



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**Βιολογική αξιολόγηση της αντικαρκινικής δράσης βιοδραστικών
ενώσεων φυσικών προϊόντων, αναλόγων και μορφοποιήσεων αυτών**

**ΜΑΡΙΑ ΧΑΤΖΗΘΑΝΑΣΙΑΔΟΥ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ, MSc**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
2021**



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**Βιολογική αξιολόγηση της αντικαρκινικής δράσης βιοδραστικών
ενώσεων φυσικών προϊόντων, αναλόγων και μορφοποιήσεων αυτών**

**ΜΑΡΙΑ ΧΑΤΖΗΑΘΑΝΑΣΙΑΔΟΥ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ, MSc**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
2021**

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Χημείας της Σχολής Θετικών Επιστημών,
του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα Ν.

5343/32,

άρθρο 202, παράγραφος 2»

Ορισμός Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής από τη Συνέλευση: 1013^Α/ 14-02-2020

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων:

Ανδρέας Τζάκος, Αναπληρωτής Καθηγητής του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη:

Χαράλαμπος Σταμάτης, Καθηγητής του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Σάββας Χριστοφορίδης, Καθηγητής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 03-02-2017

Θέμα: «Βιολογική αξιολόγηση της αντικαρκινικής δράσης βιοδραστικών ενώσεων φυσικών προϊόντων, αναλόγων και μορφοποιήσεων αυτών»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ από τη Συνέλευση: 1026^Α/13-11-2020

1. Ανδρέας Τζάκος, Αναπληρωτής Καθηγητής του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
2. Χαράλαμπος Σταμάτης, Καθηγητής του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
3. Σάββας Χριστοφορίδης, Καθηγητής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
4. Θωμάς Μαυρομούστακος, Καθηγητής του Τμήματος Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών
5. Ευάγγελος Κωλέττας, Αναπληρωτής Καθηγητής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
6. Νίκος Κουρκουμέλης, Αναπληρωτής Καθηγητής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
7. Γρηγόριος Σιβολαπένκο, Αναπληρωτής Καθηγητής του Τμήματος Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Πατρών

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «Άριστα» στις 22-02-2021

Η Πρόεδρος του Τμήματος Χημείας
Λουλούδη Μαρία, Καθηγήτρια

Η Γραμματέας του Τμήματος
Ξανθή Τουτουνηζόγλου

Η παρούσα διδακτορική διατριβή χρηματοδοτήθηκε από την Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας (ΓΓΕΤ) και από το Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας και Τεχνολογίας (ΕΛΙΔΕΚ) (Αριθμός Υποτροφίας: 1090)



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας, του Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων σε συνεργασία με το Ινστιτούτο Βιοϊατρικών Ερευνών Ιωαννίνων, υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ανδρέα Τζάκου.

Πρώτα απ' όλους, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Ανδρέα Τζάκο για την ανάθεση και επίβλεψη του θέματος. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω από καρδιάς για την πολύτιμη καθοδήγηση, την εμπιστοσύνη και την ουσιαστική στήριξη που μου προσέφερε. Επίσης, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για τη δυνατότητα που μου έδωσε να εκπαιδευτώ και να εφαρμόσω ποικίλες τεχνικές και μεθόδους, έτσι ώστε να μπορώ να εξετάζω ένα φαινόμενο πολυπλεύρως. Τον ευχαριστώ γιατί αποτέλεσε έμπνευση και άνοιξε τους ορίζοντες της επιστημονικής μου σκέψης.

Απευθύνω τις θερμές ευχαριστίες μου στους Καθηγητές κ. Χαράλαμπο Σταμάτη και κ. Σάββα Χριστοφορίδη για την αποδοχή τους να συμμετάσχουν στη τριμελή εξεταστική επιτροπή. Θα ήθελα να τους ευχαριστήσω για την καθοδήγηση και τις χρήσιμες υποδείξεις που μου προσέφεραν στο πλαίσιο της συνεργασίας μας. Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ θα ήθελα να απευθύνω στον Καθηγητή κ. Θωμά Μαυρομούστακο για την πολύτιμη καθοδήγηση και για την ευκαιρία που μου έδωσε να συνεργαστούμε σε αρκετές ερευνητικές εργασίες διευρύνοντας τους ορίζοντες της γνώσης μου. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής τους κ. Ευάγγελο Κωλέττα, κ. Νίκο Κουρκουμέλη και κ. Γρηγόριο Σιβολαπένκο που αποδέχθηκαν η παρούσα διατριβή να υποβληθεί στην κρίση τους. Ευχαριστώ όλα τα μέλη της επταμελούς επιτροπής για την διάθεση του πολύτιμου χρόνου τους.

Απευθύνω το μέγιστο της ευγνωμοσύνης μου στον Καθηγητή κ. Θεόδωρο Φώτση και στην Ερευνήτρια Β' κα. Carol Murphy για τη φιλοξενία στο εργαστήριο τους, στο Ινστιτούτο Βιοϊατρικών Ερευνών Ιωαννίνων. Χωρίς αυτή, ένα μεγάλο μέρος της διατριβής δεν θα μπορούσε να εκπονηθεί. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την κα. Carol Murphy για τις πολύτιμες συμβουλές και τη βοήθεια που μου προσέφερε. Επίσης,

αποδίδω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου στον Καθηγητή κ. Ιωάννη Γεροθανάση για την πολύτιμη καθοδήγηση και υποστήριξη και τη συνεχή προθυμία μεταλαμπάδευσης των γνώσεων του.

Ένα τεράστιο ευχαριστώ οφείλω στη Δρ. Σοφία Μπέλλου για την υποστήριξη της που ξεκινά από τα χρόνια εκπόνησης του μεταπτυχιακού μου διπλώματος μέχρι την ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής. Η συμβολή της ήταν καθοριστική και ένα μεγάλο μέρος της αγάπης μου για την επιστήμη οφείλεται σε αυτήν. Την ευχαριστώ για την πολύτιμη και αδιάλειπτη καθοδήγησή της, τις γνώσεις που μου μετέφερε και τις συμβουλές της και τη βοήθειά της σε πολλά ζητήματα που βοήθησε να επιλύσω. Την ευχαριστώ που με βοήθησε σε προσωπικό και ερευνητικό επίπεδο.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να απευθύνω στα μέλη του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας που ήταν συμπαραστάτες και συνοδοιπόροι όλα αυτά τα χρόνια, δημιουργώντας ευχάριστη και δημιουργική καθημερινότητα. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Ευγένιο Στύλο, Ανδρονίκη Κωσταγιάννη, Χριστίνα Παπαεμμανουήλ, Δημήτρη Διαμαντή, Ρένο Βρέττο, Χρήστο Χατζηγιάνη και Αντώνη Τσιαϊλάνη για το ευχάριστο περιβάλλον και τη συνεργασία.

Ένα τεράστιο ευχαριστώ αλλά και ευγνωμοσύνη απευθύνω στους φίλους μου Δρ. Αναστασία Κουγιουμτζή, Δρ. Μαρία Μάρκου, Δρ. Αλεξάνδρα Χατζηκωνσταντίνου, Δρ. Μαριάννα Σακκά και Βαγγέλη Δρούγκα γιατί με στήριξαν και με βοήθησαν ουσιαστικά όποτε τους χρειάστηκα αλλά, κυρίως, γιατί με τίμησαν με την εμπιστοσύνη και τη φιλία τους από την αρχή της γνωριμίας μας, στις εύκολες μα και στις δύσκολες στιγμές.

Τέλος, ευχαριστώ τους δικούς μου ανθρώπους, την οικογένεια μου, για την αμέριστη συμπαράσταση και δύναμη που άντλησα από εκείνους. Ως ελάχιστη ένδειξη ευγνωμοσύνης, θα ήθελα να αφιερώσω τη διδακτορική μου διατριβή στη μητέρα μου Βέρα, καθώς της οφείλω τα πάντα.

Περιεχόμενα

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή	5
1.1 Ο Καρκίνος και η αντιμετώπιση του	5
1.2 Ανάπτυξη φαρμάκων με έμφαση στα μικρά μόρια	6
1.3 Τα φυσικά προϊόντα ως πηγή παραγωγής θεραπευτικών μικρών μορίων	9
1.4 Κατηγοριοποίηση φυτοχημικών ενώσεων	12
1.5 Μηχανισμοί της χημειοπροστατευτικής και αντικαρκινικής δράσης των φυτοχημικών ενώσεων	15
1.6 Ανάπτυξη βάσης δεδομένων για την αντικαρκινική δράση φυτοχημικών ενώσεων και τις φαρμακοκινητικές τους ιδιότητες	20
1.7 Προβλήματα στην ανάπτυξη φαρμάκων προερχόμενων από φυτοχημικές ενώσεις και τρόποι αντιμετώπισης τους	23
Βιβλιογραφία	27
ΣΚΟΠΟΣ	31
Κεφάλαιο 2: Μελέτη της αλληλεπίδρασης του ροσμαρινικού οξέος και των δύο βιοδραστικών υπομονάδων του με την αλβουμίνη	33
2.1 Εισαγωγή	33
2.2 Υλικά και Μέθοδοι	38
2.2.1 Υλικά	38
2.2.2 Φθορισμομετρία	38
2.2.3 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού	40
2.2.3.1 Θεωρητικό μέρος	40
2.2.3.2 Πειραματικό μέρος	44
2.2.4 Θερμιδομετρία Ισόθερμης Τιτλοδότησης (ITC)	45
2.2.4.1 Θεωρητικό μέρος	45
2.2.4.2 Πειραματικό μέρος	48
2.2.5 Μοριακή Μοντελοποίηση	49
2.3 Αποτελέσματα	50
2.3.1. Μελέτη της αλληλεπίδρασης της αλβουμίνης με το ροσμαρινικό, καφεϊκό και σαλβιανικό οξύ μέσω φθορισμομετρίας	50
2.3.2. Μελέτη της αλληλεπίδρασης της αλβουμίνης με το ροσμαρινικό, καφεϊκό και σαλβιανικό οξύ με χρήση φασματοσκοπίας	53
2.3.2.1 Προσδιορισμός επιτόπων πρόσδεσης μέσω της τεχνικής STD NMR	53

2.3.2.2 Μελέτη της διαμόρφωσης που λαμβάνουν στο χώρο τα τρία φαινολικά οξέα κατά την πρόσδεση τους στη BSA μέσω tr-NOESY NMR	57
2.3.3. Μελέτη της αλληλεπίδρασης της αλβουμίνης με το ροσμαρινικό, καφεϊκό και σαλβιανικό οξύ με χρήση ITC.....	60
2.3.4 Δομικός χαρακτηρισμός της αλληλεπίδρασης της BSA με το ροσμαρινικό, καφεϊκό και σαλβιανικό οξύ μέσω πειραμάτων προσομοίωσης Μοριακής Πρόσδεσης.....	62
2.4 Συζήτηση.....	64
Βιβλιογραφία	67
Κεφάλαιο 3: Μελέτη συμπλόκων μορφοποίησης και παράγωγων μορίων του ροσμαρινικού και καφεϊκού οξέος με στόχο την ενίσχυση της δραστηρότητας τους.....	73
3.1 Εισαγωγή.....	73
3.2 Υλικά και Μέθοδοι	77
3.2.1 Υλικά	77
3.2.2 Προετοιμασία των συμπλόκων του ροσμαρινικού και του καφεϊκού οξέος με την HP-β-CD.....	77
3.2.3 Χαρακτηρισμός των συμπλόκων του ροσμαρινικού και του καφεϊκού οξέος με την HP-β-CD μέσω φασματοσκοπίας NMR	78
3.2.3.1 Φασματοσκοπία NMR στερεής κατάστασης (ssNMR, solid-state NMR).....	78
3.2.3.2 Φασματοσκοπία ¹ H NMR υγρής κατάστασης.....	78
3.2.3.3 Φασματοσκοπία 2D ¹ H- ¹ H NOESY.....	79
3.2.4 Φασματομετρία μαζών πλήρους σάρωσης για τον χαρακτηρισμό των συμπλόκων του ροσμαρινικού και του καφεϊκού οξέος με την HP-β-CD.....	79
3.2.5 Θερμιδομετρία Ισόθερμης Τιτλοδότησης (ITC)	79
3.2.6 Κυτταροκαλλιέργεια.....	80
3.2.7 Τεχνική ηλεκτροφόρησης του DNA μεμονωμένων κυττάρων (Single Cell Gel Electrophoresis/Comet assay).....	80
3.2.8 Τεχνική UHPLC-MS/MS για την εκτίμηση της κυτταρικής πρόληψης.....	82
3.2.8.1. Θεωρητικό μέρος	82
3.2.8.2. Πειραματικό μέρος.....	86
3.2.9 Κυτταρομετρία ροής για τον έλεγχο της απόπτωσης	87
3.2.10 Μέτρηση του ενδοκυττάρου καταλυτικά ενεργού σιδήρου	88
3.3 Αποτελέσματα.....	89
Μέρος A: Χαρακτηρισμός των συμπλόκων του ροσμαρινικού και καφεϊκού οξέος με την HP-β-CD	89
3.3.1 Χαρακτηρισμός των συμπλόκων του ροσμαρινικού και καφεϊκού οξέος με την HP-β-CD με χρήση NMR	89

3.3.2 Χαρακτηρισμός των συμπλόκων του ροσμαρινικού και καφεϊκού οξέος με την 2-HP-β-CD μέσω φασματομετρίας μαζών	94
3.3.3 Χαρακτηρισμός της αλληλεπίδρασης του ροσμαρινικού και του καφεϊκού οξέος με την HP-β-CD μέσω ITC	96
Μέρος Β: Μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης και κυτταρικής πρόσληψης του ροσμαρινικού οξέος και των εστερικών και αμιδικών παραγώγων του	97
3.3.4 Μελέτη της προστατευτικής ικανότητας του ροσμαρινικού οξέος και των εστερικών και αμιδικών παραγώγων του στην επαγόμενη από το H ₂ O ₂ βλάβη του DNA	97
3.3.5 Μελέτη της κυτταρικής πρόσληψης του ροσμαρινικού οξέος και των εστερικών και αμιδικών παραγώγων του μέσω της συνδυαστικής τεχνικής UHPLC-MS/MS	102
3.3.6 Μελέτη της προστατευτικής ικανότητας του ροσμαρινικού οξέος και των εστερικών και αμιδικών παραγώγων του στην επαγόμενη από το H ₂ O ₂ απόπτωση	105
3.3.7 Μελέτη της ικανότητας δέσμευσης του καταλυτικά ενεργού σιδήρου από το ροσμαρινικό οξύ και τα εστερικά και αμιδικά παράγωγα του	108
3.4 Συζήτηση.....	110
Βιβλιογραφία	115
Κεφάλαιο 4: Μελέτη της αντικαρκινικής και αντιαγγειογενετικής δράσης της 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνης, ανάλογου μορίου της κερσετίνης.....	119
4.1 Εισαγωγή	119
4.2 Υλικά και Μέθοδοι	128
4.2.1 Σύνθεση μεθυλιωμένων παραγώγων της κερσετίνης	128
4.2.2 Μέθοδος κυτταροκαλλιέργειας της κυτταρικής σειράς DLD1.....	128
4.2.3 Μέθοδος βιωσιμότητας κυττάρων MTT	129
4.2.4 Μελέτη της ανάπτυξης των κυττάρων DLD1 μέσω του συστήματος IncuCyte®	130
4.2.5 Μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων DLD1 μέσω του συστήματος IncuCyte®	130
4.2.6 Έλεγχος απόπτωσης και νέκρωσης στα κύτταρα DLD1 με χρήση κυτταρομετρίας ροής με Annexin V-FITC και ιωδιούχο προπίδιο.....	131
4.2.7 Δοκιμασία πολλαπλασιασμού των κυττάρων DLD1 με ενσωμάτωση βρωμοδεόξυ ουριδίνης και ανοσοφθορισμό	132
4.2.8 Μέτρηση συγκέντρωση πρωτεΐνης.....	133
4.2.9 Απομόνωση και μέθοδος κυτταροκαλλιέργειας των HUVECs.....	133
4.2.10 Δοκιμασία τοξικότητας σε κύτταρα HUVE	133
4.2.11 Δοκιμασία πολλαπλασιασμού των HUVECs με ενσωμάτωση βρωμοδεόξυ ουριδίνης και ανοσοφθορισμό	134
4.2.12 Έλεγχος απόπτωσης και νέκρωσης στα HUVECs μέσω κυτταρομετρίας ροής με Annexin V-FITC και ιωδιούχο προπίδιο.....	134

4.2.13 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου και ανοσοαποτύπωμα Western	135
4.3 Αποτελέσματα	136
4.3.1 Έλεγχος της βιωσιμότητας των κυττάρων DLD1 παρουσία της κερσετίνης και των μεθυλιωμένων παράγωγων μορίων της	136
4.3.2 Έλεγχος της επίδρασης της κερσετίνης και της 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνης στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων DLD1 μέσω ανοσοφθορισμού για τον έλεγχο της ενσωμάτωσης της βρωμοδεόξυ ουριδίνης	139
4.3.3 Έλεγχος της αποπτωτικής δράσης της κερσετίνης και της 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνης στα κύτταρα DLD1 μέσω κυτταρομετρίας ροής	141
4.3.4 Έλεγχος της ικανότητας αναστολής της μετανάστευσης των κυττάρων DLD1 μετά από επώαση με την κερσετίνη και την 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνη	142
4.3.5 Έλεγχος κυτταροτοξικότητας της κερσετίνης και της 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνης σε φυσιολογικά κύτταρα HUVE	144
4.3.6 Έλεγχος της επίδρασης της κερσετίνης και της 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνης στον επαγόμενο από τον VEGF πολλαπλασιασμό των HUVECs	145
4.3.7 Έλεγχος της επίδρασης της κερσετίνης και της 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνης στην επαγόμενη από τον VEGF επιβίωση των HUVECs	148
4.4 Συζήτηση	151
Βιβλιογραφία	155
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	161
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	167
SUMMARY	169
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	171
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	173

Κεφάλαιο 1

Εισαγωγή

1.1 Ο Καρκίνος και η αντιμετώπιση του

Ο καρκίνος αναφέρεται σε σύνολο ασθενειών οι οποίες περιγράφονται από την ανεξέλεγκτη διαίρεση γενετικά μεταλλαγμένων κυττάρων. Μέχρι στιγμής, έχουν χαρακτηριστεί περισσότεροι από 200 τύποι, ενώ ένας όγκος μπορεί να δημιουργηθεί σχεδόν σε οποιοδήποτε μέρος του ανθρώπινου σώματος. Ακολουθώντας τις καρδιαγγειακές νόσους, ο καρκίνος αποτελεί τη δεύτερη αιτία θανάτου από ασθένεια παγκοσμίως και σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization, WHO) υπολογίζεται πως 9.6 εκατομμύρια θάνατοι προήλθαν από αυτόν το 2018[1]. Οι περισσότεροι θανατηφόροι τύποι καρκίνου είναι αυτοί του πνεύμονα, του παχέος εντέρου, του στομάχου, του ήπατος και του στήθους, χωρίς να ταυτίζονται απόλυτα με τους τύπους καρκίνου που απαντώνται πιο συχνά[1]. Ωστόσο, το συνολικό ποσοστό θνησιμότητας εξαιτίας του καρκίνου παρουσιάζει φθίνουσα πορεία, ενώ χαρακτηριστικό είναι πως στο διάστημα 1991-2015 υπέστη μείωση 26 % στις ΗΠΑ[2], γεγονός που αποδίδεται στην αλλαγή του τρόπου ζωής (π.χ. μείωση της συνήθειας του καπνίσματος) αλλά και στην έγκαιρη διάγνωση και στη βελτίωση της αποτελεσματικότητας των θεραπειών[3]. Η πρόοδος που έχει σημειωθεί από τους τελευταίους δύο παράγοντες αντικατοπτρίζεται καλύτερα στο συνολικό ποσοστό πενταετούς επιβίωσης που αφορά σε όλους τους τύπους καρκίνου, το οποίο αυξήθηκε από 50 % το 1970 σε 67 % το 2013[4].

Η μικρή πρόοδος που έχει σημειωθεί στο επίπεδο των θεραπειών σε συνδυασμό με την αύξηση των νέων περιστατικών καρκίνου καθιστά αναγκαία την εύρεση νέων τρόπων αντιμετώπισης είτε τη βελτιστοποίηση των ήδη υπαρχόντων. Βέβαια, η πολυπλοκότητα της φυσιολογίας και των μοριακών μηχανισμών που χαρακτηρίζουν την

ασθένεια, τα οποία δεν είναι πλήρως κατανοητά μέχρι και σήμερα, δυσχεραίνουν την ανάπτυξη θεραπειών. Οι σύγχρονοι τρόποι θεραπείας είναι η χειρουργική επέμβαση, η ακτινοθεραπεία, η ορμονοθεραπεία, η ανοσοθεραπεία, η χημειοθεραπεία και η στοχεύουσα θεραπεία. Τα δύο τελευταία είδη θεραπειών στο μεγαλύτερο μέρος τους περιλαμβάνουν τη χορήγηση φαρμάκων που προέρχονται από την κατηγορία των μικρών μορίων (small molecules), δηλαδή τα μόρια εκείνα που έχουν μοριακό βάρος έως 900 Daltons και είναι οργανικά.

Τα μικρά μόρια στοχεύοντας κυτταρικά συστατικά εκτός (π.χ. μεμβρανικούς υποδοχείς) και εντός των κυττάρων (π.χ. πρωτεΐνες, DNA) μπορούν να επηρεάσουν την επιβίωση, την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων ή ακόμη να τα οδηγήσουν στον θάνατο. Οι κύριοι στόχοι μικρών μορίων, τα οποία έχουν εγκριθεί από τον Οργανισμό Φαρμάκων και Τροφίμων των ΗΠΑ (Food and Drug Administration, FDA) ως αντικαρκινικά φάρμακα, είναι το DNA και οι μηχανισμοί σύνθεσης και επιδιόρθωσης του, η κυτταρική διαίρεση μέσω της σταθεροποίησης/αποσταθεροποίησης των μικροσωληνίσκων, η απόπτωση, οι πρωτεϊνικές κινάσες, οι πρωτεάσες συμπεριλαμβανομένων των μεταλλοπρωτεασών και της γ-σεκρετάσης και οι πολυμεράσες της πολυ-ADP-ριβόζης (PARPs)[5]. Ωστόσο τα τελευταία χρόνια, η αλληλούχιση των καρκινικών γονιδιωμάτων αποκαλύπτει ολοένα και περισσότερο την πολυπλοκότητα των όγκων που χαρακτηρίζονται από πολυάριθμες γενετικές μεταλλάξεις και ετερογένεια. Έτσι η ανακάλυψη καινούριων μορίων-στόχων αλλά και η αναγκαιότητα της χρήσης συνδυαστικών θεραπειών καθιστά αναγκαία την ανακάλυψη καινούριων θεραπευτικών μορίων.

1.2 Ανάπτυξη φαρμάκων με έμφαση στα μικρά μόρια

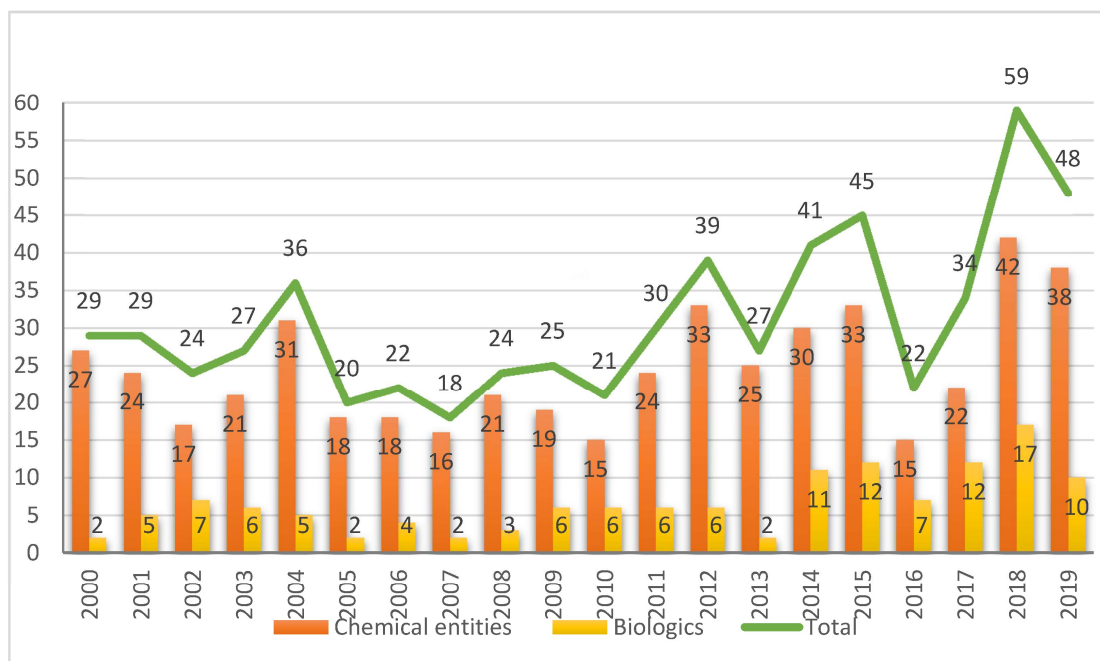
Η διαδικασία ανάπτυξης φαρμάκων είναι χρονοβόρα και πολυδάπανη. Υπολογίζεται πως το κόστος ανάπτυξης και έγκρισης ενός φαρμάκου αγγίζει κατά μέσο όρο το ποσό των 985 εκατομμυρίων δολαρίων[6] ενώ η έγκριση και η κυκλοφορία στην αγορά επιτυγχάνεται τελικώς για ένα μικρό ποσοστό των υπό μελέτη μορίων. Μόλις το 9.6 %

των μορίων που υποβλήθηκαν σε κλινικές μελέτες κατά το διάστημα 2006-2015 έλαβαν άδεια κυκλοφορίας από τον FDA [7]. Αξίζει να σημειωθεί πως αυτό το ποσοστό επιτυχίας διαφέρει ανά κατηγορία νοσημάτων αφού αγγίζει το 26 % για τα αιματολογικά νοσήματα ενώ στον τομέα της ογκολογίας είναι μόλις 5.1 % [7].

Η έγκριση των φαρμάκων γίνεται από αναγνωρισμένο οργανισμό όπως είναι ο FDA στις ΗΠΑ και ο ευρωπαϊκός EMA (European Medicines Agency, Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων) και διαχωρίζονται στις νέες χημικές οντότητες (New Chemical Entities, NCEs) όπου περιλαμβάνονται τα μικρά μόρια και στις νέες βιολογικές οντότητες (New Biological Entities, NBEs) όπου συμπεριλαμβάνονται οι πρωτεΐνες, τα αντισώματα, οι ιοί και τα εμβόλια, αλλά και η κατηγορία των συζευγμάτων αντισωμάτων-φαρμάκων (Antibody Drug Conjugates, ADCs)[8]. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 1.1**, είναι εμφανής η υπεροχή των μικρών μορίων έναντι των βιολογικών που λαμβάνουν έγκριση τα τελευταία είκοσι χρόνια, με τις βιολογικές οντότητες ωστόσο να εμφανίζουν αυξανόμενη τάση.

Εκατοντάδες μικρά μόρια απορρίπτονται κάθε χρόνο κατά τη διάρκεια των κλινικών μελετών είτε λόγω χαμηλής αποτελεσματικότητας είτε για λόγους ασφάλειας. Ακόμη μεγαλύτερος όμως είναι ο αριθμός των μικρών μορίων που κρίνονται ακατάλληλα στα προηγούμενα στάδια της ανάπτυξης φαρμάκων, αυτά της ανακάλυψης και των προκλινικών μελετών.

Στο πρώτο στάδιο της ανακάλυψης φαρμάκων η επικρατέστερη μέθοδος (hit to lead) αποτελείται από την εύρεση μιας ένωσης-οδηγού (lead) η οποία προκύπτει από τη διαλογή και βελτιστοποίηση αρχικών βιοδραστικών οδηγών-δομών (hit). Αρχικά, επιλέγεται ένας μοριακός στόχος και μια μέθοδος ανάλυσης και εφαρμόζεται ταχύς έλεγχος/διαλογή υψηλής απόδοσης (High-Throughput Screening, HTS) σε εκατοντάδες ή και χιλιάδες μικρά μόρια έτσι ώστε να βρεθούν αυτά που παρουσιάζουν δραστικότητα (hits). Στη συνέχεια οι οδηγοί-δομών αξιολογούνται περαιτέρω: ελέγχονται τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους όπως η υδατοδιαλυτότητα και το μοριακό βάρος (druglikeness), διασταυρώνεται η δραστικότητα τους μέσω δοκιμών διαφορετικών από



Εικόνα 1.1. Νέες χημικές και βιολογικές οντότητες που έχουν εγκριθεί από τον FDA τις τελευταίες δύο δεκαετίες[9].

αυτής που ακολουθήθηκε κατά την αρχική διαλογή, σχεδιάζεται καμπύλη δόσης-απόκρισης έτσι ώστε να υπολογιστούν παράμετροι όπως το IC_{50} , εκτιμάται κατά πόσο είναι εφικτή η σύνθεση τους και εξετάζεται η ισχύς και η φύση της πρόσδεσης (κινητική, θερμοδυναμικές παράμετροι, στοιχειομετρία) τους στο μόριο-στόχο μέσω βιοφυσικών τεχνικών όπως π.χ. η θερμιδομετρία ισόθερμης τιτλοδότησης (Isothermal Titration Calorimetry, ITC), ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) και ο συντονισμός επιφανειακών πλασμονίων (Surface plasmon resonance, SPR). Στη συνέχεια ακολουθεί το στάδιο hit to lead που περιλαμβάνει μελέτες σχέσης δομής-δραστικότητας (Structure -Activity Relationship, SAR) έτσι ώστε να αναγνωριστούν δομικά μοτίβα για τον σχεδιασμό μορίων με αυξημένη δραστικότητα και βελτιωμένες ιδιότητες (π.χ. διαλυτότητα, σταθερότητα) με στόχο τη δημιουργία των ενώσεων-οδηγών. Το τελικό στάδιο βελτιστοποίησης των ενώσεων-οδηγών (lead optimization) αποτελείται κυρίως από την *in vitro* και *in vivo* μελέτη τους έτσι ώστε να εκτιμηθεί η

ασφάλεια χρήσης τους και τα φαρμακοκινητικά τους χαρακτηριστικά που συμπεριλαμβάνουν την απορρόφηση, την κατανομή, τον μεταβολισμό και την έκκριση της ένωσης (Absorption – Distribution – Metabolism – Excretion, ADME)[10].

1.3 Τα φυσικά προϊόντα ως πηγή παραγωγής θεραπευτικών μικρών μορίων

Τα φυσικά προϊόντα αποτελούν μια τεράστια δεξαμενή μορίων από την οποία μπορούν να αντληθούν νέα φάρμακα. Ξεκινώντας από την παραδοσιακή ιατρική που αναπτύχθηκε από τους πρώτους πολιτισμούς (π.χ. Βαβυλωνία, Αίγυπτος), ο άνθρωπος προσπαθούσε να εκμεταλλευτεί τις θεραπευτικές ιδιότητες των βοτάνων. Ωστόσο, χρειάστηκε αρκετές εκατοντάδες χρόνια οπότε και με την ανάπτυξη της πειραματικής διαδικασίας και της τεχνολογίας να είναι δυνατός ο προσδιορισμός και η απομόνωση των φυσικών προϊόντων, ο συστηματικός έλεγχος της θεραπευτικής τους ικανότητας καθώς και η ορθή χορήγηση τους. Στις αρχές μόλις του 19^{ου} και 20^{ου} αιώνα εντάθηκε το ενδιαφέρον ως προς την ιατρική αξία των φυτών με χαρακτηριστικό παράδειγμα την απομόνωση της μορφίνης από το όπιο το έτος 1804[11] και την ανακάλυψη της κινίνης[12] και της κοκαΐνης[13], αντίστοιχα. Στη συνέχεια, η ταυτοποίηση και απομόνωση της πενικιλίνης[14] σήμανε την έναρξη μιας περιόδου κατά την οποία δόθηκε έμφαση στη μελέτη μικροβίων -κυρίως μυκήτων- με στόχο την ανάπτυξη αντιβιοτικών. Το ενδιαφέρον για την ανάπτυξη φαρμάκων από διαφορετικές φυσικές πηγές όπως τα φυτά αλλά και η χρήση τους για την αντιμετώπιση άλλων ασθενειών όπως ο καρκίνος άρχισε να καλλιεργείται μετά τη δεκαετία του 1960 με την ανακάλυψη της πακλιταξέλης[15] και της καμπτοθεκίνης[16].

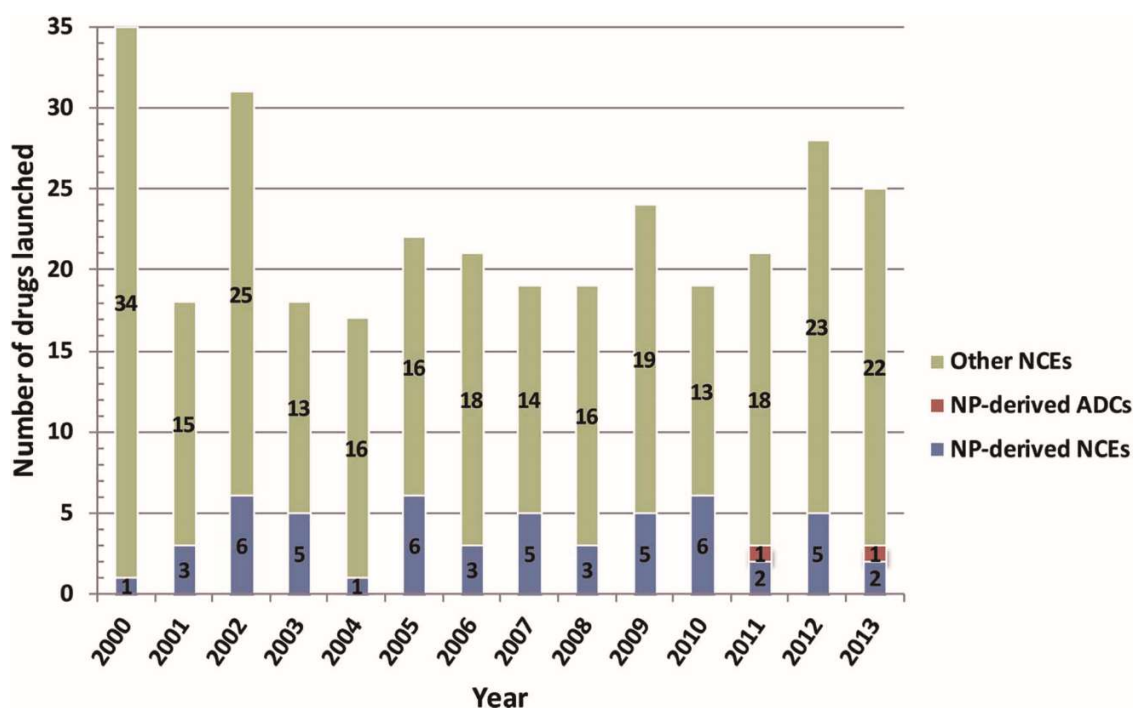
Με τον όρο φυσικά προϊόντα αναφερόμαστε σε χημικά μόρια που παράγονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες από ζώντες οργανισμούς που απαντώνται στη φύση[17]. Οι κύριες πηγές αυτών είναι προκαρυωτικοί οργανισμοί, όπως τα βακτήρια, και ευκαρυωτικοί, όπως οι μύκητες, οι φυτικοί και οι ζωικοί οργανισμοί τόσο από το χερσαίο όσο και από το υδάτινο περιβάλλον. Η βιοδραστικότητα τους καλύπτει ένα μεγάλο εύρος

ασθενειών αφού παρουσιάζουν αντικαρκινικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιβακτηριδιακές, αντιμυκητιακές, αντιπαρασιτικές, αντιϊκές και αντιδιαβητικές ιδιότητες όπως επίσης βρίσκουν εφαρμογή έναντι νοσημάτων του καρδιαγγειακού, νευρολογικού και ανοσοποιητικού συστήματος[8].

Τα πλεονεκτήματα που θέτουν τα φυσικά προϊόντα κατάλληλους υποψήφιους για θεραπείες ξεκινούν από τις ιδιότητες τους στην πηγή προέλευσης τους. Αν και αρχικώς είχε επικρατήσει η άποψη πως πρόκειται για «απόβλητα» των οργανισμών[18], πιστεύεται πως η παρουσία τους δεν είναι τυχαία και μπορεί να στοχεύει σε διάφορες λειτουργίες όπως στη διακυτταρική επικοινωνία ή και στην άμυνα του οργανισμού που τα βιοσυνθέτει. Έτσι λοιπόν, τα μόρια αυτά έχουν διαμορφωθεί εξελικτικά με τέτοιο τρόπο ώστε να αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες, να προσδέονται σε υποδοχείς και να διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες μέσω μεταφορέων[11]. Οι αλληλεπιδράσεις τους αυτές με τα κυτταρικά συστατικά καθώς και οι ομολογίες που απαντώνται στις δομές πρωτεϊνών διαφορετικών ειδών μπορούν να αιτιολογήσουν τη μεγαλύτερη πιθανότητα συσχέτισης και συμβατότητας τους με φαρμακευτικούς στόχους. Εξάλλου η μελέτη των φυσικών προϊόντων μπορεί να προσδώσει καινούρια πληροφορία στον τομέα της φυσιολογίας. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ανακάλυψη του ρόλου της ΑΤΡάσης $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ που προέκυψε μέσω της μελέτης της διγοξίνης που την αναστέλλει[19]. Επιπρόσθετα, η ποικιλότητα των χημικών δομών που μπορεί να προσφέρει η φύση δύναται να εισαγάγει καινοτόμες δομές που δεν έχουν συλληφθεί από τον ανθρώπινο εγκέφαλο. Η φυσική δεξαμενή αυτών των προϊόντων άλλωστε, έτσι όπως έχει προκύψει από εξελικτικές διεργασίες εκατομμυρίων χρόνων, φαντάζει ατελείωτη και ικανή να προσφέρει βιβλιοθήκες με πολυάριθμες χημικές δομές. Μέχρι στιγμής μικρό μέρος της φυτικής και μικροβιακής ποικιλότητας έχει μελετηθεί για τη βιοδραστικότητα του[20, 21], ενώ είναι χαρακτηριστικό πως το Εθνικό Ινστιτούτο Καρκίνου των ΗΠΑ κατάφερε να συλλέξει 30,000 είδη ανώτερων φυτών σε διάστημα 20 χρόνων με στόχο τη διαλογή τους, αριθμό που αποτελεί μόλις το 10 % του συνολικού πληθυσμού τους[11].

Τα φυσικά προϊόντα ανέκαθεν έπαιζαν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των φαρμάκων όπως υποδεικνύεται και από το ποσοστό συμμετοχής τους στον πληθυσμό

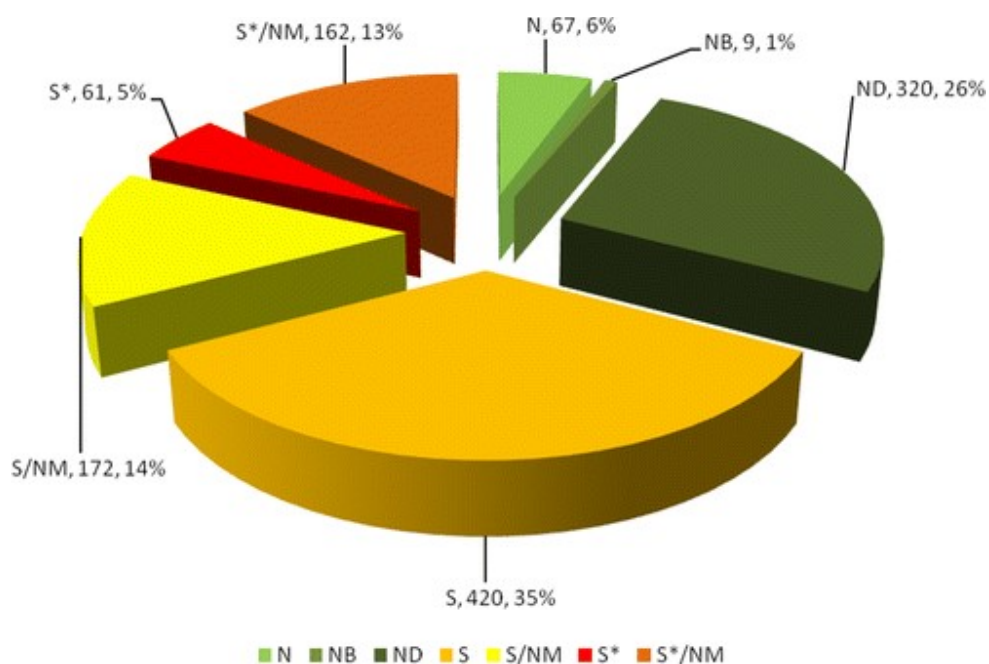
των φαρμάκων που κυκλοφορούν στην αγορά. Ενδεικτικά, στο διάστημα 2000-2013 από τις 24.4 νέες χημικές οντότητες που λάμβαναν έγκριση κατά μέσο όρο κάθε χρόνο οι 4.1 προερχόντουσαν από φυσικά προϊόντα (**Εικόνα 1.2**)[8]. Εκτενέστερη ανάλυση για τη συνεισφορά των φυσικών προϊόντων στην ανάπτυξη των φαρμάκων έχει παρουσιαστεί από τους Cragg et al. και καλύπτει το διάστημα από το 1981 έως το 2014[22]. Στην εν λόγω εργασία οι συγγραφείς διαχωρίζουν τα εγκεκριμένα φάρμακα που εμπίπτουν στην



Εικόνα 1.2. Νέες χημικές οντότητες (NCEs) που εγκρίθηκαν κατά το διάστημα 2000-2013 σε παγκόσμιο επίπεδο διαχωρισμένες σε: χημικές οντότητες που προέρχονται από φυσικά προϊόντα (NP-derived NCEs), συζεύγματα αντισωμάτων-φαρμάκων που περιέχουν φυσικά προϊόντα (NP-derived ADCs) και υπόλοιπες νέες χημικές οντότητες (Other NCEs)[8].

κατηγορία των νέων χημικών οντοτήτων σε φυσικά προϊόντα των οποίων η δομή δεν έχει υποστεί κάποια τροποποίηση (N), στα φάρμακα βοτανικής προέλευσης που συνήθως συνίστανται από εκχυλίσματα φυτών (NB), στα μικρά μόρια που προέρχονται από φυσικά προϊόντα όμως η δομή τους έχει υποστεί τροποποίηση (ND), στα φάρμακα που

έχουν προκύψει από χημική σύνθεση (S) και στα φάρμακα που έχουν προκύψει συνθετικά όμως φέρουν φαρμακοφόρο δομή προερχόμενη από κάποιο φυσικό προϊόν (S*). Στις δύο τελευταίες κατηγορίες διακρίνουν και τα μόρια που μιμούνται κάποιο φυσικό προϊόν (NM). Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 1.3**, το 33% των εγκεκριμένων μικρών μορίων προέρχεται από φυσικά προϊόντα αυτούσια ή με κάποια τροποποίηση, ενώ ένα επιπλέον ποσοστό 18 % περιλαμβάνει κάποιο φαρμακοφόρο που προέρχεται από φυσικό προϊόν.

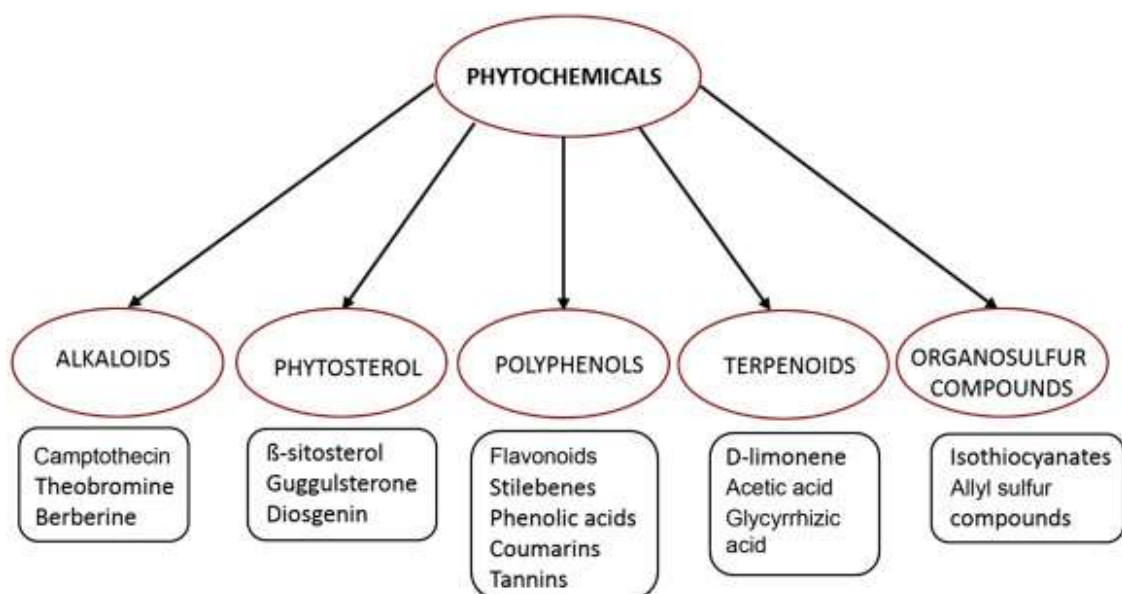


Εικόνα 1.3. Μικρά μόρια που έχουν εγκριθεί ως φάρμακα από το 1981 έως το 2014; n=1211[22].

1.4 Κατηγοριοποίηση φυτοχημικών ενώσεων

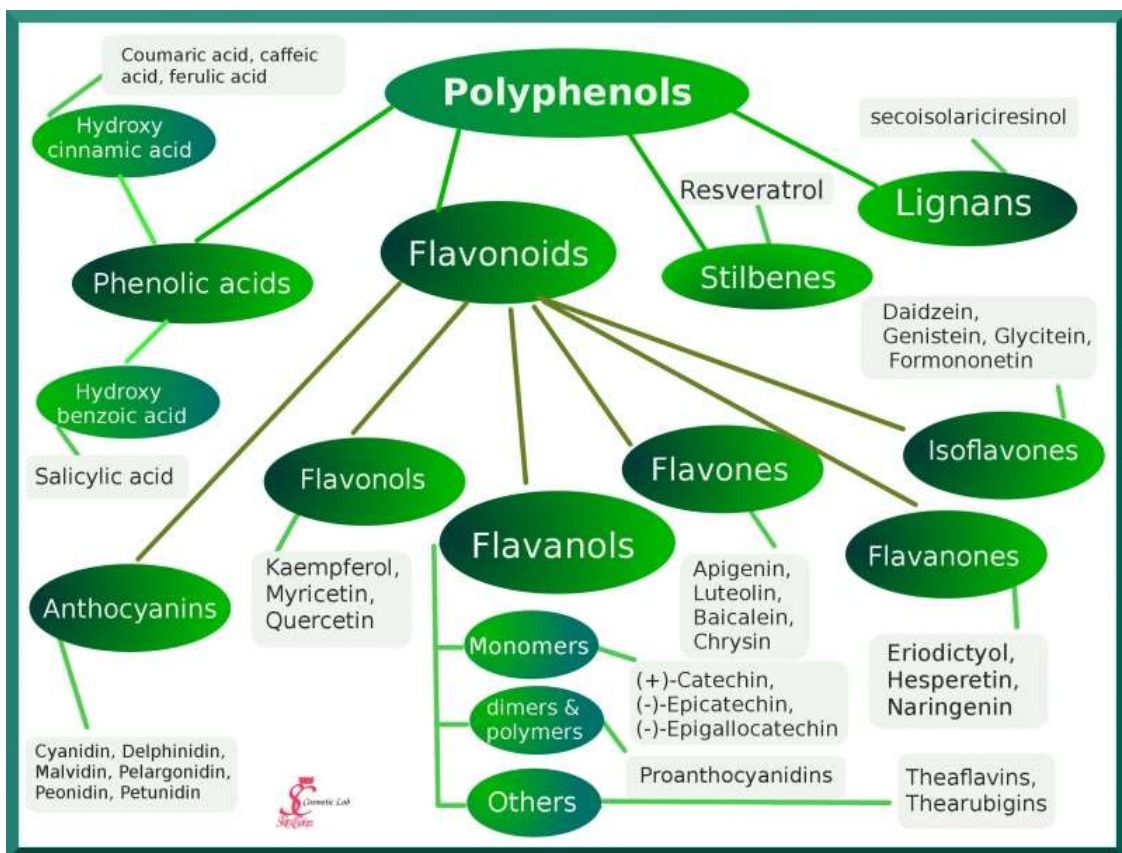
Οι φυτοχημικές ενώσεις αποτελούν δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών συμβάλλοντας στις λειτουργίες της ανάπτυξης και της αναπαραγωγής, στην άμυνα ενάντια σε παθογόνα καθώς και στο χρώμα και την οσμή των φυτικών οργανισμών. Οι βασικές κατηγορίες ταξινόμησης τους όπως φαίνεται στο **Σχήμα 1.1** είναι τα αλκαλοειδή,

οι φυτοστερόλες, οι πολυφαινόλες, τα τερπενοειδή και οι θειούχες οργανικές ενώσεις. Τα αλκαλοειδή περιέχουν ένα τουλάχιστον άτομο αζώτου ενώ μέχρι στιγμής έχουν αναγνωριστεί περίπου 3000 μόρια σε 4000 φυτικά είδη[23]. Ευρέως διαδεδομένα αλκαλοειδή που χρησιμοποιούνται ως φάρμακα είναι η μορφίνη, η κωδεΐνη και η κολχικίνη. Οι φυτοστερόλες, που διαθέτουν παρόμοια δομή με τη χοληστερόλη, είναι σημαντικά δομικά στοιχεία των φυτικών κυττάρων καθώς προσδίδουν σταθερότητα στις μεμβράνες τους. Με περισσότερο γνωστές τις σιτοστερόλη και καμπεστερόλη προσλαμβάνονται μέσω της διατροφής και φαίνεται να μειώνουν τον κίνδυνο καρδιαγγειακών νοσημάτων. Τα τερπενοειδή αποτελούνται από μονάδες 5 ανθράκων (ισοπρενίου) ενώ έχουν ανακαλυφθεί μέχρι στιγμής περίπου 55,000 μόρια[24] κάποια από τα οποία είναι η μενθόλη, το πινένιο και η καμφορά. Οι θειούχες οργανικές ενώσεις, περιέχουν άτομα θείου και έχουν χημειοπροστατευτικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες[25]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα της ομάδας είναι η αλλισίνη που απαντάται στα φυτά του γένους *Allium* προσδίδοντας τους τη χαρακτηριστική τους οσμή.



Σχήμα 1.1. Κύριες κατηγορίες φυτοχημικών ενώσεων[26].

Τέλος, οι πολυφαινόλες συνιστούν άλλη μια κατηγορία που αποτελείται από μεγάλο πλήθος αναγνωρισμένων μορίων – περίπου 20,000- με χαρακτηριστικό γνώρισμα τους τις φαινολικές ομάδες. Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 1.2** οι πολυφαινόλες διακρίνονται στα στυλβένια, τις λιγνάνες, τα φαινολικά οξέα και τα φλαβονοειδή. Στις δύο τελευταίες κατηγορίες ανήκουν τα ροσμαρινικό και καφεϊκό οξύ (φαινολικά οξέα) και η κερσετίνη (φλαβονοειδές) τα οποία θα μας απασχολήσουν στα επόμενα κεφάλαια.



Σχήμα 1.2. Κύριες κατηγορίες πολυφαινολών και χαρακτηριστικά μόρια που ανήκουν στην καθεμία[27].

Τα φλαβονοειδή διακρίνονται περαιτέρω σε έξι κατηγορίες: ανθοκυανίνες, φλαβανόλες, φλαβονόλες, φλαβόνες, φλαβανόνες και ισοφλαβόνες. Ίσως τα

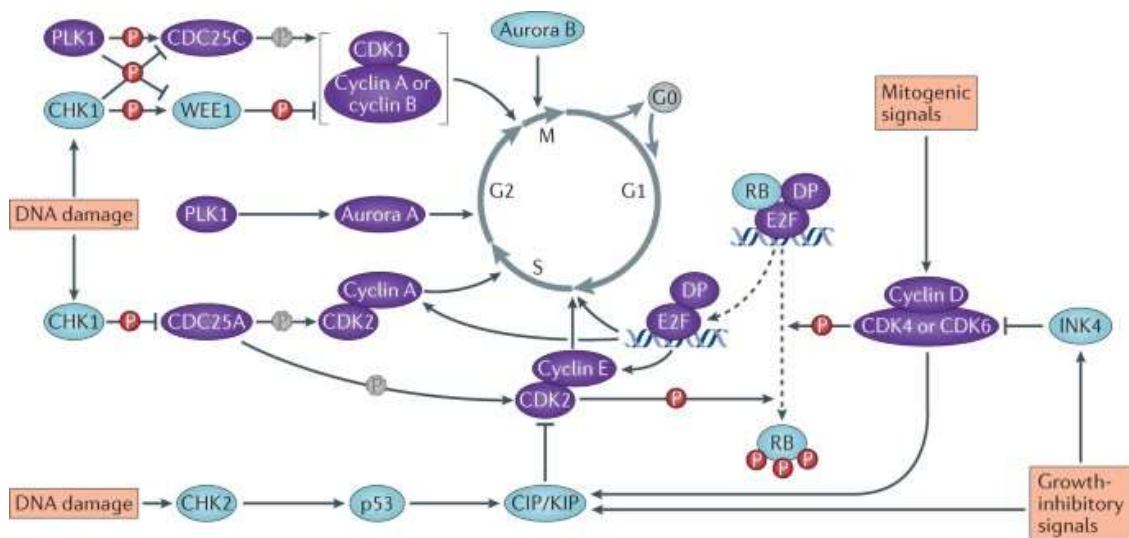
φλαβονοειδή να είναι η περισσότερο μελετημένη κατηγορία πολυφαινολών όσον αφορά στη βιοδραστητικότητα τους. Στην βιβλιογραφία εμφανίζεται πληθώρα εργασιών για τις αντιμικροβιακές, αντιφλεγμονώδεις, καρδιοπροστατευτικές, αντιοξειδωτικές και χημειοπροστατευτικές ιδιότητες τους[28-32].

1.5 Μηχανισμοί της χημειοπροστατευτικής και αντικαρκινικής δράσης των φυτοχημικών ενώσεων

Η χημειοπροστατευτική και αντικαρκινική δράση των φυτοχημικών προϊόντων εκφράζεται μέσω της αντιοξειδωτικής και αντιαγγειογενετικής τους δράσης και της ικανότητας τους να παρεμβαίνουν στις βασικές κυτταρικές λειτουργίες.

Οι ελεύθερες ρίζες παράγονται φυσιολογικά στα κύτταρα, όταν όμως η ισορροπία παραγωγής- εξουδετέρωσης τους απορρυθμίζεται, όπως στην περίπτωση του οξειδωτικού στρες, είναι επιβλαβείς καθώς μπορούν να «επιτεθούν» σε λιπίδια, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και DNA προκαλώντας καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης, τροποποιήσεις ή και μετουσιώσεις πρωτεϊνών και βλάβες στο DNA. Με αυτόν τον τρόπο, οι ελεύθερες ρίζες θεωρείται πως παίζουν σημαντικό ρόλο στη γήρανση, σε καρδιαγγειακά νοσήματα αλλά και στον καρκίνο[33]. Στη βιβλιογραφία απαντάται πληθώρα εργασιών σχετικά με τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των φυτοχημικών ενώσεων καθώς αυτά μπορούν να λειτουργούν ως εκκαθαριστές ελευθέρων ριζών, να ενεργοποιούν αντιοξειδωτικά ένζυμα[34] ή να αναστέλλουν οξειδάσες όπως η κυκλοοξυγονάση, η λιπιδική οξυγονάση και η πρωτεϊνική κινάση C[34, 35], αλλά και να συμπλοκοποιούν ιόντα μεταλλικών στοιχείων[36].

Τα φυτοχημικά μόρια έχουν την ιδιότητα να επηρεάζουν σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες όπως τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση. Η ικανότητα στόχευσης πρωτεϊνών-ρυθμιστών και η επαγωγή της διακοπής του κυτταρικού κύκλου αναφέρεται για πολλά από αυτά, υποδεικνύοντας την αντιπολλαπλασιαστική τους ιδιότητα. Στο **Σχήμα 1.3** παρουσιάζονται οι βασικές πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο.



Nature Reviews | Cancer

Σχήμα 1.3. Κύριες πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο. Μιτογόνα σήματα ενεργοποιούν τη δημιουργία συμπλόκων μεταξύ κυκλινών (cyclins) και κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (Cyclin-dependent kinases, CDKs) τα οποία οδηγούν στο πέρασμα από την G1 στην S φάση προκαλώντας τη φωσφορυλίωση πρωτεϊνών συμπεριλαμβανόμενης της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (Rb) η οποία ενεργοποιεί μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένειας E2F. Τα σύμπλοκα κυκλινών και κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών ρυθμίζουν και τη μετάβαση από τη φάση S στην G2 και στη M μαζί με άλλες πρωτεΐνες όπως η PLK1 και οι Aurora A και B. Παράλληλα, αντιμιτογόνα σήματα ανταγωνίζονται τη πρόοδο του κύκλου επάγοντας αναστολείς των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών όπως οι πρωτεΐνες INK4 και CIP/KIP. Τέλος, ο εντοπισμός βλαβών στο DNA μπορεί να προκαλέσει διακοπή του κύκλου μέσω των κινασών CHK1 και CHK2 και της p53[37].

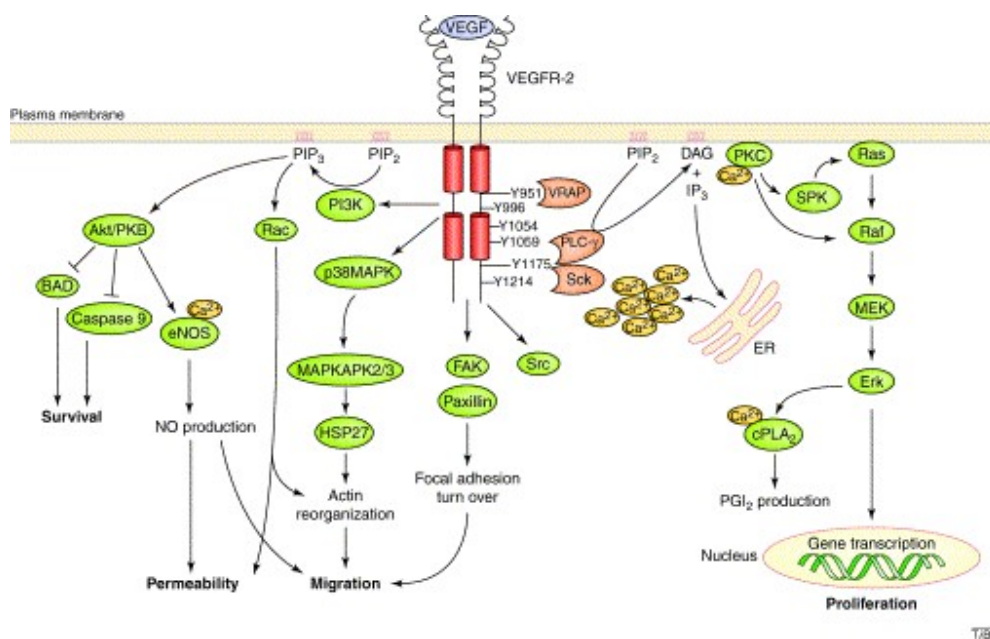
Οι κύριες κατηγορίες αυτών είναι κυκλίνες και οι κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες (Cyclin-dependent kinases, CDKs) και οι αναστολείς σημείου ελέγχου (ChkIs). Άλλες πρωτεΐνες με ρυθμιστικό ρόλο είναι οι Rb, Aurora A και B, E2F και p53. Οι φυτοχημικές

ενώσεις μπορεί να επάγουν την έκφραση των αναστολέων ή να μειώνουν την έκφραση των κινασών που ρυθμίζουν θετικά τον κυτταρικό κύκλο. Για παράδειγμα η κερσετίνη (ή κερκετίνη) μειώνει τα επίπεδα έκφρασης των CDK-2, -6, cyclin A, D, E καθώς και αυτά της φωσφορυλιωμένης Rb και αυξάνει τα επίπεδα των p21 και p27 (αναστολέων των CDKs) σε λευχαιμικά κύτταρα[38]. Μια άλλη κυτταρική λειτουργία στην οποία μπορούν να επεμβαίνουν πολλές φυτοχημικές ενώσεις είναι η απόπτωση – ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος- η οποία στα καρκινικά κύτταρα απορρυθμίζεται έτσι ώστε να υποστηρίζεται η επιβίωση τους. Δύο είναι τα βασικά μονοπάτια που ρυθμίζουν την απόπτωση. Το εξωτερικό μονοπάτι σηματοδοτείται με την πρόσδεση μορίων στους υποδοχείς θανάτου όπως οι TNFR1 και FasR οι οποίοι έπειτα οδηγούν στη διαδοχική ενεργοποίηση των κασπασών -8 και -3. Το εσωτερικό ή μιτοχονδριακό μονοπάτι διεγείρεται από ερεθίσματα που περιλαμβάνουν την ακτινοβολία, τις ελεύθερες ρίζες, την υποξία κ.α. Αυτά έχουν ως αποτέλεσμα την αλλαγή του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης και κατ' επέκταση την απελευθέρωση προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών (όπως οι Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, κυτόχρωμα C) που ενεργοποιούν την κασπάση -9 και τέλος την κασπάση -3. Στον ρόλο των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών αντιτίθενται οι αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες (Bcl-2, Mcl-1, Bcl-x, Bcl-XL κ.α), τα επίπεδα έκφρασης των οποίων είναι αυξημένα στα καρκινικά κύτταρα επάγοντας την επιβίωση τους. Με την ενεργοποίηση της κασπάσης -3 ξεκινούν οι διεργασίες για τον σχηματισμό των αποπτωτικών σωμάτων. Η ρύθμιση των υποδοχέων θανάτου, η ενεργοποίηση των κασπασών, η επαγωγή των προ-αποπτωτικών και η αναστολή των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών απαντώνται στις επιδράσεις των φυτοχημικών ενώσεων. Για παράδειγμα, η λουτεολίνη επάγει την έκφραση των υποδοχέων FasL και Trail[39] και η ναρινγενίνη αυξάνει τα επίπεδα των p53 και Bax και μειώνει τα επίπεδα της Bcl-2[40].

Τέλος, σημαντική είναι η επίδραση των φυτοχημικών ενώσεων και στην αγγειογένεση δηλαδή τη δημιουργία νέων αγγείων από ήδη προϋπάρχοντα. Η αγγειογένεση είναι μια φυσιολογική διαδικασία που συμβαίνει κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, κατά τη διάρκεια του γενετήσιου κύκλου αλλά και στη διαδικασία της επούλωσης μετά από ιστικό τραυματισμό. Όπως συμβαίνει με όλες τις βιολογικές

διαδικασίες, η απορρύθμιση της αγγειογένεσης οδηγεί στην πρόκληση ασθενειών όπως η ψωρίαση και η εκφύλιση της ωχράς κηλίδας. Όμως η διαδικασία της αγγειογένεσης απαντάται και στους καρκινικούς όγκους οι οποίοι στην προσπάθεια τους να αναπτυχθούν επιστρατεύουν γειτονικά αιμοφόρα αγγεία επάγοντας την ανάπτυξη και ωρίμανση τους. Επιπλέον, τα καρκινικά κύτταρα των όγκων μπορούν να χρησιμοποιήσουν τα νέα αυτά αγγεία ώστε να μεταναστεύσουν σε άλλους ιστούς. Πληθώρα αυξητικών παραγόντων και πρωτεϊνών συμμετέχουν στη ρύθμιση της νεοπλασματικής αγγειογένεσης με τις προκύπτουσες μεταλλάξεις σε ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια να επάγουν τις αγγειογενετικές και να καταστέλλουν τις αντι-αγγειογενετικές πρωτεΐνες. Η παρούσα διατριβή εστιάζει στη δράση του ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα VEGFA/VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor A) ο οποίος έχει την ικανότητα να προάγει τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων αλλά και την αγγειακή διαπερατότητα μέσω της πρόσδεσης του στον υποδοχέα VEGFR-2 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2). Ο ρόλος του VEGFA και του υποδοχέα του, VEGFR-2, είναι καταλυτικός στην αγγειογένεση[41]. Είναι χαρακτηριστικό πως έμβρυα ποντικών VEGFR-2^{-/-} πεθαίνουν κατά την 8.5-9.5 ημέρα τους λόγω ανεπαρκούς ανάπτυξης των αγγείων τους[42]. Η πρόσδεση του VEGFA στον VEGFR-2 επάγει την αυτοφωσφορυλίωση του σε αμινοξέα τυροσίνης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση καθοδικών σηματοδοτικών μονοπατιών όπως φαίνεται στο **Σχήμα 1.4**. Η φωσφορυλίωση της Tyr1175 οδηγεί στην πρόσδεση της PLC-γ με αποτέλεσμα την επαγωγή του πολλαπλασιασμού μέσω της ενεργοποίηση των MAPKs κινασών και των ERK1/2[43]. Η πρόσδεση της Shb επίσης στο τυροσινικό κατάλοιπο Tyr1175 ενεργοποιεί την PI3K και ακολούθως την Akt η οποία ρυθμίζει την επιβίωση αλλά και την αγγειακή διαπερατότητα[44, 45]. Τέλος, η μετανάστευση ρυθμίζεται από περισσότερα μονοπάτια εκ των οποίων τρία βασικά είναι 1) αυτό της VRAP η οποία ενεργοποιείται μέσω της φωσφορυλίωσης της Tyr951[46], 2) της p38 κινάσης μέσω της φωσφορυλίωσης της Tyr1212 η οποία οδηγεί στην αναδιαμόρφωση της ακτίνης [47] και 3) της ενεργοποίησης της FAK και της παξιλλίνης που ρυθμίζουν τις εστιακές προσφύσεις[47]. Εγκεκριμένα φάρμακα που χρησιμοποιούνται ευρέως για την αναστολή της αγγειογένεσης είναι

αντισώματα όπως η μπεβασιζουμάμπη και η ραμουσιρουμάμπη που στοχεύουν τους VEGFA και VEGFR-2, αντίστοιχα, αναστολείς τυροσινικών κινασών όπως η σουνιτινίμπη, η σοραφενίμπη και η ρεγοραφενίμπη που στοχεύουν τους υποδοχείς VEGFR και άλλα μικρά μόρια όπως το εβερόλιμους που στοχεύει το πρωτεϊνικό σύμπλεγμα mTORC1. Από την ομάδα των φυτοχημικών ενώσεων πολλές παρουσιάζουν αντιαγγειογενετικές



Σχήμα 1.4. Η σηματοδότηση του υποδοχέα VEGFR-2. Η εικόνα προέρχεται από το άρθρο των Cross et al.[48].

δυνατότητες. Για παράδειγμα η απιγενίνη και η ρεσβερατρόλη αναστέλλουν την έκφραση των HIF-1 και VEGFA[49-52]. Βέβαια αυτό που παρατηρείται είναι πως οι συγκεκριμένες ενώσεις συνήθως διαθέτουν περισσότερους του ενός πρωτεϊνικούς στόχους[53].

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω, οι φυτοχημικές ενώσεις έχουν τη δυνατότητα στόχευσης πολλών και κρίσιμων μορίων για την ανάπτυξη, επιβίωση και μετάσταση των καρκινικών κυττάρων. Έτσι, δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός πως αυτές οι ενώσεις αποτέλεσαν τη βάση για τη δημιουργία χημειοθεραπευτικών και στοχευτικών

φαρμάκων. Τα πρώτα φυσικά προϊόντα, απομονωμένα από το φυτό *Catharanthus roseus* που χρησιμοποιήθηκαν κλινικά ως αντικαρκινικά φάρμακα ήταν τα αλκαλοειδή βινμπλαστίνη και η βινκριστίνη[54]. Στη συνέχεια ακολούθησαν και άλλα συμπεριλαμβανομένων της πακλιταξέλης που απομονώθηκε από το δέντρο *Taxus brevifolia* και μαζί με το ημι-συνθετικό της ανάλογο δοσεταξέλη παρουσιάζουν αντιμιτογόνα δράση στοχεύοντας τον κυτταροσκελετό, της καμπτοθεκίνης που προέρχεται από το φυτό *Camptotheca acuminata* και μαζί με το ανάλογο μόριο της την ιρινοτεκάνη αναστέλλουν τη δράση της Τοποϊσομεράσης Ι και της ετοποσίδης που είναι ανάλογο μόριο της ποδοφυλλοτοξίνης του φυτού *Podophyllum peltatum* και αναστέλλει επίσης τη δράση της Τοποϊσομεράσης Ι.

1.6 Ανάπτυξη βάσης δεδομένων για την αντικαρκινική δράση φυτοχημικών ενώσεων και τις φαρμακοκινητικές τους ιδιότητες

Όπως προαναφέρθηκε, στη βιβλιογραφία υπάρχει πληθώρα άρθρων που μελετούν τη βιοδραστικότητα των φυτοχημικών ενώσεων τόσο σε *in vitro* όσο και σε *in vivo* καρκινικά μοντέλα. Απομονώνοντας αρχικά τις ουσίες από φυτικά εκχυλίσματα μελετούν την επίδραση τους στη βιωσιμότητα ποικίλων καρκινικών κυτταρικών σειρών έτσι ώστε να ανιχνεύσουν ενώσεις με ισχυρή βιοδραστικότητα. Μεγάλο μέρος της βιβλιογραφίας παρουσιάζει και μια περισσότερο ενδελεχή μελέτη των ενώσεων με αποτέλεσμα τη συγκέντρωση πληροφορίας σχετικά με τους μοριακούς στόχους αλλά και τους μηχανισμούς δράσης τους. Η έκφραση πρωτεϊνών, που διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των κυττάρων, μελετάται ως προς τη διαφοροποίηση της μετά από την επώαση των κυττάρων με τις φυτοχημικές ενώσεις ενώ σε αρκετές περιπτώσεις ανακαλύπτονται οι άμεσοι πρωτεϊνικοί στόχοι των ενώσεων αυτών. Η μελέτη της δράσης τους δεν περιορίζεται μόνο σε *in vitro* δοκιμές αλλά και σε *in vivo*, όπου εξετάζεται πλέον η δράση των μορίων σε καρκινικούς όγκους. Αξίζει να σημειωθεί πως στη συντριπτική τους πλειοψηφία οι

δοκιμές αυτές αφορούν μοντέλα ξενομεταμόσχευσης (xenograft) σε ποντίκια. Στο πλαίσιο της αντικαρκινικής δράσης επίσης παρουσιάζονται στοιχεία και για την ανασταλτική δράση των φυτοχημικών μορίων στην αγγειογένεση. Ένα κρίσιμο ερώτημα για τις φυτοχημικές ενώσεις είναι η συμπεριφορά τους εντός του οργανισμού από την πλευρά της φαρμακοκινητικής η οποία είναι καθοριστική για το πόση τελικά ποσότητα από την αρχική της χορηγούμενης δόσης καταλήγει στο πλάσμα και κατ' επέκταση στους ιστούς. Στη βιβλιογραφία παρατηρείται μια έκρηξη παραγωγής γνώσης ιδιαίτερα την τελευταία δεκαετία που αφορά στη μελέτη των φαρμακοκινητικών παραμέτρων πληθώρας φυτοχημικών ενώσεων. Η συγκέντρωση πληροφοριών για τους δύο παραπάνω άξονες, (1) την αντικαρκινική δράση που μελετάται σε μοριακό και κυτταρικό επίπεδο αλλά και σε επίπεδο όγκου, όπου τελικά φαίνεται η αποτελεσματικότητα του μορίου και (2) το φαρμακοκινητικό προφίλ που καθορίζει τη πορεία του μορίου σε έναν οργανισμό συμπληρώνουν το βασικό χαρακτηρισμό μιας ένωσης. Αυτές οι πληροφορίες μπορούν να αναδείξουν τα πλεονεκτήματα των φυτοχημικών ενώσεων και να οδηγήσουν σε συμπεράσματα για την κατάλληλη εφαρμογή τους αλλά και τις αδυναμίες τους (π.χ. χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα) θέτοντας ερωτήματα για το πως μπορούν αυτές να υπερκεραστούν. Συνεπώς, η συγκέντρωση των παραπάνω δεδομένων και η παρουσίαση τους με τρόπο ώστε να είναι εύκολα προσβάσιμα θα μπορούσε να συμβάλλει και να διευκολύνει την επεξεργασία τους.

Σε αυτό το πλαίσιο, δημιουργήθηκε η βάση δεδομένων HEAL (pHarmacokinetic and Anticancer properties of pLant-derived compounds) που περιέχει πληροφορίες για την αντικαρκινική δράση και το φαρμακοκινητικό προφίλ φυτοχημικών ενώσεων που προέρχονται από τέσσερις μεγάλες κατηγορίες αυτές των φλαβονοειδών, των τερπενοειδών, των αλκαλοειδών και των φαινολικών οξέων (<http://83.212.77.78:8038/HEAL/>). Οι ενώσεις της κάθε κατηγορίας εντοπίστηκαν τόσο από τη βιβλιογραφία όσο και από τη βάση δεδομένων NPACT[55]. Αρχικά, με την αναζήτηση ενός μορίου ο χρήστης έχει πρόσβαση σε γενικές πληροφορίες οι οποίες το χαρακτηρίζουν. Αυτές είναι η δομή του, η τάξη στην οποία ανήκει, οι κωδικοί αναγνώρισης (SMILES, ZINC ID, ChEMBLE ID), τα φυτικά είδη στα οποία απαντάται και

συνώνυμες και εμπορικές ονομασίες. Ο κωδικός SMILES (Simplified Molecular-Input Line-Entry System, σύστημα απλοποιημένης μοριακής γραμμικής γραφής) περιγράφει τη δομή της ένωσης με μορφή γραμμικής σημειογραφίας και όταν εισάγεται σε ειδικά εργαλεία χημειοπληροφορικής μπορεί απευθείας να δώσει την πληροφορία για τον σχεδιασμό της διδιάστατης και τριδιάστατης απεικόνισης της ένωσης. Η αναζήτηση μιας φυτοχημικής ένωσης στη βάση HEAL μπορεί να γίνει και μέσω του κωδικού SMILES. Ο κωδικός ZINC ID διατίθεται έτσι ώστε τα φυτοχημικά μόρια που παρουσιάζονται στη βάση HEAL να συνδέονται με τα δεδομένα της δημοσίως διαθέσιμης βάσης δεδομένων ZINC15[56] η οποία παρουσιάζει μεγάλο πλήθος χημικών μορίων, τα φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά, την εμπορική τους διαθεσιμότητα και άλλα εργαλεία για μελέτες μοριακής πρόσδεσης και πρόβλεψης της βιολογικής τους δραστηριότητας. Η προσθήκη του κωδικού ChEMBL ID αποσκοπεί στη σύνδεση των φυτοχημικών μορίων με τα δεδομένα που προσφέρει η βάση δεδομένων ChEMBL[57], η οποία παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη βιοδραστηριότητα και τη φαρμακοκινητική μικρών μορίων και φαρμάκων καθώς και εργαλεία χημειοπληροφορικής για την πρόβλεψη της δράσης και των στόχων τους.

Η επόμενη ομάδα πληροφοριών στις οποίες έχει πρόσβαση ο χρήστης είναι αυτές που αφορούν στην αντικαρκινική δράση ενός μορίου. Για να συλλεχθούν, πραγματοποιήθηκε αναζήτηση στο PubMed με τις λέξεις κλειδιά [Όνομα Ένωσης AND cancer] και κάθε άρθρο που προέκυψε από τα αποτελέσματα της αναζήτησης μελετήθηκε ώστε να εκμαιευτεί η ζητούμενη πληροφορία. Άρθρα που παρουσίαζαν τη συνεργιστική δράση των φυτοχημικών ενώσεων με άλλα μόρια ή τη δράση μορφοποιήσεων ή και ανάλογων μορίων των φυτοχημικών ενώσεων, απορρίφθηκαν. Οι πληροφορίες που συγκεντρώθηκαν και παρουσιάζονται είναι η κυτταρική σειρά στην οποία μελετάται η φυτοχημική ένωση, η τιμή IC₅₀, οι πρωτεΐνες των οποίων τα επίπεδα έκφρασης αυξάνονται ή μειώνονται και οι πρωτεΐνες που στοχεύει άμεσα, ο μηχανισμός δράσης, η δοκιμή της αποτελεσματικότητας τους *in vivo* και η εμπλοκή του σε μηχανισμούς της αγγειογένεσης. Δίπλα από κάθε πληροφορία υπάρχουν οι κωδικοί PMID και DOI που αντιστοιχούν στο άρθρο από το οποίο πάρθηκε η πληροφορία.

Η τρίτη ομάδα πληροφοριών αφορά στις φαρμακοκινητικές παραμέτρους της κάθε ένωσης οι οποίες αναζητήθηκαν στο PubMed με τις λέξεις κλειδιά [Όνομα Ένωσης AND pharmacokinetics]. Πιο αναλυτικά, συλλέχθηκαν δεδομένα σχετικά με το είδος του οργανισμού και της χορήγησης, την ποσότητα της δόσης, τις παραμέτρους C_{max} , $AUC_{0 \rightarrow t}$, $AUC_{0 \rightarrow \infty}$, T_{max} , $T_{1/2}$ και F , καθώς και το είδος της τεχνικής που χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση της ένωσης και το κατώτατο όριο ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ, Limit of Quantitation). Οι παράμετροι που αναφέρονται σε αριθμητικές τιμές μετατράπηκαν στην ίδια μονάδα μέτρησης έτσι ώστε τα μεγέθη τους να είναι απευθείας συγκρίσιμα από τον χρήστη. Άρθρα που παρουσίαζαν την ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών των φυτοχημικών ενώσεων ή την ποσοτικοποίηση των φυτοχημικών ενώσεων εγκλεισμένων σε φορείς απορρίφθηκαν. Κάθε πληροφορία συνοδεύεται και εδώ με τους κωδικούς PMID και DOI του αντίστοιχου άρθρου.

Η βάση δεδομένων HEAL είναι ένα εύκολα προσβάσιμο και φιλικό εργαλείο στον χρήστη το οποίο παραθέτει τις βασικές πληροφορίες ως προς την αντικαρκινική δράση και το φαρμακοκινητικό προφίλ εκατοντάδων φυτοχημικών ενώσεων και μπορεί να αξιοποιηθεί στη μελέτη των φυσικών προϊόντων ως πηγή ανάπτυξης νέων φαρμάκων.

1.7 Προβλήματα στην ανάπτυξη φαρμάκων προερχόμενων από φυτοχημικές ενώσεις και τρόποι αντιμετώπισης τους

Παρά τις επιτυχίες που έχουν σημειωθεί στην ανακάλυψη νέων θεραπευτικών μορίων από φυσικά προϊόντα, τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μείωση του ενδιαφέροντος της φαρμακοβιομηχανίας για αυτά, με την εξάπλωση του φαινομένου να είναι πιο έντονη στις ΗΠΑ[19, 58]. Και εν μέρει αυτό δικαιολογείται από τις ακόλουθες συνθήκες.

Αρχικά, η απομόνωση των φυσικών προϊόντων από την πηγή της προέλευσης τους είναι δύσκολη και χρονοβόρα διαδικασία. Στις διαδικασίες ταχείας διαλογής υψηλής απόδοσης (High-throughput screening, HTS) συνήθως ελέγχονται αρχικά ολόκληρα

εκχυλίσματα και εφόσον κάποιο από αυτά παρουσιάσει δραστικότητα, απαιτούνται σταδιακές κλασματώσεις συνοδευόμενες από συνεχή βιολογική αξιολόγηση έτσι ώστε να βρεθεί η αρχική βιοδραστική δομή (hit). Επιπρόσθετα, μπορεί σε κάποιο εκχύλισμα να εμπεριέχεται μια ένωση με ισχυρή βιοδραστικότητα αλλά η συγκέντρωσή της να είναι μικρή με αποτέλεσμα να «χαθεί» στη διαλογή. Θα πρέπει δηλαδή να τίθενται υπόψιν και οι περιβαλλοντικές συνθήκες ανάπτυξης των πηγών προέλευσης, οι οποίες μπορεί να καθορίζουν σημαντικά την παραγωγή και τη σύσταση των δευτερογενών μεταβολιτών. Η μικρή περιεκτικότητα ενός δευτερογενούς μεταβολίτη μπορεί να αποτελεί τροχοπέδη και για τα επόμενα στάδια της ανάπτυξης του ως φάρμακο, καθώς χρειάζονται μεγάλες ποσότητες για τις κλινικές μελέτες. Το πρόβλημα αυτό αποτυπώνεται χαρακτηριστικά στην περίπτωση της ταξόλης, για την κλινική αξιολόγηση της οποίας χρειάστηκε να κοπούν 4,000 δέντρα του είδους *Taxus brevifolia* έτσι ώστε να παραχθούν 360 g του φαρμάκου[59]. Ωστόσο, μια λύση μπορεί να δοθεί από την εργαστηριακή σύνθεση των φυσικών προϊόντων η οποία βέβαια δεν είναι σε όλες τις περιπτώσεις εύκολη καθώς πολλές φυσικές ενώσεις παρουσιάζουν πολύπλοκες δομές[11]. Η χρονοβόρα παραγωγή τους καθώς και η δυσκολία κατοχύρωσης διπλώματος ευρεσιτεχνίας σε φάρμακα των οποίων η δραστική ένωση είναι φυσικό προϊόν αποτελούν σημαντικές αιτίες της μείωσης του ενδιαφέροντος των φαρμακευτικών εταιρειών[19].

Μπορεί τα φυσικά προϊόντα να παρουσιάζουν υψηλή βιοδραστικότητα καθώς εξελίχθηκαν ώστε να αλληλεπιδρούν με βιομόρια, ωστόσο αυτές οι εξελικτικές διεργασίες δεν σχετίζονται με τη χρήση τους στον ανθρώπινο οργανισμό και γι' αυτό οι φυσικοχημικές και φαρμακολογικές τους ιδιότητες επιδέχονται βελτιώσεων. Ένα μεγάλο πρόβλημα είναι η χαμηλή τους βιοδιαθεσιμότητα[60, 61], η οποία μπορεί να οφείλεται στη μειωμένη απορρόφηση τους από τον εντερικό αυλό και στον εκτεταμένο ενζυμικό μεταβολισμό τους. Μεμονωμένες λύσεις σε αυτά τα προβλήματα μπορούν να δοθούν με τη χημική ή ενζυμική τροποποίηση της δομής τους ή και τον εγκλεισμό ή τη συμπλοκοποίηση με φορείς όπως νανοσωματίδια, λιποσώματα, κυκλοδεξτρίνες, πολυμερή κ.α.

Η πιθανότητα να βρεθεί ένα φυτοχημικό προϊόν που να μπορεί να χρησιμοποιηθεί αυτούσιο στη θεραπεία μιας νόσου είναι μάλλον μικρή, όμως οι ενώσεις αυτές θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν ως μόρια-οδηγοί ώστε να παραχθούν νέα μόρια με βελτιωμένες φαρμακολογικές και βιοδραστικές ιδιότητες. Μια μέθοδος παραγωγής νέων μορίων βασισμένων δομικά σε φυσικά προϊόντα είναι η τροποποίηση τους μέσω χημικών και ενζυμικών μεθόδων. Βέβαια, οι παρεμβάσεις σε αυτού του είδους τις τροποποιήσεις είναι περιορισμένες λόγω των ήδη υπάρχουσών λειτουργικών ομάδων των ενώσεων και των δυνατοτήτων αντιδράσεων που μπορούν να εφαρμοστούν σε αυτά. Μια άλλη μέθοδος, είναι η σύνθεση νέων μορίων βασισμένων δομικά σε φυσικά προϊόντα μέσω συνδυαστικών βιβλιοθηκών. Η συνδυαστική χημεία (combinatorial chemistry) αποτελείται από μια ομάδα τεχνικών που στοχεύουν στην παράλληλη σύνθεση μεγάλων χημικών βιβλιοθηκών, χρησιμοποιώντας ως ικριώματα και φυσικά προϊόντα, έτσι ώστε μετέπειτα να αξιολογηθούν με ταχεία διαλογή υψηλής απόδοσης ως προς διάφορους βιολογικούς στόχους. Είναι ένα καλό εργαλείο τόσο για τη βελτιστοποίηση των βιολογικών αλλά και των φαρμακολογικών ιδιοτήτων τους. Ωστόσο, ο αρχικός ενθουσιασμός που προέκυψε με την εισαγωγή των συνδυαστικών βιβλιοθηκών, καθώς αναμενόταν πως θα ανακαλυφθούν πολλά νέα μόρια-οδηγοί, δεν αντικατοπτρίζεται στον αριθμό των νέων χημικών οντοτήτων (NCEs) με πολλές από αυτές τις βιβλιοθήκες να περιέχουν μόρια ανεπαρκώς σχεδιασμένα, με μη-πρακτικά μεγάλα μεγέθη και απλουστευμένες δομές[54]. Είναι χαρακτηριστικό πως δύο μόνο φάρμακα, η σοραφενίμπη και η βεμουραφενίμπη, έχουν προκύψει *de novo* μέσω της συνδυαστικής χημείας[22].

Αδιαμφισβήτητα, οι φυτοχημικές ενώσεις αποτελούν μια αστείρευτη πηγή μορίων από τα οποία θα μπορούσαν να αναπτυχθούν νέα φάρμακα. Μέχρι στιγμής αρκετά τέτοια μόρια, όπως η πακλιταξέλη, έχουν εγκριθεί για τη θεραπευτική τους χρήση ενώ άλλα βρίσκονται σε κλινικές μελέτες[62]. Η τροποποίηση τους, η χρήση τους ως ικριώματα για τη σύνθεση νέων μορίων αλλά και η βαθύτερη γνώση των ρόλων που διαδραματίζουν φυσιολογικά στους οργανισμούς όπου παράγονται θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην καλύτερη αξιοποίηση τους.

Η παρούσα διατριβή εστιάζει σε μεθόδους που μπορούν να βελτιώσουν τη διαδικασία ανάπτυξης φαρμάκων από φυτοχημικές ενώσεις, θέτοντας και επιλύοντας συγκεκριμένα ζητήματα μέσω των οποίων προτείνονται λύσεις για τα παραπάνω προαναφερθέντα προβλήματα. Αρχικά, παρουσιάζεται μεθοδολογία, αποτελούμενη από μια σειρά βιοφυσικών μεθόδων, που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον χαρακτηρισμό των αλληλεπιδράσεων των φυτικών δευτερογενών μεταβολιτών με πρωτεΐνες-στόχους. Συγκεκριμένα, μελετάται η αλληλεπίδραση τριών μεταβολιτών, του ροσμαρινικού, του καφεϊκού και του σαλβιανικού οξέος – τα δύο τελευταία αποτελούν δομικές υπομονάδες του πρώτου-με την πρωτεΐνη αλβουμίνη, μέσω των μεθόδων της φθορισμομετρίας, των NMR και ITC καθώς και της υπολογιστικής τεχνικής της Μοριακής Πρόσδεσης (Molecular Docking). Μέσω της επιστράτευσης αυτών των τεχνικών μπορεί να παραχθεί συνδυαστική πληροφορία τόσο για τον τρόπο αλληλεπίδρασης – σε δομικό και θερμοδυναμικό επίπεδο- των μεταβολιτών με πρωτεΐνες-στόχους όσο και για τη δυνατότητα αλληλεπίδρασης τους. Οι πληροφορίες αυτές θα μπορούσαν να βοηθήσουν και να επιταχύνουν την επιλογή οδηγών-δομών και ενώσεων-οδηγών αλλά και να δώσουν στοιχεία για το πως μπορούν να τροποποιηθούν δομικά οι εν λόγω ενώσεις ώστε να βελτιστοποιηθεί η δραστηριότητα τους. Ένα από τα μειονεκτήματα των φυτικών μεταβολιτών που προαναφέρθηκαν και εμποδίζουν τη χρήση τους ως φάρμακα είναι η έλλειψη «συμβατότητας» τους με τον ανθρώπινο οργανισμό που αντικατοπτρίζεται στη χαμηλή τους βιοδιαθεσιμότητα. Στην παρούσα διατριβή προτείνονται δύο λύσεις σε αυτό το πρόβλημα μέσω της συμπλοκοποίησης τους σε φορείς κυκλοδεξτρινών και μέσω της χημικής τους τροποποίησης. Αναλυτικά, εξετάζεται η δυνατότητα και ο τρόπος συμπλοκοποίησης του ροσμαρινικού και του καφεϊκού οξέος με την 2-ύδροξυ-πρόπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη μέσω τεχνικών NMR, ITC και φασματομετρίας μαζών. Οι εν λόγω φορείς μπορούν να αυξήσουν την υδατοδιαλυτότητα των μορίων και ταυτόχρονα να τα προστατέψουν από μεταβολικά ένζυμα, αυξάνοντας έτσι τη βιοδιαθεσιμότητα τους. Ο δεύτερος τρόπος της χημικής τροποποίησης μελετάται μέσω της εστεροποίησης και της αμιδίωσης του ροσμαρινικού οξέος με στόχο την κάλυψη του αρνητικού του φορτίου και συνεπώς την αύξηση της κυτταρικής του πρόσληψης και της βιοδιαθεσιμότητας τους.

Τέλος, εξετάζεται το πως μπορεί να ενισχυθεί η ενδογενής δραστικότητα μιας φυτοχημικής ένωσης μέσω της χημικής της τροποποίησης. Αυτό παρουσιάζεται χρησιμοποιώντας την κερσετίνη και μελετάται το αν και με ποιον τρόπο η μεθυλίωση της μπορεί να αυξήσει την αντικαρκινική και την αντιαγγειογενετική της ιδιότητα.

Βιβλιογραφία

1. Organization, W.H. 2018; Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
2. Institute, N.C. 2020; Available from: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/statistics>.
3. Society, A.C., *Cancer Facts & Figures 2019*. 2019.
4. Ritchie, M.R.a.H., *Cancer*. Our World in Data, 2015.
5. *Recent and new targets for small molecule anti-cancer agents*. Drug Discov Today Technol, 2009. **6**(1-4): p. e1-e40.
6. Wouters, O.J., M. McKee, and J. Luyten, *Estimated Research and Development Investment Needed to Bring a New Medicine to Market, 2009-2018*. JAMA, 2020. **323**(9): p. 844-853.
7. Thomas, D.W., et al., *Clinical Development Success Rates 2006-2015*. 2016, BIO, BioMedTracker and Amplion.
8. Butler, M.S., A.A. Robertson, and M.A. Cooper, *Natural product and natural product derived drugs in clinical trials*. Nat Prod Rep, 2014. **31**(11): p. 1612-61.
9. de la Torre, B.G. and F. Albericio, *The Pharmaceutical Industry in 2019. An Analysis of FDA Drug Approvals from the Perspective of Molecules*. Molecules, 2020. **25**(3).
10. Hughes, J.P., et al., *Principles of early drug discovery*. Br J Pharmacol, 2011. **162**(6): p. 1239-49.
11. Beutler, J.A., *Natural Products as a Foundation for Drug Discovery*. Curr Protoc Pharmacol, 2009. **46**: p. 9 11 1-9 11 21.
12. P, R., *Information on the china alcaloide. VIII. Announcement: The constitution of cinchonines*. Ber. Deutsch. Chem.Ges, 1908(41): p. 62-70.
13. Willstätter R and M. W., *Ketones of the tropine group. XII. Constitution of ecgonine*. Ber.Deutsch.Chem.Ges., 1898(31): p. 2655–2669.
14. Fleming, A., *On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, with Special Reference to their Use in the Isolation of B. influenzae*. British journal of experimental pathology, 1929. **10**(3): p. 226-236.
15. Wani, M.C., et al., *Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from Taxus brevifolia*. J Am Chem Soc, 1971. **93**(9): p. 2325-7.

16. Wani, M.C. and M.E. Wall, *Plant antitumor agents. II. Structure of two new alkaloids from Camptotheca acuminata*. The Journal of Organic Chemistry, 1969. **34**(5): p. 1364-1367.
17. Wolff, M.E., *Principles of Medicinal Chemistry, 4th Edition Edited by William O. Foye, Thomas L. Lemke, and David A. Williams. Williams and Wilkins, Philadelphia, PA. 1995. xii + 995 pp. 22 × 28.5 cm. ISBN 0-683-03323-9. \$70.00*. Journal of Medicinal Chemistry, 1996. **39**(7): p. 1567-1568.
18. Mothes, K., *Die Alkaloide im Stoffwechsel der Pflanze*. Experientia, 1969. **25**(3): p. 225-239.
19. Harvey, A.L., *Natural products in drug discovery*. Drug Discov Today, 2008. **13**(19-20): p. 894-901.
20. Baker, D.D., et al., *The value of natural products to future pharmaceutical discovery*. Nat Prod Rep, 2007. **24**(6): p. 1225-44.
21. Harvey, A., *Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products*. Drug Discov Today, 2000. **5**(7): p. 294-300.
22. Newman, D.J. and G.M. Cragg, *Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014*. J Nat Prod, 2016. **79**(3): p. 629-61.
23. Kurek, J., *Introductory Chapter: Alkaloids - Their Importance in Nature and for Human Life, Alkaloids - Their Importance in Nature and Human Life*. IntechOpen, 2019.
24. Brahmkshatriya, P.P. and P.S. Brahmkshatriya, *Terpenes: Chemistry, Biological Role, and Therapeutic Applications*, in *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*, K.G. Ramawat and J.-M. Mérillon, Editors. 2013, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 2665-2691.
25. Miekus, N., et al., *Health Benefits of Plant-Derived Sulfur Compounds, Glucosinolates, and Organosulfur Compounds*. Molecules, 2020. **25**(17).
26. Bayir, A.G., H.S. Kiziltan, and A. Kocyigit, *Chapter 1 - Plant Family, Carvacrol, and Putative Protection in Gastric Cancer*, in *Dietary Interventions in Gastrointestinal Diseases*, R.R. Watson and V.R. Preedy, Editors. 2019, Academic Press. p. 3-18.
27. 2016; Available from: <https://skinchakra.eu/blog/archives/416-Plant-Extracts-101Part-V-Phytochemicals-in-cosmetics-Polyphenols.html>.
28. Arya, V.S., S.K. Kanthlal, and G. Linda, *The role of dietary polyphenols in inflammatory bowel disease: A possible clue on the molecular mechanisms involved in the prevention of immune and inflammatory reactions*. J Food Biochem, 2020. **44**(11): p. e13369.
29. Kanner, J., *Polyphenols by Generating H2O2, Affect Cell Redox Signaling, Inhibit PTPs and Activate Nrf2 Axis for Adaptation and Cell Surviving: In Vitro, In Vivo and Human Health*. Antioxidants (Basel), 2020. **9**(9).
30. Otreba, M., et al., *Cardioprotective Activity of Selected Polyphenols Based on Epithelial and Aortic Cell Lines. A Review*. Molecules, 2020. **25**(22).
31. Aguilar-Veloz, L.M., et al., *Application of essential oils and polyphenols as natural antimicrobial agents in postharvest treatments: Advances and challenges*. Food Sci Nutr, 2020. **8**(6): p. 2555-2568.

32. Abdal Dayem, A., et al., *The Anti-Cancer Effect of Polyphenols against Breast Cancer and Cancer Stem Cells: Molecular Mechanisms*. *Nutrients*, 2016. **8**(9).
33. Pietta, P.-G., *Flavonoids as Antioxidants*. *Journal of Natural Products*, 2000. **63**(7): p. 1035-1042.
34. Nijveldt, R.J., et al., *Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications*. *Am J Clin Nutr*, 2001. **74**(4): p. 418-25.
35. Heim, K.E., A.R. Tagliaferro, and D.J. Bobilya, *Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships*. *J Nutr Biochem*, 2002. **13**(10): p. 572-584.
36. Ferrali, M., et al., *Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity*. *FEBS Lett*, 1997. **416**(2): p. 123-9.
37. Otto, T. and P. Sicinski, *Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy*. *Nat Rev Cancer*, 2017. **17**(2): p. 93-115.
38. Maso, V., et al., *Multitarget effects of quercetin in leukemia*. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2014. **7**(12): p. 1240-50.
39. Kurata, A., et al., *[Acoustic neurinoma presenting with repeated intratumoral hemorrhage. Case report]*. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 1989. **29**(4): p. 328-32.
40. Bao, L., et al., *Naringenin inhibits proliferation, migration, and invasion as well as induces apoptosis of gastric cancer SGC7901 cell line by downregulation of AKT pathway*. *Tumour Biol*, 2016. **37**(8): p. 11365-74.
41. Ferrara, N., H.P. Gerber, and J. LeCouter, *The biology of VEGF and its receptors*. *Nat Med*, 2003. **9**(6): p. 669-76.
42. Shalaby, F., et al., *Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice*. *Nature*, 1995. **376**(6535): p. 62-6.
43. Takahashi, T., et al., *A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells*. *EMBO J*, 2001. **20**(11): p. 2768-78.
44. Dayanir, V., et al., *Identification of tyrosine residues in vascular endothelial growth factor receptor-2/FLK-1 involved in activation of phosphatidylinositol 3-kinase and cell proliferation*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(21): p. 17686-92.
45. Fujio, Y. and K. Walsh, *Akt mediates cytoprotection of endothelial cells by vascular endothelial growth factor in an anchorage-dependent manner*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(23): p. 16349-54.
46. Matsumoto, T., et al., *VEGF receptor-2 Y951 signaling and a role for the adapter molecule TSAd in tumor angiogenesis*. *EMBO J*, 2005. **24**(13): p. 2342-53.
47. Le Boeuf, F., et al., *Phosphorylation of focal adhesion kinase (FAK) on Ser732 is induced by rho-dependent kinase and is essential for proline-rich tyrosine kinase-2-mediated phosphorylation of FAK on Tyr407 in response to vascular endothelial growth factor*. *Mol Biol Cell*, 2006. **17**(8): p. 3508-20.
48. Cross, M.J., et al., *VEGF-receptor signal transduction*. *Trends Biochem Sci*, 2003. **28**(9): p. 488-94.
49. Igura, K., et al., *Resveratrol and quercetin inhibit angiogenesis in vitro*. *Cancer Lett*, 2001. **171**(1): p. 11-6.

50. Kanavi, M.R., et al., *The sustained delivery of resveratrol or a defined grape powder inhibits new blood vessel formation in a mouse model of choroidal neovascularization*. *Molecules*, 2014. **19**(11): p. 17578-603.
51. Mirzoeva, S., C.A. Franzen, and J.C. Pelling, *Apigenin inhibits TGF-beta-induced VEGF expression in human prostate carcinoma cells via a Smad2/3- and Src-dependent mechanism*. *Mol Carcinog*, 2014. **53**(8): p. 598-609.
52. Silvan, S. and S. Manoharan, *Apigenin prevents deregulation in the expression pattern of cell-proliferative, apoptotic, inflammatory and angiogenic markers during 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis*. *Arch Oral Biol*, 2013. **58**(1): p. 94-101.
53. Khalid, E.B., et al., *Natural products against cancer angiogenesis*. *Tumour Biol*, 2016. **37**(11): p. 14513-14536.
54. Cragg, G.M., P.G. Grothaus, and D.J. Newman, *Impact of natural products on developing new anti-cancer agents*. *Chem Rev*, 2009. **109**(7): p. 3012-43.
55. Mangal, M., et al., *NPACT: Naturally Occurring Plant-based Anti-cancer Compound-Activity-Target database*. *Nucleic Acids Res*, 2013. **41**(Database issue): p. D1124-9.
56. Sterling, T. and J.J. Irwin, *ZINC 15--Ligand Discovery for Everyone*. *J Chem Inf Model*, 2015. **55**(11): p. 2324-37.
57. Mendez, D., et al., *ChEMBL: towards direct deposition of bioassay data*. *Nucleic Acids Res*, 2019. **47**(D1): p. D930-D940.
58. Beutler, J.A., *Natural Products as a Foundation for Drug Discovery*. *Curr Protoc Pharmacol*, 2019. **86**(1): p. e67.
59. Mann, J., *Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future*. *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**(2): p. 143-8.
60. Zhang, M.Q. and B. Wilkinson, *Drug discovery beyond the 'rule-of-five'*. *Curr Opin Biotechnol*, 2007. **18**(6): p. 478-88.
61. Ganesan, A., *The impact of natural products upon modern drug discovery*. *Curr Opin Chem Biol*, 2008. **12**(3): p. 306-17.
62. Choudhari, A.S., et al., *Phytochemicals in Cancer Treatment: From Preclinical Studies to Clinical Practice*. *Frontiers in Pharmacology*, 2020. **10**(1614).

ΣΚΟΠΟΣ

Τα φυσικά προϊόντα και συγκεκριμένα οι φυτικοί δευτερογενείς μεταβολίτες αποτελούν μια ανεξάντλητη πηγή μορίων με τεράστια δομική ποικιλότητα. Εντός των φυτικών οργανισμών εξυπηρετούν λειτουργίες όπως η διακυτταρική επικοινωνία και η άμυνα κατά παθογόνων μικροοργανισμών και για το λόγο αυτό έχουν διαμορφωθεί εξελικτικά ώστε να αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες, να προσδένονται σε υποδοχείς και να διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες μέσω μεταφορέων. Αυτή η «συμβατότητα» τους με πρωτεϊνικούς στόχους τα καθιστά κατάλληλους υποψήφιους στον τομέα της ανάπτυξης αντικαρκινικών φαρμάκων. Μειονεκτήματα όπως η χρονοβόρα διαλογή και αξιολόγηση τους και η χαμηλή τους βιοδιαθεσιμότητα μείωσαν το ενδιαφέρον για τη θεραπευτική τους αξία. Ωστόσο, η τροποποίηση των φυσικών προϊόντων, η χρήση τους ως ικρίωματα για τη σύνθεση νέων μορίων αλλά και η βαθύτερη γνώση του τρόπου αλληλεπίδρασης τους με πρωτεΐνες θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην καλύτερη αξιοποίηση τους.

Κύριος σκοπός της παρούσας διατριβής είναι να διερευνηθεί:

1. Τον τρόπο αλληλεπίδρασης του ροσμαρινικού οξέος και των δύο δομικών υπομονάδων του, του καφεϊκού και σαλβιανικού οξέος, με την αλβουμίνη ώστε να εκτιμηθεί εάν το δομικά πολυπλοκότερο ροσμαρινικό οξύ παρουσιάζει μεγαλύτερη ικανότητα στόχευσης και εάν αυτό οφείλεται σε κάποια συγκεκριμένη υπομονάδα που του προσδίδει την ικανότητα αυτή ή στη δομή του ως σύνολο.
2. Τον σχηματισμό συμπλόκων του ροσμαρινικού οξέος και του καφεϊκού οξέος με την 2-ύδροξυ-πρόπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη που θα μπορούσε να αυξήσει τη χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα και μεταβολική σταθερότητα των δύο μορίων.
3. Τη χημική τροποποίηση του ροσμαρινικού οξέος μέσω εστερικών και αμιδικών δεσμών και εάν αυτή μπορεί να αυξήσει την κυτταρική του πρόσληψη και την αντιοξειδωτική του ικανότητα.
4. Τη μεθυλίωση της κερσετίνης και εάν αυτή μπορεί να ενισχύσει την αντικαρκινική και αντιαγγειογενετική της δράση.

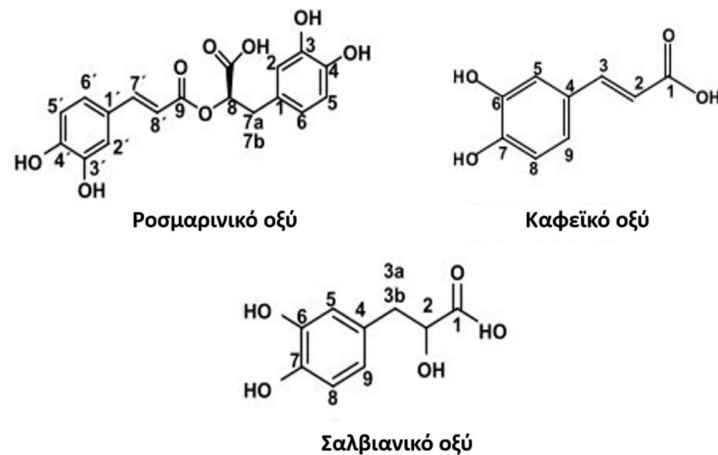
Κεφάλαιο 2

Μελέτη της αλληλεπίδρασης του ροσμαρινικού οξέος και των δύο βιοδραστικών υπομονάδων του με την αλβουμίνη

2.1 Εισαγωγή

Η φύση λειτουργεί χρησιμοποιώντας απλές δομικές μονάδες τις οποίες ανακυκλώνει συνεχώς για να δημιουργήσει μεγαλύτερα, πολυπλοκότερα και περισσότερο λειτουργικά μόρια. Χαρακτηριστικό παράδειγμα στα βιολογικά συστήματα αποτελούν τα βιομόρια όπως οι πρωτεΐνες που αποτελούνται από τα απλούστερα αμινοξέα και με τη σύνθεση τους μέσω των ριβοσωμάτων προκύπτουν ως δομικά πολυπλοκότερα μόρια με τεταρτοταγή δομή και μεγάλη ποικιλία λειτουργιών όπως η ενζυμική κατάλυση και η μεταγωγή σήματος. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρείται και στους δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτικών κυττάρων. Για παράδειγμα στην *Olea Europaea* (ελαιόδεντρο) απαντώνται μεταβολίτες όπως η ελευρωπαΐνη[1] - μια ευρέως γνωστή πολυφαινόλη με καρδιοπροστατευτικές, αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις κ.α. ιδιότητες που αποτελείται από ένα μόριο γλυκόζης, ένα μόριο υδροξυτυροσόλης και ένα μόριο ελενολικού οξέος - και η ολεοκανθάλη που φέρει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και δομικά περιέχει ένα ανάλογο μόριο του ελενολικού οξέος και ένα μόριο τυροσόλης[2]. Οι τρεις δομικές μονάδες, ελενολικό οξύ, υδροξυτυροσόλη και τυροσόλη, συνιστούν επίσης δευτερογενείς φυτικούς μεταβολίτες που απαντώνται στην *Olea Europaea* με τα δύο τελευταία να μελετώνται εκτενώς για τις χημειοπροστατευτικές, αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές και καρδιοπροστατευτικές τους ιδιότητες[2]. Συνεπώς, παρατηρείται πως εντός του φυτικού οργανισμού χρησιμοποιούνται απλούστερες ενώσεις για να συντεθούν νέες και πολυπλοκότερες οι οποίες θα φέρουν διαφορετικές ιδιότητες. Είναι ενδιαφέρον το ότι η συμμετοχή του ελενολικού οξέος στη δομή άλλων πολυφαινολών μπορεί να προκαλέσει διαφοροποιήσεις στη βιοδραστικότητα τους, όπως παρατηρείται

στην περίπτωση της υδροξυτυροσόλης και της υδροξυτυροσόλης συζευγμένης με το ελενολικό οξύ, όπου η δεύτερη προκάλεσε απόπτωση στην καρκινική κυτταρική σειρά HL-60 ακόμη και παρουσία καταλάσης σε αντίθεση με την υδροξυτυροσόλη, διατηρώντας τα επίπεδα του H₂O₂ χαμηλά και υποδεικνύοντας πως τα δύο μόρια έχουν διαφορετικό μηχανισμό δράσης[3].

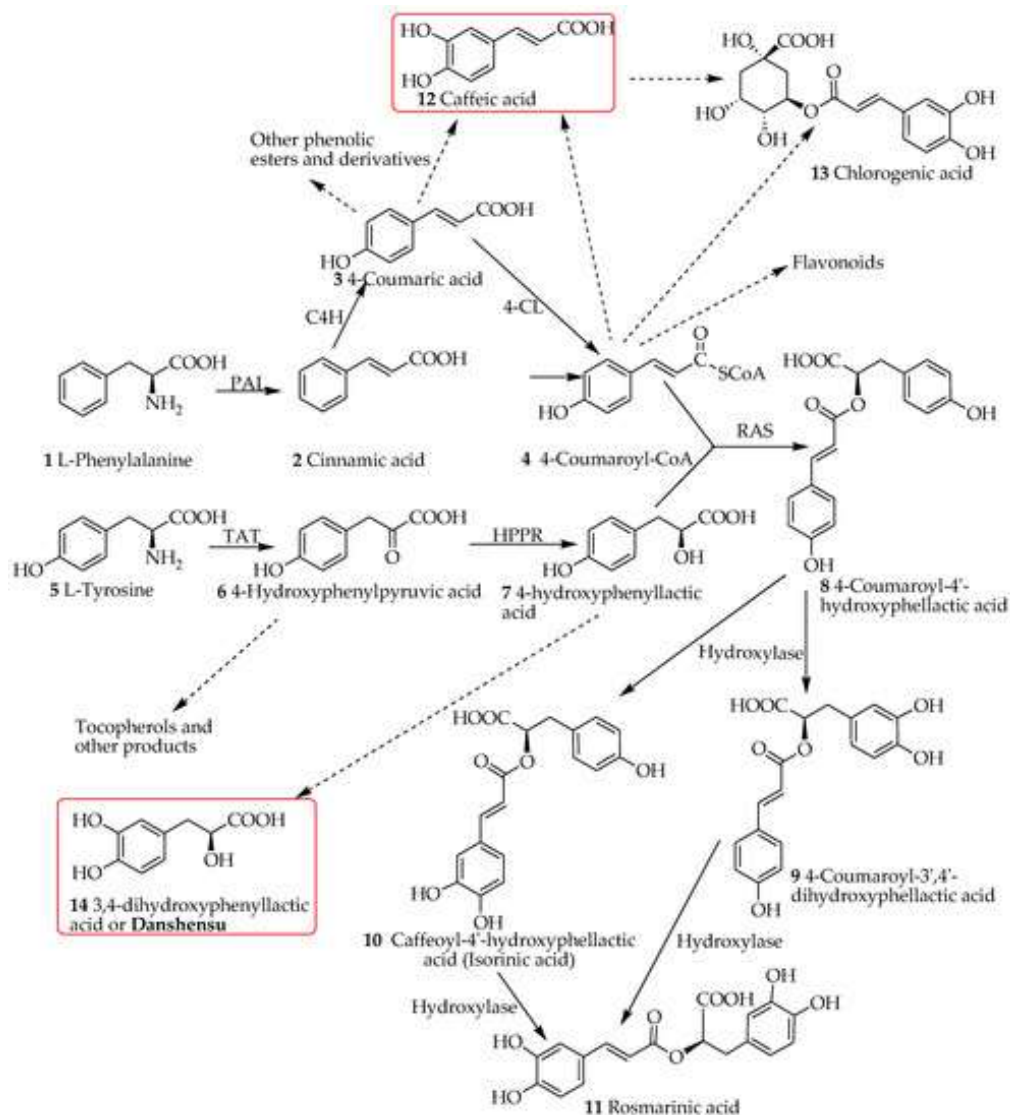


Σχήμα 2.1. Χημικές δομές του ροσμαρινικού, καφεϊκού και σαλβιανικού οξέος

Σε αυτό το κεφάλαιο μελετάται μια άλλη παρόμοια περίπτωση, αυτή του ροσμαρινικού οξέος. Το ροσμαρινικό οξύ ανήκει στην κατηγορία των φαινολικών οξέων και δομικά αποτελείται από δύο άλλα φαινολικά οξέα, το καφεϊκό και το σαλβιανικό οξύ (**Σχήμα 2.1**). Πληθώρα επιστημονικών άρθρων αναφέρεται στη βιοδραστικότητα και τις φαρμακολογικές ιδιότητες των τριών μορίων. Το ροσμαρινικό οξύ έχει μελετηθεί εκτενώς για τις αντιμικροβιακές[4], αντιφλεγμονώδεις[5] και αντιοξειδωτικές του ιδιότητες[6] με τις δύο τελευταίες να του προσδίδουν νευροπροστατευτικές[7, 8], ηπατοπροστατευτικές[9], καρδιοπροστατευτικές[10] και χημειοπροστατευτικές δράσεις[11, 12]. Παρόμοιες ιδιότητες φαίνεται να έχει και το καφεϊκό οξύ με τη βιβλιογραφία να εστιάζει στις αντιϊικές[13], αντιφλεγμονώδεις[14, 15], αντιοξειδωτικές και προ-οξειδωτικές[16], χημειοπροστατευτικές[13, 16] και νευροπροστατευτικές[17] του δράσεις. Τέλος, σε εμφανώς μικρότερο βαθμό έχει διερευνηθεί η βιοδραστικότητα του σαλβιανικού οξέος η οποία σχετίζεται κυρίως με καρδιοαγγειακές παθήσεις[18-22] αλλά επίσης περιλαμβάνει αντιφλεγμονώδη[23] και αντιοξειδωτική δράση[24] καθώς

παρέχει και προστασία ως προς την επαγόμενη από την HIV-1 Tat πρωτεΐνη νευροτοξικότητα[25].

Τα τρία φαινολικά οξέα απαντώνται σε ευρέως διαδεδομένα βότανα όπως τα *Ocimum basilicum* (βασιλικός), *Rosmarinus officinalis* (δενδρολίβανο), *Origanum majorana* (ματζουράνα), *Salvia officinalis* (φασκόμηλο) και *Melissa officinalis* (μελισσόχορτο). Η βιοσύνθεση του ροσμαρινικού οξέος συμπεριλαμβάνει τη χρήση δύο συνθετικών οδών τα οποία καταλήγουν στη σύνθεση των πρόδρομων μορίων του καφεϊκού και του σαλβιανικού οξέος και αποτελούν τμήμα της βιοχημικής οδού του σικιμικού οξέος. Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 2.2**, η φαινυλαλανίνη (**1**) μέσω της αμμωνικής λυάσης της φαινυλαλανίνης μετατρέπεται στο κινναμωμικό οξύ (**2**), το οποίο καταλύεται από την 4-υδροξυλάση του κινναμωμικού οξέος και προκύπτει το π-κουμαρικό οξύ (**3**). Με τη λιγάση του π-κουμαρικού οξέος:συνένζυμου Α το τελευταίο μετατρέπεται στο 4-κουμαρόϋλο-CoA (**4**) το οποίο αποτελεί πρόδρομο μόριο του ροσμαρινικού οξέος. Η δεύτερη συνθετική οδός ξεκινά με τη μετατροπή του αμινοξέος τυροσίνη (**5**) στο 4-ύδροξυ-φαινυλο-πυροσταφυλικό οξύ (**6**) μέσω της τυροσινικής αμινοτρανσφεράσης και στη συνέχεια αυτό με την ύδροξυ-φαινυλο-πυροσταφυλική αναγωγή ανάγεται στο 4-υδροξυ-φαινυλο-γαλακτικό οξύ (**7**) που αποτελεί πρόδρομο μόριο του σαλβιανικού οξέος (**14**). Τα 4-κουμαρόϋλο-CoA και 4-ύδροξυ-φαινυλο-γαλακτικό οξύ συζευγνύονται μέσω εστεροποίησης που καταλύεται από το ένζυμο συνθετάση του ροσμαρινικού οξέος και μέσω υδροξυλίωσης ολοκληρώνεται η σύνθεση του ροσμαρινικού οξέος (**11**)[26]. Συνεπώς, το φυτικό κύτταρο μέσω δύο βιοσυνθετικών μονοπατιών παράγει το καφεϊκό και σαλβιανικό οξύ. Παράλληλα, χρησιμοποιεί τα πρόδρομα μόρια τους για τη σύνθεση ενός περισσότερο πολύπλοκου μορίου που δομικά αποτελείται από το καφεϊκό και σαλβιανικό οξύ. Η σύνθεση του 4-κουμαρόϋλο-CoA είναι πολύ κοινή στα φυτικά είδη, ενώ δεν είναι γνωστό πότε ακριβώς προέκυψε εξελικτικά η σύνθεση του ροσμαρινικού οξέος[27]. Ωστόσο, η μεταβολική δαπάνη του φυτικού κύτταρου για τη σύνθεση ενός μεγαλύτερου μορίου μπορεί να αποσκοπεί στην αναγκαιότητα απόκτησης μιας διαφορετικής λειτουργίας. Για παράδειγμα, η στόχευση μιας πρωτεΐνης μπορεί να απαιτεί την πρόσδεση ενός μεγαλύτερου και πολυπλοκότερου μορίου το οποίο θα κατα-



Σχήμα 2.2. Βιοσυνθετικά μονοπάτια του ροσμαρινικού, καφεϊκού και σαλβιανικού οξέος (Danshensu) και σχετικών μεταβολιτών. 4CL, λιγάση του π-κουμαρικού οξέος:συνένζυμου A; C4H, 4-υδροξυλάση του κινναμικού οξέος; HPPR, υδροξυ-φαινυλο-πυροσταφυλική αναγωγή; PAL, αμμωνική λύση της φαινυλαλανίνης; RAS, συνθετάση του ροσμαρινικού οξέος; TAT, τυροσινική αμινοτρανσφεράση. Τα μόρια σε κόκκινο πλαίσιο είναι πρόδρομα μόρια των σαλβιανολικών οξέων. Τα διακεκομμένα βέλη παριστάνουν αντιδράσεις πολλαπλών βημάτων. Το σχήμα προέρχεται από το άρθρο του Solomon Habtemariam[26].

-λαμβάνει περισσότερο χώρο και θα δύναται να σχηματίζει περισσότερους δεσμούς και αλληλεπιδράσεις στη θέση πρόσδεσης της.

Σε αυτό το πλαίσιο, αναδύονται ερωτήματα όπως εάν το πολυπλοκότερο ροσμαρινικό οξύ παρουσιάζει μεγαλύτερη ικανότητα στόχευσης των πρωτεϊνών σε σύγκριση με τις δύο δομικές του μονάδες και εάν αυτό οφείλεται σε κάποια συγκεκριμένη υποομάδα που του προσδίδει την ικανότητα αυτή ή στη δομή του ως σύνολο. Για να διερευνηθούν τα παραπάνω, επιλέχθηκε μια ευρέως γνωστή και μελετημένη πρωτεΐνη η αλβουμίνη, η οποία χρησιμοποιείται συχνά σε μελέτες ως μοντέλο για τον χαρακτηρισμό της συμπεριφοράς των μικρών μορίων στις αλληλεπιδράσεις τους. Η σύνθεση της αλβουμίνης γίνεται στο ήπαρ και στη συνέχεια απελευθερώνεται στο πλάσμα όπου η παρουσία της είναι καθοριστική για τη ρύθμιση της ωσμωτικής πίεσης που αναπτύσσεται μεταξύ των αγγείων και των ιστών. Επίσης, λειτουργεί και ως μεταφορέας στεροειδών ορμονών, λιπαρών οξέων κ.α συστατικών[28]. Η ιδιότητα της αυτή έχει ως αποτέλεσμα να μπορεί να μεταφέρει και φάρμακα όπως η πενικιλίνη και η διαζεπάμη[29]. Ομόλογες μορφές της συναντώνται στα ψάρια, στα αμφίβια, στα ερπετά και στα πτηνά, ωστόσο περισσότερο διαδεδομένη είναι στα θηλαστικά[30]. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιείται η αλβουμίνη βοός BSA (Bovine Serum Albumin), η αλληλουχία της οποίας είναι κατά 75.52 % όμοια με αυτήν της ανθρώπινης αλβουμίνης HSA (Human Serum Albumin)[31]. Η BSA συνιστάμενη από 583 αμινοξέα[32], περιέχει δύο θέσεις πρόσδεσης στις οποίες συνήθως προσδένονται τα φάρμακα και ονομάζονται Sudlow Site I και Sudlow Site II. Το Sudlow Site I χαρακτηρίζεται από χαμηλή εκλεκτικότητα και για αυτόν τον λόγο πολυάριθμα μικρά μόρια με μεγάλη δομική ποικιλία (αρωματικοί δακτύλιοι, λιπαρά οξέα κ.α.) μπορούν να αλληλεπιδρούν με αυτό. Φάρμακα όπως η βαρφαρίνη, το ακετυλοσαλικυλικό οξύ και η σουλφοναμίδη προσδένονται εκλεκτικά σε αυτή τη θέση[33]. Το Sudlow Site II σχηματίζει ισχυρές υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με μόρια μικρού μοριακού βάρους που περιέχουν αρωματικούς δακτύλιους ή είναι αρνητικά φορτισμένα. Η ιμπουπροφαίνη, η διαζεπάμη και το αμινοξύ L-τρυπτοφάνη προσδένονται εκλεκτικά σε αυτό. Αυτή η εκλεκτική αλληλεπίδραση ορισμένων μορίων με μία από τις δύο θέσεις πρόσδεσης κάθε φορά

χρησιμοποιείται στη διαλεύκανση του τρόπου πρόσδεσης άλλων μορίων στην BSA μέσω πειραμάτων ανταγωνισμού.

Στο παρόν κεφάλαιο, μελετάται η αλληλεπίδραση της BSA με το ροσμαρινικό, καφεϊκό και σαλβιανικό οξύ. Σκοπός είναι η διερεύνηση του τρόπου αλληλεπίδρασης του κάθε μορίου με την πρωτεΐνη και τελικώς να εξεταστεί εάν η αλληλεπίδραση του ροσμαρινικού οξέος με τη BSA οφείλεται στις δομικές ιδιότητες των υπομονάδων του ή στην ολότητα της δομής του. Για την επίτευξη των παραπάνω επιστρατεύθηκε μια σειρά τεχνικών που συμπεριλαμβάνει φασματοσκοπικές τεχνικές για την επιβεβαίωση της κάθε αλληλεπίδρασης και τον τρόπο με τον οποίο συμβαίνει σε δομικό επίπεδο, βιοφυσικές τεχνικές για τη μελέτη της ισχύος κάθε αλληλεπίδρασης καθώς και των θερμοδυναμικών παραμέτρων της και τέλος, *in silico* υπολογιστικές τεχνικές για τον χαρακτηρισμό της αρχιτεκτονικής των αλληλεπιδράσεων σε τριδιάστατη απεικόνιση.

2.2 Υλικά και Μέθοδοι

2.2.1 Υλικά

Το ροσμαρινικό οξύ ($\geq 98\%$) αγοράστηκε από την Carbosynth (USA) και το καφεϊκό οξύ ($\geq 98\%$) από τη Sigma Aldrich (USA). Το σαλβιανικό οξύ παράχθηκε μέσω μεθανόλυσης από το πρόδρομο ροσμαρινικό οξύ. Η διαδικασία και ο χαρακτηρισμός του σαλβιανικού οξέος περιγράφονται στο σχετικό άρθρο[34]. Η BSA ($\geq 98\%$) αγοράστηκε από τη Sigma Aldrich (USA).

2.2.2 Φθορισμομετρία

Για τη μελέτη των τριών αλληλεπιδράσεων εφαρμόστηκε η τεχνική της φθορισμομετρίας, η αρχή της οποίας βασίζεται στη μεταβολή του φθορισμού των τρυπτοφανών της αλβουμίνης που προκύπτει μετά από την πρόσδεση ενός μορίου. Η λήψη των φασμάτων φθορισμού πραγματοποιήθηκε σε φθορισμόμετρο Perkin Elmer LS-

55 σε θερμοκρασία δωματίου. Για τη μέτρηση του κάθε δείγματος χρησιμοποιήθηκε κυψελίδα 1.0 cm τύπου quartz. Η πρωτεΐνη BSA διαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS (0.01 M, pH = 7.4) και τα τρία φαινολικά οξέα σε DMSO (Dimethyl sulfoxide). Η συγκέντρωση της αλβουμίνης στην κυψελίδα διατηρήθηκε σταθερή και ίση με 2 μM. Αυξανόμενες ποσότητες από το κάθε μόριο τιτλοδοτήθηκαν στο διάλυμα της αλβουμίνης έτσι ώστε να προκύψουν τελικές συγκεντρώσεις από 0 έως 20 μM. Τα μήκη κύματος διέγερσης (excitation wavelength) και εκπομπής (emission wavelength) ορίστηκαν στα 285 (μέγιστο μήκος κύματος απορρόφησης της τρυπτοφάνης) και 350 nm (μέγιστο μήκος κύματος φθορισμού της τρυπτοφάνης), αντίστοιχα. Οι σχισμές του μονοχρωμάτορα (slits) διέγερσης και του μονοχρωμάτορα εκπομπής ορίστηκαν στα 7 nm.

Η ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε μέσω της εξίσωσης Stern-Volmer:

$$F_0/F=1+K_{sv}[Q]=1+k_q\tau_0[Q],$$

όπου F_0 και F είναι η μέγιστη ένταση φθορισμού της BSA απουσία και παρουσία προσδέτη, αντίστοιχα. Η σταθερά απόσβεσης Stern-Volmer για τη BSA συμβολίζεται με το K_{sv} και το $[Q]$ αναπαριστά την εκάστοτε συγκέντρωση του μορίου προσδέτη. Το K_q είναι η σταθερά του ρυθμού απόσβεσης της BSA και το τ_0 η διάρκεια του φθορισμού (fluorescence lifetime) της BSA απουσία μορίου απόσβεσης το οποίο θεωρήθηκε ίσο με 10^{-8} s βάσει της βιβλιογραφίας[35]. Οι τιμές της προκύπτουσας έντασης του φθορισμού της BSA, F_0 και F , διορθώθηκαν έτσι ώστε να απαλειφθεί το φαινόμενο εσωτερικού φίλτρου (inner filter effect) στα μήκη κύματος διέγερσης (285 nm) και εκπομπής (350 nm) το οποίο συμβαίνει λόγω της απορρόφησης των τριών φαινολικών οξέων στα προαναφερθέντα μήκη κύματος, με βάση την παρακάτω εξίσωση:

$$F_{cor} = F_{obs} * 10^{-(\epsilon_{lexc} + \epsilon_{lem}) * l * L_0} [36],$$

Όπου F_{obs} είναι η μέγιστη, μετρούμενη ένταση φθορισμού της BSA και F_{cor} η αντίστοιχη διορθωμένη τιμή της. Τα ϵ_{lexc} και ϵ_{lem} συμβολίζουν τους συντελεστές μοριακές απόσβεσης του προσδέτη στα μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής, αντίστοιχα και το

L_0 τη συνολική συγκέντρωση του αδέσμευτου και δεσμευμένου προσδέτη. Τέλος το l είναι η απόσταση που διανύει η ακτινοβολία μέσω της κυψελίδας (path length) η οποία είναι ίση με 1 cm.

2.2.3 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού

2.2.3.1 Θεωρητικό μέρος

Η Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) είναι μια φασματοσκοπική τεχνική υψηλής ανάλυσης που χρησιμοποιείται στη μελέτη και στον προσδιορισμό τόσο μικρών οργανικών ή μη μορίων όσο και πολύπλοκων βιομορίων μεγάλου μοριακού βάρους όπως πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα, υδατάνθρακες και λιπίδια σε υδατικά και στερεά δείγματα. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται επίσης και στη μελέτη και ανάλυση πολύπλοκων βιολογικών και μη μιγμάτων (ορός αίματος, βιολογικά υγρά, τρόφιμα, εκχυλίσματα φυσικών προϊόντων) Η εφαρμογή της περιλαμβάνει κυρίως την ανάλυση και τον πλήρη χαρακτηρισμό της δομής ενός μορίου αλλά και τη μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ μορίων με μόρια μεγάλου μοριακού βάρους, όπως οι πρωτεΐνες. Η αρχή της φασματοσκοπίας NMR βασίζεται στη δυνατότητα διαφοροποίησης κάθε πυρήνα ανάλογα με το χημικό του περιβάλλον. Δηλαδή η συχνότητα συντονισμού ενός πυρήνα επηρεάζεται από την κατανομή των ηλεκτρονίων στους χημικούς δεσμούς του μορίου και όσο μεγαλύτερη είναι η ηλεκτρονική προστασία τόσο μεγαλύτερη είναι η ηλεκτρονιακή πυκνότητα γύρω από τον πυρήνα του υδρογόνου[37]. Στο παρόν κεφάλαιο χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές τεχνικές NMR:

Φασματοσκοπία NMR πρωτονίου μιας διάστασης (1D ^1H): Οι πυρήνες ^1H μιας χημικής ένωσης αναπαρίστανται με κορυφές οι οποίες εντοπίζονται σε διαφορετικές θέσεις (ppm) καθώς συντονίζονται σε διαφορετικές συχνότητες του εφαρμοζόμενου πεδίου. Οι διαφορετικές αυτές θέσεις ονομάζονται χημικές μετατοπίσεις και προκύπτουν από τη διαφορετική ηλεκτρονιακή πυκνότητα που περιβάλλει κάθε πυρήνα

και τον «θωρακίζει» από το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο που εφαρμόζεται. Η ηλεκτρονιακή αυτή «θωράκιση» εξαρτάται από το χημικό περιβάλλον του πυρήνα. Η χημική μετατόπιση μετράται βάσει της κλίμακας δ σε μονάδες ppm (parts per million) και ορίζεται από την εξίσωση:

$$\delta = \frac{\nu_{\text{αναφ}} - \nu_{\text{δειγ}}}{\nu_{\text{αναφ}}} 10^6 (\text{ppm}),$$

όπου $\nu_{\text{αναφ}}$ και $\nu_{\text{δειγ}}$ είναι οι συχνότητες συντονισμού αναφοράς και δείγματος.

Οι πληροφορίες που μπορούν να ληφθούν από ένα πρωτονιακό φάσμα NMR είναι: 1) το πλήθος και το είδος των χημικά μη ισοδύναμων πρωτονίων που υπάρχουν στο δείγμα βάσει του αριθμού των σημάτων, 2) το περιβάλλον των πυρήνων βάσει των χημικών τους μετατοπίσεων αφού αυτές υποδεικνύουν το πόσο προστατευμένα ή όχι είναι, 3) ο αριθμός των πρωτονίων που προβάλλονται από μια κορυφή ο οποίος προκύπτει από το εμβαδόν της και 4) ο αριθμός των γειτονικών πρωτονίων από τη σχάση του σήματος που προκύπτει από τη σύζευξη των πυρηνικών spin γειτονικών ατόμων (spin-spin coupling).

Φασματοσκοπία NMR διαφοράς μεταφοράς κορεσμού (STD NMR): Η τεχνική NMR διαφοράς μεταφοράς κορεσμού (Saturation Transfer Difference, STD NMR) χρησιμοποιείται για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης μιας πρωτεΐνης με ένα μόριο προσδέτη, σε ατομικό επίπεδο, σε ένα υδατικό διάλυμα. Η τεχνική αυτή μπορεί να εφαρμοστεί με επιτυχία για τη μελέτη αυτού του είδους των αλληλεπιδράσεων σε βιολογικά συστήματα[38-41]. Μέσω της τεχνικής STD NMR, είναι δυνατός ο χαρακτηρισμός εκείνης της περιοχής της δομής του υποκαταστάτη που αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη-υποδοχέα. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιείται ο όρος “epitope binding” «επίτοπος πρόσδεσης», ο οποίος περιγράφει τα πρωτόνια του υποκαταστάτη που βρίσκονται πιο κοντά στην πρωτεΐνη[42, 43]. Γενικά, στις μελέτες που γίνονται με τη μεθοδολογία STD NMR, μπορούν να διακριθούν δύο προσεγγίσεις: 1) η μελέτη και ανάλυση των σημάτων του υποδοχέα (για περιπτώσεις ισχυρής αλληλεπίδρασης) και 2) η καταγραφή των σημάτων που προκύπτουν από υποκαταστάτες μικρού μοριακού βάρους (κυρίως με ασθενείς αλληλεπιδράσεις)[43, 44].

Το πείραμα STD NMR συνοψίζεται στα εξής βήματα: Σε ένα υδατικό διάλυμα, που περιέχει την πρωτεΐνη (μεγάλου μοριακού βάρους $MW > 15$ kDa) σε μικρή συγκέντρωση (10^{-7} - 10^{-8} M) και ένα ή περισσότερα μόρια μικρού μοριακού βάρους (τους υποκαταστάτες) τα οποία βρίσκονται σε μεγάλη μοριακή περίσσεια (1:10- μέχρι 1:1000), καταγράφονται δύο φάσματα. Το πρώτο είναι το πρωτονιακό φάσμα του συμπλέγματος υποκαταστάτη- πρωτεΐνης όπου γίνεται επιλεκτική ακτινοβολή σε περιοχή που φέρει μόνο πρωτόνια που ανήκουν στην πρωτεΐνη-υποδοχέα και είναι συνήθως στα (0-1 ppm). Το φάσμα αυτό, στο οποίο γίνεται η ακτινοβολή (διέγερση) της πρωτεΐνης, καλείται *on resonance*. Η ένταση των κορυφών συμβολίζεται με I_{SAT} . Στη συνέχεια, λαμβάνεται σε συνθήκες θερμικής ισορροπίας το δεύτερο φάσμα, στο οποίο δε γίνεται ακτινοβολή/διέγερση της πρωτεΐνης και καλείται *off resonance* (εδώ η διέγερση γίνεται σε περιοχή μεγαλύτερη από 20 ppm, ώστε να είναι απομακρυσμένη από σήματα που αντιστοιχούν στην πρωτεΐνη και στον υποκαταστάτη). Η ένταση των κορυφών που προκύπτουν συμβολίζεται με I_0 . Το πρώτο φάσμα αφαιρείται από το δεύτερο και προκύπτει το φάσμα διαφοράς με ένταση κορυφών που συμβολίζεται ως I_{STD} ($I_{STD} = I_0 - I_{SAT}$). Συνεπώς, στο τελικό φάσμα εμφανίζονται οι κορυφές των πρωτονίων του υποκαταστάτη, με ένταση I_{STD} , στις οποίες έχει γίνει μεταφορά κορεσμού από την πρωτεΐνη. Η μεταφορά κορεσμού από την πρωτεΐνη στον υποκαταστάτη βασίζεται στο πυρηνικό φαινόμενο NOE (Nuclear Overhauser Effect, NOE). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι δεν λαμβάνουν όλα τα πρωτόνια του υποκαταστάτη τον ίδιο βαθμό κορεσμού από την πρωτεΐνη. Για τον λόγο αυτό, γίνεται μελέτη της αλληλεπίδρασης κάθε πρωτονίου ξεχωριστά, ώστε να γίνει μία χαρτογράφηση (*epitope mapping*) της δομής του υποκαταστάτη που αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη. Η χαρτογράφηση γίνεται μέσω των πρωτονίων, τα οποία χαρακτηρίζονται ως επίτοποι πρόσδεσης/σύνδεσης. Οι κορυφές που εμφανίζονται στο τελικό φάσμα διαφοράς ανήκουν ουσιαστικά στα πρωτόνια του υποκαταστάτη, δηλαδή στους επίτοπους πρόσδεσης/σύνδεσης[45], που βρίσκονται εγγύτερα (≤ 5 Å) και συνεπώς είναι αυτά τα πρωτόνια που αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη[42]. Ο βαθμός κορεσμού των πρωτονίων του μορίου προσδέτη εξαρτάται από τον χρόνο της πρόσδεσης του στην πρωτεΐνη. Έτσι, ο ρυθμός αποσύνδεσης του προσδέτη

είναι καθοριστικός για την ευαισθησία της τεχνικής αφού σε πολύ ισχυρές αλληλεπιδράσεις ($K_d < 1$ nM) ο χρόνος για να επέλθει η μεταφορά κορεσμού από την πρωτεΐνη στο μόριο προσδέτη δεν είναι αρκετός. Αντίθετα, όταν ο ρυθμός αποσύνδεσης είναι μεγαλύτερος ($K_d > 100$ nM) η μεταφορά κορεσμού είναι περισσότερο αποτελεσματική. Βέβαια, σε αλληλεπιδράσεις με ασθενή ισχύ πρόσδεσης ($K_d > 10$ mM) η μεταφορά κορεσμού είναι μειωμένη οδηγώντας σε σήματα μικρής έντασης[46].

Καθώς για ένα συγκεκριμένο υποκαταστάτη, δεν λαμβάνουν όλα τα πρωτόνια του τον ίδιο βαθμό κορεσμού, έχει προσδιοριστεί ο παράγοντας αλληλεπίδρασης (STD amplification factor, STD_{AMP}) ο οποίος περιγράφει το ποσοστό αλληλεπίδρασης κάθε πρωτονίου του υποκαταστάτη ξεχωριστά με την πρωτεΐνη.

Ο STD_{AMP} προσδιορίζεται πολλαπλασιάζοντας τον λόγο της έντασης των σημάτων από το φάσμα I_{STD} προς την ένταση των αντίστοιχων σημάτων του φάσματος αναφοράς I_0 με τη μοριακή αναλογία προσδέτη: πρωτεΐνης [27].

$$STD_{AMP} = \frac{I_0 - I_{STD}}{I_0} \times [L]_T/[P]$$

Όπου STD_{AMP} : ο παράγοντας αλληλεπίδρασης, I_0 η ένταση των κορυφών που λαμβάνονται στο off resonance φάσμα, I_{STD} η ένταση των κορυφών που λαμβάνονται στο STD φάσμα της διαφοράς, $[L]_T$ η συγκέντρωση του υποκαταστάτη και $[P]$ η συγκέντρωση της πρωτεΐνης.

Οι παράγοντες STD_{AMP} κανονικοποιήθηκαν ως προς τον μεγαλύτερο STD_{AMP} που παρατηρήθηκε για κάθε προσδέτη, συνεπώς η τιμή 100 % αντιστοιχεί στο σήμα με τη μεγαλύτερη ένταση.

Φασματοσκοπία NMR με τη χρήση του μεταφερόμενου πυρηνικού φαινομένου Overhauser (tr-NOE NMR): Η τεχνική tr-NOE (transferred nuclear Overhauser effect, tr-NOE) χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό της πρόσδεσης ενός μορίου με μικρό μοριακό βάρος σε ένα μόριο με μεγαλύτερο μοριακό βάρος (π.χ. πρωτεΐνη) και στηρίζεται στους διαφορετικούς χρόνους μοριακής περιστροφής (molecular correlation

time) τ_c που αυτά παρουσιάζουν. Συγκεκριμένα, τα μόρια με χαμηλό και μεσαίο μοριακό βάρος εμφανίζουν θετικά, μηδενικά ή ελαφρώς αρνητικά NOEs λόγω του μικρού χρόνου συσχέτισης τ_c , ενώ αντίστροφα μόρια με μεγάλο μοριακό βάρος παρουσιάζουν αρνητικά σήματα NOEs. Στην περίπτωση όμως πρόσδεσης ενός μικρού μορίου σε ένα βιομόριο, το πρώτο συμπεριφέρεται ως μέρος του μορίου με το μεγάλο μοριακό βάρος εμφανίζοντας έτσι αρνητικά NOEs. Η εμφάνιση αρνητικών NOEs στα πρωτόνια του προσδέτη υποδεικνύει την πρόσδεση τους στο μόριο με το μεγαλύτερο μοριακό βάρος. Εκτός από την επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης, η τεχνική tr-NOE επιτρέπει τον χαρακτηρισμό του προσανατολισμού που λαμβάνει το μικρό μόριο κατά την πρόσδεση του.

2.2.3.2 Πειραματικό μέρος

Λήψη φασμάτων STD NMR για τη χαρτογράφηση του επιτόπου πρόσδεσης: Η λήψη φασμάτων NMR πραγματοποιήθηκε στο φασματογράφο Agilent Technologies DD2 600 MHz στο κέντρο NMR του Εθνικού Ινστιτούτου Χημείας στη Σλοβενία. Το εύρος του φάσματος (spectral width) ορίστηκε στα 600 Hz, ο χρόνος αποδιέγερσης στα 2.5 s και ο χρόνος κορεσμού στα 0.22 s. Οι τιμές $^1\text{H } T_1$ του λεγόμενου διαμήκους χρόνου χαλάρωσης (longitudinal relaxation time) των προσδετών κυμάνθηκαν μεταξύ 0.44 s και 2 s. Επιλεκτικός κορεσμός των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με σειρά παλμών τύπου Gauss με διάρκεια 50 ms ο καθένας και χρονική καθυστέρηση 1 ms. Τα δείγματα ακτινοβολήθηκαν στο εντός συντονισμού (on resonance) πείραμα στα 0.81 ppm. Στο εκτός συντονισμού (off resonance) φάσμα εφαρμόστηκε ακτινοβολήση στα 30 ppm. Ο φασματογράφος ήταν συζευγμένος με υποδοχέα κρυογενικής τεχνολογίας και οι λήψεις των φασμάτων πραγματοποιήθηκαν στους 25 °C. Η BSA διαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM Tris (98 %, d_{11}) και το pH ρυθμίστηκε σε 7.4 με την προσθήκη DCl ή NaOD. Το ροσμαρινικό, καφεϊκό και σαλβιανικό οξύ διαλύθηκαν επίσης στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα. Ο τελικός όγκος κάθε δείγματος στο σωληνάκι NMR ήταν 600 μL , όπου οι συγκεντρώσεις της BSA και του εκάστοτε φαινολικού οξέος ήταν ίσες με 20 μM και 2 mM, αντίστοιχα, έτσι ώστε να επιτευχθεί αναλογία προσδέτη-πρωτεΐνης 100:1.

Λήψη φασμάτων tr-NOESY NMR: Η λήψη φασμάτων NMR πραγματοποιήθηκε στον φασματογράφο Agilent Technologies DD2 600 MHz στο κέντρο NMR του Εθνικού Ινστιτούτου Χημείας στη Σλοβενία. Η λήψη των φασμάτων έγινε στους 25 °C με τη χρήση υποδοχέα κρυογενικής τεχνολογίας. Η BSA καθώς και τα τρία φαινολικά οξέα διαλύθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM Tris (98 %, d11) και το pH ρυθμίστηκε σε 7.4 με την προσθήκη DCl ή NaOD. Ο τελικός όγκος των δειγμάτων διατηρήθηκε στα 600 μ L. Σε κάθε δείγμα η συγκέντρωση της πρωτεΐνης ήταν 20 μ M και του προσδέτη 2 mM, έτσι ώστε να επιτευχθεί τελική αναλογία 1:100. Για το tr-NOESY φάσμα του ροσμαρινικού οξέος εφαρμόστηκε συχνότητα 600 MHz με 8192 σημεία στον t_2 , 128 σημεία ενίσχυσης/καταγραφής του σήματος (complex points) στον t_1 , εύρος φάσματος στα 4807 Hz, αριθμό παλμών 32, χρόνο ανάμειξης 350 ms και χρόνο αποδιέγερσης 1.5 s. Το φάσμα του μίγματος (1:1) του καφεϊκού (2 mM) και του σαλβιανικού οξέος (2 mM) παρουσία της BSA (20 μ M) ελήφθη σε συχνότητα 800 MHz με 8192 σημεία στον t_2 , 188 σημεία καταγραφής/ ενίσχυσης του σήματος (complex points) στον t_1 , εύρος φάσματος στα 8012 Hz, αριθμό παλμών 64, χρόνο ανάμειξης 700 ms και χρόνο αποδιέγερσης 1.5 s.

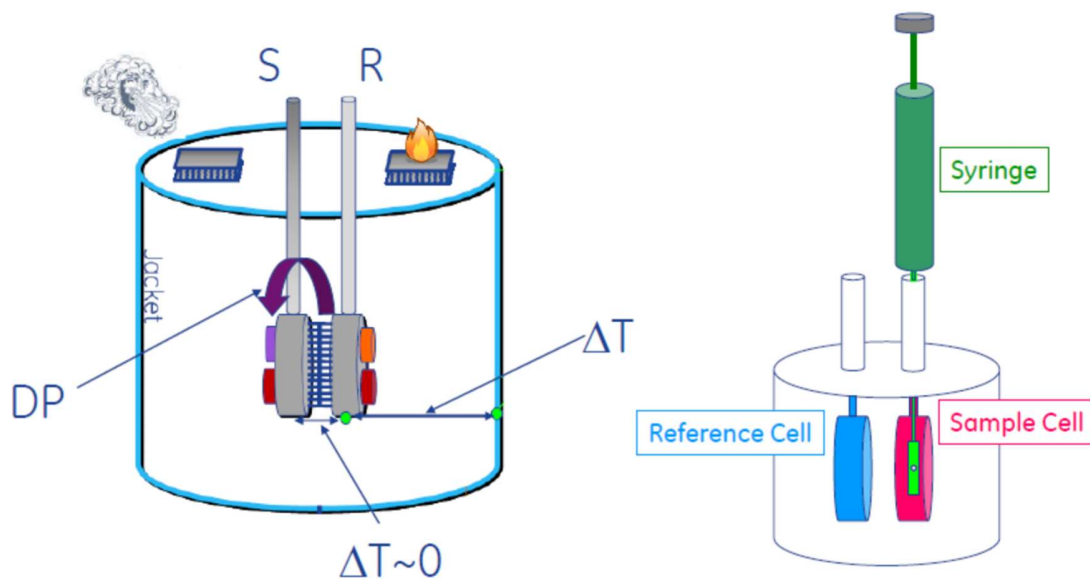
2.2.4 Θερμιδομετρία Ισόθερμης Τιτλοδότησης (ITC)

2.2.4.1 Θεωρητικό μέρος

Η θερμιδομετρία ισόθερμης τιτλοδότησης (Isothermal Titration Calorimetry, ITC) είναι μια βιοφυσική μέθοδος μέσω της οποίας μπορούν να μελετηθούν ποικίλα είδη αλληλεπιδράσεων βάσει των μεταβολών που προκύπτουν στη θερμότητα που απορροφάται ή εκλύεται κατά τη διάρκεια τους. Όσον αφορά στον τομέα της βιοχημείας κάποια από τα είδη των αλληλεπιδράσεων που μελετώνται είναι αυτά της πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, πρωτεΐνης-μικρού μορίου, πρωτεΐνης-λιπιδίου, πρωτεΐνης-DNA, ενζύμου-υποστρώματος, ενζύμου-αναστολέα κ.α.

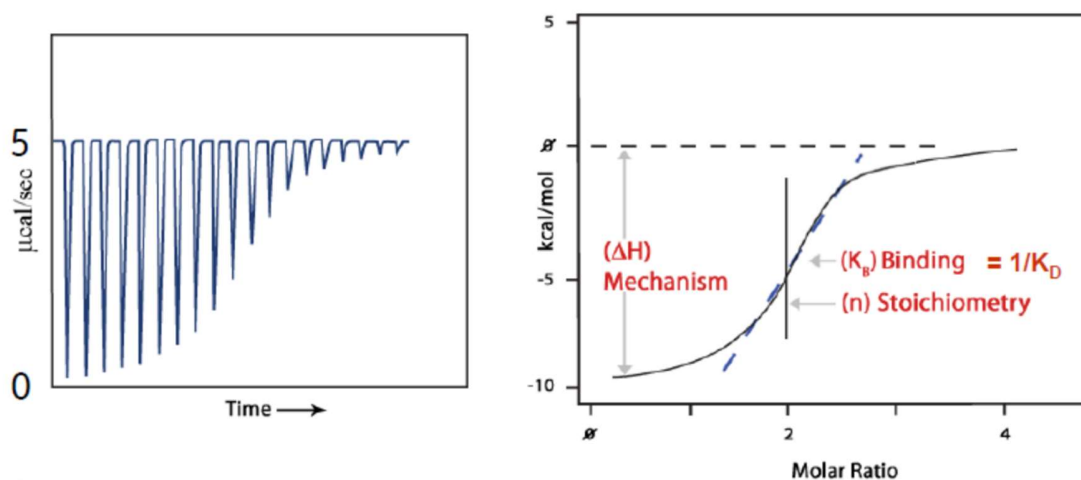
Το θερμιδόμετρο ισόθερμης τιτλοδότησης είναι ένα όργανο υψηλής ευαισθησίας που ανιχνεύει τις θερμικές μεταβολές κατά τη διάρκεια μιας αλληλεπίδρασης. Όπως

φαίνεται στο **Σχήμα 2.3**, το όργανο αποτελείται από τις κυψελίδες δείγματος και αναφοράς κατασκευασμένες από υλικό (Hastelloy) υψηλής αγωγιμότητας. Το σύστημα των δύο κυψελίδων περικλείεται από αδιαβατικό περίβλημα. Στην περίπτωση μελέτης της αλληλεπίδρασης μιας πρωτεΐνης με ένα μικρό μόριο (προσδέτης) συνήθως η πρωτεΐνη τοποθετείται στην κυψελίδα δείγματος – συνηθίζεται το μόριο με το μεγαλύτερο μοριακό βάρος να τοποθετείται στην κυψελίδα δείγματος- και ο προσδέτης φορτώνεται στη σύριγγα. Στην κυψελίδα αναφοράς τοποθετείται είτε ρυθμιστικό διάλυμα (ίδιο με αυτό στο οποίο είναι διαλυμένα τα αλληλεπιδρώντα μόρια) είτε απλώς H₂O. Η σύριγγα τιτλοδοτεί συγκεκριμένες ποσότητες από το διάλυμα το προσδέτη σε καθορισμένους χρόνους. Στο σύστημα παρέχεται συνεχώς ενέργεια (DP, Differential Power) έτσι ώστε η διαφορά θερμοκρασίας μεταξύ των δύο κυψελίδων να παραμένει σταθερή και ίση με το μηδέν ($\Delta T \approx 0$). Όταν δεν λαμβάνει χώρα κάποια αλληλεπίδραση η DP είναι σταθερή και επομένως ταυτίζεται με τη στάθμη αναφοράς (baseline). Όταν όμως πραγματοποιείται έγχυση του μορίου προσδέτη μέσα στην κυψελίδα δείγματος και εφόσον τα δύο μόρια αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, στην περίπτωση μιας εξώθερμης αντίδρασης κατά την οποία εκλύεται ενέργεια θα υπάρχει τάση ανόδου της θερμοκρασίας με αποτέλεσμα το όργανο να μειώσει την ισχύ που παρέχει στο σύστημα έτσι ώστε να διατηρηθεί η συνθήκη $\Delta T \approx 0$. Στην αντίθετη περίπτωση μιας ενδόθερμης αλληλεπίδρασης όπου απορροφάται θερμότητα, η ισχύς του συστήματος αυξάνεται.



Σχήμα 2.3. Σχηματική αναπαράσταση θερμιδομέτρου ισόθερμης τιτλοδότησης. Αριστερά οι δύο κυψελίδες δείγματος (S, Sample cell) και αναφοράς (R, Reference cell), η διαφορά θερμοκρασίας μεταξύ των δύο κυψελίδων (ΔT) και η παρεχόμενη ισχύς στο κελί του δείγματος (DP) έτσι ώστε η ΔT να διατηρείται σταθερή και ίση με το μηδέν. Δεξιά αναπαράσταση του θερμιδομέτρου με τη σύριγγα τιτλοδότησης τοποθετημένη στην κυψελίδα δείγματος. Το σχήμα προέρχεται από οδηγό χρήσης της εταιρείας Microcal.

Μετά από κάθε τιτλοδότηση και εφόσον επέρχεται ισορροπία στο σύστημα η ισχύς επιστρέφει στη στάθμη αναφοράς. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό μιας ισόθερμης καμπύλης. Η ισχύς που παρέχεται στο σύστημα κάθε χρονική στιγμή αποδίδεται σε θερμίδες ($\mu\text{cal sec}^{-1}$). Όσες περισσότερες τιτλοδοτήσεις πραγματοποιούνται τόσο επέρχεται και ο κορεσμός των θέσεων πρόσδεσης του μορίου στην κυψελίδα δείγματος με αποτέλεσμα το μέγεθος των ισόθερμων καμπυλών να μικραίνει ολοένα και περισσότερο. Το τελικό αποτέλεσμα που προκύπτει φαίνεται στο **Σχήμα 2.4.**



Σχήμα 2.4. Αποτέλεσμα ενός τυπικού πειράματος ITC πριν (αριστερά) και μετά την επεξεργασία (δεξιά). Μετά από την ολοκλήρωση των ισόθερμων καμπυλών και την έκφραση της θερμότητας που παράγεται ή εκλύεται κατά τη διάρκεια της αλληλεπίδρασης συναρτήσει της ποσότητας του προσδέτη που προστίθεται σε κάθε τιτλοδότηση, προκύπτει μια σιγμοειδής καμπύλη. Από τα χαρακτηριστικά της σιγμοειδούς καμπύλης υπολογίζονται απευθείας η μεταβολή της ενθαλπίας (ΔH), η σταθερά σύνδεσης (K_a) και η στοιχειομετρία (n). Το σχήμα προέρχεται από οδηγό χρήσης της εταιρείας Microcal.

2.2.4.2 Πειραματικό μέρος

Τα πειράματα ITC πραγματοποιήθηκαν σε θερμιδόμετρο τύπου MicroCal ITC₂₀₀ ενώ η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε μέσω του λογισμικού Origin MicroCal. Η σταθερά σύνδεσης (K_a), η στοιχειομετρία (N), η μεταβολή της ενθαλπίας (ΔH) και η μεταβολή της εντροπίας (ΔG) ανακτήθηκαν απευθείας από το λογισμικό. Η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας του Gibbs υπολογίστηκε βάσει της εξίσωσης:

$$\Delta G^{\circ} = -RT \ln K_a$$

Η BSA και τα τρία φαινολικά οξέα διαλύθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS (0.1 M, pH 7.4) και οι φυσαλίδες απομακρύνθηκαν με απαέρωση για τουλάχιστον 10 min. Σε

κάθε πείραμα η BSA τοποθετήθηκε στην κυψελίδα δείγματος και ο προσδέτης στη σύριγγα. Για την αλληλεπίδραση της BSA με το ροσμαρινικό οξύ χρησιμοποιήθηκαν 0.143 mM πρωτεΐνης και 2.5 mM ροσμαρινικού οξέος. Για την αλληλεπίδραση της BSA με το καφεϊκό οξύ χρησιμοποιήθηκαν 0.148 mM πρωτεΐνης και 2.5 mM καφεϊκού οξέος. Για την αλληλεπίδραση της BSA με το σαλβιανικό οξύ χρησιμοποιήθηκαν 0.15 mM πρωτεΐνης και 5 mM σαλβιανικού οξέος στο οποίο όμως δεν ήταν δυνατή η ανίχνευση της αλληλεπίδρασης. Οι τρεις αλληλεπιδράσεις μελετήθηκαν στους 25 °C. Το πρόγραμμα των τιτλοδοτήσεων ρυθμίστηκε μέσω του λογισμικού Origin MicroCal ITC και περιλάμβανε 20 τιτλοδοτήσεις εκ των οποίων η πρώτη είχε όγκο 1 μL και οι υπόλοιπες 2 μL η καθεμιά. Ο χρόνος αναμονής μέχρι την πρώτη τιτλοδότηση ορίστηκε στα 160 s, ενώ ο χρόνος αναμονής (spacing) μεταξύ των υπόλοιπων τιτλοδοτήσεων ήταν 200 s. Κατά τη διάρκεια των τιτλοδοτήσεων το περιεχόμενο στην κυψελίδα δείγματος βρισκόταν υπό συνεχή ανάδευση στα 1000 rpm. Το DP ορίστηκε στα 6 μcal s⁻¹. Για να διορθωθεί το βασικό πείραμα και να αφαιρεθεί η επίδραση θερμικών φαινομένων που δεν προκαλούνται από τη βασική αλληλεπίδραση πραγματοποιήθηκαν πειράματα ελέγχου δύο ειδών. Το πρώτο ήταν η τιτλοδότηση ροσμαρινικού/καφεϊκού οξέος σε ρυθμιστικό διάλυμα και το δεύτερο η τιτλοδότηση ρυθμιστικού διαλύματος στην BSA. Για την επεξεργασία των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο μίας θέσης πρόσδεσης (one site model).

2.2.5 Μοριακή Μοντελοποίηση

Η κρυσταλλική δομή της BSA (PDB ID: 4F5S) αντλήθηκε από την Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>). Η προετοιμασία πραγματοποιήθηκε μέσω του λογισμικού Maestro's Protein Preparation Wizard[34]. Οι τριδιάστατες μορφές των προσδετών (ροσμαρινικό, καφεϊκό και σαλβιανικό οξύ) σχεδιάστηκαν μέσω των λογισμικών Maestro's 2D sketcher και Macromodel. Οι ελαχιστοποιημένες ενεργειακά δομές των μορίων παράχθηκαν μέσω του LigPrep. Η γεωμετρική ελαχιστοποίηση των δομών έγινε μέσω του OPLS3 και η κατάσταση πρωτονίωσης τους σε ουδέτερο pH μέσω του Epik. Μετά την προετοιμασία τους στο LigPrep, οι δομές ενσωματώθηκαν στο λογισμικό

Macromodel για τον καθορισμό των διαμορφώσεων τους στο χώρο. Οι υπολογιστικές μελέτες μοριακής προσομοίωσης (molecular docking studies) πραγματοποιήθηκαν μέσω του λογισμικού Maestro's Induced Fit Docking (IFD) method (Schrödinger, LLC, New York, USA). Η μοριακή μοντελοποίηση έλαβε χώρα στο Τμήμα Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών από την ερευνητική ομάδα του Καθηγητή κ. Θωμά Μαυρομούστακου.

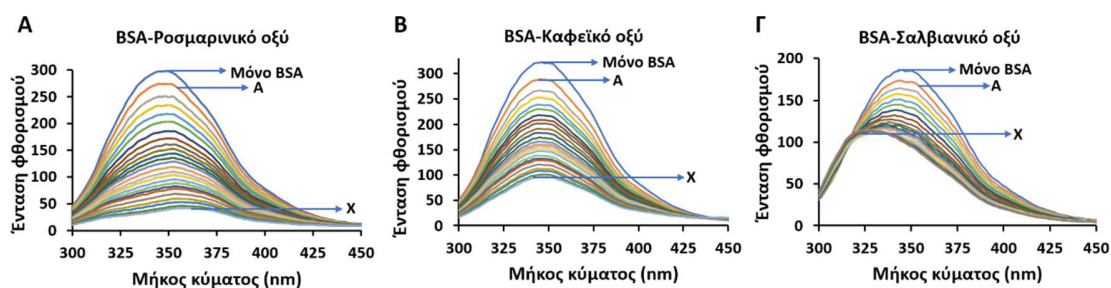
2.3 Αποτελέσματα

2.3.1. Μελέτη της αλληλεπίδρασης της αλβουμίνης με το ροσμαρινικό, καφεϊκό και σαλβιανικό οξύ μέσω φθορισμομετρίας

Η αλληλεπίδραση της BSA με τα τρία φαινολικά οξέα μελετήθηκε μέσω της φθορισμομετρίας σταθερής κατάστασης (steady state fluorescence spectroscopy). Η τεχνική αυτή βασίζεται στο σήμα φθορισμού που εκπέμπεται από τα αμινοξέα τρυπτοφάνης μιας πρωτεΐνης, όταν αυτή διεγερθεί με ακτινοβολία στα 285 nm, μήκος κύματος όπου απορροφά μέγιστα η τρυπτοφάνη. Η πρόσδεση ενός μορίου σε μια πρωτεΐνη μπορεί να οδηγήσει σε διαμορφωτικές αλλαγές της πρωτεΐνης ή και αλλαγές στο περιβάλλον της τρυπτοφάνης με αποτέλεσμα τη μεταβολή σήματος του φθορισμού της [47, 48].

Για να μελετηθούν οι μεταβολές στον φθορισμό της BSA παρουσία ροσμαρινικού, καφεϊκού ή σαλβιανικού οξέος, πραγματοποιήθηκαν τιτλοδοτήσεις αυξανόμενης ποσότητας των τριών μορίων σε σταθερή συγκέντρωση πρωτεΐνης ακολουθούμενες κάθε φορά από τη λήψη του φάσματος. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 2.1**, η ένταση του φθορισμού της BSA ελαττώνεται κατά την προσθήκη και των τριών φαινολικών οξέων. Επιπρόσθετα, στις περιπτώσεις του ροσμαρινικού και του καφεϊκού οξέος, η μείωση του φθορισμού φαίνεται να ακολουθεί το ίδιο μοτίβο, καθώς η ένταση μειώνεται σε χαμηλά επίπεδα και το μήκος κύματος όπου φθορίζει μέγιστα η πρωτεΐνη σε κάθε φάσμα δε

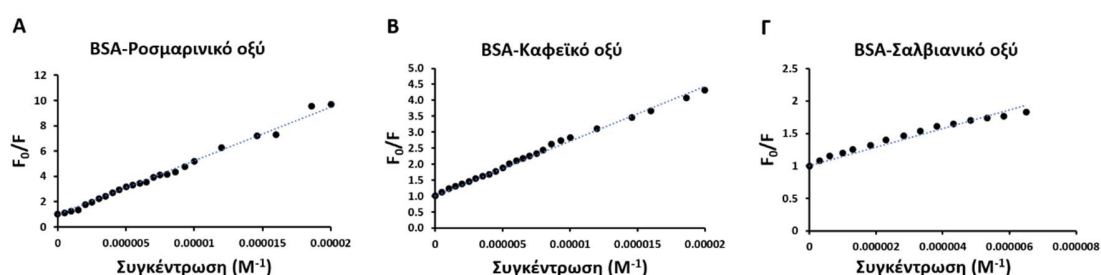
μεταβάλλεται. Αντίθετα, κατά την τιτλοδότηση του σαλβιανικού οξέος η συμπεριφορά του φθορισμού είναι αρκετά διαφορετική αφού στις υψηλές συγκεντρώσεις η ένταση προσεγγίζει και παραμένει στο μέσο περίπου της αρχικής (όπου απουσιάζει το σαλβιανικό οξύ) ενώ παράλληλα το μήκος κύματος στο οποίο φθορίζει μέγιστα η πρωτεΐνη μετατοπίζεται περίπου από τα 350 στα 325 nm, φαινόμενο που ονομάζεται υποχρωμική ή μπλε μετατόπιση (hypochromic or blue shift). Στη βιβλιογραφία αναφέρεται πως η υποχρωμική μετατόπιση προκύπτει όταν το περιβάλλον μιας τρυπτοφάνης γίνεται πιο υδρόφοβο[49]. Συνεπώς, η πρόσδεση του σαλβιανικού οξέος στη BSA μπορεί να επιφέρει σε αυτή διαμορφωτικές αλλαγές μεταβάλλοντας το περιβάλλον της/των τρυπτοφάνης/τρυπτοφανών. Παρόμοιο μοτίβο έχει παρατηρηθεί στη βιβλιογραφία κατά τη μελέτη της αλληλεπίδρασης της ανθρώπινης αλβουμίνης (HSA) με το τερπένιο 16-*O*-μεθυλ-καφεστόλη και είχε αποδοθεί στις διαμορφωτικές αλλαγές της πρωτεΐνης προκαλούμενες από την πρόσδεση του μορίου τόσο στο Sudlow Site I όσο και σε μια θέση πρόσδεσης λιπαρών οξέων[50].



Εικόνα 2.1. Φάσματα φθορισμομετρίας της αλληλεπίδρασης της BSA (2 μM) με το **A)** ροσμαρινικό οξύ (A-X: 0 μM -20 μM), **B)** καφεϊκό οξύ (A-X: 0 μM -20 μM) και **Γ)** σαλβιανικό οξύ (A-X: 0 μM -20 μM).

Τα παραπάνω φασματοσκοπικά δεδομένα χρησιμοποιήθηκαν και για να εκτιμηθεί η σταθερά απόσβεσης (K_{sv}) και ο ρυθμός της σταθεράς απόσβεσης (K_q) με βάση την εξίσωση Stern-Volmer έτσι ώστε να συγκριθεί ο βαθμός με τον οποίον τα τρία φαινολικά οξέα προκαλούν την απόσβεση του φθορισμού της BSA. Όπως φαίνεται στην

Εικόνα 2.2 σχεδιάστηκαν οι γραφικές παραστάσεις με τον λόγο F_0/F στον άξονα των y και τη συγκέντρωση του κάθε προσδέτη στον άξονα των x από όπου προκύπτουν οι γραμμικές εξισώσεις της μορφής $y=ax+b$ και υπολογίστηκε η σταθερά K_{SV} (**Πίνακας 2.1**). Από τα δεδομένα προκύπτει πως μεγαλύτερη ικανότητα απόσβεσης του φθορισμού της BSA έχει το ροσμαρινικό οξύ και στη συνέχεια ακολουθούν το καφεϊκό και το σαλβιανικό οξύ όπου οι σταθερές απόσβεσης του δεν έχουν μεγάλη διαφορά.



Εικόνα 2.2. Γραφικές παραστάσεις του λόγου F_0/F συναρτήσει της συγκέντρωσης του **A)** ροσμαρινικού **B)** καφεϊκού και **Γ)** σαλβιανικού οξέος για τον υπολογισμό της σταθεράς απόσβεσης K_{SV} .

Πίνακας 2.1. Σταθερές αλληλεπίδρασης (K_{SV}) όπως προέκυψαν από τα φθορισμομετρικά δεδομένα της τιτλοδότησης του ροσμαρινικού, καφεϊκού και σαλβιανικού οξέος στη BSA

Μόριο	K_{SV} (10^4 L mol ⁻¹)	K_q (10^{13} L mol ⁻¹ s ⁻¹)	R^2
Ροσμαρινικό οξύ	42.4	4.2	0.99
Καφεϊκό οξύ	17.1	1.7	0.99
Σαλβιανικό οξύ	14.3	1.4	0.95

2.3.2. Μελέτη της αλληλεπίδρασης της αλβουμίνης με το ροσμαρινικό, καφεϊκό και σαλβιανικό οξύ με χρήση φασματοσκοπίας

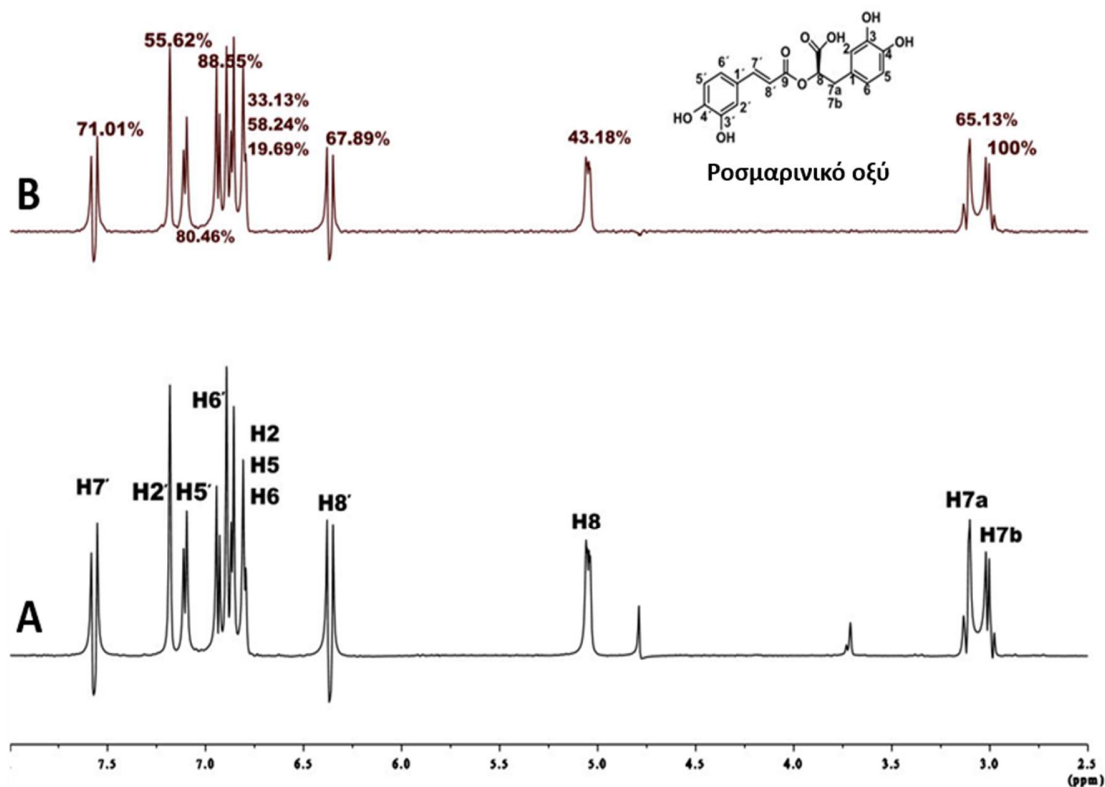
2.3.2.1 Προσδιορισμός επιτόπων πρόσδεσης μέσω της τεχνικής STD NMR

Η μέθοδος STD NMR χρησιμοποιήθηκε για την εύρεση των επιτόπων του κάθε φαινολικού οξέος αλλά και την ανίχνευση των πρωτονίων τους που αλληλεπιδρούν με τη BSA. Ταυτόχρονα, υπολογίστηκε και ο STD amplification factor.

Η **Εικόνα 2.3** παρουσιάζει το φάσμα αναφοράς και το φάσμα διαφοράς της αλληλεπίδρασης μεταξύ της BSA και του ροσμαρινικού οξέος. Όλα τα πρωτόνια του ροσμαρινικού οξέος φαίνεται να αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη παρουσιάζοντας τιμές STD_{AMP} μεγαλύτερες του 20 %. Τα αρωματικά πρωτόνια του πρώτου δακτυλίου H2', H5' και H6' αλληλεπιδρούν με τιμές STD_{AMP} 55.62 %, 80.46 % και 82.55 %, αντίστοιχα. Ενώ οι τιμές STD_{AMP} για τα αρωματικά πρωτόνια H2, H5 και H6 είναι 33.13 %, 58.24 % και 19.69 %, αντίστοιχα. Τα πρωτόνια H7' και H8' αλληλεπιδρούν επίσης ισχυρά με τη BSA και τιμές STD_{AMP} ίσες με 71.01 % και 67.89 %, αντίστοιχα. Τέλος, την ισχυρότερη πρόσδεση παρουσίασε το πρωτόνιο H7b που βρίσκεται πλησίον του καρβοξυλικού οξέος και η τιμή STD_{AMP} ορίστηκε στο 100 %, βάσει της οποίας πραγματοποιήθηκε η κανονικοποίηση των STD_{AMP} των υπολοίπων πρωτονίων.

Παρομοίως με το παραπάνω, όλα τα πρωτόνια του καφεϊκού οξέος βρέθηκαν να αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 2.4**. Ισχυρότερη αλληλεπίδραση επέδειξαν τα αρωματικά πρωτόνια H9, H8 και H5 με τιμές STD_{AMP} 100 %, 88.46 % και 70.38 % αντίστοιχα, ενώ τα πρωτόνια H2 και H3 εμφανίζονται να αλληλεπιδρούν ασθενέστερα με τιμές STD_{AMP} 56.79 % και 66.01 %, αντίστοιχα.

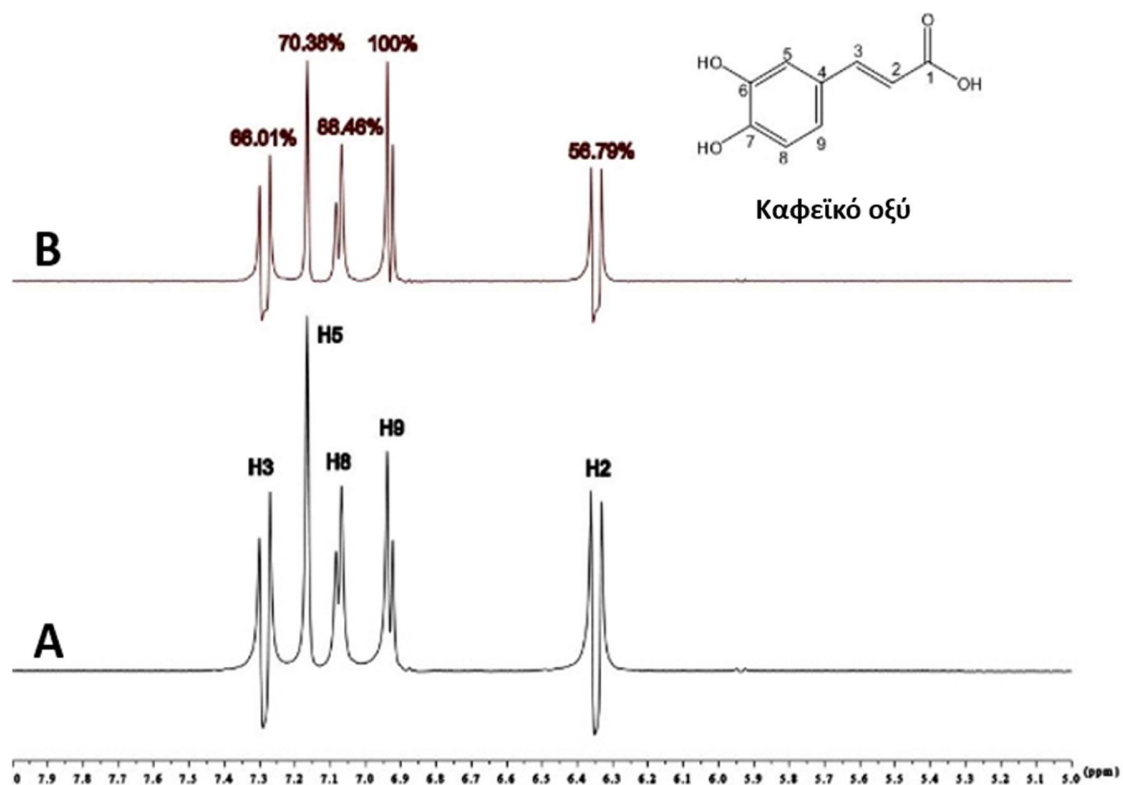
Κατά την πρόσδεση του σαλβιανικού οξέος στην BSA επίσης φαίνεται να αλληλεπιδρούν όλα τα πρωτόνια (**Εικόνα 2.5**) με ισχυρότερη αυτή του πρωτονίου H2 (STD_{AMP} 100 %). Ακολούθως, επαρκή αλληλεπίδραση εμφανίζουν τα πρωτόνια H5 και H3b με τιμές STD_{AMP} 57.89 % και 66.67 %, ενώ ασθενέστερη είναι η πρόσδεση των H8, H9 και H3a με τιμές STD_{AMP} 28.07 %, 31.58 % και 35.09 %.



Εικόνα 2.3. Α) ^1H NMR φάσμα αναφοράς του συμπλόκου του ροσμαρινικού οξέος (2 mM) με τη BSA (20 μM) σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris- d_{11} 10 mM, pH 7.4 με 600 μL D_2O . **Β)** Φάσμα STD του συμπλόκου του ροσμαρινικού οξέος με τη BSA. Οι ποσοστιαίες τιμές υποδεικνύουν τις τιμές STD_{AMP} για όλα τα πρωτόνια του ροσμαρινικού οξέος και το βαθμό που αλληλεπιδρούν με τη BSA.

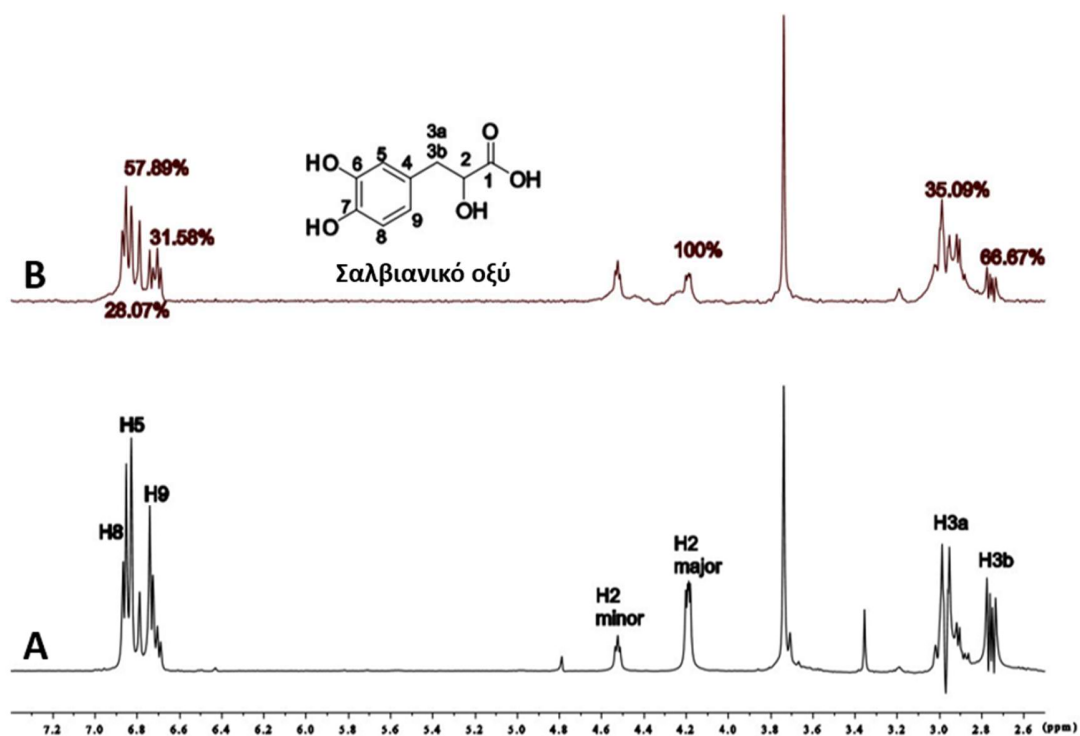
Εάν παραθέσουμε συγκεντρωτικά τις τιμές STD_{AMP} για τα τρία φαινολικά οξέα μπορούμε να εντοπίσουμε ευκολότερα τις περιοχές του κάθε μορίου που αλληλεπιδρούν ισχυρότερα με την πρωτεΐνη (**Εικόνα 2.6**). Θα πρέπει να σημειωθεί πως η σύγκριση δε μπορεί να γίνει μεταξύ όλων των πρωτονίων και των τριών μορίων, καθώς οι τιμές STD_{AMP} έχουν κανονικοποιηθεί ξεχωριστά για το κάθε μόριο ως προς το πρωτόνιο που επιδεικνύει ισχυρότερο σήμα[51], αλλά αφορά στην ισχύ της αλληλεπίδρασης των πρωτονίων κάθε μορίου ξεχωριστά. Ωστόσο, τα διαγράμματα αυτού του είδους χρησιμοποιούνται για τη σύγκριση και αναγνώριση μοτίβων στην πρόσδεση μορίων σε πρωτεΐνες[52]. Ως προς το ροσμαρινικό οξύ, η ισχυρότερη αλληλεπίδραση συμβαίνει

στην αλειφατική περιοχή και ειδικά μέσω του πρωτονίου H7b, ενώ ακολουθείται σε μέγεθος έντασης από τα αρωματικά πρωτόνια H6' και H5' με ισχυρότερο φαινόμενο STD να παρουσιάζεται από το H5'. Αντίθετα, στο καφεϊκό οξύ ισχυρότερη αλληλεπίδραση εμφανίζουν τα αρωματικά πρωτόνια H9 και H8, τα οποία όμως αντιστοιχούν στα πρωτόνια H6' και H5' του ροσμαρινικού οξέος. Συνεπώς, η αρωματική περιοχή των δύο μορίων αλληλεπιδρά με τη BSA με παρόμοιο τρόπο. Τέλος, το ισχυρότερο STD φαινόμενο μεταξύ των πρωτονίων του σαλβιανικού οξέος παρατηρήθηκε στο αλειφατικό πρωτόνιο H2 που εντοπίζεται στην α- θέση ως προς την καρβοξυλική ομάδα.

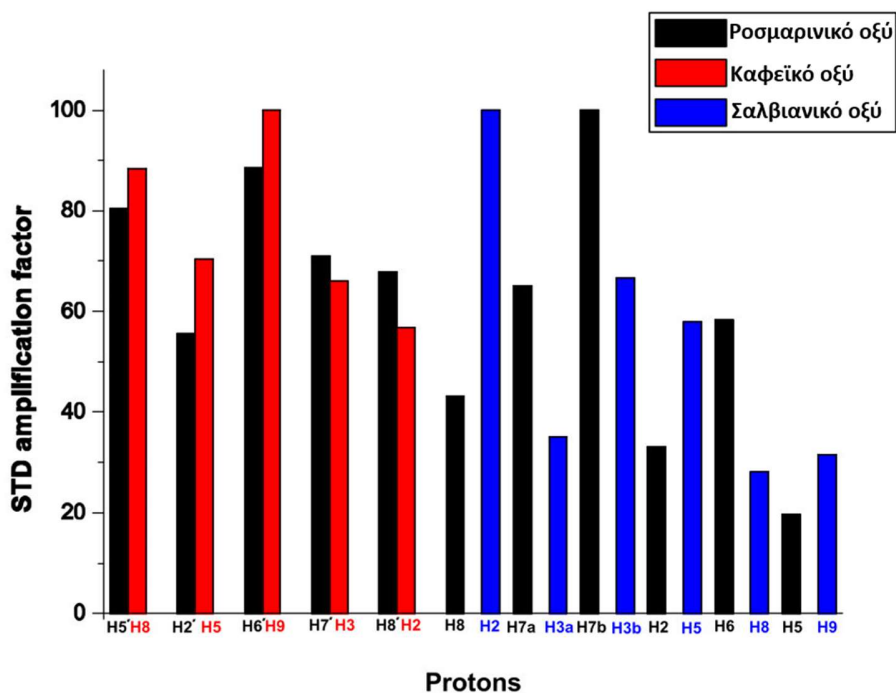


Εικόνα 2.4. Α) ¹H NMR φάσμα αναφοράς του συμπλόκου του καφεϊκού οξέος (2 mM) με τη BSA (20 μM) σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-*d*₁₁ 10 mM, pH 7.4 με 600 μL D₂O. **Β)** Φάσμα STD του συμπλόκου του καφεϊκού οξέος με τη BSA. Οι ποσοστιαίες τιμές υποδεικνύουν τις τιμές STD_{AMP} για όλα τα πρωτόνια του καφεϊκού οξέος.

Το H2 διαφέρει από το αλειφατικό πρωτόνιο H7b του ροσμαρινικού οξέος το οποίο βρίσκεται σε α-θέση ως προς τον αρωματικό δακτύλιο B, και σε β-θέση ως προς την καρβοξυλική ομάδα. Αυτή η διαφοροποίηση μπορεί να οφείλεται στην ύπαρξη της γειτνιάζουσας υδροξυλικής ομάδας στο σαλβιανικό οξύ, που διαφοροποιεί το χημικό περιβάλλον του πρωτονίου H2 στο σαλβιανικό οξύ.



Εικόνα 2.5. A) ¹H NMR φάσμα αναφοράς του συμπλόκου του σαλβιανικού οξέος (2 mM) με τη BSA (20 μM) σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-*d*₁₁ 10 mM, pH 7.4 με 600 μL D₂O. **B)** Φάσμα STD του συμπλόκου του σαλβιανικού οξέος με τη BSA. Οι ποσοστιαίες τιμές υποδεικνύουν τις τιμές STD_{AMP} για όλα τα πρωτόνια του σαλβιανικού οξέος.



Εικόνα 2.6. Παράθεση των σχετικών τιμών (του παράγοντα αλληλεπίδρασης) STD_{AMP} των κορεσμένων πρωτονίων (όσον αφορά στην πρόσδεση του στη BSA) του ροσμαρινικού οξέος (μαύρο χρώμα) του καφεϊκού οξέος (κόκκινο χρώμα) και του σαλβιανικού οξέος (μπλε χρώμα). Οι τιμές κάθε μορίου έχουν κανονικοποιηθεί με βάση το σήμα του πρωτονίου εκείνου που παρουσιάζει το ισχυρότερο STD φαινόμενο.

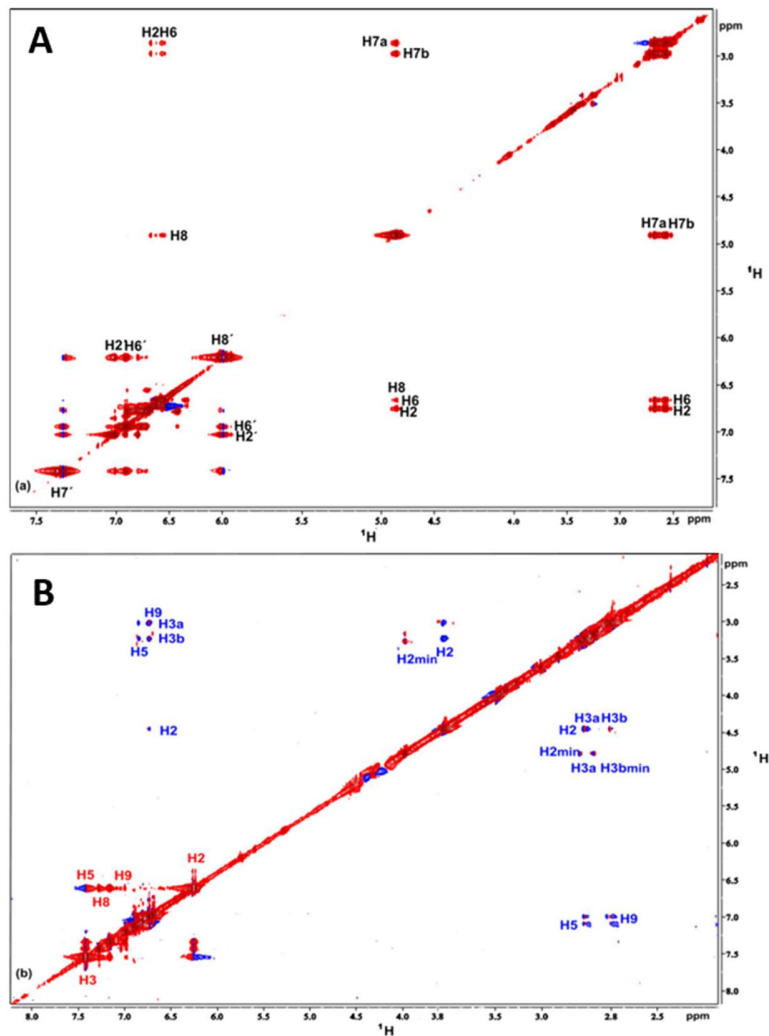
2.3.2.2 Μελέτη της διαμόρφωσης που λαμβάνουν στο χώρο τα τρία φαινολικά οξέα κατά την πρόσδεση τους στη BSA μέσω tr-NOESY NMR

Στη συνέχεια μελετήθηκε η διαμόρφωση που αποκτούν στον χώρο τα τρία φαινολικά οξέα κατά την πρόσδεση τους στη BSA μέσω της τεχνικής tr-NOESY NMR[49, 53]. Φάσματα 2D NOESY NMR του ροσμαρινικού, καφεϊκού και σαλβιανικού οξέος καταγράφηκαν απουσία και παρουσία πρωτεΐνης. Απουσία πρωτεΐνης, όπου τα μόρια βρίσκονται σε ελεύθερη κατάσταση στον διαλύτη λαμβάνονται θετικά σήματα NOEs (Εικόνα 2.7), ενώ παρουσία πρωτεΐνης το σήμα τους μεταβάλλεται σε αρνητικό εξαιτίας

της πρόσδεσης τους σε αυτήν, που δηλώνει πλέον την παρουσία ενός μορίου μεγάλου μοριακού βάρους.

Όπως παρατηρείται από το φάσμα tr-NOESY του ροσμαρινικού οξέος με τη BSA (**Εικόνα 2.7A**), αρνητικά σήματα NOEs προκύπτουν μόνο μεταξύ των πρωτονίων που βρίσκονται κοντά μεταξύ τους βάσει της δομής του ροσμαρινικού οξέος και όχι μεταξύ πρωτονίων που ανήκουν στις διαφορετικές υπομονάδες του μορίου. Το εκτεταμένο συζυγιακό σύστημα που χαρακτηρίζει τη δομή του ροσμαρινικού οξέος, εμποδίζει τυχόν αναδίπλωση του μορίου που μπορεί να προκληθεί από την αλληλεπίδραση του μορίου με τη BSA. Εξαιτίας αυτού του φαινομένου, μεμονωμένα NOEs που μπορεί να οφείλονται στις δύο διαφορετικές υπομονάδες του ροσμαρινικού οξέος, καφεϊκό και σαλβιανικό οξύ, είναι δυνατό να μην παρατηρούνται. Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν πως το ροσμαρινικό οξύ κατά την πρόσδεση του στη BSA διατηρεί εκτεταμένο το σκελετό του, χωρίς να αναδιπλώνεται, όπως όταν βρίσκεται ελεύθερο στον διαλύτη.

Η τεχνική tr-NOESY χρησιμοποιήθηκε και για την καταγραφή φάσματος σε δείγμα πρωτεΐνης με ταυτόχρονη παρουσία του καφεϊκού και σαλβιανικού οξέος (**Εικόνα 2.7B**). Στο φάσμα εντοπίζονται με κόκκινο χρώμα αρνητικά NOEs τα οποία αντιστοιχούν στα πρωτόνια του καφεϊκού οξέος αποδεικνύοντας την πρόσδεση του στη BSA παρουσία σαλβιανικού οξέος. Ενδιαφέρον προκαλεί το ότι τα πρωτόνια του τελευταίου εμφανίζουν μόνο θετικά NOEs (με μπλε χρώμα), δεδομένο που υποδεικνύει πως το καφεϊκό οξύ παρουσιάζει ισχυρότερη αλληλεπίδραση με τη BSA εκτοπίζοντας το σαλβιανικό οξύ και πως τα δύο μόρια προσδέονται στην ίδια θέση πρόσδεσης της πρωτεΐνης.

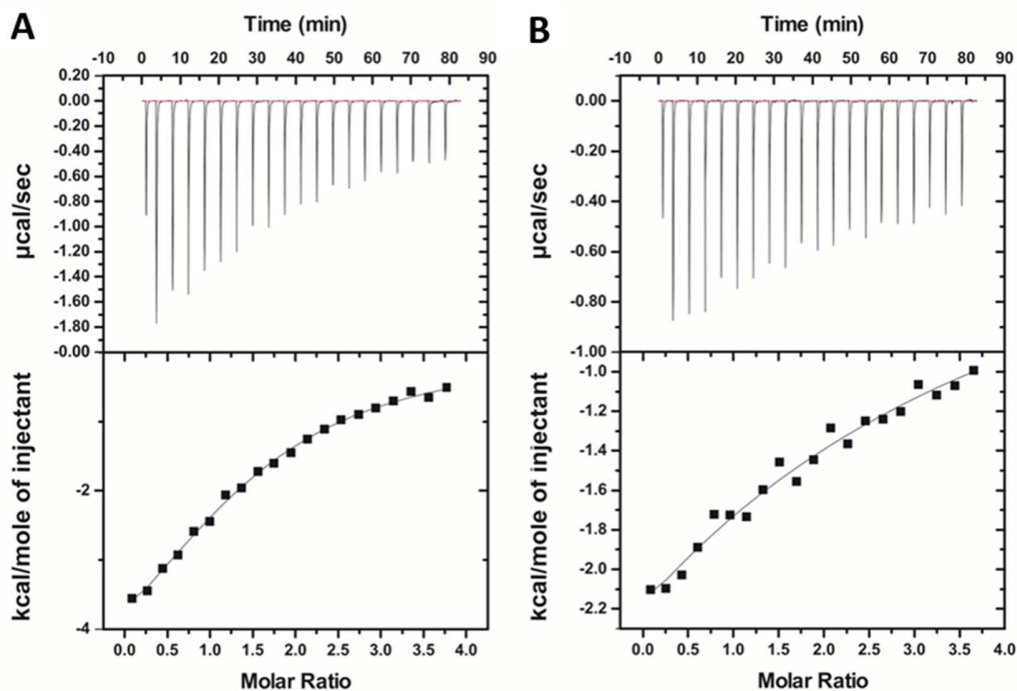


Εικόνα 2.7. Α) Διευρυμένη περιοχή του φάσματος tr- NOESY του συμπλόκου του ροσμαρινικού οξέος με τη BSA, καταγεγραμμένο με χρόνο ανάμιξης 350 ms στα 600 MHz, όπου διακρίνονται τα αρνητικά NOEs. **Β)** Διευρυμένη περιοχή του φάσματος tr- NOESY του συμπλόκου του καφεϊκού οξέος με τη BSA, καταγεγραμμένο με χρόνο ανάμιξης 700 ms στα 800 MHz όπου διακρίνονται τα αρνητικά NOEs για το καφεϊκό οξύ (κόκκινο χρώμα) και τα θετικά NOEs του κύριου στεροϊσομερούς του σαλβιανικού οξέος (μπλε χρώμα). Για το δευτερεύον στεροϊσομερές του σαλβιανικού οξέος μόνο ασθενή σήματα εντοπίστηκαν μεταξύ των H2 και H3 πρωτονίων.

2.3.3. Μελέτη της αλληλεπίδρασης της αλβουμίνης με το ροσμαρινικό, καφεϊκό και σαλβιανικό οξύ με χρήση ITC

Η θερμιδομετρία ισόθερμης τιτλοδότησης χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό των θερμοδυναμικών παραμέτρων και την ισχύ της κάθε αλληλεπίδρασης (Εικόνα 2.8). Όσον αφορά στην ισχύ της κάθε αλληλεπίδρασης, η πιο ισχυρή είναι αυτή μεταξύ της BSA και του ροσμαρινικού οξέος με K_d ίσο με 135.3 μM ενώ αρκετά μικρότερης ισχύος είναι αυτή μεταξύ της BSA και του καφεϊκού οξέος με K_d ίσο με 1564.9 μM (Πίνακας 2.2). Δεν ήταν δυνατό να υπολογιστεί το K_d της αλληλεπίδρασης μεταξύ της BSA και του σαλβιανικού οξέος καθώς το σήμα ήταν ασθενές και η μεταβολή της θερμότητας μη ικανή να προσδιοριστεί από το θερμιδόμετρο το οποίο μετρά με ακρίβεια κυρίως ισχυρές αλληλεπιδράσεις. Συνεπώς βάσει των αποτελεσμάτων το ροσμαρινικό οξύ προσδέεται ισχυρότερα στη BSA σε σχέση με το καφεϊκό οξύ ενώ η πρόσδεση του σαλβιανικού οξέος είναι η ασθενέστερη από όλες.

Αναφορικά με τις θερμοδυναμικές παραμέτρους παρατηρήθηκε πως η πρόσδεση τόσο του ροσμαρινικού όσο και του καφεϊκού οξέος στην πρωτεΐνη είναι εξώθερμες καθώς η μεταβολή της ενθαλπίας και στις δύο περιπτώσεις είναι αρνητική και αυθόρμητες με επίσης αρνητική μεταβολή στην ελεύθερη ενέργεια του Gibbs. Τέλος, η μεταβολή της εντροπίας και για τα δύο μόρια βρέθηκε αρνητική υποδεικνύοντας πως κατά την πρόσδεση τους στη BSA κυριαρχούν οι δεσμοί υδρογόνου και οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις.



Εικόνα 2.8. Διαγράμματα ITC των αλληλεπιδράσεων της BSA με **A)** το ροσμαρινικό οξύ και **B)** το καφεϊκό οξύ. Για κάθε αλληλεπίδραση παρουσιάζονται οι ισόθερμες καμπύλες (επάνω διάγραμμα) και η καμπύλη που προκύπτει από την ολοκλήρωσή τους ως προς τη μοριακή αναλογία των αλληλεπιδρώντων (κάτω διάγραμμα).

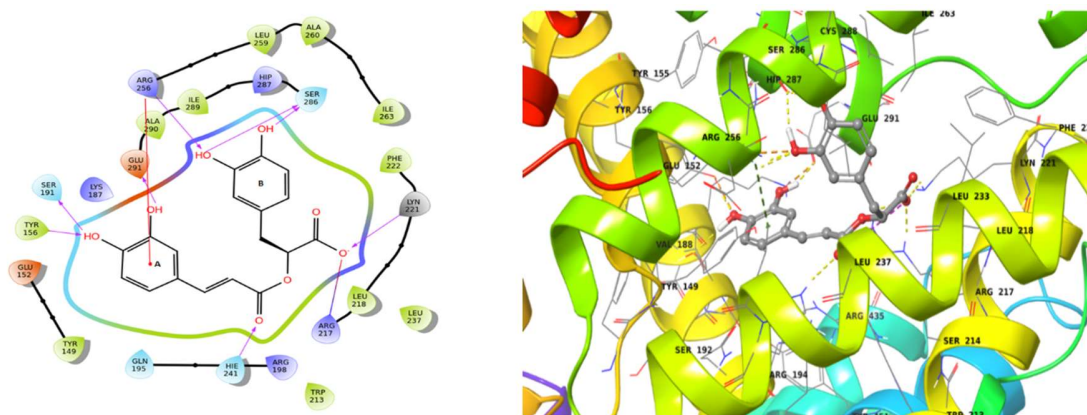
Πίνακας 2.2. Θερμοδυναμικές παράμετροι και σταθερές σύνδεσης και διάστασης των αλληλεπιδράσεων της BSA με το ροσμαρινικό και καφεϊκό οξύ.

Προσδέτης	n	ΔH (cal/mol)	ΔG (cal/mol)	ΔS (cal/mol/deg)	K_a (M^{-1})	K_d (μM)
Ροσμαρινικό οξύ	1.45	-6008 ± 302.8	-5280	-2.44	7390 ± 593	135.3 ± 10.8
Καφεϊκό οξύ	1.8	-14680 ± 1139	-3832	-36.4	639 ± 65.3	1564.9 ± 156.7

2.3.4 Δομικός χαρακτηρισμός της αλληλεπίδρασης της BSA με το ροσμαρινικό, καφεϊκό και σαλβιανικό οξύ μέσω πειραμάτων προσομοίωσης Μοριακής Πρόσδεσης

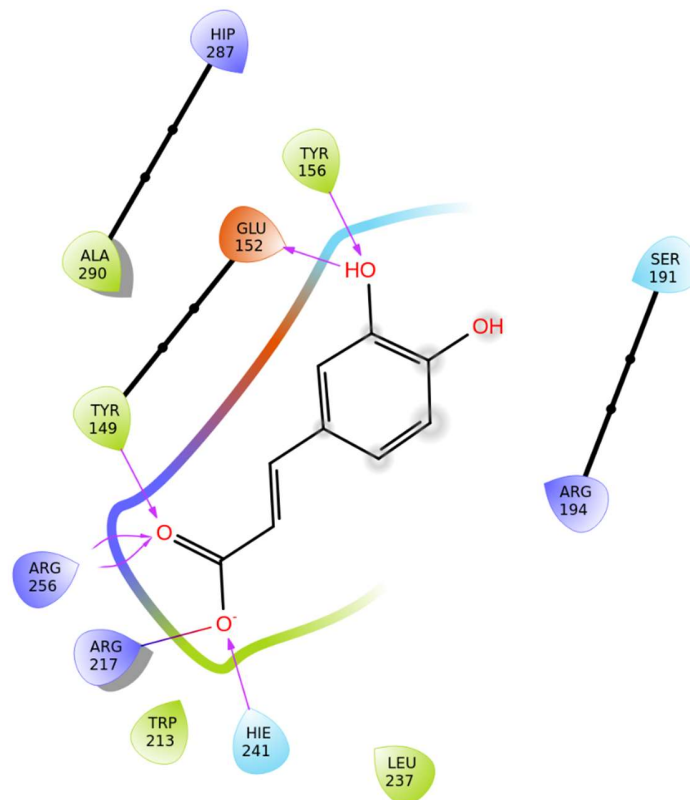
Η υπολογιστική τεχνική της Μοριακής Πρόσδεσης χρησιμοποιήθηκε για τη διερεύνηση των μοριακών αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσουν τα τρία φαινολικά οξέα στο Sudlow Site I της BSA. Επίσης, υπολογίστηκε και η βαθμολογία πρόσδεσης (Docking score) για κάθε αλληλεπίδραση με σκοπό την εκτίμηση της ικανότητας πρόσδεσης του κάθε μορίου στην πρωτεΐνη.

Για το ροσμαρινικό οξύ η βαθμολογία πρόσδεσης για το Sudlow Site I βρέθηκε ίση με -13.545 kcal/mol. Βάσει της διαμόρφωσης με τη χαμηλότερη ενέργεια αλληλεπίδρασης (**Εικόνα 2.9**), το ροσμαρινικό οξύ σχηματίζει εννέα δεσμούς υδρογόνου με οκτώ αμινοξέα της πρωτεΐνης (Tyr156, Ser191, Glu291, Arg256, Ser286, Lys221, Arg217, His241). Επιπρόσθετα, παρατηρείται και μια κατιόντος-π αλληλεπίδραση μεταξύ του αρωματικού δακτυλίου A του μορίου και της Arg256 η οποία συμβάλλει στη σταθεροποίηση του συμπλόκου.



Εικόνα 2.9. Διδιάστατη (αριστερά) και τριδιάστατη (δεξιά) απεικόνιση της περισσότερο πιθανής διαμόρφωσης του ροσμαρινικού οξέος στο Sudlow site I της BSA. Στις εικόνες παρουσιάζονται οι δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζονται καθώς και η αλληλεπίδραση κατιόντος-π μεταξύ του αρωματικού δακτυλίου A και της Arg256.

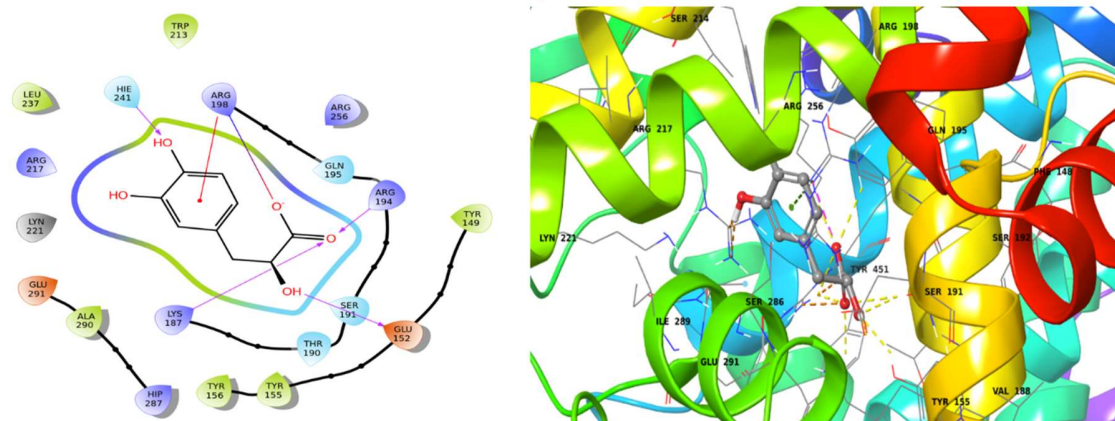
Η βαθμολογία πρόσδεσης του καφεϊκού οξέος στο Sudlow Site I βρέθηκε επίσης να ευνοεί την αλληλεπίδραση με βαθμό -11.583 kcal/mol. Φαίνεται πως το μόριο σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με πέντε αμινοξέα της πρωτεΐνης (Tyr156, Glu152, Tyr149, Arg256, His241) ενώ παρατηρείται και μια γέφυρα άλατος μεταξύ της Arg217 και της καρβοξυλικής ομάδας του καφεϊκού οξέος (**Εικόνα 2.10**).



Εικόνα 2.10. Διδιάστατη απεικόνιση της περισσότερο πιθανής διαμόρφωσης του καφεϊκού οξέος στο Sudlow site I της BSA. Στην εικόνα παρουσιάζονται οι δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζονται καθώς και η γέφυρα άλατος μεταξύ της Arg217 και της καρβοξυλικής ομάδας του μορίου.

Τέλος, η βαθμολογία πρόσδεσης στο Sudlow Site I ευνοεί και την αλληλεπίδραση του σαλβιανικού οξέος -9.849 kcal/mol. Η βέλτιστη δομική διαμόρφωση προβλέπει το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου με τέσσερα αμινοξέα της BSA (His241, Arg194, Lys187,

Glu152) καθώς και το σχηματισμό γέφυρας άλατος μεταξύ της Arg198 και της καρβοξυλικής ομάδας του μορίου ο οποίος συμβάλλει στη σταθεροποίηση του μορίου εντός της θέσης πρόσδεσης (Εικόνα 2.11).



Εικόνα 2.11. Διδιάστατη (αριστερά) και τριδιάστατη (δεξιά) απεικόνιση της περισσότερο πιθανής διαμόρφωσης του σαλβιανικού οξέος στο Sudlow site I της BSA. Στις εικόνες παρουσιάζονται οι δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζονται καθώς και η γέφυρα άλατος μεταξύ της Arg198 και της καρβοξυλικής ομάδας του μορίου.

2.4 Συζήτηση

Η δομή του ροσμαρινικού οξέος αποτελείται από τις αντίστοιχες δύο άλλων φαινολικών οξέων αυτών του καφεϊκού και του σαλβιανικού. Τα τρία βιοδραστικά μόρια είναι προϊόντα ενζυμικής σύνθεσης του μεταβολισμού των φυτικών κυττάρων. Από δύο διαφορετικά μονοπάτια της ίδιας μεταβολικής οδού προκύπτουν το καφεϊκό και το σαλβιανικό οξύ. Παράλληλα, η σύζευξη των πρόδρομων μορίων τους, 4-κουμαρόυλο-CoA και 4-ύδροξυ-φαίνυλο-γαλακτικό οξύ, οδηγεί στη βιοσύνθεση του ροσμαρινικού οξέος. Έτσι, παρατηρείται πως οι βιοσυνθετικοί μηχανισμοί εξελίχθηκαν ώστε να συνδυάζουν απλούστερα δομικά μόρια για την παραγωγή μεγαλύτερων μορίων με υψηλότερη πολυπλοκότητα. Εάν αυτή η δομική πολυπλοκότητα μπορεί να επιφέρει και ισχυρότερη βιοδραστικότητα εξαρτάται και θα πρέπει να μελετάται κάθε φορά ως προς

τον εκάστοτε πρωτεϊνικό στόχο. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η αλβουμίνη η οποία βρίσκεται σε αφθονία στον ανθρώπινο οργανισμό, είναι μεταφορέας φαρμάκων και χρησιμοποιείται ευρέως ως μοντέλο για τη διερεύνηση του τρόπου αλληλεπίδρασης των μικρών μορίων.

Το πρώτο βήμα ήταν η επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης της αλβουμίνης (BSA) με τα τρία φαινολικά οξέα μέσω φθορισμομετρίας. Γενικά η τεχνική της φθορισμομετρίας είναι πολύ διαδεδομένη στη μελέτη αλληλεπιδράσεων μικρών μορίων με πρωτεΐνες, ενώ υπάρχει πληθώρα δημοσιευμένων άρθρων που αφορά στις αλληλεπιδράσεις της αλβουμίνης με φυτοχημικές ενώσεις. Η αλληλεπίδραση του ροσμαρινικού και του καφεϊκού οξέος έχει μελετηθεί ευρέως τόσο με τη BSA όσο και με την HSA[54-57] μέσω φθορισμομετρίας ενώ υπάρχει και μια δημοσίευση που εξετάζει την αλληλεπίδραση του σαλβιανικού οξέος με τη BSA[58]. Ωστόσο, για πρώτη φορά εδώ μελετήθηκε ταυτόχρονα η αλληλεπίδραση του ροσμαρινικού οξέος και των δύο υπομονάδων του με τη BSA και πραγματοποιείται η σύγκριση μεταξύ τους. Όλα τα μόρια προκάλεσαν μείωση στον φθορισμό της πρωτεΐνης, με το ροσμαρινικό και το καφεϊκό οξύ να παρουσιάζουν το ίδιο μοτίβο απόσβεσης. Αντίθετα, το σαλβιανικό οξύ δεν μείωσε στον ίδιο βαθμό το φθορισμό της BSA ενώ παράλληλα παρατηρήθηκε υποχρωμική μετατόπιση κάτι που σχετίζεται με αλλαγές που συμβαίνουν στη διαμόρφωση του μορίου κατά την πρόσδεση[49]. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, παρόμοιο μοτίβο απόσβεσης παρατηρήθηκε και στην αλληλεπίδραση ενός τερπενοειδούς με την HSA με τους συγγραφείς του άρθρου να το αποδίδουν στην αλληλεπίδραση του εν λόγω μορίου στο Sudlow Site I και σε μια θέση πρόσδεσης λιπαρού οξέος[50]. Στη συνέχεια εκτιμήθηκαν οι σταθερές πρόσδεσης K_{SV} με την εξίσωση Stern-Volmer, βάσει των οποίων η μεγαλύτερη απόσβεση του φθορισμού προκύπτει κατά την αλληλεπίδραση με το ροσμαρινικό οξύ ενώ ακολουθούν αυτές του καφεϊκού και τέλος του σαλβιανικού οξέος. Αυτά τα πρωταρχικά αποτελέσματα υποδεικνύουν πως ίσως το ροσμαρινικό οξύ να αλληλεπιδρά ισχυρότερα με τη BSA σε σύγκριση με το καφεϊκό και το καφεϊκό ισχυρότερα από το σαλβιανικό οξύ. Εντούτοις, η τεχνική του φθορισμού βασίζεται στην αλλαγή του φθορισμού της τρυπτοφάνης ο οποίος μπορεί να επηρεάζεται από

διαμορφωτικές αλλαγές που επέρχονται μετά από μια αλληλεπίδραση και άρα παραμένει ένας έμμεσος τρόπος για τη μελέτη μιας πρόσδεσης. Επειδή, μεταξύ των διαφορετικών μορίων μπορεί να είναι διαφορετικός και ο τρόπος πρόσδεσης και συνεπώς διαφορετική και η επίδραση στην τρυπτοφάνη, χρησιμοποιήθηκαν και άλλες τεχνικές για να διαλευκάνουν την ισχύ της πρόσδεσης του κάθε μορίου στην πρωτεΐνη.

Για τον προσδιορισμό της ισχύος της πρόσδεσης χρησιμοποιήθηκε η τεχνική ITC. Την ισχυρότερη αλληλεπίδραση με τη BSA επέδειξε το ροσμαρινικό οξύ ενώ η ισχύς της αλληλεπίδρασης του καφεϊκού οξέος με την πρωτεΐνη ήταν ασθενής. Ακόμα πιο ασθενής αποδείχθηκε η αλληλεπίδραση με το σαλβιανικό οξύ, καθώς δε μπορούσε να μετρηθεί μέσω αυτής της τεχνικής. Το αποτέλεσμα αυτό συνάδει με τα δεδομένα του πειράματος ανταγωνισμού tr-NOESY, όπου κατά την ταυτόχρονη παρουσία του καφεϊκού και του σαλβιανικού οξέος στο διάλυμα της BSA το πρώτο εκτόπισε το δεύτερο, υποδηλώνοντας πως προσδέεται ισχυρότερα από το σαλβιανικό οξύ και μάλιστα πως τα δύο μόρια μοιράζονται την ίδια θέση πρόσδεσης στην πρωτεΐνη. Πειράματα ανταγωνισμού μέσω της τεχνικής STD NMR επιβεβαιώνουν αυτήν την υπόθεση αφού η βαρφαρίνη εκτόπισε και τα τρία φαινολικά οξέα από το Sudlow Site I, σε αντίθεση με την ιμπουπροφαΐνη η οποία δεν επηρέασε την πρόσδεση τους στην πρωτεΐνη[34]. Η θέση πρόσδεσης των τριών μορίων αναφέρονται και σε άλλες πηγές της βιβλιογραφίας[56, 58, 59]. Και οι δύο αλληλεπιδράσεις είναι ενθαλπικά καθοδηγούμενες με δεσμούς υδρογόνου και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις να παίζουν τον κύριο ρόλο στη δέσμευση κάτι που προβλέφθηκε και από τις μελέτες μοριακής πρόσδεσης οι οποίες προτείνουν το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου και γεφυρών άλατος μεταξύ αμινοξέων της BSA και των τριών φαινολικών οξέων.

Το μοτίβο πρόσδεσης των τριών αλληλεπιδράσεων ολοκληρώθηκε μέσω της αναγνώρισης των επιτόπων των τριών μορίων, όπου φάνηκε πως όλα τα πρωτόνια κάθε μορίου συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση τους με τη BSA, όχι όμως με την ίδια ισχύ. Βρέθηκε πως τα πρωτόνια της αλειφατικής περιοχής του ροσμαρινικού οξέος δεσμεύονται ισχυρότερα, με αυτά του πρώτου δακτυλίου να ακολουθούν. Τα πρωτόνια του ίδιου δακτυλίου παρουσιάζουν και την ισχυρότερη πρόσδεση στο καφεϊκό οξύ ενώ

αντίθετα στο σαλβιανικό παρατηρείται ένα διαφορετικό μοτίβο με το Η₂ αλειφατικό πρωτόνιο να παρουσιάζει τον μεγαλύτερο παράγοντα αλληλεπίδρασης STD. Φαίνεται λοιπόν πως η δομική πολυπλοκότητα που προκύπτει από την ένωση των δύο πρόδρομων μορίων ευνοεί την πρόσδεση στη BSA κατά τέτοιον τρόπο που δεν παρατηρείται μεμονωμένα από τη δυνατότητα δέσμευσης του κάθε μορίου παρά μόνο από την τελική σύνθεσή τους.

Η παρούσα εργασία δημοσιεύθηκε στο επιστημονικό περιοδικό *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* με τίτλο «Unveiling the interaction profile of rosmarinic acid and its bioactive substructures with serum albumin» [34].

Βιβλιογραφία

1. Sun, W., B. Frost, and J. Liu, *Oleuropein, unexpected benefits!* *Oncotarget*, 2017. **8**(11): p. 17409.
2. Karkovic Markovic, A., et al., *Hydroxytyrosol, Tyrosol and Derivatives and Their Potential Effects on Human Health*. *Molecules*, 2019. **24**(10).
3. Fabiani, R., et al., *Involvement of Hydrogen Peroxide Formation on Apoptosis Induction by Olive Oil Phenolic Compounds*. *Czech J. Food Sci.*, 2009. **27**.
4. Zhu, F., et al., *Rosmarinic acid and its ester derivatives for enhancing antibacterial, alpha-glucosidase inhibitory, and lipid accumulation suppression activities*. *J Food Biochem*, 2019. **43**(2): p. e12719.
5. Luo, C., et al., *A Review of the Anti-Inflammatory Effects of Rosmarinic Acid on Inflammatory Diseases*. *Front Pharmacol*, 2020. **11**: p. 153.
6. Oguz, A., et al., *Investigation of antioxidant effects of rosmarinic acid on liver, lung and kidney in rats: a biochemical and histopathological study*. *Folia Morphol (Warsz)*, 2020. **79**(2): p. 288-295.
7. Fachel, F.N.S., et al., *An overview of the neuroprotective potential of rosmarinic acid and its association with nanotechnology-based delivery systems: A novel approach to treating neurodegenerative disorders*. *Neurochem Int*, 2019. **122**: p. 47-58.
8. Ma, Z., et al., *Rosmarinic acid exerts a neuroprotective effect on spinal cord injury by suppressing oxidative stress and inflammation via modulating the Nrf2/HO-1 and TLR4/NF-kappaB pathways*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2020. **397**: p. 115014.

9. Elufioye, T.O. and S. Habtemariam, *Hepatoprotective effects of rosmarinic acid: Insight into its mechanisms of action*. Biomed Pharmacother, 2019. **112**: p. 108600.
10. Javidanpour, S., et al., *The cardioprotective effect of rosmarinic acid on acute myocardial infarction and genes involved in Ca(2+) homeostasis*. Free Radic Res, 2017. **51**(11-12): p. 911-923.
11. Ngo, S.N., D.B. Williams, and R.J. Head, *Rosemary and cancer prevention: preclinical perspectives*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2011. **51**(10): p. 946-54.
12. Swamy, M.K., U.R. Sinniah, and A. Ghasemzadeh, *Anticancer potential of rosmarinic acid and its improved production through biotechnological interventions and functional genomics*. Appl Microbiol Biotechnol, 2018. **102**(18): p. 7775-7793.
13. Touaibia, M., J. Jean-Francois, and J. Doiron, *Caffeic Acid, a versatile pharmacophore: an overview*. Mini Rev Med Chem, 2011. **11**(8): p. 695-713.
14. Fikry, E.M., et al., *Caffeic acid and ellagic acid ameliorate adjuvant-induced arthritis in rats via targeting inflammatory signals, chitinase-3-like protein-1 and angiogenesis*. Biomed Pharmacother, 2019. **110**: p. 878-886.
15. Huang, X., et al., *Caffeic acid protects against IL-1beta-induced inflammatory responses and cartilage degradation in articular chondrocytes*. Biomed Pharmacother, 2018. **107**: p. 433-439.
16. Espindola, K.M.M., et al., *Chemical and Pharmacological Aspects of Caffeic Acid and Its Activity in Hepatocarcinoma*. Front Oncol, 2019. **9**: p. 541.
17. Habtemariam, S., *Protective Effects of Caffeic Acid and the Alzheimer's Brain: An Update*. Mini Rev Med Chem, 2017. **17**(8): p. 667-674.
18. Jia, D., et al., *Cardioprotective mechanisms of salvianic acid A sodium in rats with myocardial infarction based on proteome and transcriptome analysis*. Acta Pharmacol Sin, 2019. **40**(12): p. 1513-1522.
19. Jia, D., et al., *Cardioprotective mechanism study of salvianic acid A sodium based on a proteome microarray approach and metabolomic profiling of rat serum after myocardial infarction*. Mol Omics, 2019. **15**(4): p. 271-279.
20. Song, Q., et al., *Potential mechanisms underlying the protective effects of salvianic acid A against atherosclerosis in vivo and vitro*. Biomed Pharmacother, 2019. **109**: p. 945-956.
21. Gao, L., et al., *Cardiovascular Protective Effects of Salvianic Acid A on db/db Mice with Elevated Homocysteine Level*. Oxid Med Cell Longev, 2017. **2017**: p. 9506925.
22. Song, Q., et al., *Mechanisms underlying the cardioprotective effect of Salvianic acid A against isoproterenol-induced myocardial ischemia injury in rats: Possible involvement of L-type calcium channels and myocardial contractility*. J Ethnopharmacol, 2016. **189**: p. 157-64.
23. Teng, M.C., et al., *Danshensu Decreases UVB-Induced Corneal Inflammation in an Experimental Mouse Model via Oral Administration*. Curr Eye Res, 2018. **43**(1): p. 27-34.

24. Guo, J., et al., *Salvianic acid A protects L-02 cells against gamma-irradiation-induced apoptosis via the scavenging of reactive oxygen species*. Environ Toxicol Pharmacol, 2013. **35**(1): p. 117-30.
25. Bao, D., et al., *The attenuation of HIV-1 Tat-induced neurotoxicity by Salvianic acid A and Danshen granule*. Int J Biol Macromol, 2019. **124**: p. 863-870.
26. Habtemariam, S., *Molecular Pharmacology of Rosmarinic and Salvianolic Acids: Potential Seeds for Alzheimer's and Vascular Dementia Drugs*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(2).
27. Petersen, M., et al., *Evolution of rosmarinic acid biosynthesis*. Phytochemistry, 2009. **70**(15-16): p. 1663-79.
28. Rothman, J.E. and L. Orci, *Molecular dissection of the secretory pathway*. Nature, 1992. **355**(6359): p. 409-15.
29. Larsen, M.T., et al., *Albumin-based drug delivery: harnessing nature to cure disease*. Mol Cell Ther, 2016. **4**: p. 3.
30. Nurdiansyah, R., M. Rifa'i, and Widodo, *A comparative analysis of serum albumin from different species to determine a natural source of albumin that might be useful for human therapy*. Journal of Taibah University Medical Sciences, 2016. **11**(3): p. 243-249.
31. Akdogan, Y., J. Reichenwallner, and D. Hinderberger, *Evidence for water-tuned structural differences in proteins: an approach emphasizing variations in local hydrophilicity*. PLoS One, 2012. **7**(9): p. e45681.
32. Bujacz, A., *Structures of bovine, equine and leporine serum albumin*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2012. **68**(Pt 10): p. 1278-89.
33. Fielding, L., S. Rutherford, and D. Fletcher, *Determination of protein-ligand binding affinity by NMR: observations from serum albumin model systems*. Magn Reson Chem, 2005. **43**(6): p. 463-70.
34. Papaemmanouil, C., et al., *Unveiling the interaction profile of rosmarinic acid and its bioactive substructures with serum albumin*. J Enzyme Inhib Med Chem, 2020. **35**(1): p. 786-804.
35. Buddanavar, A.T. and S.T. Nandibewoor, *Multi-spectroscopic characterization of bovine serum albumin upon interaction with atomoxetine*. J Pharm Anal, 2017. **7**(3): p. 148-155.
36. Rawel, H.M., et al., *Determining the binding affinities of phenolic compounds to proteins by quenching of the intrinsic tryptophan fluorescence*. Mol Nutr Food Res, 2006. **50**(8): p. 705-13.
37. Novoa-Carballal, R., et al., *NMR methods for unravelling the spectra of complex mixtures*. Nat Prod Rep, 2011. **28**(1): p. 78-98.
38. Calle, L.P., F.J. Cañada, and J. Jiménez-Barbero, *Application of NMR methods to the study of the interaction of natural products with biomolecular receptors*. Natural Product Reports, 2011. **28**(6): p. 1118-1125.
39. Pellecchia, M., et al., *Perspectives on NMR in drug discovery: a technique comes of age*. Nat Rev Drug Discov, 2008. **7**(9): p. 738-45.
40. Pellecchia, M., D.S. Sem, and K. Wuthrich, *NMR in drug discovery*. Nat Rev Drug Discov, 2002. **1**(3): p. 211-9.

41. Roldós, V., F.J. Cañada, and J. Jiménez-Barbero, *Carbohydrate–Protein Interactions: A 3D View by NMR*. ChemBioChem, 2011. **12**(7): p. 990-1005.
42. Viegas, A., et al., *Saturation-Transfer Difference (STD) NMR: A Simple and Fast Method for Ligand Screening and Characterization of Protein Binding*. Journal of Chemical Education, 2011. **88**(7): p. 990-994.
43. Meyer, B. and T. Peters, *NMR spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors*. Angew Chem Int Ed Engl, 2003. **42**(8): p. 864-90.
44. Lepre, C.A., J.M. Moore, and J.W. Peng, *Theory and applications of NMR-based screening in pharmaceutical research*. Chem Rev, 2004. **104**(8): p. 3641-76.
45. Mayer, M. and B. Meyer, *Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor*. J Am Chem Soc, 2001. **123**(25): p. 6108-17.
46. Bhunia, A., S. Bhattacharjya, and S. Chatterjee, *Applications of saturation transfer difference NMR in biological systems*. Drug Discov Today, 2012. **17**(9-10): p. 505-13.
47. Primikyri, A., et al., *Direct binding of Bcl-2 family proteins by quercetin triggers its pro-apoptotic activity*. ACS Chem Biol, 2014. **9**(12): p. 2737-41.
48. Jun, H.W., et al., *Binding study of p-hydroxybenzoic acid esters to bovine serum albumin by fluorescent probe technique*. J Pharm Sci, 1971. **60**(12): p. 1821-5.
49. Suresh, P.K., et al., *Phenytoin-Bovine Serum Albumin interactions - modeling plasma protein - drug binding: A multi-spectroscopy and in silico-based correlation*. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2018. **193**: p. 523-527.
50. Guercia, E., et al., *Interaction of coffee compounds with serum albumins. Part II: Diterpenes*. Food Chem, 2016. **199**: p. 502-8.
51. Yan, J., et al., *The effect of relaxation on the epitope mapping by saturation transfer difference NMR*. J Magn Reson, 2003. **163**(2): p. 270-6.
52. Politi, M., et al., *Screening by NMR: A New Approach for the Study of Bioactive Natural Products? The Example of Pleurotus ostreatus Hot Water Extract*. European Journal of Organic Chemistry, 2005. **2005**(7): p. 1392-1396.
53. Mayer, M. and B. Meyer, *Characterization of Ligand Binding by Saturation Transfer Difference NMR Spectroscopy*. Angew Chem Int Ed Engl, 1999. **38**(12): p. 1784-1788.
54. Peng, X., et al., *Affinity of rosmarinic acid to human serum albumin and its effect on protein conformation stability*. Food Chem, 2016. **192**: p. 178-87.
55. Brito, E., et al., *Serum Albumin Modulates the Bioactivity of Rosmarinic Acid*. J Med Food, 2018. **21**(8): p. 801-807.
56. Peng, X., et al., *Deciphering the binding patterns and conformation changes upon the bovine serum albumin-rosmarinic acid complex*. Food Funct, 2015. **6**(8): p. 2712-26.
57. Sinisi, V., et al., *Interaction of chlorogenic acids and quinides from coffee with human serum albumin*. Food Chem, 2015. **168**: p. 332-40.

58. Liu, R., et al., *Study on the interaction between salvianic acid A sodium and bovine serum albumin by spectroscopic methods*. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2011. **78**(5): p. 1535-9.
59. Xiang, Y., et al., *Fluorescence spectroscopy and molecular simulation on the interaction of caffeic acid with human serum albumin*. Luminescence, 2016. **31**(8): p. 1496-1502.

Κεφάλαιο 3

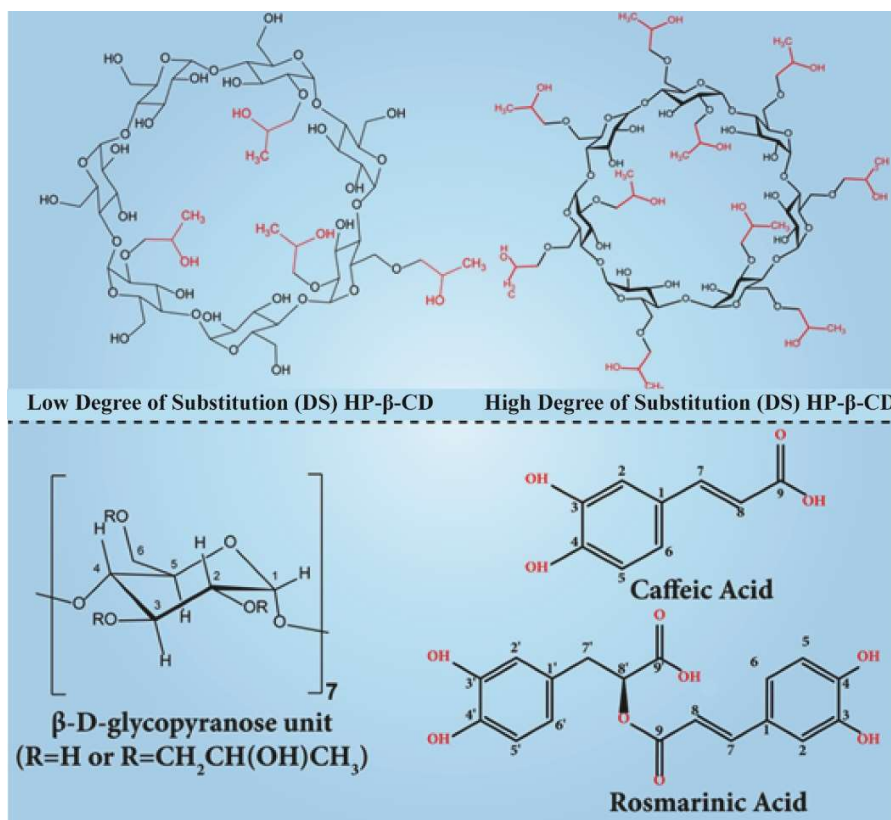
Μελέτη συμπλόκων μορφοποίησης και παράγωγων μορίων του ροσμαρινικού και καφεϊκού οξέος με στόχο την ενίσχυση της δραστικότητάς τους

3.1 Εισαγωγή

Το ροσμαρινικό και το καφεϊκό οξύ ανήκουν στην κατηγορία των πολυφαινολών, απαντώνται σε πολλά φυτικά είδη όπως το *Rosmarinus officinalis* και το *Eucalyptus globulus* και είναι ευρέως γνωστά για τη βιολογική τους δραστηριότητα η οποία συμπεριλαμβάνει τις ίσως περισσότερο μελετημένες αντιοξειδωτικές[1, 2], αλλά και αντιφλεγμονώδεις[3, 4], αντιδιαβητικές[5, 6] και νευροπροστατευτικές[7, 8] τους ιδιότητες. Ωστόσο, η αποτελεσματικότητα των δύο μορίων είναι περιορισμένη *in vivo* κυρίως λόγω της χαμηλής εντερικής τους απορρόφησης και του εκτενούς μεταβολισμού που υφίστανται. *In vitro* τα δύο φαινολικά οξέα έχουν μειωμένη ικανότητα διαπερατότητας μέσω των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων Caco-2[9, 10], ενώ λόγω των υδροξυλομάδων που περιέχουν, οι οποίες είναι επιρρεπείς στη γλυκουρονίδωση, τη μεθυλίωση και τη σουλφούρωση μεταβολίζονται σε μόρια που έχουν χαμηλότερη βιοδραστικότητα[10]. Αξίζει να σημειωθεί πως τα δύο φαινολικά οξέα μεταβολίζονται τόσο από ένζυμα του μικροβιώματος του εντερικού αυλού όσο και από ηπατικά[11]. Τα παραπάνω αποτελούν τους κύριους λόγους της περιορισμένης βιοδιαθεσιμότητάς τους. Η βιοδιαθεσιμότητα του ροσμαρινικού οξέος εκτιμήθηκε μόλις στο 0.91 % με 1.69 % μετά από *per os* χορήγηση του σε αρουραίους σε μονές δόσεις μέχρι και 50 mg kg⁻¹[12], ενώ αυτή του καφεϊκού οξέος, είναι επίσης χαμηλή αλλά υψηλότερη -14.7 % στους αρουραίους- από αυτή του ροσμαρινικού[9]. Τέλος, ένας ακόμη περιοριστικός παράγοντας είναι οι καρβοξυλικές ομάδες που διαθέτουν και τα δύο φαινολικά οξέα στις δομές τους, οι οποίες προσδίδουν αρνητικό φορτίο στα μόρια μειώνοντας έτσι την

ικανότητα τους να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη. Τα παραπάνω προβλήματα θα μπορούσαν να ξεπεραστούν με τη μορφοποίηση των ενώσεων ή και με τη δομική τους τροποποίηση.

Ένας τρόπος μορφοποίησης είναι η συμπλοκοποίηση των μορίων με κυκλοδεξτρίνες, μόρια κυκλικών ολιγοσακχαριτών που αποτελούνται από επαναλαμβανόμενες μονάδες α-D-γλυκοκυρανόζης (**Σχήμα 3.1**) συνδεδεμένες μεταξύ τους με α-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς. Η διάταξη τους στον χώρο έχει σχήμα κώνου, με τις υδροξυλομάδες να βρίσκονται εξωτερικά δημιουργώντας ένα υδρόφιλο περίβλημα και τους δεσμούς C-H, C-C και C-O-C να βρίσκονται εσωτερικά σχηματίζοντας μία εσωτερική, υδρόφοβη κοιλότητα[13]. Αυτή η διαμόρφωση τους, επιτρέπει τον εγκλεισμό υδρόφοβων μορίων στην εσωτερική τους κοιλότητα, που έχει ως αποτέλεσμα να αυξάνουν την υδατοδιαλυτότητα αλλά και να λειτουργούν ως προστατευτικό κέλυφος για τα μόρια αυτά. Έτσι, οι κυκλοδεξτρίνες χρησιμοποιούνται ευρέως εδώ και αρκετά χρόνια για την προστασία φαρμάκων από μεταβολικές τροποποιήσεις[14] αλλά και για την αύξηση της υδατοδιαλυτότητας τους που στοχεύει στην αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας τους[15]. Για τους ίδιους λόγους, οι κυκλοδεξτρίνες χρησιμοποιούνται και στα φυσικά προϊόντα, όπου για παράδειγμα μπορεί να αυξάνουν την υδατοδιαλυτότητα τους όπως στην περίπτωση της κερσετίνης[16] ή και να προστατεύουν πολυφαινόλες από την ενζυματική ή μη οξείδωση τους ενισχύοντας κατά αυτό τον τρόπο τη σταθερότητα τους[17]. Μία από τις ευρέως χρησιμοποιούμενες κυκλοδεξτρίνες είναι η 2-ύδροξυ-πρόπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη (2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin, HP-β-CD) η οποία αποτελείται από 7 μόρια γλυκοκυρανόζης όπου ύδροξυ-πρόπυλο- ομάδες έχουν υποκαταστήσει τις υδροξυλομάδες της κλασικής β-κυκλοδεξτρίνης. Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 3.1**, η υποκατάσταση (DS, Degree of Substitution) ποικίλλει από μόριο σε μόριο και έτσι τελικά προκύπτει ένα μίγμα μορίων HP-β-CD με διαφορετικές υποκαταστάσεις. Η χρήση της είναι διαδεδομένη καθώς μπορεί να σχηματίσει σύμπλοκα με υδρόφοβα μόρια αυξάνοντας τη διαλυτότητα τους[18] και δεν είναι τοξική ακόμα και σε μεγάλες δόσεις.



Σχήμα 3.1. Δομές της HP-β-CD με χαμηλό και υψηλό βαθμό υποκατάστασης (DS), της μονάδας της α-D-γλυκοκυρανόζης και του καφεϊκού και ροσμαρινικού οξέος.

Συγκεκριμένα, καθημερινή δόση της σε ποσότητα μικρότερη των 16 g δεν είναι τοξική[19]. Και το ροσμαρινικό και το καφεϊκό οξύ μπορούν να σχηματίζουν σύμπλοκα με την HP-β-CD[20, 21]. Ωστόσο, μέχρι στιγμής δεν έχουν μελετηθεί τα θερμοδυναμικά χαρακτηριστικά και ο τρόπος αλληλεπίδρασης τους σε δομικό επίπεδο. Αυτές οι πληροφορίες θα μπορούσαν να δώσουν απαντήσεις σε ερωτήματα όπως 1) εάν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο ίδιος τύπος κυκλοδεξτρίνης για τον εγκλεισμό δύο διαφορετικών φαινολικών οξέων, 2) εάν η αρχιτεκτονική των δύο συμπλόκων είναι παρόμοια εφόσον η δομή του καφεϊκού οξέος αποτελεί μέρος της δομής του ροσμαρινικού οξέος και 3) ποια είναι η ισχύς της πρόσδεσης και οι θερμοδυναμικές παράμετροι που χαρακτηρίζουν τα δύο σύμπλοκα. Για τον σκοπό αυτό, προετοιμάστηκαν τα δύο σύμπλοκα της HP-β-CD με το ροσμαρινικό και το καφεϊκό οξύ. Η φασματομετρία μαζών χρησιμοποιήθηκε για τον χαρακτηρισμό της στοιχειομετρίας τους, ενώ η θερμιδομετρία ισόθερμης

τιτλοδότησης (ITC) για την εύρεση της ισχύος των αλληλεπιδράσεων αλλά και των θερμοδυναμικών παραμέτρων. Τέλος, η φασματοσκοπία πυρηνικού συντονισμού (NMR) υγρής και στερεής κατάστασης χρησιμοποιήθηκε για τον χαρακτηρισμό της αρχιτεκτονικής των δύο αλληλεπιδράσεων σε τρισδιάστατο επίπεδο.

Όσον αφορά στην τροποποίηση της δομής των δύο φαινολικών οξέων, ίσως η «κάλυψη» του αρνητικού φορτίου της καρβοξυλομάδας να μπορούσε να ενισχύσει τη μεμβρανική τους διαπερατότητα και κατά συνέπεια και τη βιοδραστικότητα τους. Και σε αυτήν την περίπτωση η φύση με τους προχωρημένους μηχανισμούς που έχει εξελίξει προηγήθηκε συνθέτοντας ένα ανάλογο μόριο του καφεϊκού οξέος, τον φαινέθυλο εστέρα του καφεϊκού οξέος (Caffeic Acid Phenethyl Ester, CAPE) ο οποίος απαντάται σε πολλά φυτικά είδη αλλά και στην πρόπολη[22]. Το CAPE παρουσιάζει αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, χημειοπροστατευτικές και αντιδιαβητικές ιδιότητες[23-25]. Πέραν αυτών, το CAPE φαίνεται να έχει ισχυρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα και να εξουδετερώνει αποτελεσματικότερα τις ελεύθερες ρίζες συγκριτικά με το καφεϊκό οξύ[26]. Στην ίδια κατεύθυνση πραγματοποιήθηκε σύνθεση ανάλογων μορίων του ροσμαρινικού οξέος που φέρουν «καλυμμένη» την καρβοξυλομάδα τους είτε με εστεροποίηση είτε με αμίδωση. Τα ανάλογα αυτά είναι οι φαινέθυλο- και πρόπυλο-εστέρες του ροσμαρινικού οξέος και τα φαινέθυλο- και πρόπυλο- αμίδια του ροσμαρινικού οξέος. Τα τέσσερα αυτά ανάλογα και σε σύγκριση με το ροσμαρινικό οξύ αξιολογήθηκαν για τη βιοδραστικότητα τους και συγκεκριμένα για την ικανότητα τους να προστατεύουν κύτταρα από την επαγόμενη από το H₂O₂ βλάβη του DNA και την απόπτωση αλλά και να δεσμεύουν τον καταλυτικά ενεργό σίδηρο, ενώ η κυτταρική τους πρόσληψη εκτιμήθηκε μέσω της συνδυαστικής τεχνικής της φασματομετρίας μαζών τριπλού τετραπύλου συζευγμένης με υγρή χρωματογραφία υπερυψηλής απόδοσης (UHPLC-MS/MS).

3.2 Υλικά και Μέθοδοι

3.2.1 Υλικά

Το ροσμαρινικό οξύ ($\geq 98\%$) αγοράστηκε από την Carbosynth (USA) και το καφεϊκό οξύ ($\geq 98\%$) και η HP- β -CD ($MW \approx 1540 \text{ g mol}^{-1}$, 98%) από τη Sigma Aldrich (USA). Η σύνθεση των πρόπυλο- και φαινέθυλο- εστέρων και αμιδίων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του αρχικού μορίου, δηλαδή του ροσμαρινικού οξέος, όπως περιγράφεται στο άρθρο των Gerogianni et al.[27].

3.2.2 Προετοιμασία των συμπλόκων του ροσμαρινικού και του καφεϊκού οξέος με την HP- β -CD

Τα σύμπλοκα του ροσμαρινικού και του καφεϊκού οξέος με την HP- β -CD προετοιμάστηκαν μέσω ξήρανσης-ψύξης. Συγκεκριμένα, σε μίγμα 30 mg ροσμαρινικού οξέος και 229 mg HP- β -CD προστέθηκαν 20 mL dH₂O. Υπό τη συνεχή ανάδευση του αιωρήματος προστέθηκε σταδιακά υδροξείδιο του αμμωνίου έως ότου το pH να αποκτήσει τιμή μεταξύ 9-10. Τελικά, το προκύπτον διάλυμα ψύχθηκε στους -80 °C και λυοφιλοποιήθηκε. Η μοριακή αναλογία του ροσμαρινικού οξέος ως προς την κυκλοδεξτρίνη ήταν 1:2. Η ίδια διαδικασία ξήρανσης-ψύξης ακολουθήθηκε και για την παρασκευή του συμπλόκου του καφεϊκού οξέος με την HP- β -CD, χρησιμοποιώντας 30 mg καφεϊκού οξέος και 482 mg κυκλοδεξτρίνης έτσι ώστε να επιτευχθεί μοριακή αναλογία 1:2. Η προετοιμασία των συμπλόκων έλαβε χώρα στο Τμήμα Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών από την ερευνητική ομάδα της Καθηγήτριας κας Γεωργίας Βαλσαμής.

3.2.3 Χαρακτηρισμός των συμπλόκων του ροσμαρινικού και του καφεϊκού οξέος με την HP-β-CD μέσω φασματοσκοπίας NMR

3.2.3.1 Φασματοσκοπία NMR στερεής κατάστασης (ssNMR, solid-state NMR)

Η λήψη των φασμάτων ^{13}C NMR έγινε σε φασματογράφο τύπου Bruker 600 WB Avance I εξοπλισμένο με τον υποδοχέα δείγματος HX 4 mm MAS. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 310 K, ενώ εφαρμόστηκε περιστροφή μαγικής γωνίας στα 12 kHz. Για τη διέγερση των ^{13}C χρησιμοποιήθηκε μεταφορά πόλωσης μέσω γραμμικής διαβάθμισης. Ως προς την ανίχνευση, εφαρμόστηκε 100 kHz Spinal-64[28] πρωτονιακή αποσύζευξη. Ως σήμα αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το σήμα των ^{13}C της ομάδας -CH που λαμβάνεται σε φυσική αφθονία αδαμαντίνης στα 38.48 ppm. Οι λήψεις των φασμάτων πραγματοποιήθηκαν στο Goethe University Frankfurt από την ερευνητική ομάδα του Καθηγητή κ. Θωμά Μαυρομούστακου.

3.2.3.2 Φασματοσκοπία ^1H NMR υγρής κατάστασης

Τα πρωτονιακά φάσματα ^1H NMR σε διάλυμα καταγράφηκαν σε φασματογράφο τύπου Bruker AV 500 MHz Spectrometer, (Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany) στους 298 K και ο έλεγχος των πειραμάτων και η καταγραφή των αποτελεσμάτων έγιναν μέσω του λογισμικού Topspin 2.1 suite. Τόσο το ροσμαρινικό και το καφεϊκό οξύ όσο και τα σύμπλοκα τους με την HP-β-CD διαλύθηκαν σε D_2O με τελικό όγκο 600 μL . Η συγκέντρωση των αδέσμευτων φαινολικών οξέων ήταν 1 mM και η συγκέντρωση των συμπλόκων 10 mM. Το εύρος των φασμάτων ήταν 16.59331 Hz ενώ χρησιμοποιήθηκαν παλμικές ακολουθίες από τις βιβλιοθήκες της Bruker. Για τη λήψη του κάθε φάσματος χρησιμοποιήθηκαν 64 σαρώσεις και χρόνος εφησυχασμού 2 s.

3.2.3.3 Φασματοσκοπία 2D ^1H - ^1H NOESY

Τα φάσματα 2D ^1H - ^1H NOESY καταγράφηκαν σε φασματογράφο τύπου Bruker AV 500 MHz Spectrometer, (Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany) στους 298 K και ο έλεγχος των πειραμάτων και η καταγραφή των αποτελεσμάτων έγιναν μέσω του λογισμικού Topspin 2.1 suite. Ο χρόνος ανάμιξης και ο χρόνος εφησυχασμού ρυθμίστηκαν στα 300 ms και 2 s, αντίστοιχα. Τα δύο σύμπλοκα διαλύθηκαν σε 600 μL D_2O σε συγκέντρωση 10 mM.

3.2.4 Φασματομετρία μαζών πλήρους σάρωσης για τον χαρακτηρισμό των συμπλόκων του ροσμαρινικού και του καφεϊκού οξέος με την HP- β -CD

Το φασματόμετρο EVOQ™ Elite ER LC-TQ (Bruker, Germany) χρησιμοποιήθηκε για την πλήρη σάρωση των μοριακών ιόντων της HP- β -CD και των συμπλόκων της με το ροσμαρινικό και καφεϊκό οξύ. Μικρή ποσότητα (0.1 mg) από το καθένα σύμπλοκο διαλύθηκε σε dH_2O (LC-MS grade, Fisher) και εγχύθηκε απευθείας στο φασματόμετρο μέσω της αυτόματης σύριγγας eVol XR. Για τις μετρήσεις εφαρμόστηκε πηγή ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI, Electrospray Ionization), ορίστηκε δυναμικό στα -4000 V και θερμοκρασία 25 °C. Η θερμοκρασία του κώνου ρυθμίστηκε στους 300 °C και η ροή αερίου εκνέφωσης (N_2) στις 20 μονάδες. Το αέριο αποδιαλύτωσης ορίστηκε στις 20 μονάδες. Η καταγραφή και η επεξεργασία των φασμάτων διεξήχθη μέσω του λογισμικού MSWS 8.2 software από την Bruker.

3.2.5 Θερμιδομετρία Ισόθερμης Τιτλοδότησης (ITC)

Για την εκτίμηση της ισχύος και των θερμοδυναμικών παραμέτρων της αλληλεπίδρασης της HP- β -CD με το ροσμαρινικό και καφεϊκό οξύ χρησιμοποιήθηκε το θερμιδόμετρο MicroCal ITC₂₀₀ και για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων το λογισμικό Origin for Microcal ITC. Οι τιμές της σταθεράς σύνδεσης (K_a), της στοιχειομετρίας (N), της μεταβολής της ενθαλπίας (ΔH), και της μεταβολής της εντροπίας (ΔS) υπολογίστηκαν

απευθείας μέσω του λογισμικού. Η μεταβολή στην ελεύθερη ενέργεια του Gibbs υπολογίστηκε μέσω της εξίσωσης: $\Delta G^\circ = -RT \ln K$.

Η HP-β-CD (10 mM), το ροσμαρινικό και το καφεϊκό οξύ (1 mM) διαλύθηκαν σε dH₂O και τοποθετήθηκαν αντίστοιχα στην κυψελίδα δείγματος και στη σύριγγα. Τα πειράματα διεξήχθησαν στους 25 °C. Οι τιτλοδοτήσεις προγραμματίστηκαν μέσω του λογισμικού Origin for Microcal ITC με την καθεμία να έχει όγκο 2 μL εκτός από την αρχική που είχε όγκο 0.4 μL. Ο χρόνος μεταξύ των τιτλοδοτήσεων ορίστηκε στα 200 s, ενώ εφαρμόστηκε συνεχής ανάδευση στα 1000 rpm. Το DP ορίστηκε στα 6 μcal s⁻¹. Για να διορθωθεί το βασικό πείραμα και να αφαιρεθεί η επίδραση θερμικών φαινομένων που δεν προκαλούνται από τη βασική αλληλεπίδραση πραγματοποιήθηκαν πειράματα ελέγχου όπου η HP-β-CD τιτλοδοτήθηκε σε dH₂O. Τα πειράματα ελέγχου αφαιρέθηκαν από τα αρχικά δεδομένα και οι παράμετροι των αλληλεπιδράσεων υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας το μοντέλο μίας θέσης πρόσδεσης (one site model).

3.2.6 Κυτταροκαλλιέργεια

Τα T-λευχαιμικά κύτταρα Jurkat (ATCC, clone E6-1) καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, USA) εμπλουτισμένο με 10 % εμβρυϊκού ορού βοός (Fetal Bovine Serum, FBS) θερμικά απενεργοποιημένο (Gibco, USA), 2 mM γλουταμίνης και 100 units mL⁻¹ πενικιλίνης και 100 μg mL⁻¹ στρεπτομυκίνης (Gibco, USA). Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων γινόταν μέσω φυγοκέντρησης (250 g) και επαναιώρησης τους σε πυκνότητα 1.5 x 10⁶ κύτταρα/mL.

3.2.7 Τεχνική ηλεκτροφόρησης του DNA μεμονωμένων κυττάρων (Single Cell Gel Electrophoresis/Comet assay)

Η τεχνική της ηλεκτροφόρησης του DNA μεμονωμένων κυττάρων που είναι ευρέως γνωστή ως comet assay στοχεύει στην ανίχνευση του DNA που έχει υποστεί βλάβη. Αποτελείται από τα στάδια 1) του εγκλεισμού, όπου κύτταρα μονιμοποιούνται

σε αγαρόζη, 2) της λύσης, όπου με εφαρμογή διαλύματος άλατος υψηλής συγκέντρωσης και απορρυπαντικού προκαλείται το άνοιγμα των μεμβρανών και η αποικοδόμηση και απομάκρυνση των πρωτεϊνών, RNA και άλλων κυτταρικών συστατικών εκτός του πυρηνικού DNA το οποίο παραμένει εγκλωβισμένο στην πηκτή της αγαρόζης και συσκευασμένο σε μια πυρηνοειδή (nucleus-like) δομή, 3) τον εμποτισμό των δειγμάτων με αλκαλικό διάλυμα που προκαλεί τη μετουσίωση του DNA και συνεπώς την αποδιάταξη του σε μονόκλωνες αλυσίδες και 4) την ηλεκτροφόρηση του βάσει της οποίας διαχωρίζεται το DNA που δεν έχει υποστεί βλάβη από τα μικρότερα, κερματισμένα και προερχόμενα από βλάβες κομμάτια DNA. Τέλος, το DNA επισημαίνεται με χρωστική και τα δείγματα μπορούν να παρατηρηθούν μέσω μικροσκοπίου. Εφόσον τα κύτταρα έχουν υποστεί βλάβη στο DNA τους, το σύνολο των DNA αποκτούν έναν σχηματισμό που έχει τη μορφή κομήτη, στην κεφαλή του οποίου βρίσκεται οι ακέραιες μονόκλωνες αλυσίδες που δε μετακινήθηκαν κατά την ηλεκτροφόρηση ενώ στην «ουρά» του βρίσκονται τα μικρότερα τμήματα που δημιουργήθηκαν από βλάβη τα οποία λόγω μεγέθους παρασύρθηκαν ευκολότερα προς την άνοδο. Ο πληθυσμός/πυκνότητα των τελευταίων είναι ανάλογα του αριθμού των βλαβών που έχει υποστεί το DNA του κυττάρου.

Κύτταρα Jurkat (1.5×10^6 κύτταρα/mL) μεταφέρθηκαν σε τρυβλία 96 φρεατίων. Στη συνέχεια, επώαστηκαν με το ροσμαρινικό οξύ ή τους πρόπουλο- και φαινέθυλο-εστέρες ή αμίδια του. Στη συνέχεια προστέθηκε σε αυτά το ένζυμο οξειδάση της γλυκόζης (G.O) ($0.6 \mu\text{g mL}^{-1}$) για 10 λεπτά, που μπορεί να παράγει H_2O_2 με ρυθμό 10 $\mu\text{M}/\text{λεπτό}$. Ακολούθησε η συλλογή και πλύση των κυττάρων με ρυθμιστικό διάλυμα PBS και φυγοκέντρηση (400 g). Τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 100 μL διαλύματος αγαρόζης χαμηλού σημείου τήξεως (1% σε PBS) και μεταφέρθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες που καλύφθηκαν με καλυπτρίδα. Για την πήξη της αγαρόζης ακολούθησε επώαση στους 4°C για 10 λεπτά, ενώ έπειτα πραγματοποιήθηκε λύση των κυττάρων με διάλυμα 2.5 M NaCl, 0.1 M EDTA, 10 μM Tris (pH 10) και 1 % Triton-X 100 v/v για 60 λεπτά στους 4°C . Ακολούθησε η επώαση σε αλκαλικό ψυχρό διάλυμα αποδιάταξης (0.3 M NaOH, 1 mM EDTA, pH>13) για 40 λεπτά στους 4°C και έπειτα η ηλεκτροφόρηση στο ίδιο διάλυμα (30

V, 300 mA) για 30 λεπτά. Τέλος, τα δείγματα πλύθηκαν με PBS (3 x 5 λεπτά) και επισημάνθηκαν με τη χρωστική Hoechst 33342 (10 mg mL⁻¹) και εξετάσθηκαν σε μικροσκόπιο υπεριώδους ακτινοβολίας (UV microscope) με μήκος κύματος διέγερσης στα 490 nm. Η εκτίμηση βασίστηκε σε 100 τυχαίους σχηματισμούς. Κάθε σχηματισμός κατατάχθηκε σε μια από τις 5 τάξεις (0-4), που αναπαριστούν την αυξανόμενη έκταση της βλάβης του DNA. Έτσι η βαθμολογία που προκύπτει από το άθροισμα των βαθμών των 100 σχηματισμών σε ένα δείγμα μπορεί να κυμαίνεται από 0 έως 400. Με αυτό τον τρόπο η ολική βλάβη στο DNA ενός κυτταρικού πληθυσμού μπορεί να εκφραστεί σε αυθαίρετες μονάδες. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων από την ερευνητική ομάδα του Καθηγητή κ. Δημήτριου Γαλάρη.

3.2.8 Τεχνική UHPLC-MS/MS για την εκτίμηση της κυτταρικής πρόληψης

3.2.8.1. Θεωρητικό μέρος

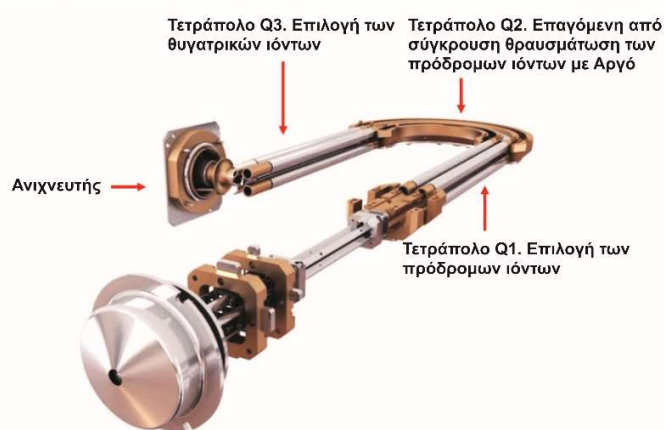
Η συνδυαστική τεχνική υγρής χρωματογραφίας υπερυψηλής απόδοσης συζευγμένης με φασματόμετρο μαζών τριπλού τετραπόλου (UHPLC-MS/MS) χρησιμοποιείται εκτενώς στην ανάπτυξη και αξιολόγηση μικρών μορίων λόγω της υψηλής εκλεκτικότητας και ευαισθησίας που διαθέτει. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση μικρών μορίων σε πολύπλοκα βιολογικά δείγματα, όπως πλάσμα αίματος, κυτταρικά εκχυλίσματα και ούρα. Σημαντική είναι η συνεισφορά της στην αξιολόγηση των φαρμακοκινητικών παραμέτρων ADME (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion), δηλ. της Απορρόφησης, της Κατανομής, του Μεταβολισμού και της Απέκκρισης αφού επιτρέπει την ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης ενός μορίου ή και των μεταβολιτών του τόσο στα βιολογικά υγρά όσο και στους ιστούς. Όπως φαίνεται από την ονομασία της, συνδυάζει δύο διαφορετικά συστήματα, αυτό της υγρής χρωματογραφίας, που διαχωρίζει τα συστατικά ενός δείγματος και αυτό της φασματομετρίας μαζών τριπλού τετραπόλου που ανιχνεύει και ταυτοποιεί τα επιθυμητά μοριακά ιόντα.

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) είναι μια αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό ουσιών από ένα μίγμα. Αποτελείται από την κινητή (mobile phase) και τη στατική φάση (stationary phase). Η κινητή φάση είναι το σύστημα διαλυτών που διαπερνά τη στήλη εκλούοντας τα συστατικά του δείγματος, ενώ η στατική φάση είναι η στήλη διαχωρισμού, όπου αρχικά κατακρατούνται τα συστατικά του δείγματος. Η τελευταία αποτελείται από μικροπορώδη σωματίδια πηκτής διοξειδίου του πυριτίου (silica gel) που μπορεί να φέρουν τροποποιήσεις ανάλογα με το είδος της έκλυσης και της φύσης των υπό μελέτη μορίων. Όταν η στατική φάση είναι περισσότερο πολική από την κινητή η HPLC χαρακτηρίζεται ως κανονικής φάσης (normal phase). Αντίστροφα, στην ανάλυση μη πολικών μορίων χρησιμοποιείται η χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (reversed phase) ώστε τα μη πολικά μόρια να κατακρατούνται περισσότερο σε σχέση με τα πολικά από την υδρόφοβη στατική φάση και στη συνέχεια να εκλούνται με την πολική κινητή φάση. Παράμετροι όπως η θερμοκρασία, η ταχύτητα ροής (flow rate) των διαλυτών, η φύση του διαλύτη, το μήκος της στήλης και το μέγεθος των σωματιδίων της μπορούν να επηρεάσουν την κατακράτηση, το διαχωρισμό και την έκλυση του υπό μελέτη μορίου και έτσι ελέγχονται, προσαρμόζονται και βελτιστοποιούνται σε κάθε νέα μέθοδο. Στην παρούσα διατριβή, χρησιμοποιήθηκε σύστημα υγρής χρωματογραφίας υπέρυψηλης απόδοσης (UHPLC, Ultra High Performance Liquid Chromatography), στο οποίο εφαρμόζονται υψηλότερες πιέσεις συγκριτικά με την HPLC με αποτέλεσμα η ανάλυση των δειγμάτων να γίνεται σε μικρότερο χρόνο. Ταυτόχρονα, χρησιμοποιούνται στήλες μικρότερες σε μήκος και «φορτωμένες» με σωματίδια σίλικας μικρότερου μεγέθους, χαρακτηριστικά που οδηγούν σε μικρότερο χρόνο έκλυσης και μεγάλο βαθμό διαχωρισμού, αντίστοιχα.

Η φασματομετρία μαζών είναι μια σύγχρονη αναλυτική τεχνική, που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και ταυτοποίηση χημικών μορίων. Κατά τη μελέτη ενός μορίου προκύπτουν ιόντα σε αέρια φάση (μοριακά ιόντα), τα οποία στη συνέχεια αναλύονται βάσει του λόγου m/z (mass to charge ratio). Τα μοριακά ιόντα μπορεί να είναι φορτισμένα θετικά (με απομάκρυνση e^-) ή αρνητικά (με προσθήκη e^-). Ένα φασματόμετρο μαζών αποτελείται από την πηγή ιονισμού (ionization source), όπου

σηματίζονται τα μοριακά ιόντα του υπό μελέτη μορίου, τον αναλυτή (analyzer), όπου τα ιόντα διαχωρίζονται βάσει του λόγου m/z και τον ανιχνευτή (detector), όπου τα ιόντα ανιχνεύονται βάσει της αφθονίας τους και του λόγου m/z . Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η τεχνική ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό κατά την οποία εφαρμόζονται στο δείγμα ηλεκτρικό δυναμικό και αέρια εκνέφωσης ώστε από ένα δείγμα σε υγρή κατάσταση να προκύψουν τα μοριακά ιόντα σε αέρια φάση. Αναλυτικά, το δείγμα διέρχεται μέσω ενός τριχοειδούς στο οποίο εφαρμόζεται διαφορά δυναμικού και αέριο εκνέφωσης (N_2) που έχει σαν αποτέλεσμα να παράγεται ένα νέφος φορτισμένων σταγονιδίων (αερόλυμα). Στη συνέχεια και ενώ τα σταγονίδια μεταβαίνουν στον αναλυτή εφαρμόζεται αέριο αποδιαλύτωσης (N_2) που οδηγεί σε περαιτέρω εξάτμιση του διαλύτη. Στην αποδιαλύτωση των σταγονιδίων συμβάλλουν και ρυθμιζόμενες υψηλές θερμοκρασίες (heated probe, cone). Τα παραπάνω προκαλούν σταδιακή μείωση του όγκου των σταγονιδίων μέχρι τα μοριακά ιόντα να απεγκλωβιστούν λόγω απωστικών δυνάμεων μεταξύ των φορτίων τους (Coulomb explosion) και να περάσουν στην αέρια κατάσταση. Στη συνέχεια τα ιόντα περνούν στον αναλυτή. Ο αναλυτής που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή είναι τετραπολικός προσφέροντας υψηλή ευαισθησία και εκλεκτικότητα στον προσδιορισμό των μορίων. Αποτελείται από τρία τετράπολα, καθένα από τα οποία περιλαμβάνει τέσσερα κυλινδρικά ηλεκτρόδια. Δυναμικό συνεχούς ρεύματος (Direct current, DC) εφαρμόζεται ανά δύο ηλεκτρόδια, ενώ ένα δυναμικό εναλλασσόμενου ρεύματος (radio frequency voltage, RF) εφαρμόζεται στα δύο δυναμικά συνεχούς ρεύματος. Ένα ιόν που εισέρχεται στο τετράπολο κατευθύνεται προς το ηλεκτρόδιο με το αντίθετο φορτίο. Καθώς αλλάζουν τα δυναμικά που εφαρμόζονται αλλάζει και η κατεύθυνση του ιόντος, πάντοτε προς τα ηλεκτρόδια με το αντίθετο φορτίο. Έτσι, με αυτή την ταλαντευόμενη κίνηση που καθορίζεται από τη συνισταμένη των δυναμικών επιτυγχάνεται η διέλευση του μέσα από το τετράπολο και συνεπώς «φιλτράρεται». Τα δύο δυναμικά συνεχούς ρεύματος και το εναλλασσόμενο καθορίζουν κάθε φορά το m/z που θα πρέπει να έχουν τα μοριακά ιόντα για να περάσουν από το τετράπολο. Τα ιόντα με μεγαλύτερο ή μικρότερο m/z εκτρέπονται και αποφορτίζονται. Για την ανάλυση του ροσμαρινικού οξέος και των παραγώγων του

χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της επιλεκτικής παρακολούθησης πολλαπλών αντιδράσεων θραυσμάτωσης ιόντων (Multiple Reaction Monitoring, MRM). Έτσι, τα μοριακά ιόντα εισέρχονται στο πρώτο τετράπολο Q1. Από αυτό επιτυγχάνεται η διέλευση μόνον αυτών που έχουν το επιθυμητό m/z και αντιστοιχούν στο υπό μελέτη μόριο (πρόδρομα ιόντα, precursor ions). Έπειτα, τα πρόδρομα ιόντα εισέρχονται στο δεύτερο τετράπολο Q2, όπου πραγματοποιείται η διάσπαση τους μέσω θραυσματοποίησης (Collision Induced Dissociation, CID) και με την εφαρμογή αερίου αργού (Ar). Τα θραύσματα που προκύπτουν ονομάζονται θυγατρικά ιόντα και η ενέργεια που χρησιμοποιείται ενέργεια θραυσματοποίησης (collision energy). Τα θυγατρικά ιόντα που προκύπτουν περνούν στο τετράπολο Q3 όπου αναλύονται και τελικά ανιχνεύονται από τον ανιχνευτή (Σχήμα 3.2). Αυτό το είδος σάρωσης πρόδρομων και θυγατρικών ιόντων αυξάνει την ευαισθησία της μεθόδου καθώς ο τετραπολικός αναλυτής και ο ανιχνευτής επικεντρώνονται σε ιόντα με συγκεκριμένο m/z , ενώ παράλληλα αυξάνει και την εκλεκτικότητα αφού η θραυσματοποίηση από το πρόδρομο ιόν στα θυγατρικά του ιόντα αποτελεί ξεχωριστό χαρακτηριστικό για κάθε μόριο.



Σχήμα 3.2. Διάταξη τριπλού τετραπόλου. Το σχήμα αποτελεί τροποποιημένη εικόνα από το εγχειρίδιο χρήσης της Bruker Daltonics.

3.2.8.2. Πειραματικό μέρος

Για τον διαχωρισμό των μορίων χρησιμοποιήθηκε το σύστημα υγρής χρωματογραφίας υπέρυψης απόδοσης Bruker Advance UHPLC system (Bruker, Germany). Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε η στήλη Kinetex C18 100mm × 2.1 mm, 2.6 μm (Phenomenex, USA) η οποία ρυθμίστηκε σε θερμοκρασία 40 °C. Η κινητή φάση αποτελείτο από H₂O (LC MS grade) και ACN (LC MS grade) με 0.1% μυρμηκικού οξέος. Ο διαχωρισμός έγινε μέσω βαθμιδωτής έκλουσης με σταθερή ταχύτητα ροής 250 μL min⁻¹ ξεκινώντας με ACN 5%, συνεχίζοντας με τη διαδοχική του αύξηση στο 100 % εντός 2 λεπτών, διατηρώντας το ACN σε ποσοστό 100 % για 2 λεπτά και τέλος μειώνοντας το σταδιακά σε 5 % μέχρι το τέλος της μεθόδου. Η διάρκεια του χρόνου ανάλυσης ήταν 5 λεπτά.

Για την ανίχνευση των μορίων χρησιμοποιήθηκε το τριπλό τετράπολο φασματομετρίας μαζών EVOQ Elite ER (Bruker Daltonics, Germany) σε λειτουργία αρνητικού ιονισμού. Το δυναμικό κώνου ορίστηκε στα - 5000 V και οι θερμοκρασίες στην πηγή ιονισμού και στον κώνο στους 300 και 350 °C, αντίστοιχα. Οι ροές αερίου εκνέφωσης και αποδιαλύτωσης ρυθμίστηκαν στις 20 και 50 μονάδες, αντίστοιχα. Αρχικά, ελήφθη φάσμα μαζών σε λειτουργία σάρωσης (Full scan) για τον πρώτο αναλυτή μαζών (Q1 quadrupole), ώστε να επιτρέπεται η διέλευση των πρόδρομων ιόντων. Με τον τρόπο αυτό βρέθηκε το πρόδρομο ιόν του εκάστοτε μορίου. Στη συνέχεια μέσω της εφαρμογής MRM builder, εισήχθη η ευρεθείσα τιμή m/z του πρόδρομου ιόντος, ενεργοποιήθηκε το αέριο θραυσματοποίησης (Ar) και εκτελέστηκε σάρωση θυγατρικού ιόντος (product ion scan), με τον πρώτο αναλυτή (Q1) ρυθμισμένο στην προεπιλεγμένη τιμή m/z και τον δεύτερο αναλυτή (Q2) σε λειτουργία σάρωσης, έτσι ώστε να θραυσματοποιηθεί το πρόδρομο ιόν. Μέσω του τρίτου αναλυτή (Q3) επιλέχθηκαν και απομονώθηκαν τα επιθυμητά θυγατρικά ιόντα. Τα πρόδρομα και θυγατρικά ιόντα για τα ροσμαρινικό οξύ, πρόπυλο-αμίδιο του ροσμαρινικού οξέος, φαινέθυλο-αμίδιο του ροσμαρινικού οξέος, πρόπυλο-εστέρα του ροσμαρινικού οξέος και φαινέθυλο-εστέρα του ροσμαρινικού οξέος ήταν m/z 359→161, m/z 400→178.9, m/z 462→179, m/z 401→179 και 463.1→179,

αντίστοιχα. Τα δεδομένα συλλέχθηκαν και επεξεργάστηκαν μέσω του λογισμικού MSWS 8.2 (Bruker, Germany).

Για την εκτίμηση της κυτταρικής πρόσληψης κύτταρα Jurkat (3×10^6 κύτταρα/φρεάτιο) μεταφέρθηκαν σε πιάτα 6 φρεατίων. Την επόμενη μέρα προστέθηκαν σε αυτά το ροσμαρινικό οξύ ή τα τέσσερα παράγωγα του σε συγκέντρωση 50 μM και αφέθηκαν για επώαση για 5, 10, 20, 30 και 60 λεπτά. Ακολούθησε η συλλογή των κυττάρων και η διπλή πλύση τους με PBS, ενώ στη συνέχεια προστέθηκε στο κάθε δείγμα διάλυμα (ACN:dH₂O) σε αναλογία (3:1 v/v) με στόχο τη λύση των κυττάρων. Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν (14,000 g για 20 min) και ακολούθησε η εξάτμιση του διαλύτη υπό κενό (Speedvac SPD1010, Thermoscientific, USA). Τέλος, πραγματοποιήθηκε ανασύσταση των δειγμάτων σε διάλυμα κινητής φάσης ACN:dH₂O (25%:75% v/v) ενώ 2 μL από το κάθε δείγμα ενέθηκαν μέσω του αυτόματου συστήματος PAL (CTC Analytics AG, Switzerland) στο σύστημα UHPLC-MS/MS. Για να ληφθούν τα φάσματα της θεωρητικής εξ'ολοκλήρου πρόσληψης των ποσοτήτων των πέντε μορίων (100 % πρόσληψη) ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με τη μόνη διαφορά πως οι ουσίες προστέθηκαν μετά τη λύση των κυττάρων.

3.2.9 Κυτταρομετρία ροής για τον έλεγχο της απόπτωσης

Για την εκτίμηση της απόπτωσης κύτταρα Jurkat (1.5×10^6 κύτταρα/φρεάτιο) μεταφέρθηκαν σε πιάτα καλλιέργειας 6 φρεατίων. Στη συνέχεια επώαστηκαν με το ροσμαρινικό οξύ ή τα παράγωγα μόρια του για 30 λεπτά και έπειτα προστέθηκε σε αυτά H₂O₂ σε συγκέντρωση 250 μM . Μετά από 7 ώρες τα κύτταρα συλλέχθηκαν, μετρήθηκαν και επαναιωρήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα πρόσδεσης (10 mM HEPES, pH = 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂) και σε τελική πυκνότητα 10^5 κύτταρα/100 μL . Σε αυτά προστέθηκαν 5 μL αννεξίνης (Annexin V-Fluorescein isothiocyanate) και 5 μL από 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ιωδιούχου προπιδίου (PI, Propidium Iodide) και επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Η αννεξίνη στοχεύει τη φωσφατιδυλοσερίνη, φωσφολιπίδιο που βρίσκεται εσωτερικά της κυτταρικής μεμβράνης αλλά κατά την απόπτωση μεταφέρεται στην επιφάνεια της. Η αννεξίνη είναι επισημασμένη με τη χρωστική φλουορεσκεΐνη έτσι

ώστε να είναι δυνατός ο εντοπισμός της. Το ιωδιούχο προπίδιο είναι χρωστική με ικανότητα πρόσδεσης στο DNA που όμως δεν μπορεί να εισέλθει στα ζώντα κύτταρα. Για την είσοδο του στα κύτταρα απαιτείται η λύση της μεμβράνης, γι' αυτό και χρησιμοποιείται για τη χρώση των νεκρωτικών κυττάρων. Η παρουσία των δύο χρωστικών εκτιμήθηκε μέσω του κυτταρόμετρου ροής Partec ML (Partec GmbH, Germany). Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων από την ερευνητική ομάδα του Καθηγητή κ. Δημήτριου Γαλάρη.

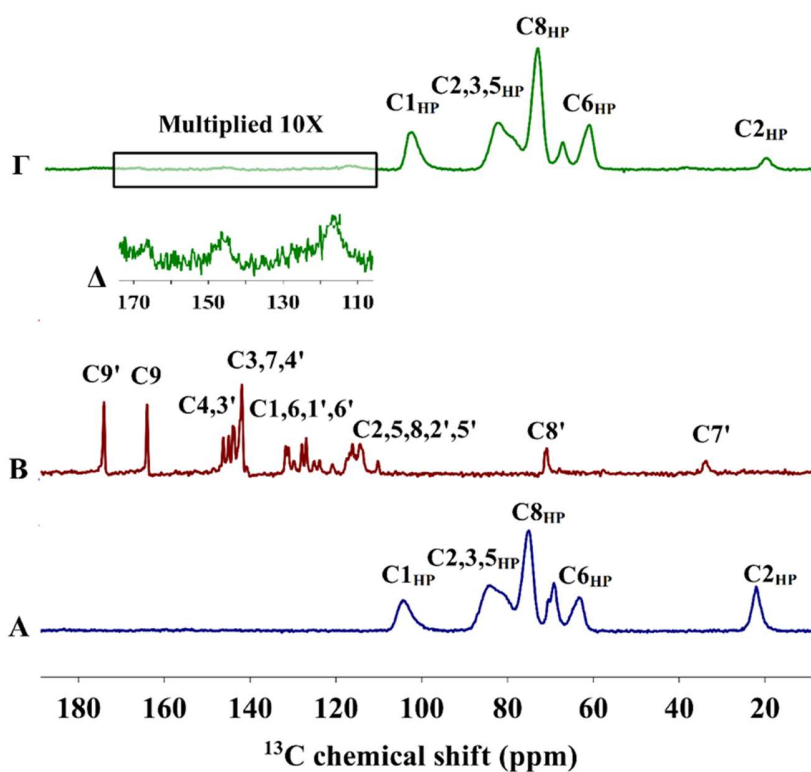
3.2.10 Μέτρηση του ενδοκυττάρου καταλυτικά ενεργού σιδήρου

Η μέτρηση του καταλυτικά ενεργού σιδήρου πραγματοποιήθηκε μέσω της μέτρησης του φθορισμού της καλσεΐνης-AM (ακετομεθόξυ-εστέρας της καλσεΐνης)[29]. Αρχικά, συλλέχθηκαν κύτταρα Jurkat (1.5×10^5 κύτταρα/mL), φυγοκεντρήθηκαν (250 g) και επαναιωρήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS που περιείχε 1 mg mL^{-1} της πρωτεΐνης BSA, 20 mM HEPES (pH=7.3) και καλσεΐνη-AM (0.15 M) και επώαστηκαν για 10 λεπτά στους 37 °C. Έπειτα, επαναιωρήθηκαν στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα χωρίς όμως την καλσεΐνη-AM. Η καλσεΐνη-AM με την είσοδο της στα κύτταρα ξεκινά να φθορίζει καθώς οι εστερικές της ομάδες υδρολύονται μέσω των ενδοκυττάρων εστερασών και μετατρέπεται στην καλσεΐνη η οποία συσσωρεύεται εντός των κυττάρων. Ταυτόχρονα, η ένταση του φθορισμού της καλσεΐνης μειώνεται καθώς δεσμεύει ιόντα σιδήρου. Ο φθορισμός της μετρήθηκε τοποθετώντας το εναιώρημα των κυττάρων σε θερμοστατούμενη κυψελίδα στους 37 °C υπό ανάδευση σε φθορισμόμετρο (F-2500 Hitachi). Τα μήκη κύματος διέγερσης και φθορισμού ήταν 488 και 517 nm, αντίστοιχα. Στη συνέχεια, προστέθηκε για 5 λεπτά ο SIH (Salicylaldehyde Isonicotinoyl Hydrazone) που δεσμεύει τα ιόντα σιδήρου ισχυρότερα από την καλσεΐνη με αποτέλεσμα να τα αποσπά από αυτήν και κατά συνέπεια να αυξάνεται ο φθορισμός της. Η προκύπτουσα αύξηση στο φθορισμό της καλσεΐνης αντανακλά τον καταλυτικά ενεργό σίδηρο. Το ροσμαρινικό οξύ και τα τέσσερα παράγωγα του προστέθηκαν πριν την προσθήκη του SIH. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων από την ερευνητική ομάδα του Καθηγητή κ. Δημήτριου Γαλάρη.

3.3 Αποτελέσματα

Μέρος Α: Χαρακτηρισμός των συμπλόκων του ροσμαρινικού και καφεϊκού οξέος με την HP-β-CD

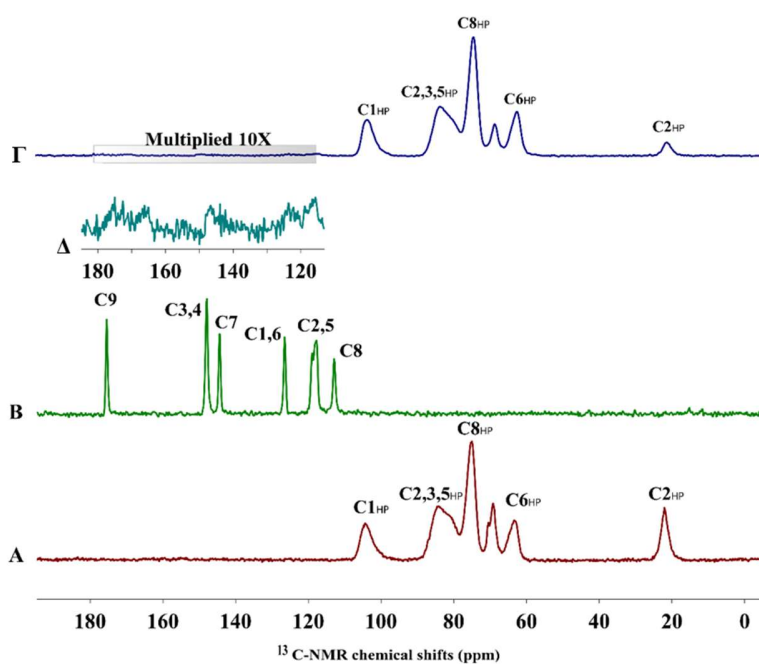
3.3.1 Χαρακτηρισμός των συμπλόκων του ροσμαρινικού και καφεϊκού οξέος με την HP-β-CD με χρήση NMR



Εικόνα 3.1. Φάσματα ^{13}C NMR A) της HP-β-CD, B) του ροσμαρινικού οξέος και Γ) του συμπλόκου αυτών. Δ) Η αρωματική περιοχή του συμπλόκου με μεγέθυνση 10X.

Τα σύμπλοκα της HP-β-CD με το ροσμαρινικό και καφεϊκό οξύ χαρακτηρίστηκαν μέσω φασματοσκοπίας NMR στερεής κατάστασης. Στις Εικόνες 3.1 και 3.2 παρατίθενται για κάθε περίπτωση τα ^{13}C NMR φάσματα της κυκλοδεξτρίνης, του ελεύθερου ροσμαρινικού/καφεϊκού οξέος και του συμπλόκου. Όσον αφορά στο σύμπλοκο HP-β-CD

– ροσμαρινικού οξέος (**Εικόνα 3.1Γ**), παρατηρείται μετατόπιση στις κορυφές των ^{13}C της κυκλοδεξτρίνης. Επίσης, οι κορυφές που αντιστοιχούν στο ροσμαρινικό οξύ έχουν διευρυνθεί σημαντικά, όπως παρατηρείται και σε ανάλογες περιπτώσεις στη βιβλιογραφία[30], υποδηλώνοντας πως η κινητικότητα του μορίου έχει μειωθεί εξαιτίας της συμπλοκοποίησης. Το γεγονός ότι διευρύνονται όλες οι κορυφές του ροσμαρινικού οξέος έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα των Medronho et al.[31], που εμφανίζουν μόνο ένα τμήμα του μορίου να εισάγεται στη β -CD. Μεταξύ των κορυφών

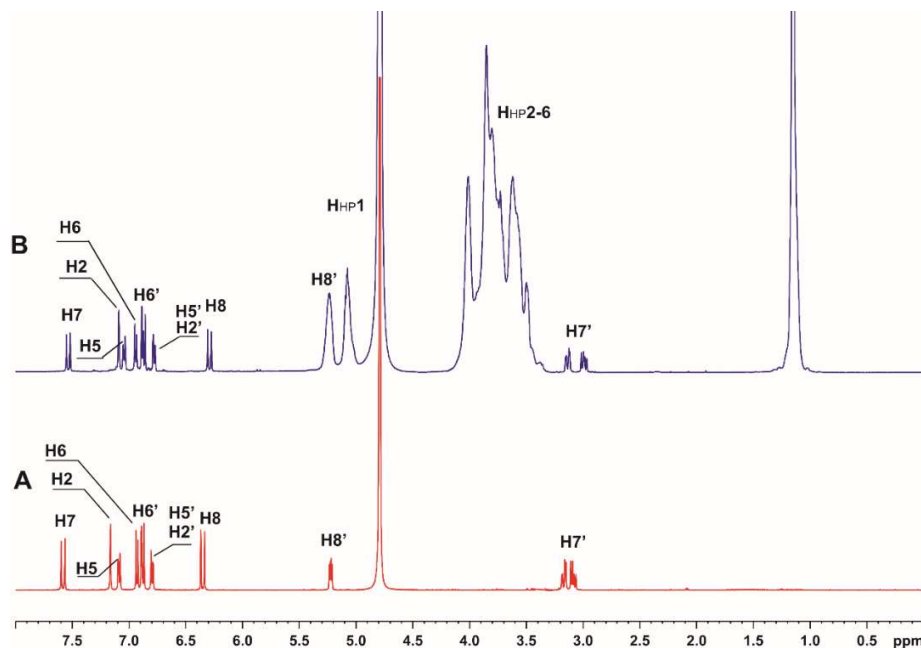


Εικόνα 3.2. Φάσματα ^{13}C NMR **A)** της HP- β -CD, **B)** του καφεϊκού οξέος και **Γ)** του συμπλόκου αυτών. **Δ)** Η αρωματική περιοχή του συμπλόκου με μεγέθυνση 10X.

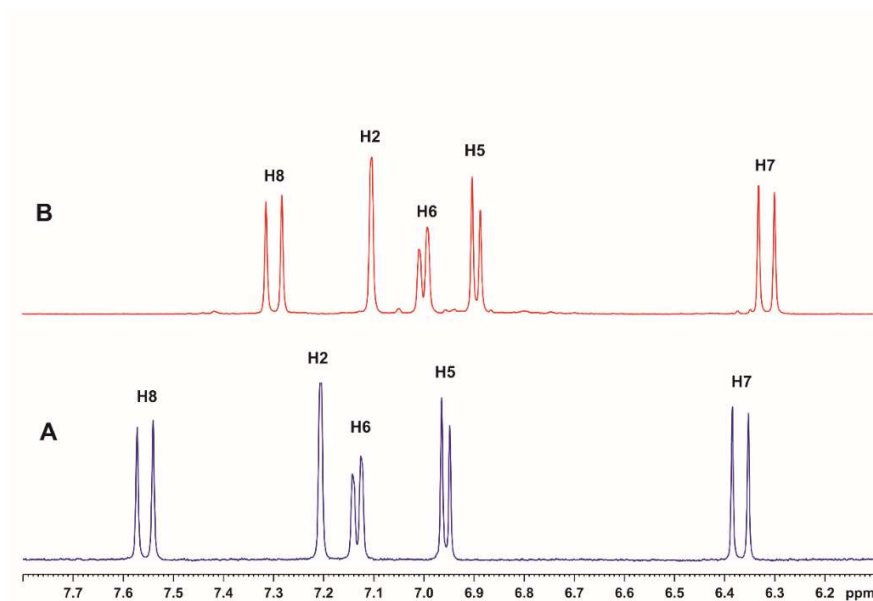
της HP- β -CD παρατηρείται διεύρυνση μόνο στην C2_{HP} . Τα φάσμα του συμπλόκου της HP- β -CD με το καφεϊκό οξύ παρουσίασε το ίδιο μοτίβο αλλαγών (**Εικόνα 3.2Γ**). Διεύρυνση παρατηρήθηκε στις κορυφές του καφεϊκού οξέος αλλά και στην κορυφή C2_{HP} της κυκλοδεξτρίνης.

Στη συνέχεια η συμπλοκοποίηση των δύο μορίων με την HP- β -CD επιβεβαιώθηκε και μέσω της λήψης πρωτονιακών ^1H -NMR φασμάτων σε διάλυμα. Και στα δύο

σύμπλοκα παρατηρήθηκαν μετατοπίσεις σε περισσότερο προασπισμένες περιοχές στα πρωτόνια του ροσμαρινικού και του καφεϊκού οξέος λόγω του εγκλεισμού τους στην κυκλοδεξτρίνη. Συγκεκριμένα, οι μεγαλύτερες μετατοπίσεις προκλήθηκαν στα πρωτόνια H2, H8 και H8' του ροσμαρινικού οξέος (**Εικόνα 3.3**) και στα πρωτόνια H6 και H8 του καφεϊκού οξέος (**Εικόνα 3.4**). Οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων της HP-β-CD συμφωνούν με αυτές που παρουσιάζονται στη βιβλιογραφία[32].

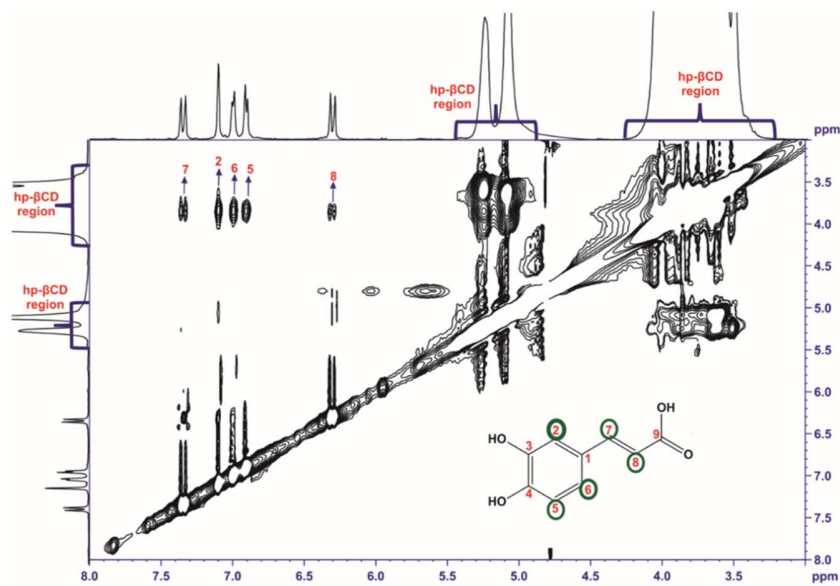


Εικόνα 3.3. Φάσματα ¹H-NMR **A**) του ελεύθερου ροσμαρινικού οξέος (1 mM) και του **B**) συμπλόκου του με την HP-β-CD (10 mM) σε D₂O στους 298 K. Η μεγάλης έντασης κορυφή που εμφανίζεται στο 1 ppm αντιστοιχεί στα πρωτόνια των μεθυλομάδων των υδροξυ-πρότυλο περιοχών της κυκλοδεξτρίνης.

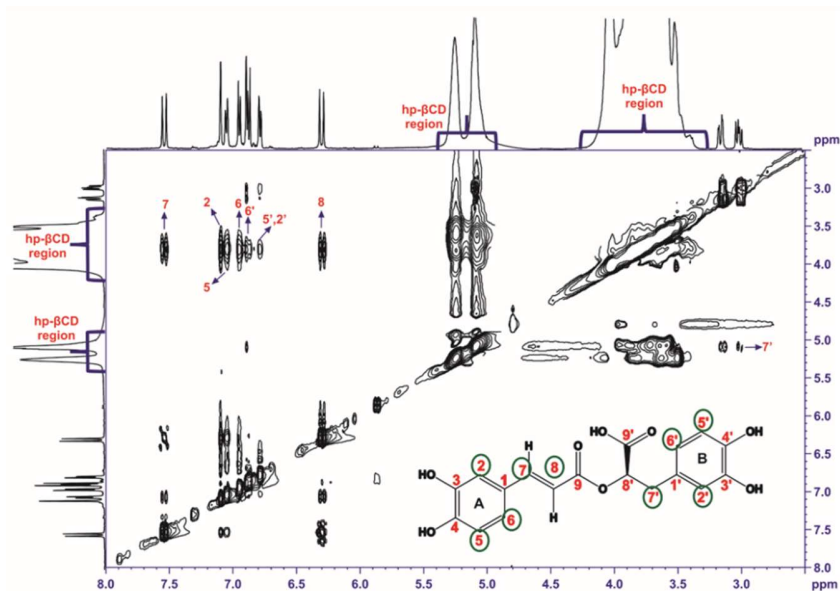


Εικόνα 3.4. Επιλεγμένη περιοχή των φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ **A)** του ελεύθερου καφεϊκού οξέος (1 mM) σε D_2O και **B)** του συμπλόκου του με την HP- β -CD (10 mM) σε D_2O στους 298 K.

Τέλος, για να εξετασθεί η αλληλεπίδραση του ροσμαρινικού και του καφεϊκού οξέος με την HP- β -CD εφαρμόστηκε στα σύμπλοκα η τεχνική $^1\text{H-}^1\text{H}$ 2D NOESY NMR (Εικόνες 3.5 και 3.6). Και στις δύο περιπτώσεις εμφανίζονται σήματα NOE μεταξύ των αρωματικών πρωτονίων H2, H5 και H6 του ροσμαρινικού/καφεϊκού οξέος και των $\text{H}_{\text{HP}2-6}$ της κυκλοδεξτρίνης. Με τα ίδια πρωτόνια της HP- β -CD εμφανίζουν έντονες κορυφές και τα H7 και H8 πρωτόνια των μορίων. Στο ροσμαρινικό οξύ τα πρωτόνια H2', H5' και H6' επίσης φαίνεται να αλληλεπιδρούν με τα πρωτόνια $\text{H}_{\text{HP}2-6}$ της κυκλοδεξτρίνης αν και τα NOE έχουν ασθενέστερο σήμα. Βάσει των παραπάνω, φαίνεται πως τα δύο φαινολικά οξέα εισάγονται ολόκληρα στην υδρόφοβη κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης.



Εικόνα 3.5. Φάσμα 2D ^1H - ^1H NOESY NMR του συμπλόκου του καφεϊκού οξέος με την HP- β -CD σε D_2O με χρόνο ανάμιξης 300 ms. Τα πρωτόνια του καφεϊκού οξέος που εμφανίζουν σήματα NOE με την HP- β -CD υποδεικνύονται είναι κυκλωμένα με πράσινο χρώμα.

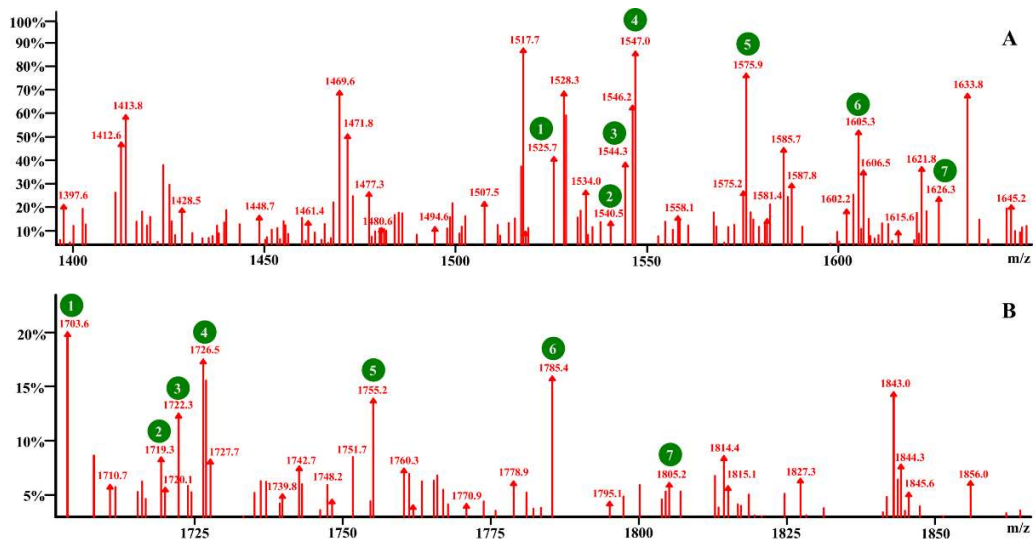


Εικόνα 3.6. Φάσμα 2D ^1H - ^1H NOESY NMR του συμπλόκου του ροσμαρινικού οξέος με την HP- β -CD σε D_2O με χρόνο ανάμιξης 300 ms. Τα πρωτόνια του ροσμαρινικού οξέος που

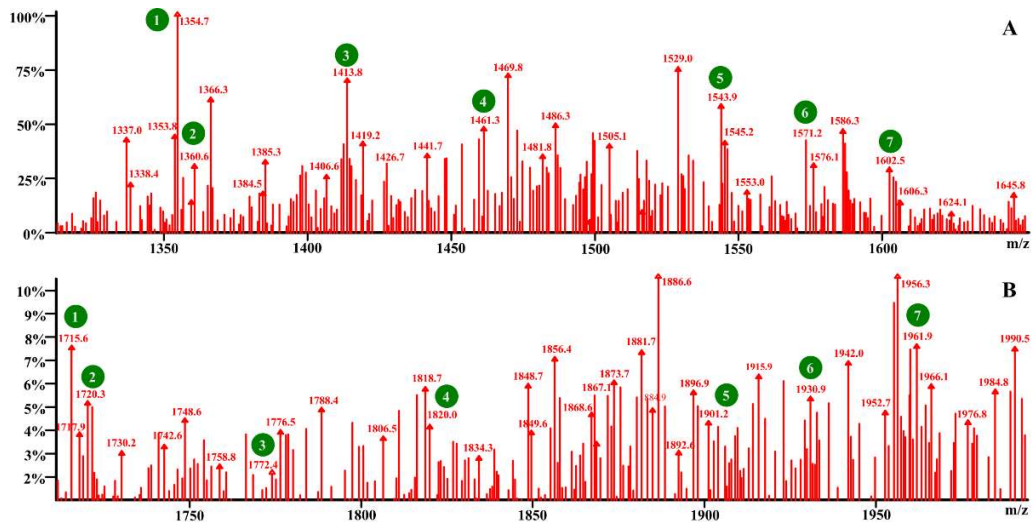
εμφανίζουν σήματα NOE με την HP-β-CD υποδεικνύονται είναι κυκλωμένα με πράσινο χρώμα. Οι αντίστοιχες κορυφές κάτω από τη διαγώνιο δεν παρουσιάζονται καθώς έχει προστεθεί η χημική δομή του ροσμαρινικού οξέος.

3.3.2 Χαρακτηρισμός των συμπλόκων του ροσμαρινικού και καφεϊκού οξέος με την 2-HP-β-CD μέσω φασματομετρίας μαζών

Η φασματομετρία μαζών με ιονισμό ηλεκτροψεκασμού ESI (Electrospray Ionization) χρησιμοποιώντας λειτουργία πλήρους σάρωσης εφαρμόστηκε για τη μελέτη του σχηματισμού των συμπλόκων. Υπενθυμίζεται πως η HP-β-CD είναι ένα ετερογενές μίγμα από κυκλοδεξτρίνες τύπου β που περιέχουν διαφορετικό αριθμό ύδροξυ-πρότυλο υποκαταστάσεων. Γι' αυτόν το λόγο, τα μοριακά τους βάρη διαφέρουν και το τελικό μίγμα χαρακτηρίζεται από το μέσο μοριακό βάρος. Είναι λοιπόν αναμενόμενη η εμφάνιση πολλών διαφορετικών μοριακών ιόντων που αντιστοιχούν στα μόρια κυκλοδεξτρινών με διαφορετικές υποκαταστάσεις. Κατ' επέκταση, το ίδιο προκύπτει και στα σύμπλοκα τους με το ροσμαρινικό και το καφεϊκό οξύ. Δηλαδή εμφανίζονται πολλές κορυφές με το m/z που τους αντιστοιχεί να αντικατοπτρίζει το m/z του φαινολικού οξέος συν αυτού της κυκλοδεξτρίνης με διαφορετική υποκατάσταση κάθε φορά. Στην **Εικόνα 3.7** παρατηρούνται τα φάσματα της καθαρής HP-β-CD και του συμπλόκου αυτής με το καφεϊκό οξύ. Στο φάσμα του συμπλόκου παρατηρούνται πολλές κορυφές με m/z 1703.6, 1719.3, 1722.3, 1726.5, 1755.2, 1785.4 και 1805.2 οι οποίες αντιστοιχούν στις κορυφές με m/z 1525.7, 1540.5, 1544.3, 1547, 1575.9, 1605.3 and 1626.3 της ελεύθερης κυκλοδεξτρίνης εάν αφαιρεθεί η τιμή m/z του καφεϊκού οξέος. Παρομοίως, το ίδιο μοτίβο παρατηρείται και στο σύμπλοκο του ροσμαρινικού οξέος με την HP-β-CD (**Εικόνα 3.8**) όπου οι κορυφές με m/z 1715.6, 1720.3, 1772.4, 1820, 1901.2, 1930.9 and 1961.9 αντιστοιχούν σε αυτές με m/z 1354.7, 1360.6, 1413.8, 1461.3, 1543.9, 1571.2 and 1602.5 της ελεύθερης κυκλοδεξτρίνης. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν τον σχηματισμό σταθερών συμπλόκων με στοιχειομετρία 1:1. Ανάλογα αποτελέσματα αναφέρονται και στη βιβλιογραφία για σύμπλοκα κυκλοδεξτρινών με φάρμακα[33, 34].



Εικόνα 3.7. ESI-MS φάσμα με εφαρμογή αρνητικού δυναμικού του συμπλόκου του καφεϊκού οξέος με την HP-β-CD όπου παρατίθενται οι περιοχές με τις κορυφές **A)** της ελεύθερης HP-β-CD και **B)** του συμπλόκου της με το καφεϊκό οξύ.



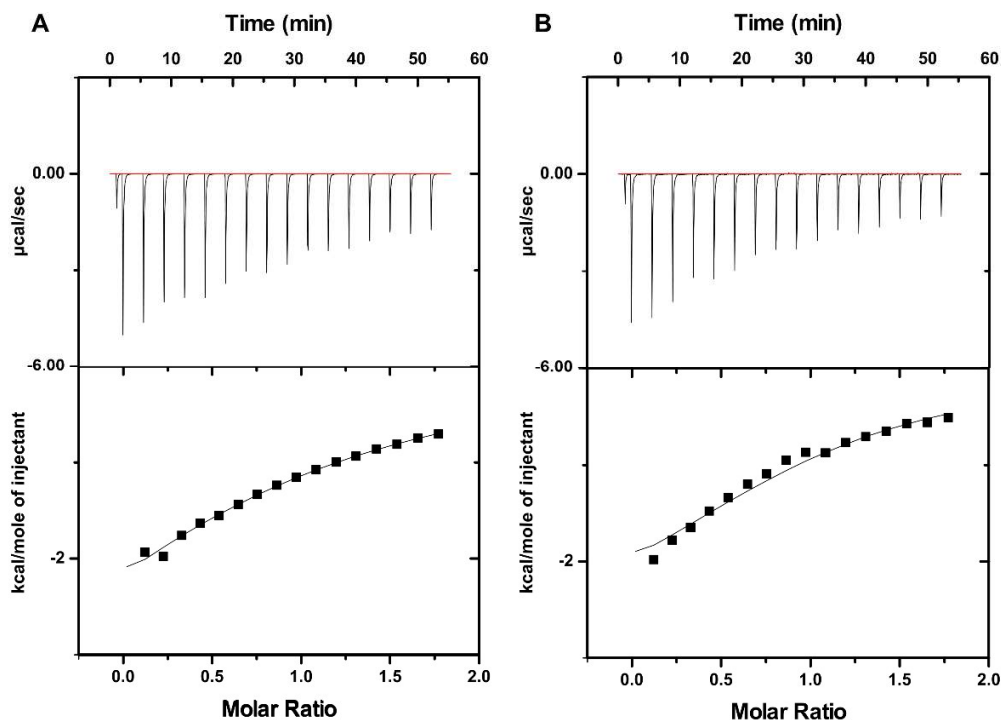
Εικόνα 3.8. ESI-MS φάσμα με εφαρμογή αρνητικού δυναμικού του συμπλόκου του ροσμαρινικού οξέος με την HP-β-CD όπου παρατίθενται οι περιοχές με τις κορυφές **A)** της ελεύθερης HP-β-CD και **B)** του συμπλόκου της με το ροσμαρινικό οξύ.

3.3.3 Χαρακτηρισμός της αλληλεπίδρασης του ροσμαρινικού και του καφεϊκού οξέος με την HP-β-CD μέσω ITC

Η θερμιδομετρία ισόθερμης τιτλοδότησης επιτρέπει τόσο την εκτίμηση της ισχύος μιας αλληλεπίδρασης όσο και τον υπολογισμό των θερμοδυναμικών της παραμέτρων. Και οι δύο αλληλεπιδράσεις της HP-β-CD με το ροσμαρινικό και καφεϊκό οξύ παρουσιάζουν μέτριας ισχύος αλληλεπίδραση όπως γενικώς παρατηρείται στα σύμπλοκα αυτού του είδους[35-37] (Πίνακας 3.1) (Εικόνα 3.9). Βέβαια, το ροσμαρινικό οξύ φαίνεται να αλληλεπιδρά ισχυρότερα και με διπλάσια σχεδόν ισχύ με την κυκλοδεξτρίνη ($K_d = 0.5 \text{ mM}$) σε σύγκριση με το καφεϊκό ($K_d = 1.3 \text{ mM}$). Και στις δύο περιπτώσεις οι μεταβολές της ενθαλπίας και της ελεύθερης ενέργειας του Gibbs είναι αρνητικές υποδεικνύοντας πως πρόκειται για εξώθερμες και αυθόρμητες αλληλεπιδράσεις. Ωστόσο, η μεταβολή της εντροπίας διαφέρει μεταξύ τους καθώς στην περίπτωση του καφεϊκού οξέος η μεταβολή είναι αρνητική και συνεπώς στον σχηματισμό του συμπλόκου κυριαρχούν οι δεσμοί υδρογόνου και οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις ενώ η αλληλεπίδραση της HP-β-CD με το ροσμαρινικό οξύ εμφανίζει θετική μεταβολή στην εντροπία που σημαίνει πως ευνοείται επιπρόσθετα και εντροπικά. Μια θετική μεταβολή στην εντροπία μπορεί να οφείλεται στη διάσπαση του υδατικού κελύφους που περιβάλλει ένα μόριο και την απελευθέρωση αυτών στο περιβάλλον[38].

Πίνακας 3.1. Σταθερές σύνδεσης και διάστασης και θερμοδυναμικές παράμετροι των αλληλεπιδράσεων της HP-β-CD με το καφεϊκό και το ροσμαρινικό οξύ.

HP-β-CD	$K_a \text{ (M}^{-1}\text{)}$	$K_d \text{ (mM)}$	$\Delta H \text{ (cal/mol)}$	$\Delta S \text{ (cal/mol/deg)}$	$T\Delta S \text{ (cal/mol)}$	$\Delta G \text{ (cal/mol)}$
Καφεϊκό οξύ	760	1.3	-4855	-3.1	-923.8	-3931
	± 52.1	± 0.08	± 164			
Ροσμαρινικό οξύ	1800	0.55	-2963	4.96	1478.0	-4441
	± 314		± 179.4			



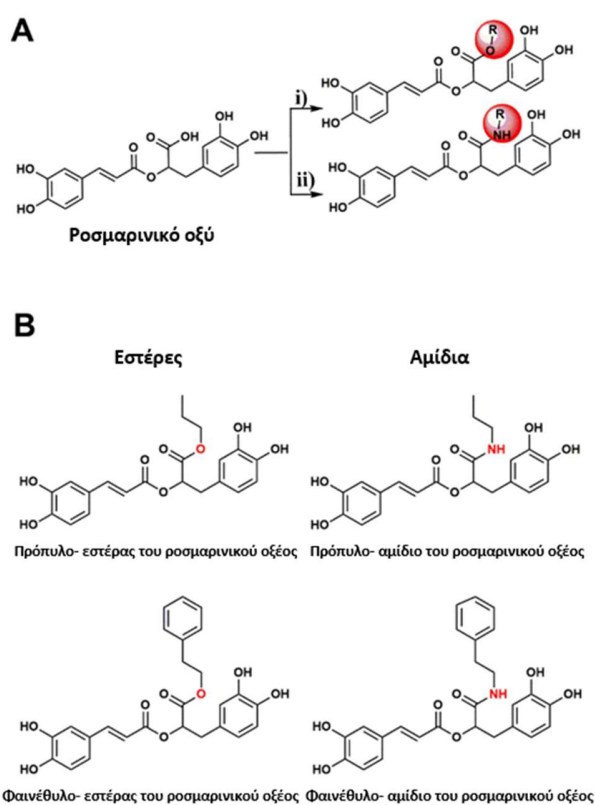
Εικόνα 3.9. Διαγράμματα ITC της αλληλεπίδρασης της HP-β-CD (10 mM) με το **A)** καφεϊκό οξύ και **B)** ροσμαρινικό οξύ (1 mM). Στο επάνω μέρος παρουσιάζονται οι ισόθερμες καμπύλες της κάθε αλληλεπίδρασης σε σχέση με τον χρόνο του πειράματος και στο κάτω μέρος τα σημεία που προκύπτουν με την ολοκλήρωση της κάθε καμπύλης ως προς τη μοριακή αναλογία των δύο αλληλεπιδρώντων.

Μέρος Β: Μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης και κυτταρικής πρόσληψης του ροσμαρινικού οξέος και των εστερικών και αμιδικών παραγώγων του

3.3.4 Μελέτη της προστατευτικής ικανότητας του ροσμαρινικού οξέος και των εστερικών και αμιδικών παραγώγων του στην επαγόμενη από το H₂O₂ βλάβη του DNA

Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 3.3**, για να καλυφθεί η καρβοξυλική ομάδα του ροσμαρινικού οξέος παρασκευάστηκαν τέσσερα διαφορετικά ανάλογα. Στα δύο από αυτά προστέθηκε μια πρότυλο- ομάδα με εστερικό ή αμιδικό δεσμό, αντίστοιχα, και στα

άλλα δύο μια φαινέθυλο-ομάδα επίσης με εστερικό ή αμιδικό δεσμό. Αρχικά, η βιολογική τους δραστηριότητα εκτιμήθηκε βάσει της ικανότητας τους να προστατέψουν το DNA T λευχαιμικών κυττάρων Jurkat από βλάβες επαγόμενες από το H₂O₂. Είναι γνωστό πως το H₂O₂ προκαλεί βλάβη στο DNA και στη συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο οξειδάση της γλυκόζης για την παραγωγή του στα κύτταρα. Οι βλάβες στο DNA των κυττάρων αξιολογήθηκαν μέσω της τεχνικής της ηλεκτροφόρησης του DNA μεμονωμένων κυττάρων (Comet assay).



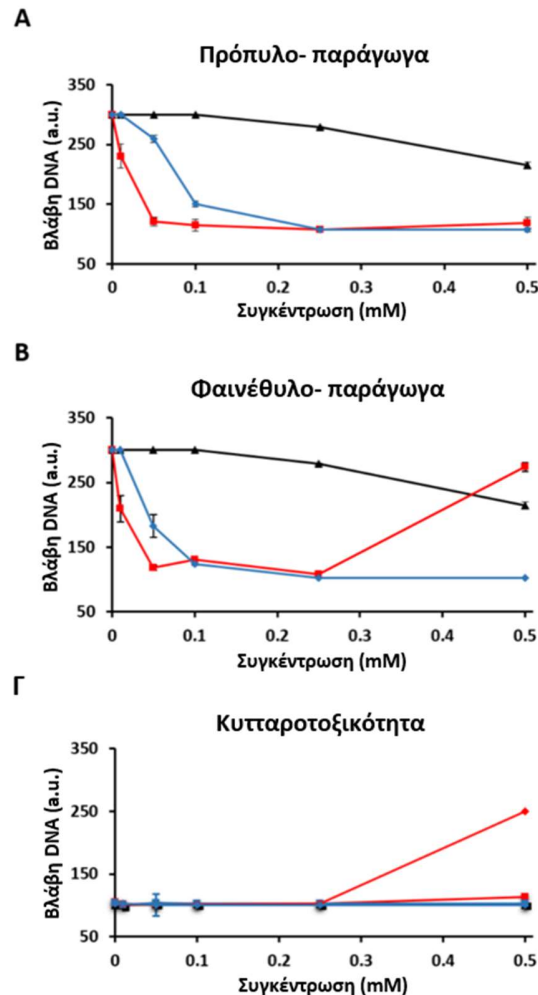
Σχήμα 3.3. Σχηματική απεικόνιση **A)** της δομής και των θέσεων τροποποίησης του ροσμαρινικού οξέος και **B)** των παραγώγων του ροσμαρινικού οξέος, πρόπυλο- εστέρα του ροσμαρινικού οξέος, πρόπυλο- αμιδίου του ροσμαρινικού οξέος, φαινέθυλο- εστέρα του ροσμαρινικού οξέος και φαινέθυλο- αμιδίου του ροσμαρινικού οξέος.

Στην **Εικόνα 3.10**, παρουσιάζεται η βλάβη του DNA που προκύπτει μετά από την παράλληλη παρουσία H₂O₂ και διαφορετικών συγκεντρώσεων (10, 50, 100, 250 και 500

μM) του ροσμαρινικού οξέος και των τεσσάρων παραγώγων του. Η επώαση με το ροσμαρινικό οξύ επέδειξε πολύ μικρή προστασία του DNA η οποία είναι εμφανής στις υψηλότερες συγκεντρώσεις 400 και 500 μM. Ακόμη και σε αυτές η αναστολή στη βλάβη του DNA δεν προσεγγίζει καν το 50 %. Ωστόσο, είναι γνωστό από προηγούμενα δεδομένα πως μόρια που περιέχουν ορθο-διυδροξυ- ομάδες έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν την επαγόμενη από το H₂O₂ βλάβη στο DNA μέσω της δέσμησης σιδήρου[39, 40]. Έτσι, θεωρήθηκε σκόπιμο να εξετασθεί αν η χαμηλή προστασία που προσφέρει το ροσμαρινικό οξύ οφείλεται στη δυσκολία του να διαπεράσει τις κυτταρικές μεμβράνες λόγω του αρνητικού φορτίου της καρβοξυλομάδας του. Πράγματι, η εστεροποίηση αύξησε σε μεγάλο βαθμό την ικανότητα προστασίας του ροσμαρινικού οξέος, όπως φαίνεται τόσο από τη μείωση των βλαβών στο DNA παρουσία του πρόπυλο-εστέρα (**Εικόνα 3.10Α**) όσο και του φαινέθυλο-εστέρα του ροσμαρινικού οξέος (**Εικόνα 3.10Β**) με τιμές IC₅₀ 25 και 12 μM, αντίστοιχα. Βέβαια, στην περίπτωση του φαινέθυλο-εστέρα του ροσμαρινικού οξέος η προστασία αυτή αρχίζει να μειώνεται στα 250 μM, ενώ στα 500 μM έχει χαθεί τελείως. Για να διαλευκανθεί αυτή η συμπεριφορά, το ίδιο πείραμα επαναλήφθηκε απουσία H₂O₂ έτσι ώστε να αξιολογηθεί εάν από μόνο του προκαλεί βλάβη στο DNA και όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3.10Γ** το μόριο είναι όντως γονιδιοτοξικό σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 250 μM.

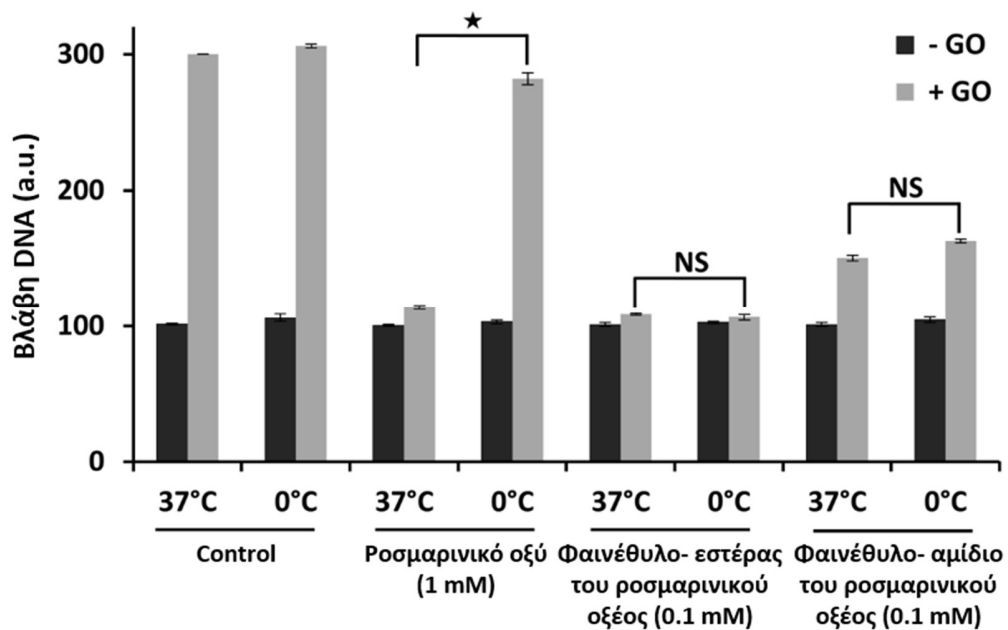
Ίσως η αυξημένη δραστηριότητα των εστερικών αναλόγων να οφείλεται στην αυξημένη κυτταρική τους πρόσληψη και η αποκοπή των πρόπυλο- και φαινέθυλο-ομάδων από τις ενδοκυττάριας εστεράσες να οδηγεί στη συσσώρευση του ροσμαρινικού οξέος εντός των κυττάρων. Για να επιβεβαιωθεί αυτή η υπόθεση έγινε σύνθεση δύο επιπρόσθετων παράγωγων μορίων τα οποία φέρουν μια επιπλέον πρόπυλο- ή φαινέθυλο- ομάδα αυτή τη φορά όμως συζευγμένη μέσω αμιδικού δεσμού. Τα δύο μόρια ήταν πολύ πιο αποτελεσματικά σε σύγκριση με το ροσμαρινικό οξύ όσον αφορά στην προστασία του DNA (**Εικόνα 3.10Α και Β**) με τιμές IC₅₀ 75 και 45 μM για το πρόπυλο-αμίδιο και φαινέθυλο-αμίδιο, ωστόσο φαίνεται να παρέχουν λιγότερη προστασία σε σχέση με τα εστερικά παράγωγα. Επίσης, το φαινέθυλο-αμίδιο του ροσμαρινικού οξέος

δεν φαίνεται να είναι τοξικό μέχρι τα 500 μM (Εικόνα 3.10Γ) σε αντίθεση με το εστερικό ανάλογο του.



Εικόνα 3.10. Προστατευτική δράση του ροσμαρινικού οξέος και των εστερικών και αμιδικών παραγώγων του από την επαγόμενη από το H_2O_2 βλάβη στο DNA και έλεγχος της κυτταροτοξικότητάς τους. Κύτταρα Jurkat (1.5×10^6 κύτταρα/mL) επώαστηκαν για 20 λεπτά με αυξανόμενες συγκεντρώσεις (10, 50, 100, 250 and 500 μM) **A**) ροσμαρινικού οξέος (μαύρο χρώμα), πρόπυλο-εστέρα του ροσμαρινικού οξέος (κόκκινο χρώμα), πρόπυλο-αμιδίου του ροσμαρινικού οξέος (μπλε χρώμα) και **B**) ροσμαρινικού οξέος (μαύρο χρώμα), φαινέθυλο-εστέρα του ροσμαρινικού οξέος (κόκκινο χρώμα), φαινέθυλο-αμιδίου του ροσμαρινικού οξέος (μπλε χρώμα). Στη συνέχεια στα κύτταρα

προστέθηκε οξειδάση της γλυκόζης ώστε να παραχθεί H_2O_2 . Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε στη Γ) με τη διαφορά ότι δεν προστέθηκε η οξειδάση της γλυκόζης. Οι βλάβες του DNA εκτιμήθηκαν μέσω της τεχνικής ηλεκτροφόρησης του DNA μεμονωμένων κυττάρων (Comet assay) και εκφράζονται σε αυθαίρετες μονάδες (a.u.). Οι μετρήσεις προέρχονται από δύο επαναλήψεις του πειράματος.

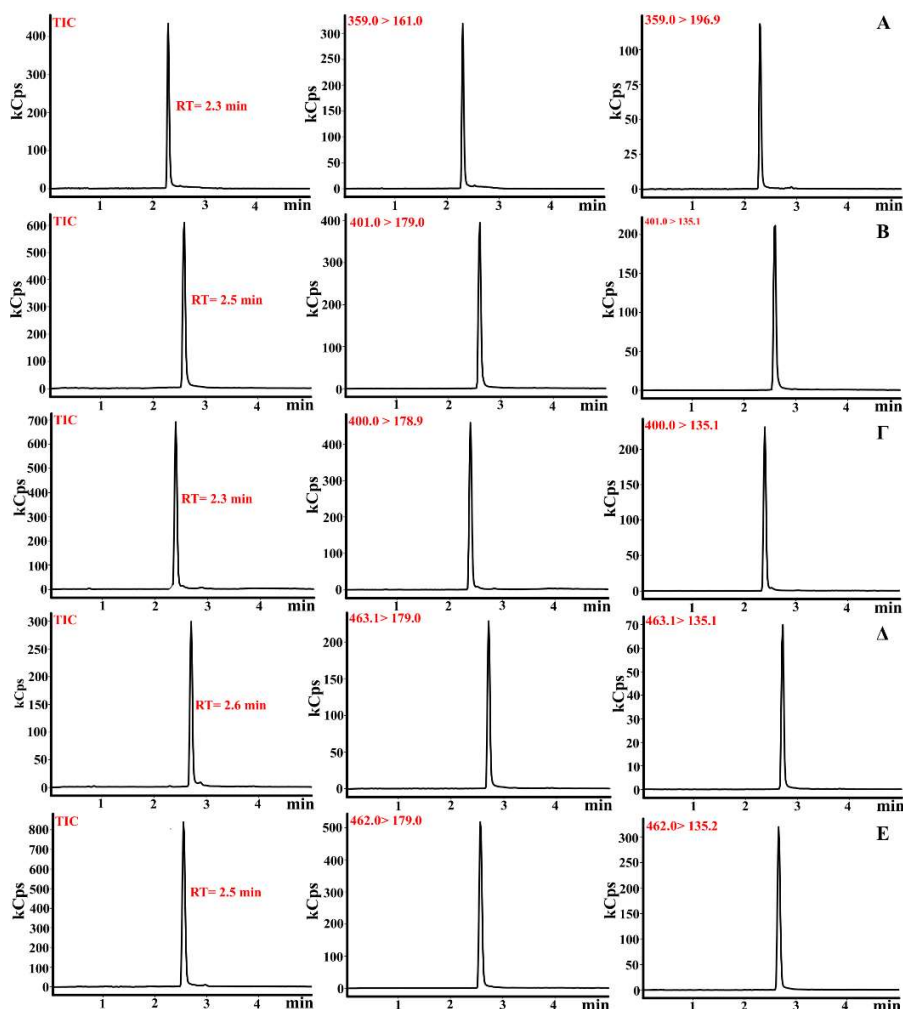


Εικόνα 3.11. Επίδραση της θερμοκρασίας στην προστατευτική δράση του ροσμαρινικού οξέος και των φαινέθυλο- παραγώγων του από την επαγόμενη από το H_2O_2 βλάβη στο DNA. Κύτταρα Jurkat (1.5×10^6 κύτταρα/mL) επώαστηκαν για 20 λεπτά με ροσμαρινικό οξύ (1 mM) ή φαινέθυλο-εστέρα του ροσμαρινικού οξέος (0.1 mM) ή φαινέθυλο-αμίδιο του ροσμαρινικού οξέος (0.1 mM) στους 0 ή 37 °C και στη συνέχεια προστέθηκε σε αυτά οξειδάση της γλυκόζης (GO). Οι βλάβες του DNA εκτιμήθηκαν μέσω της τεχνικής ηλεκτροφόρησης του DNA μεμονωμένων κυττάρων (Comet assay) και εκφράζονται σε αυθαίρετες μονάδες (a.u.). Οι μετρήσεις προέρχονται από δύο επαναλήψεις του πειράματος (* $p < 0.05$).

Η ικανότητα των εν λόγω μορίων να προστατέψουν το DNA των Jurkat από βλάβες επαγόμενες από το H₂O μελετήθηκε και στη θερμοκρασία των 0 °C. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3.11**, η προστασία που παρέχεται από τα εστερικά και αμιδικά παράγωγα παρέμεινε αμετάβλητη με τη μεταβολή της θερμοκρασίας. Αντίθετα, η προστασία του ροσμαρινικού οξέος χάθηκε τελείως στους 0 °C, υποδηλώνοντας πως το τελευταίο χρησιμοποιεί διαφορετικό μηχανισμό για την είσοδο του στα κύτταρα από αυτόν της παθητικής μεταφοράς.

3.3.5 Μελέτη της κυτταρικής πρόσληψης του ροσμαρινικού οξέος και των εστερικών και αμιδικών παραγώγων του μέσω της συνδυαστικής τεχνικής UHPLC-MS/MS

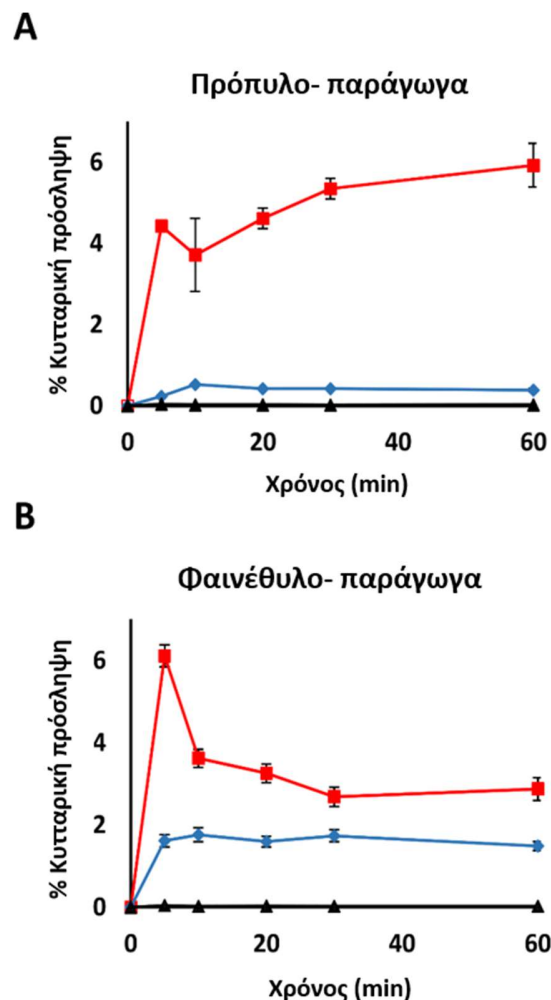
Για τη μελέτη της κυτταρικής πρόσληψης του ροσμαρινικού οξέος και των εστερικών και αμιδικών παραγώγων του στήθηκε κοινή μέθοδος στο σύστημα UHPLC-MS/MS. Αρχικά, προσδιορίστηκαν τα πρόδρομα και τα θυγατρικά ιόντα του κάθε μορίου και για τα ροσμαρινικό οξύ, πρόπυλο-αμίδιο του ροσμαρινικού οξέος, φαινέθυλο-αμίδιο του ροσμαρινικού οξέος, πρόπυλο-εστέρα του ροσμαρινικού οξέος και φαινέθυλο-εστέρα του ροσμαρινικού οξέος βρέθηκαν τα m/z 359→161, m/z 400→178.9, m/z 462→179, m/z 401→179 και 463.1→179, αντίστοιχα. Επιπρόσθετα, προσδιορίστηκαν και τα δευτερεύοντα θυγατρικά ιόντα που χρησιμοποιήθηκαν για την ποιοτική ταυτοποίηση του κάθε μορίου (**Εικόνα 3.12**). Τα χρωματογραφήματα των θυγατρικών ιόντων παρουσιάζονται στην **Εικόνα 3.12** και οι χρόνοι ανάκτησης για τα ροσμαρινικό οξύ, πρόπυλο-αμίδιο του ροσμαρινικού οξέος, φαινέθυλο-αμίδιο του ροσμαρινικού οξέος, πρόπυλο-εστέρα του ροσμαρινικού οξέος και φαινέθυλο-εστέρα του ροσμαρινικού οξέος ήταν 2.3, 2.38, 2.51, 2.58 και 2.69 λεπτά, αντίστοιχα. Η κυτταρική πρόσληψη εκτιμήθηκε ποιοτικά συγκρίνοντας κάθε φορά το ολοκλήρωμα του κύριου θυγατρικού ιόντος της κάθε ένωσης μετά από επώαση ορισμένου χρονικού διαστήματος με τα κύτταρα Jurkat με το ολοκλήρωμα του ίδιου θυγατρικού ιόντος όπως προέκυπτε από δείγμα στο οποίο θεωρητικά υπήρχε 100 % κυτταρική πρόσληψη.



Εικόνα 3.12. Χρωματογραφήματα των ιόντων του **A)** ροσμαρινικού οξέος, **B)** του πρόπυλ-εστέρα του ροσμαρινικού οξέος, **Γ)** του πρόπυλο-αμιδίου του ροσμαρινικού οξέος, **Δ)** του φαινέθυλο-εστέρα του ροσμαρινικού οξέος και **Ε)** του φαινέθυλο-αμιδίου του ροσμαρινικού οξέος. Στα αριστερά βρίσκεται το ολικό χρωματογράφημα των ιόντων, στο κέντρο το κύριο θυγατρικό ιόν και στα δεξιά το δευτερεύον θυγατρικό ιόν.

Στην **Εικόνα 3.13**, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της κυτταρικής πρόσληψης των πέντε μορίων όπως αυτά μετρήθηκαν στα 5, 10, 20, 30 και 60 λεπτά. Αρχικά, παρατηρείται πως το ποσοστό του ροσμαρινικού οξέος που εισέρχεται στα κύτταρα είναι πολύ χαμηλό. Αντίθετα, το υψηλότερο ποσοστό πρόσληψης εμφανίζεται στα εστερικά ανάλογα το οποίο μάλιστα επιτυγχάνεται πολύ γρήγορα και εντός των πρώτων 5 λεπτών.

Μετά τα 5 πρώτα λεπτά, ο πρόπυλο-εστέρας του ροσμαρινικού οξέος έχει μια ελαφρώς αυξητική τάση ενώ το ποσοστό πρόσληψης του φαινέθυλο-εστέρα του ροσμαρινικού οξέος μειώνεται κατά 50 %. Τα αμιδικά ανάλογα εμφανώς εισέρχονται στα κύτταρα σε μεγαλύτερο ποσοστό συγκριτικά με το ροσμαρινικό οξύ, με αυτό να κορυφώνεται επίσης εντός των πρώτων 5-10 λεπτών, ωστόσο φαίνεται πως η κυτταρική τους πρόσληψη είναι αρκετά μικρότερη σε σχέση με αυτή των εστερικών παραγώγων. Αυτή η διαφορά μεταξύ των εστερικών και αμιδικών παραγώγων μπορεί να οφείλεται στη διαφορετική συσσώρευση τους εντός των κυττάρων.

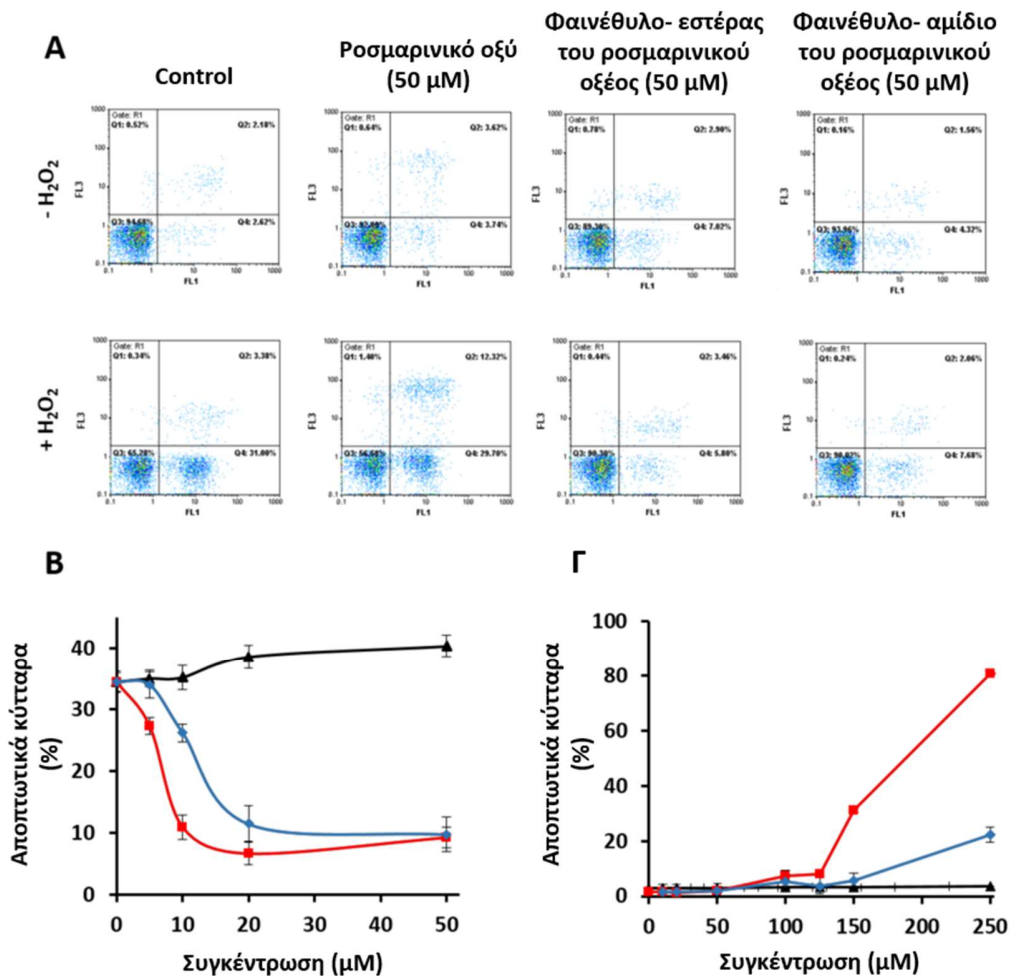


Εικόνα 3.13. Εκτίμηση της κυτταρικής πρόσληψης του ροσμαρινικού οξέος και των εστερικών και αμιδικών παραγώγων του μέσω της τεχνικής UHPLC-MS/MS. Κύτταρα

Jurkat (1.5×10^6 κύτταρα/mL) καλλιεργήθηκαν σε πιάτα 6 φρεατίων. Στη συνέχεια επωάστηκαν με 50 μM **A**) ροσμαρινικού οξέος (μαύρο χρώμα), πρόπυλο-εστέρα του ροσμαρινικού οξέος (κόκκινο χρώμα), πρόπυλο-αμιδίου του ροσμαρινικού οξέος (μπλε χρώμα) και **B**) ροσμαρινικού οξέος (μαύρο χρώμα), φαινέθυλο-εστέρα του ροσμαρινικού οξέος (κόκκινο χρώμα), φαινέθυλο-αμιδίου του ροσμαρινικού οξέος (μπλε χρώμα) για 5, 10, 20, 30 και 60 λεπτά. Ακολούθησε η συλλογή τους, πλύση με PBS και η λύση και πρωτεϊνική κατακρήμνιση με διάλυμα ACN:dH₂O (3:1 v/v). Η ποσότητα τους στα κυτταρικά εκχυλίσματα μετρήθηκε με τη τεχνική UHPLC-MS/MS. Οι τιμές έχουν εκφραστεί ως προς τη μέγιστη ποσότητα που θα μπορούσε να εισαχθεί στα κύτταρα. Οι μετρήσεις προέρχονται από δύο επαναλήψεις του πειράματος.

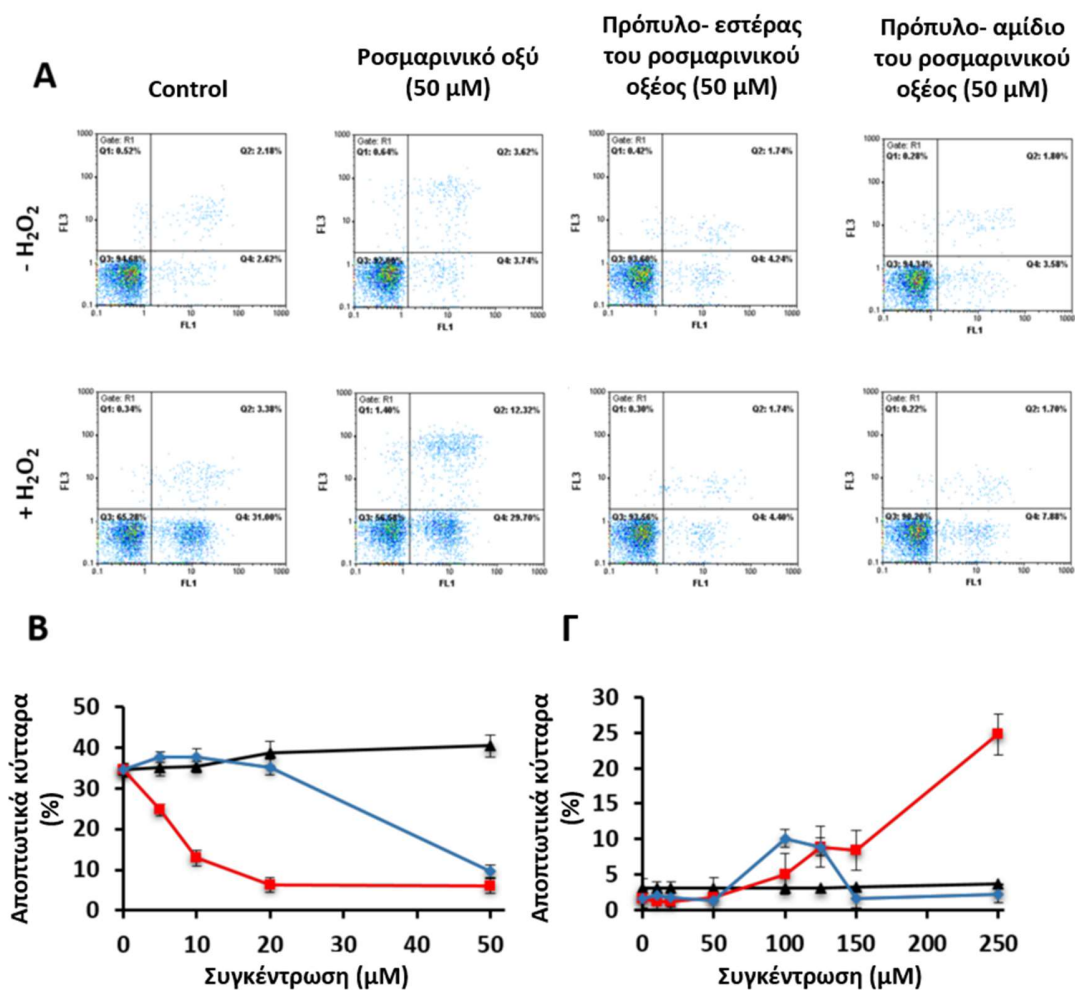
3.3.6 Μελέτη της προστατευτικής ικανότητας του ροσμαρινικού οξέος και των εστερικών και αμιδικών παραγώγων του στην επαγόμενη από το H₂O₂ απόπτωση

Το ροσμαρινικό οξύ και τα εστερικά και αμιδικά παράγωγα του εξετάστηκαν και ως προς την ικανότητα τους να εμποδίσουν την επαγόμενη από το H₂O₂ απόπτωση των κυττάρων Jurkat μέσω της κυτταρομετρίας ροής. Τα κύτταρα επωάστηκαν με 5, 10, 20 και 50 μM των μορίων και με 250 μM H₂O₂ και επισημάνθηκαν με Annexin V-FITC και ιωδιούχο προπίδιο. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3.14A** και **B**, το ροσμαρινικό οξύ δεν κατάφερε να μειώσει την επαγόμενη απόπτωση. Τα εστερικά παράγωγα ήταν εμφανώς πιο αποτελεσματικά σε σύγκριση με τα αμιδικά ως προς τη μείωση του ποσοστού των αποπτωτικών κυττάρων. Οι τιμές IC₅₀ για τα πρόπυλο-εστέρα, φαινέθυλο-εστέρα, πρόπυλο-αμίδιο και φαινέθυλο-αμίδιο του ροσμαρινικού οξέος ήταν 9, 7.5, 30 και 12 μM , αντίστοιχα. Όταν το ίδιο πείραμα διεξήχθη απουσία H₂O₂ και παρουσία των παραγώγων, το φαινέθυλο-αμίδιο παρουσίασε μικρότερη επαγωγή της απόπτωσης συγκριτικά με τον φαινέθυλο-εστέρα (**Εικόνα 3.14Γ**), κάτι που παρατηρήθηκε και στην περίπτωση των πρόπυλο-παραγώγων.



Εικόνα 3.14. Προστατευτική δράση του ροσμαρινικού οξέος και των εστερικών και αμιδικών παραγώγων του από την επαγόμενη από το H_2O_2 απόπτωση. Κύτταρα Jurkat (1.5×10^6 κύτταρα/mL) επώαστηκαν για 30 λεπτά με την κάθε ουσία ενώ στη συνέχεια προστέθηκαν 250 μM H_2O_2 . Η μέτρηση, μέσω της κυτταρομετρίας ροής, των αποπτωτικών κυττάρων πραγματοποιήθηκε 7 ώρες μετά με την προσθήκη της Annexin V ενώ η νέκρωση εκτιμήθηκε μέσω της επισήμανσης με ιωδιούχο προπίδιο. **A)** Ενδεικτικά αποτελέσματα όπως προέκυψαν από κύτταρα που δεν επώαστηκαν με κάποιο από τα μόρια (control), κύτταρα που επώαστηκαν με ροσμαρινικό οξύ, με τον φαινέθυλο-εστέρα του ροσμαρινικού οξέος και με το φαινέθυλο-αμίδιο του ροσμαρινικού οξέος απουσία και παρουσία H_2O_2 . Στον οριζόντιο άξονα (FL1) εμφανίζεται ο πληθυσμός των κυττάρων που έχει επισημανθεί με την Annexin V-FITC και στον κάθετο άξονα (FL3) ο πληθυσμός των κυττάρων που έχει επισημανθεί με το ιωδιούχο προπίδιο.

Στα κάτω διαγράμματα παρουσιάζεται το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων μετά από την προσθήκη 5, 10, 20, και 50 μM παρουσία Β) και απουσία Γ) H_2O_2 . Με μαύρο, κόκκινο και μπλε χρώμα απεικονίζονται οι μετρήσεις για το ροσμαρινικό οξύ, τον φαινέθυλο-εστέρα του ροσμαρινικού οξέος και το φαινέθυλο-αμίδιο του ροσμαρινικού οξέος. Οι μετρήσεις προέρχονται από τρεις επαναλήψεις του πειράματος.

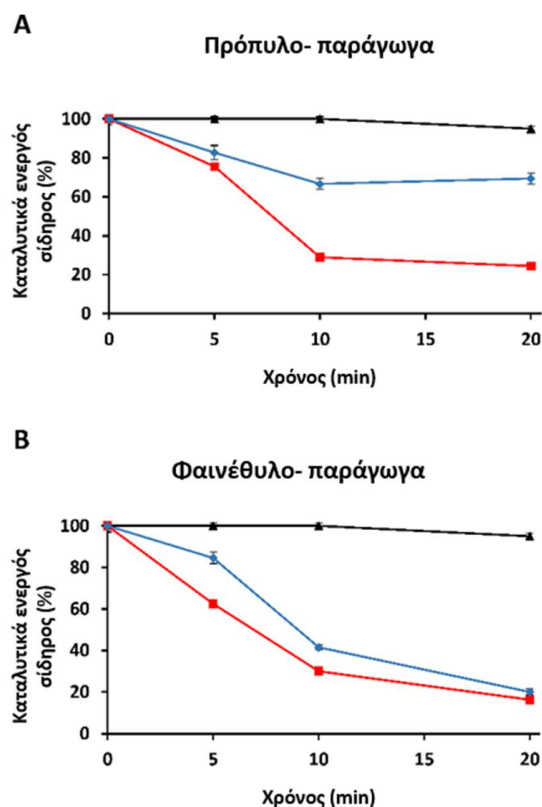


Εικόνα 3.15. Προστατευτική δράση του ροσμαρινικού οξέος και των εστερικών και αμιδικών παραγώγων του από την επαγόμενη από το H_2O_2 απόπτωση. Κύτταρα Jurkat (1.5×10^6 κύτταρα/mL) επώαστηκαν για 30 λεπτά με την κάθε ουσία ενώ στη συνέχεια προστέθηκαν 250 μM H_2O_2 . Η μέτρηση, μέσω της κυτταρομετρίας ροής, των αποπτωτικών κυττάρων πραγματοποιήθηκε 7 ώρες μετά με την προσθήκη της Annexin

Ν ενώ η νέκρωση εκτιμήθηκε μέσω της επισήμανσης με ιωδιούχο προπίδιο. **A)** Ενδεικτικά αποτελέσματα όπως προέκυψαν από κύτταρα που δεν επώαστηκαν με κάποιο από τα μόρια (control), κύτταρα που επώαστηκαν με ροσμαρινικό οξύ, με τον πρόπυλο- εστέρα του ροσμαρινικού οξέος και με το πρόπυλο - αμίδιο του ροσμαρινικού οξέος απουσία και παρουσία H_2O_2 . Στον οριζόντιο άξονα (FL1) εμφανίζεται ο πληθυσμός των κυττάρων που έχει επισημανθεί με την Annexin V-FITC και στον κάθετο άξονα (FL3) ο πληθυσμός των κυττάρων που έχει επισημανθεί με το ιωδιούχο προπίδιο. Στα κάτω διαγράμματα παρουσιάζεται το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων μετά από την προσθήκη 5, 10, 20, και 50 μM παρουσία **B)** και απουσία **Γ)** H_2O_2 . Με μαύρο, κόκκινο και μπλε χρώμα απεικονίζονται οι μετρήσεις για το ροσμαρινικό οξύ, τον πρόπυλο- εστέρα του ροσμαρινικού οξέος και το πρόπυλο- αμίδιο του ροσμαρινικού οξέος. Οι μετρήσεις προέρχονται από τρεις επαναλήψεις του πειράματος.

3.3.7 Μελέτη της ικανότητας δέσμευσης του καταλυτικά ενεργού σιδήρου από το ροσμαρινικό οξύ και τα εστερικά και αμιδικά παράγωγα του

Η ικανότητα δέσμευσης του καταλυτικά ενεργού σιδήρου από το ροσμαρινικό οξύ και τα παράγωγα του μελετήθηκε μέσω των μεταβολών στον φθορισμό της καλσεΐνης (**Εικόνα 3.16**). Και σε αυτήν την περίπτωση το ροσμαρινικό οξύ δεν μείωσε μετά από 20 λεπτά επώασης τα επίπεδα του καταλυτικά ενεργού σιδήρου. Ισχυρή μείωση επήλθε με την παρουσία των εστερικών και αμιδικών παραγώγων, που είναι ιδιαίτερα εμφανής μετά τα 10 λεπτά επώασης, με τα πρώτα να υπερισχύουν εμφανώς ως προς την ικανότητα δέσμευσης.



Εικόνα 3.16. Ικανότητα δέσμευσης του καταλυτικά ενεργού σιδήρου του ροσμαρινικού οξέος και των εστερικών και αμιδικών παραγώγων του. Ο καταλυτικά ενεργός σίδηρος μετρήθηκε μέσω της καλσεΐνης. Τα υπό μελέτη μόρια προστέθηκαν απευθείας στην κυψελίδα με το εναιώρημα κυττάρων και μετρήθηκε η μεταβολή του φθορισμού. Στα 5, 10 και 20 λεπτά προστέθηκε ο ισχυρός δεσμευτής ιόντων σιδήρου SIH και καταγράφηκε η αύξηση της έντασης του φθορισμού που αντιστοιχεί στην ποσότητα του σιδήρου που παρέμεινε στην καλσεΐνη. Με μαύρο, κόκκινο και μπλε χρώμα παρουσιάζονται οι μετρήσεις για **A)** το ροσμαρινικό οξύ, τον πρόπυλο-εστέρα και το πρόπυλο-αμίδιο του ροσμαρινικού οξέος και **B)** το ροσμαρινικό οξύ, τον φαινέθυλο-εστέρα και το φαινέθυλο-αμίδιο του ροσμαρινικού οξέος, αντίστοιχα. Οι μετρήσεις προέρχονται από τρεις επαναλήψεις του πειράματος.

3.4 Συζήτηση

Το καφεϊκό και ροσμαρινικό οξύ είναι δύο ευρέως γνωστά και μελετημένα φαινολικά οξέα με ποικίλες βιολογικές ιδιότητες. Ωστόσο, η δραστηριότητα τους περιορίζεται από τη χαμηλή τους βιοδιαθεσιμότητα, τον μεταβολισμό που υφίστανται από ένζυμα καθώς και το αρνητικό τους φορτίο που περιορίζει την κυτταρική τους πρόσληψη. Στο παρόν κεφάλαιο εξετάζονται δύο τρόποι, αυτός του εγκλεισμού σε έναν φορέα κυκλοδεξτρίνης (HP-β-CD) και αυτός της χημικής τροποποίησης, που θα μπορούσαν να συμβάλλουν στη βελτίωση των παραπάνω χαρακτηριστικών.

Στο πρώτο μέρος παρασκευάστηκαν σύμπλοκα της ευρέως χρησιμοποιούμενης, λόγω της χαμηλής της τοξικότητας, HP-β-CD με καθένα από τα δύο μόρια. Η συμπλοκοποίηση τους σε αναλογία 1:1 επιβεβαιώθηκε μέσω της φασματομετρίας μαζών και είναι σε συμφωνία με αντίστοιχα δεδομένα που παρουσιάζονται στη βιβλιογραφία[21, 41]. Στη συνέχεια, εξετάστηκε ο τρόπος εγκλεισμού των δύο μορίων εντός της υδρόφοβης κοιλότητας της HP-β-CD μέσω της τεχνικής NMR στερεής και υγρής κατάστασης. Τα δύο φαινολικά οξέα παρουσίασαν παρόμοιο μοτίβο εγκλεισμού στην κυκλοδεξτρίνη βάσει των ^{13}C NMR φασμάτων καθώς οι κορυφές των ^{13}C τους ήταν διευρυμένες και παρουσίασαν μετατοπίσεις. Η διεύρυνση των κορυφών παρατηρείται και σε ανάλογες περιπτώσεις στη βιβλιογραφία[30] και υποδηλώνει πως η κινητικότητα των δύο μορίων είναι μειωμένη εξαιτίας της συμπλοκοποίησης. Παράλληλα, η διεύρυνση παρουσιάστηκε σε όλες τις κορυφές των ^{13}C των δύο φαινολικών οξέων κάτι που έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα των Medronho et al.[31] ως προς το ροσμαρινικό οξύ για το οποίο δείχνουν μόνο ένα τμήμα του μορίου να εισάγεται στην κυκλοδεξτρίνη. Αντίθετα, ο εγκλεισμός του μεγαλύτερου μέρους του καφεϊκού οξέος υποστηρίζεται από το άρθρο των Zhang et al.[21]. Μετατοπίσεις παρουσίασαν και τα πρωτόνια των δύο μορίων στα φάσματα NMR υγρής κατάστασης, επιβεβαιώνοντας τη συμπλοκοποίηση τους. Οι μεγαλύτερες μετατοπίσεις σε περισσότερο προασπισμένες περιοχές παρατηρήθηκαν στα πρωτόνια H2, H8 και H8' του ροσμαρινικού οξέος και στα πρωτόνια H6 και H8 του καφεϊκού οξέος και βρίσκονται

σε συμφωνία με αυτές που παρουσιάζονται στη βιβλιογραφία[32]. Στη μελέτη των δύο συμπλόκων επιστρατεύθηκε και η τεχνική $^1\text{H}-^1\text{H}$ 2D NOESY NMR έτσι ώστε να ανιχνευθούν τα πρωτόνια του ροσμαρινικού και του καφεϊκού οξέος που αλληλεπιδρούν με τα πρωτόνια της HP- β -CD, από όπου φάνηκε πως και τα δύο μόρια εισάγονται ολόκληρα στην υδρόφοβη κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης. Η ισχύς και οι θερμοδυναμικές παράμετροι των δύο αλληλεπιδράσεων μελετήθηκαν μέσω της θερμιδομετρίας ισόθερμης τιτλοδότησης για πρώτη φορά αφού μέχρι στιγμής η εκτίμηση αυτών των παραμέτρων στη βιβλιογραφία προσεγγίζεται μέσω άλλων τεχνικών όπως το NMR και η φθορισμομετρία[21, 41]. Η συμπλοκοποίηση τόσο του ροσμαρινικού όσο και του καφεϊκού οξέος με την HP- β -CD είναι αυθόρμητη όπως υποδηλώνεται από τις αρνητικές τιμές ΔG . Και οι δύο αλληλεπιδράσεις είναι εξώθερμες ($\Delta H < 0$) κάτι που υποδηλώνει πως στη συμπλοκοποίηση συμμετέχουν δεσμοί υδρογόνου και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Η αρνητική μεταβολή της ενθαλπίας αποτελεί τον κανόνα στο σχηματισμό τέτοιων συμπλόκων ενώ η μεταβολή της εντροπίας μπορεί να είναι θετική ή αρνητική[42]. Εδώ, θετική μεταβολή της εντροπίας παρατηρήθηκε μόνο στην αλληλεπίδραση του ροσμαρινικού οξέος με την κυκλοδεξτρίνη οδηγώντας στο συμπέρασμα πως ο εγκλεισμός του μορίου σε αντίθεση με αυτόν του καφεϊκού οξέος ευνοείται και από υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Το σύμπλοκο της HP- β -CD με το ροσμαρινικό οξύ έχει διπλάσιο K_a συγκριτικά με αυτό του καφεϊκού οξέος. Βέβαια, το μέγεθος της ισχύος και των δύο αλληλεπιδράσεων είναι μικρό καθώς K_a αυτής της τάξεως (1800 και 760 M^{-1} για το σύμπλοκο με ροσμαρινικό και καφεϊκό οξύ, αντίστοιχα) χαρακτηρίζουν ασθενείς αλληλεπιδράσεις κάτι που παρατηρείται γενικώς σε τέτοιου είδους συμπλοκοποιήσεις μικρών μορίων με κυκλοδεξτρίνες (συνήθως 10-2000 M^{-1})[42]. Συγκεκριμένα τα K_a που απαντώνται στα σύμπλοκα της HP- β -CD με μικρά μόρια κυμαίνονται μεταξύ 100-3000 M^{-1} [43]. Ωστόσο, η ασθενής αλληλεπίδραση του ροσμαρινικού και του καφεϊκού οξέος με την HP- β -CD μπορεί να ευνοεί και την ευκολότερη απελευθέρωση των μορίων. Αξίζει να σημειωθεί πως οι τιμές K_a που παρουσιάζονται στη βιβλιογραφία για τα συγκεκριμένα σύμπλοκα είναι αρκετά χαμηλότερες (267 [41] και 112 M^{-1} [21] για το σύμπλοκο με ροσμαρινικό και καφεϊκό οξύ,

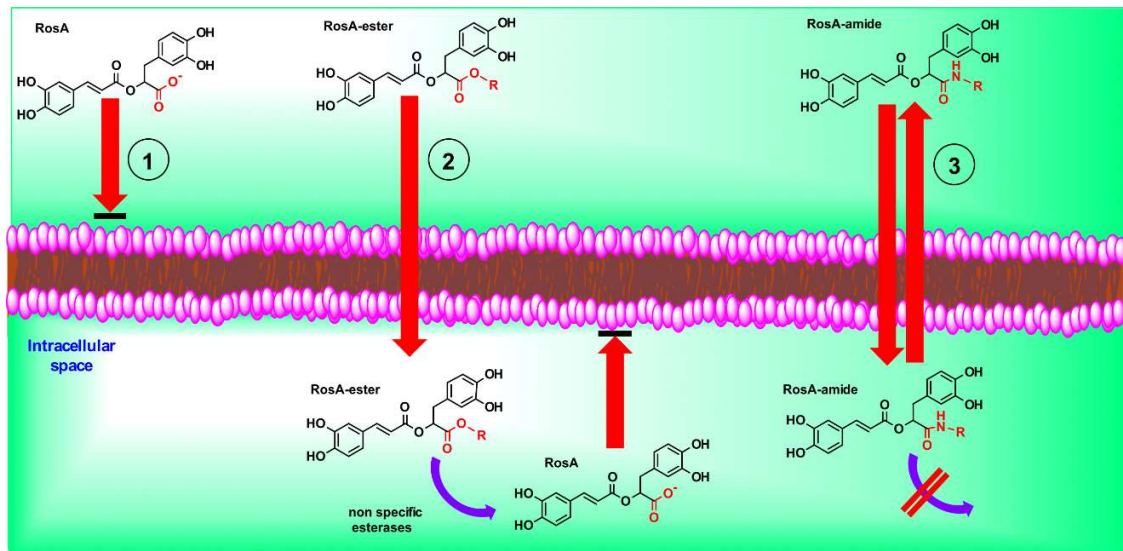
αντίστοιχα), κάτι που μπορεί να οφείλεται στο ότι η εκτίμηση τους έγινε μέσω άλλης μεθόδου και συγκεκριμένα της φθορισμομετρίας. Συμπερασματικά, με τη χρήση βιοφυσικών τεχνικών επετεύχθη ο χαρακτηρισμός της αλληλεπίδρασης δύο φαινολικών οξέων με την HP-β-CD σε μια προσπάθεια να μελετηθεί η ικανότητα συμπλοκοποίησης αλλά και η φύση της αλληλεπίδρασης τέτοιων μορίων με φορείς όπως οι κυκλοδεξτρίνες. Βέβαια, η μελέτη αυτών των συμπλόκων *in vivo* είναι αναγκαία ώστε να μελετηθεί η συμπεριφορά τους στα συστήματα των ζώντων οργανισμών όπως π.χ. η σταθερότητα των συμπλόκων στο πεπτικό και κυκλοφορικό σύστημα, αλλά και να εξετασθούν οι φαρμακοκινητικοί τους παράμετροι (π.χ. μεταβολισμός, εντερική απορρόφηση).

Στο δεύτερο μέρος του κεφαλαίου παρουσιάστηκε η τροποποίηση του ροσμαρινικού οξέος σε παράγωγα μόρια εστέρων και αμιδίων με στόχο την ενίσχυση της βιολογικής του δραστηριότητας. Μόρια που φέρουν ορθο-διυδροξυ- ομάδες (κατεχόλες), όπως το ροσμαρινικό οξύ, έχουν αντιοξειδωτική δράση και μπορούν να δεσμεύσουν σίδηρο μέσω αυτών[44], ιδιότητα που τους θέτει υποψήφιους ρυθμιστές του οξειδωτικού στρες[45]. Ωστόσο, όταν εξετάσθηκε η ικανότητα του ροσμαρινικού οξέος να προστατεύει το DNA των κυττάρων Jurkat από βλάβες επαγόμενες από το H₂O₂ η επίδραση αυτή δε φάνηκε παρά μόνο σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις. Έτσι, έγινε η υπόθεση πως η μειωμένη αυτή αποτελεσματικότητα μπορεί να οφείλεται στη μειωμένη δυνατότητα του μορίου να διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη εξαιτίας του αρνητικού του φορτίου. Για να ελεγχθεί αυτή υπόθεση, συντέθηκαν τέσσερα παράγωγα μόρια που φέρουν πρόπυλο- ή φαινέθυλο- ομάδες δεσμευμένες μέσω εστερικών ή αμιδικών δεσμών στον C της καρβοξυλομάδας. Τα μόρια αυτά όντας περισσότερο υδρόφοβα επέδειξαν εμφανώς ισχυρότερη προστασία του DNA στα Jurkat μετά από παράλληλη επώαση με το H₂O₂. Η μεγαλύτερη μεμβρανική διαπερατότητα των τεσσάρων παραγώγων σε σχέση με το ροσμαρινικό οξύ αποδείχθηκε μέσω της μέτρησης της κυτταρικής τους πρόσληψης με τη συνδυαστική μέθοδο UHPLC-MS/MS. Επιπλέον, η μέτρηση της ικανότητας τους να προστατεύουν το DNA παρουσία H₂O₂ στους 0 °C έδειξε πως τα παράγωγα μόρια διαχέονται μέσω της μεμβράνης σε αντίθεση με το ροσμαρινικό οξύ το οποίο μάλλον χρησιμοποιεί διαφορετικό μηχανισμό. Το ίδιο μοτίβο

δραστηκότητας έδειξαν τα πέντε μόρια και στην προστασία από την επαγόμενη από το H_2O_2 απόπτωση. Βέβαια, τα εστερικά ανάλογα έδειξαν μεγαλύτερη προστασία σε σύγκριση με τα αμιδικά. Αυτό μπορεί να οφείλεται στη διαφορετική συσσώρευση του ροσμαρινικού οξέος στις δύο περιπτώσεις. Συγκεκριμένα, αναμένεται πως οι εστερικοί δεσμοί υδρολύονται από τις ενδοκυττάρια εστεράσες και με αυτόν τον τρόπο μπορεί να συσσωρευθεί το ροσμαρινικό οξύ που απελευθερώνεται εντός του κυττάρου δεδομένου πως πλέον δε μπορεί να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη για να εξέλθει. Αντίθετα, η υδρόλυση των αμιδικών δεσμών δεν είναι γνωστό εάν συμβαίνει και σε τι βαθμό. Τέλος, μελετήθηκε και η ικανότητα των μορίων να δεσμεύουν τον ενεργά καταλυτικά σίδηρο. Ο σίδηρος αποτελεί κύριο καταλύτη στις κυτταρικές οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, όμως όταν βρίσκεται στην ενεργή μορφή του μπορεί μέσω της κατάλυσης αντιδράσεων να οδηγήσει στη δημιουργία ελευθέρων ριζών[46, 47] οι οποίες αναλόγως με τη θέση της δημιουργίας τους μπορούν να προκαλέσουν βλάβες στα βιομόρια όπως μεταλλάξεις και κατακερματισμό στο DNA, μετουσίωση και τροποποιήσεις στις πρωτεΐνες, υπεροξείδωση στα λιπίδια και κατακερματισμό ή τροποποιήσεις στους υδατάνθρακες. Και πάλι τα εστερικά και αμιδικά παράγωγα αποδείχθηκαν ισχυρότεροι δεσμευτές σιδήρου σε σχέση με το πρόδρομο μόριο τους, ενώ τα εστερικά υπερέιχαν των αμιδικών. Το κατά πόσο συσχετίζεται η δέσμευση του σιδήρου με την προστασία που παρέχουν στην επαγόμενη από το H_2O_2 απόπτωση δεν είναι γνωστό πάντως βιβλιογραφικά δεδομένα έχουν δείξει πως ο σίδηρος ρυθμίζει τη φωσφορυλίωση των JNK και p-38 MAP κινασών οι οποίες έχουν καθοριστικό ρόλο στην επιβίωση των κυττάρων[48, 49].

Συμπερασματικά, ο μηχανισμός πρόσληψης και συσσώρευσης του ροσμαρινικού οξέος και των εστερικών και αμιδικών παραγώγων που προτείνεται συνοψίζεται στο **Σχήμα 3.4**. Το ροσμαρινικό οξύ δεν μπορεί να εισέλθει στο κύτταρο λόγω του αρνητικού φορτίου της καρβοξυλομάδας του (1). Τα εστερικά παράγωγα εισέρχονται στο κύτταρο και υδρολύονται μέσω των εστερασών με αποτέλεσμα να απελευθερώνονται μόρια του ροσμαρινικού οξέος και να συσσωρεύονται στον ενδοκυττάριο χώρο μιας και δε μπορούν να διαπεράσουν σε αυτή την μορφή την κυτταρική μεμβράνη (2). Τα αμιδικά παράγωγα εισέρχονται στα κύτταρα, όπου δεν υδρολύονται ή υδρολύονται με μικρό

ρυθμό έχοντας έτσι τη δυνατότητα να εισέρχονται και να εξέρχονται μέσω της κυτταρικής μεμβράνης (3).



Σχήμα 3.4. Σχηματική αναπαράσταση της πρόσληψης και συσσώρευσης στα κύτταρα 1) του ροσμαρινικού οξέος, 2) των εστερικών του παραγώγων και 3) των αμιδικών του παραγώγων.

Τα παραπάνω αποτελέσματα αποτελούν μέρη δύο ξεχωριστών εργασιών. Η μελέτη των συμπλόκων μορφοποίησης του ροσμαρινικού και καφεϊκού οξέος με την 2-υδροξυπρόπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη δημοσιεύθηκε στο επιστημονικό περιοδικό *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* με τίτλο «Charting the structural and thermodynamic determinants in phenolic acid natural product - cyclodextrin encapsulations»[50] και η μελέτη των παράγωγων μορίων του ροσμαρινικού οξέος δημοσιεύθηκε στο επιστημονικό περιοδικό *Redox Biology* με τίτλο «Lipophilic ester and amide derivatives of rosmarinic acid protect cells against H₂O₂-induced DNA damage and apoptosis: The potential role of intracellular accumulation and labile iron chelation»[27].

Βιβλιογραφία

1. Khojasteh, A., et al., *Powerful Plant Antioxidants: A New Biosustainable Approach to the Production of Rosmarinic Acid*. Antioxidants (Basel), 2020. **9**(12).
2. Khan, F.A., A. Maalik, and G. Murtaza, *Inhibitory mechanism against oxidative stress of caffeic acid*. J Food Drug Anal, 2016. **24**(4): p. 695-702.
3. Ma, Z., et al., *Rosmarinic acid exerts a neuroprotective effect on spinal cord injury by suppressing oxidative stress and inflammation via modulating the Nrf2/HO-1 and TLR4/NF-kappaB pathways*. Toxicol Appl Pharmacol, 2020. **397**: p. 115014.
4. Cao, X., et al., *Caffeic Acid Inhibits the Formation of Advanced Glycation End Products (AGEs) and Mitigates the AGEs-Induced Oxidative Stress and Inflammation Reaction in Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs)*. Chem Biodivers, 2019. **16**(10): p. e1900174.
5. Wen, Y.J. and M.C. Yin, *The anti-inflammatory and anti-glycative effects of rosmarinic acid in the livers of type 1 diabetic mice*. Biomedicine (Taipei), 2017. **7**(3): p. 19.
6. Chen, L., H. Teng, and H. Cao, *Chlorogenic acid and caffeic acid from *Sonchus oleraceus* Linn synergistically attenuate insulin resistance and modulate glucose uptake in HepG2 cells*. Food Chem Toxicol, 2019. **127**: p. 182-187.
7. Ghasemzadeh Rahbardar, M. and H. Hosseinzadeh, *Effects of rosmarinic acid on nervous system disorders: an updated review*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2020. **393**(10): p. 1779-1795.
8. Colonnello, A., et al., *Comparing the Neuroprotective Effects of Caffeic Acid in Rat Cortical Slices and *Caenorhabditis elegans*: Involvement of Nrf2 and SKN-1 Signaling Pathways*. Neurotox Res, 2020. **37**(2): p. 326-337.
9. Wang, S.J., et al., *Bioavailability of caffeic acid in rats and its absorption properties in the Caco-2 cell model*. Pharm Biol, 2014. **52**(9): p. 1150-7.
10. Qiang, Z., et al., *Permeability of rosmarinic acid in *Prunella vulgaris* and ursolic acid in *Salvia officinalis* extracts across Caco-2 cell monolayers*. J Ethnopharmacol, 2011. **137**(3): p. 1107-12.
11. Achour, M., et al., *Bioavailability and metabolism of rosemary infusion polyphenols using Caco-2 and HepG2 cell model systems*. J Sci Food Agric, 2018. **98**(10): p. 3741-3751.
12. Wang, J., et al., *Pharmacokinetics of rosmarinic acid in rats by LC-MS/MS: absolute bioavailability and dose proportionality*. RSC Advances, 2017. **7**(15): p. 9057-9063.
13. Loftsson, T., et al., *Cyclodextrins in drug delivery*. Expert Opin Drug Deliv, 2005. **2**(2): p. 335-51.
14. Sfihi, H., et al., *Solid-state ¹³C NMR study of β-cyclodextrin/substituted aromatic ketone complexes: evidence for two kinds of complexation of the guest molecules*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 1996. **115**: p. 115-126.
15. Tiwari, G., R. Tiwari, and A.K. Rai, *Cyclodextrins in delivery systems: Applications*. J Pharm Bioallied Sci, 2010. **2**(2): p. 72-9.

16. Borghetti, G.S., et al., *Quercetin/beta-cyclodextrin solid complexes prepared in aqueous solution followed by spray-drying or by physical mixture*. AAPS PharmSciTech, 2009. **10**(1): p. 235-42.
17. Giancarlo, C., et al., *Cyclodextrins as Food Additives and in Food Processing*. Current Nutrition & Food Science, 2006. **2**(4): p. 343-350.
18. Srivalli, K.M. and B. Mishra, *Improved Aqueous Solubility and Antihypercholesterolemic Activity of Ezetimibe on Formulating with Hydroxypropyl-beta-Cyclodextrin and Hydrophilic Auxiliary Substances*. AAPS PharmSciTech, 2016. **17**(2): p. 272-83.
19. Irie, T. and K. Uekama, *Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation*. J Pharm Sci, 1997. **86**(2): p. 147-62.
20. Aksamija, A., et al., *The inclusion complex of rosmarinic acid into beta-cyclodextrin: A thermodynamic and structural analysis by NMR and capillary electrophoresis*. Food Chemistry, 2016. **208**: p. 258-263.
21. Zhang, M., et al., *Preparation and spectral investigation of inclusion complex of caffeic acid with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin*. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2009. **71**(5): p. 1891-5.
22. Menezes da Silveira, C.C.S., et al., *Propolis: A useful agent on psychiatric and neurological disorders? A focus on CAPE and pinocembrin components*. Med Res Rev, 2020.
23. Kumazawa, S., et al., *Radical-scavenging activity and phenolic constituents of propolis from different regions of Argentina*. Nat Prod Res, 2010. **24**(9): p. 804-12.
24. Chen, H.C., et al., *Optimization of ultrasound-accelerated synthesis of enzymatic caffeic acid phenethyl ester by response surface methodology*. Ultrason Sonochem, 2011. **18**(1): p. 455-9.
25. Wang, X., et al., *Cytoprotective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and catechol ring-fluorinated CAPE derivatives against menadione-induced oxidative stress in human endothelial cells*. Bioorg Med Chem, 2006. **14**(14): p. 4879-87.
26. Son, S. and B.A. Lewis, *Free radical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid amide and ester analogues: structure-activity relationship*. J Agric Food Chem, 2002. **50**(3): p. 468-72.
27. Gerogianni, P.S., et al., *Lipophilic ester and amide derivatives of rosmarinic acid protect cells against H2O2-induced DNA damage and apoptosis: The potential role of intracellular accumulation and labile iron chelation*. Redox Biol, 2018. **15**: p. 548-556.
28. Fung, B.M., A.K. Khitrin, and K. Ermolaev, *An improved broadband decoupling sequence for liquid crystals and solids*. J Magn Reson, 2000. **142**(1): p. 97-101.
29. Epsztejn, S., et al., *Fluorescence analysis of the labile iron pool of mammalian cells*. Anal Biochem, 1997. **248**(1): p. 31-40.
30. Fukami, T., et al., *Nanoparticle processing in the solid state dramatically increases the cell membrane permeation of a cholesterol-lowering drug, probucol*. Mol Pharm, 2009. **6**(3): p. 1029-35.

31. Medronho, B., et al., *Inclusion complexes of rosmarinic acid and cyclodextrins: stoichiometry, association constants, and antioxidant potential*. Colloid and Polymer Science, 2014. **292**(4): p. 885-894.
32. Wei, Y., et al., *Characterization of glabridin/hydroxypropyl-beta-cyclodextrin inclusion complex with robust solubility and enhanced bioactivity*. Carbohydr Polym, 2017. **159**: p. 152-160.
33. Lioffi Alpha, S., et al., *Exploring the interactions of irbesartan and irbesartan-2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin complex with model membranes*. Biochim Biophys Acta Biomembr, 2017. **1859**(6): p. 1089-1098.
34. Ntountaniotis, D., et al., *Host-Guest Interactions between Candesartan and Its Prodrug Candesartan Cilxetil in Complex with 2-Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin: On the Biological Potency for Angiotensin II Antagonism*. Mol Pharm, 2019. **16**(3): p. 1255-1271.
35. Li, H., et al., *Microcalorimetric and spectrographic studies on host-guest interactions of α -, β -, γ - and M β -cyclodextrin with resveratrol*. Thermochimica Acta, 2010. **510**(1): p. 168-172.
36. Zheng, Y., et al., *Effect of pH on the complexation of kaempferol-4'-glucoside with three beta-cyclodextrin derivatives: isothermal titration calorimetry and spectroscopy study*. J Agric Food Chem, 2014. **62**(1): p. 244-50.
37. Callies, O. and A. Hernández Daranas, *Application of isothermal titration calorimetry as a tool to study natural product interactions*. Natural Product Reports, 2016. **33**(7): p. 881-904.
38. Wszelaka-Rylik, M. and P. Gierycz, *Isothermal titration calorimetry (ITC) study of natural cyclodextrins inclusion complexes with tropane alkaloids*. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 2015. **121**(3): p. 1359-1364.
39. Melidou, M., K. Riganakos, and D. Galaris, *Protection against nuclear DNA damage offered by flavonoids in cells exposed to hydrogen peroxide: The role of iron chelation*. Free Radical Biology and Medicine, 2005. **39**(12): p. 1591-1600.
40. Kitsati, N., et al., *Lipophilic Caffeic Acid Derivatives Protect Cells against H₂O₂-Induced DNA Damage by Chelating Intracellular Labile Iron*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012. **60**(32): p. 7873-7879.
41. Celik, S.E., et al., *Spectroscopic study and antioxidant properties of the inclusion complexes of rosmarinic acid with natural and derivative cyclodextrins*. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2011. **78**(5): p. 1615-24.
42. Loftsson, T. and M.E. Brewster, *Pharmaceutical applications of cyclodextrins: basic science and product development*. J Pharm Pharmacol, 2010. **62**(11): p. 1607-21.
43. Kurkov, S.V., et al., *The effect of parenterally administered cyclodextrins on the pharmacokinetics of coadministered drugs*. J Pharm Sci, 2012. **101**(12): p. 4402-8.
44. Andjeličković, M., et al., *Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups*. Food Chemistry, 2006. **98**(1): p. 23-31.
45. Kruszewski, M., *Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidative stress*. Mutat Res, 2003. **531**(1-2): p. 81-92.
46. Galaris, D. and K. Pantopoulos, *Oxidative stress and iron homeostasis: mechanistic and health aspects*. Crit Rev Clin Lab Sci, 2008. **45**(1): p. 1-23.

47. Weinberg, E.D., *The hazards of iron loading*. Metallomics, 2010. **2**(11): p. 732-740.
48. Mantzaris, M.D., et al., *Intracellular labile iron determines H₂O₂-induced apoptotic signaling via sustained activation of ASK1/JNK-p38 axis*. Free Radical Biology and Medicine, 2016. **97**: p. 454-465.
49. Kitsati, N., M.D. Mantzaris, and D. Galaris, *Hydroxytyrosol inhibits hydrogen peroxide-induced apoptotic signaling via labile iron chelation*. Redox Biology, 2016. **10**: p. 233-242.
50. Andreadelis, I., et al., *Charting the structural and thermodynamic determinants in phenolic acid natural product - cyclodextrin encapsulations*. J Biomol Struct Dyn, 2020: p. 1-17.

Κεφάλαιο 4

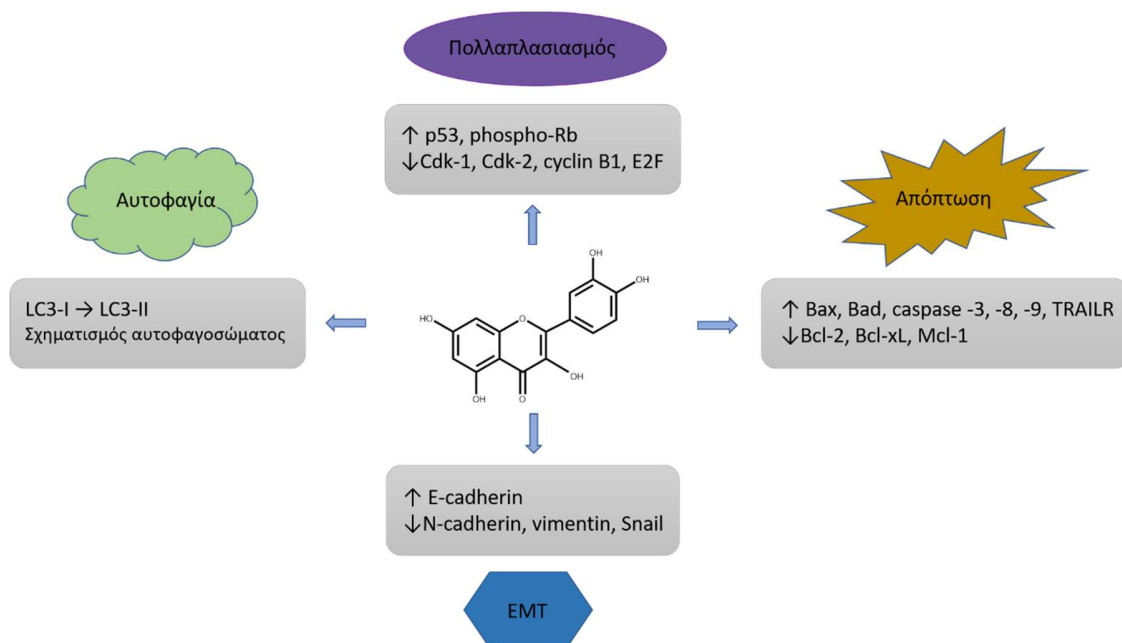
Μελέτη της αντικαρκινικής και αντιαγγειογενετικής δράσης της 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνης, ανάλογου μορίου της κερσετίνης

4.1 Εισαγωγή

Η κερσετίνη (**Σχήμα 4.1**) είναι φυτικός δευτερογενής μεταβολίτης και ανήκει στην κατηγορία των φλαβονοειδών και συγκεκριμένα στην τάξη των φλαβονολών, αφού φέρει μια υδροξυλομάδα στη θέση 3. Συναντάται σε διάφορα εδώδιμα είδη φρούτων, λαχανικών και άλλων φυτών όπως τα *Allium cepa*, *Malus domestica* και *Brassica oleracea*. Είναι ευρέως γνωστή για μια πληθώρα βιολογικών δράσεων όπως η αντιμικροβιακή[1-3], η αντιφλεγμονώδης[4, 5] και η αντιοξειδωτική της δράση[6, 7] ενώ επιστημονικά δεδομένα υποστηρίζουν την προστατευτική της δράση ως προς τις καρδιαγγειακές νόσους[8-12].

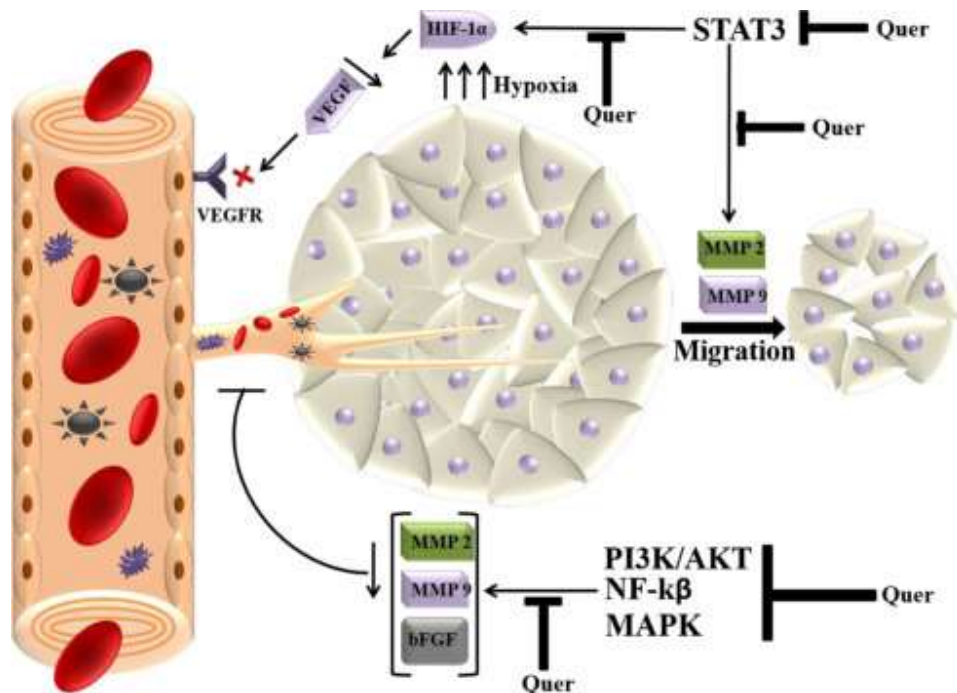
Επιπρόσθετα, η κερσετίνη επιδεικνύει χημειοπροστατευτική δράση μέσω της επίδρασης της σε ποικίλους κυτταρικούς μηχανισμούς. Η παρεμβολή της σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος κρίσιμα για την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση ποικίλων τύπων καρκινικών κυττάρων, όπως αυτά του μαστού, του παχέος εντέρου, του πνεύμονα, του παγκρέατος και του ήπατος, περιγράφεται σε πολλά επιστημονικά άρθρα[13]. Ρυθμίζοντας τη λειτουργία κυκλινών, κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών, μεταγραφικών παραγόντων και άλλων πρωτεϊνών μπορεί να αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο επιδρώντας με αυτόν τον τρόπο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων σε διάφορα σημεία μετάβασης, όπως τα G2/M, S και G1[14-16]. Η θετική ρύθμιση της έκφρασης της p53 και της φωσφορυλιωμένης Rb καθώς και η μειωμένη έκφραση των Cdk1, Cdk2, cyclin B1, cyclin A και E2F έχει παρατηρηθεί σε ποικίλες καρκινικές σειρές μετά από χορήγηση της κερσετίνης[14, 17-20]. Παράλληλα, η κερσετίνη παρουσιάζει και αποπτωτική δράση[21, 22] τόσο μέσω του εσωτερικού

μιτοχονδριακού μονοπατιού όσο και μέσω του εξωτερικού με τη μεσολάβηση των υποδοχέων θανάτου. Συγκεκριμένα, η δράση της στο μιτοχονδριακό μονοπάτι περιλαμβάνει την ενεργοποίηση κασπασών (caspase-3, -8, -9), την αύξηση της έκφρασης των αποπτωτικών πρωτεϊνών Bax και Bad και την αντίστοιχη μείωση της έκφρασης των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-xL, Bcl-2 και Mcl-1[23]. Σε προγενέστερη εργασία αποδείχθηκε πως η κερσετίνη στοχεύει άμεσα τις Bcl-xL και Bcl-2[21]. Ως προς το εξωτερικό αποπτωτικό μονοπάτι η κερσετίνη αυξάνει τα επίπεδα έκφρασης των υποδοχέων TRAILR, TNFR και FAS σε κύτταρα καρκίνου του πνεύμονα[24] Επίσης, δρα συνεργιστικά με την TRAIL σε καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου[25] και γλοιοβλαστώματος[26]. Αλλά και όσον αφορά την αυτοφαγία, η δράση της κερσετίνης φαίνεται να είναι επαγωγική, τουλάχιστον στη διδιάστατη καλλιέργεια επιθηλιακών καρκινικών κυττάρων του στομάχου, προκαλώντας τη δημιουργία αυτοφαγοσωμάτων και επάγοντας τη μετατροπή της LC3-I σε LC3-III[27]. Η δράση της εμπλέκεται και στο οξειδωτικό στρες μειώνοντας τα επίπεδα του επαγόμενου από ROS υπεροξειδίου



Σχήμα 4.1. Σύνοψη βασικών επιδράσεων της κερσετίνης ως προς τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την απόπτωση, την αυτοφαγία και την επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετατροπή (EMT). Τροποποιημένη εικόνα από το άρθρο των Tang et al.[23].

του υδρογόνου πιθανότατα μέσω του μονοπατιού PI3K/Akt[28]. Τέλος, η κερσετίνη έχει την ικανότητα να αναστέλλει τη γλυκόλυση, μεταβολική διεργασία στην οποία καταφεύγουν τα καρκινικά κύτταρα για να παράγουν ενέργεια[29].



Σχήμα 4.2. Οι πρωτεϊνικοί στόχοι της κερσετίνης στην αγγειογένεση και τη μετάσταση όπως αποδίδεται στην εργασία των Kashyap et al.[30].

Η αντικαρκινική δράση της κερσετίνης ίσως να διαφαίνεται περισσότερο μέσα από την αντιαγγειογενετική και αντιμεταστατική της δράση (Σχήμα 4.2). Αρχικά, αναστέλλει κατά δόσο-εξαρτώμενο τρόπο τον επαγόμενο από τον VEGF πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων[31]. Μειώνει τα επίπεδα έκφρασης του VEGF και του bFGF[32] και αναστέλλει τον HIF-1 σε συνθήκες υποξίας[33]. Στοχεύοντας τον VEGFR-2 και μέσω του μονοπατιού Akt/mTOR/P70S6K αναστέλλει την αγγειογένεση και περιορίζει την ανάπτυξη των όγκων σε μοντέλα ποντικών xenograft καρκίνου του προστάτη[31]. Ακόμη, παρεμβαίνοντας στο μονοπάτι σηματοδότησης της STAT3 και μειώνοντας την έκφραση των μεταλλοπρωτεϊνών MMP-2 και MMP-9 αναστέλλει τη μετανάστευση και τη διήθηση[34]. Τέλος, αναφέρεται

πως μπορεί να εμποδίσει την επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετατροπή (EMT) επάγοντας την έκφραση της E-cadherin και μειώνοντας την έκφραση των μεσεγχυματικών δεικτών N-cadherin, vimentin και Snail[35].

Η κερσετίνη δρα συνεργιστικά όταν χορηγείται σε συνδυασμό με καθιερωμένα χημειοθεραπευτικά φάρμακα αυξάνοντας την ευαισθησία των καρκινικών κυττάρων στη θεραπεία αλλά και προστατεύοντας τα υγιή κύτταρα από παρενέργειες[36-39]. Όπως προκύπτει από *in vitro* και *in vivo* μελέτες παρουσιάζει συνεργιστική δράση, αυξάνοντας τη βιοδιαθεσιμότητα και την ευαισθησία, με τουλάχιστον δεκατέσσερα θεραπευτικά μόρια συμπεριλαμβανομένων της τοποτεκάνης, σισπλατίνης, πακλιταξέλης, βιμπλαστίνης και ταμοξιφαίνης κυρίως μέσω της αναστολής της P-gp και της MRP-1[40]. Στο επίπεδο της κλινικής εφαρμογής, αρκετές κλινικές μελέτες πραγματοποιούνται ή έχουν ήδη ολοκληρωθεί για την κερσετίνη (32 εγγεγραμμένες στη βάση δεδομένων του NIH (<https://clinicaltrials.gov/>) έτσι ώστε να διερευνηθεί η προστατευτική ή ακόμη και η θεραπευτική της δράση, συνεργιστικά με φάρμακα ή όχι, έναντι διαφόρων ασθενειών όπως η υπέρταση [NCT01691404], ο διαβήτης τύπου II [NCT01839344], η παχυσαρκία [NCT00065676] και η χρόνια νεφρική νόσος [NCT02848131]. Ωστόσο τα διαθέσιμα αποτελέσματα των εν λόγω κλινικών μελετών είναι ελάχιστα ενώ μέχρι στιγμής δεν υπάρχουν δεδομένα για την αντικαρκινική της δράση σε κλινικό επίπεδο. Συγκεκριμένα, οι υπάρχουσες κλινικές μελέτες που αφορούν την κερσετίνη και τον καρκίνο, αναφέρονται είτε στη μελέτη της χημειοπροστατευτικής της δράσης [NCT01538316, NCT03476330] είτε στη μελέτη της θεραπευτικής της ικανότητας ως προς συγκεκριμένες παρενέργειες της χημειοθεραπείας [NCT02989129], ενώ καμία κλινική έρευνα δεν συναντάται για την αποτελεσματικότητα της ως θεραπευτικό μόριο έναντι του καρκίνου.

Το γεγονός ότι ένα ευρέως μελετημένο μόριο όπως η κερσετίνη δεν έχει προχωρήσει σε κλινικές μελέτες για την αντικαρκινική δράση μπορεί να οφείλεται σε διάφορους παράγοντες. Ένας κύριος περιοριστικός παράγοντας είναι η χαμηλή της βιοδιαθεσιμότητα συνοδευόμενη από εκτενή μεταβολισμό που λαμβάνει χώρα στον εντερικό σωλήνα και στο ήπαρ και ταχεία κάθαρση[41]. Είναι χαρακτηριστικό πως η συγκέντρωση της κερσετίνης στο πλάσμα ακόμη και μετά την κατανάλωση τροφής

πλούσιας σε αυτή είναι πολύ χαμηλότερη από τη συγκέντρωση που απαιτείται – τουλάχιστον 10 μM - έτσι ώστε να επιδειχθούν οι αντικαρκινικές της ιδιότητες[30]. Άλλοι παράγοντες ίσως είναι η μη ειδικότητα και η χαμηλή στοχευτική ικανότητα της. Είναι γνωστό πως η κερσετίνη αναστέλλει έναν σημαντικό αριθμό κινασών, όπως οι EGFR, FLT3, JAK3, MEK1, Raf1 και FGFR2[42, 43] ενώ σε πολλές περιπτώσεις έχει αποδειχθεί πως η αναστολή τους προκαλείται μέσω της πρόσδεσης της στη θέση πρόσδεσης του ATP[42-44]. Η στόχευση αυτή μπορεί να εξηγεί και την ανάμειξη της σε ποικίλα σηματοδοτικά μονοπάτια. Παράλληλα, η κερσετίνη μπορεί να επιδρά σε κρίσιμους μηχανισμούς των καρκινικών κυττάρων ή ακόμη και να στοχεύει άμεσα πρωτεΐνες με πρωτεύοντα ρόλο στην επιβίωση των καρκινικών κυττάρων, όμως οι συγκεντρώσεις στις οποίες παρατηρείται σημαντική δραστικότητα του μορίου είναι υψηλές (**Πίνακας 4.1**). Γενικώς παρατηρείται πως σε χαμηλές συγκεντρώσεις υπερισχύουν οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες του μορίου και συνεπώς η χημειοπροστατευτική του δράση, ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις διαφαίνονται οι αντικαρκινικές του δυνατότητες[45]. Όμως κλινικές μελέτες σχετικά με την τοξικότητα της κερσετίνης δείχνουν πως όταν χορηγείται σε δόσεις υψηλότερες των 50 mg kg^{-1} μπορεί να προκαλέσει νεφροτοξικότητα[46].

Πίνακας 4.1. Τιμές IC_{50} της κερσετίνης σε καρκινικές κυτταρικές σειρές βάσει βιβλιογραφίας

Κυτταρική σειρά	IC_{50} (μM)
HT-29	81.65[47]
PC-3	100[48]
DU-145	64.2[49]
MCF-7	37[50]
T24	64.02[51]
A549	66.5[52]

Η χαμηλή στοχευτική ικανότητα σε συνδυασμό με τους περιορισμούς της δοσολογίας λόγω τοξικότητας μπορεί να αποτελεί άλλο ένα εμπόδιο στην κλινική μελέτη και

εφαρμογή της. Εντούτοις, η δυνατότητα του μορίου να ρυθμίζει κυτταρικές διεργασίες, όπως παρουσιάζεται από πληθώρα ερευνητικών δεδομένων, οδηγεί στο συμπέρασμα πως η κερσετίνη θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως μόριο-οδηγός στον τομέα ανακάλυψης αντικαρκινικών φαρμάκων.

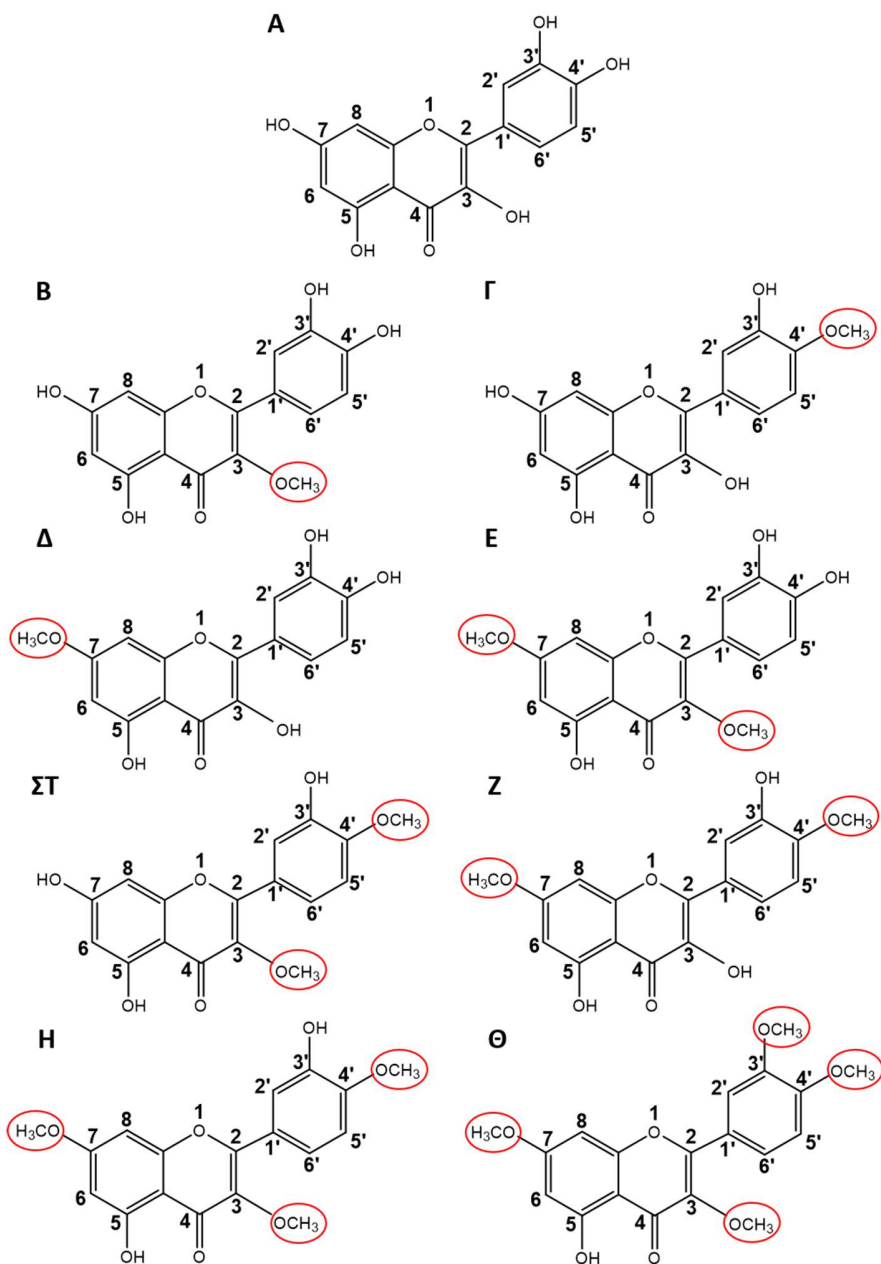
Για να ξεπεραστούν τα προαναφερθέντα εμπόδια της χαμηλής βιοδιαθεσιμότητας και της χαμηλής στοχευτικής ικανότητας της κερσετίνης, δύο οδοί ακολουθούνται στη βιβλιογραφία. Η πρώτη οδός αφορά στον εγκλεισμό της κερσετίνης σε διάφορων ειδών νανοσωματίδια ή λιποσώματα ή πολυμερή[41, 53]. Η δεύτερη οδός σχετίζεται με την τροποποίηση του μορίου, η οποία μπορεί να συμβεί π.χ. με την προσθήκη κάποιας λειτουργικής ομάδας[54], αμινοξέων[55] ή ακόμη και ολόκληρων μορίων/φαρμάκων[56]. Μια μέθοδος τροποποίησης της κερσετίνης είναι η *O*-αλκυλίωση, δηλαδή η προσθήκη ενός ή περισσότερων αλκυλίων στις φαινολικές ομάδες του μορίου. Ειδικά για τη μεθυλίωση τους, έχει αναφερθεί πως αυξάνει τη μεταβολική τους σταθερότητα, τη βιοδιαθεσιμότητα αλλά και τη δραστικότητα[57]. Φαίνεται πως η παρουσία των μεθυλομάδων αντί των υδροξυλομάδων καθιστά τα φλαβονοειδή λιγότερο επιρρεπή στην οξείδωση και σε συζεύξεις, όπως η γλυκουρονίδωση, η σουλφούρωση και η μεθυλίωση[58] και επιπρόσθετα αυξάνει την εντερική τους απορρόφηση[59]. Η αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας και της μεταβολικής σταθερότητας οδηγεί στην αύξηση της βιολογικής επίδρασης ενός μορίου, όμως φαίνεται πως η μεθυλίωση μπορεί να ενισχύσει επιπλέον και την ενδογενή δραστικότητα του. Μεθυλιωμένα παράγωγα της κερσετίνης παρουσίασαν μεγαλύτερη ικανότητα ρύθμισης της αντίστασης σε φάρμακα (MDR, MultiDrug Resistance) μέσω των υποδοχέων P-gp, BCRP και MRP1[60]. Αλλά και ως προς τον πολλαπλασιασμό, μεθυλιωμένα παράγωγα της απιγενίνης και της χρυσίνης έδειξαν 8 και 13 φορές αντίστοιχα μεγαλύτερη αναστολή του πολλαπλασιασμού καρκινικών κυττάρων πλακώδους επιθηλίου του στόματος σε σχέση με τα αρχικά φλαβονοειδή[61]. Ανάλογες μελέτες έχουν γίνει και για την επίδραση μεθυλιωμένων παραγώγων της κερσετίνης στη βιωσιμότητα καρκινικών κυτταρικών σειρών, όπως καρκίνου του πνεύμονα και του προστάτη και μελανώματος[62, 63],

ωστόσο δεν έχει διαλευκανθεί μέχρι στιγμής ο τρόπος με τον οποίο η μεθυλίωση επηρεάζει αυτήν την ιδιότητα[57].

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου είναι ο τρίτος πιο συχνός στους άντρες και ο δεύτερος πιο συχνός στις γυναίκες τύπος καρκίνου, με περίπου 1.8 εκατομμύρια νέα περιστατικά διαγνωσμένα μόνο κατά το έτος 2018[64]. Ο μοριακός μηχανισμός του ορθοκολικού καρκίνου έχει χαρακτηριστεί λεπτομερώς με τις πιο κοινές μεταλλάξεις να απαντώνται στα γονίδια APC, CTNNB1, KRAS, NRAS, BRAF, ERBB2, ERBB3, PTEN, PIK3CA και TGFBR2, SMAD4 τα οποία εμπλέκονται σε 5 κύρια μονοπάτια μεταγωγής σήματος: το μονοπάτι WNT, το μονοπάτι των MAP κινασών, το μονοπάτι της PI3 κινάσης, το μονοπάτι του αυξητικού παράγοντα TGFβ και αυτό του TP53[65]. Επίσης η αγγειογένεση παίζει σημαντικό ρόλο στην πρόοδο της νόσου με το μονοπάτι VEGF/VEGFR-2 να αποτελεί κύριο θεραπευτικό στόχο. Η έγκαιρη διάγνωση είναι καθοριστική για την έκβαση της νόσου ενώ οι θεραπείες που έχουν αναπτυχθεί περιλαμβάνουν τη χειρουργική επέμβαση, ακτινοθεραπείες αλλά και χορήγηση χημειοθεραπευτικών φαρμάκων ή και στοχευτικών παραγόντων. Κύρια χημειοθεραπευτικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται είναι οι 5-φθοροουρακίλη, η ιρινοτεκάνη και η οξαλιπλατίνη, ενώ η στοχεύουσα θεραπεία (Targeted therapy) περιλαμβάνει τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων, όπως οι μπεβασιζουμάμπη και αφλιβερσέπτη που στοχεύουν τον αγγειογενετικό παράγοντα VEGF, και μικρά μόρια, όπως η ρεγοραφενίμπη που στοχεύει τον υποδοχέα VEGFR-2.

Στη βιβλιογραφία εμφανίζεται πληθώρα άρθρων σχετικά με την επίδραση της κερσετίνης σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του παχέος εντέρου όπου προτείνονται και διάφοροι μηχανισμοί δράσης του μορίου, όπως η ενεργοποίηση της AMPK και η επαγωγή της απόπτωσης μέσω της p53[66] και η μείωση της έκφρασης των ErbB2 και ErbB3 στα κύτταρα HT-29[67], η επαγωγή της απόπτωσης σε κυτταρικές σειρές που φέρουν μετάλλαξη στο KRAS μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού JNK[68] αλλά και η αναστολή της επαγόμενης από τον TGF-β1 επιθηλιακής- μεσεγχυματικής μετατροπής[69]. Ωστόσο, η πρόκληση βιολογικού ερεθίσματος από την κερσετίνη παρατηρείται σε υψηλές συγκεντρώσεις[70], κάτι που μπορεί δύσκολα να επιτευχθεί *in*

νίνο και που μπορεί να οδηγεί στη μη ειδική δράση του μορίου. Τα μεθυλιωμένα παράγωγα των φλαβονοειδών επιδεικνύουν ενισχυμένη βιολογική δράση σε σχέση με τα αρχικά τους μόρια, τόσο από την άποψη της βελτιωμένης βιοδιαθεσιμότητας όσο και λόγω της καλύτερης ενδογενούς δραστηριότητας. Στόχος του παρόντος κεφαλαίου είναι η μελέτη της αντικαρκινικής δράσης μεθυλιωμένων παραγώγων της κερσετίνης (**Σχήμα 4.3**) και η μελέτη του τρόπου δράσης του πιο δραστικού παραγώγου σε καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου. Ταυτόχρονα, μελετάται και η επίδραση του επικρατέστερου μεθυλιωμένου παραγώγου στο μονοπάτι VEGF/VEGFR-2 έτσι ώστε να διερευνηθεί εάν η τροποποίηση διατηρεί τις αντιαγγειογενετικές ιδιότητες της κερσετίνης.



Σχήμα 4.3. Χημικές δομές της **Α)** κερσετίνης, **Β)** 3',4',5,7-OH-3-μεθοξυφλαβόνης, **Γ)** 3',3,5,7-OH-4'-μεθοξυφλαβόνης, **Δ)** 3',4',3,5-OH-7-μεθοξυφλαβόνης, **Ε)** 3',4',5-OH-3,7-διμεθοξυφλαβόνης, **ΣΤ)** 3',5,7-OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνης, **Ζ)** 3',3,5-OH-7,4'-διμεθοξυφλαβόνης, **Η)** 3,5-OH-7,3,4'-τριμεθοξυφλαβόνης και **Θ)** 5-OH-7,3,3',4'-τετραμεθοξυφλαβόνης

4.2 Υλικά και Μέθοδοι

4.2.1 Σύνθεση μεθυλιωμένων παραγώγων της κερσετίνης

Σε διάλυμα άνυδρης κερσετίνης (1 g, 1 ισοδύναμο) και K_2CO_3 (1.14 g, 2.5 ισοδύναμα) σε 20 mL άνυδρου διμεθυλοφορμαμιδίου προστέθηκε CH_3I (412 μ L, 2 ισοδύναμα) στάγδην στους 0 °C υπό ατμόσφαιρα αζώτου σε διάστημα 10 λεπτών. Το διάλυμα αφέθηκε υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 ώρες. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθήθηκε με χρήση χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC). Ο διαλύτης εξατμίστηκε σε αντλία υψηλού κενού με χρήση θέρμανσης και το υπόλειμμα καθαρίστηκε σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με αντίστροφη φάση όπου χρησιμοποιήθηκε σύστημα έκλουσης 75/25 % έως 20/80 % $H_2O+0.1\%$ TFA/MeCN+0.1 % TFA, για 30 λεπτά και σε απορρόφηση 280 nm. Η απόδοση της 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνης ήταν 10 %. Η ταυτοποίηση των ενώσεων έγινε με τη λήψη πρωτονιακών φασμάτων NMR σε $DMSO-d_6$ στους 298 K. Επιπλέον ποσότητα της 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνης αγοράστηκε από την Extrasynthese.

4.2.2 Μέθοδος κυτταροκαλλιέργειας της κυτταρικής σειράς DLD1

Στα πειράματα του παρόντος κεφαλαίου χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινα κύτταρα προερχόμενα από αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου (Duke's type C) DLD1. Η κυτταρική σειρά καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό υλικό Mc Coy's 5A (Hyclone, GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA) εμπλουτισμένο με 10 % εμβρυϊκού ορού βοός (Fetal Bovine Serum, FBS) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA) θερμικά απενεργοποιημένο και 100 units/mL πενικιλίνη και 100 μ g mL^{-1} στρεπτομυκίνη (Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA). Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων γινόταν σε τρυβλία petri (100 mm) και όταν επερχόταν κάλυψη ολόκληρης της επιφάνειας τους (κάθε δύο ημέρες) πραγματοποιούνταν η διασπορά τους σε αναλογία 1:4. Ο χειρισμός των κυττάρων γινόταν σε εστία κάθετης

νηματικής ροής ενώ τα κύτταρα αναπτύσσονταν σε επωαστικό κλίβανο στους 37 °C, με ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5 % CO₂ και συνθήκες υγρασίας.

4.2.3 Μέθοδος βιωσιμότητας κυττάρων MTT

Η μέθοδος MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma Aldrich, USA) είναι μια χρωματομετρική τεχνική η οποία βασίζεται στην αναγωγή του τετραζολίου (κίτρινο χρώμα) σε φορμαζάνη (μωβ χρώμα) μέσω μιτοχονδριακών ενζύμων. Επομένως, η βιωσιμότητα των κυττάρων μετράται έμμεσα καθώς αντιστοιχίζεται με τη μεταβολική δραστηριότητα τους. Το μήκος κύματος όπου παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση η φορμαζάνη είναι περίπου στα 570 nm.

Για τη μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων DLD1 παρουσία της κερσετίνης και των οκτώ μεθόξυ- ανάλογων μορίων της αρχικά καλλιεργήθηκαν 3,000 κύτταρα/φρεάτιο σε τρυβλία των 96 φρεατίων. Ο αριθμός των κυττάρων εκτιμήθηκε με δοκιμή διαφορετικών πληθυσμών έτσι ώστε η απορρόφηση των δειγμάτων ελέγχου (control) να βρίσκεται εντός του εύρους 0.75-1.25. Την επόμενη ημέρα ακολούθησε η προσθήκη των μορίων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και σε τριπλέτες. Τα φλαβονοειδή διαλύθηκαν αρχικά σε DMSO και στη συνέχεια σε θρεπτικό υλικό. Σε κάθε περίπτωση το ποσοστό του DMSO στα κύτταρα δεν ξεπερνούσε το 0.25 %. Μετά από επώαση 72 ωρών προστέθηκε MTT (5 mg mL⁻¹ σε διάλυμα φωσφορικών, PBS) για 4 ώρες. Στη συνέχεια αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και οι σχηματισμένοι κρύσταλλοι φορμαζάνης διαλυτοποιήθηκαν με την προσθήκη 100 μL DMSO ανά φρεάτιο. Τα δείγματα μετρήθηκαν σε φωτόμετρο τύπου ELISA (Awareness Technology Inc) χρησιμοποιώντας φίλτρο απορρόφησης στα 540 nm. Ο υπολογισμός των τιμών IC₅₀ έγινε μέσω του λογισμικού Graphpad Prism 8. Ως δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν τα φρεάτια που επώαστηκαν μόνο με τον φορέα. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται προέρχονται από τρεις επαναληπτικές δοκιμές και εκφράστηκαν ως προς το δείγμα ελέγχου (100 %).

4.2.4 Μελέτη της ανάπτυξης των κυττάρων DLD1 μέσω του συστήματος IncuCyte®

Για τον έλεγχο αναστολής της ανάπτυξης κύτταρα DLD1 σε πληθυσμό 5,000 και 10,000 κύτταρα ανά φρεάτιο στρώθηκαν σε τρυβλία 96 φρεατίων. Την επόμενη ημέρα η κερσετίνη και η 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνη προστέθηκαν σε τριπλέτες σε συγκεντρώσεις 10, 25 και 50 μM και ακολούθησε επώαση στους 37 °C και ταυτόχρονη παρακολούθηση των κυττάρων με το σύστημα IncuCyte® S3 Live-Cell Analysis System (Sartorius, Michigan, MI, USA). Η λήψη φωτογραφιών πραγματοποιούνταν κάθε 2 ώρες, ενώ η ανάλυση των δεδομένων έγινε μέσω του λογισμικού (IncuCyte Zoom 2016B) του ίδιου συστήματος, βάσει του ποσοστού κάλυψης της επιφάνειας των φρεατίων. Πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις τους πειράματος.

4.2.5 Μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων DLD1 μέσω του συστήματος IncuCyte®

Για τον έλεγχο αναστολής της μεταναστευτικής ικανότητας, κύτταρα DLD1 σε πληθυσμό 40,000 κυττάρων/φρεάτιο στρώθηκαν σε τρυβλία 96 φρεατίων. Την επόμενη ημέρα και εφόσον τα κύτταρα κάλυψαν ολόκληρη την επιφάνεια κάθε φρεατίου, δημιουργήθηκαν τραύματα. Ακολούθησε μια πλύση με ρυθμιστικό διάλυμα PBS και στη συνέχεια προστέθηκαν διάφορες συγκεντρώσεις εις τριπλούν κερσετίνης και 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνης (5, 10, 25 και 50 μM). Τα τρυβλία επώαστηκαν στους 37 °C εντός του συστήματος IncuCyte® S3 Live-Cell Analysis System (Sartorius, Michigan, MI, USA). Η λήψη φωτογραφιών πραγματοποιήθηκε σε 4 ώρες και 8 ώρες, ενώ η ανάλυση των δεδομένων έγινε μέσω του λογισμικού ImageJ έτσι ώστε να ποσοτικοποιηθεί η επιφάνεια της τραυματισμένης περιοχής που δεν καλύφθηκε από τα κύτταρα σε κάθε δείγμα. Πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις τους πειράματος.

4.2.6 Έλεγχος απόπτωσης και νέκρωσης στα κύτταρα DLD1 με χρήση κυτταρομετρίας ροής με Annexin V-FITC και ιωδιούχο προπίδιο

Για τον έλεγχο επαγωγής της απόπτωσης και της νέκρωσης, κύτταρα DLD1 καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία των έξι φρεατίων σε πληθυσμό 400,000 κυττάρων/φρεάτιο. Την επόμενη ημέρα προστέθηκαν στα κύτταρα 10 μM κερσετίνης και 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνης και επώαστηκαν για 24 ώρες. Με το πέρας του χρόνου επώασης, τα κύτταρα συλλέχθηκαν, μετρήθηκαν και στη συνέχεια επαναιωρήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα πρόσδεσης (1x Annexin V Binding Buffer, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂, 10 mM HEPES/ NaOH, pH 7.4) έτσι ώστε να έχουν τελικό πληθυσμό 150,000 κύτταρα/100 μL . Τα κύτταρα επώαστηκαν με 3 μL Annexin V-FITC (eBioscience, USA) και 5 μL ιωδιούχου προπιδίου (PI) (Sigma Aldrich, τελική συγκέντρωση 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) για 20 λεπτά σε σκοτάδι και θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, τα δείγματα επαναιωρήθηκαν σε διάλυμα πρόσδεσης με τελικό όγκο 1000 μL . Η ανάλυση των δειγμάτων με κυτταρομετρία ροής (FACS, Fluorescence-activating Cell Sorting) εκτελέστηκε με το κυτταρόμετρο ροής CyFlow[®]ML (Partec, Munster, Germany) εξοπλισμένο με λέιζερ αργού. Η μέτρηση ρυθμίστηκε στα 10,000 γεγονότα, ενώ για την ανίχνευση του φθορισμού της Annexin V-FITC και του ιωδιούχου προπιδίου χρησιμοποιήθηκαν τα κανάλια FL1 και FL3, αντίστοιχα. Η ανάλυση των δεδομένων έγινε μέσω του λογισμικού FloMax. Κύτταρα τα οποία δεν παρουσιάζουν φθορισμό σε κανένα από τα δύο κανάλια θεωρούνται ζωντανά. Αυτά που είναι θετικά στην Annexin V-FITC και αρνητικά στο ιωδιούχο προπίδιο βρίσκονται στο στάδιο της πρώιμης απόπτωσης, ενώ τα θετικά κύτταρα και στις δύο χρώσεις βρίσκονται σε προχωρημένο στάδιο της απόπτωσης. Τέλος τα θετικά κύτταρα μόνο σε ιωδιούχο προπίδιο έχουν υποστεί νέκρωση.

4.2.7 Δοκιμασία πολλαπλασιασμού των κυττάρων DLD1 με ενσωμάτωση βρωμοδεόξυ ουριδίνης και ανοσοφθορισμό

Τα κύτταρα DLD1 επιστρώθηκαν σε τρυβλίο καλλιέργειας 24 φρεατίων σε πληθυσμό 40,000 κύτταρα ανά φρεάτιο με καλυπτρίδες των 11 mm. Την επόμενη ημέρα προστέθηκαν σε αυτά διαφορετικές συγκεντρώσεις κερσετίνης και 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνης (1, 5 και 10 μM) και επώαστηκαν για 24 ώρες. Τις τελευταίες 6 ώρες πριν τη λήξη της επώασης προστέθηκε σε αυτά βρωμοδεόξυ ουριδίνη (Bromodeoxyuridine, BrdU) σε τελική συγκέντρωση 100 μM . Η βρωμοδεόξυ ουριδίνη, ως ανάλογο μόριο της θυμίνης, έχει την ικανότητα να ενσωματώνεται στο DNA. Έτσι, τα κύτταρα που πολλαπλασιάζονται μετά την προσθήκη της θα περιέχουν στο νεοσυντιθέμενο DNA τους τη βρωμοδεόξυ ουριδίνη αντί της θυμίνης. Στη συνέχεια ακολούθησε η μονιμοποίηση των κυττάρων στις καλυπτρίδες σε διάλυμα παραφορμαλδεΐδης 3.7% για 15 λεπτά και η απόσβεση του μη ειδικού σήματος με διάλυμα 50 mM χλωριούχου αμμωνίου (NH_4Cl) για 15 λεπτά. Έπειτα, προστέθηκε διάλυμα Triton X-100 0.1 % για την επαγωγή της διαπερατότητας των κυτταρικών μεμβρανών για 4 λεπτά, ενώ ακολούθησε επώαση τους σε διάλυμα 1.5 M υδροχλωρικού οξέος (HCL) εμπλουτισμένο με 150 mM NaCl για 10 λεπτά έτσι ώστε να αποδιαταχθεί το DNA. Το διάλυμα απομακρύνθηκε με τρεις πλύσεις με PBS των δέκα λεπτών και ακολούθησε επώαση με 10 % FCS (Fetal Calf Serum) για 30 λεπτά για να καλυφθούν οι μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης. Στη συνέχεια, προστέθηκε το αντίσωμα anti-BrdU ($2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$) (G3G4, DSHB, USA) για μια ώρα. Μετά από τρεις πλύσεις διάρκειας, 5 λεπτών η καθεμία, με PBS τα coverslips επώαστηκαν με το δεύτερο αντίσωμα συζευγμένο με ισοθειοκυανική τετραμέθυλο ροδαμίνη (TRITC, Tetramethyl Rhodamine Isothiocyanate) (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd) είτε Alexa 488 (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd) σε αραιώση 1:300 και 1:200, αντίστοιχα. Οι καλυπτρίδες τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες σε διάλυμα Mowiol (Sigma-Aldrich) και παρατηρήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο (confocal microscope) Leica TCS SP5, εξοπλισμένο με πηγές λέιζερ, Arg, SS561 και HeNe633.

4.2.8 Μέτρηση συγκέντρωση πρωτεΐνης

Για τη μέτρηση της συγκέντρωσης της συνολικής πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος BCA (bikinchromic acid, βικινχρωμικό οξύ) (PIERCE™, ThermoScientific, USA). Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης BSA (2, 4, 8, 16 και 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Τα δείγματα επώαστηκαν στους 37 °C για 30 λεπτά και η απορρόφηση τους μετρήθηκε στα 562 nm.

4.2.9 Απομόνωση και μέθοδος κυτταροκαλλιέργειας των HUVECs

Τα HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial cells) απομονώθηκαν από ανθρώπινους ομφάλιους λώρους. Αρχικά, οι λώροι πλύθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα PBS (20 mL) και προστέθηκε διάλυμα κολλαγενάσης τύπου I (Worthington, USA) 0.1 % σε θρεπτικό υλικό M199 (Gibco). Στη συνέχεια οι λώροι επώαστηκαν στους 37 °C για 12 λεπτά, ξεπλύθηκαν με θρεπτικό υλικό και φυγοκεντρήθηκαν στα 500 g για 5 λεπτά. Τέλος, τα απομονωμένα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε τρυβλία καλλιέργειας[71].

Η καλλιέργεια των HUVECs πραγματοποιήθηκε σε τρυβλία τα οποία προηγουμένως είχαν επιστρωθεί με κολλαγόνο αρουραίου τύπου I (Corning, USA) και πλυθεί δύο φορές με PBS. Η διασπορά των κυττάρων γινόταν σε αραιώση 1:3. Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν το M199 εμπλουτισμένο με 20 % εμβρυϊκό ορό βοός (Fetal Bovine Serum, FBS), 0.05 mg mL^{-1} ECGS, 0.05 IU ηπαρίνης/mL (Sigma Aldrich, USA) και 1 % πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα γενιάς 2-4.

4.2.10 Δοκιμασία τοξικότητας σε κύτταρα HUVE

Κύτταρα HUVE επιστρώθηκαν σε τρυβλίο καλλιέργειας 96 φρεατίων σε πληθυσμό 10,000 κυττάρων/φρεάτιο. Την επόμενη μέρα προστέθηκαν σε αυτά η κερσετίνη και η 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνη σε συγκεντρώσεις 0.4-25 μM και

ακολούθησε επώαση για 48 ώρες. Η βιωσιμότητα των κυττάρων αξιολογήθηκε με τη μέθοδο MTT όπως περιγράφεται παραπάνω.

4.2.11 Δοκιμασία πολλαπλασιασμού των HUVECs με ενσωμάτωση βρωμοδεόξυ ουριδίνης και ανοσοφθορισμό

Κύτταρα HUVE επιστρώθηκαν σε τρυβλίο καλλιέργειας 24 φρεατίων σε πληθυσμό 30,000 κύτταρα/φρεάτιο με καλυπτρίδες των 11 mm. Την επόμενη ημέρα τα κύτταρα υπέστησαν στέρηση ορού (5 % FBS) για 18 ώρες μετά το πέρας των οποίων προστέθηκαν στα κύτταρα διαφορετικές συγκεντρώσεις κερσετίνης (10 μM) και 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνης (1, 5 και 10 μM) και επωάστηκαν για 24 ώρες παρουσία και απουσία VEGF (VEGF-165, Immunotools) (50 ng mL^{-1}). Τις τελευταίες 6 ώρες πριν τη λήξη της επώασης προστέθηκε σε αυτά βρωμοδεόξυ ουριδίνη (Bromodeoxyuridine, BrdU) σε τελική συγκέντρωση 200 μM . Έπειτα ακολούθησε η μονιμοποίηση και ο ανοσοφθορισμός των δειγμάτων κατά την ίδια διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 4.2.7 με τη διαφορά ότι ως δεύτερο αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε μόνο το συζευγμένο με την Alexa 488. Οι καλυπτρίδες τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες σε διάλυμα Mowiol (Sigma-Aldrich) και παρατηρήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο Leica TCS SP5, εξοπλισμένο με πηγές λέιζερ, Arg, SS561 και HeNe633.

4.2.12 Έλεγχος απόπτωσης και νέκρωσης στα HUVECs μέσω κυτταρομετρίας ροής με Annexin V-FITC και ιωδιούχο προπίδιο

Κύτταρα HUVE επιστρώθηκαν σε τρυβλία 6 φρεατίων σε πληθυσμό 200,000 κύτταρα/φρεάτιο. Την επόμενη μέρα τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε στέρηση ορού (5 % FBS) για 18 ώρες. Κατόπιν, προστέθηκαν σε αυτά η 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνη και η κερσετίνη σε συγκέντρωση 10 μM , παρουσία και απουσία VEGF (50 ng mL^{-1}) και επωάστηκαν για 24 ώρες. Με το πέρας του χρόνου επώασης συλλέχθηκε το υπερκείμενο θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα και μετρήθηκαν. Ακολούθησε η επαναιώρηση τους σε

ρυθμιστικό διάλυμα πρόσδεσης (1x Annexin V Binding Buffer, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂, 10 mM HEPES/ NaOH, pH 7.4) έτσι ώστε να έχουν τελικό πληθυσμό 100,000 κύτταρα/100 μL. Στη συνέχεια ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 4.2.6.

4.2.13 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου και ανοσοαποτύπωμα Western

Για την απομόνωση των κυτταρικών εκχυλισμάτων, HUVECs επιστρώθηκαν σε τρυβλία 12 φρεατίων σε πληθυσμό 200,000 κυττάρων ανά φρεάτιο. Την επόμενη μέρα τα κύτταρα υπέστησαν στέρηση ορού είτε για 1.5 ώρα (0 % FBS) είτε για 6 ώρες (5 % FBS). Έπειτα, τα κύτταρα επώαστηκαν με 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνη (1, 5, 10 μM) ή κερσετίνη (10 μM) για 10 λεπτά. Τέλος, ελήφθησαν τα κυτταρικά εκχυλίσματα με ρυθμιστικό διάλυμα PBS (pH 7.0) που περιείχε 1% SDS και 100 μM αναστολέα πρωτεασών (phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF). Στη συνέχεια, ακολούθησε επεξεργασία των δειγμάτων με υπέρηχους (Branson Digital Sonifier) (13 % amplitude) δύο φορές με διάρκεια 10 δευτερολέπτων η καθεμία και υπέστησαν βρασμό για 10 λεπτά. Αφού φυγοκεντρήθηκαν στα 12,000 g για 20 λεπτά, συλλέχτηκε το υπερκείμενο και υπολογίστηκε η συγκέντρωση πρωτεϊνών. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 12 % (SDS-PAGE) και μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης 0.45 μm Protran™ (Amersham, GE Healthcare Life Sciences). Για να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα της μεταφοράς, πραγματοποιήθηκε χρώση με 0.1 % PonceauS για 1 λεπτό και στη συνέχεια η χρωστική απομακρύνθηκε με νερό. Η μεμβράνη επώαστηκε με 5 % άπαχο γάλα σε διάλυμα western (10 mM Tris-HCl pH 7.2, 0.1 % Tween-20, και 150 mM NaCl), έτσι ώστε να δεσμευθούν οι μη ειδικές θέσεις, για 1 ώρα. Έπειτα η μεμβράνη επώαστηκε με το πρωτογενές αντίσωμα anti-phospho-Erk1/2 T202/Y204 (Cell Signalling, USA) ή anti-phospho-Akt Ser473 (Cell Signalling, USA) ή anti-tubulin (DSHB, USA) ή anti-actin (Santa Cruz, USA), αραιωμένο σε 5 % άπαχο γάλα ή 2 % ζελατίνη (Gelatin from cold water fish

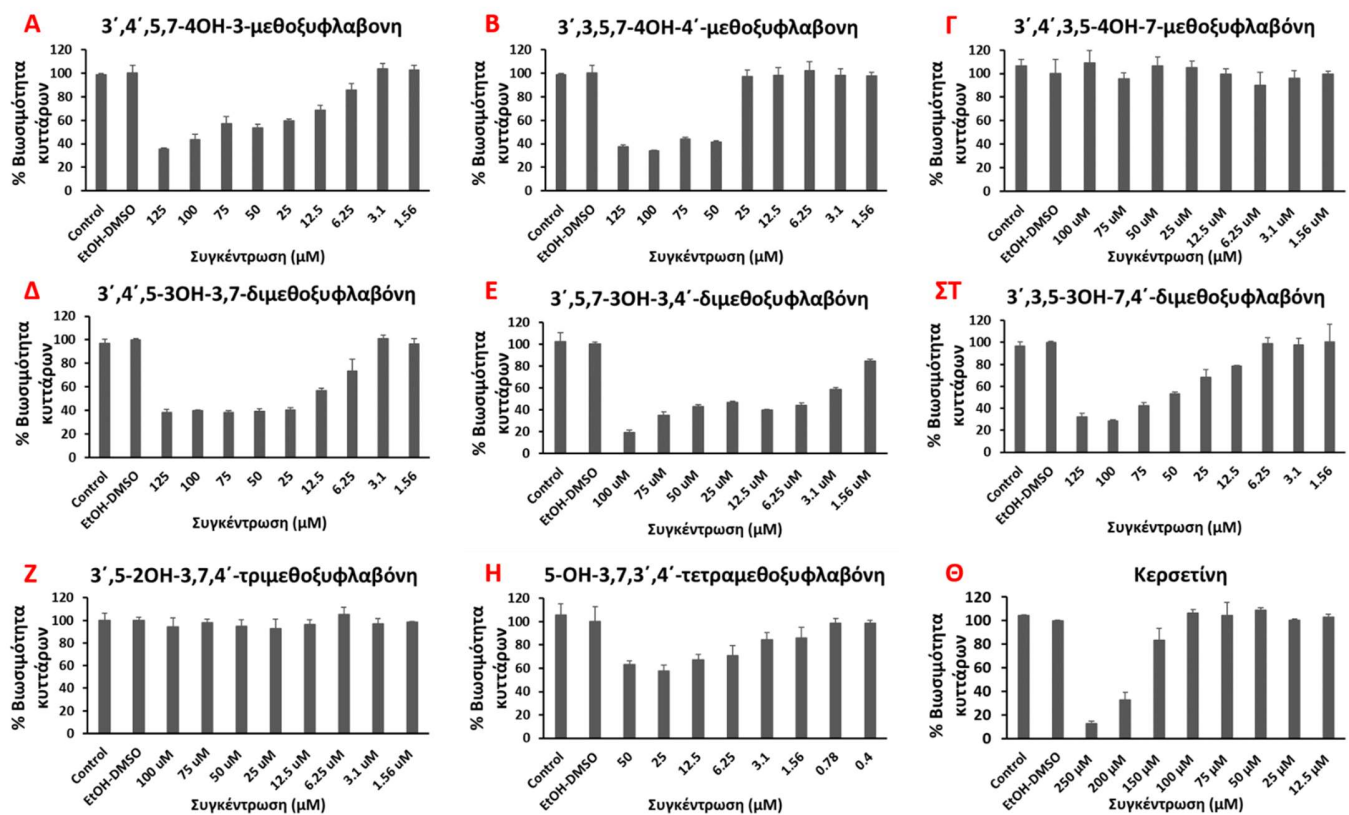
skin, Sigma, 063K0777) σε διάλυμα western για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ή ολονυκτίως στους 4 °C. Ακολούθως πραγματοποιήθηκαν τρεις πλύσεις των 10 λεπτών με διάλυμα western και επώαση με δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με τη ραφανιδική υπεροξειδάση (Horse Radish Peroxidase, HRP) για 2 ώρες. Τα δευτερογενή αντισώματα αραιώθηκαν σε 5 % άπαχο γάλα σε διάλυμα western. Μετά την επώαση ακολούθησαν τρεις πλύσεις των 10 λεπτών με διάλυμα western. Η εμφάνιση του σήματος έγινε με το αντιδραστήριο ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (Enhanced Chemiluminescence, ECL) της εταιρείας Amersham (Amersham GE Healthcare Life Sciences, USA).

4.3 Αποτελέσματα

4.3.1 Έλεγχος της βιωσιμότητας των κυττάρων DLD1 παρουσία της κερσετίνης και των μεθυλιωμένων παράγωγων μορίων της

Η επίδραση της κερσετίνης και των μεθυλιωμένων παραγώγων της εξετάστηκε στα κύτταρα DLD1 με τη μέθοδο MTT μετά από επώαση τους για 72 ώρες. Το καθένα φλαβονοειδές προστέθηκε στα κύτταρα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις έτσι ώστε να εκτιμηθεί η τιμή IC_{50} (Πίνακας 4.2). Στην Εικόνα 4.1 παρουσιάζεται η επί τοις εκατό βιωσιμότητα των κυττάρων συναρτήσει των διαφορετικών συγκεντρώσεων του κάθε μορίου με τις οποίες έχουν επωαστεί. Παρατηρείται πως όλα τα μεθυλιωμένα ανάλογα της κερσετίνης, εκτός της 3',4',3,5-OH-7-μεθοξυφλαβόνης και της 3,5-OH-7,3,4'-τριμεθοξυφλαβόνης, παρουσιάζουν σημαντικά χαμηλές τιμές IC_{50} . Η ισχυρότερη μείωση της βιωσιμότητας των DLD1 κυττάρων προκύπτει μετά από προσθήκη της 3',5,7-OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνης ($IC_{50}=4\pm 1.4 \mu M$). Παρομοίως ισχυρή δράση παρουσιάζουν και οι 5-OH-7,3,3',4'-τετραμεθοξυφλαβόνη ($IC_{50}=7.3\pm 2.1 \mu M$) και 3',4',5-OH-3,7'-διμεθοξυφλαβόνη ($IC_{50}=8.9\pm 0.9 \mu M$). Συνεπώς, το ανάλογο 3',5,7-OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνη επιλέχθηκε να μελετηθεί διεξοδικά ως προς τον μηχανισμό δράσης του στα κύτταρα DLD1.

Η επίδραση της κερσετίνης και της 3',5,7-OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνης στην ανάπτυξη των DLD1 μελετήθηκε και με το σύστημα IncuCyte® το οποίο επιτρέπει τη βιντεοσκόπηση των κυττάρων σε πραγματικό χρόνο ενόσω αυτά καλλιεργούνται σε επωαστικό κλίβανο δίνοντας έτσι τη δυνατότητα παρακολούθησης τους από την χρονική στιγμή 0 και καθ' όλη τη διάρκεια του χρόνου επώασης 48 ωρών (Εικόνα 4.2). Παρατηρείται πως η 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνη αναστέλλει την ανάπτυξη των

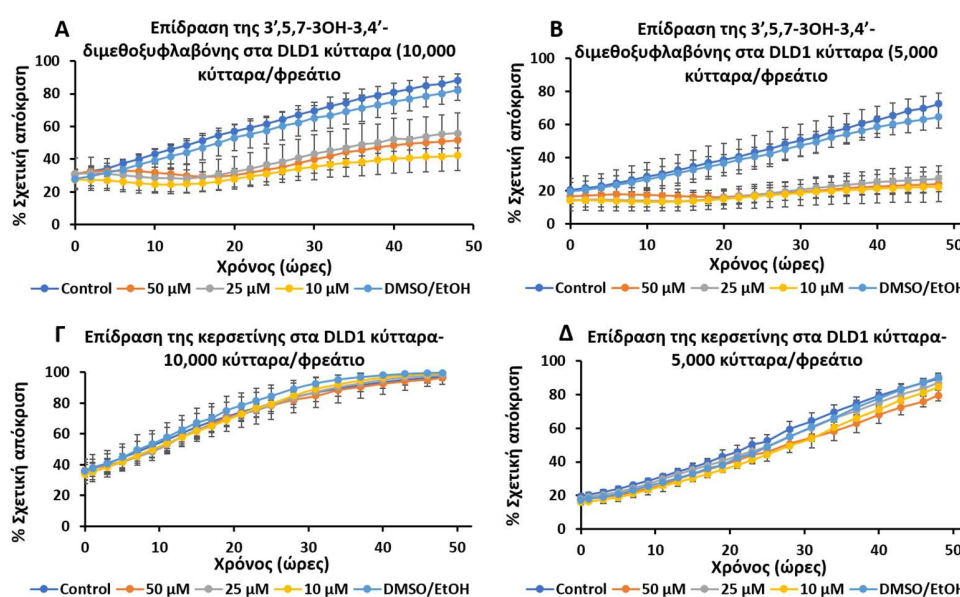


Εικόνα 4.1. Ποσοστό (%) της βιωσιμότητας των κυττάρων DLD1 όπως προκύπτει από την μέθοδο MTT μετά από προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων των **A)** 3',4',5,7-OH-3-μεθοξυφλαβόνης, **B)** 3',3,5,7-OH-4'-μεθοξυφλαβόνης, **Γ)** 3',4',3,5-OH-7-μεθοξυφλαβόνης, **Δ)** 3',4',5-OH-3,7-διμεθοξυφλαβόνης, **Ε)** 3',5,7-OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνης, **ΣΤ)** 3',3,5-OH-7,4'-διμεθοξυφλαβόνης, **Ζ)** 3,5-OH-7,3,4'-τριμεθοξυφλαβόνης, **Η)** 5-OH-7,3,3',4'-τετραμεθοξυφλαβόνης και **Θ)** της κερσετίνης και του φορέα EtOH-DMSO (50:50 v/v) μετά από επώαση 72 ωρών.

κυττάρων και στις τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις (10, 25 και 50 μM), ωστόσο δεν προκαλεί περαιτέρω μείωση στον αρχικό πληθυσμό των κυττάρων. Όπως ήταν αναμενόμενο, δεν παρατηρήθηκε αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης παρουσία κερσετίνης σε καμία από τις εν λόγω συγκεντρώσεις (Εικόνα 4.2, Γ, Δ).

Πίνακας 4.2 Τιμές IC_{50} της κερσετίνης και των μεθυλωμένων ανάλογων μορίων της

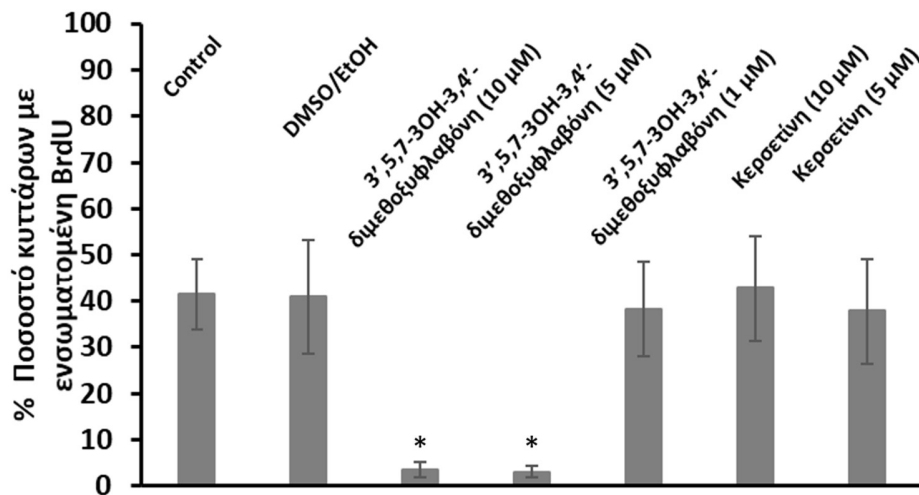
Φλαβονοειδές	Τιμή IC_{50} (μM)
Κερσετίνη	176.1 ± 7.1
3',4',5,7-OH-3-μεθοξυφλαβόνη	18.4 ± 3.9
3',3,5,7-OH-4'-μεθοξυφλαβόνη	37.6 ± 4.3
3',4',3,5-OH-7-μεθοξυφλαβόνη	>100
3',4',5-OH-3,7-διμεθοξυφλαβόνη	8.9 ± 0.9
3',5,7-OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνη	4.0 ± 1.4
3',3,5-OH-7,4'-διμεθοξυφλαβόνη	28.4 ± 4.6
3,5-OH-7,3,4'-τριμεθοξυφλαβόνη	>100
5-OH-7,3,3',4'-τετραμεθοξυφλαβόνη	7.3 ± 2.1



Εικόνα 4.2. Μελέτη της ανάπτυξης της κυτταρικής σειράς DLD1 μετά από επώαση 10,000 κυττάρων με την **A)** 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνη και την **B)** κερσετίνη και 5,000 κυττάρων με την **Γ)** 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνη και την **Δ)** κερσετίνη για 48 ώρες. Η παρακολούθηση των κυττάρων έγινε μέσω του συστήματος IncuCyte®.

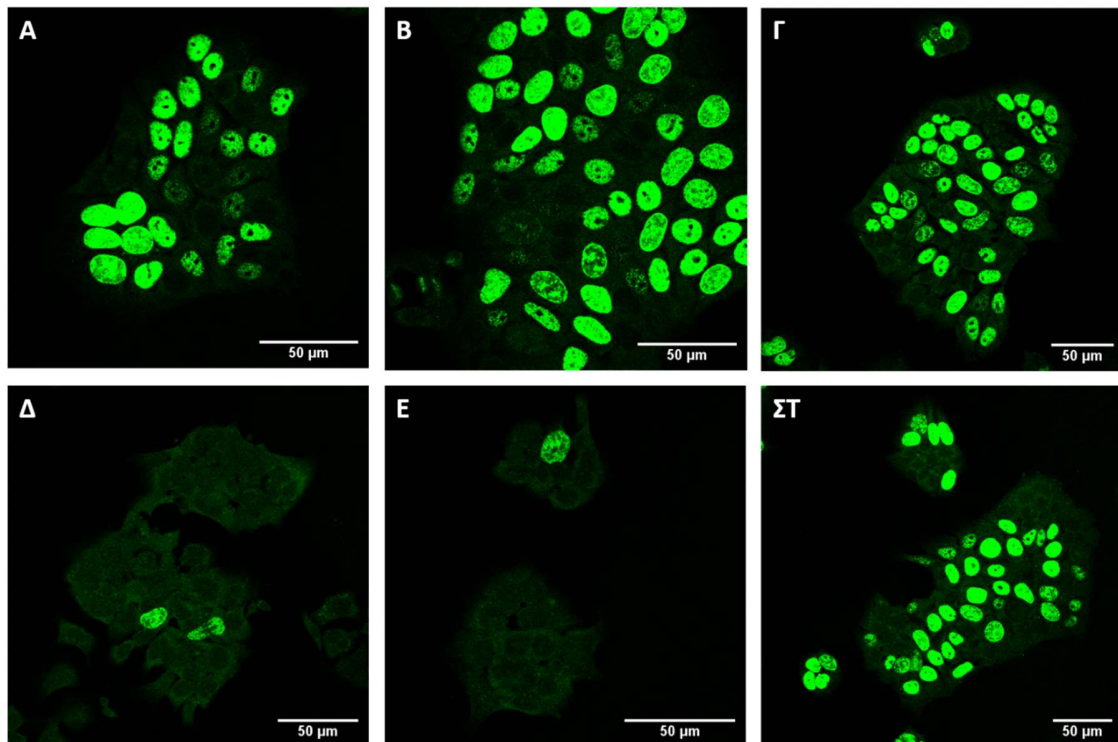
4.3.2 Έλεγχος της επίδρασης της κερσετίνης και της 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνης στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων DLD1 μέσω ανοσοφθορισμού για τον έλεγχο της ενσωμάτωσης της βρωμοδεόξυ ουριδίνης

Για να ελέγξουμε την πιθανότητα αναστολής του πολλαπλασιασμού των DLD1 κυττάρων από την 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνη χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του ανοσοφθορισμού για τον εντοπισμό και την εκτίμηση του ποσοστού ενσωμάτωσης της βρωμοδεόξυ ουριδίνης.



Εικόνα 4.3. Επίδραση της κερσετίνης και της 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνης στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων DLD1. Τα κύτταρα επώαστηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις των δύο μορίων για 24 ώρες και ακολούθησε η δοκιμασία πολλαπλασιασμού με ενσωμάτωση BrdU. Τα γραφήματα αναπαριστούν τα ποσοστά των κυττάρων που ενσωμάτωσαν τη BrdU. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση των μετρήσεων μεταξύ τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα (one-way ANOVA) και έλεγχο με το τεστ Dunnet (*P<0.005).

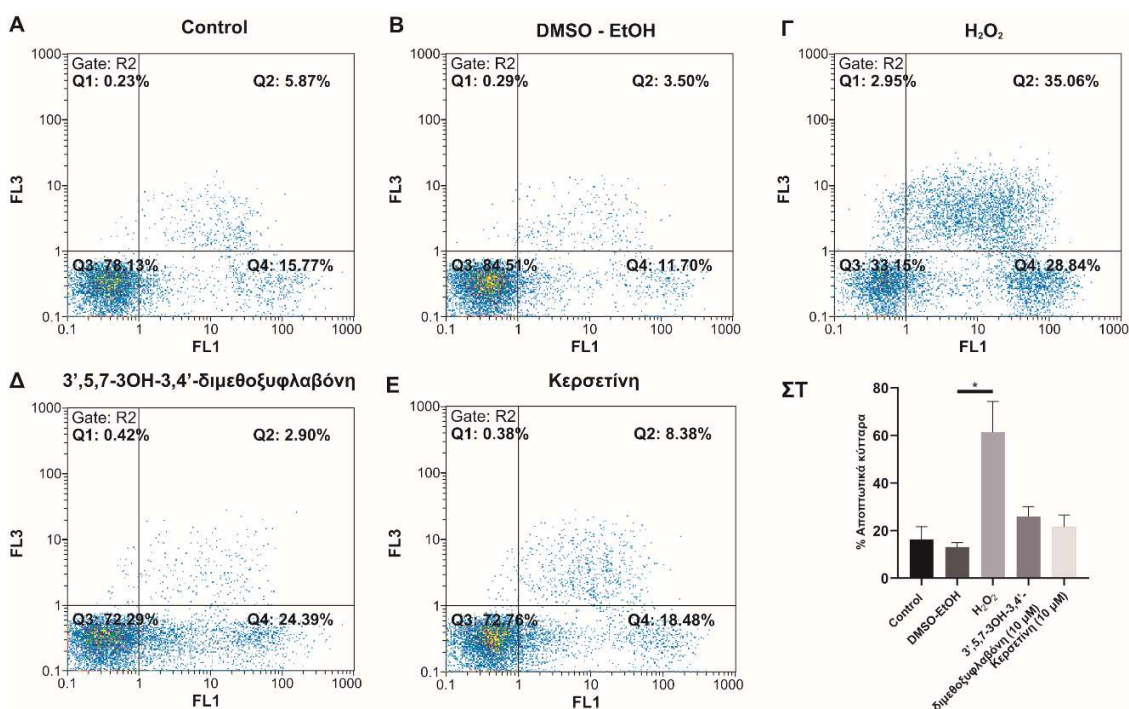
Όπως παρατηρείται στην **Εικόνα 4.3** και **Εικόνα 4.4** η ενσωμάτωση της βρωμοδεόξυ ουριδίνης στα κύτταρα που έχουν επωαστεί ακόμη και με 10 μM κερσετίνης είναι παρόμοια με αυτή του δείγματος ελέγχου. Ωστόσο, το ποσοστό ενσωμάτωσης είναι χαμηλό, αγγίζοντας το όριο της πλήρους αναστολής, μετά από επώαση με 5 και 10 μM της 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνης.



Εικόνα 4.4. Επίδραση της κερσετίνης και της 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνης στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων DLD1. Αντιπροσωπευτικές εικόνες από τον ανοσοφθορισμό όπου η BrdU είναι επισημασμένη με FITC (488 nm) των **A)** δείγμα ελέγχου (control), **B)** κυττάρων που έχουν επωαστεί με φορέα DMSO-EtOH (50:50 v/v), **Γ)** κυττάρων που έχουν επωαστεί με 10 μM κερσετίνης, **Δ)** κυττάρων που έχουν επωαστεί με 10 μM 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνης, **Ε)** κυττάρων που έχουν επωαστεί με 5 μM 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνης και **ΣΤ)** κυττάρων που έχουν επωαστεί με 1 μM 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνης.

4.3.3 Έλεγχος της αποπτωτικής δράσης της κερσετίνης και της 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνης στα κύτταρα DLD1 μέσω κυτταρομετρίας ροής

Στη συνέχεια εξετάστηκε η πιθανότητα επαγωγής απόπτωσης ή νέκρωσης. Για το σκοπό αυτό κύτταρα που επωάστηκαν με τα δύο φλαβονοειδή για 24 ώρες και στη συνέχεια προστέθηκε σε αυτά Annexin V-FITC και ιωδιούχο προπιδίο μετρήθηκαν με κυτταρομετρία ροής. Στην **Εικόνα 4.5** παρουσιάζεται πως κανένα από τα δύο μόρια δεν προκαλεί απόπτωση στη συγκέντρωση των 10 μ M καθώς η επίδραση τους δεν είναι στατιστικά σημαντική. Αρνητική επίσης ήταν και η επίδραση τους στην επαγωγή της νέκρωσης. Ως θετικό στην αννεξίνη και στο ιωδιούχο προπιδίο δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε το H_2O_2 .

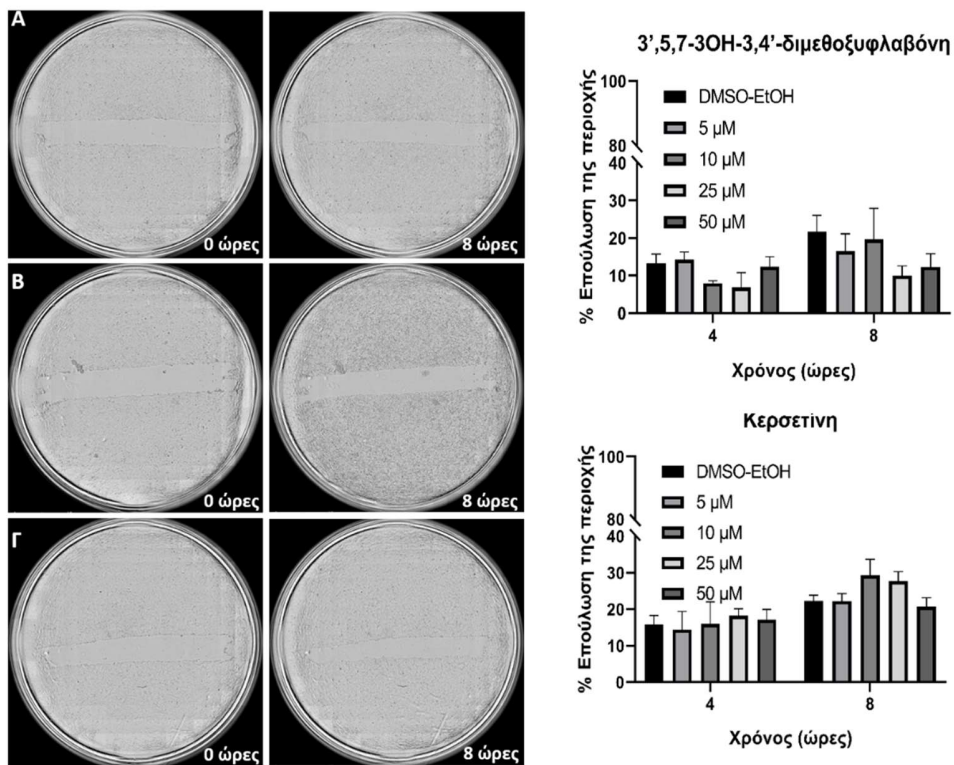


Εικόνα 4.5. Έλεγχος της αντιαποπτωτικής δράσης της κερσετίνης και της 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνης στα κύτταρα DLD1 μέσω κυτταρομετρίας ροής με Annexin V-FITC και ιωδιούχο προπιδίο. Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα των **A)** Δείγμα ελέγχου που δεν έχει υποστεί προσθήκη ουσίας, **B)** Δείγμα ελέγχου όπου έχει προστεθεί ο φορέας DMSO-

EtOH, Γ) Κύτταρα που επώαστηκαν με 500 mM H₂O₂ για 24 ώρες, Δ) Κύτταρα που επώαστηκαν με την 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνη (10 μM) για 24 ώρες, Ε) Κύτταρα που επώαστηκαν με την κερσετίνη (10 μM) για 24 ώρες και ΣΤ) Γραφική αναπαράσταση του ποσοστού των αποπτωτικών κυττάρων. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα (one-way ANOVA) και έλεγχο με το τεστ Tukey (*p<0.0001) σε τρεις δοκιμές.

4.3.4 Έλεγχος της ικανότητας αναστολής της μετανάστευσης των κυττάρων DLD1 μετά από επώαση με την κερσετίνη και την 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνη

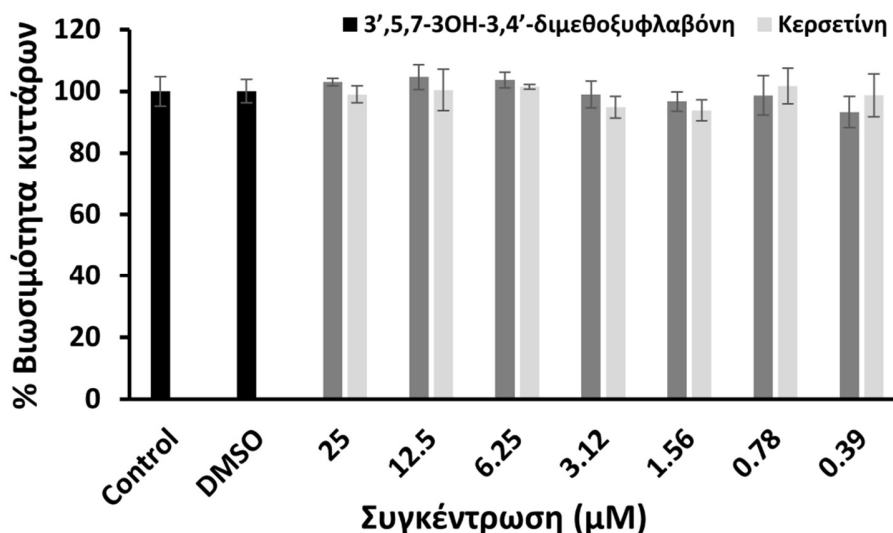
Για τον έλεγχο της μεταναστευτικής ικανότητας των κυττάρων DLD1 παρουσία κερσετίνης και 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνης, πραγματοποιήθηκε η δοκιμασία επούλωσης τραύματος (wound healing assay), όπου δημιουργείται ένα κενό/τραύμα στην κυτταρική μονοστιβάδα και ποσοτικοποιείται η δυνατότητα κάλυψης του τραύματος. Η επώαση με τα δύο μόρια και η παρακολούθηση των κυττάρων μέσω του συστήματος IncuCyte πραγματοποιήθηκε για 8 ώρες και όπως παρατηρείται στην **Εικόνα 4.6** ούτε η κερσετίνη αλλά ούτε και η 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνη προκαλούν στατιστικώς σημαντική αναστολή της κυτταρικής μετανάστευσης.



Εικόνα 4.6. Έλεγχος της μεταναστευτικής ικανότητας των κυττάρων DLD1 με το σύστημα IncuCyte. Τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε πιάτα καλλιέργειας 96 φρεατίων. Την επόμενη ημέρα δημιουργήθηκε κενό-τραύμα σε όλα τα φρεάτια ταυτόχρονα και τα κύτταρα επώαστηκαν για 8 ώρες. Εικόνες ελήφθησαν με φακό 4X κάθε 4 ώρες. Αριστερά παρουσιάζονται ενδεικτικές φωτογραφίες του τραύματος σε 0 και 8 ώρες μετά από επώαση με **A)** φορέα DMSO-EtOH, **B)** 50 μM 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνης και **Γ)** 50 μM κερσετίνης. Στο γράφημα δεξιά παρουσιάζεται το ποσοστό της περιοχής του τραύματος που καλύφθηκε/ανά μονάδα χρόνου. Για τη μέτρηση της περιοχής του τραύματος χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Fiji ImageJ. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε τρεις ανεξάρτητες φορές.

4.3.5 Έλεγχος κυτταροτοξικότητας της κερσετίνης και της 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνης σε φυσιολογικά κύτταρα HUVE

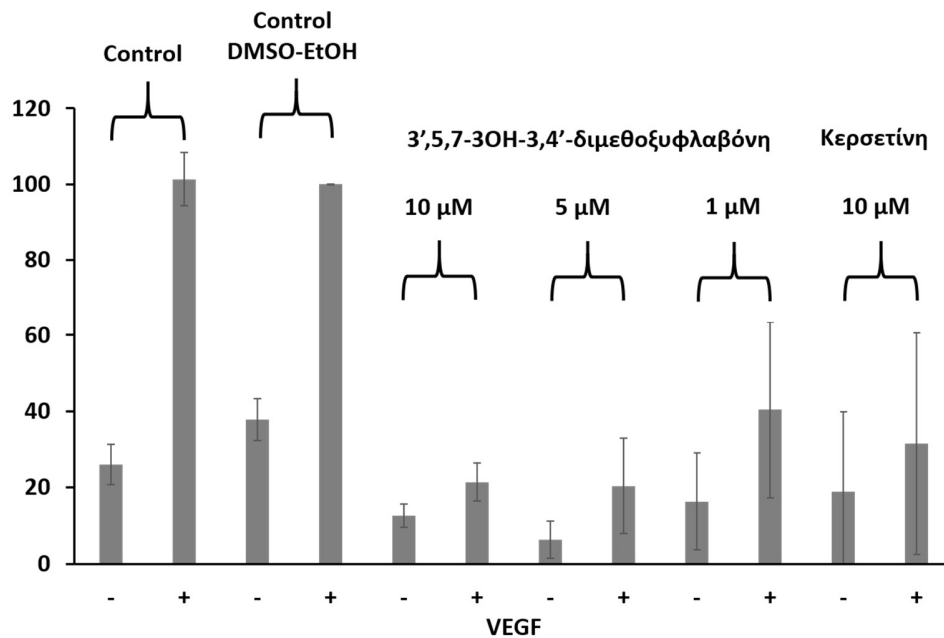
Αφού επιβεβαιώθηκε η αντιπολλαπλασιαστική δράση της 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνης στα καρκινικά κύτταρα DLD1 θεωρήθηκε σκόπιμος ο έλεγχος της πιθανούς κυτταροτοξικής δράσης της σε φυσιολογικά κύτταρα HUVECs. Για τον σκοπό αυτό εξετάστηκε η βιωσιμότητα των HUVECs σε πλήρες θρεπτικό υλικό παρουσία της 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνης αλλά και της κερσετίνης για 48 ώρες, Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 4.7** κανένα από τα δύο μόρια δεν επηρεάζει τη βιωσιμότητα τους μέχρι και τη συγκέντρωση των 25 μM .



Εικόνα 4.7. Επίδραση της κερσετίνης και της 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνης στη βιωσιμότητα των κυττάρων HUVE. Τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε τρυβλία 96 φρεατίων (10,000 κύτταρα/φρεάτιο). Την επόμενη μέρα προστέθηκαν σε αυτά τα δύο μόρια σε συγκεντρώσεις 0-25 μM και ακολούθησε επώαση για 48 ώρες. Η βιωσιμότητα των κυττάρων εκτιμήθηκε με τη μέθοδο MTT. Το πείραμα επαναλήφθηκε δύο φορές.

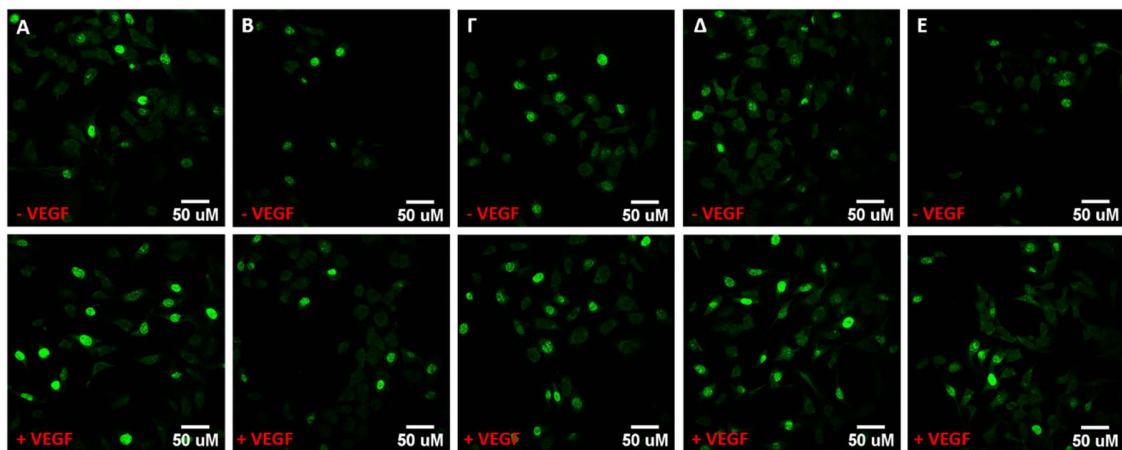
4.3.6 Έλεγχος της επίδρασης της κερσετίνης και της 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνης στον επαγόμενο από τον VEGF πολλαπλασιασμό των HUVECs

Η αναστολή του επαγόμενου από τον VEGF πολλαπλασιασμού των HUVECs από την 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνη και την κερσετίνη εκτιμήθηκε βάσει του ποσοστού ενσωμάτωσης της βρωμοδεόξυ ουριδίνης (Εικόνα 4.9) παρουσία και απουσία VEGF. Στην Εικόνα 4.8 το ποσοστό ενσωμάτωσης για κάθε συγκέντρωση έχει



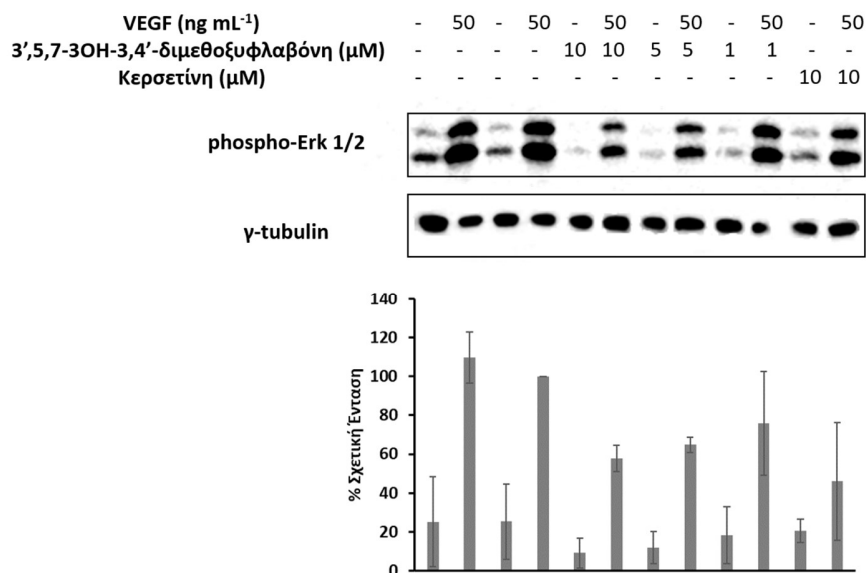
Εικόνα 4.8. Επίδραση της κερσετίνης και της 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνης στον επαγόμενο από τον VEGF πολλαπλασιασμό των HUVECs. Αρχικά, τα κύτταρα επωάστηκαν σε θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με 5 % FBS (στέρηση ορού) για 18 ώρες και στη συνέχεια προστέθηκαν τα δύο μόρια και ο VEGF (50 ng mL^{-1}) για 24 ώρες. Έξι ώρες πριν το τέλος της επώασης προστέθηκε η BrdU. Τα γραφήματα αναπαριστούν τα ποσοστά των κυττάρων που ενσωμάτωσαν τη BrdU εκφρασμένα ως προς το ποσοστό των κυττάρων που επωάστηκαν μόνο με VEGF (100 %). Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση των μετρήσεων μεταξύ δύο ανεξάρτητων πειραμάτων.

εκφραστεί ως προς το ποσοστό ενσωμάτωσης στα κύτταρα που επώαστηκαν με VEGF (100 %). Απουσία VEGF το ποσοστό του πολλαπλασιασμού παραμένει χαμηλό τόσο στο δείγμα ελέγχου όσο και στα υπόλοιπα που έχουν επωαστεί με τα δύο φλαβονοειδή, κάτι που είναι αναμενόμενο καθώς ο VEGF επάγει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων σε συνθήκες στέρησης ορού. Ωστόσο, ακόμη και παρουσία του VEGF παρατηρείται αναστολή του πολλαπλασιασμού τόσο στα κύτταρα που επώαστηκαν με την 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνη σε συγκεντρώσεις 1, 5 και 10 μM , όσο και στα κύτταρα που επώαστηκαν με την κερσετίνη.



Εικόνα 4.9. Επίδραση της κερσετίνης και της 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνης στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HUVECs απουσία ή παρουσία VEGF. Αρχικά, τα κύτταρα επώαστηκαν σε θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με 5 % FBS (στέρηση ορού) για 18 ώρες και στη συνέχεια προστέθηκαν τα δύο μόρια και ο VEGF (50 ng mL^{-1}) για 24 ώρες. Έξι ώρες πριν το τέλος της επώασης προστέθηκε η BrdU. Αντιπροσωπευτικές εικόνες από τον ανοσοφθορισμό όπου η BrdU είναι επισημασμένη με Alexa 488 των **A)** κυττάρων έχουν επωαστεί με φορέα DMSO-EtOH (50:50 v/v), **B)** κυττάρων που έχουν επωαστεί με 10 μM 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνης, **Γ)** κυττάρων που έχουν επωαστεί με 5 μM 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνης, **Δ)** κυττάρων που έχουν επωαστεί με 1 μM 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνης και **Ε)** κυττάρων που έχουν επωαστεί με 10 μM κερσετίνης απουσία (επάνω) και παρουσία (κάτω) VEGF.

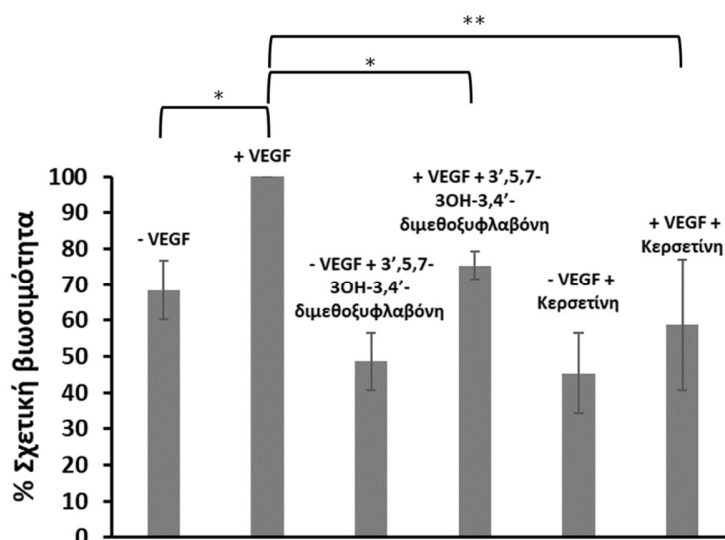
Για την επιβεβαίωση της αναστολής του επαγόμενου από τον VEGF πολλαπλασιασμού των HUVECs και σε επίπεδο κυτταρικής σηματοδότησης ελέγχθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των phospho-Erk1/2 (**Εικόνα 4.10**), πρωτεϊνών που βρίσκονται καθοδικά στο μονοπάτι VEGFR-2/Ras/Raf/Merk/Erk1/2 μέσω του οποίου ο VEGF ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό. Τα επίπεδα των phospho-Erk1/2 εμφανίζονται μειωμένα συγκριτικά με το δείγμα ελέγχου ακόμη και παρουσία VEGF και είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα του ανοσοφθορισμού.



Εικόνα 4.10. Επίδραση της κερσετίνης και της 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνης στην έκφραση των phospho-Erk1/2. Κύτταρα HUVE επιστρώθηκαν σε τρυβλία 12 φρεατίων (200,000 κύτταρα/φρεάτιο). Την επόμενη μέρα πραγματοποιήθηκε στέρηση ορού για 1.5 ώρα και στη συνέχεια προστέθηκαν τα δύο μόρια παρουσία και απουσία VEGF (50 ng mL⁻¹). Τα επίπεδα των phospho-Erk1/2 και της γ-tubulin εκτιμήθηκαν μέσω ανοσοαποτυπώματος Western. Τα γραφήματα αναπαριστούν το ποσοστό έκφρασης της πρωτεΐνης από τα κύτταρα που επωάστηκαν με τα φλαβονοειδή εκφρασμένο ως προς το ποσοστό έκφρασης της πρωτεΐνης από τα κύτταρα που επωάστηκαν μόνο με VEGF (100 %). Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση των μετρήσεων μεταξύ δύο ανεξάρτητων πειραμάτων.

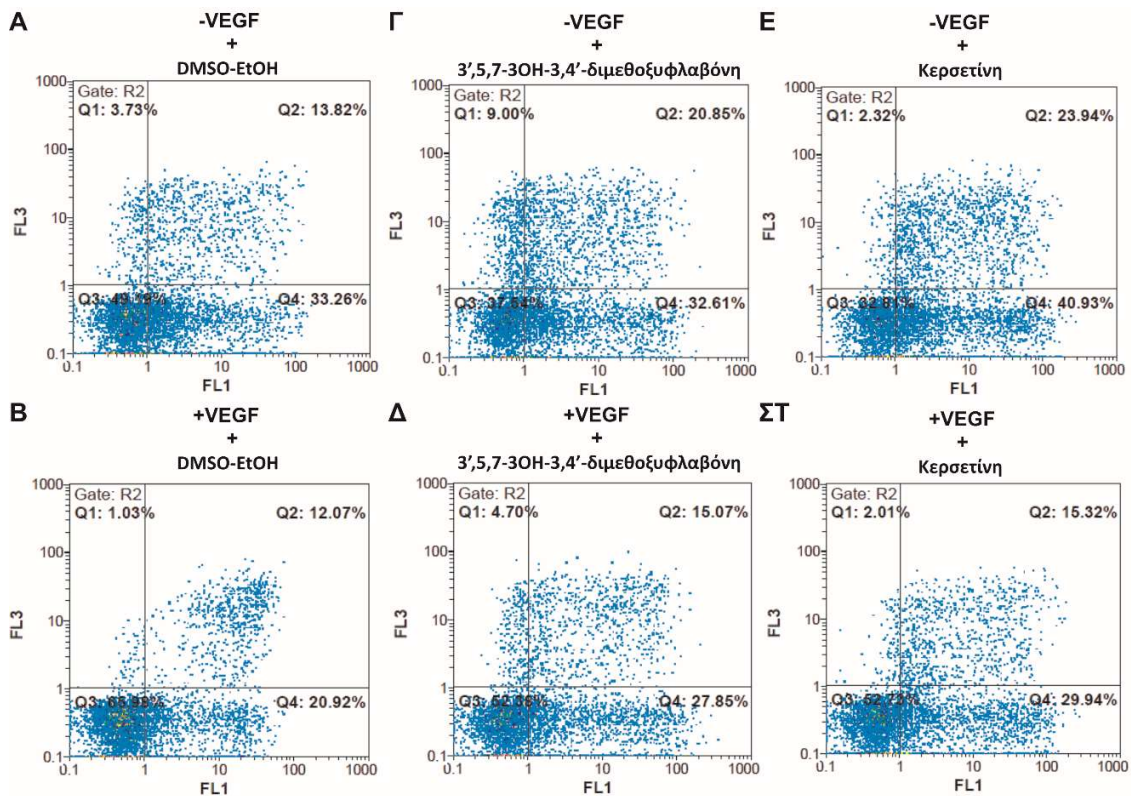
4.3.7 Έλεγχος της επίδρασης της κερσετίνης και της 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνης στην επαγόμενη από τον VEGF επιβίωση των HUVECs

Είναι γνωστό πως ο VEGF μέσω της πρόσδεσης του στον VEGFR-2 και της φωσφορυλίωσης της Akt/PKB ρυθμίζει την επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Για να εξετασθεί το ενδεχόμενο εμπλοκής της 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνης και της κερσετίνης σε αυτό, ελέγχθηκε το ποσοστό των ζώντων κυττάρων μετά την προσθήκη των δύο φλαβονοειδών και απουσία/παρουσία του VEGF. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 4.11** (η **Εικόνα 4.12** παρουσιάζει αντιπροσωπευτικά παραδείγματα) η παρουσία των δύο μορίων αναστέλλει την επιβιωτική δράση του VEGF υπό συνθήκες στέρησης ορού.



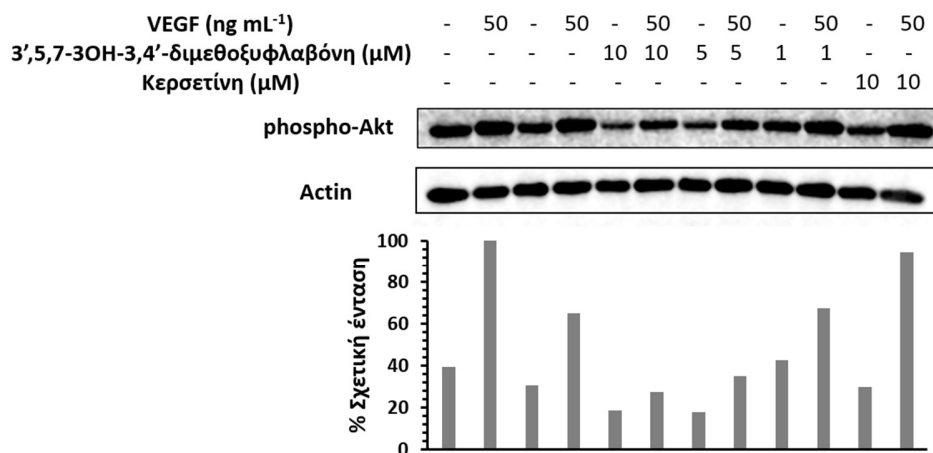
Εικόνα 4.11. Έλεγχος της αποπτωτικής δράσης της κερσετίνης και της 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνης στα HUVECs μέσω κυτταρομετρίας ροής με Annexin V-FITC και ιωδιούχο προπίδιο. Κύτταρα HUVE επιστρώθηκαν σε τρυβλία 6 φρεατίων σε πληθυσμό 200,000 κύτταρα/φρεάτιο και υποβλήθηκαν σε στέρηση ορού (5 % FBS) για 18 ώρες. Κατόπιν, προστέθηκαν σε αυτά η 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνη και η κερσετίνη σε συγκέντρωση 10 μM , παρουσία και απουσία VEGF (50 ng mL^{-1}) και επώαστηκαν για 24 ώρες. Στο διάγραμμα παρουσιάζεται η % βιωσιμότητα των κυττάρων όπου 100 % το ποσοστό των ζώντων κυττάρων στο δείγμα ελέγχου παρουσία VEGF. Η στατιστική

ανάλυση πραγματοποιήθηκε με ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα (one-way ANOVA) και έλεγχο με το τεστ Dunnett (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση των μετρήσεων μεταξύ τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.



Εικόνα 4.12. Έλεγχος της αποπτωτικής δράσης της κερσετίνης και της 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνης στα HUVECs μέσω κυτταρομετρίας ροής με αννεξίνη και ιωδιούχο προπίδιο. Κύτταρα HUVE επιστρώθηκαν σε τρυβλία 6 φρεατίων σε πληθυσμό 200,000 κύτταρα/φρεάτιο και υποβλήθηκαν σε στέρηση ορού (5 % FBS) για 18 ώρες. Κατόπιν, προστέθηκαν σε αυτά η 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνη και η κερσετίνη σε συγκέντρωση 10 μM , παρουσία και απουσία VEGF (50 ng mL^{-1}) και επώαστηκαν για 24 ώρες. Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα των: δείγματος ελέγχου με το φορέα DMSO-EtOH **A**) απουσία και **B**) παρουσία VEGF, κυττάρων που επώαστηκαν με την 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνη (10 μM) **Γ**) απουσία και **Δ**) παρουσία VEGF και κυττάρων που επώαστηκαν με την κερσετίνη (10 μM) **E**) απουσία και **ΣΤ**) παρουσία VEGF.

Για την επιβεβαίωση της αναστολής της επαγόμενης από τον VEGF επιβίωσης των HUVECs και στο επίπεδο της κυτταρικής σηματοδότησης ελέγχθηκαν τα επίπεδα έκφρασης της phospho-Akt (Ser 473), πρωτεΐνης που βρίσκεται καθοδικά στο μονοπάτι VEGFR-2/PI3K/Akt μέσω του οποίου ο VEGF επάγει την επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων (**Εικόνα 4.13**). Τα επίπεδα της phospho-Akt εμφανίζονται μειωμένα συγκριτικά με το δείγμα ελέγχου ακόμη και παρουσία VEGF, συμφωνώντας με τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής. Η αναστολή αυτή είναι εμφανής ιδιαίτερα στις συγκεντρώσεις των 5 και 10 μM της 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνης.



Εικόνα 4.13. Επίδραση της κερσετίνης και της 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνης στην έκφραση της phospho-Akt. Κύτταρα HUVE επιστρώθηκαν σε τρυβλία 12 φρεατίων (200,000 κύτταρα/φρεάτιο). Την επόμενη μέρα πραγματοποιήθηκε επώαση σε θρεπτικό υλικό με FBS 5 % για 6 ώρες. 10 λεπτά πριν το τέλος της επώασης προστέθηκαν σε αυτά τα δύο μόρια παρουσία και απουσία VEGF (50 ng mL^{-1}). Τα επίπεδα της phospho-Akt (Ser 473) και της Actin εκτιμήθηκαν μέσω ανοσοαποτυπώματος Western. Τα γραφήματα αναπαριστούν το ποσοστό έκφρασης της πρωτεΐνης από τα κύτταρα που επώαστηκαν με τα φλαβονοειδή εκφρασμένο ως προς το ποσοστό έκφρασης της πρωτεΐνης από τα κύτταρα που επώαστηκαν μόνο με VEGF (100 %). Τα αποτελέσματα έχουν προκύψει από μια δοκιμή.

4.4 Συζήτηση

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου είναι από τους πιο θανατηφόρους τύπους καρκίνου, εφόσον δεν διαγνωστεί εγκαίρως. Η κερσετίνη, ένα ευρέως μελετημένο για την βιολογική του δράση φλαβονοειδές, φαίνεται να εμπλέκεται σε ποικίλους μηχανισμούς των εν λόγω καρκινικών κυττάρων, όπως τον πολλαπλασιασμό, την απόπτωση και τη μετανάστευση. Η τροποποίηση μορίων, είτε αυτά είναι φυσικά προϊόντα είτε εδραιωμένα φάρμακα, είναι μια συνήθης στρατηγική που στοχεύει στη βελτίωση της δραστηριότητας αλλά και του φαρμακοκινητικού τους προφίλ.

Με σκοπό την ενίσχυση της βιολογικής δράσης της κερσετίνης πραγματοποιήθηκε σύνθεση και εκτίμηση της δραστηριότητας οκτώ μεθυλιωμένων παραγώγων της στην κυτταρική σειρά καρκίνου του παχέος εντέρου DLD1. Η αξιολόγηση έγινε με τη μέθοδο MTT, όπου αρχικά βρέθηκε πως η κερσετίνη προκαλεί αναστολή της βιωσιμότητας των DLD1 σε αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις ($IC_{50}=176\pm 7.1 \mu M$). Το αποτέλεσμα αυτό είναι σύμφωνο με αντίστοιχες εκτιμήσεις που παρουσιάζονται στη βιβλιογραφία [68, 72]. Από τα μεθυλιωμένα παράγωγα η 3',4',3,5-OH-7-μεθοξυφλαβόνη και η 3,5-OH-7,3,4'-τριμεθοξυφλαβόνη δεν επηρέασαν τη βιωσιμότητα των DLD1 μέχρι και τη συγκέντρωση των 100 μM . Τα υπόλοιπα ανάλογα έδειξαν σαφώς ισχυρότερη δράση από την κερσετίνη με τη 3',5,7-OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνη να επιδεικνύει τη χαμηλότερη τιμή IC_{50} ($4.0\pm 1.4 \mu M$), γι' αυτό και επιλέχθηκε για περαιτέρω διερεύνηση της δράσης της. Ενδεικτικά, οι τιμές IC_{50} των 5-φθοροουρακίλη, ιρινοτεκάνης και οξαλιπλατίνης όπως παρουσιάζονται στην βιβλιογραφία για τη σειρά DLD1 είναι 0.7 [73], 18.5 [74] και 4.63 μM [75], αντίστοιχα. Αξίζει να σημειωθεί πως η 5-OH-7,3,3',4'-τετραμεθοξυφλαβόνη μπορεί να παρουσίασε παραπλήσια αναστολή της βιωσιμότητας, ωστόσο η υδατοδιαλυτότητα της ήταν πολύ χαμηλή κάτι που ίσως να αποτελούσε εμπόδιο για τη μελέτη της *in vivo*. Από τα παραπάνω αποτελέσματα δεν μπορεί να οριστεί κάποιο ασφαλές μοτίβο μεθυλίωσης το οποίο να ενισχύει την δράση της κερσετίνης. Ωστόσο φαίνεται πως η μεθυλίωση στην θέση 7 δεν αρκεί από μόνη της για να την ενισχύσει ενώ αντίθετα οι μεθυλίώσεις στις θέσεις 3 και 4' μόνες τους (9 και 4

φορές, αντίστοιχα) ή σε συνδυασμό (44 φορές) μειώνουν δραματικά την τιμή IC₅₀ της κερσετίνης. Αποτελέσματα μελέτης ανάλυσης δομής-δράσης όπου μεθυλωμένα παράγωγα εξετάσθηκαν ως προς την κυτταροτοξικότητα που προκαλούν έναντι των καρκινικών κυτταρικών σειρών NCI-60 και την αναστολή του πολυμερισμού της τουμπουλίνης έδειξαν ότι τα πιο δραστικά μόρια έφεραν υδροξυλομάδα στην θέση 3' και μεθυλομάδα στην 4', ενώ η μεθυλομάδα στην θέση 3 ήταν καθοριστική για την αναστολή του πολυμερισμού της τουμπουλίνης[76]. Επίσης, η μεθυλίωση στη θέση 4' αύξησε τη δραστικότητα του 3-μεθοξυ παράγωγου της κερσετίνης έναντι της λευχαιμικής κυτταρικής σειράς HL-60[77]. Στην εργασία τους οι Shi et al.[62] όπου πραγματοποίησαν μελέτη δομής-δράσης σε 16 μεθυλωμένα παράγωγα της κερσετίνης εξετάζοντας την ικανότητα τους να αναστέλλουν τη βιωσιμότητα 16 καρκινικών κυτταρικών σειρών. Αρχικά παρατήρησαν πως η δραστικότητα του κάθε αναλόγου μπορεί να διέφερε μεταξύ των κυτταρικών σειρών. Ωστόσο, είδαν πως στις περισσότερες περιπτώσεις η μεθυλίωση στις θέσεις 7 και 4' ενίσχυε σημαντικά την αναστολή του πολλαπλασιασμού.

Η επίδραση της 3',5,7-OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνης και της κερσετίνης ελέγχθηκε και με βιντεοσκόπηση μέσω του συστήματος IncuCyte®, το οποίο επιτρέπει τη συνεχή παρακολούθηση και καταγραφή της επιφάνειας που καλύπτουν τα κύτταρα. Όπως ήταν αναμενόμενο δεν παρατηρήθηκε κάποια μείωση στα κύτταρα που επώαστηκαν με την κερσετίνη σε αυτό το εύρος συγκεντρώσεων, ωστόσο είναι αξιοσημείωτο πως η προσθήκη της 3',5,7-OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνης δεν οδήγησε σε μείωση του αρχικού πληθυσμού των κυττάρων αλλά «συγκράτησε» την αύξηση της ανάπτυξης επιδεικνύοντας κυτταροστατική δράση. Τα επόμενα πειράματα επιβεβαίωσαν αυτήν την ένδειξη. Η εκτίμηση της ενσωμάτωσης της BrdU μέσω ανοσοφθορισμού έδειξε πως ακόμη και στη συγκέντρωση των 5 μM η 3',5,7-OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνη αναστέλλει πλήρως τον πολλαπλασιασμό των DLD1 κυττάρων. Αντίθετα, δεν επάγει την απόπτωση ή νέκρωση όπως διαπιστώθηκε από τη μέτρηση της αννεξίνης και του ιωδιούχου προπιδίου μέσω κυτταρομετρίας ροής τουλάχιστον μέχρι τη συγκέντρωση των 10 μM. Η ικανότητα αναστολής του πολλαπλασιασμού καρκινικών κυττάρων *in vitro* της 3',5,7-OH-

3,4'-διμεθοξυφλαβόνης έχει αναφερθεί βιβλιογραφικά. Όπως προαναφέρθηκε η 3',5,7-OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνη αναστέλλει τον πολυμερισμό της τουμπουλίνης ενώ στις κυτταρικές σειρές λεμφώματος HL-60 και U937 επάγει την παύση του κυτταρικού κύκλου στο σημείο G2-M[78] αυξάνοντας τα επίπεδα έκφρασης των Cyclin B1, phospho-cyclin B1 και p21 και προκαλώντας αποφωσφορυλίωση της Cdk1[79].

Τα παραπάνω δεδομένα οδηγούν εύλογα στο ερώτημα σχετικά με το πως η Ο-μεθυλίωση επηρεάζει τις ιδιότητες της κερσετίνης. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω η δραστηριότητα των μεθυλιωμένων αναλόγων μπορεί να διαφέρει αναλόγως με την κυτταρική σειρά όπου μελετάται. Ίσως, μια μελέτη ανάλυσης δομής-δράσης σε επίπεδο πρωτεϊνών και όχι κυτταρικών σειρών να επέφερε περισσότερες πληροφορίες. Επιπρόσθετα, πέραν των μοριακών μηχανισμών της δράσης τους θα είχε ενδιαφέρον να εξετασθεί και το φαρμακοκινητικό προφίλ της 3',5,7-OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνης συγκριτικά με αυτό της κερσετίνης αλλά και η αποτελεσματικότητα της πρώτης *in vivo* σε καρκινικά xenograft μοντέλα. Αξίζει να σημειωθεί πως *i.p.* χορήγηση της 3',5,7-OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνης σε xenograft HL-60 μοντέλα ποντικών σε δοσολογία 25 mg/kg/ημέρα για 15 ημέρες μείωσε το μέγεθος των όγκων κατά 35 %, χωρίς να παρατηρηθεί τοξικότητα κατά τη διάρκεια της[79].

Τοξικότητα της 3',5,7-OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνης στο κυτταρικό επίπεδο δεν παρατηρήθηκε ούτε στην περίπτωση των DLD1 κυττάρων, αφού το ποσοστό των νεκρωτικών κυττάρων όπως εκτιμήθηκε μέσω της κυτταρομετρίας ροής ήταν χαμηλό αλλά ούτε και στα φυσιολογικά κύτταρα HUVE τουλάχιστον μέχρι τη συγκέντρωση των 25 μ M, συγκέντρωση σχεδόν πενταπλάσια της τιμής IC₅₀ του μορίου στα κύτταρα DLD1. Το αποτέλεσμα αυτό ίσως αποτελεί ένδειξη μιας πιο εξειδικευμένης δράσης και στόχευσης της 3',5,7-OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνης. Στις ίδιες συγκεντρώσεις αποδείχθηκε πως και η κερσετίνη δεν επηρεάζει την βιωσιμότητα των HUVECs, κάτι που συμφωνεί με αντίστοιχο πείραμα στην βιβλιογραφία[31].

Η χαμηλή τοξικότητα σε συνδυασμό με τα βιβλιογραφικά δεδομένα που υποστηρίζουν την αντιαγγειογενετική δράση της κερσετίνης αποτέλεσαν το έναυσμα για την μελέτη της επίδρασης της 3',5,7-OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνης στην λειτουργία του

VEGF αυξητικού παράγοντα των ενδοθηλιακών κυττάρων που διαδραματίζει κύριο ρόλο στην αγγειογένεση. Η πρόσδεση του VEGF στον VEGFR-2 ενεργοποιεί τον υποδοχέα που φωσφορυλιώνεται σε τυροσινικά κατάλοιπα μέσω των οποίων η σηματοδότηση μεταφέρεται καθοδικά σε πρωτεΐνες όπως οι PI3K, Erk1/2, p38MAPK που ρυθμίζουν κρίσιμες κυτταρικές λειτουργίες όπως τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Εδώ μελετήθηκε η ικανότητα της 3',5,7-OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνης και της κερσετίνης να αναστέλλουν τον επαγόμενο από τον VEGF πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των HUVECs. Και τα δύο μόρια αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των HUVECs σε συγκεντρώσεις ίσες και μικρότερες των 10 μM κάτι που αντικατοπτρίζεται και στα μειωμένα επίπεδα των phospho-Erk1/2. Αυτή η ικανότητα αναστολής από την κερσετίνη αναφέρεται από τους Pratheeshkumar et al.[31] και τους Li et al.[80] για συγκεντρώσεις ίσες και μεγαλύτερες των 10 μM. Αντίστοιχα και μέσω της κυτταρομετρίας ροής τα δύο μόρια φάνηκαν να αναστέλλουν την επαγόμενη από τον VEGF επιβίωση των κυττάρων, μειώνοντας παράλληλα τα επίπεδα έκφρασης της phospho-Akt. Η επίδραση της κερσετίνης στη φωσφορυλιωμένη μορφή της Akt είναι γνωστή και μάλιστα φαίνεται πως παρουσία της μειώνονται και τα επίπεδα έκφρασης του mTOR και της pS6K1 που βρίσκονται καθοδικά της Akt[31]. Επίσης, μέσω του μονοπατιού Akt/mTOR αναστέλλει την αγγειογένεση σε ποντικούς με T-κυτταρικό λέμφωμα[80]. Ίσως θα μπορούσε κανείς να συμπεράνει πως η επίδραση της κερσετίνης *in vitro* στους μοριακούς μηχανισμούς των ενδοθηλιακών κυττάρων που οδηγούν στην αγγειογένεση είναι μεγαλύτερη συγκριτικά από την επίδραση της στους μηχανισμούς των καρκινικών κυττάρων αφού, όπως και στην παρούσα περίπτωση, είναι εμφανής σε μικρότερες συγκεντρώσεις. Σε κάθε περίπτωση η 3',5,7-OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνη φαίνεται να διατηρεί αυτήν τη δραστικότητα της κερσετίνης κρίνοντας αναγκαία τη διερεύνηση της αντιαγγειογενετικής τους δράσης *ex vivo* ή *in vivo* σε μοντέλα αγγειογένεσης. Είναι γνωστό επίσης πως τα DLD1 κύτταρα εκφράζουν και εκκρίνουν τον VEGF[81, 82], κάτι που θα μπορούσε να οδηγήσει στην επαγωγή της αγγειογένεσης στον όγκο. Επομένως, θα είχε ενδιαφέρον να μελετηθεί η διττή αυτή επίδραση της 3',5,7-OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνης και σε καρκινικούς όγκους.

Βιβλιογραφία

1. Wang, S., et al., *Bacteriostatic Effect of Quercetin as an Antibiotic Alternative In Vivo and Its Antibacterial Mechanism In Vitro*. J Food Prot, 2018. **81**(1): p. 68-78.
2. Górnjak, I., R. Bartoszewski, and J. Króliczewski, *Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids*. Phytochemistry Reviews, 2019. **18**(1): p. 241-272.
3. Quecan, B.X.V., et al., *Effect of Quercetin Rich Onion Extracts on Bacterial Quorum Sensing*. Front Microbiol, 2019. **10**: p. 867.
4. Carullo, G., et al., *Quercetin and derivatives: useful tools in inflammation and pain management*. Future Med Chem, 2017. **9**(1): p. 79-93.
5. Li, Y., et al., *Quercetin, Inflammation and Immunity*. Nutrients, 2016. **8**(3): p. 167.
6. Xu, D., et al., *Antioxidant Activities of Quercetin and Its Complexes for Medicinal Application*. Molecules, 2019. **24**(6).
7. Boots, A.W., G.R. Haenen, and A. Bast, *Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical*. Eur J Pharmacol, 2008. **585**(2-3): p. 325-37.
8. Dabeek, W.M. and M.V. Marra, *Dietary Quercetin and Kaempferol: Bioavailability and Potential Cardiovascular-Related Bioactivity in Humans*. Nutrients, 2019. **11**(10).
9. Hertog, M.G., et al., *Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study*. Lancet, 1993. **342**(8878): p. 1007-11.
10. Gormaz, J.G., S. Quintremil, and R. Rodrigo, *Cardiovascular Disease: A Target for the Pharmacological Effects of Quercetin*. Curr Top Med Chem, 2015. **15**(17): p. 1735-42.
11. Serban, M.C., et al., *Effects of Quercetin on Blood Pressure: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials*. J Am Heart Assoc, 2016. **5**(7).
12. Patel, R.V., et al., *Therapeutic potential of quercetin as a cardiovascular agent*. Eur J Med Chem, 2018. **155**: p. 889-904.
13. Rauf, A., et al., *Anticancer potential of quercetin: A comprehensive review*. Phytother Res, 2018. **32**(11): p. 2109-2130.
14. Jeong, J.H., et al., *Effects of low dose quercetin: cancer cell-specific inhibition of cell cycle progression*. J Cell Biochem, 2009. **106**(1): p. 73-82.
15. Deng, X.H., et al., *Effects of quercetin on the proliferation of breast cancer cells and expression of survivin in vitro*. Exp Ther Med, 2013. **6**(5): p. 1155-1158.
16. Ren, M.X., et al., *Effect of quercetin on the proliferation of the human ovarian cancer cell line SKOV-3 in vitro*. Exp Ther Med, 2015. **10**(2): p. 579-583.
17. Lee, T.J., et al., *Quercetin arrests G2/M phase and induces caspase-dependent cell death in U937 cells*. Cancer Lett, 2006. **240**(2): p. 234-42.
18. Chou, C.C., et al., *Quercetin-mediated cell cycle arrest and apoptosis involving activation of a caspase cascade through the mitochondrial pathway in human breast cancer MCF-7 cells*. Arch Pharm Res, 2010. **33**(8): p. 1181-91.

19. Mu, C., et al., *Quercetin induces cell cycle G1 arrest through elevating Cdk inhibitors p21 and p27 in human hepatoma cell line (HepG2)*. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 2007. **29**(3): p. 179-83.
20. Duo, J., et al., *Quercetin inhibits human breast cancer cell proliferation and induces apoptosis via Bcl-2 and Bax regulation*. *Mol Med Rep*, 2012. **5**(6): p. 1453-6.
21. Primikyri, A., et al., *Direct binding of Bcl-2 family proteins by quercetin triggers its pro-apoptotic activity*. *ACS Chem Biol*, 2014. **9**(12): p. 2737-41.
22. Granato, M., et al., *Quercetin induces apoptosis and autophagy in primary effusion lymphoma cells by inhibiting PI3K/AKT/mTOR and STAT3 signaling pathways*. *J Nutr Biochem*, 2017. **41**: p. 124-136.
23. Tang, S.M., et al., *Pharmacological basis and new insights of quercetin action in respect to its anti-cancer effects*. *Biomed Pharmacother*, 2020. **121**: p. 109604.
24. Youn, H., et al., *Quercetin potentiates apoptosis by inhibiting nuclear factor-kappaB signaling in H460 lung cancer cells*. *Biol Pharm Bull*, 2013. **36**(6): p. 944-51.
25. Psahoulia, F.H., et al., *Quercetin enhances TRAIL-mediated apoptosis in colon cancer cells by inducing the accumulation of death receptors in lipid rafts*. *Mol Cancer Ther*, 2007. **6**(9): p. 2591-9.
26. Siegelin, M.D., et al., *Quercetin promotes degradation of survivin and thereby enhances death-receptor-mediated apoptosis in glioma cells*. *Neuro Oncol*, 2009. **11**(2): p. 122-31.
27. Wang, K., et al., *Quercetin induces protective autophagy in gastric cancer cells: involvement of Akt-mTOR- and hypoxia-induced factor 1alpha-mediated signaling*. *Autophagy*, 2011. **7**(9): p. 966-78.
28. Maurya, A.K. and M. Vinayak, *PI-103 and Quercetin Attenuate PI3K-AKT Signaling Pathway in T- Cell Lymphoma Exposed to Hydrogen Peroxide*. *PLoS One*, 2016. **11**(8): p. e0160686.
29. Jia, L., et al., *Quercetin suppresses the mobility of breast cancer by suppressing glycolysis through Akt-mTOR pathway mediated autophagy induction*. *Life Sci*, 2018. **208**: p. 123-130.
30. Kashyap, D., et al., *Molecular mechanisms of action of quercetin in cancer: recent advances*. *Tumour Biol*, 2016. **37**(10): p. 12927-12939.
31. Pratheeshkumar, P., et al., *Quercetin inhibits angiogenesis mediated human prostate tumor growth by targeting VEGFR- 2 regulated AKT/mTOR/P70S6K signaling pathways*. *PLoS One*, 2012. **7**(10): p. e47516.
32. Kong, L., K. Wu, and H. Lin, *Inhibitory effects of quercetin on angiogenesis of experimental mammary carcinoma*. *Chinese Journal of Clinical Oncology*, 2005. **2**(3): p. 631-636.
33. Lee, D.H. and Y.J. Lee, *Quercetin suppresses hypoxia-induced accumulation of hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) through inhibiting protein synthesis*. *J Cell Biochem*, 2008. **105**(2): p. 546-53.
34. Cao, H.H., et al., *Quercetin exerts anti-melanoma activities and inhibits STAT3 signaling*. *Biochem Pharmacol*, 2014. **87**(3): p. 424-34.

35. Kee, J.Y., et al., *Inhibitory effect of quercetin on colorectal lung metastasis through inducing apoptosis, and suppression of metastatic ability*. *Phytomedicine*, 2016. **23**(13): p. 1680-1690.
36. Scambia, G., et al., *Quercetin potentiates the effect of adriamycin in a multidrug-resistant MCF-7 human breast-cancer cell line: P-glycoprotein as a possible target*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1994. **34**(6): p. 459-64.
37. Thangasamy, T., et al., *Quercetin abrogates chemoresistance in melanoma cells by modulating deltaNp73*. *BMC Cancer*, 2010. **10**: p. 282.
38. Gao, W., et al., *Quercetin ameliorates paclitaxel-induced neuropathic pain by stabilizing mast cells, and subsequently blocking PKCepsilon-dependent activation of TRPV1*. *Acta Pharmacol Sin*, 2016. **37**(9): p. 1166-77.
39. Azevedo, M.I., et al., *The antioxidant effects of the flavonoids rutin and quercetin inhibit oxaliplatin-induced chronic painful peripheral neuropathy*. *Mol Pain*, 2013. **9**: p. 53.
40. Chen, C., J. Zhou, and C. Ji, *Quercetin: a potential drug to reverse multidrug resistance*. *Life Sci*, 2010. **87**(11-12): p. 333-8.
41. Cai, X., et al., *Bioavailability of quercetin: problems and promises*. *Curr Med Chem*, 2013. **20**(20): p. 2572-82.
42. Baby, B., et al., *Structural insights into the polypharmacological activity of quercetin on serine/threonine kinases*. *Drug Des Devel Ther*, 2016. **10**: p. 3109-3123.
43. Boly, R., et al., *Quercetin inhibits a large panel of kinases implicated in cancer cell biology*. *Int J Oncol*, 2011. **38**(3): p. 833-42.
44. Gupta, P., et al., *Evaluation of binding and inhibition mechanism of dietary phytochemicals with sphingosine kinase 1: Towards targeted anticancer therapy*. *Scientific Reports*, 2019. **9**(1): p. 18727.
45. Jana, N., et al., *Potential of the Flavonoid Quercetin to Prevent and Treat Cancer - Current Status of Research*. *Klin Onkol*. **31**(3): p. 184-190.
46. Ferry, D.R., et al., *Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: pharmacokinetics and evidence for in vivo tyrosine kinase inhibition*. *Clin Cancer Res*, 1996. **2**(4): p. 659-68.
47. Yang, L., et al., *Quercetin-induced apoptosis of HT-29 colon cancer cells via inhibition of the Akt-CSN6-Myc signaling axis*. *Mol Med Rep*, 2016. **14**(5): p. 4559-4566.
48. Ko, C.C., et al., *Chemical proteomics identifies heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) A1 as the molecular target of quercetin in its anti-cancer effects in PC-3 cells*. *J Biol Chem*, 2014. **289**(32): p. 22078-89.
49. Aalinkeel, R., et al., *The dietary bioflavonoid, quercetin, selectively induces apoptosis of prostate cancer cells by down-regulating the expression of heat shock protein 90*. *Prostate*, 2008. **68**(16): p. 1773-89.
50. Ranganathan, S., D. Halagowder, and N.D. Sivasithambaram, *Quercetin Suppresses Twist to Induce Apoptosis in MCF-7 Breast Cancer Cells*. *PLoS One*, 2015. **10**(10): p. e0141370.

51. Su, Q., et al., *Quercetin induces bladder cancer cells apoptosis by activation of AMPK signaling pathway*. Am J Cancer Res, 2016. **6**(2): p. 498-508.
52. Mukherjee, A. and A.R. Khuda-Bukhsh, *Quercetin Down-regulates IL-6/STAT-3 Signals to Induce Mitochondrial-mediated Apoptosis in a Nonsmall- cell Lung-cancer Cell Line, A549*. J Pharmacopuncture, 2015. **18**(1): p. 19-26.
53. Nam, J.S., et al., *Application of Bioactive Quercetin in Oncotherapy: From Nutrition to Nanomedicine*. Molecules, 2016. **21**(1): p. E108.
54. Massi, A., et al., *Research Progress in the Modification of Quercetin Leading to Anticancer Agents*. Molecules, 2017. **22**(8).
55. Dobrydnev, A.V., et al., *Quercetin-Amino Acid Conjugates are Promising Anti-Cancer Agents in Drug Discovery Projects*. Mini Rev Med Chem, 2020. **20**(2): p. 107-122.
56. Tsiailanis, A.D., et al., *Enhancement of glioblastoma multiforme therapy through a novel Quercetin-Losartan hybrid*. Free Radic Biol Med, 2020. **160**: p. 391-402.
57. Walle, T., *Methylation of dietary flavones increases their metabolic stability and chemopreventive effects*. Int J Mol Sci, 2009. **10**(11): p. 5002-19.
58. Walle, T., *Absorption and metabolism of flavonoids*. Free Radic Biol Med, 2004. **36**(7): p. 829-37.
59. Artursson, P. and J. Karlsson, *Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1991. **175**(3): p. 880-5.
60. Yuan, J., et al., *Synthesis of methylated quercetin derivatives and their reversal activities on P-gp- and BCRP-mediated multidrug resistance tumour cells*. Eur J Med Chem, 2012. **54**: p. 413-22.
61. Walle, T., et al., *Cancer chemopreventive properties of orally bioavailable flavonoids--methylated versus unmethylated flavones*. Biochem Pharmacol, 2007. **73**(9): p. 1288-96.
62. Shi, Z.H., et al., *Biological evaluation and SAR analysis of O-methylated analogs of quercetin as inhibitors of cancer cell proliferation*. Drug Dev Res, 2014. **75**(7): p. 455-62.
63. Al-Jabban, S.M., et al., *Synthesis and Anti-Proliferative Effects of Quercetin Derivatives*. Nat Prod Commun, 2015. **10**(12): p. 2113-8.
64. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. CA Cancer J Clin, 2018. **68**(6): p. 394-424.
65. Kuipers, E.J., et al., *Colorectal cancer*. Nat Rev Dis Primers, 2015. **1**: p. 15065.
66. Kim, H.J., et al., *Apoptotic effect of quercetin on HT-29 colon cancer cells via the AMPK signaling pathway*. J Agric Food Chem, 2010. **58**(15): p. 8643-50.
67. Kim, W.K., et al., *Quercetin decreases the expression of ErbB2 and ErbB3 proteins in HT-29 human colon cancer cells*. J Nutr Biochem, 2005. **16**(3): p. 155-62.
68. Yang, Y., et al., *Quercetin preferentially induces apoptosis in KRAS-mutant colorectal cancer cells via JNK signaling pathways*. Cell Biol Int, 2019. **43**(2): p. 117-124.

69. Feng, J., et al., *Quercetin restrains TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition by inhibiting Twist1 and regulating E-cadherin expression*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018. **498**(1): p. 132-138.
70. Darband, S.G., et al., *Quercetin: A functional dietary flavonoid with potential chemo-preventive properties in colorectal cancer*. *J Cell Physiol*, 2018. **233**(9): p. 6544-6560.
71. Jaffe, E.A., et al., *Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria*. *J Clin Invest*, 1973. **52**(11): p. 2745-56.
72. Linsalata, M., et al., *Quercetin inhibits human DLD-1 colon cancer cell growth and polyamine biosynthesis*. *Anticancer Res*, 2010. **30**(9): p. 3501-7.
73. Varghese, V., et al., *FOXO1 modulates 5-FU resistance in colorectal cancer through regulating TYMS expression*. *Sci Rep*, 2019. **9**(1): p. 1505.
74. Honrubia-Gomez, P., et al., *Pedf derived peptides affect colorectal cancer cell lines resistance and tumour re-growth capacity*. *Oncotarget*, 2019. **10**(31): p. 2973-2986.
75. Chira, S., et al., *Premature senescence activation in DLD-1 colorectal cancer cells through adjuvant therapy to induce a miRNA profile modulating cellular death*. *Exp Ther Med*, 2018. **16**(2): p. 1241-1249.
76. Beutler, J.A., et al., *Structure-activity requirements for flavone cytotoxicity and binding to tubulin*. *J Med Chem*, 1998. **41**(13): p. 2333-8.
77. Burmistrova, O., et al., *Synthesis and effects on cell viability of flavonols and 3-methyl ether derivatives on human leukemia cells*. *Eur J Med Chem*, 2014. **84**: p. 30-41.
78. Torres, F., J. Quintana, and F. Estevez, *5,7,3'-trihydroxy-3,4'-dimethoxyflavone-induced cell death in human leukemia cells is dependent on caspases and activates the MAPK pathway*. *Mol Carcinog*, 2010. **49**(5): p. 464-75.
79. Torres, F., J. Quintana, and F. Estevez, *5,7,3'-Trihydroxy-3,4'-dimethoxyflavone inhibits the tubulin polymerization and activates the sphingomyelin pathway*. *Mol Carcinog*, 2011. **50**(2): p. 113-22.
80. Li, F., et al., *Quercetin inhibits vascular endothelial growth factor-induced choroidal and retinal angiogenesis in vitro*. *Ophthalmic Res*, 2015. **53**(3): p. 109-16.
81. Goi, T., et al., *The anti-tumor effect is enhanced by simultaneously targeting VEGF and PROK1 in colorectal cancer*. *Oncotarget*, 2015. **6**(8): p. 6053-61.
82. Yasui, M., et al., *Antisense to cyclin D1 inhibits vascular endothelial growth factor-stimulated growth of vascular endothelial cells: implication of tumor vascularization*. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(15): p. 4720-

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα φυσικά προϊόντα και ιδιαίτερα οι φυτοχημικές ενώσεις αποτελούν μια αστείρευτη πηγή μικρών μορίων των οποίων η «συμβατότητα» με πρωτεϊνικούς στόχους και η δομική ποικιλότητα θα μπορούσε να αξιοποιηθεί στην ανάπτυξη αντικαρκινικών φαρμάκων. Η χημική τροποποίηση τους αλλά και ο εγκλεισμός τους σε φορείς μπορεί να αυξήσει τη βιοδραστικότητα τους αλλά και να ενισχύσει τη «συμβατότητα» τους με τον ανθρώπινο οργανισμό όπως για παράδειγμα στο πλαίσιο της αύξησης της βιοδιαθεσιμότητας, της απορρόφησης και της προστασίας από ένζυμα του μεταβολισμού. Επίσης, η διαλεύκανση του τρόπου αλληλεπίδρασης αυτών των μορίων βάσει των δομικών χαρακτηριστικών τους θα μπορούσε να αξιοποιηθεί στη στόχευση πρωτεϊνικών στόχων.

Αρχικά, μελετήθηκε η αλληλεπίδραση του ροσμαρινικού οξέος και των δύο δομικών υπομονάδων του, καφεϊκό και σαλβιανικό οξύ, με την αλβουμίνη BSA. Από δύο διαφορετικές οδούς του ίδιου μεταβολικού μονοπατιού προκύπτουν το καφεϊκό και το σαλβιανικό οξύ, ενώ παράλληλα το φυτικό κύτταρο χρησιμοποιεί τα πρόδρομα μόρια τους ώστε να συνθέσει το δομικά πολυπλοκότερο ροσμαρινικό οξύ. Για να μελετήσουμε τον τρόπο αλληλεπίδρασης των τριών μορίων χρησιμοποιήσαμε τη BSA που είναι γνωστή πρωτεΐνη-μεταφορέας φαρμάκων και χρησιμοποιείται ευρέως ως μοντέλο για τη διερεύνηση του τρόπου αλληλεπίδρασης των μικρών μορίων. Με την τεχνική της φθορισμομετρίας παρατηρήθηκε ίδιο μοτίβο μείωσης της έντασης του εγγενούς φθορισμού της BSA κατά την πρόσδεση του ροσμαρινικού και του καφεϊκού οξέος, ενώ η πρόσδεση του σαλβιανικού οξέος επέφερε μικρότερη μείωση και υποχρωμική μετατόπιση. Μεγαλύτερη σταθερά απόσβεσης K_{SV} παρουσίασε το ροσμαρινικό οξύ. Η πρόσδεση των τριών μορίων στην BSA χαρτογραφήθηκε μέσω της τεχνικής STD NMR και της αναγνώρισης των επιτόπων των τριών μορίων. Όλα τα πρωτόνια κάθε μορίου συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση τους με τη BSA αλλά με διαφορετική ισχύ. Το ροσμαρινικό οξύ φαίνεται να αλληλεπιδρά ισχυρότερα μέσω του αλειφατικού H7b, ενώ το καφεϊκό οξύ μέσω των αρωματικών H9, H8 και H5 του πρώτου δακτυλίου και το

σαλβιανικό μέσω του αλειφατικού H₂, παρουσιάζοντας διαφορετικό μοτίβο αλληλεπίδρασης. Η μελέτη των τριών αλληλεπιδράσεων μέσω ITC έδειξε την ισχυρότερη πρόσδεση του ροσμαρινικού οξέος στην BSA με K_d ίσο με 135 μM σε αντίθεση με αυτή του καφεϊκού οξέος όπου το K_d βρέθηκε ίσο με 1564.9 μM. Οι δύο αλληλεπιδράσεις ευνοούνται ενθαλπικά και συνεπώς βασίζονται στον σχηματισμό δεσμών υδρογόνου και ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Η αλληλεπίδραση του σαλβιανικού οξέος ήταν ασθενέστερη και μη ικανή να μελετηθεί μέσω του ITC. Γι' αυτόν τον λόγο επιστρατεύθηκε η τεχνική tr-NOESY NMR όπου μέσω πειράματος ανταγωνισμού φάνηκε πως το καφεϊκό οξύ εκτοπίζει το σαλβιανικό οξύ ώστε να προσδεθεί στην πρωτεΐνη. Με την ίδια τεχνική μελετήθηκε και η πρόσδεση του ροσμαρινικού οξέος στην BSA από όπου διαπιστώθηκε πως το μόριο διατηρεί εκτεταμένο τον σκελετό του. Το ροσμαρινικό οξύ μπορεί να σχηματίσει περισσότερους δεσμούς υδρογόνου με αμινοξικά κατάλοιπα της BSA σε σύγκριση με τα άλλα δύο μόρια όπως φάνηκε από τις μελέτες προσομοίωσης Μοριακής Πρόσδεσης. Η ένωση του καφεϊκού οξέος με το σαλβιανικό οξύ οδηγεί στο σχηματισμό του δομικά πολυπλοκότερου ροσμαρινικού οξέος το οποίο αλληλεπιδρά πολύ πιο ισχυρά με τη BSA και κατά τέτοιον τρόπο που δεν μπορεί να αποδοθεί μεμονωμένα σε μία από τις δύο υπομονάδες του. Συμπερασματικά, το φυτικό κύτταρο επιλέγει να συνδυάσει δύο υπάρχουσες χημικές δομές σε μία ή οποία φέρει διαφορετικές ιδιότητες και ικανότητες πρόσδεσης.

Το ροσμαρινικό και το καφεϊκό οξύ είναι βιοδραστικά μόρια ωστόσο η αποτελεσματικότητά τους είναι περιορισμένη *in vivo* λόγω της χαμηλής βιοδιαθεσιμότητάς τους και του εκτενούς μεταβολισμού. Για τον λόγο αυτό, μελετήθηκε η ικανότητά τους να συμπλοκοποιηθούν με την κυκλοδεξτρίνη HP-β-CD, έναν διαδεδομένο φορέα φαρμάκων με χαμηλή τοξικότητα που μπορεί να αυξήσει την υδατοδιαλυτότητα των εγκλεισμένων μορίων. Η συμπλοκοποίηση των δύο μορίων επιβεβαιώθηκε μέσω των τεχνικών ¹³C NMR και ¹H NMR, όπου παρατηρήθηκε η διεύρυνση των κορυφών ¹³C των δύο φαινολικών οξέων και η μετατόπιση των πρωτονίων τους σε περισσότερο προασπισμένες περιοχές, αντίστοιχα. Η στοιχειομετρία και των δύο συμπλόκων βρέθηκε ίση με 1:1 μέσω της φασματομετρίας μαζών, ενώ με

την τεχνική NOESY NMR διαπιστώθηκε πως τα μόρια εισάγονται ολόκληρα στην υδρόφοβη κοιλότητα της HP-β-CD. Τέλος, οι δύο αλληλεπιδράσεις μελετήθηκαν μέσω ITC όπου το ροσμαρινικό οξύ φάνηκε να αλληλεπιδρά ισχυρότερα με την κυκλοδεξτρίνη σε σχέση με το καφεϊκό οξύ με K_d ίσο με 0.55 mM έναντι του 1.3 mM, αντίστοιχα. Επιπρόσθετα, ο σχηματισμός των δύο συμπλόκων ευνοείται ενθαλπικά ενώ μόνο το σύμπλοκο του ροσμαρινικού οξέος βρέθηκε να ευνοείται και εντροπικά. Συνεπώς, τα δύο μόρια, που παρουσιάζουν ομοιότητα ως προς τη δομή τους καθώς το καφεϊκό οξύ αποτελεί υπομονάδα του ροσμαρινικού οξέος και ως προς την ύπαρξη καρβοξυλικής ομάδας, φαίνεται να μην αλληλεπιδρούν ακριβώς με τον ίδιο τρόπο.

Ένα ακόμη πρόβλημα του ροσμαρινικού και του καφεϊκού οξέος αποτελεί η μειωμένη κυτταρική τους πρόσληψη λόγω του αρνητικού φορτίου της καρβοξυλομάδας τους. Παίρνοντας παράδειγμα από τη φύση και συγκεκριμένα τον φυτικό μεταβολίτη CAPE όπου μια φαινέθυλο- ομάδα καλύπτει την καρβοξυλομάδα του καφεϊκού οξέος μέσω εστερικού δεσμού, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση πρόπυλο- και φαινέθυλο- ανάλογων μορίων του ροσμαρινικού οξέος μέσω εστερικών και αμιδικών δεσμών έτσι ώστε να διερευνηθεί εάν αυτές οι τροποποιήσεις αυξάνουν την κυτταρική πρόσληψη του μορίου και κατ' επέκτασιν την αντιοξειδωτική του ικανότητα. Είναι γνωστό πως ενώσεις που φέρουν ορθο-διυδροξυ- ομάδες (κατεχόλες), όπως το ροσμαρινικό οξύ, έχουν αντιοξειδωτική δράση και μπορούν να δεσμεύσουν σίδηρο. Έτσι, αρχικά μελετήθηκε η ικανότητα του ροσμαρινικού οξέος και των τεσσάρων παραγώγων του να προστατεύουν την επαγόμενη από το H_2O_2 βλάβη του DNA στα T λευχαιμικά κύτταρα Jurkat. Τα πρόπυλο- και φαινέθυλο- εστερικά ανάλογα αποδείχθηκαν πιο αποτελεσματικά με τιμές IC_{50} 25 και 12 μM έναντι των πρόπυλο- και φαινέθυλο- αμιδικών αναλόγων που παρουσίασαν τιμές IC_{50} 75 και 45 μM , ενώ το ροσμαρινικό οξύ επέδειξε πολύ ασθενή προστασία. Όταν το ίδιο πείραμα πραγματοποιήθηκε σε χαμηλή θερμοκρασία τα φαινέθυλο- παράγωγα διατήρησαν τη δραστικότητα τους σε αντίθεση με το ροσμαρινικό οξύ, υποδεικνύοντας πως το τελευταίο δεν μεταφέρεται μέσα στα κύτταρα με τον ίδιο τρόπο. Ανάλογη δράση έδειξαν τα εν λόγω μόρια και στην ικανότητα τους να δεσμεύουν τον καταλυτικά ενεργό σίδηρο, υποδεικνύοντας πως η

αντιοξειδωτική τους δράση μπορεί να βασίζεται σε αυτήν την ιδιότητα τους. Επίσης, ισχυρότερη προστασία από την επαγόμενη από το H₂O₂ απόπτωση στα κύτταρα Jurkat παρουσίασαν τα πρόπυλο- και φαινέθυλο- εστερικά ανάλογα με τιμές IC₅₀ 9 και 7.5 μM έναντι των πρόπυλο- και φαινέθυλο- αμιδικών αναλόγων που παρουσίασαν τιμές IC₅₀ 30 και 12 μM, ενώ το ροσμαρινικό οξύ δεν παρείχε καμία προστασία. Τέλος, η κυτταρική τους πρόσληψη μελετήθηκε μέσω της συνδυαστικής τεχνικής UHPLC-MS/MS από όπου φάνηκε πως τα εστερικά παράγωγα συσσωρεύονται εντός των κυττάρων Jurkat σε μεγαλύτερο ποσοστό συγκριτικά με τα αμιδικά. Από αυτά τα δεδομένα εκτιμάται πως το ροσμαρινικό οξύ δεν μπορεί να εισέλθει στο κύτταρο σε μεγάλο ποσοστό, τα εστερικά παράγωγα εισέρχονται στο κύτταρο, υδρολύονται μέσω εστερασών με αποτέλεσμα να συσσωρεύεται το ροσμαρινικό οξύ στον ενδοκυττάριο χώρο και τα αμιδικά παράγωγα εισέρχονται στα κύτταρα, όπου δεν υδρολύονται ή υδρολύονται με μικρό ρυθμό έχοντας έτσι τη δυνατότητα να εισέρχονται και να εξέρχονται μέσω της κυτταρικής μεμβράνης.

Είναι γνωστό βιβλιογραφικά πως η μεθυλίωση μπορεί να ενισχύσει την αντικαρκινική δράση της κερσετίνης. Έτσι, εξετάστηκε η ικανότητα οκτώ μεθυλιωμένων αναλόγων μορίων της κερσετίνης ως προς τη μείωση της βιωσιμότητας των καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου DLD1. Διαπιστώθηκε πως η μεθυλίωση στην θέση 7 δεν αρκεί από μόνη της για να μειώσει τη βιωσιμότητα των κυττάρων ενώ οι μεθυλιώσεις στις θέσεις 3 και 4' μόνες τους είτε και σε συνδυασμό ήταν ικανές μειώσουν σημαντικά το IC₅₀ της κερσετίνης στα κύτταρα DLD1. Ένα από αυτά, η 3',5,7-OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνη παρουσίασε τη χαμηλότερη τιμή IC₅₀ ίση με 4.0 μM και 44 φορές μικρότερη από αυτήν της κερσετίνης (176 μM). Το ανάλογο αυτό επιλέχθηκε ώστε να μελετηθεί περαιτέρω για τον τρόπο με τον οποίο επηρεάζει τη βιωσιμότητα των DLD1 αλλά και για το αν διατηρεί την αντιαγγειογενετική δράση της κερσετίνης. Το ανάλογο δεν επέδειξε επαγωγή της απόπτωσης ή αναστολή της μετανάστευσης στα κύτταρα αλλά παρουσίασε ισχυρή αναστολή του πολλαπλασιασμού ακόμη και στη συγκέντρωση των 5 μM. Επιπρόσθετα, δεν είναι τοξικό στα φυσιολογικά κύτταρα HUVE μέχρι και τη συγκέντρωση των 25 μM. Η επίδραση του στους αγγειογενετικούς μοριακούς μηχανισμούς των HUVECS μελετήθηκε ως προς την ικανότητα του να αναστέλλει τα επαγόμενα από τον VEGF

πολλαπλασιασμό και επιβίωση τους μιας και είναι γνωστό βιβλιογραφικά πως η κερσετίνη επιδρά σε αυτούς τους μηχανισμούς. Πράγματι, η 3',5,7-OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνη αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των κυττάρων παρουσία VEGF μειώνοντας ταυτόχρονα τα επίπεδα των φωσφορυλιωμένων Erk1/2 και Akt. Η 3',5,7-OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνη φαίνεται να διατηρεί την αντιαγγειογενετική δράση της κερσετίνης ενώ παράλληλα επιδεικνύει και ισχυρή αντιπολλαπλασιαστική δράση σε χαμηλές συγκεντρώσεις.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος είναι μια από τις πιο θανατηφόρες ασθένειες παγκοσμίως και παρ' όλο που καινοτόμες θεραπείες αναπτύσσονται συνεχώς το ποσοστό επιβίωσης παραμένει χαμηλό. Έτσι, η ανάγκη για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων για κάθε τύπο καρκίνου παραμένει επιτακτική. Τα φυσικά προϊόντα και ειδικά οι φυτοχημικές ενώσεις αποτελούν τεράστια πηγή ποικίλων και βιοδραστικών μορίων. Αν και αρκετά από αυτά μέχρι στιγμής, όπως η βινμπλαστίνη, η πακλιταξέλη και η ιρινοτεκάνη, έχουν εγκριθεί για τη θεραπεία καρκίνων το ερευνητικό ενδιαφέρον ως προς τις φυτοχημικές ενώσεις έχει μειωθεί τα τελευταία χρόνια εξαιτίας διαφόρων δυσκολιών όπως η απαιτητική απομόνωση/σύνθεση και η χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα τους. Ωστόσο, η απόκτηση βαθύτερης γνώσης της βιοδραστικότητας της αλλά και της δυνατότητας της δομικής τους τροποποίησης/ του εγκλεισμού σε φορείς μπορούν να βελτιστοποιήσουν τη βιοδραστικότητα τους και να προσφέρουν καινοτόμα μόρια-οδηγούς στον τομέα της ανάπτυξης αντικαρκινικών φαρμάκων.

Το πρώτο μέρος περιγράφει την αλληλεπίδραση του ροσμαρινικού οξέος και των δύο δομικών υπομονάδων του, καφεϊκό και σαλβιανικό οξύ, με την αλβουμίνη του ορού. Οι τρεις αλληλεπιδράσεις εξετάζονται μέσω φθορισμομετρίας, STD και NOESY NMR φασματοσκοπίας, θερμοδομετρίας ισόθερμης τιτλοδότησης (ITC) και προσομοίωσης Μοριακής Πρόσδεσης έτσι ώστε να χαρτογραφηθούν τα δομικά και θερμοδυναμικά χαρακτηριστικά τους καθώς και ο τρόπος πρόσδεσης τους. Ισχυρότερη πρόσδεση στην αλβουμίνη επέδειξε το ροσμαρινικό οξύ, καθώς οι αλληλεπιδράσεις του καφεϊκού και σαλβιανικού οξέος ήταν πολύ πιο αδύναμες, υποδεικνύοντας πως η δομική πολυπλοκότητα μπορεί να οδηγήσει σε διαφοροποιημένες ιδιότητες πρόσδεσης.

Στο δεύτερο μέρος περιγράφονται τα σύμπλοκα εγκλεισμού του ροσμαρινικού και του καφεϊκού οξέος με την 2-ύδροξυ-πρότυλο-β-κυκλοδεξτρίνη και η χημική τροποποίηση του ροσμαρινικού οξέος σε εστερικά και αμιδικά παράγωγα. Τα δομικά χαρακτηριστικά, οι θερμοδυναμικές παράμετροι και η ισχύς των δύο συμπλόκων χαρακτηρίζονται μέσω φασματοσκοπίας NMR στερεής και υγρής κατάστασης, ITC και

φασματομετρία μαζών αποκαλύπτοντας σύμπλοκα μοριακής αναλογίας 1:1 με αλληλεπιδράσεις μέτριας ισχύος. Συμπερασματικά, η 2-ύδροξυ-πρόπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως φορέας των δύο μορίων και δυνητικά να αυξήσει τη σταθερότητα και τη βιοδιαθεσιμότητα τους *in vivo*. Επιπρόσθετα, η εστεροποίηση και η αμιδίωση του ροσμαρινικού οξέος αυξάνει την κυτταρική του πρόσληψη η οποία εμποδίζεται από το αρνητικό φορτίο που του επιφέρει η καρβοξυλική του ομάδα. Η ενισχυμένη κυτταρική πρόσληψη αντικατοπτρίζεται, επίσης, στην αυξημένη ικανότητα των παραγώγων να προστατέψουν τα κύτταρα Jurkat από τις επαγόμενες από το H₂O₂ βλάβες στο DNA και την απόπτωση αλλά και στην αυξημένη ικανότητα μείωσης των ενδοκυτταρικών επιπέδων του καταλυτικά ενεργού σιδήρου. Τα εστερικά παράγωγα έδειξαν μεγαλύτερη κυτταρική πρόσληψη και αντιοξειδωτική ιδιότητα σε σχέση με τα αμιδικά οδηγώντας στην εκτίμηση πως η υδρόλυση των εστερικών τους δεσμών από τις ενδοκυττάρια εστεράσες μπορούν να επιφέρουν υψηλότερη συσσώρευση του ροσμαρινικού οξέος στα κύτταρα.

Τέλος, το τρίτο μέρος αναφέρεται στη μελέτη ενός μεθυλιωμένου ανάλογου μορίου της κερσετίνης το οποίο επέδειξε πολύ πιο υψηλή αντιπολλαπλασιαστική ικανότητα συγκριτικά με την κερσετίνη έναντι των καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου DLD1. Αφού εξετάσθηκε η δράση 8 μεθυλιωμένων αναλόγων της κερσετίνης, ένα από αυτά έδειξε 44 φορές χαμηλότερη τιμή IC₅₀ σε σχέση με αυτήν της κερσετίνης. Ο τρόπος δράσης του μελετήθηκε με τεχνικές για τον έλεγχο του πολλαπλασιασμού, της απόπτωσης και της μετανάστευσης οδηγώντας στο συμπέρασμα πως μειώνει την κυτταρική ανάπτυξη μέσω αναστολής του πολλαπλασιασμού. Επιπλέον, μελετήθηκε αν το μεθυλιωμένο παράγωγο διατηρεί την ικανότητα της κερσετίνης να επιδρά σε αγγειογενετικούς μοριακούς μηχανισμούς των ενδοθηλιακών κυττάρων (HUVECs). Ομοίως της κερσετίνης, το μεθυλιωμένο παράγωγο αναστέλλει την επαγόμενη από τον VEGF επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των HUVECs.

SUMMARY

Cancer is one of the deadliest diseases worldwide and though novel treatments consecutively arise the survival rate remains low. Thus, there is an urgent need to develop new drugs suitable for each cancer type. Natural products and especially phytochemical substances constitute a huge source of diverse and bioactive compounds. Even though many of them until now, like vinblastine, paclitaxel and irinotecan, have been approved for cancer treatment the research interest in phytochemical compounds has been decreased in the last years due to various difficulties like their challenging isolation/synthesis and low bioavailability. However, deeper knowledge of their bioactivity as well as of their capacity for derivatization/carrier inclusion may optimize their efficacy and provide novel lead molecules for anticancer drug development.

The first part describes the interaction of rosmarinic acid and its two building blocks, caffeic and salvianic acid, with serum albumin. The three interactions are investigated through fluorescence spectroscopy, STD and NOESY NMR spectroscopy, isothermal titration calorimetry (ITC) and molecular docking to map their structural, thermodynamic and binding characteristics. The strongest affinity to serum albumin was exhibited by rosmarinic acid, while the affinities of caffeic and salvianic acid were much weaker, indicating that structural complexity can lead to differential binding properties.

The second part describes the inclusion complexes of rosmarinic and caffeic acid with the 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin and the chemical derivatization into ester and amide analogues of rosmarinic acid. The structural characteristics, thermodynamic and affinity parameters of the two complexes are characterized through solid and liquid state NMR spectroscopy, ITC and mass spectrometry revealing 1:1 complexes with moderate affinities. As a result, 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin could serve as a carrier for both molecules and potentially increase their stability and bioavailability *in vivo*. Furthermore, the esterification and amidification of rosmarinic acid increases its cellular uptake which is hampered due to the negative charge of its carboxylic group. The enhanced uptake is, also, reflected in the increased ability of the analogues to protect Jurkat cells from the

H₂O₂-induced DNA damage and apoptosis and in the increased ability to reduce the intracellular levels of labile iron. The ester derivatives displayed greater cellular uptake and antioxidant activity compared to the amide derivatives, leading to the estimation that the hydrolysis of the ester bonds by the intracellular esterases can result to higher accumulation of rosmarinic acid into the cells.

Finally, the third part is about the study of a quercetin methylated analogue showing much higher antiproliferative properties than the parent compound against the DLD1 colon cancer cells. After the screening of 8 methylated quercetin analogues, one showed a 44-fold lower IC₅₀ compared to quercetin. Its way of action was studied through proliferation, apoptosis and migration assays leading to the conclusion that it inhibits the cell growth through the inhibition of proliferation. Furthermore, it was investigated whether the methylated compound retains the ability of quercetin to act on angiogenic molecular mechanisms in endothelial cells (HUVECs). Similar to quercetin, the methylated compound inhibits the VEGF-induced survival and proliferation of HUVECs.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

- ADCs (Antibody Drug Conjugates): Συζεύγματα Αντισωμάτων-Φαρμάκων
- ADME (Absorption – Distribution – Metabolism – Excretion): Απορρόφηση-Κατανομή-Μεταβολισμός-Έκκριση
- BrdU (Bromodeoxyuridine): Βρωμοδεόξυουριδίνη
- BCA (bikinchromic acid): Βικινχρωμικό οξύ
- BSA (Bovine Serum Albumin): Αλβουμίνη Ορού Βοός
- CAPE (Caffeic Acid Phenethyl Ester): Φαινέθυλ- Εστέρας του Καφεϊκού Οξέος
- CDKs (Cyclin-dependent kinases): Κυκλινο-Εξαρτώμενες Κινάσες
- CID (Collision Induced Dissociation): Διάσπαση μέσω Θραυσματοποίησης
- DC (Direct current): Συνεχές Ρεύμα
- DMSO (Dimethyl sulfoxide)
- DP (Differential Power)
- DS (Degree of Substitution): Βαθμός Υποκατάστασης
- ECL (Enhanced Chemiluminescence): Αντιδραστήριο Ενισχυμένης Χημειοφωταύγειας
- EMA (European Medicines Agency): Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων
- EMT (Epithelial–Mesenchymal Transition): Επιθηλιακή προς Μεσεγχυματική Μετατροπή
- ESI (Electrospray Ionization): Ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό
- FACS, Fluorescence-activating Cell Sorting
- FBS (Fetal Bovine Serum): Εμβρυϊκός ορός Βοός
- FDA (Food and Drug Administration): Οργανισμός Φαρμάκων και Τροφίμων των ΗΠΑ
- GO (Glucose Oxidase): Οξειδάση της γλυκόζης
- HEAL (pHarmacokinetic and Anticancer properties of pLant-derived compounds)
- HP- β -CD (2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin): 2-ύδροξυ-πρόπυλ- β -κυκλοδεξτρίνη
- HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial cells)
- HSA (Human Serum Albumin): Αλβουμίνη Ανθρώπινου Ορού
- HTS (High-Throughput Screening): Ταχύς Έλεγχος/Διαλογή Υψηλής Απόδοσης
- ITC (Isothermal Titration Calorimetry): Θερμιδομετρία Ισόθερμης Τιτλοδότησης
- MDR (MultiDrug Resistance)
- MRM (Multiple Reaction Monitoring): Επιλεκτική Παρακολούθηση Πολλαπλών Αντιδράσεων Θραυσμάτωσης Ιόντων
- MS (Mass Spectrometry): Φασματομετρία Μαζών
- MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
- NBEs (New Biological Entities): Νέες Βιολογικές Οντότητες
- NCEs (New Chemical Entities): Νέες Χημικές Οντότητες
- NMR (Nuclear Magnetic Resonance): Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός

- NOE (Nuclear Overhauser Effect): Πυρηνικό Φαινόμενο Υπερβολικής Συχνότητας Overhauser
- PBS (Phosphate Buffered Saline)
- PI (Propidium Iodide): Ιωδιούχο Προπίδιο
- PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride)
- ppm (parts per million)
- RF (radio frequency voltage): Δυναμικό Εναλλασσόμενου Ρεύματος
- SMILES (Simplified Molecular-Input Line-Entry System): Σύστημα Απλοποιημένης Μοριακής Γραμμικής Γραφής)
- SIH (Salicylaldehyde Isonicotinoyl Hydrazone)
- SPR (Surface plasmon resonance): Συντονισμός Επιφανειακών Πλασμονίων
- STD NMR (Saturation Transfer Difference NMR): NMR Διαφοράς Μεταφοράς Κορεσμού
- TRITC (Tetramethyl Rhodamine Isothiocyanate): Ισοθειοκυανική Τετραμέθυλο Ροδαμίνη
- tr-NOE (transferred nuclear Overhauser effect): Φασματοσκοπία NMR με τη χρήση του μεταφερόμενου πυρηνικού φαινομένου Overhauser
- UHPLC (Ultra High Performance Liquid Chromatography)
- VEGFA/VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor A): Αγγειακός Ενδοθηλιακός Αυξητικός Παράγοντας
- VEGFR-2 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2): Υποδοχέας 2 του Αγγειακού Ενδοθηλιακού Αυξητικού Παράγοντα
- WHO (World Health Organization): Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Κατά την εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής προέκυψαν οι παρακάτω δημοσιεύσεις σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά :

1. **Unveiling the Thermodynamic Aspects of Drug-Cyclodextrin Interactions Through Isothermal Titration Calorimetry.** Chatziathanasiadou MV, Mavromoustakos T, Tzakos AG. *Methods Mol Biol.* **2021**; 2207:187-198. doi: 10.1007/978-1-0716-0920-0_15.
2. **Preparation and Biophysical Characterization of Quercetin Inclusion Complexes with β -Cyclodextrin Derivatives to be Formulated as Possible Nose-to-Brain Quercetin Delivery Systems.** Manta K, Papakyriakopoulou P, Chountoulesi M, Diamantis DA, Spaneas D, Vakali V, Naziris N, Chatziathanasiadou MV, Andreadelis I, Moschovou K, Athanasiadou I, Dallas P, Rekkas DM, Demetzos C, Colombo G, Banella S, Javornik U, Plavec J, Mavromoustakos T, Tzakos AG, Valsami G. *Mol Pharm.* **2020** Oct 19. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.0c00672.
3. **Synthetic Analogues of Aminoadamantane as Influenza Viral Inhibitors-In Vitro, In Silico and QSAR Studies.** Chayrov R, Parisis NA, Chatziathanasiadou MV, Vrontaki E, Moschovou K, Melagraki G, Sbirikova-Dimitrova H, Shivachev B, Schmidtke M, Mitrev Y, Sticha M, Mavromoustakos T, Tzakos AG, Stankova I. *Molecules.* **2020** Sep 1;25(17):3989. doi: 10.3390/molecules25173989.
4. **Bioinspired tailoring of fluorogenic thiol responsive antioxidant precursors to protect cells against H₂O₂-induced DNA damage.** Diamantis DA, Oblukova M, Chatziathanasiadou MV, Gemenetzi A, Papaemmanouil C, Gerogianni PS, Syed N, Crook T, Galaris D, Deligiannakis Y, Sokolova R, Tzakos AG. *Free Radic Biol Med.* **2020** Aug 29;160:540-551. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.08.025.
5. **Antihypertensive Activity and Molecular Interactions of Irbesartan in Complex with 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin.** Leonis G, Christodoulou E, Ntountaniotis D, Chatziathanasiadou MV, Mavromoustakos T, Naziris N, Chountoulesi M, Demetzos C, Valsami G, Damalas DE, Tzakos AG, Thomaidis NS, Karageorgos V, Liapakis G. *Chemical Biology & Drug Design.* **2020.** Jul;96(1):668-683. doi: 10.1111/cbdd.13664
6. **NMR-Based Chemical Profiling, Isolation and Evaluation of the Cytotoxic Potential of the Diterpenoid Siderol From Cultivated *Sideritis euboea* Heldr.** Tomou EM, Chatziathanasiadou MV, Chatzopoulou P, Tzakos AG, Skaltsa H. *Molecules.* **2020** May 20;25(10):E2382. doi: 10.3390/molecules25102382.
7. **Host-Guest Interactions Between Candesartan and Its Prodrug Candesartan Cilexetil in Complex With 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin: On the Biological Potency for Angiotensin II Antagonism.** Ntountaniotis D, Andreadelis I, Kellici TF,

- Karageorgos V, Leonis G, Christodoulou E, Kiriakidi S, Becker-Baldus J, Stylos EK, Chatziathanasiadou MV, Chatzigiannis CM, Damalas DE, Aksoydan B, Javornik U, Valsami G, Glaubitz C, Durdagi S, Thomaidis NS, Kolocouris A, Plavec J, Tzakos AG, Liapakis G, Mavromoustakos T. *Molecular Pharmaceutics*. **2019** Mar 4;16(3):1255-1271. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.8b01212
8. **Development and validation of simple step protein precipitation UHPLC-MS/MS methods for quantitation of temozolomide in cancer patient plasma samples.** El Mubarak MA, Stylos EK, Chatziathanasiadou MV, Danika C, Alexiou GA, Tsekeris P, Renziehausen A, Crook T, Syed N, Sivolapenko GB, Tzakos AG. *J Pharm Biomed Anal*. **2019** Jan 5;162:164-170.
 9. **Inclusion of Quercetin in Gold Nanoparticles Decorated with Supramolecular Hosts Amplifies Its Tumor Targeting Properties.** Yilmaz et al. *ACS Applied Bio Materials*. **2019**, 2, 7, 2715–2725. doi:10.1021/acsabm.8b00748
 10. **Designing Natural Product Hybrids Bearing Triple Antiplatelet Profile and Evaluating Their Human Plasma Stability.** Tsailanis A, Tsoumani M, Stylos EK, Chatziathanasiadou MV, Kellici TF, Mavromoustakos T, Tselepis AD, Tzakos AG. *Methods Mol Biol*. **2018**; 1824:371-385.
 11. **Tailoring Acyclovir Prodrugs with Enhanced Antiviral Activity: Rational Design, Synthesis, Human Plasma Stability and In Vitro Evaluation.** Chayrov RL, Stylos EK, Chatziathanasiadou MV, Chuchkov KN, Tencheva AI, Kostagianni AD, Milkova TS, Angelova AL, Galabov AS, Shishkov SA, Todorov DG, Tzakos AG, Stankova IG. *Amino Acids*. **2018** Aug;50 (8):1131-1143.
 12. **Amplifying and broadening the cytotoxic profile of quercetin in cancer cell lines through bioconjugation.** Chatziathanasiadou MV, Geromichalou EG, Sayyad N, Vrettos EI, Katsikoudi A, Stylos E, Bellou S, Geromichalos GD, Tzakos AG., *Amino acids*, **2018** Feb;50(2):279-291.
 13. **Enriching the biological space of natural products and charting drug metabolites, through real time biotransformation monitoring: The NMR tube bioreactor.** Chatzikonstantinou AV, Chatziathanasiadou MV, Ravera E, Fragai M, Parigi G, Gerothanassis IP, Luchinat C, Stamatis H, Tzakos AG. *Biochim Biophys Acta*. **2018** Jan; 1862(1):1-8.
 14. **Rational design and structure-activity relationship studies of quercetin-amino acid hybrids targeting the anti-apoptotic protein Bcl-xL.** Kellici TF, Chatziathanasiadou MV, Lee MS, Sayyad N, Geromichalou EG, Vrettos EI, Tsailanis AD, Chi SW, Geromichalos GD, Mavromoustakos T, Tzakos AG. *Org Biomol Chem*. **2017** Sep 26;15(37):7956-7976
 15. **Tailoring naringenin conjugates with amplified and triple antiplatelet activity profile: Rational design, synthesis, human plasma stability and in vitro evaluation.** Stylos E, Chatziathanasiadou MV, Tsailanis A, Kellici TF, Tsoumani M, Kostagianni AD, Deligianni M, Tselepis AD, Tzakos AG., *Biochim Biophys Acta*, **2017** Nov, 1861(11 Pt A), 2609-2618.