της θερμοχωρητικότητας της ένωσης συναρτήσει της θερμοκρασίας. Όλες οι θερμικές μελέτες πραγματοποιήθηκαν σε συσκευή Shimadzu, υπό ροή N_2 ($50 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$) με ρυθμό θέρμανσης $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$.

6.9. Φασματοσκοπία UV-Vis

Η φασματοφωτομετρία μοριακής απορρόφησης UV-Vis αναφέρεται στην απορρόφηση μονοχρωματικής ακτινοβολίας από το δείγμα προκαλώντας ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις σε υψηλότερης ενέργειας μοριακά τροχιακά. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση και τον έλεγχο σταθερότητας (0 – 48 hrs) του COSAL. Παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα συγκέντρωσης 10^{-2} M του COSAL, του $SALH_2$ και της TPP σε DMSO. Σε κυψελίδα των 2 mL μετρήθηκε σκέτος ο διαλύτης (τυφλό πείραμα) και στη συνέχεια το σύμπλοκο και οι ligands, αφού πρώτα αραιώθηκαν σε διαλύματα των 2 mL με συγκεντρώσεις 10^{-5} M και 10^{-4} M αντιστοίχως. Για τη λήψη φασμάτων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα M. Wave Professional 1.0 στο UV-Vis φασματοφωτόμετρο σειράς PC UV 1600 της εταιρείας VWR.



Εικόνα 20. UV-Vis φασματοφωτόμετρο σειράς PC UV 1600 της VWR.

6.10. Φασματοσκοπία Φθορισμού

Με τη φασματοσκοπία φθορισμού ανιχνεύεται αν μία ένωση φθορίζει. Η αρχή μεθόδου βασίζεται στη διέγερση μορίων και την αποδιέγερση αυτών μεταξύ ενεργειακών καταστάσεων ίδιας πολλαπλότητας με εκπομπή ακτινοβολίας. Η εκπεμπόμενη ακτινοβολία εμφανίζεται σε μεγαλύτερα μήκη κύματος (λ nm) σε σχέση με την προσπίπτουσα. Σε κυψελίδα των 2 mL μετρήθηκαν σκέτος ο διαλύτης DMSO και στη συνέχεια το σύμπλοκο αφού πρώτα αραιώθηκε από 10^{-2} M σε 10^{-5} M. Όλα τα φάσματα φθορισμού καταγράφηκαν σε φασματοφθορισμόμετρο σειράς FP-8200 της εταιρείας Jasco.



Εικόνα 21. Φασματοφθορισμόμετρο σειράς FP-8200 της εταιρείας Jasco.[74]

6.11. Φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$

Με τη φασματοσκοπία NMR καθίσταται ποιοτική και ποσοτική ανάλυση του δείγματος καθώς εξετάζεται και η σταθερότητα (0 – 48 hrs). Η μέθοδος αυτή βασίζεται σε διεγέρσεις μαγνητικών πυρήνων που συμβαίνουν σε ένα ομογενές μαγνητικό πεδίο. Η συχνότητα της προσπίπτουσας απορροφημένης ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας σε περιοχή ραδιοσυχνοτήτων μεταξύ 4-900 MHz είναι χαρακτηριστική της συχνότητας της περιστροφής της μαγνητικής ροπής των πυρήνων. Ζυγίστηκαν περίπου 10 mg των ενώσεων (COSAL, TPP, SALH₂) και διαλύθηκαν σε δευτεριωμένο DMSO (DMSO-d₆). Η καταγραφή των φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ για τα διαλύματα έγινε στο όργανο AC 400 MHz FT-NMR της εταιρείας Bruker με χημικές μετατοπίσεις που δίνονται ως προς το πρότυπο αναφοράς τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS).

7. Βιολογικές μελέτες

7.1. Μελέτη της *in vitro* αντιπολλαπλασιαστικής δράσης σε MCF-7, MDA-MB-231 και MRC-5 κύτταρα.

Για την μελέτη της *in vitro* κυτταροτοξικής δράσης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της σουλφοροδαμίνης Β (SRB). Η SRB είναι μία φθορίζουσα χρώση που προσδέεται και επισημαίνει βασικά αμινοξικά κατάλοιπα πρωτεϊνών των (ζωντανών) κυττάρων, σε όξινες συνθήκες.[75] Παρασκευάστηκαν διαλύματα COSAL συγκέντρωσης 10^{-2} M σε DMSO και αραιώθηκαν με θρεπτικό μέσο κυτταροκαλλιέργειας (DMEM) στις κατάλληλες συγκεντρώσεις (0.5-16 μ M). Χρησιμοποιήθηκε τρυβλίο με 96 βοθρία στο οποίο επιστρώθηκαν και τα τρία είδη κυττάρων MCF-7, MDA-MB-231 και MRC-5 σε πυκνότητες 6000, 8000 και 2000 κύτταρα/βοθρίο, αντιστοίχως. Τα κύτταρα πολλαπλασιάστηκαν σε επωαστικό κλίβανο για 24 ώρες στους 37 °C και έπειτα εκτέθηκαν στο COSAL για 48 ώρες. Τα ζωντανά κύτταρα προσκολλήθηκαν στον πυθμένα του τρυβλίου ενώ τα νεκρά αιωρήθηκαν στο θρεπτικό υλικό. Ακολούθησε αναρρόφηση του θρεπτικού υλικού και προσθήκη 50 μ L τριγλωρο-ακετικού οξέος (TCA) για τη μονιμοποίηση των κυττάρων (30 min σε 4 °C). Ύστερα, αφού έγινε έκπλυση με dd H₂O, προστέθηκαν 70 μ L χρωστικής SRB 0.4% w/v σε διάλυμα 1% οξικού οξέος ανά βοθρίο (20 min σε 25 °C), η οποία διαλυτοποιήθηκε σε 200 μ L unbuffered Tris-Base (10 mM). Η κυτταροτοξικότητα της ένωσης αξιολογήθηκε με τη βοήθεια χρωματομετρικού προσδιορισμού SRB σε $\lambda = 568$ nm δίνοντας το ποσοστό των κυττάρων επιβίωσης έναντι των αντίστοιχων control (κύτταρα που δεν υποβλήθηκαν στο COSAL). Οι απορροφήσεις μετρήθηκαν στο φωτόμετρο μικροπλακών Elisa (MMP-96 HiPo) της Biosan (Εικόνα 23). Μ' αυτόν τον τρόπο προσδιορίστηκαν οι τιμές

IC₅₀ (ελάχιστες συγκεντρώσεις αναστολής του 50% των κυττάρων σε σύγκριση με τα control).[25]



Εικόνα 23. φωτόμετρο μικροπλακών Elisa (MMP-96 HiPo) της Biosan. [76]

7.2. *Ex vivo* πειράματα

7.2.1. Αλληλεπίδραση COSAL με CT-DNA

Για την παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος (buffer) προστέθηκαν σε 500 mL dd H₂O 15 mM κιτρικού νατρίου και 150 mM χλωριούχου νατρίου (NaCl). Κατά τη διάρκεια ήπιας ανάδευσης του διαλύματος, ρυθμίστηκε το pH=7 με προσθήκη καυστικού νατρίου (NaOH) 1M και η μέτρηση έγινε με πεχάμετρο της εταιρείας CRISON. Το buffer αποθηκεύτηκε στο ψυγείο. [29]

Για την παρασκευή πρότυπου διαλύματος DNA, ζυγίστηκαν ίνες του CT-DNA σε καθαρή κωνική φιάλη. Έπειτα, στην κωνική φιάλη προστέθηκαν 19 mL buffer και 1

mL ddH₂O. Το διάλυμα αναδεύτηκε ήπια με σκοπό να αποφευχθεί η μετουσίωση του, για 3-4 μέρες, σε 4 °C. Το πρότυπο διάλυμα CT-DNA αποθηκεύτηκε στο ψυγείο. Ο έλεγχος της ποιότητας του πρότυπου διαλύματος CT-DNA εξετάστηκε με φασματοφωτόμετρο UV-Vis της VWR. Για τη λήψη του φάσματος απορρόφησης, σε κυψελίδα των 2 mL, προστέθηκε buffer (τυφλό) και στη συνέχεια μετρήθηκε το διάλυμα του CT-DNA στην περιοχή 450-200 nm. [29]Από τον λόγο των απορροφήσεων στα 260 nm προς 280 nm $\frac{A_{260}}{A_{280}} = 1.93$ τεκμηριώνεται η καθαρότητα του διαλύματος. Συγκεκριμένα:

- Αν ο λόγος είναι μεταξύ των τιμών $1.8 < \frac{A_{260}}{A_{280}} < 2.0$ αποδεικνύεται ότι το διάλυμα είναι απαλλαγμένο από προσμίξεις πρωτεϊνών και φαινολών. Μεταξύ των τιμών αυτών σημαίνει ότι υπάρχουν προσμίξεις RNA, οι οποίες δεν προκαλούν κάποιο πρόβλημα.
- Όταν η τιμή $\frac{A_{260}}{A_{280}} = 2$ είναι χαρακτηριστική του καθαρού RNA ενώ όταν ισούται με 1.8 είναι του καθαρού DNA.
- Αν ο λόγος $\frac{A_{260}}{A_{280}} \leq 1.7$, υποδηλώνει προσμίξεις πρωτεϊνών και φαινολών. [77]

Τέλος, η συγκέντρωση του διαλύματος CT-DNA καθορίζεται από τον Νόμο του Lambert-Beer:

$$A_{260} = \varepsilon_{260} \times b \times c$$

Η A_{260} μετράται στο φάσμα απορρόφησης, ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης ε_{260} ισούται με $6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ και το μήκος κυψελίδας είναι $b = 1 \text{ cm}$.

7.2.1.1. Μελέτη αλληλεπίδρασης με Φασματοσκοπία UV-Vis

Κατά τη μελέτη αλληλεπίδρασης του COSAL με DNA μέσω της φασματοσκοπίας απορρόφησης UV-Vis διεξήχθησαν δύο πειράματα:

1) Τιτλοδότηση CT-DNA με COSAL

Με τη μέθοδο αυτή προσδιορίζεται το είδος δέσμευσης μεταξύ της ένωσης και του DNA. Στα πειράματα τιτλοδότησης, τα φάσματα καταγράφονται για μία σταθερή συγκέντρωση CT-DNA, απουσία και παρουσία αυξανόμενης συγκέντρωσης συμπλόκου με τη χρήση του φασματοφωτόμετρου UV-Vis σειράς PC UV-1600 της VWR. Καθώς προστίθεται η συγκέντρωση του συμπλόκου ανάλογα με το είδος αλληλεπίδρασης, το μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης $\lambda_{\max} = 258 \text{ nm}$ μετατοπίζεται προς μεγαλύτερα (βαθυχρωμία) ή προς μικρότερα λ (υψιχρωμία), ενώ η ένταση (ϵ_{\max}) απορρόφησης μειώνεται (υποχρωμία) ή αυξάνεται (υπερχρωμία). Η ένωση διαλυτοποιήθηκε σε DMSO με συγκέντρωση 10^{-2} M . Για τη λήψη φασμάτων, χρειάστηκε κυψελίδα των 2 mL στην οποία προστέθηκε κάθε φορά η σωστή αναλογία r (0, 0.02, 0.05, 0.07, 0.10, 0.12) όπου $r = [\text{complex}]/[\text{DNA}]$, $[\text{DNA}] = 10^{-4} \text{ M}$ και ο υπολοιπόμενος όγκος συμπληρώθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα buffer. [29]

2) Τιτλοδότηση COSAL με CT-DNA

Με την τεχνική αυτή ερευνάται η ισχύ δέσμευσης μεταξύ της ένωσης και του DNA μέσω του υπολογισμού της σταθεράς σύνδεσης συμπλόκου-DNA (K_b, M^{-1}). Στα πειράματα προσδιορισμού της K_b , η συγκέντρωση του συμπλόκου είναι σταθερή, ενώ η συγκέντρωση του CT-DNA προστίθεται σε διαφορετικές αναλογίες r (1, 0.5, 0.25, 0.17, 0.125, 0.1). Η καταγραφή φασμάτων γίνεται επίσης με το φασματοφωτόμετρο UV-Vis σειράς PC UV-1600 της VWR. Το αρχικό διάλυμα ένωσης 10^{-2} M σε DMSO

αραιώθηκε σε τελική συγκέντρωση 10^{-5} M. Σε κυψελίδα των 2 mL προστέθηκε κάθε φορά η κατάλληλη αναλογία r και ο υπολοιπόμενος όγκος συμπληρώθηκε με buffer.[29]

7.2.1.2. Μελέτη της ανταγωνιστικής δράσης του COSAL με το EB με Φασματοσκοπία Φθορισμού

Με τη μέθοδο της φασματοσκοπίας φθορισμού εξετάζεται ο τρόπος δέσμευσης του συμπλόκου με το DNA, προσδιορίζοντας τις σταθερές K_{sv} (σταθερά Stern-Volmer) και K_{app} (φαινομενική σταθερά). Το φθορίζον μόριο EB έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται λόγω του επίπεδου δακτυλίου της φαινανθριδίνης μεταξύ των γειτονικών αζωτούχων βάσεων του δίκλωνου DNA και να το καθιστά ορατό κατά την έκθεση του σε υπεριώδη ακτινοβολία. Με την προσθήκη μίας ένωσης που αλληλεπιδρά με το DNA, είτε μέσω παρεμβολής είτε μέσω δέσμευσης στην αύλακα, το EB αντικαθίσταται και ο φθορισμός ελαττώνεται. Παρασκευάστηκε πρότυπο διάλυμα του COSAL 10^{-2} M σε DMSO. Χρειάστηκαν συνολικά 14 δοκιμαστικοί σωλήνες. Οι πρώτοι 7 περιείχαν διαλύματα σταθερών συγκεντρώσεων $[EB] = 2.3 \mu M$ και $[CT-DNA] = 26 \mu M$, ενώ η συγκέντρωση του COSAL μεταβαλλόταν από 0 έως $600 \mu M$ στον καθένα. Στους υπόλοιπους 7 προστέθηκαν οι ίδιες ποσότητες απουσία του EB. Η μέτρηση των 14 διαλυμάτων έγινε σε κυψελίδα των 2 mL αφού πρώτα συμπληρώθηκε ο υπολοιπόμενος όγκος με buffer. Στο συγκεκριμένο πείραμα, για τη λήψη των φασμάτων εκπομπής (550-750 nm) έγινε διέγερση σε $\lambda_{max(exc)} = 527$ nm (μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης του EB-DNA) ενώ η απόσβεση του φθορισμού παρατηρήθηκε σε $\lambda_{max(em)} = 588$ nm (μήκος κύματος μέγιστης εκπομπής του EB-DNA). Δεδομένο ότι το

COSAL φθορίζει χρειάστηκε να αφαιρεθούν οι εντάσεις των φασμάτων εκπομπής των διαλυμάτων απουσία EB από τις αντίστοιχες εντάσεις αυτών παρουσία του EB. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε φασματοφθορισμόμετρο σειράς FP-8200 της εταιρείας JASCO. [78]

7.2.1.3. Μελέτη αλληλεπίδρασης με Ιξωδομετρία

Η ιξωδομετρία είναι μία κινητική υδροδυναμική μέθοδος που συμβάλλει στην εύρεση του τρόπου αλληλεπίδρασης μιας χημικής ένωσης με το CT-DNA, μέσω της μέτρησης του ιξώδους. Το ιξώδες του CT-DNA βρίσκεται σε αναλογία με το μήκος του και κατά συνέπεια οποιαδήποτε μεταβολή ή μη συμβαίνει στη δομή του, εμφανίζεται ως μείωση, αύξηση ή σταθερότητα του κινηματικού ιξώδους, αντίστοιχα. Πειραματικά, παρασκευάστηκε πρότυπο διάλυμα της ένωσης συγκέντρωσης 10^{-3} M σε DMSO. Το κινηματικό ιξώδες του CT-DNA μετρήθηκε κατά την παρουσία και απουσία του COSAL. Κάθε μέτρηση επαναλήφθηκε 3 φορές σε ένα γυάλινο τριχοειδές ιξωδόμετρο τύπου Ostwald (Εικόνα 22). Αρχικά πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις σκέτου DNA και στην συνέχεια προστέθηκαν διαδοχικά συγκεντρώσεις του συμπλόκου σε αναλογίες $r = 0-0.37$, όπου $r = [complex]/[DNA]$, $[DNA] = 0.9 \times 10^{-4}$. Επιπλέον πραγματοποιήθηκαν οι αντίστοιχες μετρήσεις με buffer και COSAL, διότι το ιξώδες n υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$n = \frac{(t - t_0)}{t_0}$$

Όπου t = ο χρόνος ροής του CT-DNA απουσία και παρουσία του COSAL, ενώ t_0 = χρόνος ροής του διαλύτη. [79]



Εικόνα 22. Γυάλινο τριχοειδές ιξωδόμετρο τύπου Ostwald.

7.2.2. Αλληλεπίδραση του COSAL με την LOX

Προετοιμασία διαλυμάτων:

- 1) Παρασκευή buffer βορικού οξέος 0.2 M. Σε 500 mL dd H₂O προστέθηκαν 6.18 g H₃BO₃. Κατά τη διάρκεια ήπιας ανάδευσης του διαλύματος, ρυθμίστηκε το pH=9.0 με προσθήκη NaOH 1M και η μέτρηση έγινε με πεχάμετρο της εταιρείας CRISON. Το buffer φυλάχτηκε στο ψυγείο. [29]
- 2) Παρασκευή διαλύματος υποστρώματος LA 0.3 mM. Όλα τα διαλύματα απαερώθηκαν με αργό (Ar) ή άζωτο (N₂) (πιο βαριά αέρια από οξυγόνο, O₂) για περίπου 1 min, ώστε να αποφευχθεί η οξείδωση του υποστρώματος.
 - Διάλυμα A. Σε ογκομετρική φιάλη συμπληρώθηκαν 50 mL ddH₂O. Σε στενόλαιμη κωνική φιάλη προστέθηκαν 50 μL αιθανόλης (EtOH) καθαρότητας 95% v/v και 50 μL LA. Το μίγμα αναδεύτηκε ήπια έως ότου

να ομογενοποιηθεί. Έπειτα, υπό αργή ανάδευση προστέθηκαν τα 50 mL ddH₂O. [29]

- Διάλυμα Β. Το τελικό διάλυμα υποστρώματος, που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα, παρασκευάστηκε από 5mL του διαλύματος Α και 30 mL buffer.

3) Παρασκευή διαλύματος ενζύμου LOX 1.93 μM

1 mg καθαρής LOX ισοδυναμεί με 131000 μονάδες. Ως μονάδα ορίζεται η ποσότητα του ενζύμου που, όταν προστεθεί σε διάλυμα 3 mL LA, προκαλεί αύξηση της οπτικής απορρόφησης στα 234 nm [μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης του προϊόντος οξείδωσης του LA, (13-(S)-HPODE)] ίση προς 0.001 ανά λεπτό, σε συνθήκες pH= 9 και θερμοκρασία 25 °C. Για τα πειράματα, το διάλυμα του ενζύμου που παρασκευάστηκε περιείχε προσεγγιστικά 10000 μονάδες ενζύμου ανά 1 mL buffer. Σύμφωνα με τα παραπάνω, αφού ζυγίστηκε ορισμένη ποσότητα της LOX, μεταφέρθηκε σε κωνική φιάλη σε θερμοκρασία πάγου (4 °C) και προστέθηκε η κατάλληλη ποσότητα buffer. Το διάλυμα ενζύμου αναδεύτηκε ήπια (προκειμένου να αποφευχθεί η μετουσίωση του) για 4-5 ώρες. [29]

7.2.2.1. Μελέτη αναστολής της καταλυτικής δράσης του ενζύμου LOX

Η LOX είναι ένα οξειδωτικό ένζυμο που οξειδώνει το LA σε 13-(S)-HPODE, ένα προϊόν που σχετίζεται με τις φλεγμονώδεις αποκρίσεις στο μιτοχόνδριο. Συνεπώς, μελετάται ο βαθμός αναστολής του ενζύμου από το COSAL, προσδιορίζοντας τη συγκέντρωση IC₅₀ (mg/mL), δηλαδή την ελάχιστη ποσότητα που απαιτείται για το 50% της αναστολής της δράσης του ενζύμου. Κατά την αυξανόμενη προσθήκη

συγκέντρωσης συμπλόκου, ερευνάται η κινητική μελέτη της αύξησης της απορρόφησης στα 234 nm ανά 1 sec για 10 min. Πειραματικά, παρασκευάστηκε πρότυπο διάλυμα COSAL 10^{-2} M σε DMSO. Σε κυψελίδα των 3 mL, προστέθηκαν σταθερές ποσότητες LA (2000 μ L, 0.3 mM) και LOX (100 μ L, 500 μονάδες ανά 3 mL δείγματος), ενώ η συγκέντρωση του συμπλόκου ελέγχθηκε σε τιμές 0, 2.5, 5, 7, 10, 15, 20, 25 μ M. Σε κάθε μέτρηση προστέθηκε η κατάλληλη ποσότητα buffer μέχρι να συμπληρωθούν 3 mL. Το διάλυμα του control περιείχε σταθερή ποσότητα ενζύμου (100 μ L), υποστρώματος (2000 μ L) και buffer (900 μ L) χωρίς το σύμπλοκο. Καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος η θερμοκρασία διατηρήθηκε σταθερή στους 37 $^{\circ}$ C (ανθρώπινος οργανισμός) σε υδατόλουτρο. Κάθε μέτρηση λήφθηκε 3 φορές. Η κινητική μελέτη πραγματοποιήθηκε σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis σειράς PC UV 1600 της εταιρείας VWR. [29]

7.2.2.2. Μελέτη του μηχανισμού του αναστολέα του ενζύμου LOX

7.2.2.2.1. Προσδιορισμός τύπου αναστολής (αντιστρεπτή ή μη)

Ο τύπος της αναστολής δοκιμάστηκε επωάζοντας το υπόστρωμα με τον αναστολέα (COSAL: 10^{-2} M σε DMSO) και σκέτο τον διαλύτη DMSO, πριν την προσθήκη του ενζύμου, σε χρονικές περιόδους (0, 5, 10, 15 min). Το διάλυμα control (2000 μ L LA, 900 μ L buffer και 100 μ L LOX, χωρίς την παρουσία DMSO ή COSAL) μετρήθηκε μόνο για 0 min αφού και μετά από 15 min η αρχική ταχύτητα θα είναι ίδια.

Κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκε σε κυψελίδα των 3 mL και επαναλήφθηκε 3 φορές σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis σειράς PC UV 1600 της εταιρείας VWR. [80]

7.2.2.2. Προσδιορισμός του είδους του μηχανισμού αντιστρεπτού αναστολέα

Για τον προσδιορισμό του είδους του μηχανισμού του αντιστρεπτού αναστολέα αξιολογήθηκαν οι κινητικές παράμετροι από την εξίσωση Michaelis-Menten, K_m (σταθερά Michaelis-Menten) και V_{max} (μέγιστη ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης), πραγματοποιώντας μια σειρά πειραμάτων με διάφορες συγκεντρώσεις LA παρουσία και απουσία του συμπλόκου. Οι κινητικές σταθερές της δραστηριότητας LOX μετρήθηκαν υπό τυπικές συνθήκες προσδιορισμού χρησιμοποιώντας συγκεντρώσεις LA 0.01, 0.0125, 0.025, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25 και 0.3 mM, παρουσία σταθερής συγκέντρωσης (IC_{50} , μM) του συμπλόκου ή του DMSO. Η ρύθμιση του pH = 9 έγινε με buffer. Κατά την κινητική μελέτη, η αύξηση της απορρόφησης καταγράφηκε στα 234 nm, που οφείλεται στην αύξηση της ποσότητας του 13-(S)-HPODE που παράγεται κατά την αντίδραση. Το ένζυμο, το υπόστρωμα και το buffer βρίσκονταν σε θερμοκρασία 37 °C. Κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκε σε κυψελίδα των 3 mL και επαναλήφθηκε τρεις φορές σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis σειράς PC UV 1600 της εταιρείας VWR. [80]

7.3. *In silico* πείραμα–Μοριακή Πρόσδεση (Molecular Docking) μεταξύ CT-DNA και COSAL

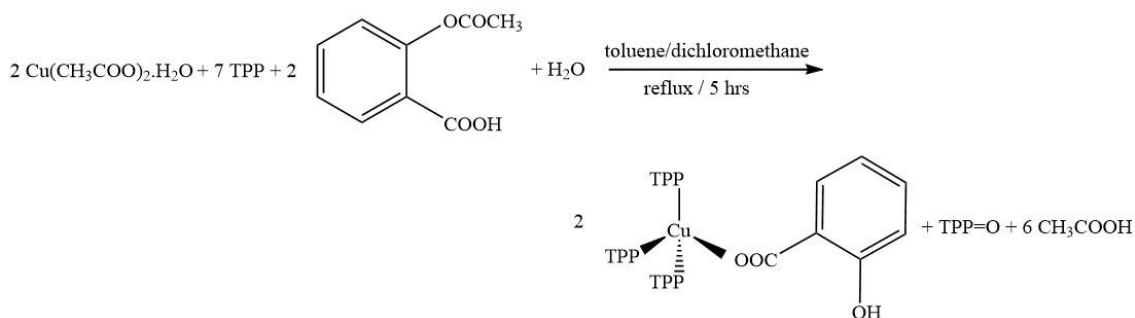
Για τη μελέτη αλληλεπίδρασης μεταξύ του συμπλόκου και του CT-DNA διεξήχθησαν θεωρητικοί υπολογισμοί Μοριακής Πρόσδεσης προκειμένου να επιβεβαιωθεί η *ex vivo* πειραματική δράση. Αυτή η μέθοδος προβλέπει τον βέλτιστο προσανατολισμό του προσδέτη σε έναν υποδοχέα. Η κλασική θερμοδυναμική υποστηρίζει ότι κατά την σύνδεση ενός βιομορίου (CT-DNA) με ένα μικρό μόριο (COSAL), η σταθερότερη (βέλτιστη) διαμόρφωση είναι αυτή με την χαμηλότερη ενέργεια δέσμευσης. [81] Πραγματοποιήθηκαν μελέτες μοριακής σύνδεσης με το πρόγραμμα AutodockVina και το AutodockTools (ADT 1.5.7). Η δομή CT-DNA βρέθηκε στη βάση δεδομένων 3D δομών, Protein Data Base (<http://www.pdb.org>).[82] Πριν από τη σύνδεση του COSAL στο CT-DNA, αφαιρέθηκαν τα μόρια του H₂O και προστέθηκαν τα πολικά υδρογόνα. Οι διαστάσεις του πλέγματος αναζήτησης (grid box) ορίστηκαν 40 × 40 × 40 Å, με τις υπόλοιπες παραμέτρους να παραμένουν ως έχουν (εγχειρίδιο Vina).[29] Τελικά, υπολογίστηκαν οι ενέργειες δέσμευσης και η σύνθετη δομή COSAL-DNA επεξεργάστηκε στο πρόγραμμα PyMOL.

Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

8. Χημικό μέρος

8.1. Σύνθεση και κρυστάλλωση του COSAL

Το COSAL λαμβάνεται από την αντίδραση ένυδρου οξικού χαλκού(II) με ASPH και TPP σε αναλογία 2:2:7 σε διάλυμα toluene/DCM υπό επαναρροή για 5 ώρες (Σχήμα 20). Στην οξειδοαναγωγική αντίδραση σχηματισμού του COSAL συμβαίνει αναγωγή του Cu(II) σε Cu(I) κατά την οποία παρατηρείται μεταβολή του χρώματος του κυανού διαλύματος σε λευκό. Ταυτόχρονα, ο φώσφορος της TPP υφίσταται αργή οξείδωση και δίνει το αντίστοιχο οξείδιο (TPP=O) με μεταβολή αριθμού οξείδωσης από +3 σε +5. Επίσης, η υδρόλυση της ASPH σε SALH₂ δημιουργεί οξική ρίζα η οποία αποπρωτονιώνει την καρβοξυλική ομάδα καταλύοντας το σχηματισμό του COSAL. Οι κρύσταλλοι του COSAL αναπτύσσονται σε διάλυμα MeOH/MeCN και είναι σταθεροί στον αέρα όταν διατηρούνται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου.



Σχήμα 20. Αντίδραση σύνθεσης του συμπλόκου COSAL.

8.2. Σημείο τήξης

Πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των σημείων τήξεως των ενώσεων COSAL, TPP και SALH₂. Τα σημεία τήξεως δεν υποβλήθηκαν σε κάποια διόρθωση. Κατά την σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας, παρατηρήθηκε αλλαγή χρώματος του COSAL στους 140 °C και ολική τήξη στους 151-153 °C. Από τον Πίνακα 2 επιβεβαιώνεται ο σχηματισμός του COSAL, εφόσον οι T_m των ligands είναι διαφορετικές.

Πίνακας 2. T_m των ligands και του συμπλόκου COSAL.

Ένωση	T _m (°C)
COSAL	151-153
SALH₂	159
TPP	80

8.3. Διαλυτότητα

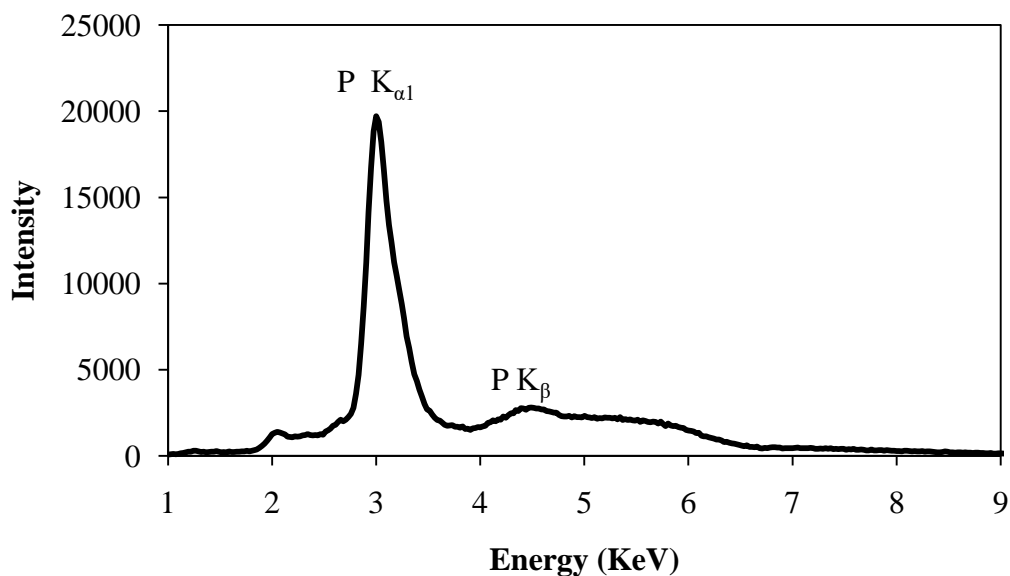
Ο έλεγχος της διαλυτότητας των κρυστάλλων COSAL παίζει καθοριστικό ρόλο στην επιλογή του κατάλληλου διαλύτη για τα βιολογικά πειράματα. Στον Πίνακα 3 φαίνεται ότι οι κρύσταλλοι διαλυτοποιούνται πλήρως στους διαλύτες DCM, CHCl₃, Me₂CO, MeOH, MeCN, DMSO και μερικώς στο toluene.

Πίνακας 3. Διαλυτότητα των κρυστάλλων COSAL.

Διαλυτότητα			
DCM	✓	DMSO	✓
CHCl₃	✓	toluene	Μερικώς
Me₂CO	✓	n-hexane	×
MeOH	✓	dd H ₂ O	×
MeCN	✓		

8.4. Φασματοσκοπία XRF

Με τη μέθοδο XRF προσδιορίζονται ποιοτικά και ποσοτικά τα στοιχεία σε ένα δείγμα. Για κάθε στοιχείο εμφανίζονται κορυφές διαφορετικών εντάσεων οι οποίες οφείλονται σε μεταβάσεις από L, M σε K στοιβάδες. Η ταυτοποίηση γίνεται από την χαρακτηριστική ενέργεια φωτονίου που εκπέμπει ενώ η ποσοτικοποίηση από την ένταση της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας. Στο φάσμα XRF του COSAL παρουσιάζονται δύο κορυφές $K_{\alpha 1}$ και K_{β} (Εικόνα 23). Η παρουσία P στο COSAL επιβεβαιώνεται από τις χαρακτηριστικές ενέργειες των φασματικών γραμμών στο φάσμα (Πίνακας 4) Επιπλέον, η περιεκτικότητα του P είναι 9.89 ± 0.19 % w/w, η οποία συμφωνεί με την θεωρητικά υπολογιζόμενη 9.42% w/w. Η περιεκτικότητα του P στο COSAL που προκύπτει από την ανάλυση XRF, αντιστοιχεί σε μοριακό βάρος (MW) = $940.74 \times n$ g/mol, το οποίο συνάδει με αυτό του $[\text{Cu}(\text{TPP})_3(\text{SAL})]$, ($987.47 \times n$ g/mol).



Εικόνα 23. Φάσμα XRF του COSAL

Πίνακας 4. Ενέργειες (keV) των X-Ray φασματικών γραμμών.

X-Ray Φασματικές γραμμές	Πειραματική ενέργεια (keV)
$K_{\alpha 1}$	3
K_{β}	4.5

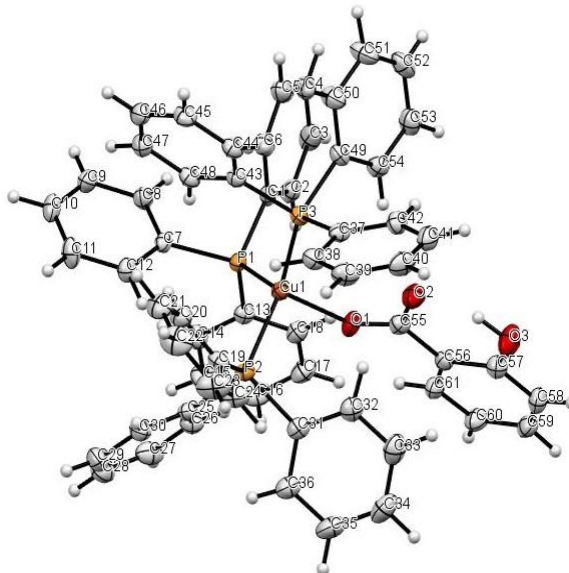
8.5. Κρυοσκοπία

Το MW του COSAL προσδιορίστηκε με την κρυοσκοπική μέθοδο, η οποία βασίζεται στην ταπείνωση του σημείου πήξεως της διαλυμένης ουσίας (COSAL) στον διαλύτη (dd H₂O). Το MW βρέθηκε 1009.81 g/mol που αντιστοιχεί στον μοριακό τύπο [Cu(TPP)₃(SAL)], (θεωρητικό= 987.47 g/mol) και επιπλέον συμφωνεί με αυτό που προσδιορίζεται από τη φασματοσκοπία XRF (940.74 ×n g/mol, n=1).

8.6. XRD

Η επίλυση της κρυσταλλικής δομής του COSAL έγινε με Περίθλαση Ακτινών X (XRD). Το διάγραμμα ORTEP του COSAL παρουσιάζεται στο Σχήμα 21. Οι επιλεγμένες αποστάσεις και οι γωνίες δεσμών φαίνονται στον Πίνακα 5. Το κρυσταλλικό σύστημα του COSAL βρέθηκε ότι είναι ορθορομβικό. Συγκεκριμένα, τρία άτομα P από TPP και ένα αποπρωτονιωμένο καρβοξυλικό άτομο οξυγόνου του SALH₂ εντάσσονται στο ιόν του Cu(I). Οι γωνίες δεσμών γύρω από το μεταλλικό κέντρο είναι μεταξύ 118.75° και 93.84° παραπέμποντας σε μια τετραεδρική γεωμετρία. Από τα δεσμών C55-O1 (1.259(2) Å) και C55-O2 (1.268(2) Å) της καρβοξυλομάδας του

SALH₂ συμπεραίνεται ότι ο τρόπος ένταξης του SALH₂ στο ιόν του Cu(I) είναι μονοδοντικός με διάχυση ηλεκτρονιακού φορτίου μεταξύ των δύο O.



Σχήμα 21. ORTEP διάγραμμα της κρυσταλλικής δομής του COSAL

Πίνακας 5. Επιλεγμένα μήκη και γωνίες δεσμών.

Γωνίες Δεσμών (°)		Αποστάσεις Δεσμών (Å)	
P(1)–Cu(1)–P(2)	118.75(2)	Cu(1)–P(1)	2.3448(6)
P(2)–Cu(1)–P(3)	111.10(2)	Cu(1)–P(2)	2.3271(6)
P(3)–Cu(1)–O(1)	113.36(4)	Cu(1)–P(3)	2.3216(6)
O(1)–Cu(1)–P(1)	93.84 (4)	Cu(1)–O(1)	2.087(1)
		O(1)–C(55)	1.259(1)
		O(2)–C(55)	1.268(2)
		O(3)–C(57)	1.358(2)
		O(3)–H30	0.93(3)

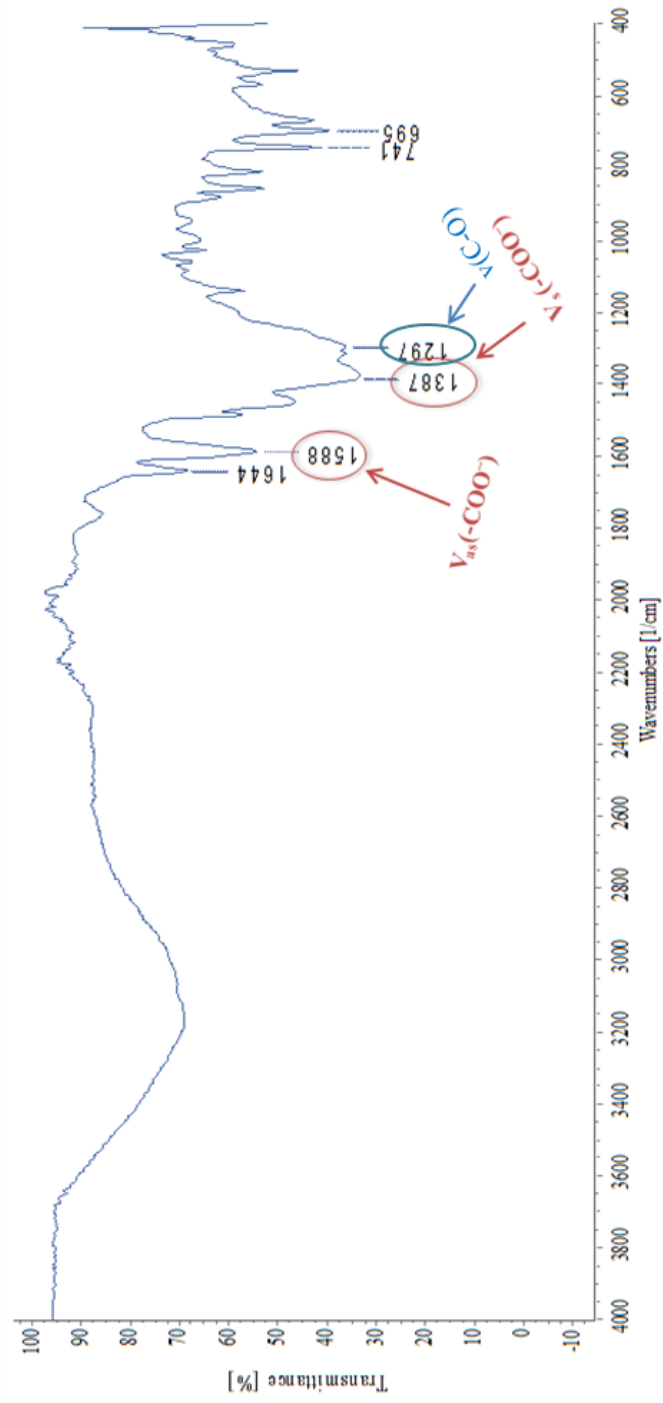
8.7. ATR-FTIR

Παρακάτω παρουσιάζονται τα ATR-FTIR φάσματα του σαλικυλικού καλίου (SALHK) (Εικόνα 24), του συμπλόκου COSAL (Εικόνα 25) και του ligand TPP (Εικόνα 26). Η χαρακτηριστική δόνηση τάσης του δεσμού ν(C-O) εμφανίζεται στους 1297 cm^{-1} στο φάσμα ATR-FTIR του SALHK και μετατοπίζεται στους 1256 cm^{-1} στο φάσμα του COSAL. Στο φάσμα ATR-FTIR του SALHK, η ασύμμετρη δόνηση τάσης (ν_{as}) της αποπρωτονιωμένης καρβοξυλικής ομάδας $-\text{COO}^-$ εμφανίζεται στα 1588 cm^{-1} ενώ η συμμετρική δόνηση τάσης (ν_s) της $-\text{COO}^-$ στα 1387 cm^{-1} . Αντίστοιχα, στο φάσμα ATR-FTIR του COSAL η ν_{as} μετατοπίζεται στα 1629 cm^{-1} ενώ η ν_s στα 1381 cm^{-1} . Από τη διαφορά $\Delta_\nu = \nu_{as}(\text{COO}^-) - \nu_s(\text{COO}^-)$ συμπεραίνεται η ένταξη του σαλικυλικού ανιόντος γύρω στο Cu(I) (Πίνακας 5). Γενικά, όταν ο τρόπος ένταξης της $-\text{COO}^-$ ομάδας γύρω από το μεταλλικό ιόν είναι μονοδοντικός, η τιμή Δ_ν είναι υψηλότερη από αυτή που παρατηρείται για την ιοντική ένωση, ενώ όταν η $-\text{COO}^-$ ομάδα χηλικοποιείται, η Δ_ν είναι μικρότερη από αυτή του ελεύθερου άλατος. Για την ασύμμετρη διδοντική ένταξη ισχύει ό, τι και για την μονοδοντική. Επίσης, κατά τη γεφύρωση των μεταλλικών ιόντων, η τιμή Δ_ν είναι σχεδόν ίδια με αυτή που παρατηρείται για την ιοντική ένωση. [83, 84] Ως αποτέλεσμα, η τιμή Δ_ν για το COSAL (248 cm^{-1}) είναι υψηλότερη από την αντίστοιχη στο SALHK (201 cm^{-1}). Για τους λόγους που αναφέρθηκαν παραπάνω, υποδεικνύεται ο μονοδοντικός τρόπος ένταξης μεταξύ Cu1-O1 και Cu1-O2 στο COSAL και συμπεραίνεται ότι η μάζα του δείγματος έχει ίδια δομή με αυτή του μονοκρυστάλλου.

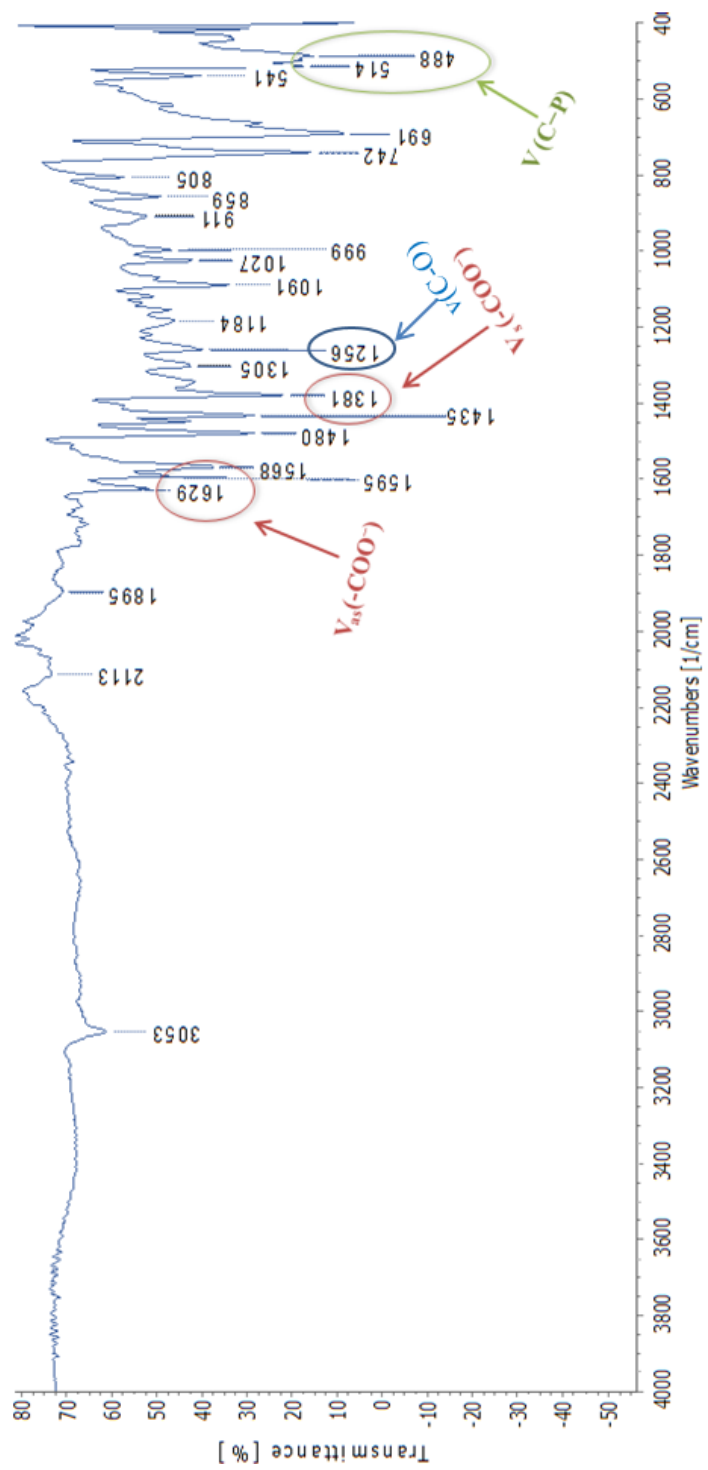
Πίνακας 5. Τρόπος ένταξης των ligand στο μεταλλικό κέντρο σύμφωνα με τις τιμές Δ_v

Δ_v συμπλόκου $> \dots > \Delta_v$ άλατος	Μονοδοντική ή ασύμμετρη διδοντική ένταξη
Δ_v συμπλόκου $< \dots < \Delta_v$ άλατος	Χηλική ένταξη
Δ_v συμπλόκου $\approx \Delta_v$ άλατος	Γεφυρωτική ένταξη

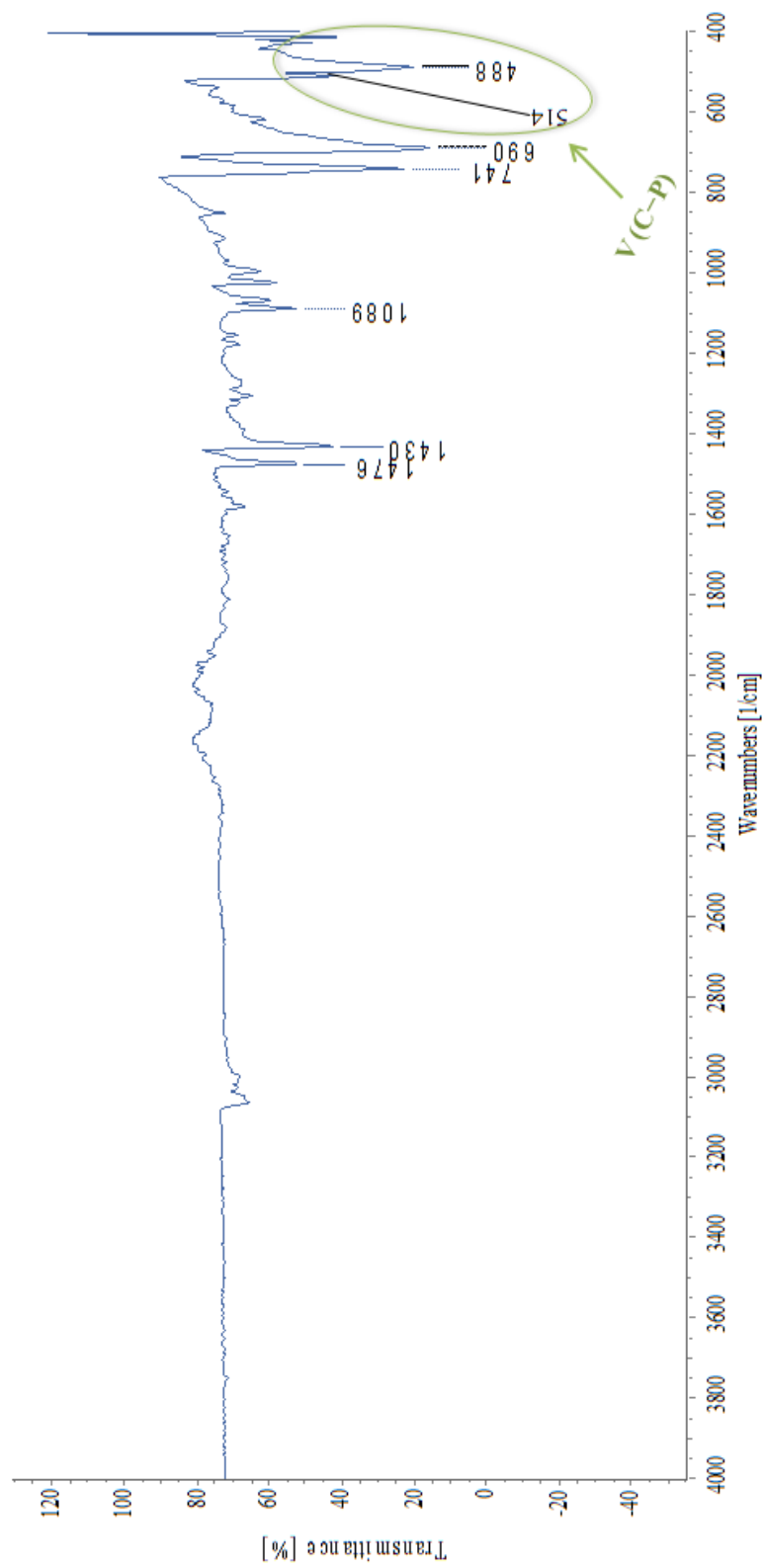
Τέλος, στο φάσμα ATR-FTIR της ελεύθερης TPP εμφανίζονται δύο χαρακτηριστικές τάσεις δόνησης $\nu(\text{C-P})$ στα 514 cm^{-1} και 488 cm^{-1} , οι οποίες παρατηρούνται και στο φάσμα του COSAL [63]. Συνεπώς, επιβεβαιώνεται η δέσμευση του μεταλλοφαρμάκου με την TPP.



Εικόνα 24. Φάσμα ATR-FTIR του SALHK



Εικόνα 25. Φάσμα ATR-FTIR του COSAL



Εικόνα 26. Φάσμα ATR-FTIR του TPP

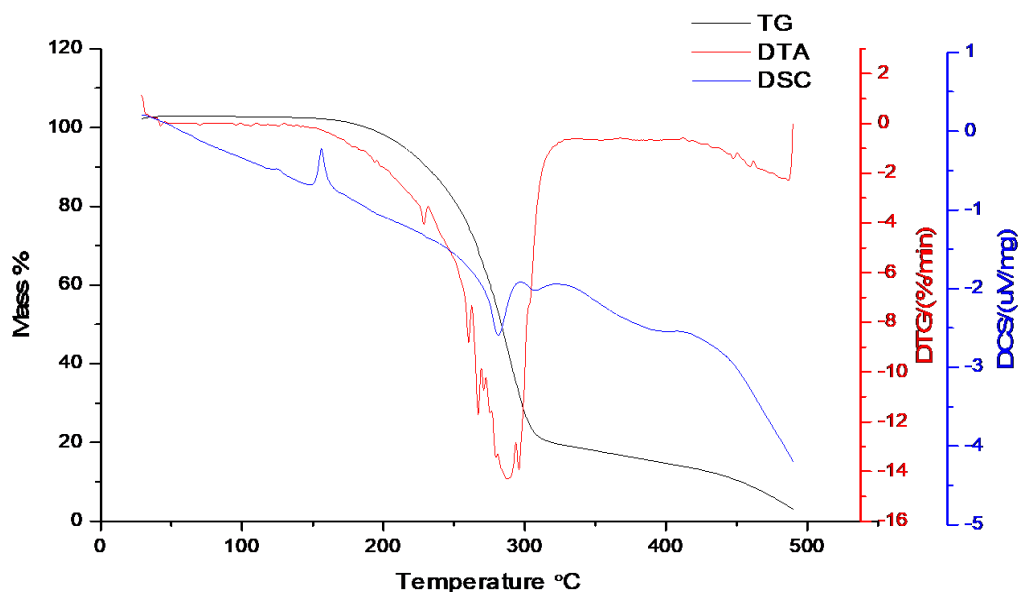
8.8. TG-DTA/DSC

Το διάγραμμα θερμικής ανάλυσης TG-DTA/DSC του COSAL παρουσιάζεται στην Εικόνα 27. Από την TG-DTA ανάλυση συμπεραίνεται ότι το COSAL αποσυντίθεται σε δύο στάδια με συνολική απώλεια μάζας 96.96% (Πίνακας 6).

Πίνακας 6. Αποσύνθεση του COSAL

Στάδια αποσύνθεσης	Απώλεια μάζας (%)
145.8 °C- 338 °C	81.36
338 °C- 489.7 °C	15.6

Το θερμοδιάγραμμα DSC του COSAL εμφανίζει μία ενδόθερμη (περιοχή τήξης) και μία εξώθερμη (περιοχή ψυχρής κρυστάλλωσης) μετάβαση στους 156 °C και 281 °C, αντίστοιχα. Αυτό επιβεβαιώνει τον προσδιορισμό του σημείο τήξεως του COSAL = 151-153 °C.



Εικόνα 27. Διάγραμμα TG-DTA/ DSC του COSAL

8.9. Φασματοσκοπία UV-Vis

Στην Εικόνα 28 απεικονίζονται τα φάσματα απορρόφησης UV-Vis των ενώσεων COSAL, TPP και SALH₂ σε διάλυμα DMSO. Οι συντελεστές μοριακής απορρόφησης ($\epsilon \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) είναι χαρακτηριστικοί για κάθε ένωση σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος και υπολογίζονται από τον Νόμο Lambert-Beer για αραιά διαλύματα (Πίνακας 7):

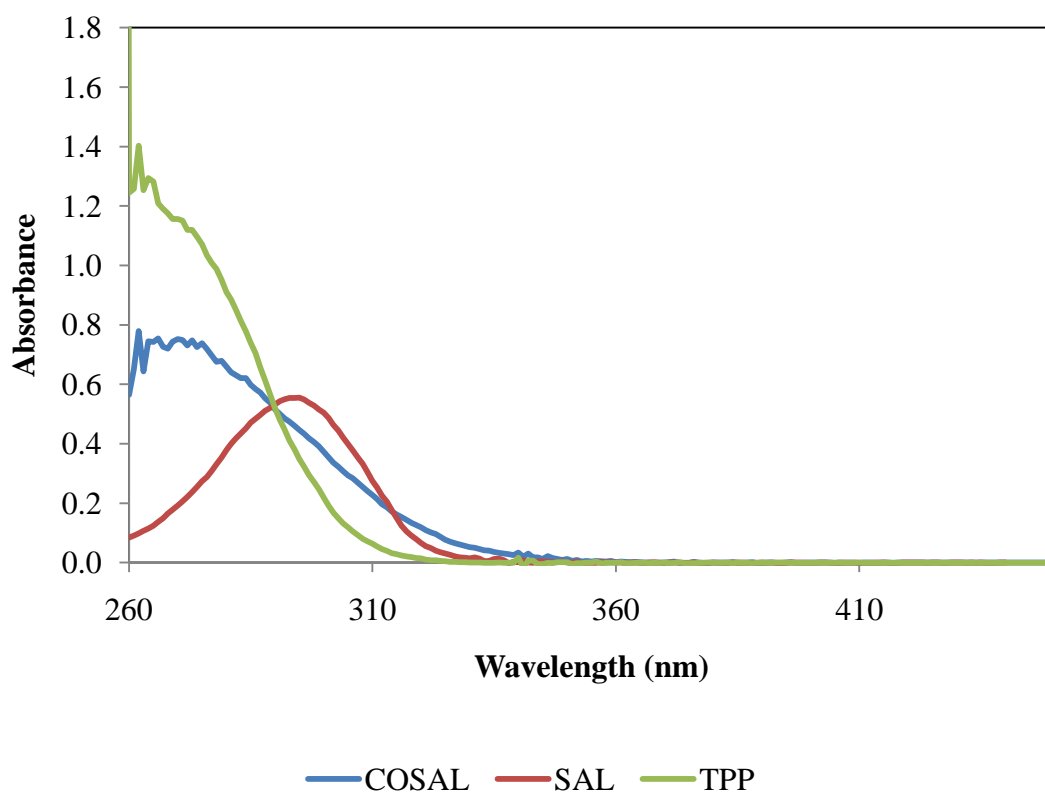
$$A = \epsilon \times b \times c$$

A= απορρόφηση, C= συγκέντρωση του διαλύματος (M), b= το μήκος κυψελίδας=1 cm.

Πίνακας 7. Υπολογισμός των $\epsilon \text{ (cm}^{-1} \text{ M}^{-1})$ των ενώσεων.

Ένωση	λ_{max}	Απορρόφηση	Συγκέντρωση (M)	b (cm)	$\epsilon \text{ (cm}^{-1} \text{ M}^{-1})$
COSAL	262	0.7793	10^{-5}	1	77930
SALH ₂	295	0.5551	10^{-4}	1	5551
TPP	262	1.4031	10^{-4}	1	14031

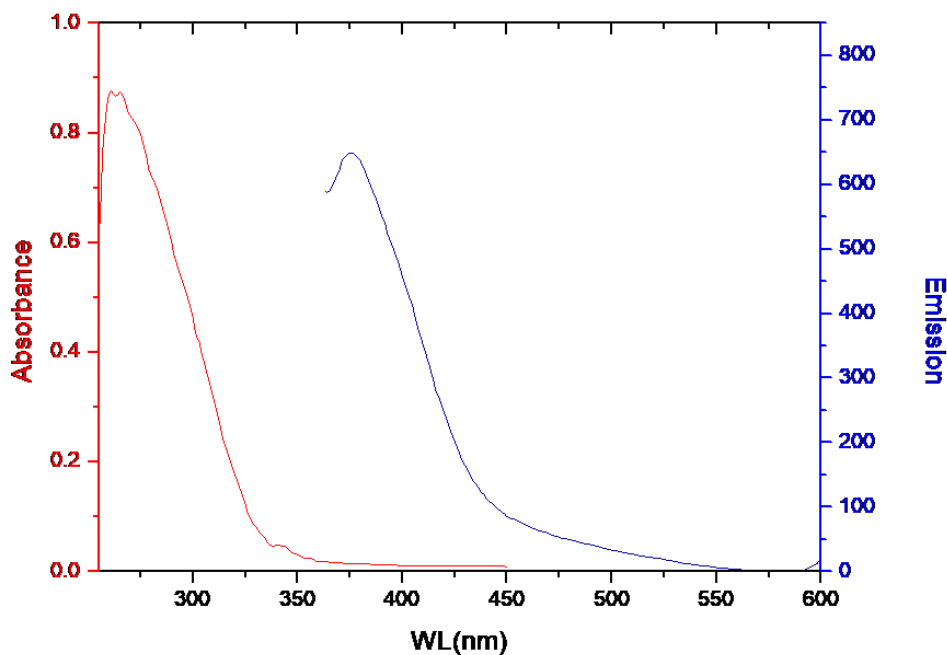
Η ελεύθερη TPP εμφανίζει ένα μέγιστο απορρόφησης στο $\lambda_{\text{max}} = 262 \text{ nm}$ που οφείλεται σε $\pi^* \leftarrow \pi$ μεταβάσεις με $\epsilon = 14031 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$. Αυτή η ζώνη απορρόφησης παρατηρείται επιπλέον στο φάσμα του COSAL (262 nm) με $\epsilon = 77930 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$, η οποία αποδίδεται σε μεταπτώσεις ($\pi^* \leftarrow \pi$) του ligand TPP εντός του COSAL. Τέλος, το φάσμα του SALH₂ κυριαρχείται από ένα μέγιστο απορρόφησης στα 305 nm με $\epsilon = 5551 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ λόγω της διέγερσης των π ηλεκτρονίων στον δακτύλιο βενζολίου. Ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης του COSAL είναι πολύ μεγαλύτερος σε σχέση με αυτούς των ελεύθερων ligand οπότε επιβεβαιώνεται ο σχηματισμός του συμπλόκου.



Εικόνα 28. Φάσματα UV-Vis των COSAL, TPP και SALH₂ σε διάλυμα DMSO

8.10. Φασματοσκοπία Φθορισμού

Στην Εικόνα 29 δίνεται το φάσμα απορρόφησης και εκπομπής του σε διάλυμα DMSO όταν διεγερθεί σε $\lambda_{\text{max}} = 262 \text{ nm}$ (μέγιστο απορρόφησης του COSAL). Η ταινία εκπομπής σε $\lambda_{\text{max}} = 376 \text{ nm}$ αποδεικνύει τον φθορισμό του συμπλόκου COSAL, που μπορεί να οφείλεται στους ligands καθώς και στο ιόν του Cu(I). [63,85]

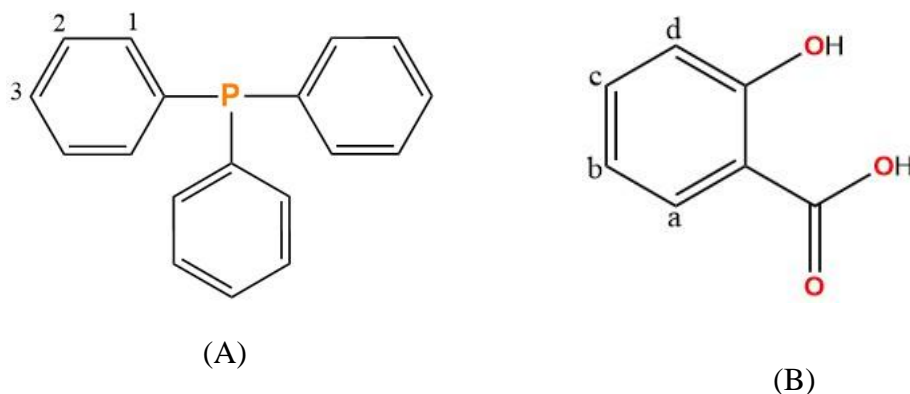


Εικόνα 29. Φάσμα απορρόφησης και εκπομπής του COSAL

8.11. Φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$

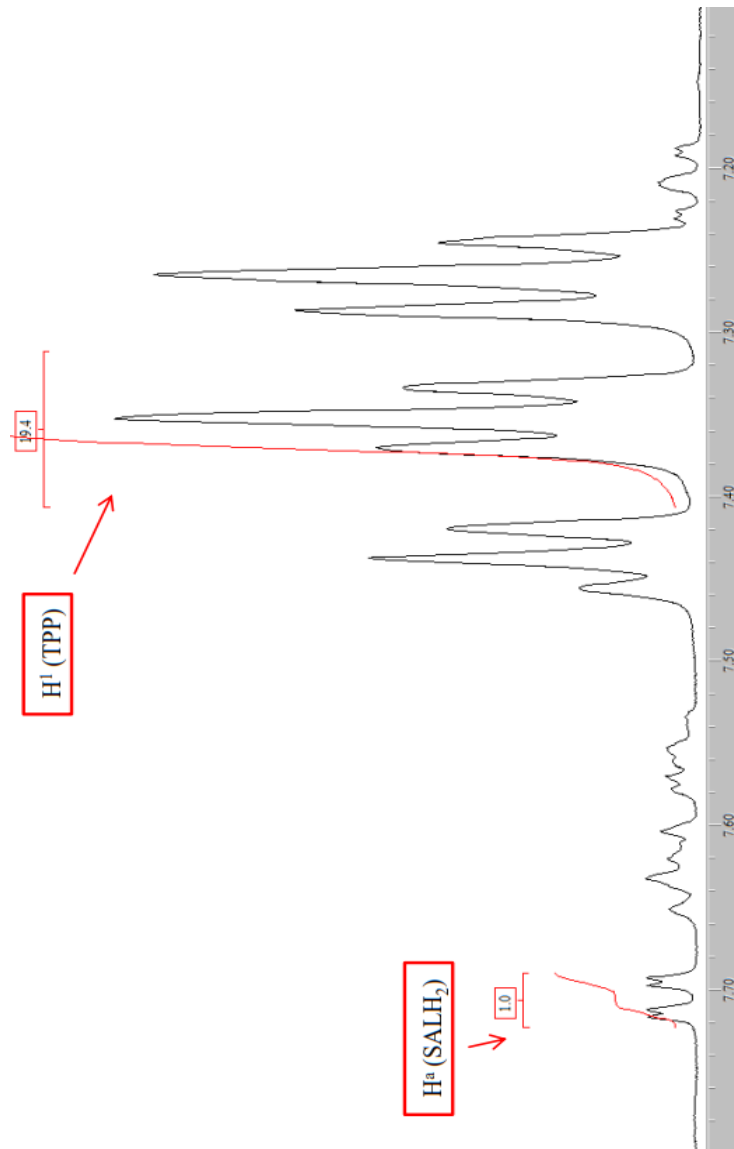
Μία από τις εφαρμογές της φασματοσκοπίας $^1\text{H-NMR}$ είναι ο προσδιορισμός της μοριακής δομής των ενώσεων σε διάλυμα. Τα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ των ενώσεων COSAL, TPP και SALH_2 σε διάλυμα DMSO-d_6 παρουσιάζονται στην Εικόνα 31. Αρχικά, στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ελεύθερης TPP, τα αρωματικά πρωτόνια ($\text{H}^{1,2,3}$) εμφανίζονται στα 7.365-7.212 ppm, με τα πιο προστατευμένα να είναι τα $\text{H}^{2,3}$ (Σχήμα 22 (A)) [29]. Στο φάσμα του COSAL τα αντίστοιχα σήματα συντονισμού πρωτονίων της TPP εμφανίζονται μετατοπισμένα από 7.371 έως 7.246 ppm γεγονός που αποδεικνύει τον συντονισμό στο ιόν Cu(I) . Επιπλέον, το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του ελεύθερου SALH_2 εμφανίζει σήματα συντονισμού πρωτονίων στα 7.778–7.739 ppm (d-

διπλή, H^a), 7.512–7.445 ppm (t-τριπλή, H^c), 6.931–6.921 ppm (d-διπλή, H^d) και 6.861 ppm (t-τριπλή, H^b) (Σχήμα 22 (B)) [40] Αυτά τα σήματα μετατοπίζονται στο φάσμα του COSAL στα 7.717-7.693 ppm (d, H^a), 6.69 ppm (d, H^d) και 6.65 ppm (t, H^b), ενώ το αρωματικό πρωτόνιο H^c εμφανίζεται μεταξύ 7.455 και 7.42 ppm.

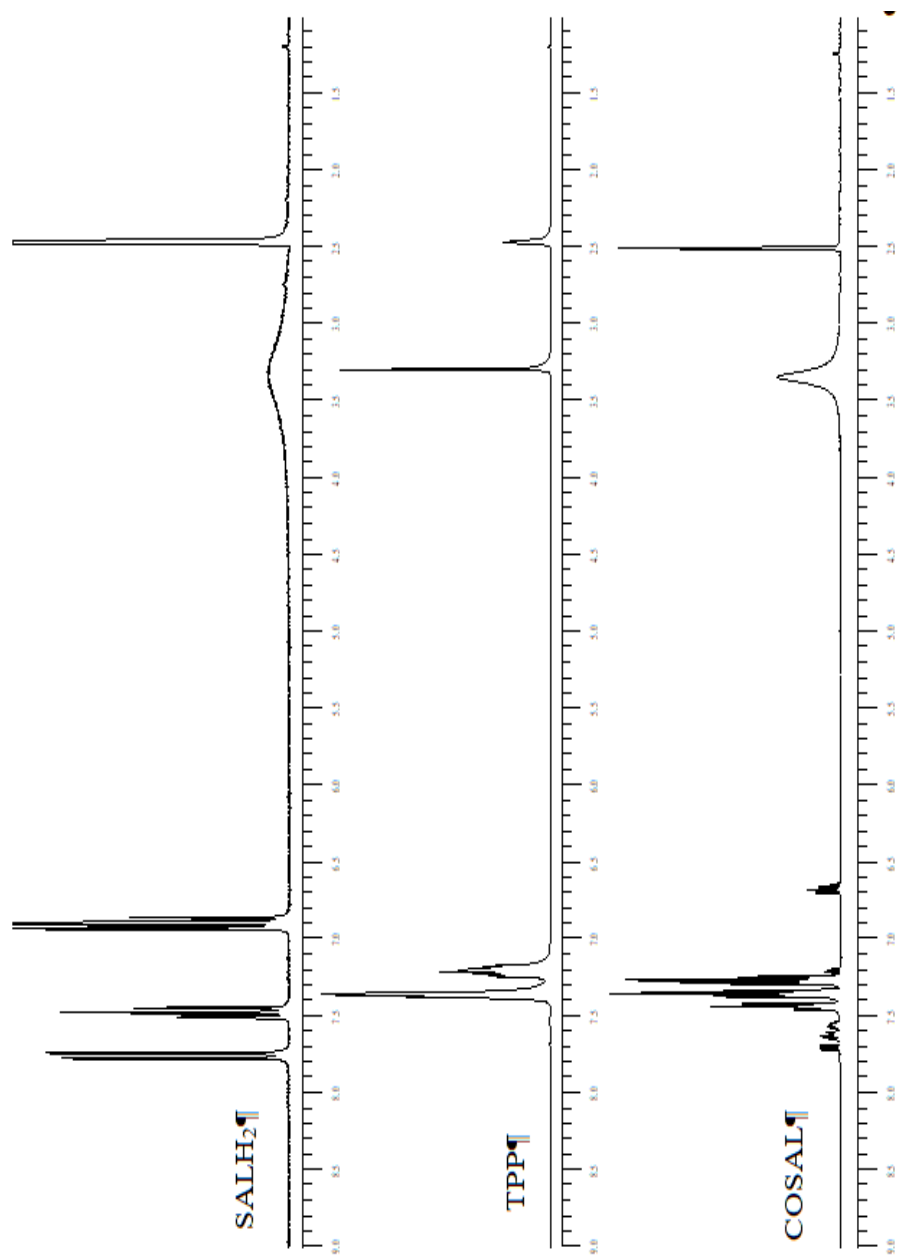


Σχήμα 22. Μοριακή δομή της TPP (A) και του SALH₂ (B)

Από την ολοκλήρωση των σημάτων πρωτονίων από 7.72 έως 7.69 ppm που αποδίδονται στο H^a του SALH₂ και των αντίστοιχων από 7.37 έως 7.33 ppm που αποδίδονται στα H^1 της TPP αποδεικνύεται ότι η αναλογία SALH₂ /TPP είναι 1/3 (Εικόνα 30). Επομένως η δομή του COSAL διατηρείται και στο διάλυμα αναλλοίωτη.



Εικόνα 30. $^1\text{H-NMR}$ φάσμα COSAL

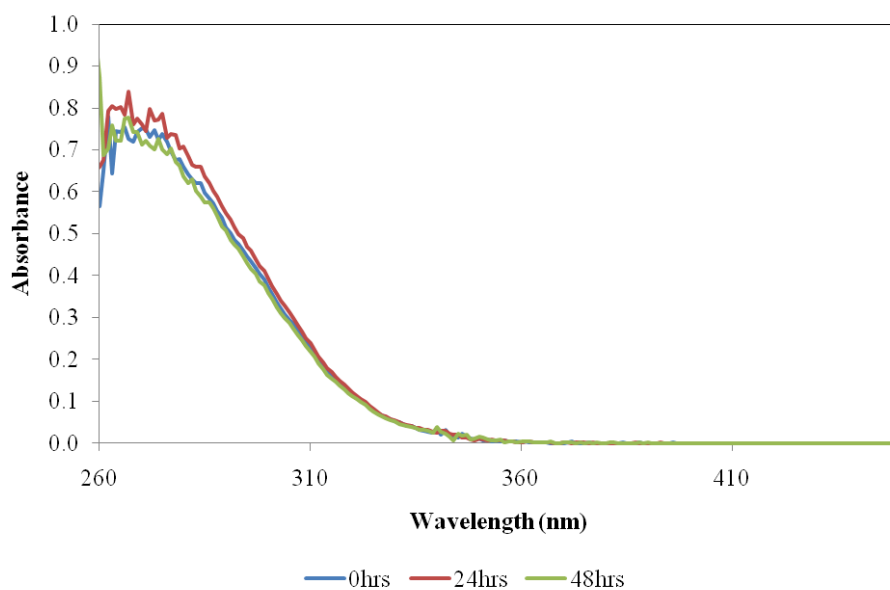


Εικόνα 31. $^1\text{H-NMR}$ φάσματα των ενώσεων SALH₂, TPP και COSAL

8.12. Μελέτες σταθερότητας του COSAL

8.12.1 Φασματοσκοπία UV-Vis

Η σταθερότητα των κρυστάλλων COSAL μελετάται με φασματοσκοπία UV-Vis, σε χρονικό διάστημα από 0 έως 48 ώρες (διάλυμα 10^{-5} M σε DMSO) όσο δηλαδή και ο απαιτούμενος χρόνος επώασης για τα βιολογικά πειράματα. Στο φάσμα UV-Vis, το COSAL παραμένει σταθερό μετά από 48 ώρες, χωρίς σημαντική μεταβολή απορρόφησης στο $\lambda_{\max} = 262$ nm (Εικόνα 32).

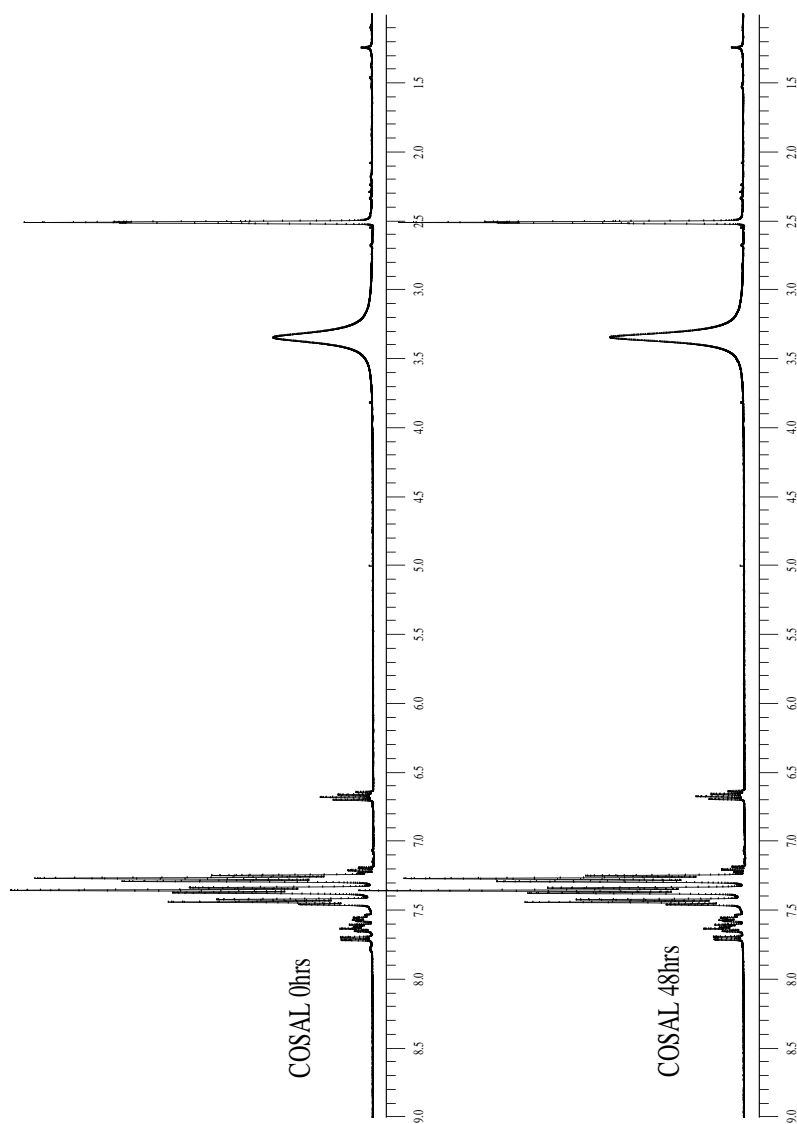


Εικόνα 32. Φάσμα σταθερότητας UV-Vis του COSAL σε διάλυμα DMSO.

8.12.2. Φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$

Η σταθερότητα των κρυστάλλων COSAL (διάλυμα DMSO- d_6) ελέγχθηκε περαιτέρω με φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ για 0 και 48 ώρες. Η συγκεκριμένη χρονική

περίοδος επιλέχθηκε με βάση τον απαιτούμενο χρόνο επώασης των κυτταροκαλλιιεργειών με το COSAL. Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ δεν παρατηρείται καμία μεταβολή στις μετατοπίσεις (δ , ppm) ούτε στα σήματα συντονισμού πρωτονίων σε διάστημα 48 ωρών γεγονός που αποδεικνύει τη σταθερότητα του COSAL (Εικόνα 33).



Εικόνα 33. Φάσμα σταθερότητας $^1\text{H-NMR}$ του COSAL σε DMSO-d_6

9. Βιολογικές μελέτες

9.1. Μελέτη της *in vitro* αντιπολλαπλασιαστικής δράσης σε MCF-7 (HD) και MDA-MB-231 (HI) κύτταρα.

Η *in vitro* αντιπολλαπλασιαστική δράση του COSAL δοκιμάστηκε έναντι δύο κυτταρικών σειρών ανθρώπινου αδενοκαρκινώματος μαστού, των κυττάρων MCF-7 (HD) και MDA-MB-231 (HI). Η μελέτη πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της SRB μετά από περίοδο επώασης 48 ωρών. Οι τιμές IC_{50} του COSAL έναντι των κυττάρων MCF-7 και MDA-MB-231 βρέθηκαν 2.4 ± 0.07 και 11.6 ± 0.6 μ M, αντιστοίχως (Πίνακας 8). Επομένως, το COSAL αναστέλλει σχεδόν πενταπλάσια τα κύτταρα MCF-7 (HD) απ' ό,τι τα MDA-MB-231 (HI), γεγονός που υποδηλώνει ότι είναι πιο αποτελεσματικό χημειοθεραπευτικό φάρμακο για καρκίνους του μαστού που εξαρτώνται από ορμονικούς υποδοχείς. Επίσης, οι ενώσεις TPP και $SALH_2$ δεν εμφάνισαν κάποια ανασταλτική δράση ($IC_{50} > 30$ μ M), με αποτέλεσμα το μεταλλικό ιόν Cu(I) που ενώνει τους ligands να έχει καθοριστικό ρόλο στην αντιπολλαπλασιαστική δράση του φαρμάκου. Οι αντίστοιχες τιμές IC_{50} του cisplatin είναι 5.5 ± 0.4 μ M για τα MCF-7 (HD) και 26.7 ± 1.1 μ M για τα κύτταρα MDA-MB-231 (HI) (Πίνακας 8) [78]. Σε σύγκριση με το cisplatin, το COSAL παρουσιάζει 2.5 φορές μεγαλύτερη ανασταλτική δράση έναντι των MCF-7 (HD) και των MDA-MB-231 (HI).

Πίνακας 8. Αντιπολλαπλασιαστική δράση του COSAL έναντι κυττάρων MCF-7 (HD) και MDA-MB 231 (HI).

Ένωση	IC ₅₀ (μM)		
	MCF-7	MDA-MB 231	MRC-5
COSAL	2.4 ± 0.07	11.6 ± 0.6	7.0 ± 0.27
TPP	> 30	> 30	> 30
SALH₂	> 30	> 30	> 30
cisplatin	5.5 ± 0.4	26.7 ± 1.1	1.1 ± 0.2

9.2. Μελέτη της *in vitro* τοξικότητας σε MRC-5 κύτταρα

Η *in vitro* τοξικότητα εξετάστηκε σε φυσιολογικά εμβρυικά κύτταρα ινοβλαστών του πνεύμονα (MRC-5). Η τιμή IC₅₀ του COSAL έναντι των κυττάρων MRC-5 βρέθηκε 7.0 ± 0.27 μM (Πίνακας 9). Για την αξιολόγηση της τοξικότητας του COSAL υπολογίζεται ο Δείκτης Θεραπευτικής Ισχύος (TPI), ο οποίος ορίζεται από τον τύπο:

$$TPI = \frac{IC_{50} \text{ φυσιολογικών κυττάρων}}{IC_{50} \text{ καρκινικών κυττάρων}}$$

Όπου IC₅₀ φυσιολογικών κυττάρων είναι η ελάχιστη κυτταροτοξική συγκέντρωση που μπορεί να προκαλέσει κυτταρικό θάνατο στο 50% των φυσιολογικών κυττάρων. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας η τιμή TPI πρέπει να είναι μεγαλύτερη του 2 για να μπορεί μία ένωση να δράσει ως φάρμακο και μεγαλύτερη της μονάδας για να είναι εκλεκτική ως προς τα καρκινικά κύτταρα. Προσδιορίστηκε η εκλεκτικότητα του COSAL και για τις δύο κυτταρικές γραμμές καρκίνου του μαστού σε σχέση με τις φυσιολογικές. Οι τιμές TPI υπολογίστηκαν 2.91 για τα MCF-7 και 0.6 για τα MDA-MB-231. Συνεπώς, το COSAL εμφανίζει μεγαλύτερη εκλεκτικότητα στα MCF-7 (σε

σχέση με τα υγιή κύτταρα), απ' ότι στα MDA-MB-231 (HI). Λαμβάνοντας υπόψιν ότι οι τιμές TPI του cisplatin για MCF-7 (HD) και MDA-MB-231(HI) είναι 0.20 και 0.04, αντιστοίχως, το COSAL είναι πιο εκλεκτικό και για τις δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν σε σύγκριση με το cisplatin. [68, 86]

Πίνακας 9. *In vitro* τοξικότητα του COSAL σε φυσιολογικά κύτταρα MRC-5

Ένωση	IC ₅₀ (μM)	TPI	
		MCF-7	MDA-MB-231
	MRC-5		
COSAL	7.0± 0.27	2.91	0.6
TPP	> 30		
SALH₂	> 30		
Cisplatin	1.1 ± 0.2	0.20	0.04

9.3. *Ex vivo* Αλληλεπίδραση COSAL με CT-DNA

9.3.1. Μελέτη αλληλεπίδρασης με φασματοσκοπία UV-Vis

Μία από τις μελέτες που πραγματοποιήθηκαν για τη σταθερότητα του CT -DNA και την αλληλεπίδραση του με το COSAL ήταν η φασματοσκοπία απορρόφησης UV-Vis. Τα μεταλλοφάρμακα μπορούν να αλληλεπιδράσουν είτε ομοιοπολικά είτε μη ομοιοπολικά με το CT-DNA (Πίνακας 10). [87]

Πίνακας 10. Τρόποι αλληλεπίδρασης μεταλλικών συμπλόκων με CT-DNA

Ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις	Μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις
Μη αντιστρεπτές	Αντιστρεπτές
Ισχυρές	Ασθενείς
Αντικατάσταση αζωτούχων βάσεων του DNA από ευκίνητους ligands	Παρεμβολή Ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση Δέσμευση στη μεγάλη ή μικρή αύλακα

Ο αντιστρεπτός μη ομοιοπολικός τρόπος δέσμευσης του CT-DNA με το COSAL προσδιορίστηκε από τη μετατόπιση του μέγιστου της απορρόφησης $\lambda_{\max} = 258$ nm του CT-DNA κατά την αυξανόμενη προσθήκη του COSAL. Υπάρχουν τέσσερα φαινόμενα: η υποχρωμία, η υπερχρωμία, η βαθυχρωμία και η υψιχρωμία. (Πίνακας 11) [87]

Πίνακας 11. Φαινόμενα ανάλογα με τη μεταβολή του μέγιστου απορρόφησης

Υποχρωμία	Αύξηση απορρόφησης
Υπερχρωμία	Μείωση απορρόφησης
Βαθυχρωμία (red- shift)	Μετατόπιση λ_{\max} προς μεγαλύτερα λ $\Delta\lambda > 8$ nm
Υψιχρωμία (blue-shift)	Μετατόπιση λ_{\max} προς μικρότερα λ $\Delta\lambda > 8$ nm

Ανάλογα με το φαινόμενο που προκύπτει αποδίδεται κάποιο είδος αλληλεπίδρασης του COSAL με το CT-DNA (Πίνακας 12, 13). Εάν μια αλληλεπίδραση είναι πιο αδύναμη, τότε εμφανίζονται μόνο υποχρωμικά και υπερχρωμικά φαινόμενα.[87]

Πίνακας 12. Συσχέτιση τρόπων αλληλεπίδρασης με αποτελέσματα μετατόπισης του μεγίστου απορρόφησης.

Μη ομοιοπολική Αλληλεπίδραση	Υπερχρωμία	Υποχρωμία	Βαθυχρωμία	Υψιχρωμία
Παρεμβολή		✓		
Μετουσίωση- Σπάσιμο δεσμών H	✓	✓		
Ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση μεταξύ των κατιόντων και των αρνητικά φορτισμένων φωσφορικών ομάδων	✓	✓		
Δέσμευση στην αύλακα (Δεσμοί H, van der Waals)	✓			
Σταθεροποίηση της διπλής έλικας DNA			✓	
Αποσταθεροποίηση της διπλή έλικας DNA				✓

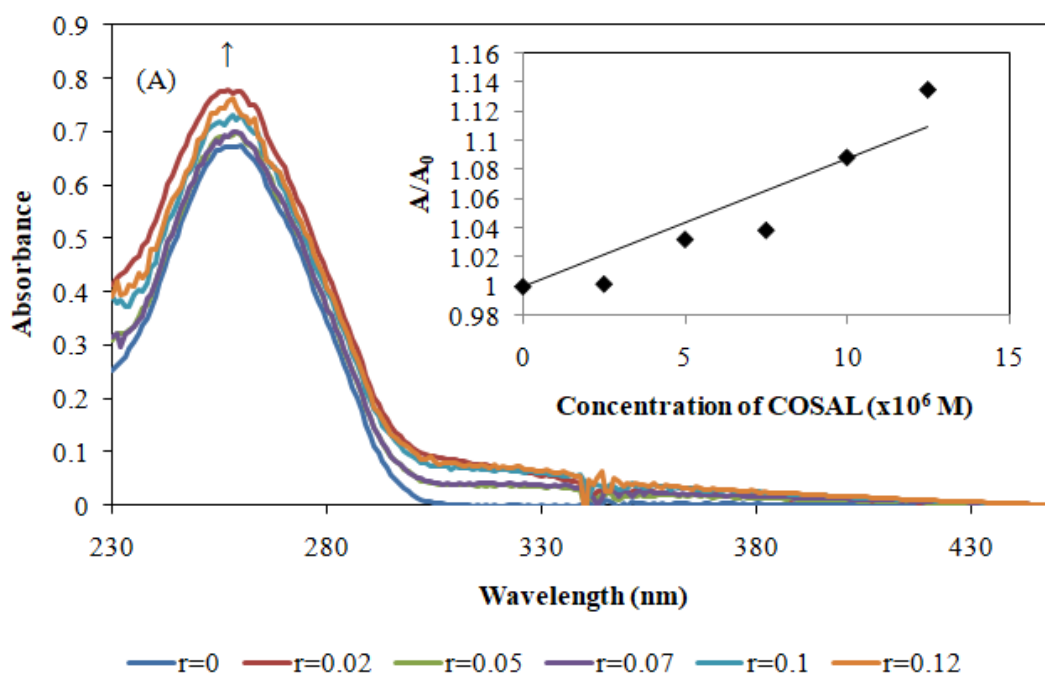
Πίνακας 13. Συσχέτιση τρόπων αλληλεπίδρασης με συνδυαστικά αποτελέσματα μετατόπισης του μεγίστου απορρόφησης.

	Υπερχρωμία +Βαθυχρωμία	Υποχρωμία +Βαθυχρωμία	Υποχρωμία +Υψιχρωμία	Υπερχρωμία +Υψιχρωμία
Παρεμβολή		✓ Μεγάλο red shift $\Delta\lambda > 15 \text{ nm}$	✓	
Μετουσίωση- Σπάσιμο δεσμών H	✓ Μικρό red shift			✓ Μικρό blue shift
Ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση μεταξύ των κατιόντων και των αρνητικά φορτισμένων φωσφορικών ομάδων	✓ Μικρό red shift			✓ Μικρό blue shift
Δέσμευση στην αύλακα (Δεσμοί H, van der Waals)	✓ Μικρό red shift $\Delta\lambda < 8 \text{ nm}$			✓ Μικρό blue shift
Ομοιοπολική αλληλεπίδραση				✓

Στην Εικόνα 34 (A) παρουσιάζονται τα φάσματα UV του CT-DNA απουσία και παρουσία COSAL σε αναλογίες r (0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1, 0.12), όπου:

$$r = [COSAL]/[DNA]$$

Στην Εικόνα 34 (B) δίνεται το διάγραμμα του πηλίκου A/A_0 συναρτήσει της συγκέντρωσης του συμπλόκου COSAL. Κατά την προσθήκη αυξανόμενης συγκέντρωσης συμπλόκου παρατηρήθηκε αύξηση της απορρόφησης ($\lambda_{\max} = 258 \text{ nm}$), χωρίς κάποια μετατόπιση σε μεγαλύτερα ή μικρότερα λ . Συνεπώς, εμφανίζεται υπερχρωμία με ποσοστό 13.25 % που μπορεί να αποδίδεται είτε σε ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση, είτε σε μετουσίωση του DNA είτε σε δέσμευση στην αύλακα (Πίνακας 12). [29,87]



Εικόνα 34. (A) Φάσματα UV του CT-DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα απουσία και παρουσία COSAL σε τιμές r 0-0.12, ($r = [COSAL]/[DNA]$) και (B) διάγραμμα A/A_0 συναρτήσει $[COSAL]$ σε $\lambda_{\max} = 258 \text{ nm}$.

Η ισχύς δέσμευσης του COSAL με το CT-DNA καθορίζεται από την τιμή K_b (M^{-1}), η οποία αντιπροσωπεύει τη σταθερά σύνδεσης ανά ζεύγος βάσεων DNA και μπορεί να ληφθεί παρακολουθώντας τις αλλαγές στην απορρόφηση φάσματος UV του COSAL με αυξανόμενες συγκεντρώσεις CT-DNA. Ο προσδιορισμός της K_b γίνεται με την εξίσωση Wolfe-Shimer:

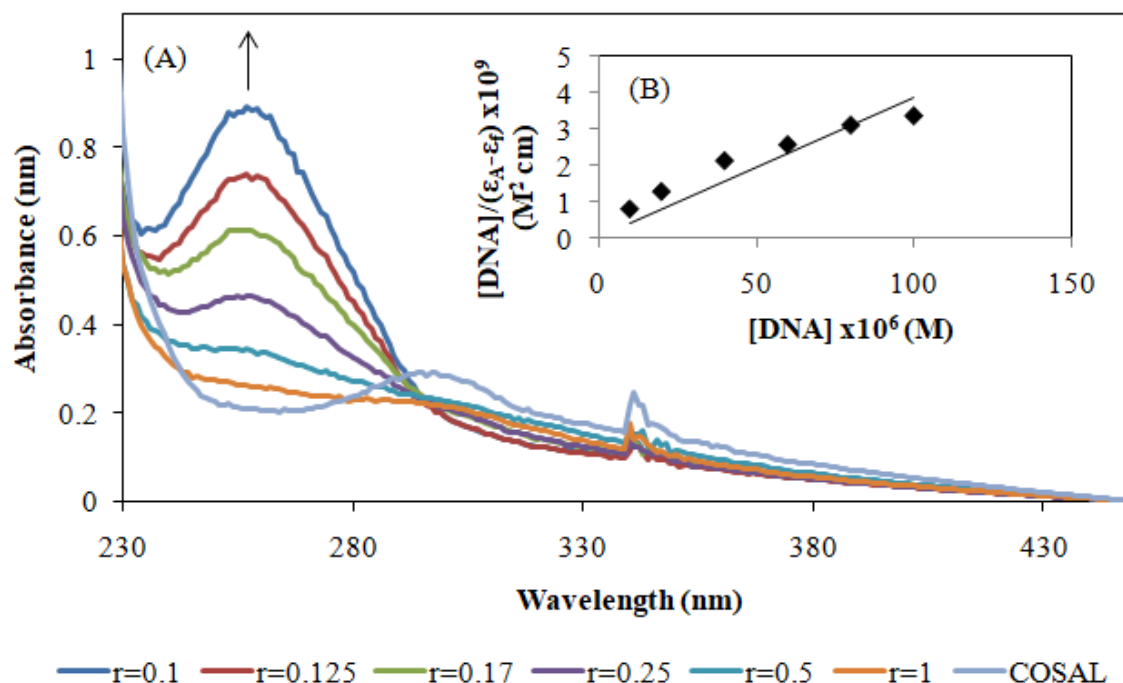
$$\frac{[DNA]}{(\varepsilon_A - \varepsilon_f)} = \frac{[DNA]}{(\varepsilon_b - \varepsilon_f)} + \frac{1}{K_b (\varepsilon_b - \varepsilon_f)}$$

Όπου $[DNA]$: συγκέντρωση του DNA σε ζεύγη βάσεων, ε_A : συντελεστής μοριακής απορρόφησης $A_{obs}/[COSAL]$, ε_f : ο συντελεστής απόσβεσης για το ελεύθερο σύμπλοκο ε_b : ο συντελεστής απόσβεσης για την πλήρως δεσμευμένη μορφή συμπλόκου. Η K_b λαμβάνεται από την αναλογία της κλίσης προς την τεταγμένη επί την αρχή των αξόνων σε γραφικές παραστάσεις $[DNA]/(\varepsilon_A - \varepsilon_f)$ συναρτήσει $[DNA]$. [29]

Στην Εικόνα 35 (A) απεικονίζονται τα φάσματα UV του COSAL απουσία και παρουσία του CT-DNA με αναλογίες $r = 1, 0.5, 0.25, 0.17, 0.125$ και 0.1 , όπου:

$$r = [COSAL]/[DNA]$$

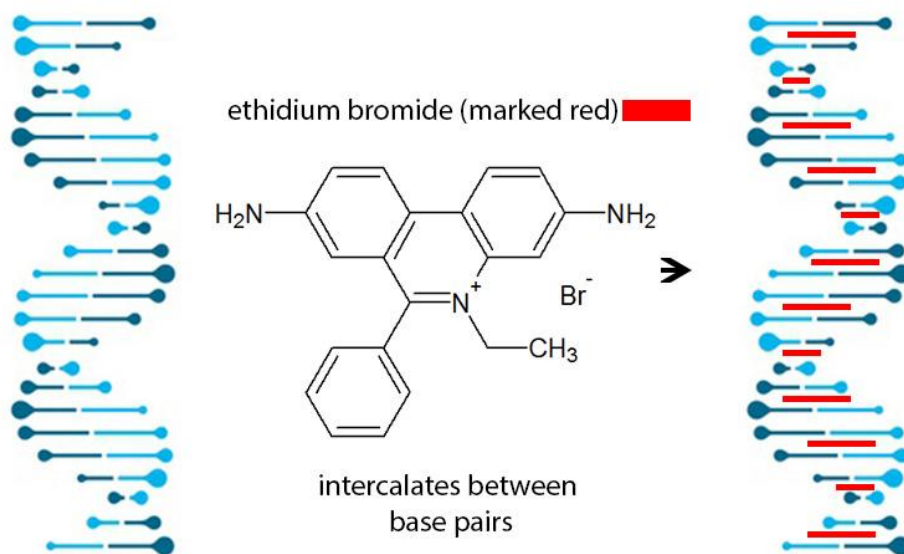
Ενώ στην Εικόνα 35 (B) παρουσιάζεται η γραφική παράσταση του πηλίκου $[DNA]/(\varepsilon_A - \varepsilon_f)$ συναρτήσει $[DNA]$. Η K_b για το COSAL υπολογίστηκε $5.1 \pm 0.8 \times 10^4 M^{-1}$, ενώ για το SALH₂ $6.7 \pm 0.3 \times 10^3 M^{-1}$. Ως αποτέλεσμα, η συγγένεια δέσμευσης του COSAL προς το CT-DNA είναι αρκετά υψηλότερη από αυτή του ελεύθερου SALH₂. [29]



Εικόνα 35. (Α) Φάσματα UV του COSAL απουσία και παρουσία CT-DNA σε τιμές $r = 1-0.1$, ($r = [\text{COSAL}]/[\text{DNA}]$). (Β) Γραφική παράσταση $[\text{DNA}]/(\epsilon_A - \epsilon_f)$ συναρτήσει $[\text{DNA}]$.

9.3.2. Μελέτη της ανταγωνιστικής δράσης του COSAL με το EB με Φασματοσκοπία Φθορισμού

Ο τρόπος δέσμευσης του COSAL με το CT-DNA μελετήθηκε περαιτέρω με τη φασματοσκοπική τεχνική φθορισμού. Η μέθοδος βασίζεται στο φθοροφόρο EB που δρα ισχυρός παρεμβολέας μεταξύ των ζευγών βάσεων του CT-DNA και κατά συνέπεια το έντονο φθορίζον φως αυξάνεται (Εικόνα 36) [68].



Εικόνα 36. Παρεμβολή του EB μεταξύ των ζευγών βάσεων του DNA.[88]

Εάν μια ένωση μπορεί να εκτοπίσει το EB, η ένταση της εκπομπής μειώνεται. Έτσι, ανάλογα με την απόσβεση φθορισμού υποδεικνύεται η αλληλεπίδραση μεταξύ CT-DNA και ενώσεων που μπορεί να παρεμβάλλονται ή να συνδέονται στην αύλακα. Για τη μελέτη της ανταγωνιστικής δράσης του COSAL με το CT-DNA υποβλήθηκαν σε προεπεξεργασία με σταθερή συγκέντρωση EB (2.3 μM). Η ένταση της εκπομπής μετρήθηκε σε $\lambda_{\text{max}}^{\text{em}} = 588 \text{ nm}$ που είναι η μέγιστη εκπομπή του συμπλόκου CT-DNA-EB ενώ η διέγερση έγινε σε $\lambda_{\text{max}}^{\text{exc}} = 527 \text{ nm}$. Η ένταση φθορισμού των διαλυμάτων EB-DNA στα 588 nm μειώθηκε κατά 55.63 % σε σύγκριση με το αρχική, κατά τη διαδοχική αύξηση συγκεντρώσεων του COSAL (0-600 μM) (Εικόνα 37 (A)). Για την αξιολόγηση του τρόπου αλληλεπίδρασης του CT-DNA με το COSAL προσδιορίστηκε η φαινομενική σταθερά K_{app} από την εξίσωση:

$$K_{EB}[EB] = K_{\text{app}} [Q_{50}]$$

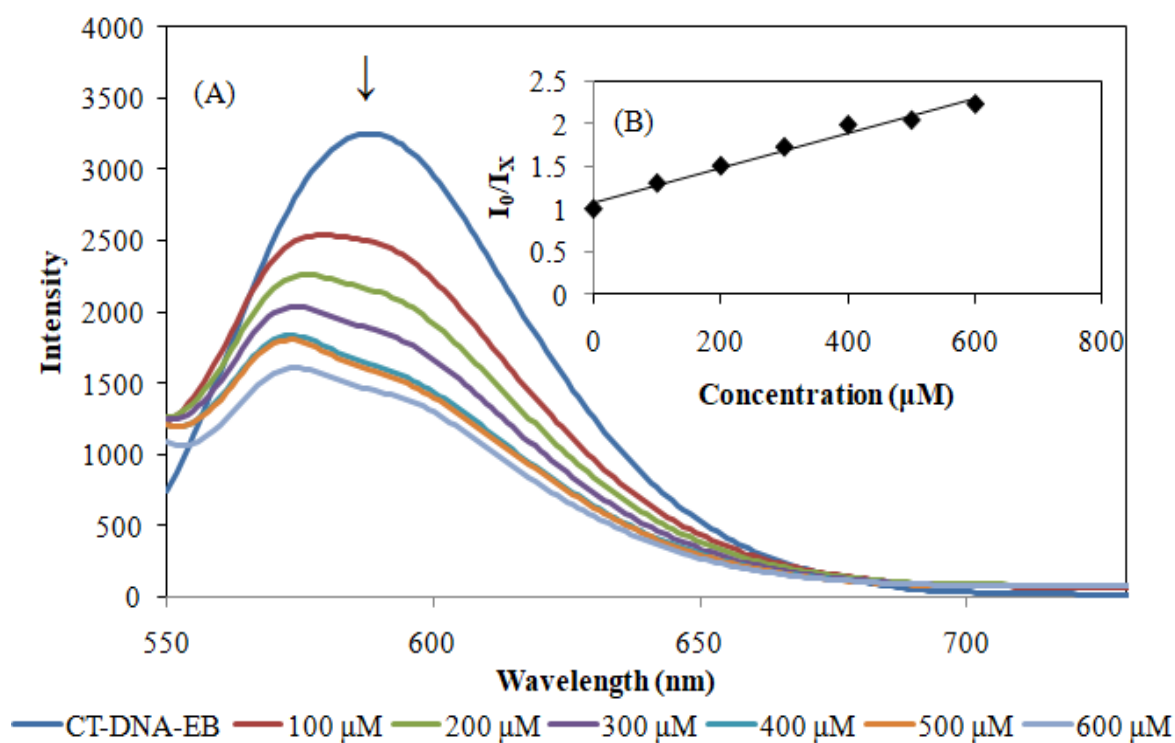
όπου $[Q_{50}]$ είναι η συγκέντρωση του COSAL όταν ο φθορισμός του συμπλόκου EB-DNA μειώνεται κατά 50 %, η σταθερά σύνδεσης EB-DNA $K_{EB} = 10^7 \text{ M}^{-1}$ και η $[EB] = 2.3 \text{ }\mu\text{M}$. Η $[Q_{50}]$ προκύπτει από το διάγραμμα (I_x/I_0) συναρτήσεως $[COSAL]$ (Εικόνα 37 (B)), όπου I_0 και I_x είναι οι εντάσεις εκπομπής του CT-DNA-EB απουσία και παρουσία του COSAL, αντίστοιχα. Για τον καθορισμό του βαθμού δέσμευσης του CT-DNA με το COSAL υπολογίστηκε η σταθερά απόσβεσης K_{SV} από την κλίση της γραμμικής εξίσωσης Stern-Volmer:

$$\frac{I_0}{I_x} = 1 + K_{sv} \times [Q]$$

Η τιμή K_{SV} του COSAL υπολογίστηκε $2.1 \pm 0.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, ενώ η $K_{app} = 4.8 \pm 0.21 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. Ως αποτέλεσμα της τάξης μεγέθους της K_{app} (10^4 M^{-1}), το COSAL δεσμεύεται στην αύλακα του CT-DNA (Πίνακας 14). [68, 89]

Πίνακας 14. Συσχέτιση της K_{app} με τον τρόπο αλληλεπίδρασης

Τάξη μεγέθους K_{app} (M^{-1})	Τρόπος δέσμευσης
$>10^6$	Παρεμβολή
10^4-10^5	Δέσμευση στην αύλακα



Εικόνα 37. (Α) Φάσματα εκπομπής CT-DNA-EB παρουσία COSAL ([EB] = 2.3 μM, [DNA] = 26 μM, [COSAL] = 0–600 μM) σε $\lambda_{\max}^{\text{exc}} = 527$ nm. (Β) Διάγραμμα της έντασης εκπομπής I_0/I_x συναρτήσει του [COSAL].

9.3.3. Μελέτη αλληλεπίδρασης με Ιξοδομετρία

Η μέθοδος της ιξοδομετρίας βασίζεται στην αλλαγή του μήκους της διπλής έλικας του CT-DNA όταν δεσμευτεί με ένα μεταλλοφάρμακο και κατ' επέκταση τη μεταβολή ιξώδους του διαλύματος (Πίνακας 15). [90]

Πίνακας 15. Συσχέτιση του ιξώδους με το μήκος CT-DNA και του τρόπου αλληλεπίδρασης.

Ιξώδες	Μήκος CT-DNA	Τρόπος αλληλεπίδρασης
Αύξηση	Επέκταση	Παρεμβολή
Μείωση	Κάμψη	Διάσπαση δεσμών H
Σταθερό (μικρή μείωση ή αύξηση)	Σταθερό	Ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση ή δέσμευση σε αύλακα

Η εξίσωση που συσχετίζει το μήκος του DNA με το ιξώδες των διαλυμάτων DNA είναι:

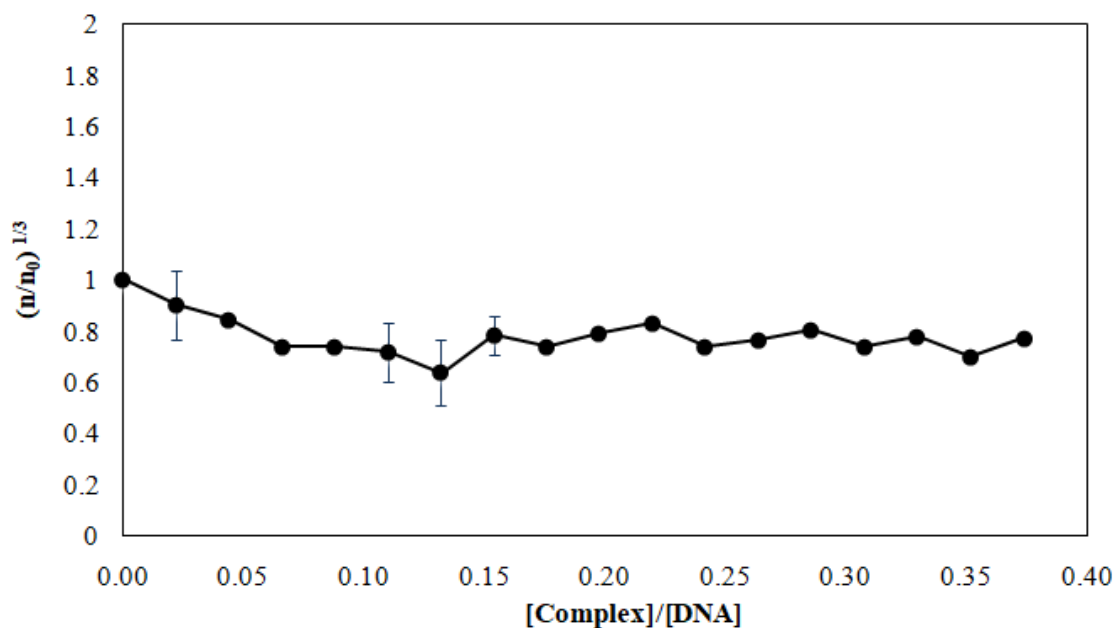
$$\frac{L}{L_0} = \left(\frac{n}{n_0}\right)^{\frac{1}{3}}$$

όπου n και n_0 είναι το ιξώδες του CT-DNA παρουσία και απουσία COSAL, αντίστοιχα ενώ L το μήκος του CT-DNA παρουσία COSAL και L_0 είναι το αρχικό μήκος του CT-DNA. Το n ισούται με $\frac{(t-t_0)}{t_0}$ όπου $t = 0$ χρόνος ροής του CT-DNA παρουσία του COSAL, ενώ $t_0 =$ χρόνος ροής του διαλύτη. [91]

Για τη μέτρηση του ιξώδους, το διάλυμα CT-DNA (10 mM) επωάζεται με αυξανόμενες ποσότητες COSAL στη μοριακή αναλογία μέχρι $r = 0.37$,

$$r = [COSAL]/[DNA]$$

Στην Εικόνα 38 φαίνεται το σχετικό ειδικό ιξώδες $(n/n_0)^{1/3}$ συναρτήσει του r . Το σχετικό ιξώδες του διαλύματος CT-DNA παρουσία COSAL, προς το αντίστοιχο απουσία αυτού, μειώνεται ελαφρώς. Αυτό συνεπάγεται δέσμευση στην αύλακα του CT-DNA (Πίνακας 14).



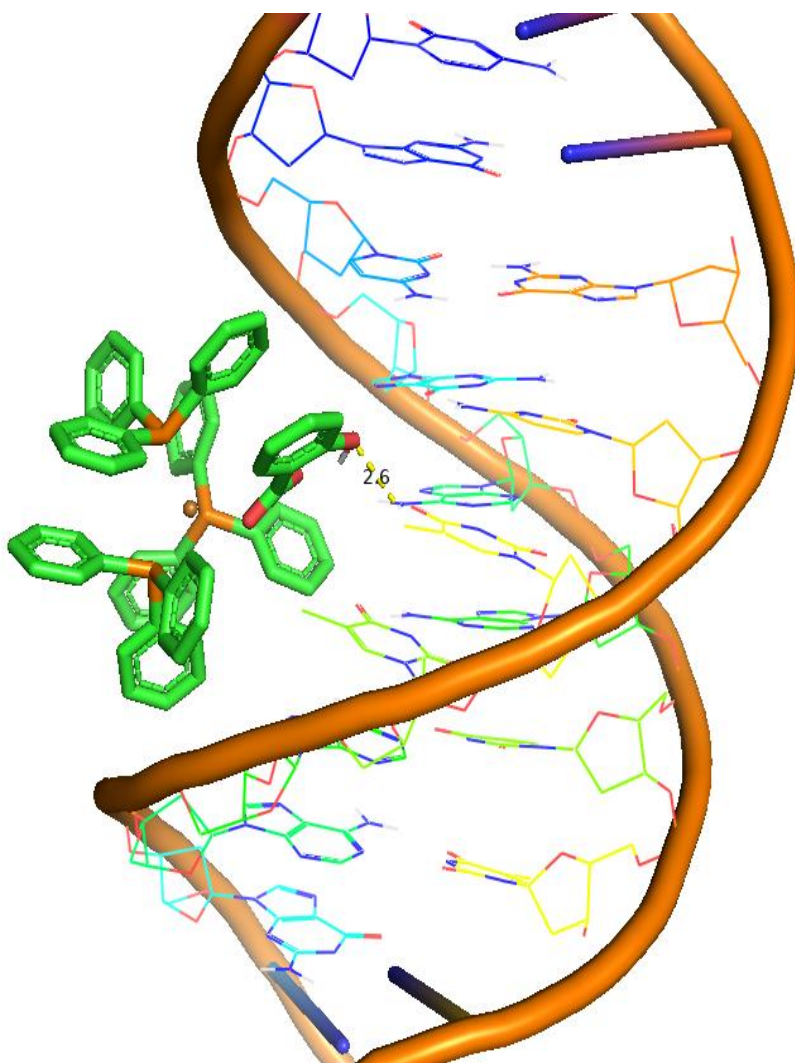
Εικόνα 38. Επίδραση του COSAL στο σχετικό ιζώδες του CT-DNA ($[DNA] = 10 \text{ mM}$, $r = [\text{ένωση}]/[DNA]$)

9.4. *In silico* πείραμα–Μοριακή Πρόσδεση (Molecular Docking) μεταξύ CT-DNA και COSAL

Στο πλαίσιο μελέτης του τρόπου σύνδεσης μεταξύ COSAL και CT-DNA πραγματοποιήθηκαν *in silico* θεωρητικοί υπολογισμοί ώστε να επαληθευτεί ο τρόπος αλληλεπίδρασης που προέκυψε από τα *ex vivo* βιολογικά πειράματα. [29]

Στην βέλτιστη διαμόρφωση (1) φαίνεται ότι το COSAL προσαρμόζεται στην περιοχή της αδενίνης στη θέση 1. Στο CT-DNA, η μεγάλη αύλακα είναι προσιτή σε ογκώδεις παράγοντες, όπως πρωτεΐνες και σπανιότερα σε μικρά μόρια. Το COSAL ως μικρό μόριο δεσμεύεται στην αλληλουχία της μικρής αύλακας CT-DNA μέσω σχηματισμού δεσμού H μεταξύ της H(Ναδενίνης) και του O(C(3) COSAL) της υδροξυλομάδας (Εικόνα 39). Η απόσταση του δεσμού H είναι 2.6 Å. Αυτή η

αλληλεπίδραση συμβάλλει σημαντικά στη σταθεροποίηση του COSAL. Η χαμηλότερη ενεργειακή συγγένεια δέσμευσης (-5.6 kcal/mol) απεικονίζεται στον Πίνακα 16, υποδεικνύοντας αυξημένο δυναμικό δέσμευσης της ένωσης προς το CT-DNA. Συνεπώς, τα αποτελέσματα που προέκυψαν από το *in silico* πείραμα της Μοριακής Πρόσδεσης υποστηρίζουν τα πειραματικά αποτελέσματα, επιβεβαιώνοντας ότι η ένωση COSAL δρα ως groove binder.



Εικόνα 39. Θέση δέσμευσης του COSAL με το CT-DNA.

Πίνακας 16. Ενέργειες δέσμευσης για το COSAL

Διαμορφώσεις	Ενέργειες δέσμευσης (kcal/mol)
1	-5.6
2	-5.4
3	-5.3
4	-5.3
5	-5.3
6	-5.3
7	-5.2
8	-5.2
9	-5.2

9.5. *Ex vivo* αλληλεπίδραση COSAL με LOX

9.5.1. Μελέτη αναστολής της καταλυτικής δράσης του ενζύμου της LOX

Η LOX είναι ένα οξειδωτικό ένζυμο του LA σε 13-(S)-HPODE, το οποίο συμμετέχει στο μηχανισμό της φλεγμονώδους απόκρισης που εδράζεται στο μιτοχόνδριο. Δεδομένο ότι τα καρκινικά κύτταρα έχουν υποστεί φλεγμονή, η χρήση μιας ένωσης ως αναστολέα της LOX προκαλεί απόπτωση αυτών. Για το σκοπό αυτό ερευνήθηκε η αναστολή της καταλυτικής δράσης του ενζύμου της LOX από το COSAL, με φασματοσκοπία UV-Vis. Η ενζυμική κινητική μελέτη βασίστηκε στη μεταβολή της απορρόφησης σε $\lambda_{\max} = 234$ nm (μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης

του προϊόντος 13-(S)-HPODE) με βήμα 1 sec για 10 min, στους 37 °C, κατά την επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων (0 έως 25 μM) του COSAL. Από την κινητική μελέτη υπολογίζεται ο βαθμός αναστολής με τον προσδιορισμό της τιμής IC₅₀ [μείωση της 100% δραστηριότητας του ενζύμου (απουσία COSAL) στο 50 % (παρουσία COSAL)].[29,80]

Ο βαθμός δραστηριότητας LOX (A, %) παρουσία COSAL υπολογίστηκε σύμφωνα με τον τύπο:

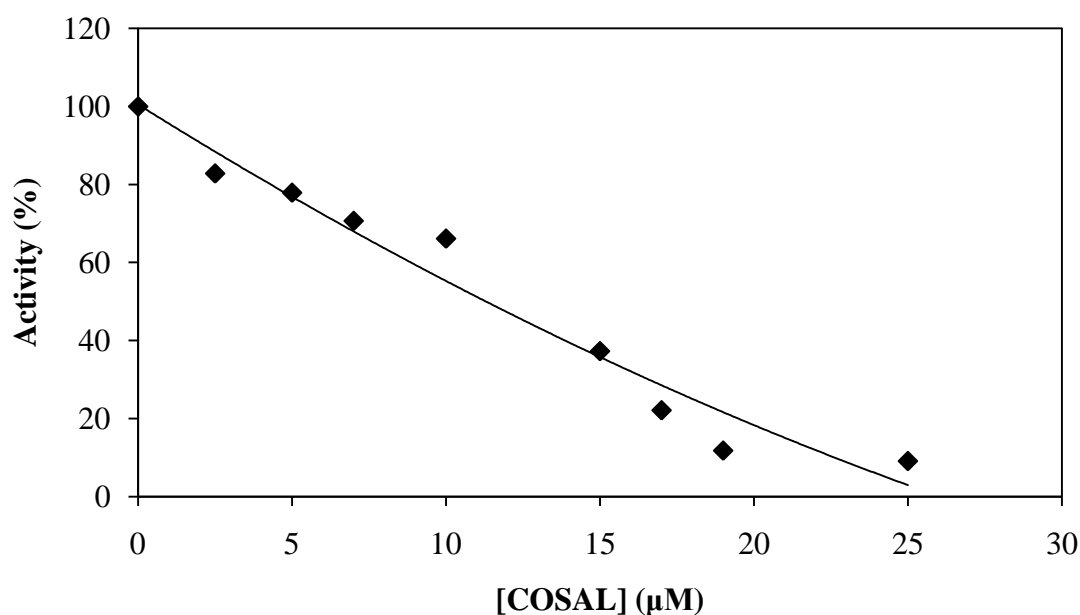
$$A (\%) = \left(\frac{u_0 \text{ παρουσία αναστολέα}}{u_0 \text{ απουσία αναστολέα}} \right) \times 100$$

Η τιμή της αρχικής ταχύτητας (u_0 , μM s⁻¹) υπολογίστηκε από τις εξισώσεις:

$$u_0 = \frac{\Delta C}{\Delta t} = \frac{\Delta A}{\Delta t \varepsilon} = \frac{tga}{\Delta t \varepsilon}$$

όπου C είναι η συγκέντρωση του προϊόντος οξείδωσης 13-(S)-HPODE, ε είναι ο μοριακός συντελεστής απορρόφησης του 13-(S)-HPODE, t είναι ο χρόνος αντίδρασης και tga είναι η κλίση της κινητικής καμπύλης που απεικονίζεται ως απορρόφηση συναρτήσει του χρόνου.[29,80]

Στην Εικόνα 40 φαίνεται η δραστηριότητα (A, %) της LOX συναρτήσει συγκεντρώσεων του COSAL. Η τιμή IC₅₀ για το COSAL προσδιορίστηκε 11.3 μM υποδηλώνοντας υψηλή ανασταλτική δραστηριότητα σε σχέση με τις τιμές των ελεύθερων ligands TPP (IC₅₀= 51.4 μM) [29] και SALH₂ (IC₅₀= 101 μM) [92] που δεν αναστέλλουν το ένζυμο.[29,80]



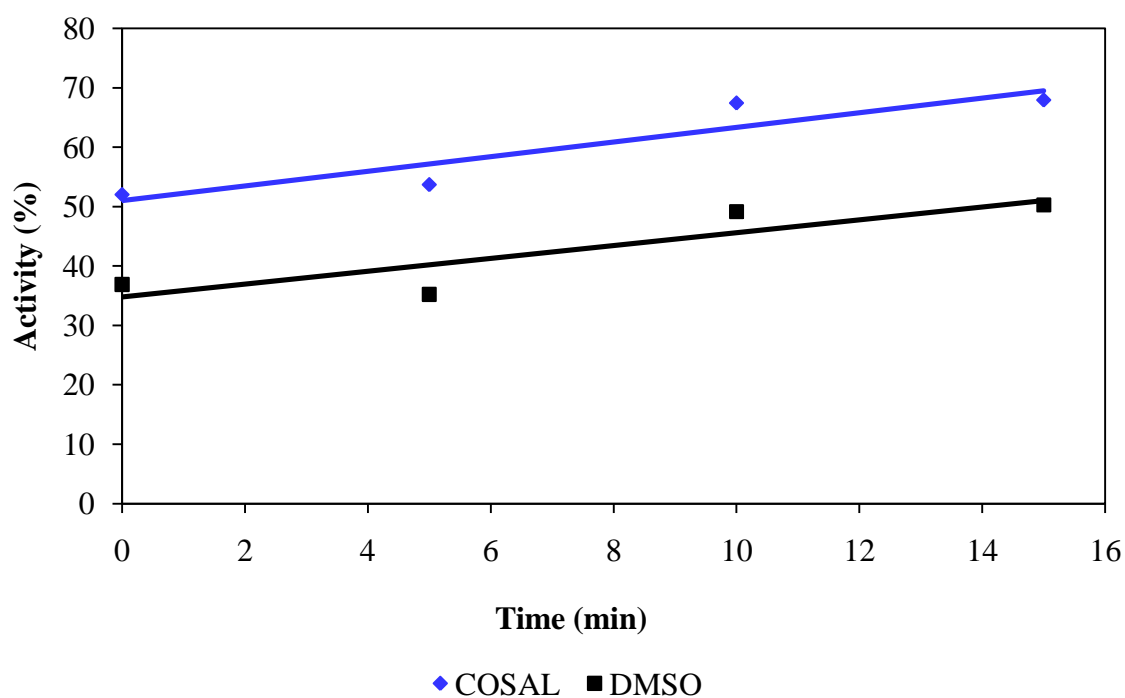
Εικόνα 40. Η % δραστηκότητα της LOX (A, %) συναρτήκει συγκεντρώσεων του COSAL από 0-25 μM

9.5.2. Μελέτη του μηχανισμού του αναστολέα του ενζύμου LOX

9.5.2.1. Προσδιορισμός τύπου αναστολής (αντιστρεπτή ή μη)

Η αναστολή ενός ενζύμου μπορεί να είναι αντιστρεπτή ή μη. Η διάκριση μεταξύ των δύο τύπων αναστολής βασίζεται ανάλογα με το αν το E μετά την πρόσδεση με τον I μπορεί να ανακτήσει τη δραστηκότητα του ή όχι. Στην μη αντιστρεπτή αναστολή σχηματίζεται ένα σταθερό σύμπλοκο του EI ενώ στην αντιστρεπτή μπορεί το EI να διασπαστεί. Ο τύπος αναστολής που προκαλείται από το COSAL, μελετήθηκε με ενζυμική κινητική σταθερής κατάστασης (steady-state kinetics). Η steady-state kinetics

εφαρμόζεται όταν η συγκέντρωση του S είναι μεγαλύτερη από αυτή του E, έτσι ώστε το $U_{0(S)} > U_{0(E)}$. [93] Η αναστρεψιμότητα της αναστολής LOX προσδιορίστηκε με επώαση του LA με το COSAL και το DMSO πριν από την προσθήκη του ενζύμου σε διαφορετικές χρονικές περιόδους (0-15 min). Στην Εικόνα 41, δεν παρατηρείται καμία επίδραση στην % δραστικότητα του ενζύμου παρουσία σταθερής συγκέντρωσης COSAL και διαλύτη DMSO (παράλληλες ευθείες με περίπου ίδια κλίση) συναρτήσει του χρόνου επώασης, υποδεικνύοντας έναν αντιστρεπτό τύπο αναστολής. [29, 80]



Εικόνα 41. Γραφικές παραστάσεις % δραστικότητας του COSAL και του DMSO για τον προσδιορισμό της αντιστρεπτής αναστολής της LOX.

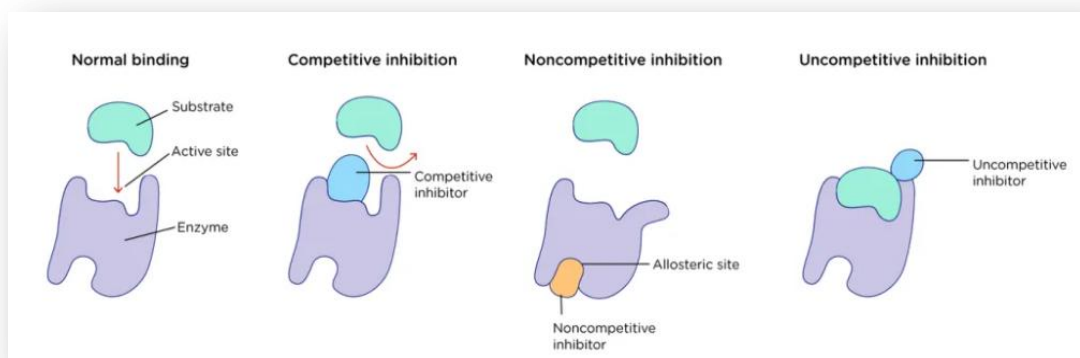
9.5.2.2. Προσδιορισμός του είδους του μηχανισμού αντιστρεπτού αναστολέα

Εφόσον αποδείχθηκε ο αντιστρεπτός τύπος αναστολής της LOX από το COSAL, ακολούθησε ο προσδιορισμός του είδους του μηχανισμού αντιστρεπτού I. Υπάρχουν διάφοροι τρόποι δέσμευσης ενός αντιστρεπτού I στο E, όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 17 και την Εικόνα 42.

- I. Competitive. Ο I προσδένεται στο ενεργό κέντρο του E και εμποδίζει την πρόσδεση του S.
- II. Uncompetitive. Ο I δεσμεύεται σε διαφορετική θέση από το ενεργό κέντρο του E (αλλοστερική θέση). Οι uncompetitive I δεν δεσμεύουν το E μέχρι να σχηματιστεί το ES.
- III. Non competitive. Ο I συνδέεται σε διαφορετική θέση από το ενεργό κέντρο του (αλλοστερική θέση). Το S μπορεί να συνδεθεί στο E, αλλά ο I έχει αλλάξει το σχήμα του E οπότε δεν υφίσταται καταλυτική αντίδραση.
- IV. Mixed. Είναι ένας συνδυασμός competitive και uncompetitive αναστολέα. Οι mixed I προσδέονται σε διαφορετική θέση από το ενεργό κέντρο του E αλλά μπορούν να συνδέονται με το E και με το σύμπλεγμα ES. [93]

Πίνακας 17. Τα είδη μηχανισμού αντιστρεπτού αναστολέα και τα σημεία πρόσδεσης στο E και το S.

Είδος μηχανισμού αντιστρεπτού I	Σημείο πρόσδεσης του I
Competitive	EI ή ES
Uncompetitive	ESI
Non competitive	EI ή ESI
Mixed (Competitive & Uncompetitive)	EI και ESI



Εικόνα 42. Είδη μηχανισμού αντιστρεπτού αναστολέα [94]

Ο μηχανισμός αναστολής που προκλήθηκε από το COSAL προσδιορίστηκε με steady-state kinetics σε εύρος συγκεντρώσεων LA από 0.01 έως 0.3 mM απουσία και παρουσία του συμπλόκου. Για την εύρεση του μηχανισμού αναστολής καθορίστηκαν οι τιμές των κινητικών παραμέτρων K_m (σταθερά Michaelis Menten) και V_{max} (μέγιστη ταχύτητα της LOX) της εξίσωσης Michaelis-Menten:

$$U = \frac{V_{max} [S]}{[S] + K_m}$$

όπου U είναι η ταχύτητα της ενζυμικής κινητικής αντίδρασης και $[S]$ η συγκέντρωση του S . Ο υπολογισμός των κινητικών παραμέτρων K_m (η οποία ισούται με $[S]$ όταν $U = \frac{V_{max}}{2}$) και V_{max} , γίνεται από την κλίση και την τεταγμένη επί την αρχή του διαγράμματος ευθείας γραμμής Lineweaver-Burk ($1/v=f(1/[S])$), αντίστοιχα. Η γραφική παράσταση Lineweaver-Burk (Εικόνα 10), είναι η γραμμική μετασχηματιζόμενη μορφή της εξίσωσης Michaelis-Menten και δίνεται από τον τύπο:

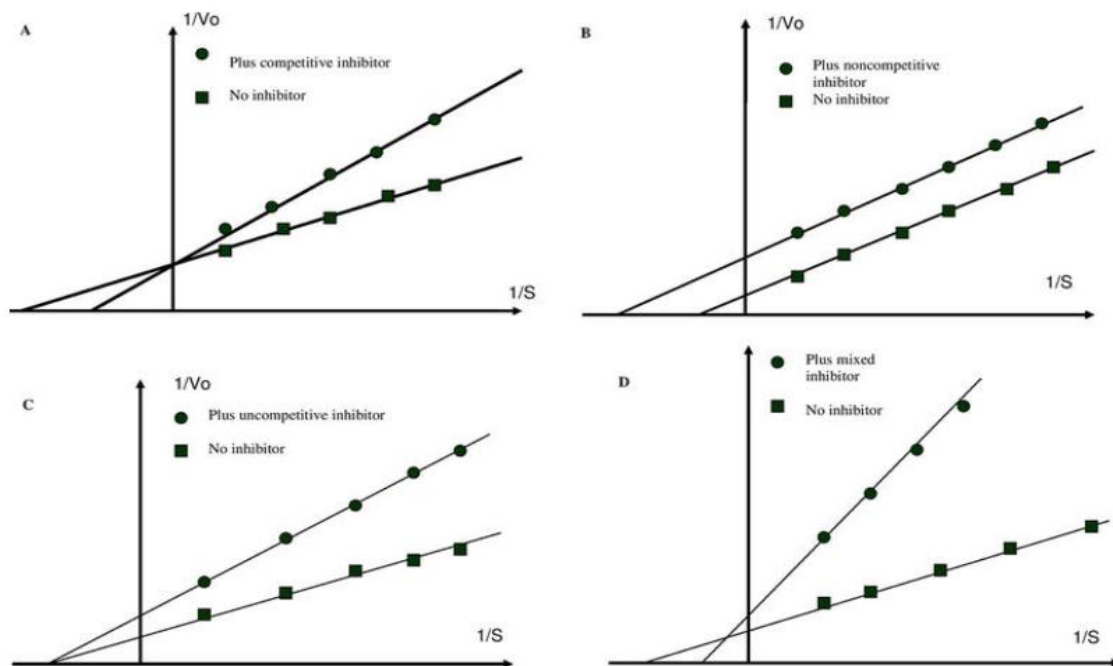
$$\frac{1}{V_0} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]}$$

Χρησιμοποιούνται μόνο οι χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος ($[S] < 0.1\text{mM}$) στις οποίες η ταχύτητα αυξάνει με την αύξηση της συγκέντρωσης του $[S]$. Στην περιοχή αυτή μπορεί να εκτιμηθεί η δράση της LOX, καθώς δεν παρεμβάλλεται η επιπλέον επίδραση του LA.[29,80,92]

Ανάλογα με τις τιμές των κινητικών παραμέτρων από τα διαγράμματα Lineweaver-Burk παρουσία ή απουσία του I προκύπτει συμπέρασμα για το είδος του μηχανισμού (Πίνακας 18, Εικόνα 43).[29,80,92]

Πίνακας 18. Τα είδη μηχανισμού αντιστρεπτού I και τα κινητικά χαρακτηριστικά παρουσία αυτού.

Είδος μηχανισμού αντιστρεπτού I	Κινητικά χαρακτηριστικά παρουσία I	
Competitive	V_{max} σταθερή	K_m αυξάνεται
Uncompetitive	V_{max} μειώνεται	K_m μειώνεται
Noncompetitive	V_{max} μειώνεται	K_m σταθερή
Mixed	V_{max} μειώνεται	K_m αυξάνεται



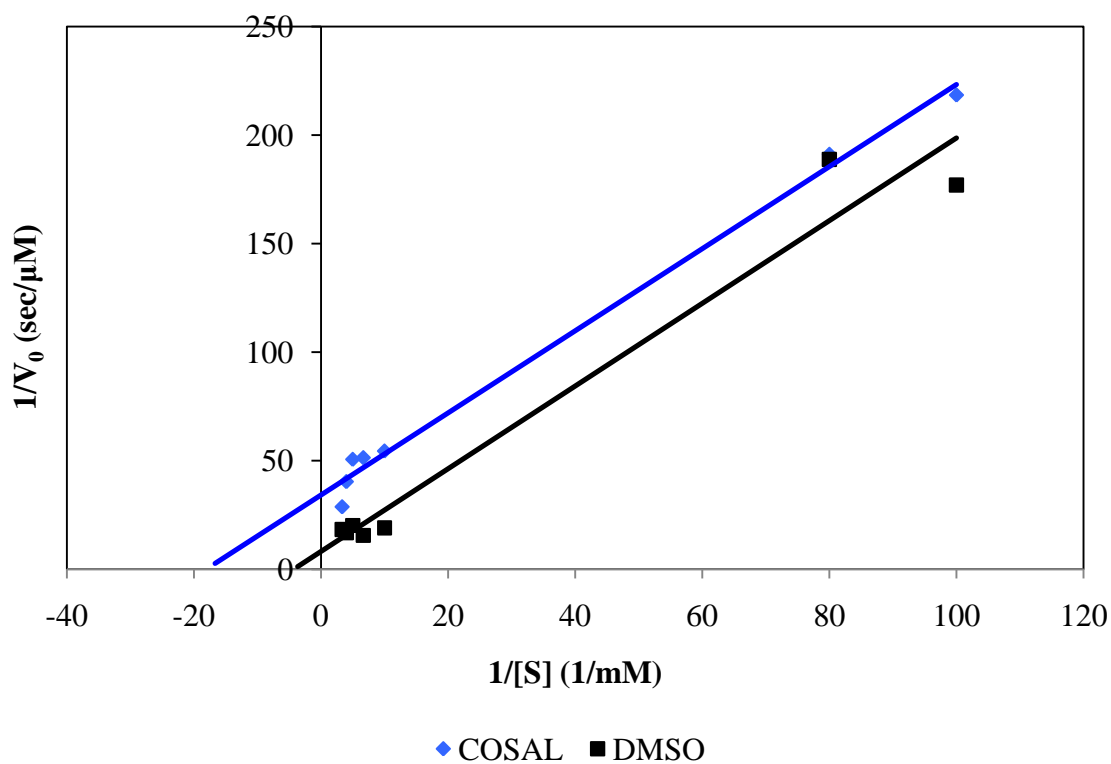
Εικόνα 43. Διαγράμματα Lineweaver- Burk για competitive(A), noncompetitive (B), uncompetitive(C) και mixed (D) μηχανισμού αντιστρεπτών I. [95]

Στο συγκεκριμένο πείραμα, κατά τη διαδοχική αύξηση συγκεντρώσεων του LA απουσία και παρουσία σταθερής συγκέντρωσης του COSAL δημιουργήθηκε το διάγραμμα Lineweaver-Burk. Οι κινητικές παράμετροι K_m και V_{max} προσδιορίστηκαν παρουσία και απουσία του COSAL (Πίνακας 19) και προέκυψαν τα εξής αποτελέσματα: Η K_m (απουσία αναστολέα) βρέθηκε 0.22 mM καθώς και η V_{max} (απουσία αναστολέα) = 11.4×10^5 mM. Ενώ, η $K_{m(inh)}$ (παρουσία αναστολέα) υπολογίστηκε 0.05 και η $V_{max(inh)}$ 2.67×10^5 mM παρουσία αναστολέα). Παρατηρείται ότι κατά την διαδοχική προσθήκη του LA οι τιμές $K_{m(inh)}$ και $V_{max(inh)}$ μειώθηκαν σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές του DMSO. Λήφθηκαν παράλληλες γραμμές για το

COSAL (Εικόνα 44), επιβεβαιώνοντας έναν uncompetitive μηχανισμό αντιστρεπτού αναστολέα της δραστηκότητας της LOX.

Πίνακας 19. Κινητικοί παράμετροι για το COSAL

	COSAL	DMSO
K_m (mM)	0.05	0.22
V_{max} (mM/sec) ($\times 10^5$)	2.67	11.4



Εικόνα 44. Γραφική παράσταση Lineweaver–Burk του COSAL και του DMSO για τον προσδιορισμό των κινητικών παραμέτρων K_m και V_{max} .

Ε. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί σημαντική αιτία θνησιμότητας στις γυναίκες, σε παγκόσμια κλίμακα. Η ανάγκη για την ανάπτυξη νέων χημειοθεραπευτικών μεταλλοφαρμάκων, λόγω τ' ότι τα παραδοσιακά αντικαρκινικά φάρμακα εμφανίζουν σοβαρές παρενέργειες, παρέπεμψε στο σχεδιασμό και την βιολογική μελέτη του μεταλλικού συμπλόκου COSAL. Η σύνθεση του COSAL βασίστηκε στο ΜΣΑΦ (SALH₂) που μετέχει στο μηχανισμό φλεγμονής και επιπλέον, στη μιτοχονδριοτροπική ένωση TPP που προκαλεί δυσλειτουργία στη μιτοχονδριακή μεμβράνη. Η σύνδεση των δύο προαναφερόμενων ligands έγινε με ιόντα χαλκού(I) που έχει αποδειχθεί ότι συμμετέχουν σε πολλές βιολογικές λειτουργίες του ανθρώπινου οργανισμού.

Στο πλαίσιο της βιολογικής έρευνας, μελετήθηκε η *in vitro* αντιπολλαπλασιαστική δράση του COSAL έναντι κυτταρικών σειρών αδενοκαρκινώματος μαστού MCF-7 (HD) και MDA-MB-231 (HI). Βρέθηκε ότι το COSAL εμφανίζει πενταπλάσια ανασταλτική δράση προς τα κύτταρα MCF-7 θετικά σε ορμονικούς υποδοχείς με $IC_{50} = 2.4 \pm 0.07 \mu M$ σε σχέση με τα MDA-MB-231 αρνητικά σε ορμονικούς υποδοχείας με $IC_{50} = 11.6 \pm 0.6 \mu M$. Επομένως, αποδεικνύεται η συμμετοχή των ορμονικών υποδοχέων στο μηχανισμό δράσης του COSAL. Αξιοσημείωτο είναι ότι σε σύγκριση με το cisplatin, το COSAL παρουσιάζει μεγαλύτερη κατά 2.5 φορές ανασταλτική δράση έναντι των MCF-7 (HD) και των MDA-MB-231 (HI). Η *in vitro* εκλεκτικότητα του COSAL στα καρκινικά κύτταρα MCF-7 επιβεβαιώθηκε έναντι των φυσιολογικών κυττάρων MRC-5 με τον δείκτη TPI να είναι > 2 (2.91). Επιπλέον, το COSAL παρουσιάζει μεγαλύτερη εκλεκτικότητα και για τις δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές MCF-7 MCF-7 (HD) και MDA-MB-231 (HI) σε σύγκριση με το cisplatin (TPI= 0.2).

Στη συνέχεια, μελετήθηκε ο *ex vivo* μοριακός μηχανισμός του COSAL σε σημαντικά οργανίδια των κυττάρων όπως το DNA και το μιτοχόνδριο. Οι μελέτες αλληλεπίδρασης του COSAL με το CT-DNA απέδειξαν ισχυρή δέσμευση στην μικρή αύλακα από τρία πειραματικά αποτελέσματα: (i) το ποσοστό υπερχρωμίας (13.25 %) (ii) τον προσδιορισμό σταθερών $K_b = 5.1 \pm 0.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (φασματοσκοπία UV-Vis) και $K_{app} = 4.8 \pm 0.21 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (φασματοσκοπία φθορισμού) (iii) σταθερότητα του ιζώδους. Τα πειραματικά αποτελέσματα εξακριβώθηκαν με τις *in silico* υπολογιστικές μελέτες πρόσδεσης οι οποίες επιβεβαίωσαν την ισχυρή αλληλεπίδραση μεταξύ της ο-OH ομάδας του COSAL και της αδενίνης (1) του DNA μέσω δεσμού H.

Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι το COSAL αναστέλλει σημαντικά τη δραστηριότητα του ενζύμου της LOX με έναν uncompetitive μηχανισμό. Η αναστολή της LOX ενεργοποιεί το ενδογενές βιοχημικό μονοπάτι της απόπτωσης.

Δεδομένο ότι η τιμή IC_{50} ($2.4 \pm 0.07 \mu\text{M}$) για τα καρκινικά κύτταρα MCF-7 ήταν σημαντικά μικρότερη από την αντίστοιχη της LOX ($11.3 \mu\text{M}$) δείχνει ότι το COSAL μπορεί να αναστείλει και άλλα βασικά συστατικά του καρκινικού κυττάρου, όπως το DNA. Επομένως, το COSAL προκαλεί απόπτωση σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του μαστού και κατά συνέπεια, μπορεί να θεωρηθεί υποψήφιο για την δημιουργία ενός νέου αντικαρκινικού μεταλλοφαρμάκου.

ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] https://en.wikipedia.org/wiki/Breast_cancer
- [2] H. Sung, J. Ferlay, R. L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal; F. Bray, Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries, CA: Cancer Journal of Clinicians, 2021, 71, 209-249.
- [3] U. Mehraj, A. H. Dar, N.A. Wani, M.A. Mir, Tumor microenvironment promotes breast cancer chemoresistance, Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 87 ,147–158.
- [4] A. Avagliano, M.R. Ruocco, F. Aliotta, I. Belviso, A. Accurso, S. Masone, S. Montagnani, A. Arcucci, Mitochondrial Flexibility of Breast Cancers: A Growth Advantage and a Therapeutic Opportunity, Cells, 2019, 8, 401.
- [5] <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/treatment/treatment-of-breast-cancer-by-stage/treatment-of-breast-cancer-stages-i-iii.html>
- [6] T. Moo, R. Sanford, C. Dang, M. Morrow, Overview of Breast Cancer Therapy, PET Clinics, 2018, 13(3), 339-354.
- [7] S. Schoch, S. Gajewski, J. Rothfuß, A. Hartwig, B. Köberle, Comparative Study of the Mode of Action of Clinically Approved Platinum-Based Chemotherapeutics, International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21, 18, 6968.
- [8] F. M. Muggia, A. Bonetti, J.D. Hoeschele, M. Rozenzweig, S. B. Howell, Platinum Antitumor Complexes: 50 Years Since Barnett Rosenberg's Discovery, Journal of Clinical Oncology, 2015,33,35.
- [9] C. N.Banti, A. G.Hatzidimitriou, N. Kourkoumelis, S.K.Hadjikakou, Diclofenac conjugates with biocides through silver(I) ions (CoMeD's); Development of a reliable

model for the prediction of anti-proliferation of NSAID's-silver formulations, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2019, 194, 7-18.

[10] E. J. Anthony, E. M. Bolitho, H. E. Bridgewater, O.W. L. Carter, J.M. Donnelly, C. Imberti, E. C. Lant, F. Lermyte, R.J. Needham, M. Palau, P. J. Sadler, H. Shi, Fang-Xin Wang, W. Zhang, Z. Zhang, *Metallo-drugs are unique: opportunities and challenges of discovery and development*, *Chemistry Science*, 2020, 11, 12888-12917.

[11] A. Erxleben, *Mitochondria-Targeting Anticancer Metal Complexes*, *Current Medicinal Chemistry*, 2019, 26, 694-728.

[12] N. Fantoni, T. Brown, A. Kellett, *DNA-Targeted Metallo-drugs: An Untapped Source of Artificial Gene Editing Technology*, *ChemBioChem*, 2021, 22, 1–23.

[13] C. Loreto, G.L. Rocca, R. Anzalone, R. Caltabiano, G. Vespasiani, FS. Castorina, D. J. Ralph, S. Celtek, G. Musumeci, S. Giunta, R. Djinovic, D. Basic, S. Sansalone, *The role of intrinsic pathway in apoptosis activation and progression in Peyronie's disease*, *BioMed Research International*, 2014, 61619.

[14] S. Mani, G. Swargiary, K. K. Singh, *Natural Agents Targeting Mitochondria in Cancer*, *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21 (19).

[15] S. Li, J. Zhao, Y. Guo, Y. Mei, B. Yuan, N. Gan, J. Zhang, J. Hu, H. Hou, *Influence of the introduction of a triphenylphosphine group on the anticancer activity of a copper complex*, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2020, 210.

[16] C. N. Banti, C. Papatrifiantafyllopoulou, A. J. Tasiopoulos, S. K. Hadjidakou, *New metallo-therapeutics of NSAIDs against human breast cancer cells*, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2018, 143, 1687-1701.

- [17] R.A.J. Smith, R. C. Hartley, M. P. Murphy, Mitochondria-Targeted Small Molecule Therapeutics and Probes, *Antioxidants & Redox Signaling*, 2011, 15, 3021-3038.
- [18] S. Elmore, Apoptosis: a review of programmed cell death, *Toxicology Pathology*, 2007, 35(4): 495-516.
- [19] C. Loreto, G.L. Rocca, R. Anzalone, R. Caltabiano, G. Vespasiani, FS. Castorina, D. J. Ralph, S. Celtek, G. Musumeci, S. Giunta, R. Djinovic, D. Basic, S. Sansalone, The role of intrinsic pathway in apoptosis activation and progression in Peyronie's disease, *BioMed Research International*, 2014, 61619.
- [20] C. Krakstad, M. Chekenya, Survival signaling and apoptosis resistance in glioblastomas: opportunities for targeted therapeutics, *Molecular Cancer*, 2010, 9:135
- [21] M. A. Meshram, U. O. Bhise, P. N. Makhal, V. R. Kaki, Synthetically-tailored and nature-derived dual COX-2/5-LOX inhibitors: Structural aspects and SAR, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2021, 225.
- [22] J. A. Martinez-Silvestrini, Prescribing Medications for Pain and Inflammation, *Clinical Sports Medicine*, 2007, 15, 194-204.
- [23] L. Chen, H. Deng, H. Cui, J. Fang, Z. Zuo, J. Deng, Y. Li, X. Wang, L. Zhao, Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs, *Oncotarget*, 2018, 9, 7204-7218.
- [24] S. Kotlyarov, A. Kotlyarova, Involvement of Fatty Acids and Their Metabolites in the Development of Inflammation in Atherosclerosis, *International Journal of Molecular Sciences* 2022, 23, 1308.
- [25] C. N. Banti, C. Papatriantafyllopoulou, M. Manoli, A.J. Tasiopoulos, S. K. Hadjidakou, Nimesulide Silver Metallodrugs, Containing the Mitochondriotropic,

Triaryl Derivatives of Pnictogen; Anticancer Activity against Human Breast Cancer Cells, Inorganic Chemistry, 2016.

[26] F.Gao, D. Kieseewetter, L.Chang , S. I. Rapoport, M. Igarashi, Quantifying conversion of linoleic to arachidonic and other n-6 polyunsaturated fatty acids in unanesthetized rats, Journal of Lipid Research V, 2014, 51, 2940-2946.

[27] N.K. Khankari, P. T. Bradshaw, S. E. Steck, A. F. Olshan, J. Shen, J. Ahn, Y.Chen, H. Ahsan, M. Beth Terry, S. L. Teitelbaum, A. I. Neugut, R. M. Santella, M. D. Gammon, Polyunsaturated fatty acid interactions and breast cancer incidence: a population-based case-control study on Long Island, New York, Annals of Epidemiology, 2015, 25, 929-935.

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

[29] C. N. Banti, A. D. Giannoulis, N. Kourkoumelis, A. M. Owczarzak, M. Poyraz, M. Kubicki, K. Charalabopoulosbe, S. K. Hadjidakou, Mixed ligand–silver(I) complexes with anti-inflammatory agents which can bind to lipoxygenase and calf-thymus DNA, modulating their function and inducing apoptosis,2021, 4, 545-560.

[30] L. M Knab, P. J Grippo, D. J Bentrem, involvement of eicosanoids in the pathogenesis of pancreatic cancer: the roles of cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase, World of Journal Gastreology, 2014,20 (31), 10729-10739.

[31] https://en.wikipedia.org/wiki/Linoleic_acid

[32] J. Soler, P. Saura, D. García-Lopez, L. Masgrau, J.M. Lluch, A. Gonzalez-Lafont, How Can Linoleic Acid Be the Preferential Substrate of the Enzyme 15-Lipoxygenase-1? A QM/MM Approach, The Journal of Physical Chemistry B, 2016, 120 (8), 1950-1960.

- [33] R. Suardíaz, L. Masgrau, J. M. Lluch, À. Gonzalez-Lafont, An Insight into the Regiospecificity of Linoleic Acid Peroxidation Catalyzed by Mammalian 15-Lipoxygenases, *The Journal of Physical Chemistry*, 2013, 117, 3747–3754.
- [34] C. Pereira-Leite, C. Nunes, S. Reis, Interaction of nonsteroidal anti-inflammatory drugs with membranes: In vitro assessment and relevance for their biological actions, *Progress in Lipid Research*, 2013, 571-584.
- [35] G.L.Kedderis, Toxicokinetics: Biotransformation of Toxicants, *Comprehensive Toxicology*, 1, 2010, 137-151.
- [36] https://en.wikipedia.org/wiki/Lineweaver%E2%80%93Burk_plot
- [37] D. Lapenn, G. Ciofani, S. D. Pierdomenico, M. Neri, C. Cuccurullo, M. A. Giamberardino, F. Cuccurullo, Inhibitory activity of salicylic acid on lipoxygenase-dependent lipid peroxidation, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2009, 1790, 25–30.
- [38] R. Amann, B. A. Peskar, Anti-inflammatory effects of aspirin and sodium salicylate, *European Journal of Pharmacology*, 2002, 447, 1 – 9.
- [39] F.K. Braun, N. Al-Yacoub, M Plotz, M. Mobs, W. Sterry, J. Eberle, Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Induce Apoptosis in Cutaneous T-Cell Lymphoma Cells and Enhance Their Sensitivity for TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand, *Journal of Investigative Dermatology*, 2012, 132, 429–439.
- [40] M. de Pedro, S. Baeza, M. Escudero, T. Dierssen-Sotos, I. Gomez-Acebo, M. Pollan, J.Llorca, Effect of COX-2 inhibitors and other non-steroidal inflammatory drugs on breast cancer risk: a meta-analysis, *Breast Cancer Research and Treatment*, 2015, 149, 525–536.

- [41] C.N. Banti, S. K. Hadjidakou, Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) in Metal Complexes and Their Effect at the Cellular Level, *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2016, 1-25.
- [42] N.M. Polychronis, C.N. Banti, C.P. Raptopoulou, V. Psycharis, N. Kourkouvelis, S.K. Hadjidakou, Non steroidal anti-inflammatory drug (NSAIDs) in breast cancer chemotherapy; antimony(V) salicylate a DNA binder, *Inorganica Chimica Acta*, 2019, 489, 39-47.
- [43] C.N. Banti, A. G. Hatzidimitriou, N. Kourkouvelis, S.K. Hadjidakou, Diclofenac conjugates with biocides through silver(I) ions (CoMeD's); Development of a reliable model for the prediction of anti-proliferation of NSAID's-silver formulations, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2019, 194, 7-18.
- [44] G. Rossos, S. K. Hadjidakou, N. Kourkouvelis, Molecular Docking and Structure Activity Relationship Studies of NSAIDs. What do they Reveal about IC₅₀?, 2017, 14 (8), 949-958.
- [45] C. N. Banti, N. Kourkouvelis, C. P. Raptopoulou, V. Psycharis, S. K. Hadjidakou, *N*-(4-Hydroxyphenyl)acetamide against diiodine towards polyiodide dianion, *New Journal of Chemistry*, 2017, 13.
- [46] M. Poyraz, H. Berber, C. N. Banti, N. Kourkouvelis, M J. Manos, S. K. Hadjidakou, Synthesis characterization and biological activity of mixed ligand silver(I) complex of 2-benzimidazolylurea and triphenylphosphine, *Polyhedron*, 2017, 128, 95–103.
- [47] C.N. Banti, A.D. Giannoulis, N. Kourkouvelis, A.M. Owczarzak, M. Kubicki, S.K. Hadjidakou, Silver(I) compounds of the anti-inflammatory agents salicylic acid

and p-hydroxyl-benzoic acid which modulate cell function, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2015, 142, 132–144.

[48] E.I.Gkaniatsou, C.N.Banti, N.Kourkoumelis, S.Skoulika, M.Manoli, A.J.Tasiopoulos, S.K.Hadjikakou, Novel mixed metal Ag(I)-Sb(III)-metallotherapeutics of the NSAIDs, aspirin and salicylic acid: Enhancement of their solubility and bioactivity by using the surfactant CTAB, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2015, 150, 108-119.

[49] C.N. Banti, E.I. Gkaniatsou, N. Kourkoumelis, M.J. Manos , A.J. Tasiopoulos , T. Bakas, S.K. Hadjidakou, Assessment of organotins against the linoleic acid, glutathione and CT-DNA, *Inorganica Chimica Acta*, 2014, 423, 98-106.

[50] E. Vrontaki, G. Leonis, M.G. Papadopoulos, M. Simcic, S. Golic Grdadolnik, A. Afantitis, G. Melagraki, S.K. Hadjidakou, T. Mavromoustakos, Comparative binding effects of aspirin and anti-inflammatory Cu complex in the active site of LOX-1, *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2012, 1-33.

[51] M. Poyraz, C.N. Banti, N. Kourkoumelis, V. Dokorou, M.J. Manos, M. Simčič, S. Golič-Grdadolnik, T. Mavromoustakos, A.D. Giannoulis, I.I. Verginadis, K. Charalabopoulos, S.K. Hadjidakou, Synthesis, structural characterization and biological studies of novel mixed ligand Ag(I) complexes with triphenylphosphine and aspirin or salicylic acid, *Inorganica Chimica Acta*, 2011, 375, 114-121.

[52] Kyrikou, S.K. Hadjidakou, D. Kovala-Demertzi, K. Viras, T. Mavromoustakos, Effects of non-steroid anti-inflammatory drugs in membrane bilayers, *Chemistry and Physics of Lipids*, 2004 132, 157–169.

[53] <https://en.wikipedia.org/wiki/Copper>

- [54] F. Tisato, C. Marzano, M. Porchia, M. Pellei, C. Santini, Copper in Diseases and Treatments, and Copper-Based Anticancer Strategies, Wiley Periodicals, 2010, 4, 708-749.
- [55] S. Lib , J. Zhaoa, Y. Guoa, Y. Meib, B. Yuanb, N. Gana, J. Zhanga, J. Hua, H. Hou, Influence of the introduction of a triphenylphosphine group on the anticancer activity of a copper complex, Journal of Inorganic Biochemistry, 2020, 210.
- [56] M. C. Linder, The relationship of copper to DNA damage and damage prevention in humans, Mutation Research, 2012, 733, 83-91.
- [57] https://www.researchgate.net/figure/Major-types-of-DNA-cleavage-A-Hydrolytic-cleavage-of-DNA-P-O-bond-scission-is-shown_fig6_264642111
- [58] C. Garrido, L. Galluzzi, M. Brunet, P.E Puig, C. Didelot, G Kroemer, Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria, Cell Death & Differentiation, 2006, 13,1423–1433.
- [59]<https://www.chem.uwec.edu/Webpapers2001/bonisjm/Pages/Example%20%231/example1.html>
- [60] A. B. Swaminathan, V. M. Gohil, The Role of COA6 in the Mitochondrial Copper Delivery Pathway to Cytochrome c Oxidase, Biomolecules, 2022, 12, 125.
- [61] Dr. W. Han Du, Dr. A. W. Götz, Prof. L. Noodleman, DFT Calculations for Mössbauer Properties on Dinuclear Center Models of the Resting Oxidized Cytochrome c Oxidase, ChemPhysChem, 2022.
- [62] J. Chakraborty, S. Pakrashi, A. Sarbajna, M. Dutta, J. Bandyopadhyay, Quercetin Attenuates Copper-Induced Apoptotic Cell Death and Endoplasmic Reticulum Stress in SH-SY5Y Cells by Autophagic Modulation, Biological Trace Element Research, 2022.
- [63] K. Moschovitis, C.N. Banti, N. Kourkoumelis, E.E. Moushi, T. Lazarides, S.K.

Hadjikakou, Fluorescence of copper(I) and mixed valence copper(I/II) complexes with dipicolinic acid and their catalytic activity on catechol oxidation, *Inorganica Chimica Acta*, 2020, 500.

[64] G.K. Batsala, V. Dokorou, N. Kourkoumelis, M.J. Manos, A.J. Tasiopoulos, T. Mavromoustakos, M. Simcic, S. Golic-Grdadolnik, S.K. Hadjickakou, Copper(I)/(II) or silver(I) ions towards 2-mercaptopyrimidine: An exploration of a chemical variability with possible biological implication, *Inorganica Chimica Acta*, 2012, 382, 146-157.

[65] K. Lazarou, B. Bednarz, M. Kubicki, I. I. Verginadis, K. Charalabopoulos, N. Kourkoumelis, S. K. Hadjickakou, Structural, photolysis and biological studies of the bis(12-chloro)-tris(triphenylphosphine)-di-copper(I) and chloro-tris(triphenylphosphine)-copper(I) complexes. Study of copper(I)–copper(I) interactions, *Inorganica Chimica Acta*, 2010, 363, 763-772.

[66] S. Li, J. Zhao, Y. Guo, Y. Mei, B. Yuan, N. Gan, J. Zhang, J. Hu, H. Hou, Influence of the introduction of a triphenylphosphine group on the anticancer activity of a copper complex, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2020, 210.

[67] B. A. Babgi, J. H. Alsayari, B. Davaasuren, A. Emwas, M. Jaremko, M. H. Abdellattif, M. A. Hussien, Synthesis, Structural Studies, and Anticancer Properties of [CuBr(PPh₃)₂(4,6-Dimethyl-2-Thiopyrimidine-κS)], *Crystals*, 2021, 11, 688.

[68] R. Khan, M. Usman, R. Dhivya, P. Balaji, A. Alsalme, H. AlLohedan, F. Arjmand, K. AlFarhan, M. A. Akbarsha, F. Marchetti, C. Pettinari, S. Tabassum, Heteroleptic Copper(I) Complexes of “Scorpionate” Bis-pyrazolyl Carboxylate Ligand with Auxiliary Phosphine as Potential Anticancer Agents: An Insight into Cytotoxic Mode, *Scientific Reports*, 2017, 1-17.

[69] M. O’Connor, A. Kellett, M. McCann, G. Rosair, M. McNamara, O. Howe, B.S.

Creaven, S. McClean, A. Foltyn-Arfa Kia, D. O'Shea, M. Devereux, Copper(II) Complexes of Salicylic Acid Combining Superoxide Dismutase Mimetic Properties with DNA Binding and Cleaving Capabilities Display Promising Chemotherapeutic Potential with Fast Acting in Vitro Cytotoxicity against Cisplatin Sensitive and Resistant Cancer Cell Lines, *Journal Medicinal of Chemistry*, 2012, 55, 1957-1968.

[70] W. Lian, X. Wang, C. Xie, H. Tian, X. Song, H. Pan, X. Qiao, J. Xu, Mixed-ligand copper(II) Schiff base complexes: the role of coligand in DNA binding, DNA cleavage, protein binding and cytotoxicity, *Dalton Transactions*, 2016, 00, 1-3.

[71] F. Jian, H. Xiao, P. Sun, (2-Hydroxybenzoato)-bis(triphenylphosphine)-copper(i), *Chinese Journal of Inorganic Chemistry*, 2003, 19, 869.

[72] W. Yuan, Y. Chen, J. Che, ESR, solid-state ^{31}P MAS NMR, and UV-vis-NIR studies on linear CuI CuII CuI trinuclear species: Crystal structure of bis-*l*-salicylato (2)-1:2 $\mu_4\text{O}$; 2:3 $\mu_4\text{O}$ -tetrakis (triphenylphosphine- μ_2 2P, μ_3 2P)-tricopper(I, II, I), $[(\text{PPh}_3)_2\text{Cu}]_2(\text{l-o-OC}_6\text{H}_4\text{COO})_2\text{Cu}$, *Inorganic Chemistry Communications*, 2009, 12, 1197-1199.

[73] <https://www.osmometers.com/osmomat-basic.html>

[74] <http://chromabzar.com/fluorometer/>

[75] E.A. Orellana, A.L. Kasinski, Sulforhodamine B (SRB) Assay in Cell Culture to Investigate Cell Proliferation, *Bio-Protocol*, 2016, 6(21), 1984.

[76] <https://biosan.lv/products/hipo-mpp-96-microplate-photometer/>

[77] W. W. Wilfinger, K. Mackey, P. Chomczynski, Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity, *Biotechniques*, 1997, 22, 3, 474-6, 478-81.

[78] M. Kapetana, C. N. Banti, C. Papachristodoulou, V. Psycharis, C. P.

Raptopoulou, S.K. Hadjikakou, Conjugation of triphenylantimony(V) with carvacrol against human breast cancer cells, *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2022, 27, 373–389.

[79] L. Tabrizi, H. Chiniforoshan, P. McArdle, M. Ebrahimi, T. Khayamian, A novel bioactive Cd(II) polymeric complex with mefenamic acid: Synthesis, crystal structure and biological evaluations, *Inorganica Chimica Acta*, 2015, 432, 176-184.

[80] I. Ozturk, S. Filimonova, S. K. Hadjikakou, N. Kourkouvelis, V. Dokorou, M. J. Manos, A. J. Tasiopoulos, M. M. Barsan, I. S. Butler, E. R. Milaeva, J. Balzarini, N. Hadjiliadis, Structural Motifs and Biological Studies of New Antimony(III) Iodide Complexes with Thiones, *Inorganic Chemistry*, 2010, 49, 488–501.

[81] G. Chen, A. J. Seukep, M. Guo, Recent Advances in Molecular Docking for the Research and Discovery of Potential Marine Drugs, *Marine Drugs*, 2020, 18 (11), 545.

[82] G. K. Latsis, C.N. Banti, N. Kourkouvelis, C. Papatriantafyllopoulou, N. Panagiotou, A. Tasiopoulos, A. Douvalis, A. G. Kalampounias, T. Bakas, S. K. Hadjikakou, Poly Organotin Acetates against DNA with Possible Implementation on Human Breast Cancer, *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19, 2055.

[83] M. A. Abdallah, S. K. Hadjikakou, N. Hadjiliadis, M. Kubicki, T. Bakas, N. Kourkouvelis, Y. V. Simos, S. Karkabounas, M. M. Barsan, I.S. Butler, Synthesis, Characterization, and Biological Studies of Organotin(IV) Derivatives with o- or p-hydroxybenzoic Acids, *Bioinorganic Chemistry and Application*, 2009, 12.

[84] V. Robert, G. Lemerrier, A Combined Experimental and Theoretical Study of Carboxylate Coordination Modes: A Structural Probe, *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128, 1183-1187.

[85] C. I. Miles, G. H. Schenk, Fluorescence of Acetylsalicylic Acid in Solution and Its

Measurement in Presence of Salicylic Acid, 1970, *Analytical Chemistry*, 1970, 42 (6), 656-659.

[86] M. Poyraz, H. Berber, C. N.Banti, N. Kourkoumelis, M. J.Manos, S.K. Hadjikakou, Synthesis characterization and biological activity of mixed ligand silver(I) complex of 2-benzimidazolylurea and triphenylphosphine, *Polyhedron* 2017, 128, 95-103.

[87] M. Sirajuddin, S. Ali, A. Badshah, Drug–DNA interactions and their study by UV–Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2013, 124, 1-19.

[88] <https://www.hoelzel-biotech.com/en/infothek/nucleic-acid-detection/>

[89] X. Sheng, X. Lu, Y. Chen, G. Lu, J. Zhang, Y. Shao, F. Liu, Q. Xu, Synthesis, DNA-Binding, Cleavage, and Cytotoxic Activity of New 1,7-Dioxo4,10-diazacyclododecane Artificial Receptors Containing Bisguanidinoethyl or Diaminoethyl Double Side Arms, *Chemistry- A European Journal*, 2007, 13, 9703–9712.

[90] L.Tabrizi, H. Chiniforoshan, P. McArdle, M. Ebrahimi, T. Khayamian, A novel bioactive Cd(II) polymeric complex with mefenamic acid: Synthesis, crystal structure and biological evaluations, *Inorganica Chimica Acta*, 2015, 432, 176-184.

[91] C.N. Banti, C. P. Raptopoulou, V. Psycharis, S.K. Hadjikakou, Novel silver glycinate conjugate with 3D polymeric intermolecular self-assembly architecture; an antiproliferative agent which induces apoptosis on human breast cancer cells, *J Inorg Biochem*, 2021, 216:111351.

[92] D. Lapenna, G. Ciofani, S. D. Pierdomenico, M. Neri, C. Cuccurullo, M. A. Giamberardino, F. Cuccurullo, Inhibitory activity of salicylic acid on lipoxygenase-dependent lipid peroxidation, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2009, 1790, 25–30.

[93] D.L. Nelson, M.M. Cox, Enzymes: Lehninger Principles of Biochemistry, 2004, 4th ed.

[94] <https://jackwestin.com/resources/mcat-content/enzymes/inhibition>

[95] O.D. Lopina, Enzyme Inhibition and Activators, licensee InTechOpen, 2017, 11, 244-255.