

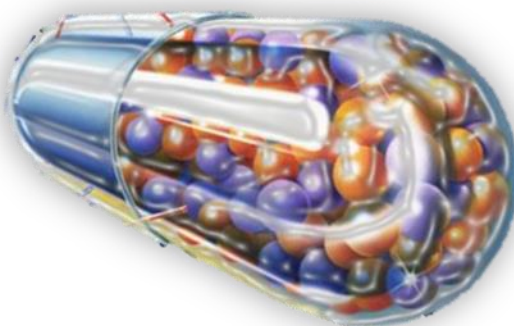


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ (Π.Μ.Σ.)

«ΣΥΝΘΕΤΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ – ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ – ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ»

«Σύζευξη τετρακυκλίνης με οργανοαντιμόνιο(V) και μελέτη της
αντικαρκινικής τους δράσης»



Παρασκευή Τριαλώνη, Χημικός
Επιβλέπων Καθηγητής: Σωτήριος Χατζηκακού

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2022

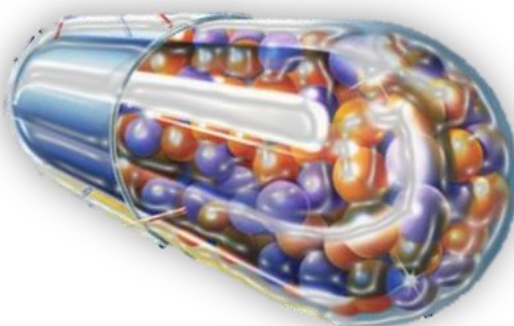


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ (Π.Μ.Σ.)

«ΣΥΝΘΕΤΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ – ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ – ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ»

«Σύζευξη τετρακυκλίνης με οργανοαντιμόνιο(V) και μελέτη της
αντικαρκινικής τους δράσης»



Παρασκευή Τριαλώνη, Χημικός
Επιβλέπων Καθηγητής: Σωτήριος Χατζηκακού

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2022

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ (Π.Μ.Σ.)
ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
«ΣΥΝΘΕΤΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ – ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ – ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ»

Της κ. Παρασκευής Τριαλώνη

Επιβλέπων μέλος ΔΕΠ: Σωτήριος Χατζηκακού

Θέμα: «Σύζευξη τετρακυκλίνης με οργανοαντιμόνιο(V) και μελέτη της αντικαρκινικής τους δράσης»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ από την Γ.Σ.: 1065/26-9-2022

1. Χατζηκακού Σωτήριος, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων (Επιβλέπων)
2. Μητσοπούλου Χριστιάνα, Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ (Μέλος)
3. Μιχαηλίδης Θεολόγος, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα ΒΕΤ, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων (Μέλος)

Έγκριση Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας στις _____

Ο/Η Διευθυντής/ρια του Π.Μ.Σ.

Καθηγητής _____

Ο/Η Γραμματέας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Στο πλαίσιο εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου διατριβής, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κύριο Σωτήριο Χατζηκακού, επιβλέποντα της διπλωματικής μου εργασίας, για την αδιάλειπτη καθοδήγησή του καθόλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών. Ο κύριος Χατζηκακού ήταν πάντοτε διαθέσιμος να απαντήσει σε κάθε ερώτηση και να δώσει λύση σε κάθε προβληματισμό μου, από την αρχή της συνεργασίας μας. Παρά τις δυσκολίες με τις οποίες ήρθαμε αντιμέτωποι εν καιρώ πανδημίας, ο κύριος Χατζηκακού πίστεψε στις δυνατότητές μου και με τις κατάλληλες υποδείξεις με στήριξε ώστε να φέρω εις πέρας το επιστημονικό έργο που μου ανατέθηκε.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω τη Μεταδιδάκτορα κυρία Χριστίνα Μπαντή για την ομαλή συνεργασία και το ευχάριστο κλίμα κατά τη διάρκεια διεξαγωγής των βιολογικών πειραμάτων. Η κυρία Χριστίνα Μπαντή συνέβαλε σημαντικά στη διεκπεραίωση της έρευνας.

Οφείλω θερμές ευχαριστίες στο Κ.Α.Δ. Αλέξανδρου Σταυρόπουλου του Ιδρύματος Ευγενίδου που με έκλεξε ως υπότροφο για το ακαδημαϊκό έτος 2021-2022. Είναι τιμή μου που αποτελώ μέλος ενός τόσο αξιόλογου Ιδρύματος και είμαι ευγνώμων για την οικονομική στήριξη που μου προσφέρθηκε.

Θέλω, στη συνέχεια, να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια κυρία Χριστιάνα Μητσοπούλου και τον Αναπληρωτή Καθηγητή κύριο Θεολόγο Μιχαηλίδη που δέχτηκαν να είναι μέλη της τριμελούς επιτροπής μου.

Τέλος, ένα τεράστιο ευχαριστώ στην οικογένεια, τους φίλους και τα μέλη του εργαστηρίου που ήταν δίπλα στις όμορφες και άσχημες στιγμές μου, και με τον τρόπο τους έκαναν αυτό το ταξίδι ξεχωριστό.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος του μαστού είναι η πιο συχνά διαγνωσμένη κακοήθεια στις γυναίκες και προσβάλλει περίπου 1.7 εκατομμύρια γυναίκες παγκοσμίως. Ανάλογα τον τύπο και την εξέλιξη του καρκίνου, επιλέγεται η κατάλληλη θεραπεία μέσα από μια ευρεία ποικιλία θεραπευτικών παραγόντων. Χημειοθεραπευτική δράση έχει αναφερθεί και σε κυτταροτοξικά αντιβιοτικά όπως η δοξορουβικίνη και η μπλεομυκίνη, τα οποία χρησιμοποιούνται εκτενώς για τη θεραπεία διαφόρων τύπων καρκίνου. Η τετρακυκλίνη, ένα αντιβιοτικό σε κλινική χρήση, σχετίζεται δομικά με τη δοξορουβικίνη. Συνεπώς, η μελέτη μεταλλικών συμπλόκων της $TecH_2$ αποτελεί πεδίο έρευνας για την ανάπτυξη νέων αντικαρκινικών φαρμάκων με χαμηλές ή καθόλου παρενέργειες.

Η φαρμακευτική χρήση του αντιμονίου οφείλεται στην εφαρμογή του για τη θεραπεία πυρετού, δερματικών ερεθισμών και τροπικών ασθενειών, όπως η λεισμανίαση. Το Sb έχει δύο οξειδωτικές καταστάσεις (+3, +5) με τις μορφές Sb^V να είναι πιο σταθερές και λιγότερο τοξικές. Αν και το Sb^{III} είναι πιο δραστικό από το Sb^V , το τελευταίο χρησιμοποιείται ως προ-φάρμακο λόγω της χαμηλότερης τοξικότητας και της ικανότητάς του να ανάγεται από Sb^V σε Sb^{III} λόγω των ειδικών συνθηκών στο κυτταρικό μικροπεριβάλλον. Επομένως, η σύζευξη του οργανοαντιμονίου (V) με την τετρακυκλίνη αναμένεται να σχηματίσει πιο αποτελεσματικά και λιγότερο τοξικά μεταλλοθεραπευτικά προϊόντα.

Σε αυτή τη διατριβή παρουσιάζουμε τη σύζευξη της τετρακυκλίνης ($TecH_2$) με το τριφαινυλαντιμόνιο ($TPSb^{III}$), παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου για να σχηματιστεί το $[Ph_3Sb^V(Tec)]$. Η ένωση χαρακτηρίστηκε με σ.τ (σημείο τήξης), Φασματοσκοπία Φθορισμού ακτίνων X (XRF), Φασματοσκοπία Υπερύθρου Μετασχηματισμού Fourier με Αποσβένουσα Ολική Ανάκλαση (ATR-FTIR), Θερμοβαρυστρική-Διαφορική Θερμική Ανάλυση (TG-DTA) σε στερεά κατάσταση και υπεριώδεις (UV) και Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού

Συντονισμού (^1H και ^{13}C -NMR) σε διάλυμα. Το μοριακό βάρος (MW) προσδιορίζεται με κρυοσκοπία ενώ η *in vitro* κυτταροτοξική δράση του TecAn αξιολογείται έναντι των κυτταρικών σειρών ανθρώπινου αδενοκαρκινώματος του μαστού: MCF-7 (θετικά σε ορμονικούς υποδοχείς (HR+)), MDA-MB-231 (αρνητικά σε ορμονικούς υποδοχείς (HR-)). Η *in vitro* τοξικότητα και γενοτοξικότητά του δοκιμάζεται έναντι φυσιολογικών ανθρώπινων εμβρυϊκών ινοβλαστικών κυττάρων του πνεύμονα (MRC-5). Η μορφολογία των κυττάρων MCF-7 και η χρώση Acridine Orange/Bromide Ethidium (AO/EB) υποδηλώνουν μια αποπτωτική οδό για τον κυτταρικό θάνατο. Προκειμένου να εξεταστεί η *in vivo* τοξικότητα, χρησιμοποιείται η δοκιμασία γαρίδα άλμης (*Artemia salina*). Επιπλέον, μελετάται η δέσμευση του TecAn στο DNA, *ex vivo*, με φασματοσκοπίες UV-Vis και φθορισμού και μετρήσεις του ιξώδους του διαλύματος DNA. Δεν ανιχνεύεται ανασταλτική δράση του TecAn έναντι της λιποξυγενάσης (LOX). Διερευνάται, ακόμα, η αναγωγή του μη ενεργού Sb^{V} , του TecAn, σε ενεργό Sb^{III} από τη γλουταθειόνη (GSH) (ένα τριπεπτίδιο που εκφράζεται σε καρκινικά κύτταρα). Τέλος, μελετάται η αντιμικροβιακή δράση της ένωσης με τη μέθοδο των ζωνών αναστολής (inhibition zones, IZ).

ABSTRACT

Breast cancer is the most diagnosed malignancy in women, and it affects approximately 1.7 million women worldwide. Depending on the type and progression of cancer, a wide variety of therapeutic agents are selected. Chemotherapeutic activity has been reported in cytotoxic antibiotics such as doxorubicin and bleomycin, which are widely used to treat various types of cancer. Tetracycline, an antibiotic in clinical use, on the other hand, is structurally related to doxorubicin. Therefore, the study of metal complexes of Tech_2 is a field of research for the development of new anti-cancer drugs $\mu\pi\lambda\epsilon$ with low or no side effects.

Antimony's medicinal use is due to its application for the treatment of fever, skin irritations and tropical diseases, like leishmaniasis. Sb has two oxidative states (+3, +5) with Sb^{V} formulations being more stable and less toxic. Although Sb^{III} is more active than Sb^{V} , the latter is used as a pro-drug due to its lower toxicity and its efficacy to reduce from Sb^{V} to Sb^{III} due to the specific microenvironmental conditions of cells. Therefore, the conjugation of organoantimony(V) with tetracycline is expected to form more effective and less toxic metallotherapeutics.

In this thesis, we report the conjunction of tetracycline (Tech_2) with triphenyl-antimony (TPSb^{III}), in the presence of hydrogen peroxide to form the $[\text{Ph}_3\text{Sb}^{\text{V}}(\text{Tec})]$. The compound is characterized by m.p (melting point), X-ray Fluorescence spectroscopy (XRF), Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infra Red (ATR-FTIR), Thermogravimetric-Differential Thermal Analysis (TG-DTA) in solid state and Ultra Violet (UV) and Nuclear Magnetic Resonance (^1H and ^{13}C -NMR), spectroscopies in solution. The molecular weight (MW) is determined with cryoscopy, while the *in vitro* cytotoxic activity of TecAn is evaluated against the human breast adenocarcinoma cell lines: MCF-7 (positive to hormones receptor (HR+)), MDA-MB-231 (negative to hormones receptor (HR-)). Its *in vitro* toxicity and genotoxicity is tested against

normal human fetal lung fibroblast cells (MRC-5). The MCF-7 cells morphology and Acridine Orange/Ethidium Bromide (AO/EB) Staining, suggest an apoptotic pathway for cell death. In order to examine the *in vivo* toxicity, the brine shrimp *Artemia salina* assay is used. Moreover, the DNA binding of TecAn is studied, *ex vivo*, with Uv-Vis and fluorescence spectroscopies and measurements of DNA solution viscosity. No inhibitory activity against lipoxygenase (LOX) has been detected for TecAn. The reduction of non-active Sb^{V} , of TecAn, to active Sb^{III} by glutathione (GSH) (a tripeptide over expressed in tumor cells) is also investigated. Finally, the antimicrobial activity of the compound is investigated through inhibition zones (IZ).

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1. Καρκίνος	1
1.1.1. Ορισμός	1
1.1.2. Τύποι καρκίνου	2
1.1.3. Καρκίνος του μαστού.....	3
1.1.3.1. Ορμονικοί υποδοχείς και HER2.....	6
1.1.3.2. Χαρακτηριστικά του μικροπεριβάλλοντος όγκου	8
1.1.4. Θεραπείες κατά του καρκίνου του μαστού.....	9
1.2. Αντιβιοτικά.....	13
1.2.1. Ορισμός	13
1.2.2. Κατηγορίες αντιβιοτικών.....	14
1.2.3. Μηχανισμοί δράσης αντιβιοτικών	18
1.2.4. Ιδιότητες και χρήσεις τετρακυκλινών	20
1.2.5. Αντιβιοτικά με αντικαρκινική δράση.....	24
1.3. Μεταλλοφάρμακα.....	27
1.3.1. Ορισμός	27
1.3.2. Αντικαρκινικά μεταλλοφάρμακα.....	28
1.3.3. Εφαρμογές μεταλλοφαρμάκων	32
1.4. Καρκινογένεση και μικροβίωμα	34
1.5. Αντιμόνιο	36
1.5.1. Χημεία αντιμονίου	36
1.5.2. Φαρμακευτική δράση αντιμονίου	38
1.5.3 Δοσολογία και παρενέργειες αντιμονίου.....	41
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	43
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	45
3.1. Χημικό μέρος	45
3.1.1. Υλικά και Όργανα.....	45
3.1.2. Σύνθεση	46
3.1.3. Σημείο Τήξης.....	46
3.1.4. Διαλυτότητα.....	47
3.1.5. Κρυοσκοπία	47
3.1.6. Φασματοσκοπία Υπέρυθρου Μετασχηματισμού Fourier με Αποσβένουσα Ολική Ανάκλαση (ATR-FTIR)	48

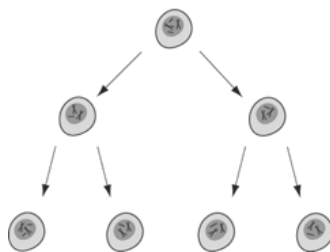
3.1.7. Φασματοσκοπία Φθορισμού Ακτίνων X (XRF).....	49
3.1.8. Φασματοσκοπία Υπεριώδους-Ορατού (UV/Vis).....	49
3.1.9. Θερμοβαρυνμετρική-Διαφορική Θερμική Ανάλυση (TG-DTA)	50
3.1.10. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (^1H - ^{13}C -NMR).....	51
3.2. Βιολογικό μέρος	51
3.2.1. Υλικά.....	51
3.2.2. Μελέτες <i>in vivo</i> και <i>in vitro</i>	52
3.2.2.1. Προσδιορισμός σουλφοροδαμίνης B (SRB assay).....	52
3.2.2.2. Αξιολόγηση της <i>in vitro</i> γενοτοξικότητας με τη μέθοδο των μικροπυρηνίσκων (Micronucleus assay)	53
3.2.2.3. Αξιολόγηση της <i>in vivo</i> τοξικότητας με τη μέθοδο γαρίδας άλμης (<i>Artemia salina</i> assay)	54
3.2.2.4. Μελέτη κυτταρικής μορφολογίας.....	55
3.2.2.5. Δοκιμασία χρώσης Acridine Orange/Ethidium Bromide (AO/EB)	55
3.2.3. Μελέτες αλληλεπίδρασης – <i>Ex vivo</i>	56
3.2.3.1. Μελέτες Υπεριώδους-Ορατού (UV/Vis).....	56
3.2.3.2. Μελέτες φθορισμού.....	57
3.2.3.3. Μελέτες ιξωδομετρίας.....	57
3.2.3.4. Αναστολή της δράσης της λιποξυγενάσης.....	58
3.2.3.5. Μετατροπή Sb(V) (TecAn) σε Sb(III) από GSH (IR).....	60
3.2.4. Μελέτες αντιμικροβιακής δράσης.....	60
3.2.4.1. Ζώνες Αναστολής (IZ).....	60
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	62
4.1. Χημικό μέρος – Χαρακτηρισμός ένωσης.....	62
4.1.1. Σύνθεση.....	62
4.1.2. Σημείο τήξης.....	62
4.1.3. Διαλυτότητα.....	63
4.1.4. Κρυοσκοπία.....	63
4.1.5. Φάσμα XRF.....	64
4.1.6. Φάσμα ATR-FT-IR	65
4.1.7. Φάσμα UV/Vis.....	69
4.1.8. Φάσμα ^1H -NMR.....	70
4.1.9. Φάσμα ^{13}C -NMR.....	73
4.1.10. Σταθερότητα TecAn μέσω UV/Vis και ^1H -NMR	75
4.1.11. Φάσμα TG-DTA	76

4.1.12. Προτεινόμενη δομή.....	77
4.2. Βιολογικό μέρος	78
4.2.1. Αποτελέσματα <i>in vivo</i> και <i>in vitro</i>	78
4.2.1.1. Μελέτη αντιπολλαπλασιαστικής δράσης <i>in vitro</i>	78
4.2.1.2. Μελέτη τοξικότητας <i>in vitro</i>	78
4.2.1.3. Μελέτη της <i>in vitro</i> γενοτοξικότητας	79
4.2.1.4. Μελέτη τοξικότητας <i>in vivo</i>	80
4.2.1.5. Μελέτη μορφολογίας κυττάρων.....	81
4.2.1.6. Δοκιμασία χρώσης Acridine Orange/Ethidium Bromide (AO/EB)	82
4.2.2. Αποτελέσματα <i>ex vivo</i>	84
4.2.2.1. Αλληλεπίδραση DNA με TecAn μέσω UV/Vis.....	84
4.2.2.2. Αλληλεπίδραση DNA με TecAn μέσω Φθορισμού	88
4.2.2.3. Αλληλεπίδραση DNA με TecAn μέσω Ιξωδομετρίας.....	90
4.2.2.4. Δράση του TecAn στο ένζυμο λιποξυγενάση	92
4.2.2.5. Αντίδραση TecAn με γλουταθειόνη (GSH) μέσω IR.....	94
4.2.3. Αποτελέσματα αντιμικροβιακής δράσης.....	95
4.2.3.1. Ζώνες αναστολής (IZ)	95
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	97
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	99
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ	103

1.1. Καρκίνος

1.1.1. Ορισμός

Ο καρκίνος αποτελεί μια ασθένεια η οποία χαρακτηρίζεται από τη μη φυσιολογική ανάπτυξη και διαίρεση των κυττάρων και έχει τη δυνατότητα να αναπτυχθεί σε οποιοδήποτε όργανο ή ιστό του σώματος. Τα ανθρώπινα κύτταρα πολλαπλασιάζονται μέσω τη διαδικασία της κυτταρικής διαίρεσης (Εικόνα 1) για να σχηματίσουν νέα κύτταρα, ανάλογα με τις ανάγκες του σώματος [1].



Εικόνα 1: Απεικόνιση της διαδικασίας της κυτταρικής διαίρεσης [2]

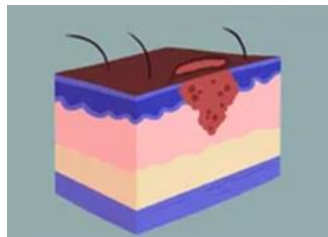
Όταν τα κύτταρα καταστρέφονται, γερνούν ή πεθαίνουν, αντικαθίστανται από νέα και κάποιες φορές αυτή η διαδικασία εμφανίζει βλάβες, με αποτέλεσμα μη φυσιολογικά κύτταρα να δημιουργούνται και να πολλαπλασιάζονται. Τότε είναι δυνατό να σχηματιστούν όγκοι, οι οποίοι μπορεί να είναι καλοήθεις ή κακοήθεις [1]. Οι καλοήθεις όγκοι είναι αυτοί που δεν εξαπλώνονται σε άλλα σημεία του σώματος, παραμένοντας στην αρχική τους θέση. Έχουν την τάση να αναπτύσσονται αργά και διαθέτουν διακριτά όρια. Αντίθετα, οι κακοήθεις όγκοι αναπτύσσονται ανεξέλεγκτα και εξαπλώνονται σε κοντινά ή/και απομακρυσμένα σημεία. Η εξάπλωση στα απομακρυσμένα σημεία, γνωστή και ως μετάσταση, πραγματοποιείται μέσω της κυκλοφορίας του

αίματος ή του λεμφικού συστήματος. Λόγω της γρήγορης ανάπτυξης είναι απαραίτητη η θεραπεία προκειμένου να αποφευχθεί η περαιτέρω εξάπλωση. Ως εκ τούτου, οι θεραπείες που επιλέγονται είναι η χειρουργική επέμβαση με πιθανή επακόλουθη χημειοθεραπεία ή ακτινοθεραπεία. Εάν ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί, τότε προτιμάται η συστηματική θεραπεία με χημειοθεραπεία ή ανοσοθεραπεία [3].

1.1.2. Τύποι καρκίνου

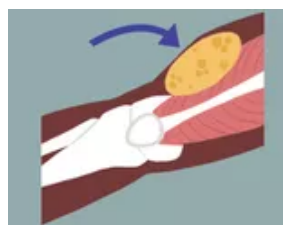
Ο αριθμός των διαφορετικών τύπων καρκίνου ξεπερνάει τους 100 και ο λόγος έγκειται στο γεγονός ότι ο καρκίνος μπορεί να προκύψει από οποιουδήποτε είδος κυττάρου του ανθρώπινου σώματος. Οι βασικές ομάδες τύπων καρκίνου είναι οι εξής [4]:

- α. Καρκινώματα:** τα οποία αφορούν το 90% των καρκίνων στον άνθρωπο και είναι κακοήθειες των επιθηλιακών κυττάρων (Εικόνα 2)



Εικόνα 2: Αναπαράσταση ενός καρκινώματος [5]

- β. Σαρκώματα:** τα οποία είναι συμπαγείς όγκοι συνδετικών ιστών, όπως μυών, οστών και χόνδρων (Εικόνα 3)



Εικόνα 3: Αναπαράσταση ενός σαρκώματος [5]

γ. **Λευχαιμίες και λεμφώματα:** τα οποία αντιπροσωπεύουν περίπου το 8% των ανθρώπινων κακοηθειών και προκύπτουν από κύτταρα που σχηματίζουν το αίμα και από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, αντίστοιχα (Εικόνα 4)



Εικόνα 4: Αναπαράσταση λευχαιμίας (αριστερά) και λεμφώματος (δεξιά) [5]

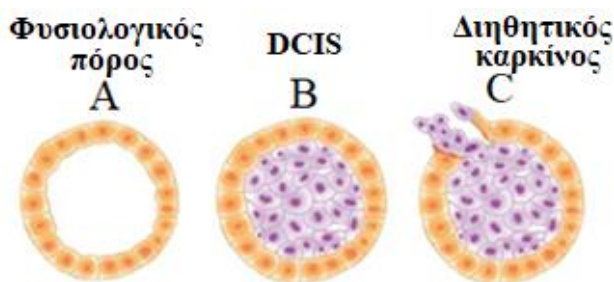
Οι όγκοι ταξινομούνται αρχικά με βάση τον τύπο του κυττάρου από τον οποίο προέρχονται και έπειτα από τον ιστό προέλευσης (π.χ. καρκινώματα πνεύμονα ή μαστού). Αν και υπάρχουν πολλά διαφορετικά είδη καρκίνου, λίγα είναι αυτά που εμφανίζονται συχνότερα, με κυριότερα τον καρκίνο του μαστού, του προστάτη, του πνεύμονα και του παχέος εντέρου. Ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί το πιο θανατηφόρο είδος καρκίνου και ευθύνεται για σχεδόν το 30% όλων των θανάτων από καρκίνο [4].

1.1.3. Καρκίνος του μαστού

Ο ιστός του μαστού αποτελείται από αδένες γάλακτος, γαλακτοφόρους πόρους και συνδετικό ιστό, λιπώδη ιστό και λεμφικό ιστό. Ο καρκίνος του μαστού προκύπτει όταν υπάρχει μη ρυθμισμένη ανάπτυξη κυττάρων σε οποιοδήποτε από τα παραπάνω συστατικά του μαστού. Πρόκειται για τον πιο διαγνωσμένο καρκίνο στις γυναίκες και προσβάλλει περίπου 1.7

εκατομμύρια γυναίκες ετησίως σε παγκόσμια κλίμακα. Αν και σε πολύ μικρότερα ποσοστά, ο καρκίνος του μαστού μπορεί να εμφανιστεί και στους άνδρες [6].

Ο καρκίνος του μαστού στα πρώιμα στάδια είναι πιθανό να βρίσκεται σε μια *in situ* φάση. Το *in situ* πορογενές καρκίνωμα (Ductal Carcinoma In Situ, DCIS) αφορά καρκινικά κύτταρα που περιορίζονται στον γαλακτοφόρο πόρο του μαστού. Ουσιαστικά, το DCIS αποτελεί ένα είδος προ-καρκινικού καρκίνου και διαθέτει υψηλή πρόγνωση χωρίς να είναι απειλητικό για τη ζωή [7]. Ωστόσο, η ύπαρξή του αυξάνει τις πιθανότητες να εξελιχθεί στην πιο επιθετική μορφή του, τον διηθητικό καρκίνο (Invasive Cancer). Σε αυτήν την περίπτωση, πρόκειται για μια κακοήθεια, η οποία έχει επεκταθεί πέρα από τους πόρους και αδένες στους περιβάλλοντες ιστούς και τους λεμφαδένες (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: A: Φυσιολογικός πόρος, B: In situ πορογενές καρκίνωμα: τα καρκινικά κύτταρα παραμένουν εσωτερικά του πόρου, C: Διηθητικός καρκίνος: τα κύτταρα διηθούν στους περιβάλλοντες ιστούς [7]

Ο καρκίνος του μαστού, είτε *in situ* ή διηθητικός, μπορεί να ανιχνευθεί μέσω μαστογραφικού ελέγχου ή όταν εμφανιστούν συμπτώματα. Στην αρχή, τα συμπτώματα είναι ελάχιστα μέχρις ότου δημιουργηθεί ένα ανώδυνο εξόγκωμα εντός του μαστού. Άλλα λιγότερο κοινά συμπτώματα περιλαμβάνουν την έκκριση αίματος από τις θηλές, ερυθρότητα, οίδημα, παραμόρφωση του μαστού κ.ά. [6]

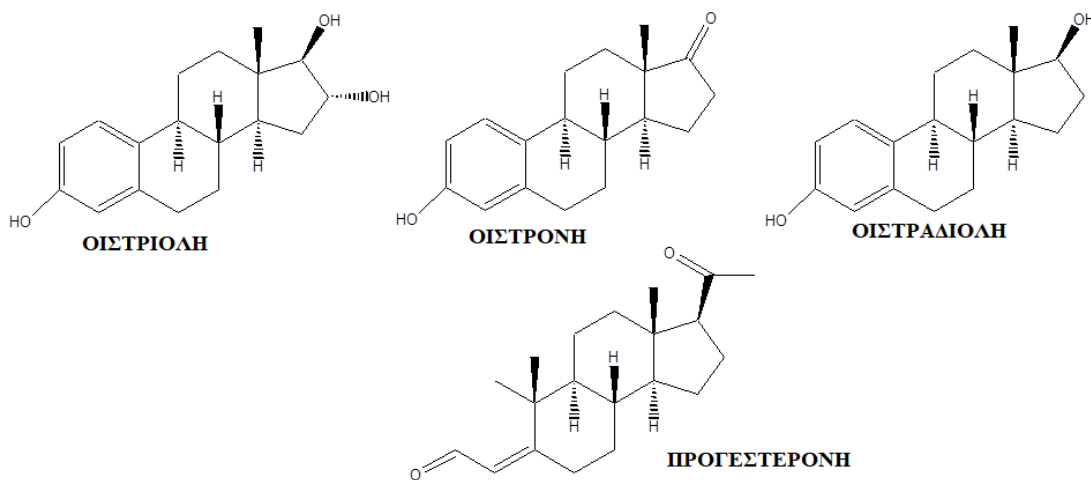
Στον διηθητικό καρκίνο προσδιορίζεται εάν υπάρχουν ορμονικοί υποδοχείς και εάν υπάρχει υπερβολική συγκέντρωση του υποδοχέα ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα 2, HER2. Έχει αποδειχθεί ότι η πλειονότητα των διηθητικών καρκίνων του μαστού είναι θετικοί στους ορμονικούς υποδοχείς (HR+) και αρνητικοί στον υποδοχέα HER2. Αυτού του είδους οι κακοήθειες είναι βραδείας ανάπτυξης και λιγότερο επιθετικές. Όμως, δεν ισχύει το ίδιο και για τους τριπλά αρνητικούς καρκίνους (απουσία ορμονικών υποδοχέων και υποδοχέα HER2) οι οποίοι διαθέτουν τη χειρότερη πρόγνωση κυρίως γιατί δεν υπάρχουν στοχευμένες θεραπείες. Τέλος, υπάρχουν κακοήθειες που είναι αρνητικές στους ορμονικούς υποδοχείς (HR-) αλλά θετικές στον υποδοχέα HER2 και εμφανίζουν υψηλή επιθετικότητα και χαμηλότερη πρόγνωση σε σχέση με τους ορμονοθετικούς τύπους [6].

Τα εργαλεία που χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη της έρευνας και της θεραπείας κατά του καρκίνου του μαστού είναι οι καρκινικές κυτταρικές σειρές. Η πρώτη εκ αυτών είναι η HeLa, που πήρε το όνομά της από την ασθενή Henrietta Lacks, η οποία είχε καρκίνωμα του τραχήλου της μήτρας. Άλλες κυτταρικές σειρές του καρκίνου του μαστού είναι η MD Anderson's (MDA-MB-235) και η MCF-7 (Michigan Cancer Foundation) που δημιουργήθηκε το 1973 από το Ίδρυμα Καρκίνου του Michigan. Η MDA-MB-235 δεν εκφράζει τους ορμονικούς υποδοχείς (HR-), ενώ η MCF-7 είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη καρκινική σειρά παγκοσμίως. Ο λόγος έγκειται στο γεγονός ότι παρουσιάζει σημαντική ευαισθησία στις ορμόνες, καθώς εκφράζει τους υποδοχείς οιστρογόνου (ER+), καθιστώντας την ιδανικό μοντέλο για τη μελέτη της ορμονικής θεραπείας [8].

1.1.3.1. Ορμονικοί υποδοχείς και HER2

Λόγω της άμεσης συσχέτισής τους με τον καρκίνο του μαστού, οι ορμονικοί υποδοχείς επιλέγονται ως μοριακοί δείκτες για τη διάγνωση του καρκίνου και τον προσδιορισμό της κατάλληλης θεραπείας. Οι βιοδείκτες που χρησιμοποιούνται συστηματικά είναι οι υποδοχείς οιστρογόνου (estrogen receptors, ER), υποδοχείς προγεστερόνης (progesterone receptors, PR) και οι υποδοχείς ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα 2 (human epidermal growth factor receptors, HER2) [9].

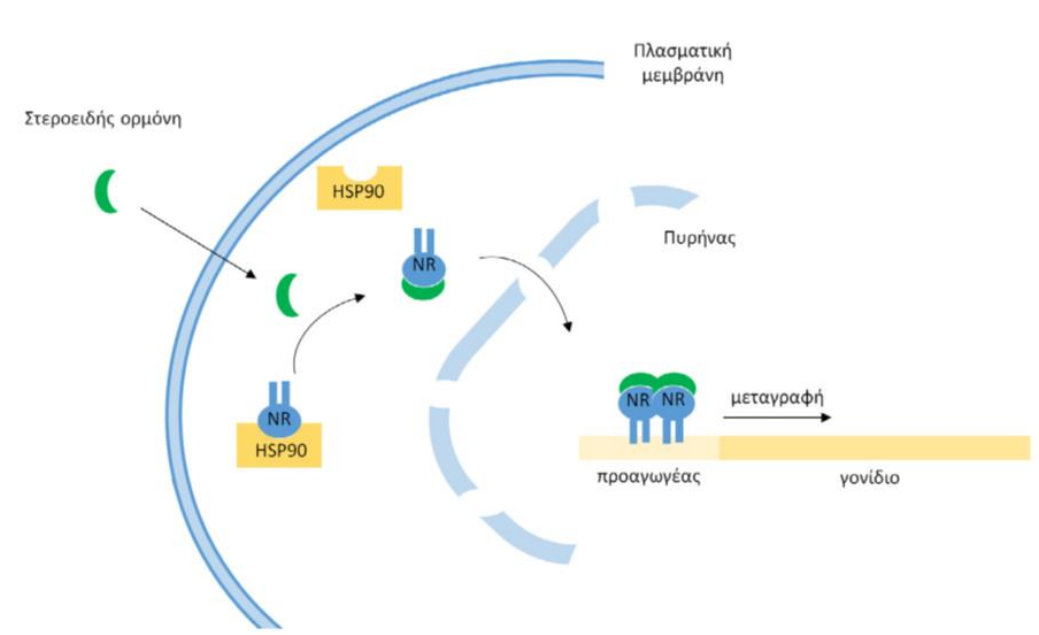
Οι ER και PR είναι πρωτεϊνικά μόρια που βρίσκονται στα κύτταρα του μαστού και λαμβάνουν σήματα από τις στεροειδείς ορμόνες, οιστρογόνου και προγεστερόνης. Στον άνθρωπο υπάρχουν τρία ενδογενή οιστρογόνα: η οιστραδιόλη, η οιστρόνη και η οιστριόλη (Εικόνα 6).



Εικόνα 6: Χημική δομή οιστρογόνων και προγεστερόνης

Και οι δύο αυτές ορμόνες είναι εξίσου σημαντικές για πολλές λειτουργίες στις γυναίκες, όπως η σεξουαλική ωρίμανση, η εγκυμοσύνη, ο τοκετός και η εμμηνόπαυση. Ειδικότερα, οι ER και PR εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα και κυτταρική μεμβράνη, αντίστοιχα. Πρόκειται για πυρηνικούς υποδοχείς οι οποίοι μόλις ενεργοποιηθούν από τις ορμόνες, μετατοπίζονται στον πυρήνα, όπου

συνδέονται με ένα συγκεκριμένο τμήμα του DNA προκαλώντας ενεργοποίηση ή καταστολή διαφόρων γονιδίων (Εικόνα 7) [9].



Εικόνα 7: Η λιποδιαλυτή ορμόνη διαπερνά τη λιπιδική διλοστοιβάδα και εντάσσεται στον πυρηνικό υποδοχέα. Τότε το νεοσχηματιζόμενο διμερές σύμπλοκο μετατοπίζεται στον πυρήνα όπου δρα άμεσα στο DNA προκαλώντας ενεργοποίηση ή καταστολή διαφόρων γονιδίων [10]

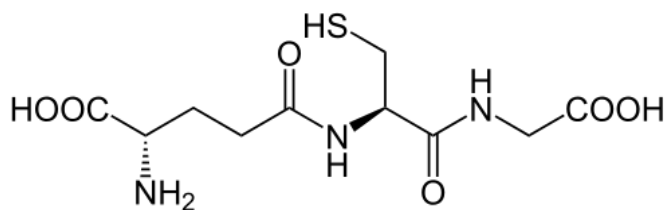
Ο HER2 είναι μια ογκοπρωτεΐνη και ανήκει στην οικογένεια υποδοχέων κινάσης τυροσίνης HER. Ρόλος του είναι να βοηθά και να ελέγχει τα κύτταρα του μαστού να αναπτυχθούν με υγιή τρόπο, να διαιρεθούν και να επιδιορθωθούν. Αποτελείται από μια εξωκυττάρια περιοχή δέσμευσης και περιέχει δύο περιοχές πλούσιες σε κυστεΐνη. Συγκεκριμένοι υποκαταστάτες συνδέονται με τον υποδοχέα στην περιοχή δέσμευσης, οδηγώντας τον σε διμερισμό. Ανάλογα με τον υποκαταστάτη που εμπλέκεται στη διαδικασία αλλά και το διμερές HER που σχηματίζεται, συγκεκριμένες περιοχές τυροσίνης αυτοφωσφορυλιώνονται με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών. Αυτά τα σηματοδοτικά μονοπάτια εμπλέκονται στην κυτταρική επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, τη μετανάστευση, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση [11].

1.1.3.2. Χαρακτηριστικά του μικροπεριβάλλοντος όγκου

Το μικροπεριβάλλον του όγκου (tumor microenvironment, TME) είναι ένα όξινο περιβάλλον με διάφορους τύπους κυττάρων (π.χ. καρκινικά, ανοσοποιητικά και φλεγμονώδη κύτταρα) και αποτελείται από χαμηλή περιεκτικότητα σε οξυγόνο (O_2) ή αλλιώς υποξία, υψηλό υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και υψηλή γλουταθειόνη (glutathione, GSH). Αυτά τα χαρακτηριστικά καθιστούν το TME ευνοϊκό για την ανάπτυξη, εισβολή και μετάσταση των καρκινικών κυττάρων [12].

Οι υποξικές περιοχές των όγκων συνήθως χαρακτηρίζονται από μειωμένη παροχή θρεπτικών συστατικών, όπως γλυκόζη και απαραίτητα αμινοξέα. Αυτό συμβαίνει επειδή τα καρκινικά κύτταρα χρησιμοποιούν τη γλυκόλυση προκειμένου να λάβουν την ενέργεια που χρειάζονται για να επιβιώσουν και να πολλαπλασιαστούν αντί τον οξειδωτικό μεταβολισμό, ο οποίος οδηγεί στην παραγωγή O_2 και ανθρακικού οξέος. Η μειωμένη ικανότητα απομάκρυνσης αυτών των όξινων προϊόντων του μεταβολισμού δημιουργεί το όξινο περιβάλλον των καρκινικών κυττάρων [13].

Η γλουταθειόνη είναι ένα τριπεπτίδιο (γλουταμινικού οξέος, κυστεΐνης και γλυκίνης) (Εικόνα 8) που βρίσκεται σε αφθονία στους ιστούς των θηλαστικών. Έχει σημαντική αντιοξειδωτική δράση και στα υγιή κύτταρα είναι υπεύθυνη για την απομάκρυνση και αποτοξίνωση των καρκινογόνων ουσιών, ενώ στα καρκινικά κύτταρα τα αυξημένα επίπεδα γλουταθειόνης συνδέονται με την εξέλιξη του όγκου και την αντίσταση στα χημειοθεραπευτικά φάρμακα [14].



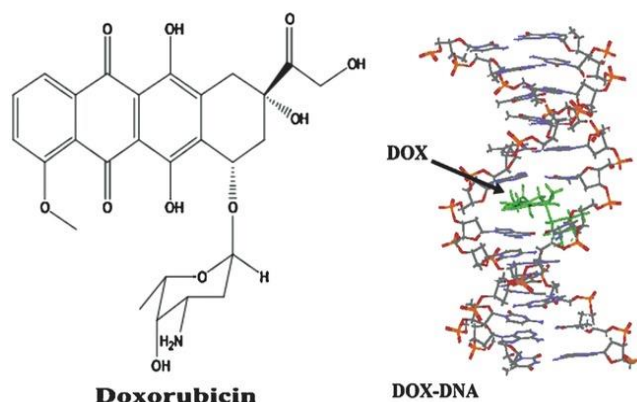
Εικόνα 8: Χημική δομή γλουταθειόνης [15]

Συμπεραίνεται ότι η αντίσταση στο φάρμακο, η περιορισμένη θεραπευτική αποτελεσματικότητα και η εισβολή και μετάσταση του καρκίνου οφείλεται στην αλληλεπίδραση των καρκινικών κυττάρων με το μικροπεριβάλλον του όγκου. Για αυτό το λόγο έχουν αναπτυχθεί νέες θεραπείες που στοχεύουν π.χ. το αντιοξειδωτικό σύστημα της γλουταθειόνης σε όγκους και ρυθμίζουν την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) [12][14].

1.1.4. Θεραπείες κατά του καρκίνου του μαστού

Οι θεραπείες που προτείνονται για την καταπολέμηση του καρκίνου του μαστού είναι η χημειοθεραπεία, η ορμονοθεραπεία (ή ενδοκρινής θεραπεία) και η στοχευμένη αντι-HER2 θεραπεία [16].

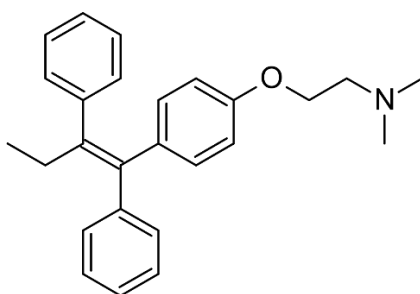
Ο χημειοθεραπευτικός παράγοντας που έχει υιοθετηθεί παγκοσμίως για την καταπολέμηση του καρκίνου του μαστού είναι η δοξορουβικίνη (doxorubicin), ένα γλυκοσιδικό αντιβιοτικό [17] που ταξινομείται στην κατηγορία των ανθρακυκλινών, και δρα ως παρεμβολέας μεταξύ των ζευγών βάσεων στην έλικα του DNA με σκοπό να εμποδίσει την αντιγραφή του (Εικόνα 9) [12][18].



Εικόνα 9: Παρεμβολή της δοξορουβικίνης στο DNA [19]

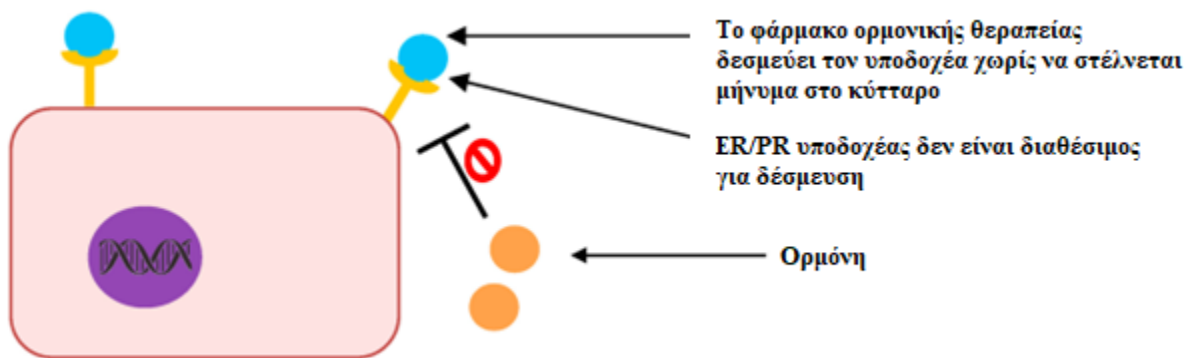
Το 80% των καρκινικών περιπτώσεων είναι θετικό στους υποδοχείς οιστρογόνου (ER+), εκ των οποίων το 65% είναι επίσης θετικό στους υποδοχείς προγεστερόνης (PR+). Ως εκ τούτου, η ορμονοθεραπεία είναι απαραίτητη και συμπληρωματική της χειρουργικής επέμβασης για την αφαίρεση του όγκου, στην πλειονότητα των ασθενών [20].

Η ταμοξιφαίνη είναι ένα μη στεροειδές φάρμακο που χρησιμοποιείται εκτεταμένα όταν απαιτείται ενδοκρινής θεραπεία (Εικόνα 10) και ανήκει στην κατηγορία των Εκλεκτικών Ρυθμιστών των Υποδοχέων Οιστρογόνου (Selective Estrogen Receptor Modulators, SERMs).



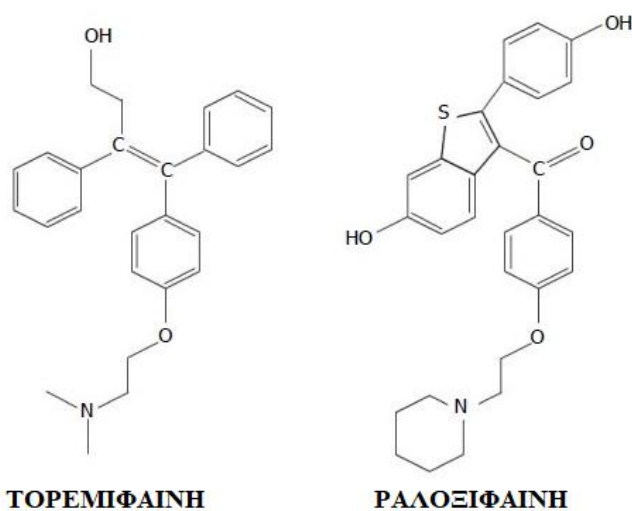
Εικόνα 10: Χημική δομή ταμοξιφαίνης

Δρα ως ανταγωνιστικός αναστολέας υποδοχέα με κύρια αντικαρκινική δράση την εκλεκτική αναστολή της δέσμευσης της οιστραδιόλης στον υποδοχέα οιστρογόνου [21], οδηγώντας σε περαιτέρω αναστολή τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του πόρου (Εικόνα 11).



Εικόνα 11: Αναπαράσταση μηχανισμού ορμονικής θεραπείας [9]

Ο αυξημένος κίνδυνος θρομβοεμβολικής νόσου και ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του ενδομητρίου είναι οι σοβαρότερες παρενέργειες που προέρχονται από τη χρήση της. Προκειμένου να περιοριστεί η συχνότητα εμφάνισης αυτών των παρενεργειών, έχουν προταθεί άλλα φάρμακα, όπως η τορεμιφαίνη και η ραλοξιφαίνη (Εικόνα 12) [20].



Εικόνα 12: Χημική δομή τορεμιφαίνης και ραλοξιφαίνης

Η τορεμιφαίνη παρουσιάζει παρόμοιες ιδιότητες με την ταμοξιφαίνη ως προς τη δράση, αποτελεσματικότητα και ανεκτικότητα. Προκαλεί λιγότερες ανεπιθύμητες ενέργειες στα αγγεία και στο ενδομήτριο, ενώ σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του μαστού εμφανίζει παρόμοια

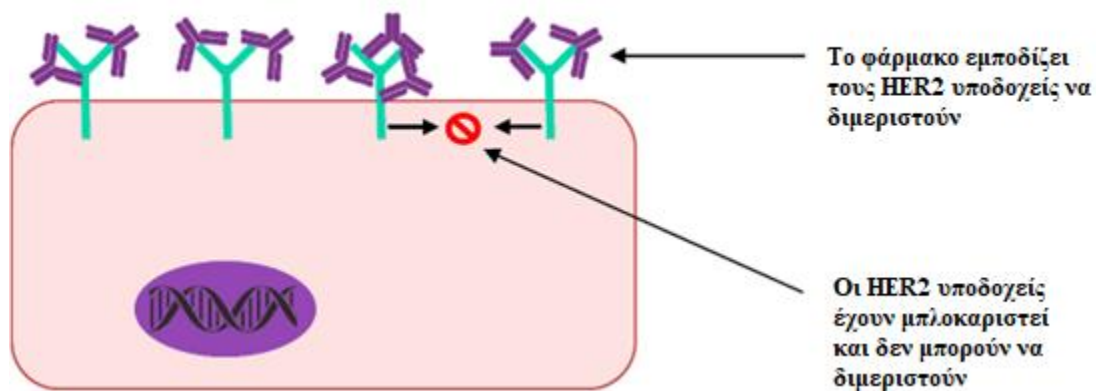
αποτελέσματα σε σύγκριση με την ταμοξιφαίνη. Επίσης, το συγκεκριμένο φάρμακο αποτελεί μια αξιόπιστη εναλλακτική για τις γυναίκες σε εμμηνόπαυση [20].

Η ραλοξιφαίνη είναι ένα άλλο μη στεροειδές φάρμακο που έχει εγκριθεί για την πρόληψη και θεραπεία της οστεοπόρωσης σε μετακλιμακτηριακές γυναίκες. Ένα πλεονέκτημα της ραλοξιφαίνης έναντι των άλλων SERMs είναι ότι δρα ως ανταγωνιστής των υποδοχέων οιστρογόνου στη μήτρα και σε αντίθεση με την ταμοξιφαίνη, δε σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του ενδομητρίου [21].

Οι περιπτώσεις που είναι θετικές στον υποδοχέα ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα 2, HER2, καταπολεμώνται με αντι-HER2 θεραπείες (Εικόνα 13). Προς το παρόν, τέσσερις είναι διαθέσιμες και είναι οι εξής:

- 1) Τραστουζουμπάμπη (*Εμπορική ονομασία: Herceptin*)
- 2) Λαπατινίμπη (*Εμπορική ονομασία: Tykerb*)
- 3) Περτουζουμπάμπη (*Εμπορική ονομασία: Perjeta*)
- 4) Τραστουζουμπάμπη εμτασίνη (*Εμπορική ονομασία: Kadcycla*)

Σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του μαστού θετικό στον HER2, η θεραπεία πρώτης γραμμής θα πρέπει να είναι η τραστουζουμπάμπη, η περτουζουμπάμπη και η ταξάνη. Όσοι σημειώνουν πρόοδο κατά τη διάρκεια ή μετά τη θεραπεία, θα πρέπει να χορηγούνται τραστουζουμπάμπη εμτασίνη [16].



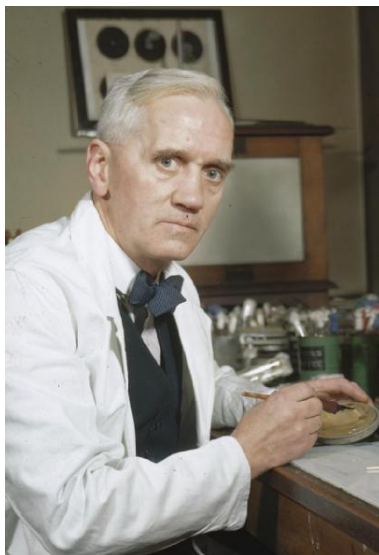
Εικόνα 13: Αναπαράσταση μηχανισμού θεραπείας με αντι-HER2 παράγοντες [9]

1.2. Αντιβιοτικά

1.2.1. Ορισμός

Τα αντιβιοτικά είναι φυσικές ή συνθετικές χημικές ουσίες που διαθέτουν την ικανότητα να επηρεάζουν την επιβίωση των βακτηρίων [22]. Αυτά που σκοτώνουν τους μικροοργανισμούς χαρακτηρίζονται βακτηριοκτόνα, ενώ αυτά που αναστέλλουν την ανάπτυξη τους χαρακτηρίζονται βακτηριοστατικά. Στην πραγματικότητα ο όρος προήλθε από τη λέξη «αντιβίωση» που κυριολεκτικά σημαίνει «κατά της ζωής». Οι αντιβιοτικές ενώσεις χωρίζονται σε αντιβακτηριακές, αντιμυκητιακές και αντικές ανάλογα τον μικροοργανισμό που καταπολεμούν [23].

Η πενικιλίνη ήταν το πρώτο αντιβιοτικό που ανακαλύφθηκε το 1928 από τον Άγγλο βιολόγο Αλεξάντερ Φλέμινγκ (Εικόνα 14). Ο ίδιος τυχαία έλαβε τη βακτηριοκτόνα ουσία από ένα ξεχασμένο δισκίο μικροβιακής καλλιέργειας στο οποίο είχε αναπτυχθεί μούχλα. Βέβαια, οι κλινικές δοκιμές άργησαν να πραγματοποιηθούν και διεξήχθησαν σε άνθρωπο πρώτη φορά το 1940 [23]. Αναμφισβήτητα, η εισαγωγή των αντιβιοτικών στην κλινική χρήση υπήρξε η μεγαλύτερη ιατρική ανακάλυψη του 20^{ου} αιώνα [24].



Εικόνα 14: Ο Αλεξάντερ Φλέμινγκ στο εργαστήριό του [25]

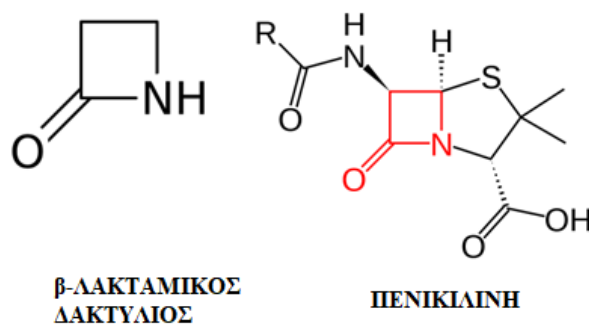
Παρότι τα αντιβιοτικά κατέστησαν δυνατή τη θεραπεία μολυσματικών λοιμώξεων και έπαιξαν σπουδαίο ρόλο στις σύγχρονες ιατρικές επεμβάσεις, παρατηρείται κατάχρηση αυτών των ενώσεων με αποτέλεσμα την εμφάνιση αυξημένης μικροβιακής αντίστασης [24]. Παράλληλα, λόγω της χαμηλής εκλεκτικότητας ως προς την αντιβακτηριακή τους δράση καταπολεμούν τη φυσιολογική και χρήσιμη ανθρώπινη μικροχλωρίδα. Ως εκ τούτου, είναι σκόπιμο να κατανοηθούν οι κατηγορίες των αντιβιοτικών και οι μηχανισμοί με τους οποίους δρουν έτσι ώστε να χορηγούνται βάσει συνολικού οφέλους, λαμβάνοντας υπόψη και τις παρενέργειες [23].

1.2.2. Κατηγορίες αντιβιοτικών

Ο τρόπος με τον οποίο ταξινομούνται τα αντιβιοτικά γίνεται ανάλογα με τη μοριακή δομή και τον τρόπο δράσης τους. Μερικές από τις πιο κοινές κατηγορίες είναι οι εξής:

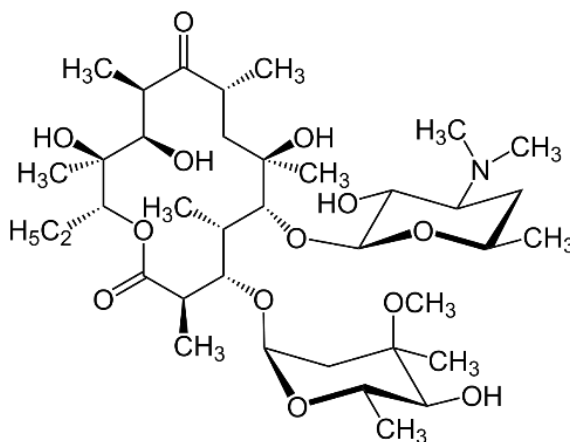
- i) Β-λακτάμες.** Τα αντιβιοτικά αυτής της κατηγορίας περιέχουν ένα β-λακταμικό δακτύλιο (Εικόνα 15). Η δράση τους είναι να παρεμβαίνουν στις πρωτεΐνες που είναι σημαντικές

για τη σύνθεση του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος θανατώνοντας τα βακτήρια στην πορεία ή αναστέλλοντας την ανάπτυξή τους [23].



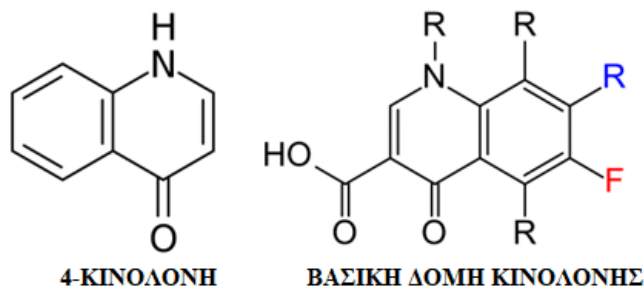
Εικόνα 15: Χημική δομή β-λακταμικού δακτυλίου και πενικιλίνης

ii) Μακρολίδια. Τα μακρολίδια χαρακτηρίζονται από 14-, 15-, ή 16-μελείς δακτυλίους μακροκυκλικής λακτόνης (Εικόνα 16) και είτε σκοτώνουν είτε περιορίζουν τα βακτήρια αναστέλλοντας τη σύνθεση των βακτηριακών πρωτεϊνών [23].



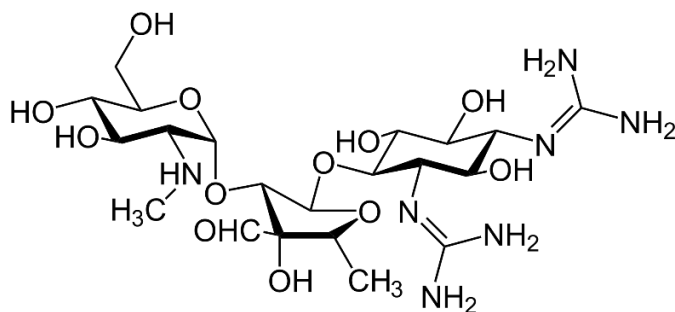
Εικόνα 16: Χημική δομή μακρολιδίου

iii) Κινολόνες. Οι κινολόνες είναι μια οικογένεια αντιβιοτικών που αποτελούνται από μια δικυκλική βασική δομή, η οποία σχετίζεται με την 4-κινολόνη (Εικόνα 17). Αυτή η κατηγορία αναστέλλει τη σύνθεση του βακτηριακού DNA διαταράσσοντας τη βακτηριακή τοποϊσομεράση τύπου II [26].



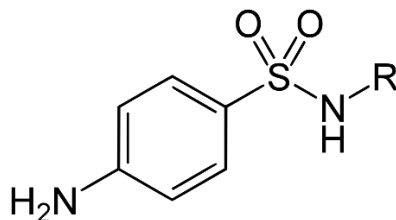
Εικόνα 17: Χημική δομή 4-κινολόνης και βασική δομή κινολόνης (η μπλε ομάδα R είναι συνήθως πιπεραζίνη, ενώ εάν η δομή εμπεριέχει φθόριο (με κόκκινο χρώμα) τότε πρόκειται για μια φθοριοκινολόνη)

iv) Αμινογλυκοζίδες. Το πρώτο αντιβιοτικό που ανακαλύφθηκε από αυτήν την κατηγορία ήταν η Στρεπτομυκίνη (Εικόνα 18). Οι αμινογλυκοζίδες είναι συνήθως ενώσεις αμινοσακχάρων που συνδέονται μεταξύ τους με γλυκοζιτικούς δεσμούς και είναι ικανές να αναστείλουν τη σύνθεση πρωτεϊνών στα βακτήρια όταν δεσμεύονται σε μία από τις ριβοσωμικές υπομονάδες [23].



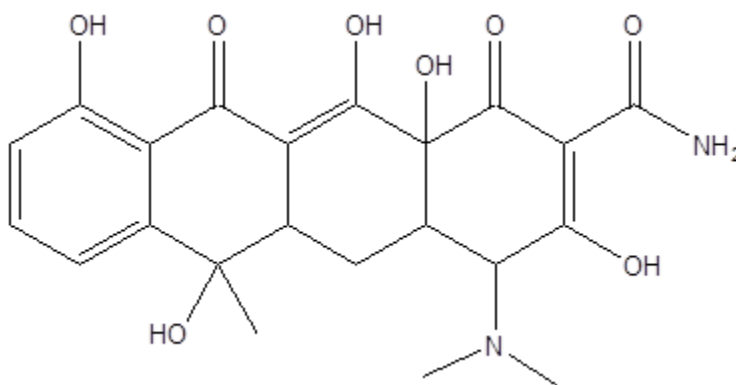
Εικόνα 18: Χημική δομή Στρεπτομυκίνης

v) Σουλφοναμίδες. Οι σουλφοναμίδες αποτελούν μια σημαντική κατηγορία συνθετικών αντιβιοτικών φαρμάκων που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία βακτηριακών λοιμώξεων σε ανθρώπινους και ζωικούς οργανισμούς. Έχουν ευρύ φάσμα δράσης και είναι αποτελεσματικές έναντι των θετικών κατά Gram και ορισμένων αρνητικών κατά Gram βακτηρίων. Πρόκειται για ενώσεις άνθρακα-θείου που περιέχουν την σουλφοναμιδική ομάδα SO_2NH_2 ή SO_2NH (Εικόνα 19) [27].



Εικόνα 19: Χημική δομή σουλφοναμίδης

vi) Τετρακυκλίνες Οι τετρακυκλίνες ανακαλύφθηκαν τη δεκαετία του 1940 με το πρώτο μέλος αυτής της κατηγορίας να είναι η χλωροτετρακυκλίνη. Οι ενώσεις αυτής της κατηγορίας αποτελούνται από τέσσερις (4) δακτυλίους υδρογονάνθρακα (Εικόνα 20) και κατηγοριοποιούνται σε διαφορετικές γενιές ανάλογα με τη μέθοδο σύνθεσης. Αυτές που βιοσυντίθενται ονομάζονται πρώτης γενιάς και περιλαμβάνουν την τετρακυκλίνη, χλωροτετρακυκλίνη, οξυτετρακυκλίνη και δεμεκλοκυκλίνη. Ενώσεις όπως η δοξυκυκλίνη, η μεθακυκλίνη, η μινοκυκλίνη και η ρολιτετρακυκλίνη θεωρούνται δεύτερης γενιάς καθώς είναι παράγωγα ημι-σύνθεσης, ενώ αυτές που λαμβάνονται από ολική σύνθεση όπως η τιγκεκυκλίνη θεωρούνται τρίτης γενιάς. Ο στόχος της αντιβακτηριακής τους δράσης είναι το ριβόσωμα, διαταράσσοντας την προσθήκη αμινοξέων στις πολυπεπτιδικές αλυσίδες κατά την πρωτεϊνοσύνθεση. Περισσότερες πληροφορίες αναφορικά με αυτήν την κατηγορία αντιβιοτικών αναφέρονται σε παρακάτω υποκεφάλαιο [23] (Βλ. Κεφ. 1.2.4).



Εικόνα 20: Χημική δομή τετρακυκλίνης

1.2.3. Μηχανισμοί δράσης αντιβιοτικών

Πέντε (5) είναι οι βασικοί μηχανισμοί δράσης των αντιβιοτικών έναντι των βακτηρίων:

- 1) **Αναστολή της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος.** Τα βακτηριακά κύτταρα περιέχουν ένα προστατευτικό σώμα το οποίο δομείται από πεπτίδια και πολυσακχαρίτες και ονομάζεται πεπτιδογλυκάνη. Η πεπτιδογλυκάνη ή αλλιώς μуреΐνη είναι ένα μόριο που περιβάλλει το κύτταρο. Η δομή της αποτελείται από αλυσίδες πολυσακχαριτών με επαναλαμβανόμενη μονάδα β -1,4-N-ακετυλογλυκοζαμίνη- β -1,4-N-ακετυλομουραμικό οξύ [28] με δύο ένζυμα να είναι υπεύθυνα για τη σύνθεσή της. Φάρμακα όπως η πενικιλίνη είναι ικανά να εμποδίσουν τη διασύνδεση των μονάδων πεπτιδογλυκάνης αναστέλλοντας έτσι το σχηματισμό του πεπτιδικού δεσμού [23].
- 2) **Διαταραχή της κυτταρικής μεμβράνης.** Συγκεκριμένες κατηγορίες αντιβιοτικών προκαλούν βλάβες στις κυτταρικές μεμβράνες των βακτηρίων ανάλογα με τα διαφορετικά λιπίδια που περιέχει η κάθε μικροβιακή ομάδα. Για παράδειγμα, οι πολυμυξίνες προκαλούν ρήξη της κυτταρικής μεμβράνης των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων και προκαλούν κυτταρικό θάνατο αλληλεπιδρώντας με ένα λιποπολυσακχαρίτη της εξωτερικής μεμβράνης [23].
- 3) **Αναστολή της δομής και λειτουργίας των νουκλεϊκών οξέων.** Ορισμένα αντιβιοτικά αναστέλλουν τη σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων εμποδίζοντας κατ'επέκταση τις διαδικασίες της αντιγραφής και της μεταγραφής. Η αντιγραφή του DNA είναι μια διαδικασία η οποία καταλύεται από το ένζυμο ελικάση και περιλαμβάνει το ξετύλιγμα της διπλής έλικας του DNA. Η κατηγορία των κινολονών είναι υπεύθυνη για την αναστολή αυτού του ενζύμου με αποτέλεσμα η διαδικασία της αντιγραφής και επιδιόρθωσης DNA να διακόπτεται. Παράλληλα, αυτά τα αντιβιοτικά είναι δυνατό να στοχεύσουν και τα

ένζυμα τοποϊσομεράση II και τοποϊσομεράση IV των βακτηρίων. Η αναστολή αυτών των δύο ενζύμων επηρεάζει την RNA πολυμεράση η οποία εμποδίζει με τη σειρά της τη σύνθεση του RNA [23].

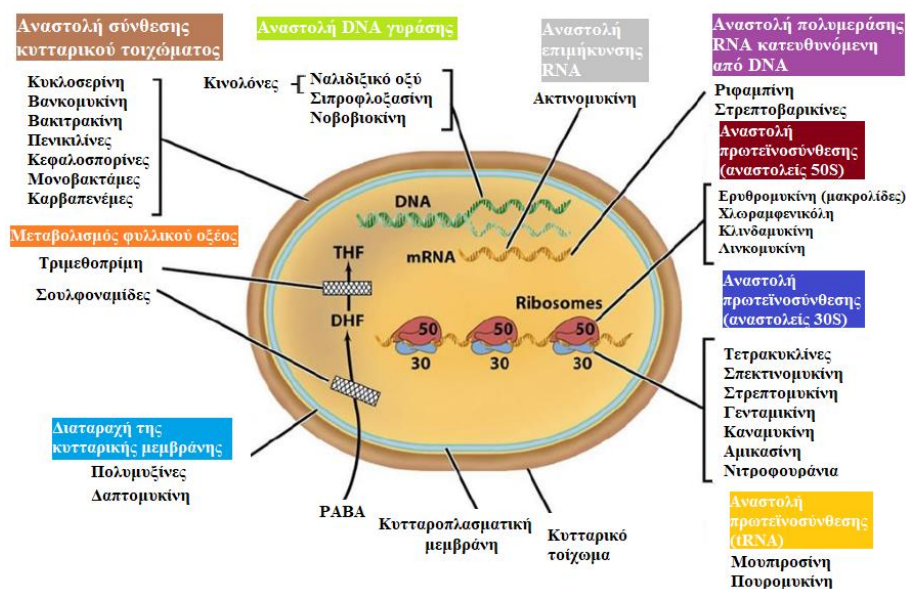
- 4) Αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης.** Οι πρωτεΐνες είναι σημαντικές για τις μεταβολικές διεργασίες αλλά και για τη ζωή όλων των ζωντανών οργανισμών γενικότερα. Ό,τι διαταράσσει τη διαδικασία της σύνθεσής τους σε ένα βακτήριο είναι σε θέση να αναστείλει την ανάπτυξη του κυττάρου ή και να οδηγήσει στη θανάτωσή του [23]. Κατά το μηχανισμό της μετάφρασης, η οποία πραγματοποιείται στο ριβόσωμα στο χώρο του κυτταροπλάσματος, έχουμε μια αλληλουχία κωδικονίων στο mRNA μέσω των οποίων συντίθεται μια πολυπεπτιδική αλυσίδα. Το ριβόσωμα, ένα μεγάλο ριβο-νουκλεϊκό σύμπλοκο αποτελείται από δύο υπομονάδες σε όλα τα είδη. Στα προκαρυωτικά (βακτήρια) οι υπομονάδες είναι οι 30S και 50S (μονάδες Svedberg) και μαζί αποτελούν το ριβόσωμα 70S [29].

Τα αντιβιοτικά που αναστέλλουν την πρωτεϊνοσύνθεση μπορούν να χωριστούν σε δύο (2) υποκατηγορίες: **α)** αναστολείς 50S και **β)** αναστολείς 30S. Αντιβιοτικά όπως η ερυθρομυκίνη (κατηγορία μακρολιδίων) έχει αποδειχθεί ότι συγκαταλέγονται στους αναστολείς του ριβοσώματος 50S. Αυτές οι ενώσεις δρουν αναστέλλοντας είτε τη φάση έναρξης είτε τη φάση επιμήκυνσης της πρωτεϊνοσύνθεσης όπου το εισερχόμενο αμινοξύ συνδέεται με τη σχηματιζόμενη πεπτιδική αλυσίδα. Οι αναστολείς ριβοσώματος 30S λειτουργούν εμποδίζοντας τη σύνδεση των αμινοακυλο-tRNA στο ριβόσωμα. Σε αυτήν την ομάδα περιλαμβάνονται οι τετρακυκλίνες, οι στρεπτομυκίνες κ.λ.π [23].

- 5) Παρεμπόδιση βασικών μεταβολικών οδών.** Αντιβιοτικά όπως οι σουλφοναμίδες έχει αποδειχθεί ότι μιμούνται ένα υπόστρωμα, απαραίτητο για τον κυτταρικό μεταβολισμό των

βακτηρίων. Αυτό το γεγονός αναγκάζει τα βακτήρια να προσκολληθούν στο αντιβιοτικό και όχι στο κανονικό υπόστρωμα. Αναλυτικότερα, οι σουλφοναμίδες δρουν όπως το τετραϋδροφυλλικό οξύ που απαιτείται για τη σύνθεση του φυλλικού οξέος, ένα οξύ υψηλής σημασίας για το μεταβολισμό των νουκλεϊκών οξέων και αμινοξέων. Έτσι, οι σουλφοναμίδες αναστέλλουν τη σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων και αμινοξέων, μιας και μιμούνται τα υποστρώματα που χρειάζονται για την παραγωγή του φυλλικού οξέος [23].

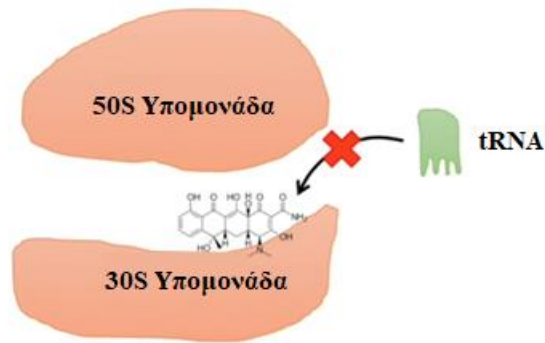
Παρακάτω παρουσιάζονται συνοπτικά οι μηχανισμοί δράσης των αντιβιοτικών στις διάφορες περιοχές του βακτηρίου (Εικόνα 21)



Εικόνα 21: Οι στόχοι των αντιβιοτικών σε ένα βακτηριακό κύτταρο [23]

1.2.4. Ιδιότητες και χρήσεις τετρακυκλινών

Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, οι τετρακυκλίνες είναι μια κατηγορία αντιβιοτικών που δεσμεύονται εκλεκτικά στη ριβοσωμική υπομονάδα 30S και σταματούν τη μετάφραση κατά τη φάση της επιμήκυνσης, παρεμβάλλοντας τη σύνδεση του αμινοακυλο-tRNA (Εικόνα 22) [30].



Εικόνα 22: Αναπαράσταση του μηχανισμού δράσης των τετρακυκλινών. Η πρωτεϊνوسύνθεση παρεμποδίζεται όταν οι τετρακυκλίνες δεσμεύονται στη ριβοσωμική υπομονάδα 30S.

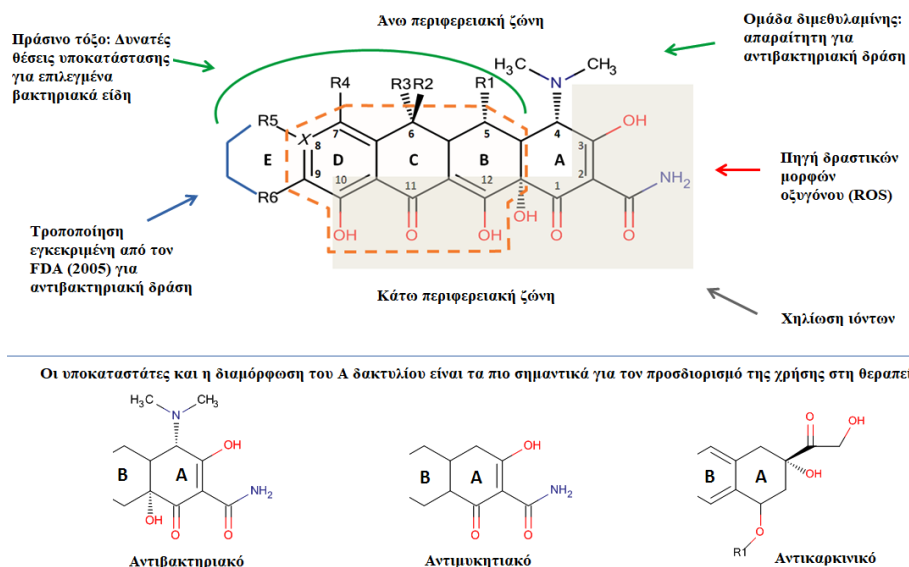
Οι τετρακυκλίνες διαθέτουν ένα ευρύ φάσμα αντιβακτηριακής δράσης, με τις ίδιες να είναι αποτελεσματικές τόσο σε θετικά όσο και σε αρνητικά κατά Gram βακτήρια [31]. Η κύρια διαφορά αυτών των δύο βακτηρίων έγκειται στο διαφορετικό ποσοστό πεπτιδογλυκάνης που περιέχεται στο κυτταρικό τους τοίχωμα. Τα θετικά κατά Gram βακτήρια διαθέτουν παχύ κυτταρικό τοίχωμα καθώς αποτελούνται από πολλαπλά στρώματα πεπτιδογλυκάνης, ενώ τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια έχουν λεπτότερο κυτταρικό τοίχωμα το οποίο αποτελείται από ένα μόνο στρώμα πεπτιδογλυκάνης [28]. Επιπρόσθετα, θεωρούνται βακτηριοστατικά αντιβιοτικά, ωστόσο έχει αποδειχθεί *in vitro* ότι διαθέτουν και βακτηριοκτόνα δράση [30].

Οι τετρακυκλίνες εξακολουθούν να εφαρμόζονται ευρέως σε πολλές χώρες για την πρόληψη και θεραπεία ασθενειών σε ζώα όπως βοοειδή, χοίρους, πρόβατα και πουλερικά. Πιο αναλυτικά, αυτά τα αντιβιοτικά φάρμακα χρησιμοποιούνται στην κτηνιατρική για τη θεραπεία γαστρεντερικών και δερματικών βακτηριακών λοιμώξεων, μολυσματικών λοιμώξεων του ουρογεννητικού συστήματος, συστηματικών λοιμώξεων και σήψης. Στην ανθρώπινη ιατρική τα αντιβιοτικά τετρακυκλίνης έχουν χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία διαφορετικών τύπων λοιμώξεων, ιδιαίτερα λοιμώξεων του αναπνευστικού συστήματος (πνευμονία). Επιπλέον, έχει προταθεί ότι θα μπορούσαν να είναι ωφέλιμα και αποτελεσματικά για τη θεραπεία λοιμώξεων από

παρασιτικούς οργανισμούς (π.χ. πρωτόζωα) [32]. Η επιτυχία των τετρακυκλινών οφείλεται στις θεραπευτικές της χρήσεις, μιας και παρουσιάζει σημαντικές αντιβακτηριακές και μη-αντιβακτηριακές ιδιότητες [32] [33] [34]. Μερικά από τα μη-αντιβακτηριακά αποτελέσματα είναι η αντιφλεγμονώδης [32] [33] [34], αντιαγγειογενετική και αντιαποπτωτική (αντικαρκινική) [33] [34] δράση, η στόχευση της αρθρίτιδας [33] [34] και η επούλωση δερματολογικών παθήσεων (ακμή) [32] [33], ενώ παράλληλα μελέτες υποστηρίζουν ότι οι τετρακυκλίνες δρουν κατά νευροεκφυλιστικών ασθενειών όπως η νόσος Huntington [33] [34] και κατά της οστεοπόρωσης [33].

Όλα αυτά τα βιολογικά χαρακτηριστικά οφείλονται στη χημική δομή της τετρακυκλίνης και των παραγώγων της. Οι τετρακυκλίνες με αντιβιοτική δράση έχουν μία ομάδα διμεθυλαμίνης στον C(4) άνθρακα του A δακτυλίου και η αφαίρεσή της είναι δυνατό να οδηγήσει σε μείωση της αντιβιοτικής αλλά ενίσχυση της μη αντιβιοτικής της δράσης (Εικόνα 23). Η χρήση αυτής της τεχνικής λειτούργησε ως βάση για την ανάπτυξη αρκετών χημικά τροποποιημένων τετρακυκλινών. Η δομή δακτυλίου που φέρει αυτή η κατηγορία αντιβιοτικών περιβάλλεται από άνω και κάτω περιφερειακές ζώνες, οι οποίες περιέχουν διάφορες χημικές λειτουργικές ομάδες και υποκαταστάτες. Η συνθετική τροποποίηση της κάτω περιφερειακής ζώνης έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση τόσο της αντιβιοτικής όσο και της μη-αντιβιοτικής δράσης, ενώ η τροποποίηση της άνω περιφερειακής ζώνης, ιδιαίτερα στους άνθρακες C(7) και C(9) του D δακτυλίου, μπορεί να ενισχύσει τους βιολογικούς στόχους [33]. Πιο συγκεκριμένα, οι ομάδες R1, R2 και R3 μπορούν να τροποποιηθούν για να αποδώσουν μεγαλύτερη εκλεκτικότητα στην αντιμυκητιακή δράση, αλλά όχι στην αντιβακτηριακή [34]. Μάλιστα, τέτοιες τροποποιήσεις έχουν επιτευχθεί με τις ημι-συνθετικές ενώσεις τετρακυκλίνης, όπως η μινοκυκλίνη και η δοξυκυκλίνη [33].

Άλλη μία σημαντική ιδιότητα των τετρακυκλινών είναι η ικανότητα τους να σχηματίζουν λιποδιαλυτά σύμπλοκα με μεταλλικά κατιόντα, η μεταφορά των οποίων γίνεται μέσω βιολογικών μεμβρανών. Οι τετρακυκλίνες δεσμεύουν δισθενή μεταλλικά ιόντα, κυρίως κατά μήκος της κάτω περιφερειακής ζώνης και κυκλοφορούν στο πλάσμα του αίματος ως χηλικές ενώσεις Ca^{2+} και Mg^{2+} . Ο ρόλος των τετρακυκλινών ως φορείς ιόντων ασβεστίου έχει σημαντικές βιολογικές επιπτώσεις. Για παράδειγμα, μετά την ενδοκυτταρική ενσωμάτωση, το ασβέστιο δρα ως δευτερεύων αγγειοφόρος και μπορεί να επηρεάσει μονοπάτια, όπως εκκριτικές διεργασίες, μεταβολικές αντιδράσεις και την ενεργοποίηση ή αναστολή υποδοχέων [33].



Εικόνα 23: Δομική σχέση δράσης διαφόρων παραγόντων της οικογένειας τετρακυκλινών [34]

Προτού προκύψουν αυτές οι τροποποιήσεις ήταν γνωστό ότι οι τετρακυκλίνες δρούσαν βακτηριοστατικά, δηλαδή ως αναστολείς της πρωτεϊνσύνθεσης έναντι των βακτηρίων. Ωστόσο, διαπιστώθηκε ότι οι περισσότερες λιπόφιλες τετρακυκλίνες είναι βακτηριοκτόνες με μηχανισμό που βασίζεται σε βλάβες μεμβρανών. Πλέον, η ιατρική αποδεικνύει ότι οι τετρακυκλίνες

σχετίζονται χημικά και βιολογικά με πολλαπλούς μηχανισμούς δράσης και είναι ικανές να αλληλεπιδρούν με πολλαπλούς στόχους, είτε με ριβοσωμικές είτε με κυτταρικές μεμβράνες [34].

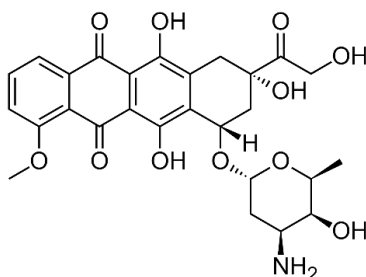
1.2.5. Αντιβιοτικά με αντικαρκινική δράση

Οι ασθενείς που υποβάλλονται σε θεραπείες κατά του καρκίνου είναι, συνήθως, ανοσοκατασταλμένοι και συνεπώς, πολύ ευάλωτοι στις λοιμώξεις. Για αυτόν το λόγο, τους χορηγούνται συχνά, πέρα από τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα, κοκτέιλ πολλαπλών φαρμάκων με αντιβιοτικούς παράγοντες για την πρόληψη ή τη θεραπεία διαφόρων ασθενειών. Αποτελέσματα έχουν δείξει ότι οι καρκινοπαθείς που λαμβάνουν τόσο αντιβιοτικά όσο και χημειοθεραπευτικά φάρμακα για τη θεραπεία του καρκίνου εμφανίζουν υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης σε σύγκριση με όσους λαμβάνουν μόνο χημειοθεραπεία. Ως εκ τούτου, οι έρευνες έχουν επικεντρωθεί στην εύρεση νέων φαρμάκων που θα ενισχύουν την αποτελεσματικότητα των υπαρχόντων χημειοθεραπευτικών παραγόντων [35].

Σύμφωνα με μελέτες, τα αντιβιοτικά μπορούν να προάγουν την απόπτωση του καρκίνου, να αναστείλουν την ανάπτυξη και να αποτρέψουν τη μετάστασή του. Τα αντικαρκινικά αντιβιοτικά ταξινομούνται σε κατηγορίες και περιλαμβάνουν τις ανθρακυκλίνες, τη μπλεομυκίνη, ακτινομυκίνη, μιτομυκίνη, κ.ά, με τις αντικαρκινικές τους δράσεις να είναι περίπλοκες αλλά αποτελεσματικές. Η κατηγορία των ανθρακυκλινών περιλαμβάνει κύριως τη δοξορουβικίνη (doxorubicin), η οποία διαθέτει ένα ευρύ κλινικό αντικαρκινικό φάσμα [36]. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι οι ανθρακυκλίνες σχετίζονται δομικά με τις τετρακυκλίνες και είναι σκόπιμο να ταξινομηθούν και οι δύο στην ίδια κατηγορία λόγω των χημικών ομοιοτήτων τους, των φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους και τη χρήση τους ως αντικαρκινικά φάρμακα [34]. Η

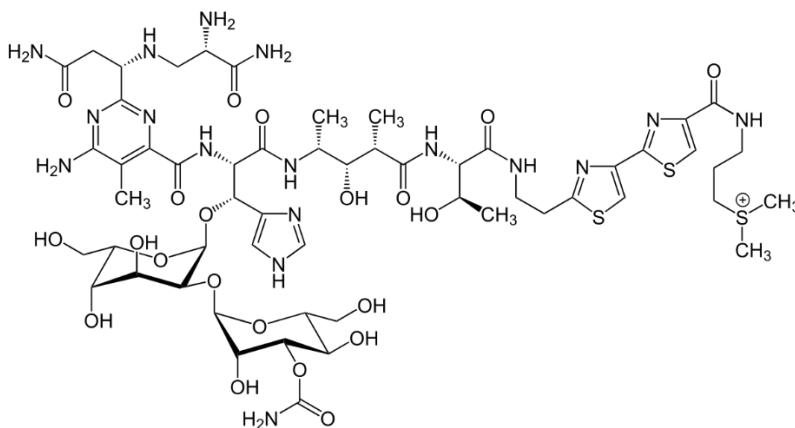
δοξορουβικίνη είναι αποτελεσματική κατά συμπαγών καρκίνων, όπως το κακοήθες λέμφωμα, ο καρκίνος του μαστού, του πνεύμονα, του ήπατος, του στομάχου και του σαρκόματος μαλακών μορίων με πιθανή επίδραση στην οξεία λευχαιμία [36].

Η **δοξορουβικίνη** (Εικόνα 24) δρα ως παρεμβολέας, καθώς παρεμβάλλεται ηλεκτροστατικά μεταξύ των ζευγών βάσεων του DNA και παράγει δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS). Εκτός από την παρεμβολή, μπορεί επίσης να προκαλέσει θραύση του διπλού κλώνου του DNA καταλήγοντας σε βλάβη του DNA και τελικά σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο [36].



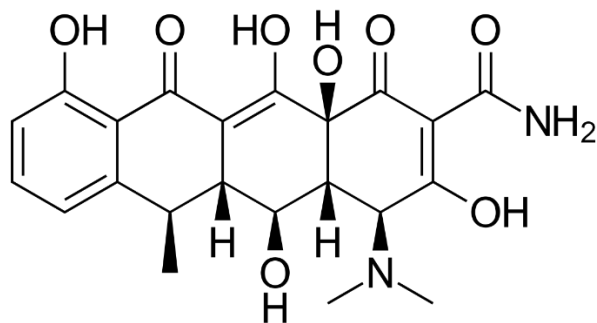
Εικόνα 24: Χημική δομή δοξορουβικίνης

Η **μπλεομυκίνη** (Εικόνα 25) είναι ένα αντιβιοτικό που μπορεί να ενσωματωθεί στο DNA με σύμπλοκα σιδήρου και χρησιμοποιείται αποτελεσματικά ως αντικαρκινικό φάρμακο για την καταπολέμηση καρκίνων των γεννητικών κυττάρων και λεμφωμάτων [36].



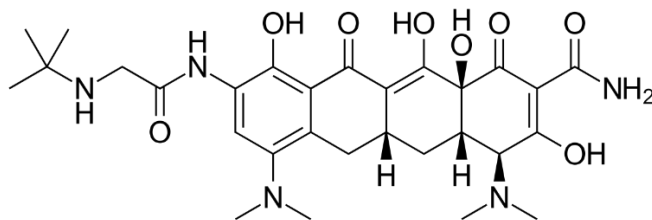
Εικόνα 25: Χημική δομή μπλεομυκίνης

Η **δοξουκυκλίνη** (Εικόνα 26) χρησιμοποιείται για τη θεραπεία μελανώματος, διαφόρων τύπων λεμφώματος και του καρκίνου του προστάτη, μεταξύ άλλων. Είναι ικανή να «μειορρυθμίζει» (downregulate) τον πολλαπλασιασμό και να επάγει την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων του τραχήλου της μήτρας, να επηρεάζει την κατανάλωση οξυγόνου και τη γλυκόλυση, και να ρυθμίζει τα επίπεδα ATP *in vivo* και *in vitro*. Επιπλέον, *in vivo* μελέτες έδειξαν ότι η δοξουκυκλίνη αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του μαστού [35].



Εικόνα 26: Χημική δομή δοξουκυκλίνης

Η **τιγκεκυκλίνη** (Εικόνα 27) μπορεί να δράσει ως αντικαρκινικό φάρμακο αναστέλλοντας διαφορετικούς τύπους καρκίνου όπως μυελογενής λεχαιμία, γλοίωμα, καρκίνο του πνεύμονα και αρνητικό καρκίνο του μαστού. Αυτό το επιτυγχάνει μέσω διαφορετικών μηχανισμών δράσης συμπεριλαμβανομένης της αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της αγγειογένεσης, του οξειδωτικού στρες, της απόπτωσης, κ.ά [35].

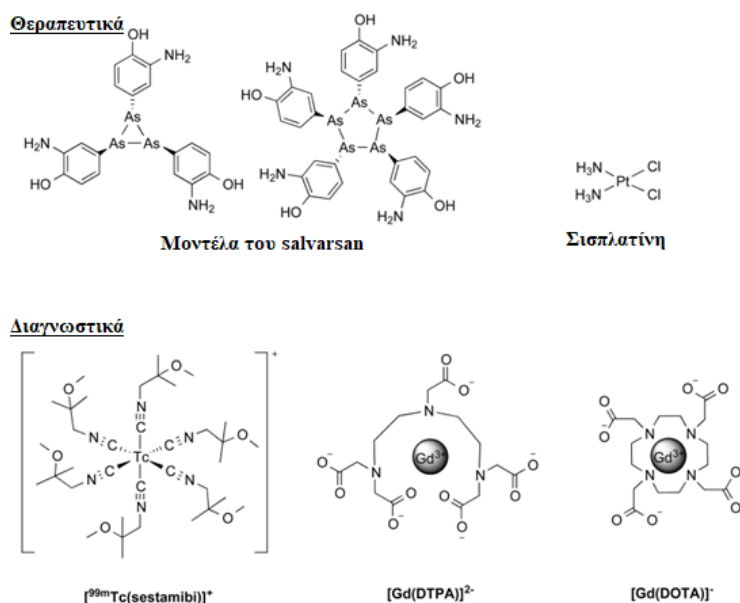


Εικόνα 27: Χημική δομή τιγκεκυκλίνης

1.3. Μεταλλοφάρμακα

1.3.1. Ορισμός

Τα μεταλλοφάρμακα είναι φαρμακευτικές ενώσεις που περιέχουν ένα μέταλλο και η εισαγωγή τους στο ανθρώπινο βιολογικό σύστημα έχει θεραπευτικούς και διαγνωστικούς σκοπούς [37]. Τα μέταλλα είναι σημαντικά για τον άνθρωπο, καθώς διαθέτουν ζωτικούς ρόλους σε θρεπτικά συστατικά και φάρμακα, ενώ παρέχουν χημικές λειτουργίες που δεν είναι προσιτές από καθαρά οργανικές ενώσεις. Τουλάχιστον 10 από αυτά είναι απαραίτητα για την ανθρώπινη ζωή και περίπου άλλα 46 μη απαραίτητα χρησιμοποιούνται ήδη σε φαρμακευτικές θεραπείες και ως διαγνωστικοί δείκτες (Εικόνα 28). Συχνά, τα μεταλλοφάρμακα δρουν ως προ-φάρμακα και υφίστανται ενεργοποίηση *en route* (καθ'οδόν) προς ή στο στόχο. Η ενεργοποίηση μπορεί να προκύψει από την πρόσδεση ή μετατόπιση κάποιου υποκαταστάτη, από το άνοιγμα χηλικού δακτυλίου είτε από την αλλαγή της οξειδωτικής κατάστασης του μετάλλου ή των υποκαταστατών. Εναλλακτικά, εξωτερικά ερεθίσματα όπως φως, ήχος, θερμότητα ή/και ακτινοβολία είναι ικανά να ενεργοποιήσουν εκλεκτικά το μεταλλοφάρμακο. [38].



Εικόνα 28: Παραδείγματα θεραπευτικών και διαγνωστικών μεταλλοφαρμάκων [37]

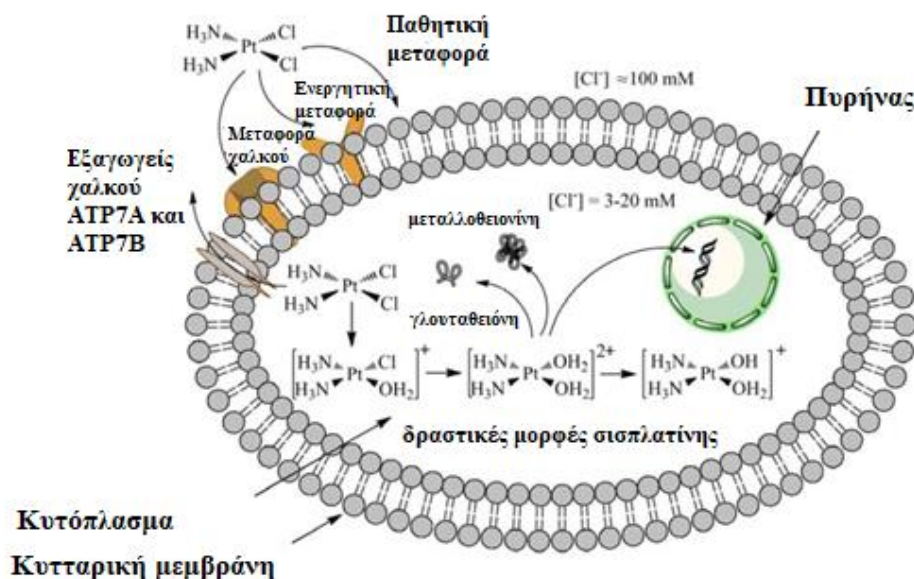
Το Salvarsan (3-άμινο-4-υδροξυφαινυλ-αρσενικό (III)) υπήρξε ένα από τα πρώτα θεραπευτικά μεταλλοφάρμακα. Πρόκειται για ένα αντιμικροβιακό φάρμακο με βάση το αρσενικό που αναπτύχθηκε το 1912 από τον Paul Ehrlich. Αν και οι δομές μοντέλων του Salvarsan αποσαφηνίστηκαν πρόσφατα, η ακριβής σύνθεσή του είναι ακόμα άγνωστη. Ωστόσο, χρησιμοποιήθηκε ευρέως στους ανθρώπους και καθιερώθηκε ως το φάρμακο για τη θεραπεία της σύφιλης, έως ότου αντικαταστάθηκε από την πενικιλίνη. Βέβαια, παρότι το Salvarsan του Ehrlich χαρακτηρίζεται ως η γέννηση της σύγχρονης χημειοθεραπείας και συχνά αναφέρεται ως η αρχή της σύγχρονης έρευνας και ανάπτυξης των μεταλλοφαρμάκων, το αστέρι του πεδίου είναι το αντικαρκινικό φάρμακο σισπλατίνη (cisplatin) [37].

1.3.2. Αντικαρκινικά μεταλλοφάρμακα

Ο καθηγητής Rosenberg είναι υπεύθυνος για την τυχαία ανακάλυψη της αντιπολλαπλασιαστικής δράσης της σισπλατίνης (cis-(NH₃)₂PtCl₂). Το 1965 σε μια από τις έρευνές του μελετούσε την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου στο βακτήριο *Escherichia coli* όπου και παρατήρησε ότι η διαδικασία της κυτταρικής διαίρεσης αναστέλλεται από την παραγωγή cis-διαμινοδιχλωροπλατίνης (II) από τα ηλεκτρόδια πλατίνης. Επιπλέον, απέδειξε ότι η σισπλατίνη ανέστειλε την ανάπτυξη συμπαγούς όγκου σε ποντίκια με τα αποτελέσματα να εγκρίνονται από τον Αμερικανικό Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA), και το ίδιο το φάρμακο να εισέρχεται στην κλινική χρήση το 1978. Με τη χρήση της έχουν θεραπευτεί κακοήθειες του επιθηλίου και καρκίνοι των όρχεων. Χρησιμοποιείται ως κύριο συστατικό για τη θεραπεία του καρκίνου των ωοθηκών και της ουροδόχου κύστης, ενώ επιλέγεται ως χημειοθεραπευτικό πρώτης γραμμής κατά των καρκίνων του πνεύμονα, του οισοφάγου, του στομάχου, του παχέος εντέρου,

του τραχήλου της μήτρας και της μήτρας. Όλα αυτά έχουν ως αποτέλεσμα η σισπλατίνη να αποτελεί, δικαίως, ένα ορόσημο στην ιστορία των αντικαρκινικών φαρμάκων με τις υψηλότερες πωλήσεις στον κόσμο [39].

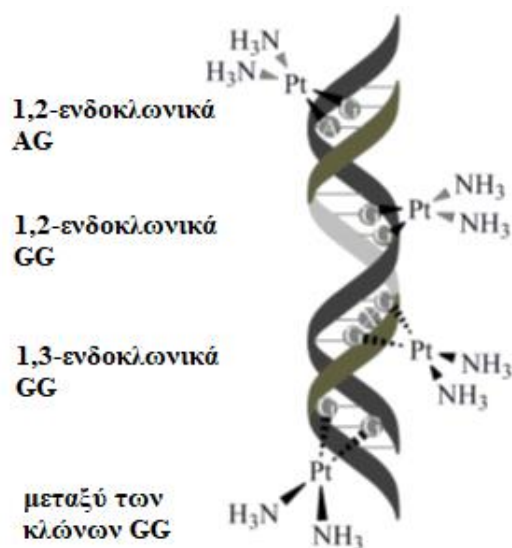
Μετά την ενδοφλέβια χορήγηση, η σισπλατίνη φθάνει στην κυκλοφορία του αίματος όπου η υψηλή συγκέντρωση ιόντων χλωρίου Cl^- (100mM) αντισταθμίζει οποιαδήποτε ανταλλαγή ιόντος προκύπτει με τους ευκίνητους υποκαταστάτες χλωρίου. Η σισπλατίνη εισέρχεται σχεδόν σε όλους τους τύπους κυττάρων είτε με παθητική είτε με ενεργητική μεταφορά μέσω υποδοχέων. Ενδοκυττάρια, όπου επικρατούν χαμηλές συγκεντρώσεις χλωρίου πραγματοποιείται η υδρόλυση του φαρμάκου και σχηματίζονται διάφορα δραστικά παράγωγα [39] (Εικόνα 29).



Εικόνα 29: *In vivo* μηχανισμός δράσης της σισπλατίνης [39]

Ο λευκόχρυσος (Pt^{2+}) συνδέεται ομοιοπολικά με το DNA, και πιο συγκεκριμένα με το άζωτο (N) είτε της γουανίνης (G), είτε της αδενίνης (A) σε αλληλουχίες GG ή AG σχηματίζοντας συνδέσεις μεταξύ των κλώνων και διασυνδέσεις 1,2 ή 1,3 εντός της αλυσίδας (Εικόνα 30). Τέτοια σύμπλοκα σισπλατίνης-DNA μαζί με τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται ως απόκριση των

κυττάρων στη σισπλατίνη, οδηγούν σε διακοπή αντιγραφής, αναστολή μεταγραφής, επιδιόρθωση DNA και απόπτωση [37].



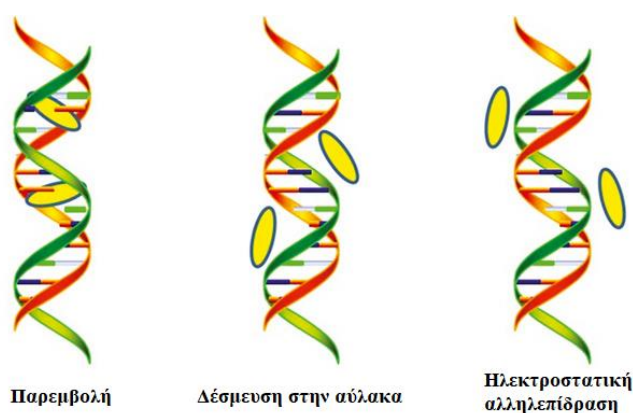
Εικόνα 30: Σχηματιζόμενα σύμπλοκα της σισπλατίνης με τη δίκλωνη αλυσίδα του DNA [39].

Σε αυτό το σημείο αξίζει να αναφερθεί ότι υπάρχουν δύο τρόποι δέσμευσης των φαρμάκων με το DNA: **α)** ομοιοπολικός και **β)** μη ομοιοπολικός [40].

α) Τα ομοιοπολικά προϊόντα μπορούν να σχηματιστούν μέσω αλκυλίωσης ή με συνδέσεις μεταξύ των βάσεων των κλώνων ή εντός της ίδια αλυσίδας. Το κύριο χαρακτηριστικό της ομοιοπολικής αλληλεπίδρασης είναι η μη-αναστρεψιμότητα, η οποία προκαλεί αναστολή των διεργασιών του DNA με επακόλουθο κυτταρικό θάνατο. Επιπλέον χαρακτηριστικά είναι η υψηλής ισχύς σύνδεση των ομοιοπολικών προϊόντων που μπορούν να προκαλέσουν παραμόρφωση στο DNA, και με τη σειρά τους να επηρεάσουν τις διεργασίες της αντιγραφής και μεταγραφής [40].

β) Οι μη ομοιοπολικοί παράγοντες αλληλεπίδρασης του DNA, οι παρεμβολείς DNA και οι παράγοντες που συνδέονται στις αύλακες του DNA θεωρούνται λιγότερο κυτταροτοξικοί σε σύγκριση με τα ομοιοπολικά προϊόντα. Η μη ομοιοπολική αλληλεπίδραση είναι αναστρέψιμη και

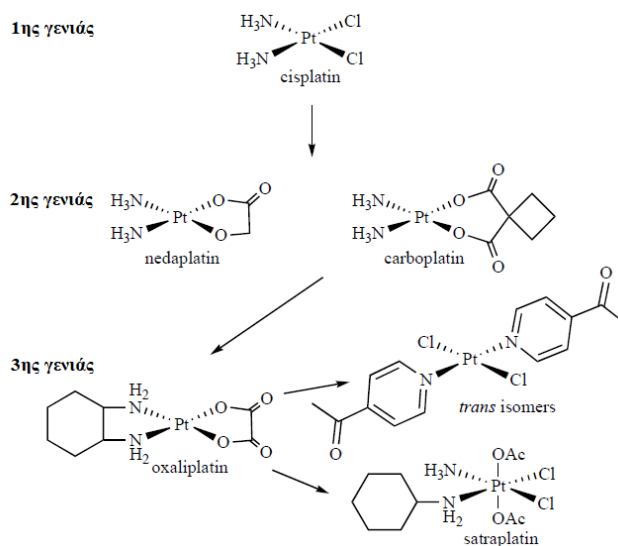
προτιμάται έναντι της ομοιοπολικής εφόσον λαμβάνεται υπόψη ο μεταβολισμός του φαρμάκου και οι πιθανές τοξικές παρενέργειες. Οι μη ομοιοπολικοί παράγοντες αλληλεπίδρασης του DNA μπορούν να αλλάξουν τη διαμόρφωση και την τάση στρέψης του DNA, να διακόψουν αλληλεπιδράσεις DNA-πρωτεΐνης και ενδεχομένως να σχηματίσουν θραύσματα του κλώνου του DNA. Όλα αυτά είναι δυνατό να προκαλέσουν επιπτώσεις στη γονιδιακή έκφραση. Επιπλέον, αυτό το είδος αλληλεπίδρασης ταξινομείται περαιτέρω σε τρεις τύπους (Εικόνα 31): **i)** παρεμβολή **ii)** δέσμευση στην αύλακα και **iii)** εξωτερική ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση [40].



Εικόνα 31: Μη ομοιοπολικοί τρόποι δέσμευσης φαρμάκου-DNA [41]

Ωστόσο, η σισπλατίνη παρουσιάζει περιορισμένη χρήση λόγω κακής υδατοδιαλυτότητας, για αυτό χορηγείται ενδοφλεβίως. Παράλληλα, εμφανίζει μια ποικιλία παρενεργειών συμπεριλαμβανομένου τη νευροτοξικότητα, τη νεφροτοξικότητα, την εμετογένεση κ.λ.π. Επιπλέον, η φυσική αλλά και σταδιακά αποκτούμενη αντίσταση των καρκινικών κυττάρων στη σισπλατίνη, υπονομεύει σημαντικά τη λειτουργικότητά της. Ως εκ τούτου, προκειμένου να ξεπεραστούν αυτά τα μειονεκτήματα η έρευνα στράφηκε στη σύνθεση φαρμάκων δεύτερης και τρίτης γενιάς με βάση το λευκόχρυσο και κατ'επέκταση τη σισπλατίνη. Έτσι, το πρώτο στάδιο παραλλαγής προήλθε από την αντικατάσταση των χλωριούχων υποκαταστατών από άλλους ανιονικούς υποκαταστάτες και σχηματίστηκαν η καρβοπλατίνη (carboplatin) και η νενταπλατίνη

(nedaplatin). Το δεύτερο στάδιο παραλλαγής περιλάμβανε την αντικατάσταση της αμινομάδας (NH_3) από διαφορετικούς υποκαταστάτες αμίνης π.χ. οξαλιπλατίνη (oxaliplatin) κ.ά (Εικόνα 32) [39].



Εικόνα 32: Ιστορία ανάπτυξης των φαρμάκων πλατίνας [39]

1.3.3. Εφαρμογές μεταλλοφαρμάκων

Τα διαγνωστικά μεταλλοφάρμακα (ραδιοφάρμακα) διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στη θεραπεία και διάγνωση ασθενειών, όπως ο καρκίνος, οι λοιμώξεις, οι καρδιολογικές και νευρολογικές διαταραχές κ.λ.π. Η ανάπτυξη συσκευών απεικόνισης με αυξημένη ευαισθησία και βελτιωμένη ανάλυση, καθώς και η δημιουργία νέων ραδιοφαρμάκων έχουν συνδράμει σημαντικά στην ποιότητα απεικόνισης των ιατρικών σαρώσεων τα τελευταία 50 χρόνια. Επιπλέον, χάρη σε αυτήν εξέλιξη είναι δυνατή η διαφοροποίηση μεταξύ υγιούς και καρκινογόνου ιστού προτού ληφθεί ένα πραγματικό δείγμα ιστού [37].

Για την απεικόνιση διαφορετικών ιατρικών παθήσεων, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μια ποικιλία διαφορετικών ραδιοφαρμάκων που στοχεύουν ένα συγκεκριμένο όργανο ή ιστό. Ο

Πίνακας 1 παρουσιάζει μερικά από αυτά, τα οποία είναι εγκεκριμένα από τον Αμερικανικό Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA). Κυρίαρχο ισότοπο είναι το τεχνήτιο-99m (^{99m}Tc) με εναλλακτική λύση το γάλλιο με ισότοπα ^{67}Ga για SPECT και ^{69}Ga για PET απεικονίσεις [37].

Πίνακας 1: Ορισμένα διαγνωστικά μεταλλοραδιοφαρμακευτικά προϊόντα [37]

Ραδιοϊσότοπο	Ακτινοβολία	Ενεργό συστατικό	Διαγνωστική απεικόνιση
^{99m}Tc	γ	Tc-99m medronate	Οστό
^{99m}Tc	γ	Tc-99m mertiatide	Νεφρό
^{99m}Tc	γ	Tc-99m oxidronate	Οστό
^{99m}Tc	γ	Tc-99m tetrofosmin	Μυοκάρδιο
^{67}Ga	γ	Ga-67 citrate	Νόσος Hodgkin, λέμφωμα, βρογχογενές καρκίνωμα

Τα μεταλλοφάρμακα έχουν βρει περαιτέρω εφαρμογές ως αντιφλεγμονώδη, αντιμικροβιακά, αντιδιαβητικά κ.ά. Πιο αναλυτικά [37]:

- Το αρσενικό (As), αντιμόνιο (Sb) και βισμούθιο (Bi) έχουν χρησιμοποιηθεί κατά των βακτηρίων και παρασίτων. Φάρμακα του αντιμονίου έχουν χορηγηθεί για τη θεραπεία της λεισμανίασης, μιας τροπικής νόσου που μεταδόθηκε στις αρχές του 20^{ου} αιώνα. Το βισμούθιο είναι μη τοξικό και φάρμακά του συνδέονται με γαστρεντερικές διαταραχές. Επίσης, έχει συνταγογραφηθεί για την καταπολέμηση του ελικοβακτηρίου του πυλωρού
- Ο άργυρος (Ag) έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα για τη θεραπεία τραυμάτων και λοιμώξεων. Τοπικές αλοιφές όπως η αργυρούχος σουλφοδιαζίνη εφαρμόζεται ως κρέμα ή υδατικό διάλυμα για την πρόληψη και θεραπεία λοιμώξεων που προκαλούνται από εγκαύματα δεύτερου και τρίτου βαθμού

- Οι ενώσεις του χρυσού (Au) έχουν εμφανίσει θεραπευτική δράση κατά της χρόνιας ρευματοειδούς αρθρίτιδας και της πνευμονικής φυματίωσης
- Τα άλατα και σύμπλοκα του βαναδίου (V) έχουν παρουσιάσει αντιδιαβητικά αποτελέσματα και χαρακτηριστικά αυξημένης ινσουλίνης. Αν και δεν είναι σε θέση να υποκαταστήσουν την έλλειψη ινσουλίνης στον διαβήτη τύπου I, μπορούν να διαχειριστούν τα επίπεδα σακχάρου σε ασθενείς με διαβήτη τύπου II
- Τα μεταλλοφάρμακα χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία καρδιαγγειακών παθήσεων και ρυθμίζουν το μονοξείδιο του αζώτου (NO) και το οξυγόνο (O₂) στα αιμοφόρα αγγεία. Το μονοξείδιο του αζώτου αποτελεί υποψήφιο για τη ρύθμιση της διαστολής των αγγείων, αυξάνοντας τη ροή του αίματος στο σώμα
- Πόνοι στο στομάχι και προβλήματα πέψης έχουν αντιμετωπιστεί με αντιόξινα παρασκευάσματα νατρίου (Na) (I), μαγνησίου (Mg) (II), ασβεστίου (Ca) (II) και αργιλίου (Al) (II), τα οποία εξουδετερώνουν τα γαστρικά οξέα και ανακουφίζουν από τα συμπτώματα της καούρας

1.4. Καρκινογένεση και μικροβίωμα

Η σχέση μεταξύ μικροβίων και καρκίνου έχει αμφισβητηθεί εδώ και αιώνες, ωστόσο πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν ότι τα βακτήρια, οι ιοί ή/και οι μύκητες διαθέτουν σπουδαίο ρόλο στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου και είναι ικανά να θεραπεύσουν τις μεταστάσεις. Παρά αυτά τα ευρήματα, ο αριθμός των μικροβίων που είναι υπεύθυνος για την καρκινογένεση παραμένει μικρός. [42]. Τα μικρόβια και τα καρκινικά κύτταρα βρίσκονται στο οικοσύστημα του σώματός μας, όπου και επιβιώνουν και αναπαράγονται χάρη στους εισερχόμενους πόρους. Ουσιαστικά, αυτό που τρώμε μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη τόσο των καρκινικών όσο και των μικροβιακών κυττάρων. Επίσης, τα καρκινικά κύτταρα και τα μικρόβια μπορούν να

επηρεάσουν ο ένας τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση του άλλου υποδηλώνοντας ότι οι αλληλεπιδράσεις αυτών των δύο ειδών κυττάρων είναι σημαντικές για την έναρξη και εξέλιξη του καρκίνου [43].

Στο ανθρώπινο έντερο βρίσκονται ποικίλοι μικροοργανισμοί όπως μύκητες, βακτήρια, ιοί και αρχαία, με τα βακτήρια *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* και *Actinobacteria* να είναι τα πιο διαδεδομένα. Ρόλος αυτών των βακτηρίων είναι να διατηρούν τον εντερικό φραγμό και να εμποδίζουν τους δυνητικά επιβλαβείς οργανισμούς από το να εισέλθουν στο επιθήλιο και να δημιουργήσουν ασθένειες. Πλέον, πιστεύεται ότι τα βακτήρια συμβάλλουν στον κίνδυνο του καρκίνου τροποποιώντας το DNA και αλλάζοντας τις διαδικασίες του κυτταρικού κύκλου. Με αυτόν τον τρόπο επιταχύνουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και διαταράσσουν τα προγράμματα κυτταρικού θανάτου που προστατεύουν το σώμα από ανώμαλα κύτταρα [43].

Υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι η μικροχλωρίδα του εντέρου σχετίζεται με μια σειρά από κακοήθειες, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού. Σε αυτήν την περίπτωση, πιστεύεται ότι οι μικροβιακοί πληθυσμοί στο έντερο προάγουν την καρκινογένεση μέσω διαφόρων οδών, όπως μέσω της επιρροής τους στο μεταβολισμό των οιστρογόνων, μέσω της επιρροής τους στον ενεργειακό μεταβολισμό και την παχυσαρκία ή μέσω της αντικαρκινικής ανοσολογικής λειτουργίας [44].

Έως σήμερα, τα μικρόβια έχουν συνδεθεί με 10-20% των ανθρώπινων καρκίνων και έχουν εντοπιστεί 10 μικροοργανισμοί που έχουν χαρακτηριστεί ως καρκινογόνοι, από τον Διεθνή Οργανισμό Έρευνας για τον Καρκίνο. Ένας από αυτούς είναι το *ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού* και σχετίζεται με τον καρκίνο του στομάχου. Παρά τις παρατηρούμενες συνδέσεις με τον καρκίνο, αυτά τα μικρόβια κατοικούν σε μεγάλο ποσοστό του ανθρώπινου πληθυσμού χωρίς να αναπτύσσουν ποτέ καρκίνους σε πολλούς από αυτούς [43].

1.5. Αντιμόνιο

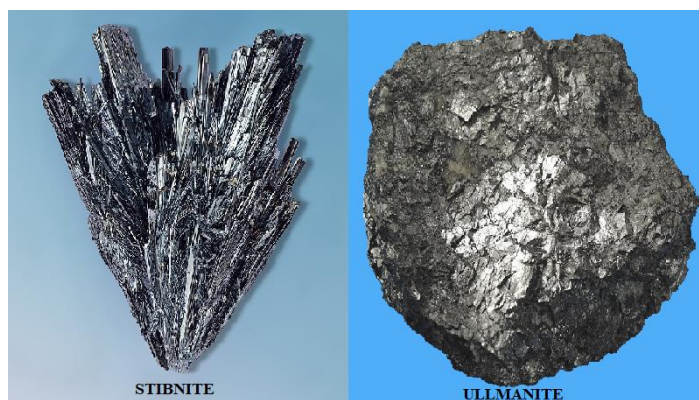
Το αντιμόνιο έχει εφαρμοσθεί στην ιατρική και ανθρώπινη υγεία εδώ και αρκετούς αιώνες, με την παλαιότερη χρήση του να καταγράφεται από τους αρχαίους Αιγύπτιους. Οι ίδιοι χρησιμοποιούσαν το αντιμόνιο για καλλυντικούς σκοπούς, λόγω των ιδιαίτερα όμορφων χρωμάτων των ενώσεων, και το επέλεγαν ως φάρμακο για τη θεραπεία του πυρετού και των δερματικών ερεθισμών [45].

Παρά το γεγονός ότι το αντιμόνιο δεν είναι απαραίτητο για τη ζωή, διαδραματίζει θεραπευτικό ρόλο στην ανθρώπινη υγεία γιατί αλληλεπιδρά με βιομόρια. Πιο συγκεκριμένα, οι ενώσεις του αντιμονίου αλληλεπιδρούν με νουκλεοτίδια, αμινοξέα, πεπτίδια, πρωτεΐνες και ένζυμα, τα οποία σχετίζονται στενά με την πρόσληψη, συσσώρευση, οξειδοαναγωγή, μεταφορά και απέκκριση τους στον ανθρώπινο οργανισμό. Έτσι, με τη σειρά τους είναι υπεύθυνα για τις αντιμικροβιακές, αντικαρκινικές, αντιαλβινικές και αντιπαρασιτικές τους δράσεις. Η έρευνα γύρω από αυτές τις αλληλεπιδράσεις μπορεί να οδηγήσει σε καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών δράσης των φαρμάκων αντιμονίου σε βιολογικά συστήματα και να διευκολύνει την ανάπτυξη πιο αποτελεσματικών μεταλλοφαρμάκων [46].

1.5.1. Χημεία αντιμονίου

Το αντιμόνιο (Sb) βρίσκεται στη 15^η ομάδα του περιοδικού πίνακα με ατομικό αριθμό 51 και ανήκει στην κατηγορία των πνικτιδίων μαζί με τα υπόλοιπα στοιχεία της ομάδας, άζωτο, φώσφορο, αρσενικό και βισμούθιο. Παρόμοια με το αρσενικό, το αντιμόνιο ταξινομείται ως ημι-μέταλλο. Διαθέτει δύο σταθερά φυσικά ισότοπα ^{121}Sb (57.25%) και ^{123}Sb (42.75%), και βρίσκεται κυρίως σε μορφή μεταλλεύματος ως θειούχος ορυκτός αντιμονίτης (stibnite, Sb_2S_3) ή ως

ουλμανίτης (ullmanite, NiSbS) (Εικόνα 33). Οι πιο κοινές και σταθερές οξειδωτικές καταστάσεις του αντιμονίου είναι η τρισθενής (Sb^{III}) και η πεντασθενής (Sb^{V}), με την τελευταία να είναι πιο σταθερή και λιγότερο τοξική [45].



Εικόνα 33: Ορυκτό αντιμονίτη (αριστερά) και ουλμανίτη (δεξιά)

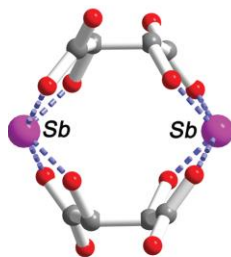
Οι μορφές του αντιμονίου III και V με το οξυγόνο δεν έχουν χαρακτηριστεί επαρκώς, όμως πιστεύεται ότι οι τύποι που επικρατούν είναι οι Sb_2O_3 και SbO_5 , αντίστοιχα. Αυτές οι ενώσεις σχηματίζουν σύμπλοκα με οργανικά οξέα όπως το τρυγικό και γλυκονικό οξύ με τις προκύπτουσες ενώσεις να λειτουργούν ως θεραπευτικοί παράγοντες. Έτσι, το Sb^{III} εντάσσεται με διάφορους υποκαταστάτες που περιέχουν οξυγόνο και θείο, με τον αριθμό ένταξης να ποικίλλει από 3 σε 4. Όταν το αντιμόνιο είναι συνδεδεμένο με άτομα θείου η γεωμετρία του μετάλλου μπορεί να είναι τριγωνική πυραμίδα ή διπυραμίδα. Σύμπλοκα του Sb^{V} έχουν διερευνηθεί με υποκαταστάτες της 15^{ης} ομάδας με τις δομές να είναι οκταεδρικές ή παραμορφωμένες οκταεδρικές. Αυτό εξηγείται λόγω της απουσίας μοναχικού ζεύγους ηλεκτρονίων στο περιβάλλον ένταξης, σε αντίθεση με τα Sb^{III} σύμπλοκα [45].

1.5.2. Φαρμακευτική δράση αντιμονίου

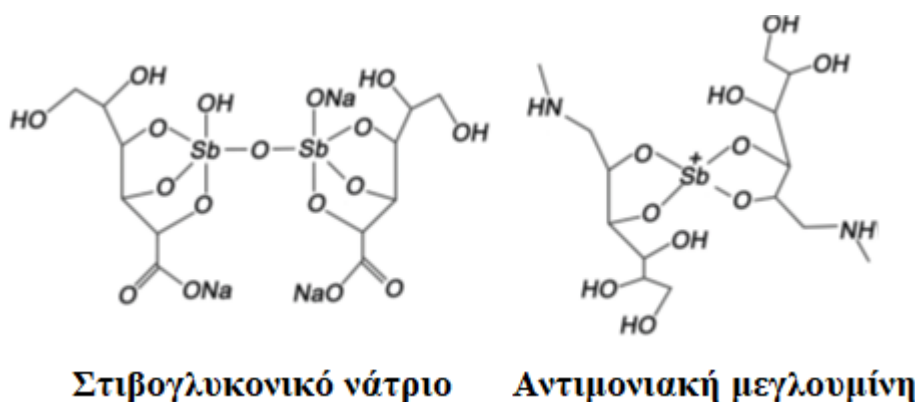
Τον 16^ο αιώνα το αντιμόνιο χρησιμοποιήθηκε ως εμετικό, ενώ οι ενώσεις του αντιμονίου λειτούργησαν θεραπευτικά κατά του έλκους. Έπειτα, το ενδιαφέρον για τη χρήση αυτού του στοιχείου αναβίωσε τον 20^ο αιώνα, όπου ανακαλύφθηκαν συγκεκριμένα αντιπαρασιτικά αποτελέσματα [42]. Πιο συγκεκριμένα, το αντιμόνιο θεράπευσε τροπικές νόσους, με κυρίαρχη τη λεισμανίαση. Αυτή η νόσος προκαλείται από τα είδη *Leishmania*, τα οποία είναι ανθρώπινα πρωτόζωα της οικογένειας τρυπανόσωμα (*trypanosomatidae*). [47]. Η λεισμανίαση ταξινομείται σε τρεις κατηγορίες [48]:

- α. Σπλαχνική λεισμανίαση (ή καλααζάρ), η οποία προκαλεί επικίνδυνη συστηματική λοίμωξη
- β. Δερματική λεισμανίαση, η οποία προκαλεί χρόνιες δερματικές πληγές
- γ. Λεισμανίαση του βλεννογόνου, η οποία μπορεί να προκαλέσει παραμόρφωση του προσώπου

Το πρώτο αντιλεισμανικό φάρμακο του αντιμονίου (1910) που αναπτύχθηκε είναι το τρυγικό κάλιο Sb^{III} (Tartar emetic). Στο τρυγικό εμετικό ($\text{K}_2\text{Sb}_2(\text{C}_4\text{H}_2\text{O}_6)_2$) κάθε Sb^{III} εντάσσεται συνολικά με 4 οξυγόνα από τα δύο μόρια τρυγικού οξέος (Εικόνα 34). Οι πεντασθενείς ενώσεις του αντιμονίου όπως το στιβογλυκονικό νάτριο (Pentostam) και η αντιμονιακή μεγλουμίνη (Glucantime) (Εικόνα 35) χορηγούνται σε πολλές χώρες ως αντιλεισμανικά φάρμακα πρώτης γραμμής, λόγω της χαμηλής τοξικότητας και των υψηλών θεραπευτικών δεικτών τους. Γενικά έχει προταθεί ότι τα φάρμακα του αντιμονίου (V) δρουν ως προ-φάρμακα και ανάγονται *in vivo*, είτε ενζυματικά είτε από κάποιον άλλο μηχανισμό αναγωγής, στο τοξικό αντιμόνιο (III) [46] [47]. Αυτή η φαρμακοκινητική των ενώσεων αντιμονίου παρατηρήθηκε στους ιστούς μολυσμένων χάμστερ, όπου βρέθηκαν ποσότητες Sb^{III} μετά τη θεραπεία με φάρμακο Sb^{V} [46].



Εικόνα 34: Τρισδιάστατη ανιωνική δομή του τρυγικού καλίου αντιμονίου (III) ($K_2Sb_2(C_4H_2O_6)_2$, Tartar emetic) [46]



Εικόνα 35: Χημικές δομές των πεντασθενών φαρμάκων αντιμονίου: στιβογλυκονικό νάτριο (Pentostam) και αντιμονιακή μεγλουμίνη (Glucantime) [46]

Ενώσεις του αντιμονίου έχουν επίσης χορηγηθεί κατά της σχιστοσωμιάσης. Η νόσος σχιστοσωμιάση με βάση τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) ταξινομείται ως «παραμελειμένη» τροπική ασθένεια (Neglected Tropical Disease, NTD) και προκαλείται από αρκετά είδη του γένους *Schistosoma*. Πρόκειται για μία από τις σημαντικότερες παρασιτικές ασθένειες του ανθρώπου όσον αφορά τη νοσηρότητα και τη θνησιμότητα. Τα τρία κύρια σχιστοσώματα που μολύνουν τον άνθρωπο είναι [49]:

- α. *Schistosoma mansoni*, το οποίο προκαλεί ηπατο-εντερική σχιστοσωμιάση
- β. *S. haematobium*, το οποίο προκαλεί μια ουρογεννητική μορφή της ασθένειας και ταξινομείται ως καρκινογόνο· μπορεί να οδηγήσει σε καρκίνωμα της ουροδόχου κύστης

γ. *S. japonicum.*, το οποίο προκαλεί ηπατο-εντερική μορφή της νόσου

Η σχιστοσωμίαση είναι γενικά περιορισμένη στη ζώνη των τροπικών και υποτροπικών περιοχών, με τους θανάτους να φθάνουν τους 280.000-500.000 ετησίως. Όμως, εκτός από το θάνατο, αυτή η λοίμωξη μπορεί να δημιουργήσει πολλά προβλήματα υγείας, όπως χρόνια αναπηρία, χρόνια αναιμία, κοιλιακό άλγος, διάρροια και για το είδος *S. Haematobium* ουρογεννητικά προβλήματα, όπως δυσλειτουργία της ουροδόχου κύστης, αιματουρία και συσχέτιση με καρκίνο της ουροδόχου κύστης [49].

Τα πρώτα αντι-σχιστοσωμικά φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι τρισθενείς ενώσεις του αντιμονίου, όπως το τρυγικό κάλιο Sb^{III} (Tartar emetic) το οποίο παρουσίασε σοβαρές παρενέργειες. Η επόμενη γενιά φαρμάκων ήταν νέες ενώσεις αντιμονίου, με ακόμη πιο έντονες και σοβαρές παρενέργειες, που συχνά οδηγούσαν μέχρι και στο θάνατο ασθενών. Όλα τα αντιμονικά χορηγούνταν είτε ενδοφλέβια είτε ενδομυϊκά [49].

Οι ενώσεις του αντιμονίου έχουν αξιολογηθεί περαιτέρω για πιθανή αντινεοπλασματική δράση. Το στιβογλυκονικό νάτριο (Pentostam) παρουσιάζει αξιοσημείωτη αντιλευχαιμική δράση σε ασθενείς με οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία και έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί διαφοροποίηση της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας [47] [50]. Επιπλέον, διαθέτει την ικανότητα να λειτουργεί ως αναστολέας της πρωτεϊνικής φωσφατάσης τυροσίνης (PTPase) στα κύτταρα λευχαιμίας. Το γεγονός αυτό πιθανόν προσφέρει τη δυνατότητα να αναπτυχθούν πιο ειδικοί και αποτελεσματικοί αναστολείς που στοχεύουν τη φωσφατάση, έχοντας ως βάση το αντιμόνιο συζευγμένο με διαφορετικά οργανικά τμήματα. Ακόμη, έχει μελετηθεί συγκριτικά με τη σουραμίνη, μια ένωση γνωστή για την αντινεοπλασματική της δράση έναντι πολλών τύπων καρκίνου όπου και αποδείχθηκε ότι το στιβογλυκονικό νάτριο δρα ως καλύτερος αναστολέας [42][44]. Περαιτέρω, το τρυγικό κάλιο Sb^{III} (Tartar emetic) έχει βρεθεί ότι έχει κυτταροτοξική *in*

vitro δράση σε διάφορες καρκινικές σειρές του πνεύμονα με την συγκέντρωση που εξοντώνει το 50% των κυττάρων (IC_{50}) να κυμαίνεται από 4.2 έως 322 mg/mL. Ένα εύρος τιμών που αποδεικνύει παρόμοια αποτελεσματικότητα με τα αντικαρκινικά φάρμακα σισπλατίνης και δοξορουβικίνης [46].

Τέλος, το στιβογλυκονικό νάτριο εμφανίζει πλήρη καταστολή του ιού της ηπατίτιδας C. Το Antimoniotungstate ($[(NH_4)_{17}Na(NaSb_9W_{21}O_{86}) \cdot 14H_2O]$) φαίνεται να μειώνει τα επίπεδα HIV σε ασθενείς με AIDS, ανοίγοντας το πεδίο για την εύρεση άλλων πολυοξομεταλλικών ιόντων αντιμονίου που μπορούν να δράσουν αποτελεσματικά σε περιπτώσεις ταυτόχρονης λοίμωξης από HIV και λεϊσμανίαση. Μια σειρά από αρωματικές ενώσεις Sb^V εμφανίζει σημαντική ισχύ κατά του HIV, με το μηχανισμό δράσης να χαρακτηρίζεται από διακοπή των αλληλεπιδράσεων μεταξύ της γλυκοπρωτεΐνης του περιβλήματος του ιού και της γλυκοπρωτεΐνης που εκφράζεται στην κυτταρική επιφάνεια [46].

1.5.3 Δοσολογία και παρενέργειες αντιμονίου

Τα φάρμακα του αντιμονίου χορηγούνται ανάλογα με το σωματικό βάρος. Στις πρώτες δοκιμές κατά της σπλαχνικής λεϊσμανίασης συστηνόταν το στιβογλυκονικό νάτριο να είναι 10 mg kg^{-1} ημέρα⁻¹ για μια περίοδο 6-10 ημερών. Ωστόσο, παρά τα υψηλά ποσοστά ίασης, έχει αναφερθεί αυξανόμενη αντίσταση και υποτροπές της νόσου. Πλέον, η βέλτιστη συνολική δόση του φαρμάκου είναι 20 mg kg^{-1} ημέρα⁻¹ με μέγιστη δόση τα 850 mg την ημέρα για ένα διάστημα 20-30 ημερών [45].

Αν και οι ενώσεις του αντιμονίου επιλέγονται γιατί είναι λιγότερο τοξικές στον άνθρωπο από τις ενώσεις του αρσενικού, έχουν παρατηρηθεί σημαντικές παρενέργειες του τρισθενούς

αντιμονίου. Μερικές από αυτές είναι η ναυτία, εμετός, αδυναμία, μυαλγία, διάρροια, δερματικά εξανθήματα και καρδιοτοξικότητα. Παράλληλα, έχει βρεθεί ότι το Sb^{III} αναστέλλει την αποκατάσταση βλαβών του DNA. Όσον αφορά την καρδιοτοξικότητα, στο παρελθόν χορηγήθηκε κατά λάθος 10 φορές μεγαλύτερη ημερήσια δόση του στιβογλυκονικού νατρίου από τη συνιστώμενη (8500 mg) και παρόλα αυτά δεν παρατηρήθηκε σοβαρή τοξικότητα με την υπερδοσολογία να είναι ανεκτή. Αυτό υποδηλώνει ότι μία μικρή δόση του πεντασθενούς αντιμονίου εμφανίζει ελάχιστες παρενέργειες στους ασθενείς [45].

2. ΣΚΟΠΟΣ

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί έναν από τους πιο γνωστούς τύπους κακοηθειών στις γυναίκες με τις θεραπείες να περιλαμβάνουν χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία και χειρουργική επέμβαση. Οι ερευνητές έχουν αναπτύξει σπουδαία χημειοθεραπευτικά φάρμακα, όμως η αλληλεπίδραση των καρκινικών κυττάρων με το μικροπεριβάλλον του όγκου δυσχεραίνει την καταπολέμηση του. Λόγω αυτής της αλληλεπίδρασης εμφανίζεται αντίσταση των φαρμάκων στον καρκίνο, γνωστή και ως αντίσταση στη χημειοθεραπεία, με επακόλουθη τη μειωμένη θεραπευτική αποτελεσματικότητα και πιθανόν μετάσταση. Αν και οι θεραπείες καταπολέμησής του καρκίνου έχουν βελτιωθεί και τα ποσοστά επιβίωσης έχουν αυξηθεί τα τελευταία χρόνια, η παγκόσμια έρευνα έχει κληθεί να αναπτύξει πιο αποτελεσματικές στρατηγικές με περιορισμένες παρενέργειες.

Σκοπός, λοιπόν, της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η σύνθεση ενός χημειοθεραπευτικού παράγοντα που δρα εκλεκτικά στα καρκινικά κύτταρα του μαστού. Το μεταλλοφάρμακο συγκροτείται από δύο οντότητες: την α) τετρακυκλίνη, αντιβιοτικό το οποίο διαθέτει παρόμοια δομή με ήδη χορηγούμενα αντικαρκινικά φάρμακα (δοξορουβικίνη) και το β) αντιμόνιο, μέταλλο με εκτεταμένη χρήση στην ιατρική. Αντικείμενο μελέτης είναι ο σχηματισμός μιας ενιαίας ένωσης που πιθανόν να παρέχει ένα συνεργιστικό αποτέλεσμα.

Σε αυτό το νεοσυντιθέμενο σύζευγμα μελετάται η δράση του σε καρκινικά και υγιή κύτταρα, η τοξικότητά του *in vitro*, ο μηχανισμός αλληλεπίδρασης με το DNA και το ένζυμο λιποξυγενάση και η αλληλεπίδραση του με το τριπεπτίδιο γλουταθειόνης, με απώτερο στόχο την αξιολόγηση δεδομένων και εξαγωγή συμπερασμάτων για τις αντικαρκινικές ιδιότητες της ένωσης.

Τέλος, αξιολογείται η αντιμικροβιακή δράση της ένωσης προκειμένου να διερευνηθεί η σχέση της καρκινογένεσης με το ανθρώπινο μικροβίωμα.

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1. Χημικό μέρος

3.1.1. Υλικά και Όργανα

Όλοι οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν διέθεταν βαθμό αντιδραστηρίου και ήταν κατάλληλοι για χρήση χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Τα αντιδραστήρια τριφαινυλαντιμόνιο, τετρακυκλίνη, LOX και λινολεϊκό οξύ αγοράστηκαν από την Aldrich-Merck και χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Το DMSO αγοράστηκε από τη Riedel-de Haën ενώ το θρεπτικό Dulbecco's modified Eagle's medium, ο εμβρυϊκός βόειος ορός, η γλουταμίνη και η θρυψίνη αγοράστηκαν από την Gibco, Γλασκώβη, Ηνωμένο Βασίλειο. Το αλατούχο διάλυμα φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος (PBS), CT-DNA, βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) και ιωδιούχο προπίδιο αγοράστηκαν από τη Sigma-Aldrich.

Για την εύρεση του σημείου τήξεως χρησιμοποιήθηκαν τριχοειδή σωληνάκια και η μέτρηση πραγματοποιήθηκε στη συσκευή STUART SMP30, χωρίς να γίνει κάποια διόρθωση στη λαμβανόμενη τιμή. Στη φασματοσκοπία υπερύθρου ($4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$) τα φάσματα λήφθηκαν μέσω του φασματοφωτόμετρου Cary 670 FTIR (Agilent Technologies). Για τα φάσματα φθορισμού χρησιμοποιήθηκε το φασματόμετρο φθορισμού Jasco FP-8200. Για τη λήψη ηλεκτρονικών φασμάτων απορρόφησης χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο Uv/Vis σειράς PC UV-1600 VWR. Η μέτρηση XRF πραγματοποιήθηκε με το όργανο Rigaku NEX QC EDXRF (Austin, TX, ΗΠΑ). Το TG-DTA διεξήχθη στη συσκευή DTG/TG NETZSCH STA 449 C, υπό ροή αέρα με ρυθμό θέρμανσης $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ($25-500^\circ\text{C}$). Τα φάσματα ^1H και ^{13}C NMR καταγράφηκαν με το όργανο Bruker AC 400 MHz FT-NMR σε διάλυμα $\text{DMSO}-d_6$. Για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους χρησιμοποιήθηκε το οσμόμετρο σημείου πήξης Osmomat

3000 basic. Το ιξώδες μελετήθηκε σε γυάλινο τριχοειδές ιξωδόμετρο τύπου Ubbelohde. Η διαλυτοποίηση και ανάμειξη ουσιών πραγματοποιήθηκε σε Vortex από την Sanichem και το pH μετρήθηκε με πεχάμετρο (pH meter Basic 20) από την CRISON. Η ειδική πρέσα για τη δημιουργία παστίλιας είναι της Specac και ο αναλυτικός ζυγός της Scatec.

3.1.2. Σύνθεση

Για την αντίδραση σύνθεσης του TecAn ζυγίζονται 0.176 g $\text{Ph}_3\text{Sb(III)}$ (0.5 mmol) τα οποία οξειδώνονται με 0.05 mL H_2O_2 30% υπεροξείδιο του υδρογόνου παρουσία 0.222 g τετρακυκλίνης (0.5 mmol) σε 20 mL Et_2O . Το διάλυμα αναδεύεται σε παγόλουτρο στους 4 °C για 5 ώρες. Το υπο-κίτρινο ίζημα διηθείται και ξηραίνεται σε συνθήκες περιβάλλοντος. Το προϊόν σκόνης διαλύεται σε 20 mL MeCN και στη συνέχεια διηθείται για να απομακρυνθούν οι ακαθαρσίες. Το διαυγές διάλυμα συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού στον περιστροφικό εξατμιστήρα και η στερεή σκόνη TecAn πλένεται με 2 mL διαιθυλαιθέρα (Et_2O).

3.1.3. Σημείο Τήξης

Για τη μέτρηση του σημείου τήξεως χρησιμοποιούνται τριχοειδή σωληνάκια BRIS micro haematocrit tubes (Soda Lime Glass, Vitrex Medical A/S), τα οποία τροποποιούνται από τη μία μεριά με τη βοήθεια φλόγας προκειμένου να μπορούν να συγκρατήσουν το δείγμα. Έπειτα, τοποθετούνται στη συσκευή STUART SMP30 και παρατηρείται η τήξη του δείγματος ενώ καταγράφεται η αύξηση της θερμοκρασίας με τη χρήση ενός θερμομέτρου.

3.1.4. Διαλυτότητα

Για τη διαλυτότητα, τοποθετείται ισόποση ποσότητα δείγματος και διαλύτη σε δοκιμαστικούς σωλήνες και ακολουθεί ισχυρή ανάδευση για πλήρη ανάμιξη του διαλύματος. Ένας διαλύτης είναι επιθυμητός όταν μπορεί να διαλύσει πλήρως το στερεό και να οδηγήσει σε ένα διαυγές διάλυμα. Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται είναι οι εξής: εξάνιο (n-hexane), τολουόλιο (toluene), διχλωρομεθάνιο (CH_2Cl_2), χλωροφόρμιο (CHCl_3), ακετόνη (Acetone), μεθανόλη (MeOH), ακετονιτρίλιο (MeCN), διμέθυλο-σουλφοξείδιο (DMSO), διμέθυλο-φορμαμίδιο (DMF) και δις απεσταγμένο νερό (ddH_2O).

3.1.5. Κρυοσκοπία

Σύμφωνα με την αρχή της κρυοσκοπίας το σημείο πήξης ενός διαλύματος είναι χαμηλότερο από εκείνο του καθαρού διαλύτη. Το όργανο της κρυοσκοπίας υπολογίζει τη συνολική ωσμωτικότητα οποιουδήποτε υδατικού διαλύματος. Με τον όρο οσμωτικότητα αναφερόμαστε στον αριθμό των ενεργών σωματιδίων που υπάρχουν ανά κιλό διαλύτη (νερό) και μετριέται σε Osmol/kg ή mOsmol/kg. Η ωσμωτικότητα ενός διαλύματος είναι ευθέως ανάλογη με τη μετρούμενη πίεση του σημείου πήξης και επομένως μπορεί να υπολογιστεί από αυτό το αποτέλεσμα. Η σχέση έχει ως εξής: $C_{osm} = \frac{\Delta T_f}{K_f}$. (1) Η ταπείνωση του σημείου πήξης (ΔT_f) του διαλύτη εξαρτάται από τη συγκέντρωση του διαλύματος και ισχύει ο τύπος: $\Delta T_f = K_f m = K_f \frac{m_{ουσίας} 1000}{Mr_{ουσίας} m_{διαλύτη}}$ (2) όπου K_f : η σταθερά ταπείνωσης που εξαρτάται από τη φύση του διαλύτη και m : η μοριακότητα κατά βάρος του διαλύματος. Από τους τύπους (1) + (2) προκύπτει ότι μέσω της κρυοσκοπίας προσδιορίζεται η σχετική μοριακή μάζα.

Σημειώνεται ότι αυτές οι σχέσεις ισχύουν για όλους τους διαλύτες. Στην προκειμένη περίπτωση, οι ενώσεις διαλυτοποιούνται σε DMSO, και υπολογίζεται η osmolarity διαλύματος DMSO/H₂O (1:49 w/w). Η osmolarity του μείγματος διαλυτών στη συνέχεια κανονικοποιείται με τη βοήθεια καμπύλης συσχέτισης osmolarity καθαρού διαλύτη ως προς την osmolarity του διαλύματος.

Πειραματικά, προετοιμάζεται ένα διάλυμα συγκέντρωσης 10mg/1mL DMSO. Έπειτα, λαμβάνεται 1 μ L από το διάλυμα και αραιώνεται σε 49 μ L ddH₂O. Το νέο διάλυμα μεταφέρεται σε ένα erpendorf και τοποθετείται στο όργανο Osmomat 3000 basic. Τα δεδομένα καταγράφονται και υπολογίζεται το μοριακό βάρος της ένωσης.

3.1.6. Φασματοσκοπία Υπέρυθρου Μετασχηματισμού Fourier με Αποσβένουσα Ολική Ανάκλαση (ATR-FTIR)

Η φασματοσκοπία υπέρυθρου (IR) βασίζεται στην αλληλεπίδραση της ύλης με την ακτινοβολία. Αυτή η αλληλεπίδραση αποδίδεται μέσω δονήσεων, οι οποίες δημιουργούνται από τις αλλαγές στη διπολική ροπή του μορίου. Ο όρος υπέρυθρη φασματοσκοπία μετασχηματισμού Fourier (FTIR) αφορά τον μετασχηματισμό Fourier που απαιτείται για τη μετατροπή των πρωτογενών δεδομένων σε πραγματικό φάσμα. Στη δειγματοληψία ATR, το υπέρυθρο φως (IR) μεταφέρεται μέσα από έναν κρύσταλλο, ανακλάται εσωτερικά στη διεπαφή κρυστάλλου-δείγματος και το ανακλώμενο φως ταξιδεύει στον ανιχνευτή FTIR. Δείγματα που μπορούν να μελετηθούν είναι στερεά και υγρά.

Για τη λήψη των φασμάτων IR τοποθετούνται επαρκείς ποσότητες δειγμάτων στον κρύσταλλο του φασματοφωτόμετρου Cary 670 FTIR (Agilent Technologies). Λαμβάνονται τα

φάσματα της ένωσης TecAn και των υποκαταστατών τετρακυκλίνης(TecH₂) και Ph₃Sb με το εύρος της ακτινοβολίας να κυμαίνεται από 4000-400 cm⁻¹.

3.1.7. Φασματοσκοπία Φθορισμού Ακτίνων X (XRF)

Η μέθοδος Φθορισμού Ακτίνων X βασίζεται στη διέγερση ατόμων με τη χρήση ακτινοβολίας κατάλληλου μήκους κύματος και στην ανίχνευση των ακτίνων X που εκπέμπονται κατά την μετάπτωση των διεγερμένων ατόμων στη βασική τους κατάσταση. Στο φάσμα ακτίνων X εμφανίζονται χαρακτηριστικές ενεργειακές κορυφές, η θέση των οποίων ταυτοποιεί τα στοιχεία που βρίσκονται στο δείγμα (ποιοτική ανάλυση), ενώ από την ένταση των κορυφών υπολογίζονται οι συγκεντρώσεις των στοιχείων του δείγματος (ποσοτική ανάλυση).

Για τη λήψη φασμάτων XRF παρασκευάστηκαν παστίλιες από την ένωση TecAn. Πιο συγκεκριμένα στον αναλυτικό ζυγό ζυγίζεται κατάλληλη ποσότητα δείγματος σε erpendorf και στο ίδιο erpendorf ζυγίζονται 500mg βορικού οξέος (H₃BO₃). Έπειτα, το δείγμα κονιοποιείται σε γουδί και μεταφέρεται στην ειδική πρέσα της Specac. Το δείγμα εξάγεται από την πρέσα και μεταφέρεται στο όργανο Rigaku NEX QC EDXRF όπου και λαμβάνεται το φάσμα.

3.1.8. Φασματοσκοπία Υπεριώδους-Ορατού (UV/Vis)

Η φασματοσκοπία UV/Vis στηρίζεται στο γεγονός ότι η ακτινοβολία διέρχεται μέσα από το διάλυμα, με την ουσία που περιέχεται να απορροφά μέρος της ακτινοβολίας και αυτή να εξέρχεται με χαμηλότερη ένταση. Η «ποσότητα» της ακτινοβολίας που απορροφάται από το διάλυμα είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της ουσίας που υπάρχει μέσα στο διάλυμα και βασίζεται στο νόμο του Lambert – Beer με εξίσωση $A = \epsilon bC$, όπου A είναι η απορρόφηση, ϵ είναι ο

συντελεστής μοριακής απορρόφησης και είναι σταθερός για κάθε ένωση, b είναι το μήκος της κυψελίδας και C η συγκέντρωση.

Για τη λήψη φασμάτων UV/Vis παρασκευάζονται διαλύματα TecAn, τετρακυκλίνης (TecH_2) και Ph_3Sb συγκέντρωσης 10^{-2}M σε διαλύτη DMSO. Πραγματοποιείται τυφλό πείραμα με 2 mL DMSO και στη συνέχεια οι υποκαταστάτες αραιώνονται σε συγκέντρωση 10^{-4}M ενώ η ένωση αραιώνεται σε $5 \times 10^{-5}\text{M}$, τελικού όγκου 2 mL. Τα φάσματα λαμβάνονται από το όργανο UV/Vis σειράς PC UV-1600 της VWR.

3.1.9. Θερμοβαρυμετρική-Διαφορική Θερμική Ανάλυση (TG-DTA)

Το TG/DTA είναι ένας θερμικός αναλυτής που χαρακτηρίζει ταυτόχρονα πολλές θερμικές ιδιότητες του δείγματος. Με τον όρο TG αναφερόμαστε σε θερμοκρασιακές μετρήσεις όπου συμβαίνει αποσύνθεση, αναγωγή ή οξείδωση. Παράλληλα, καταγράφονται οι αλλαγές βάρους που σχετίζονται με διάφορες φυσικοχημικές αλλαγές, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα την απώλεια ή αύξηση βάρους του δείγματος. Ο όρος DTA δείχνει εάν οι διεργασίες αποσύνθεσης είναι ενδόθερμες ή εξώθερμες ενώ μετρά θερμοκρασίες όπου υπάρχει αλλαγή φάσης του δείγματος όμως δεν υπάρχουν απώλειες μάζας.

Για τη διεξαγωγή της ανάλυσης TG-DTA χρησιμοποιήθηκε η συσκευή DTG/TG NETZSCH STA 449 C, υπό ροή αέρα με ρυθμό θέρμανσης $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ($25\text{--}500^\circ\text{C}$).

3.1.10. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (^1H - ^{13}C -NMR)

Η φασματοσκοπία NMR στηρίζεται στο φαινόμενο κατά το οποίο οι πυρήνες των ατόμων που διαθέτουν spin όταν ακτινοβολούνται υπό την επίδραση ισχυρού στατικού μαγνητικού πεδίου, διεγείρονται και κατά την αποδιέγερσή τους δίνουν σήμα.

Για τη λήψη των φασμάτων ^1H - και ^{13}C -NMR του TecAn και των υποκαταστατών του ζυγίστηκαν 10mg δείγματος και διαλύθηκαν σε 400 μL δευτεριωμένου DMSO ($\text{DMSO-}d_6$). Τα διαλύματα μεταφέρθηκαν σε ειδικά σωληνάκια NMR όπου και σφραγίστηκαν με καπάκια και πάραφιλμ περιμετρικά του σωλήνα. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στο όργανο Bruker AC 400 MHz FT-NMR.

3.2. Βιολογικό μέρος

3.2.1. Υλικά

Τα βιολογικά πειράματα, που περιλαμβάνουν την αξιολόγηση βιωσιμότητας με τη δοκιμασία SRB (Sulforhodamine B assay), τη μελέτη της *in vitro* γενετοξικότητας με τη μέθοδο μικροπυρηνίσκων (Micronucleus assay), τη μελέτη μορφολογίας κυττάρων, τη χρώση ακριδίνης πορτοκαλιού/βρωμιούχου αιθιδίου (AO/EB) και τη μελέτη της *in vivo* τοξικότητας σε γαρίδες άλμης (*Artemia salina*), διεξάγονται χρησιμοποιώντας stock διάλυμα TecAn (10^{-2}M) σε DMSO, διάλυμα τετρακυκλίνης (TecH_2) σε DMSO (10^{-2}M) και διάλυμα Ph_3Sb σε DMSO (10^{-2}M). Τα stock διαλύματα TecAn, σισπλατίνης, τετρακυκλίνης (TecH_2) και Ph_3Sb παρασκευάζονται φρέσκα κάθε φορά που διεξάγεται πείραμα και αραιώνονται με μέσα κυτταροκαλλιέργειας στην επιθυμητή συγκέντρωση. Για τις μελέτες σύνδεσης με το DNA και το ένζυμο λιποξυγενάση τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα. Για την και την εύρεση ζωνών αναστολής

(inhibition zones, IZ) στα βακτήρια *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* και *Staphylococcus epidermidis* χρησιμοποιούνται stock διαλύματα TecAn, τετρακυκλίνης (TecH₂) και Ph₃Sb (10⁻³M) σε DMSO. Τα υλικά που απαιτούνται για τη διεξαγωγή των πειραμάτων είναι: Tryptone, Soytone, Beef extract, Yeast extract, NaCl, d-Glucose, K₂HPO₄, Peptone, Agar, τρυβλία petri, κρικοφόρος στείλεός, βαμβakoφόρος στείλεός, χάρτινοι δίσκοι 10 mm, ορός (NaCl 0.9M), hood με laminar air flow (HD-650 laminar flow cabinet Zhejing sujing Purification Equipment), επωαστής και μηχανήμα σάρωσης (Hewlett Packard).

3.2.2. Μελέτες *in vivo* και *in vitro*

3.2.2.1. Προσδιορισμός σουλφοροδαμίνης B (SRB assay)

Ο προσδιορισμός της σουλφοροδαμίνης B χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της κυτταρικής πυκνότητας, μετρώντας την περιεκτικότητα των κυττάρων σε κυτταρική πρωτεΐνη.

Τα κύτταρα τοποθετούνται σε πηγαδάκια (100 μ L ανά πηγαδάκι), σε τρυβλίο με επίπεδο πυθμένα που φέρει 96 πηγαδάκια, σε διάφορες πυκνότητες (MCF-7, MDA-MB-231 και MRC-5: 6000, 8000 και 2000 κύτταρα/πηγαδάκι, αντίστοιχα). Οι καλλιέργειες των κυττάρων επωάζονται σε κλίβανο για 24 h στους 37°C με 5% CO₂ και στη συνέχεια προστίθεται η ένωση για 48 h σε συγκεντρώσεις (5-60M), είτε με τη προσθήκη 100 μ L θρεπτικού μέσου καλλιέργειας (control) είτε με την προσθήκη 100 μ L του διαλύματος της ένωσης στις τελικές επιθυμητές συγκεντρώσεις. Οι μετρήσεις επαναλαμβάνονται εις διπλούν. Μετά την επώαση ακολουθεί η αναρρόφηση του θρεπτικού μέσου και προστίθενται 50 μ L διαλύματος τριχλωρικού οξέος (TCA) 10%. Τα τρυβλία παραμένουν για 30 λεπτά στους 4°C προκειμένου να μονιμοποιηθούν και ξεπλένονται 5 φορές με απιονισμένο νερό. Έπειτα, παραμένουν ανάποδα για τουλάχιστον 24 h σε θερμοκρασία δωματίου

για να στεγνώσουν. Στη συνέχεια, προστίθενται 70 μL σουλφοροδαμίνης Β (SRB) 0.4 (w/v) διαλυμένη σε διάλυμα 1% οξικού οξέος. Τα τρυβλία επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά και αμέσως μετά η χρωστική αναρροφάται με τα πηγαδάκια ξεπλένονται 5 φορές με διάλυμα οξικού οξέος 1%. Τέλος, η χρωστική διαλυτοποιείται με 200 μL unbuffered Tris-Base (10mM) και τα τρυβλία μεταφέρονται στο όργανο Microplate photometer HiPo MPP-96 (Biosan) για να γίνει μέτρηση της απορρόφησης, σε μήκος κύματος $\lambda = 560 \text{ nm}$, και να υπολογιστεί το ποσοστό των επιζώντων κυττάρων προς τα κύτταρα που δε φέρουν ουσία (control). Η έκφραση των αποτελεσμάτων πραγματοποιείται με τις τιμές IC_{50} (συγκέντρωση που εξοντώνει το 50% των κυττάρων) [51].

3.2.2.2. Αξιολόγηση της *in vitro* γενοτοξικότητας με τη μέθοδο των μικροπυρηνίσκων (Micronucleus assay)

Οι μικροπυρηνίσκοι σχηματίζονται κάθε φορά που ένα χρωμόσωμα ή ένα θραύσμα χρωμοσώματος δεν ενσωματώνεται στους θυγατρικούς πυρήνες κατά της διάρκειας της κυτταρικής διαίρεσης. Η ύπαρξή τους αποτελεί χαρακτηριστικό γενοτοξικότητας και χρωμοσωμικής αστάθειας. Οι μικροπυρηνίσκοι εμφανίζονται κυρίως στα καρκινικά κύτταρα με την παρουσία τους να υποδεικνύει γενετικές βλάβες.

Για την εύρεση της γενοτοξικότητας χρησιμοποιούνται κύτταρα MRC-5 (4×10^4 κύτταρα/πηγαδάκι) τα οποία τοποθετούνται σε γυάλινες καλυπτρίδες, οι οποίες στη συνέχεια μεταφέρονται σε τρυβλία έξι πηγαδιών, με την προσθήκη 3 mL θρεπτικού και επωάζονται για 24 h. Έπειτα, προστίθεται το TecAn στην τιμή IC_{50} για περίοδο 48 h. Τα καλύμματα πλένονται 3 φορές με PBS και 1 φορά με υποτονικό διάλυμα (75 mM KCl) για 10 λεπτά σε θερμοκρασία

δωματίου. Τα κύτταρα σταθεροποιούνται με τουλάχιστον τρεις αλλαγές διαλύματος οξικού οξέος/μεθανόλης 1:3. Τα καλύμματα πλένονται, επίσης, με ψυχρή μεθανόλη που περιέχει 1% οξικό οξύ και στη συνέχεια χρωματίζονται με το πορτοκαλόχρωμο της ακριδίνης (50 µg/mL) για 15 λεπτά στους 37°C. Έπειτα, τα καλύμματα ξεπλένονται 3 φορές με PBS για να αφαιρεθεί τυχόν περίσσεια πορτοκαλιού ακριδίνης. Τέλος, προσδιορίζεται ο αριθμός των μικροπύρηνων κυττάρων ανά 1000 κύτταρα [51].

3.2.2.3. Αξιολόγηση της *in vivo* τοξικότητας με τη μέθοδο γαρίδας άλμης (*Artemia salina* assay)

Η μέθοδος γαρίδας άλμης επιλέγεται επειδή μπορεί να προβλέψει μια ποικιλία δράσεων των βιοδραστικών ενώσεων, όπως κυτταροτοξικότητα, φωτοτοξικότητα, ακόμα και δράσεις φαρμακολογικές και παρασιτοκτόνες.

Για την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιείται ένα γραμμάριο κύστης, το οποίο ενυδατώνεται σε νερό για 1 h σε διαχωριστική χοάνη. Το θαλασσινό νερό παρασκευάζεται διαλύοντας 17 g θαλασσινού άλατος σε 500 mL απεσταγμένου νερού. Στην καλλιέργεια παρέχεται επαρκής ανάδευση με τη δημιουργία αέρα και φωτισμός για 48 h σε θερμοκρασία δωματίου. Μόλις εκκολαφθούν τα ψάρια λαμβάνεται μια ποσότητα τους στη φωτεινή πλευρά της χοάνης με τη χρήση πιπέτας Pasteur και μεταφέρονται σε σκαφάκι που περιέχει NaCl 0.9%. Στη συνέχεια, λαμβάνεται μια ποσότητα αυτού του διαλύματος που περιέχει περίπου 20 ψάρια και τοποθετείται στα πηγαδάκια τρυβλίου 24 θέσεων. Έπειτα, προστίθενται και οι προς μελέτη ουσίες (TecAn και τετρακυκλίνη) στις διαφορετικές συγκεντρώσεις 25, 50 και 100 µM. Ο τελικός όγκος κάθε πηγαδιού είναι 1mL με NaCl 0.9%. Έπειτα, οι γαρίδες άλμης παρατηρούνται μετά από 24 h,

χρησιμοποιώντας στερεοσκόπιο. Οι προνύμφες θεωρούνται νεκρές εάν δεν εμφάνιζαν καμία εσωτερική ή εξωτερική κίνηση σε 10 δευτερόλεπτα παρατήρησης. Κάθε πείραμα επαναλαμβάνεται τρεις φορές [52].

3.2.2.4. Μελέτη κυτταρικής μορφολογίας

Η μορφολογία των κυττάρων MCF-7 παρατηρήθηκε κάτω από ένα αντίστροφο μικροσκόπιο, μετά από επώαση των κυττάρων MCF-7 με TecAn, για 48 h.

3.2.2.5. Δοκιμασία χρώσης Acridine Orange/Ethidium Bromide (AO/EB)

Η μέθοδος χρώσης με το πορτοκαλόχρωμο της ακριδίνης ακριδίνης/βρωμιούχο αιθίδιο (AO/EB) χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό ζωντανών, αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων. Μέσω αυτής της μεθόδου ανιχνεύονται πυρηνικές αλλαγές και αποπτωτικά σώματα που είναι χαρακτηριστικά της απόπτωσης.

Πειραματικά, τα κύτταρα MCF-7 τοποθετούνται σε τρυβλίο 24 θέσεων (70.000 κύτταρα ανά πηγάδι) και καλλιεργούνται στους 37 °C σε επωαστήρα CO₂ για 24 h. Στη συνέχεια, τα κύτταρα υποβάλλονται σε επεξεργασία με την υπό μελέτη ένωση TecAn στην τιμή IC₅₀ για 48 h. Τα κύτταρα που δε φέρουν ουσία (control) και τα επεξεργασμένα κύτταρα συλλέγονται μετά από 48 h, πλένονται δύο φορές με PBS και φυγοκεντρούνται. 25 μ L εναιωρήματος κυττάρων σε PBS επωάζονται με 50 μ g/mL AO και 50 μ g/mL διάλυμα EB. Στη συνέχεια, τα κύτταρα αναμειγνύονται απαλά και 10 μ L κυττάρων σε εναιώρημα τοποθετούνται σε μια γυάλινη πλάκα με μια καλυπτρίδα να τοποθετείται πάνω της. Συλλέγονται τυχαία 300 κύτταρα και παρατηρούνται αμέσως σε ένα μικροσκόπιο φθορισμού (Μικροσκόπιο ανεστραμμένου φθορισμού Optika) και

εξετάζονται σε μεγέθυνση x60. Έπειτα, υπολογίζεται το ποσοστό των κυττάρων που αντανακλούν παθολογικές αλλαγές [53].

3.2.3. Μελέτες αλληλεπίδρασης – *Ex vivo*

3.2.3.1. Μελέτες Υπεριώδους-Ορατού (UV/Vis)

Το stock διάλυμα του DNA παρασκευάζεται με αραιώση του CT DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) και ddH₂O. Η αναλογία CT-DNA:ddH₂O:Buffer είναι 1:1:19. Για την παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος διαλύονται 2.2 g κιτρικού νατρίου (15 mM) και 4.38 gr χλωριούχου νατρίου NaOH (150 mM) σε 500 mL ddH₂O. Το pH του διαλύματος πρέπει να είναι 7 και η μέτρησή του πραγματοποιείται με πεχάμετρο. Έπειτα, μετράται η απορρόφηση UV του stock διαλύματος του DNA, η οποία πρέπει να έχει αναλογία στα 260 και 280 nm (A_{260}/A_{280}) = 1.90. Έτσι, αποδεικνύεται ότι το DNA είναι καθαρό και απολύτως απαλλαγμένο από πρωτεΐνες. Η συγκέντρωση DNA προσδιορίζεται από την απορρόφηση UV στα 260 nm χρησιμοποιώντας το συντελεστή μοριακής απορρόφησης $\epsilon = 6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Στα πειράματα τιτλοδότησης εξετάζεται ο τρόπος με τον οποίον μεταβάλλεται το $\lambda_{\text{max}}(\text{απορ.})=258 \text{ nm}$ του CT-DNA κατά την αυξανόμενη προσθήκη της υπό μελέτη ένωσης. Στη συγκεκριμένη μέθοδο καταγράφονται τα φάσματα UV του CT DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα απουσία και παρουσία TecAn, τετρακυκλίνης (TecH₂) και Ph₃Sb σε τιμές r 0, 0.02, 0.05, 0.07, 0.10 και 0.12. ($r = [\text{ένωση}]/[\text{DNA}]$, $[\text{DNA}] = 1 \times 10^{-4} \text{ M}$).

Στα πειράματα προσδιορισμού της σταθεράς δέσμευσης K_b εξετάζεται η ισχύς δέσμευσης της υπό μελέτη ένωσης με το DNA. Σε αυτήν τη μέθοδο καταγράφονται τα φάσματα UV του TecAn, τετρακυκλίνης (TecH₂) και Ph₃Sb απουσία και παρουσία CT DNA σε τιμές r 1, 0.5, 0.25,

0.17, 0.125 και 0.1 ($r = [\text{ένωση}/\text{ένωση}] [\text{DNA}]$, $[\text{ένωση}] = 10 \mu\text{M}$, $[\text{CT DNA}] = 10\text{--}100 \mu\text{M}$).

Πραγματοποιούνται, επίσης, πειράματα control με DMSO [54].

3.2.3.2. Μελέτες φθορισμού

Η μέθοδος φασματοσκοπίας φθορισμού χρησιμοποιεί το βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr), μια φθορίζουσα ένωση που έχει την ικανότητα να παρεμβάλλεται σε δύο γειτονικές βάσεις της έλικας του DNA.

Σε αυτό το πείραμα εξετάζονται οι σχετικές ιδιότητες δέσμευσης του TecAn, της τετρακυκλίνης (TecH_2) και του Ph_3Sb στο CT DNA. Εάν η ένωση που προστίθεται μειώνει την ένταση του συμπλόκου EtBr-DNA τότε συμπαιρένεται ότι η υπό μελέτη ένωση αντικαθιστά το EtBr. Έτσι, καταγράφονται τα φάσματα εκπομπής στα 605 nm διαλυμάτων EtBr (2.3 μM) που περιέχουν CT DNA (26 μM) απουσία ή παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων TecAn (0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 και 800 μM) και τετρακυκλίνης (TecH_2) και Ph_3Sb (0, 100, 200, 300, 400, 500 και 600 μM) κατά τη διέγερσή τους στα 527 nm [55].

3.2.3.3. Μελέτες ιξωδομετρίας

Η μέτρηση του ιξώδους του DNA είναι μια αξιόπιστη και άμεση μέθοδος μέσω της οποίας μελετώνται οι αλληλεπιδράσεις των ενώσεων με το DNA ως συνάρτηση των υδροδυναμικών αλλαγών που προκαλούνται από τους συνδετικούς παράγοντες. Το μήκος του DNA αλλάζει κατά την επώασή του με την ένωση, επηρεάζοντας έτσι το ιξώδες του διαλύματος.

Για την εύρεση του ιξώδους παρασκευάζονται stock διαλύματα TecAn, τετρακυκλίνης (TecH₂) και Ph₃Sb συγκέντρωσης 10⁻³M. Αρχικά, πραγματοποιούνται μετρήσεις του ιξώδους του DNA και έπειτα προστίθεται αυξανόμενη συγκέντρωση της υπό μελέτη ένωσης σε μοριακές αναλογίες $r = 0-3.73$ ([TECAN]/[DNA]). Κάθε μέτρηση πραγματοποιείται τρεις φορές, με την ίδια διαδικασία να διεξάγεται και για το control πείραμα, όπου το CT DNA αντικαθίστανται από το ρυθμιστικό διάλυμα. Το κινηματικό ιξώδες των διαλυμάτων DNA με ή χωρίς TecAn, τετρακυκλίνη (TecH₂) και Ph₃Sb μετριέται με ιξωδόμετρο τύπου Ostwald, ενώ οι χρόνοι ροής καταγράφονται μέσω του προγράμματος Debut Video Capture Software [53].

3.2.3.4. Αναστολή της δράσης της λιποξυγενάσης

Για τη μελέτη του βαθμού αναστολής της LOX από τον αναστολέα (TecAn, TecH₂) χρησιμοποιήθηκε το βορικό οξύ ως ρυθμιστικό διάλυμα. Η παρασκευή του βορικού οξέος πραγματοποιείται με την ακόλουθη διαδικασία: 6.18 g βορικού οξέος (0.2M) διαλύονται σε 500 mL ddH₂O. Το pH του διαλύματος πρέπει να είναι 9 και για τη ρύθμισή του χρησιμοποιείται διάλυμα καυστικού νατρίου NaOH 50% w/v. Η μέτρηση του pH γίνεται με πεχάμετρο.

Έπειτα, παρασκευάζεται το διάλυμα του υποστρώματος (λινολεϊκό οξύ) με τον εξής τρόπο: 50 μ L λινολεϊκού οξέος διαλύονται σε 50 μ L 95% αιθανόλης σε ογκομετρική φιάλη. Ο κατάλληλος όγκος ddH₂O προστίθεται σταδιακά στη φιάλη με συνεχή ανάδευση. Το παρασκευασμένο διάλυμα (5 mL) προστίθεται σε 30 mL ρυθμιστικού διαλύματος. Η συγκέντρωση του αραιωμένου διαλύματος είναι 0.46 mM. Όλη η διαδικασία απαιτεί προσοχή, με κάθε σκεύος να απαραιώνεται προκειμένου να αποφευχθεί η οξείδωση του υποστρώματος.

Τέλος, παρασκευάζεται το διάλυμα του ενζύμου λιποξυγενάση (LOX). 1 mg λιποξυγενάσης περιέχει 131000 μονάδες (Units). Η μονάδα ορίζεται ως η ποσότητα του ενζύμου που είναι ικανή να αυξήσει την οπτική απορρόφηση κατά 0.001/min, σε μήκος κύματος $\lambda = 234$ nm, όταν προστεθεί σε διάλυμα 3 mL με λινολεϊκό οξύ. Με δεδομένο ότι σε 1 mL διαλύματος LOX περιέχονται 10000 μονάδες λιποξυγενάσης και σε 1 mg περιέχει 131000 μονάδες, ζυγίζεται στον αναλυτικό ζυγό μικρή ποσότητα ενζύμου σε erpendorf όπου και προστίθεται με προσοχή κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος. Έπειτα, το διάλυμα μεταφέρεται σε κωνική φιάλη με την ανάδευση να διαρκεί 4 ώρες σε παγόλουτρο. Όταν ολοκληρωθεί αυτό το μέρος της διαδικασίας το διάλυμα του ενζύμου χωρίζεται ανά mL σε erpendorfs με τα ίδια να αποθηκεύονται στον καταψύκτη.

Πειραματικά, η ενζυμική δραστηριότητα παρακολουθείται με ανάλυση UV. Ποσότητα ενζύμου (100 μ L) προστίθεται σε κυψελίδα που περιέχει 2 mL διαλύματος λινολεϊκού οξέος με τις κατάλληλες ποσότητες ρυθμιστικού διαλύματος και διαλυμάτων των αναστολέων (TecAn, TecH₂) συγκέντρωσης 10^{-2} M διαλυμένα σε DMSO. Η δράση του ενζύμου προσδιορίζεται παρακολουθώντας την αύξηση της απορρόφησης που προκαλείται από την οξείδωση του λινολεϊκού οξέος στα 234 nm ($\epsilon = 25\ 000\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$). Η συγκέντρωση του υποστρώματος διατηρείται σταθερή (0.3 mM), ενώ οι ποσότητες του ρυθμιστικού διαλύματος και των διαλυμάτων αναστολέα κυμαίνονται ανάλογα με τη συγκέντρωση των αναστολέων (έως 60 μ M). Όλα τα διαλύματα διατηρούνται σε θερμοκρασία 37 °C με τη χρήση υδατόλουτρου και κάθε μέτρηση πραγματοποιείται 3 φορές. Τέλος, από τα φάσματα υπολογίζεται ο βαθμός αναστολής συγκρίνοντας τη δράση που του ενζύμου απουσία ένωσης (100% δραστηριότητα) και τη δράση του κατά την προσθήκη της ένωσης [55].

3.2.3.5. Μετατροπή Sb(V) (TecAn) σε Sb(III) από GSH (IR)

Η αντίδραση οξειδοαναγωγής μεταξύ της GSH και του TecAn μελετάται χρησιμοποιώντας την υπέρυθη φασματοσκοπία (IR). Αρχικά παρασκευάζονται τα διαλύματα: H_2O_2 10^{-1}M , GSH $8 \times 10^{-2}\text{M}$ σε διαλύτη ddH₂O και TecAn 10^{-2}M σε διαλύτη MeOH. Έπειτα, σε ένα eppendorf προστίθενται 100 μL TecAn + 16 μL GSH με το διάλυμα να επωάζεται για 1 h στους 37 °C. Αντίστοιχα, σε ένα άλλο eppendorf προστίθενται 12.5 μL GSH + 77.5 μL MeOH + 10 μL H_2O_2 με το διάλυμα να επωάζεται, επίσης, για 1 h στους 37 °C. Μόλις ολοκληρωθεί η επώαση τα διαλύματα μεταφέρονται στον περιστροφικό εξατμιστήρα όπου και συμπυκνώνονται για 1 h. Η συμπυκνωμένη σκόνη, πλέον, μεταφέρεται με προσοχή στο όργανο IR όπου και λαμβάνονται τα φάσματα των δύο ενώσεων.

3.2.4. Μελέτες αντιμικροβιακής δράσης

3.2.4.1. Ζώνες Αναστολής (IZ)

Προτού αναλυθεί η πειραματική διαδικασία των ζωνών αναστολής αξίζει να αναφερθούν τα υλικά που απαιτούνται για τη παρασκευή των θρεπτικών μεσών. Κάθε βακτήριο χρησιμοποιεί το δικό του θρεπτικό μέσο. Έτσι, για την *Pseudomonas aeruginosa* χρησιμοποιούνται: tryptone (1%, 10g/L), yeast extract (0.5%, 5g/L) και NaCl (1%, 10g/L). Για τον *S. epidermidis* και τον *S. aureus* χρησιμοποιούνται tryptone (1.7%, 17g/L), soytone (0.3%, 3g/L), dextrose (0.25%, 2.5g/L), NaCl (0.5%, 5g/L), και K_2HPO_4 (0.25%, 2.5g/L) και την *E. coli* NaCl (1%, 10g/L), yeast extract (0.5%, 5g/L), soytone (0.3%, 3g/L).

Όλα τα σκεύη που χρησιμοποιούνται για τη διεξαγωγή αυτών των πειραμάτων (μπουκάλια, τιπς, τρυβλία, θρεπτικά μέσα, βαμβakoφόροι στειλεοί, κυλινδρικά χαρτάκια

διαμέτρου 10 mm) έχουν αποστειρωθεί. Τα πειράματα πραγματοποιούνται σε hood με laminar air flow ή υπό την παρουσία φλόγας προκειμένου να εξασφαλιστούν οι στείρες συνθήκες και να ελαττωθούν οι πιθανές επιμολύνσεις.

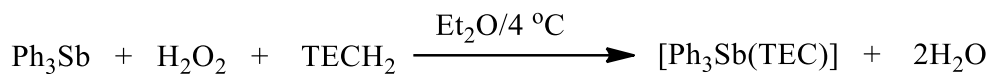
Μέσω αυτού του πειράματος υπολογίζεται η διάμετρος της ζώνης που αναπτύσσεται καθώς σταματά η ανάπτυξη των βακτηρίων. Εφόσον, λοιπόν, διαθέτουμε τα απαραίτητα θρεπτικά μέσα και βακτήρια, η μεθοδολογία είναι παρόμοια για κάθε είδος βακτηρίου. Πρώτα, λαμβάνεται ένα τρυβλίο και χωρίζεται σε τόσα τμήματα όσα και οι ουσίες που θα προστεθούν επάνω. Λαμβάνονται 2 mL NaCl 0.9% σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα και προστίθεται μια μικρή ποσότητα βακτηρίων έτσι ώστε να περιέχονται 10^8 βακτήρια. Ο έλεγχος πραγματοποιείται σε φωτόμετρο στα 620 nm με την απορρόφηση να δείχνει $A=0.1$. Μόλις ολοκληρωθεί αυτό το στάδιο ακολουθεί η αποστείρωση του βαμβακοφόρου στείλεου και η εμφύσησή του στον ορό για 20 sec. Έπειτα, απλώνεται από άκρη σε άκρη στο τρυβλίο περιστρέφοντάς το τουλάχιστον 3 φορές ανά 60 μοίρες. Εν συνεχεία τα κυλινδρικά χαρτάκια διαμέτρου 10 mm εμφύονται, επίσης για 20 sec, σε διάλυμα της υπό μελέτη ένωσης συγκέντρωσης $10^{-3}M$ και τοποθετούνται πάνω στο θρεπτικό. Τα τρυβλία τοποθετούνται στον επωαστήρα στους 25 °C για 24 h με τα αποτελέσματα να σκανάρονται. Όπου εμφανίζεται ζώνη αναστολής καταγράφεται το μήκος με τη χρήση χάρακα.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. Χημικό μέρος – Χαρακτηρισμός ένωσης

4.1.1. Σύνθεση

Για τη σύνθεση της ένωσης TecAn χρησιμοποιούνται ισομοριακές ποσότητες (1:1) τετρακυκλίνης (TecH_2) και τριφαινυλαντιμονίου (Ph_3Sb), παρουσία υδροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2), σε διαλύτη διαιθυλαιθέρα (Et_2O). Το διάλυμα διατηρείται σε παγόλουτρο. Η χημική αντίδραση της σύνθεσης παρουσιάζεται στο Σχήμα 1.



Σχήμα 1: Αντίδραση σύνθεσης TecAn

Το προϊόν που λαμβάνεται διηθείται και ξηραίνεται σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, διαλύεται σε ακετονιτρίλιο (MeCN) και διηθείται εκ νέου προκειμένου να απομακρυνθούν οι ακαθαρσίες. Το διαυγές πλέον διάλυμα συμπυκνώνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα και το στερεό TecAn συλλέγεται με διαιθυλαιθέρα (Et_2O). Η ένωση παραμένει σταθερή στον αέρα και αποθηκεύεται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου.

4.1.2. Σημείο τήξης

Το σημείο τήξεως προσδιορίζεται υπό αυξανόμενη θερμοκρασία και οι τιμές που λαμβάνονται δεν υπόκεινται σε διόρθωση. Τα σημεία τήξεως της ένωσης TecAn και των υποκαταστατών φαίνονται στον Πίνακα 2. Η διαφορά στις θερμοκρασίες μεταξύ TecAn και υποκαταστατών επιβεβαιώνει το σχηματισμό ενός νέου συμπλέγματος.

Πίνακας 2: Σημεία τήξης υποκαταστατών και TecAn

Ένωση	Σημείο τήξης
TecAn	149-154 °C
TecH ₂	171-174 °C
Ph ₃ Sb	49-52 °C

4.1.3. Διαλυτότητα

Σύμφωνα με τα δεδομένα του Πίνακα 3, το TecAn διαλύεται πλήρως στους διαλύτες CHCl₃, CH₂Cl₂, DMSO, DMF και ακετόνη, ενώ διαλύεται μερικώς στους διαλύτες MeOH και MeCN.

Πίνακας 3: Διαλυτότητα του TecAn

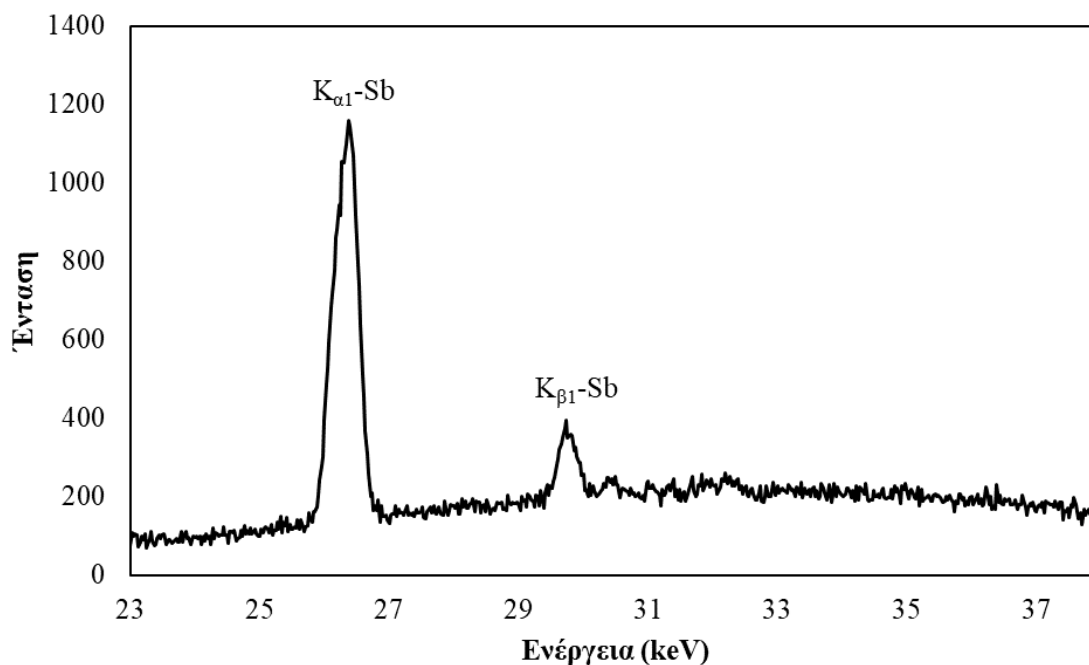
Διαλύτες	TecAn
n-hexane	✗
toluene	✗
CH ₂ Cl ₂	✓
CHCl ₃	✓
Acetone	✓
MeOH	✓
MeCN	✓
DMSO	✓
DMF	✓
ddH ₂ O	✗

4.1.4. Κρυοσκοπία

Οι κρυοσκοπικές μετρήσεις μοριακού βάρους πραγματοποιούνται σε διάλυμα DMSO/διπλά απεσταγμένου νερού (ddH₂O) (1:49) χρησιμοποιώντας οσμόμετρο σημείου πήξης. Το μοριακό βάρος βρίσκεται 799 g/mol (υπολογισμός θεωρητικού μοριακού βάρους: 795.5 g/mol) για μοριακό τύπο [Ph₃Sb(TEC)].

4.1.5. Φάσμα XRF

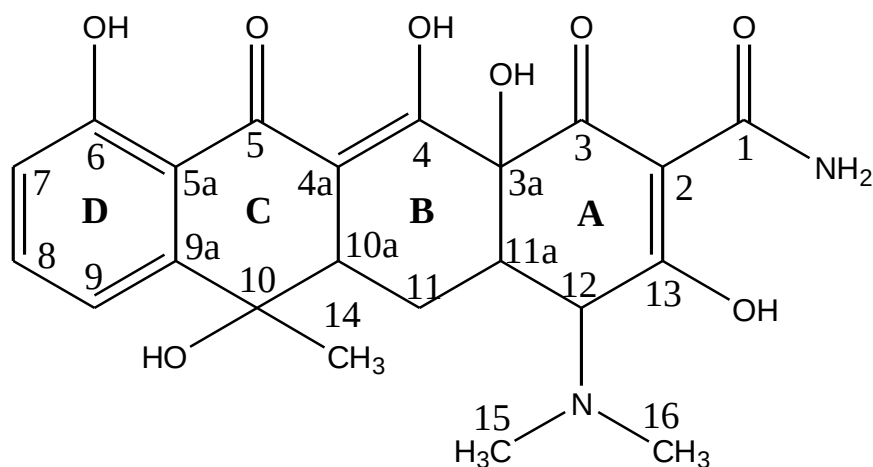
Το φάσμα XRF της σκόνης TecAn επιβεβαιώνει την παρουσία Sb στο σύμπλεγμα (Εικόνα 36), χάρη στις φασματικές καμπύλες $K_{\alpha 1}$ και $K_{\beta 1}$ που διαθέτουν τις χαρακτηριστικές ενέργειες των εκπεμπόμενων φωτονίων και είναι ίσες με 26.4 και 29.7 eV, αντίστοιχα. Η περιεκτικότητα σε αντιμόνιο στο TecAn προσδιορίζεται σε 14.86 % w/w $\pm$ 0.0018 (υπολογ. Sb: 15.31 % w/w) που αντιστοιχεί σε πειραματικό μοριακό βάρος MW=819.2 g/mol (υπολογ. MW=795.5×n g/mol, n= αριθμός άτομα Sb). Λαμβάνοντας υπόψη την ανάλυση XRF και τις κρυοσκοπικές μελέτες ο τύπος του TecAn είναι $[Ph_3Sb(TEC)]$.



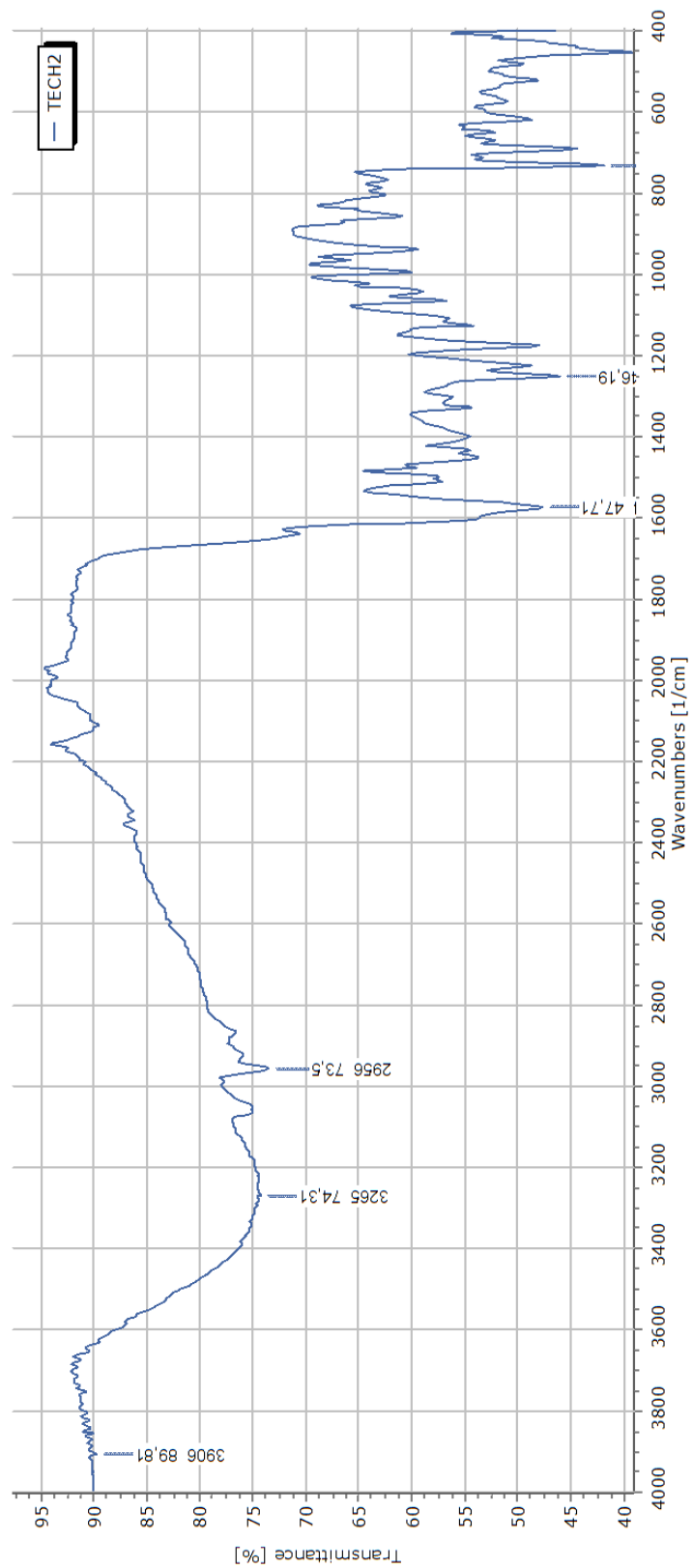
Εικόνα 36: Φάσμα XRF του TecAn

4.1.6. Φάσμα ATR-FT-IR

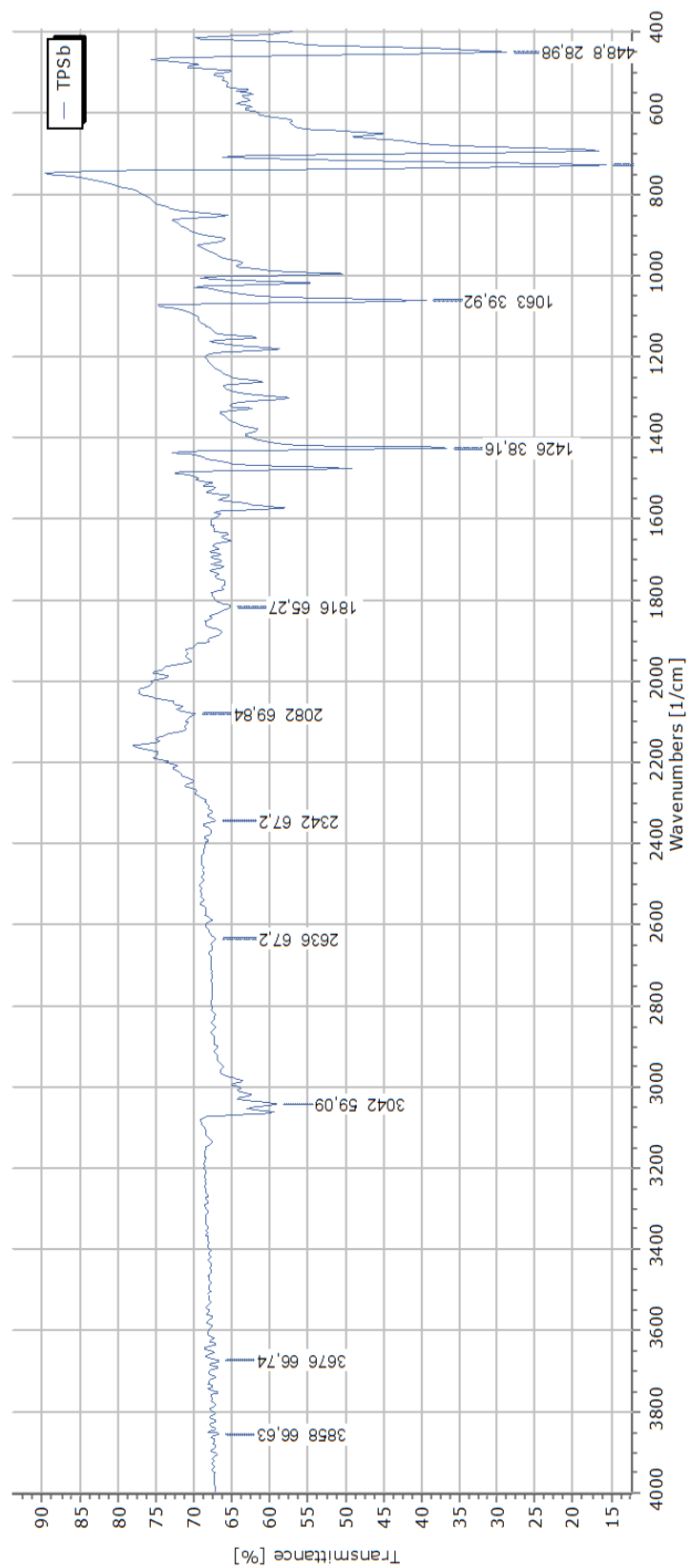
Η δόνηση του δεσμού $\text{H-C}_{\text{αλειφ.}}$ στο φάσμα IR του TecH_2 στα 2958 cm^{-1} παρατηρείται επίσης στο φάσμα του TecAn (Εικόνα 39). Η ταινία δόνησης στα 1640 cm^{-1} στο φάσμα FT-IR της τετρακυκλίνης αποδίδεται στο δεσμό $\nu(\text{O}=\text{C})$ (Σχήμα 2). Αυτή η ταινία μετατοπίζεται κατά 12 cm^{-1} (στα 1652 cm^{-1}) στο φάσμα του TecAn υποδηλώνοντας το ένταξη της TecH_2 με το Sb(V) μέσω καρβονυλικού ατόμου δότη οξυγόνου O. Η αντίστοιχη δονητική ταινία στα 1299 cm^{-1} που αποδίδεται το HO-C(13) (Σχήμα 2) στο φάσμα IR της TecH_2 παρατηρείται στα 1307 cm^{-1} στο φάσμα του TecAn υποδηλώνοντας την αύξηση της τάξης δεσμού στο $\text{H}\cdots\text{O}\cdots\text{C(13)}$ λόγω της ένταξης του O(C1) . Η ταινία δόνησης $\nu(\text{C-N}_{\text{str}})$ που παρατηρείται στα 1225 cm^{-1} στο φάσμα ATR-IR της TecH_2 μετατοπίζεται κατά 15 κυματικούς αριθμούς στα 1210 cm^{-1} υποδηλώνοντας την ένταξη του αντιβιοτικού από άτομο δότη O(C1) . Η δονητική ταινία στα 410 cm^{-1} στο φάσμα IR του TecAn αποδίδεται στη δόνηση του δεσμού Sb-O .



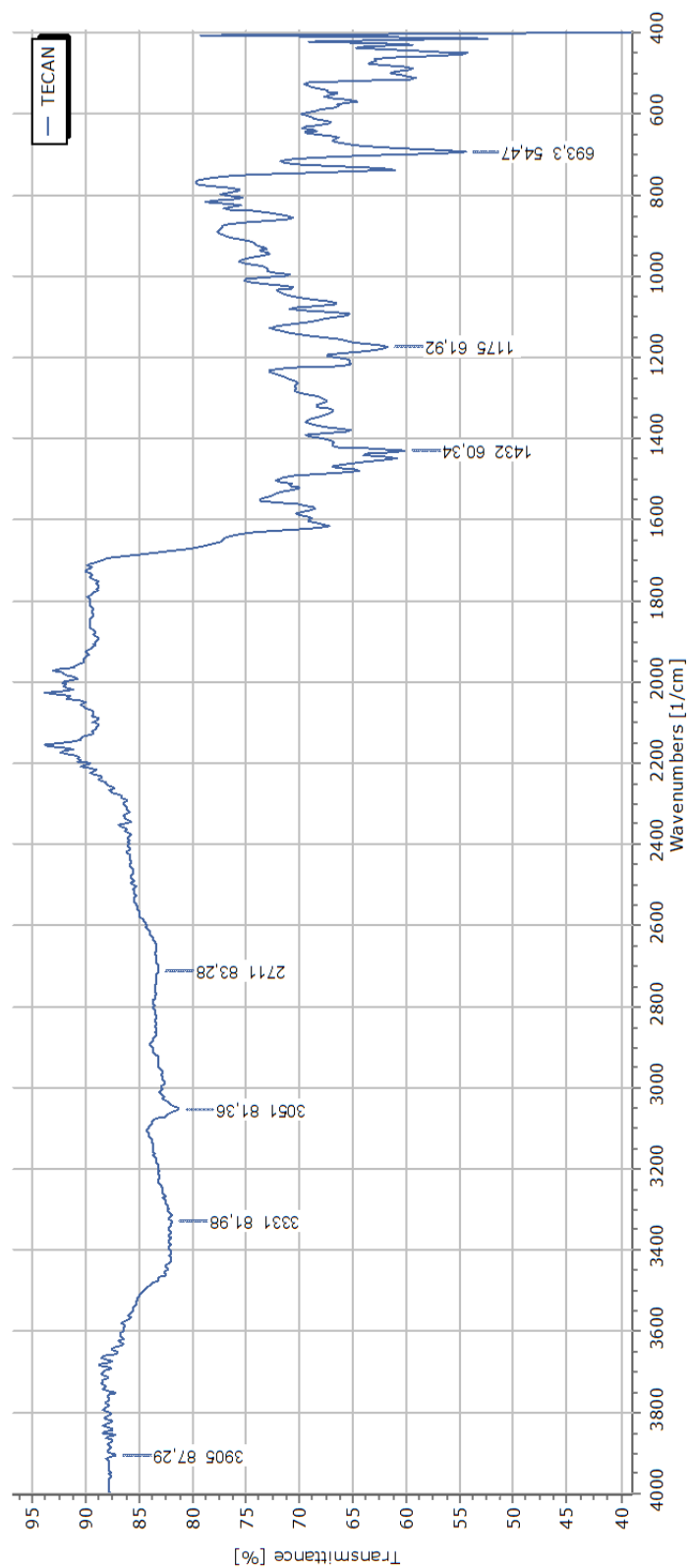
Σχήμα 2: Συντακτικός τύπος της τετρακυκλίνης TecH_2



Εικόνα 37: Φάσμα IR της TECH₂



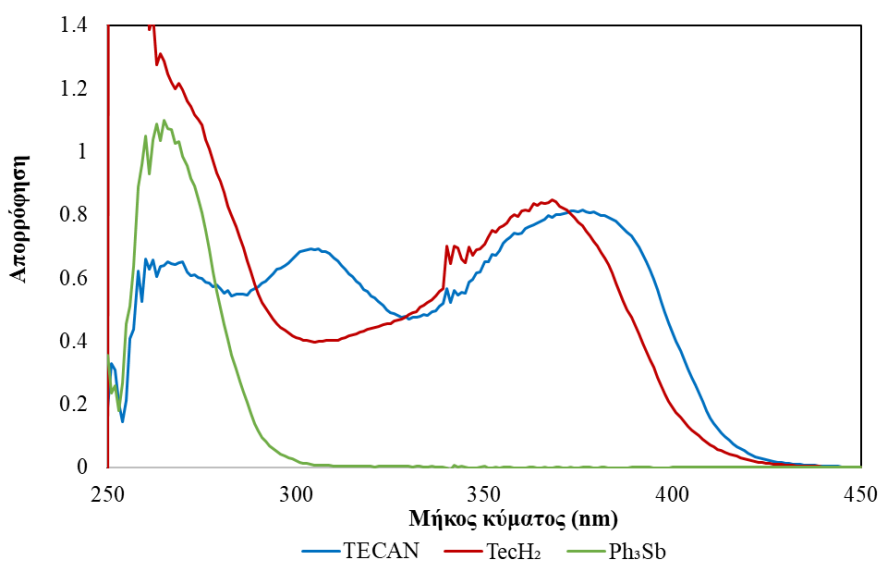
Εικόνα 38: Φάσμα IR του Ph_3Sb



Εικόνα 39: Φάσμα IR της ένωσης TecAn

4.1.7. Φάσμα UV/Vis

Τα φάσματα απορρόφησης UV/Vis των TecAn, TecH₂ και Ph₃Sb καταγράφονται σε διάλυμα DMSO (Εικόνα 40). Δύο ζώνες απορρόφησης στα 368 nm ($\epsilon = 17104 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) και 266 nm ($\epsilon = 25080 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) παρατηρούνται στο φάσμα του TecH₂, οι οποίες αποδίδονται σε μεταβάσεις $\pi^* \leftarrow \pi$. Το φάσμα του Ph₃Sb αποτελείται από μία ταινία απορρόφησης στα 266 nm ($\epsilon = 10740 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) η οποία αποδίδεται στη διέγερση των ηλεκτρονίων $\pi^* \leftarrow \pi$. Το αντίστοιχο φάσμα του TecAn δείχνει δύο ζώνες απορρόφησης στα 378 nm ($\epsilon = 16270 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) και στα 266 nm ($\epsilon = 13116 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) που αντιστοιχούν σε διεγέρσεις ηλεκτρονίων που είναι εντοπισμένα στον υποκαταστάτη $\pi^* \leftarrow \pi$. Η νέα ταινία απορρόφησης στα 304 nm ($\epsilon = 13968 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) στο φάσμα απορρόφησης του TecAn αποδίδεται στη διέγερση ηλεκτρονίου που είναι εντοπισμένο σε δεσμό μετάλλου-υποκαταστάτη. Η δημιουργία της νέας ταινίας και η μετατόπιση των 10 nm στην αντίστοιχη στα 368 nm επιβεβαιώνουν το σχηματισμό της ένωσης.



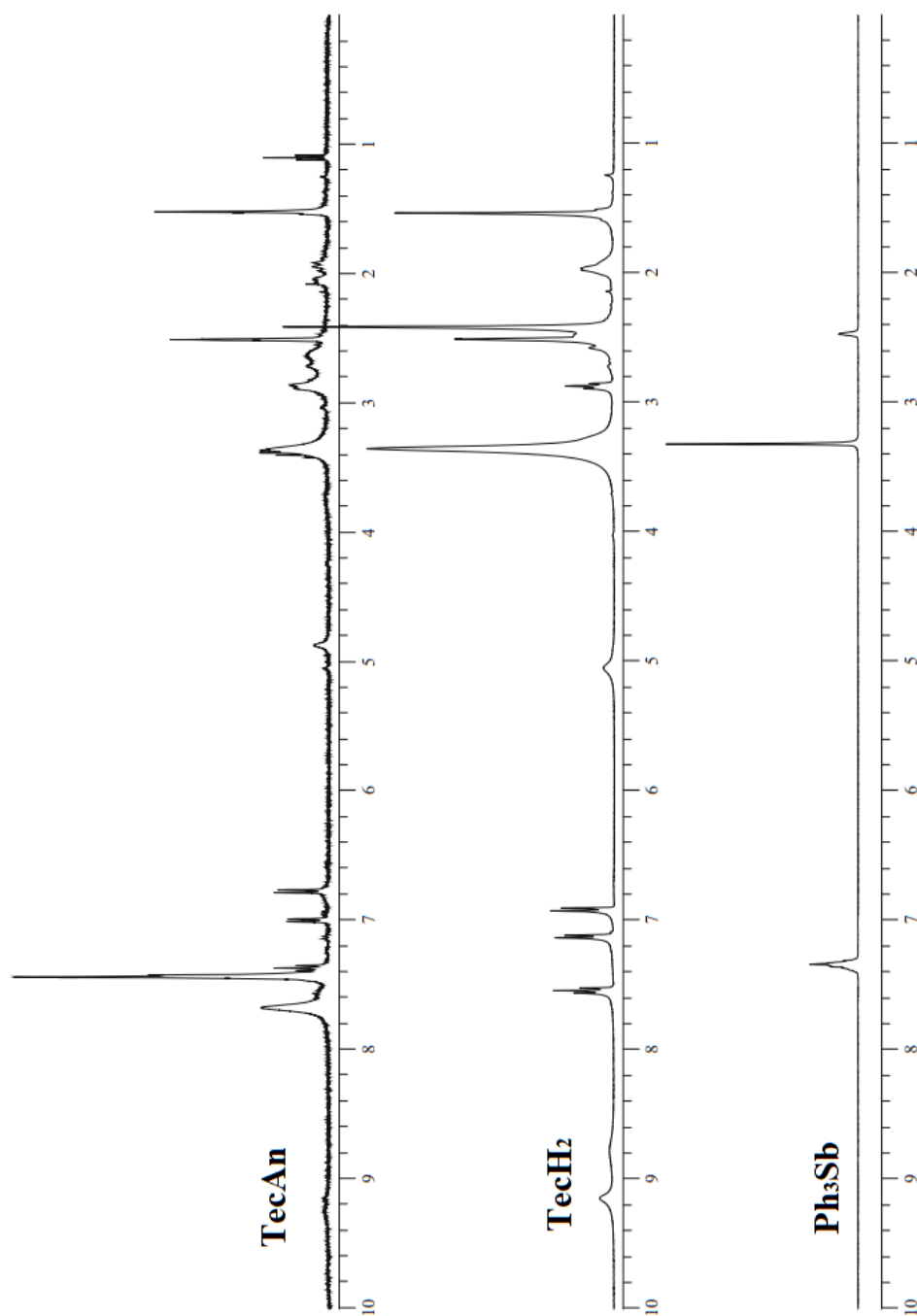
Εικόνα 40: Φάσμα απορρόφησης Uv/Vis των TecAn, TecH₂ και Ph₃Sb

4.1.8. Φάσμα $^1\text{H-NMR}$

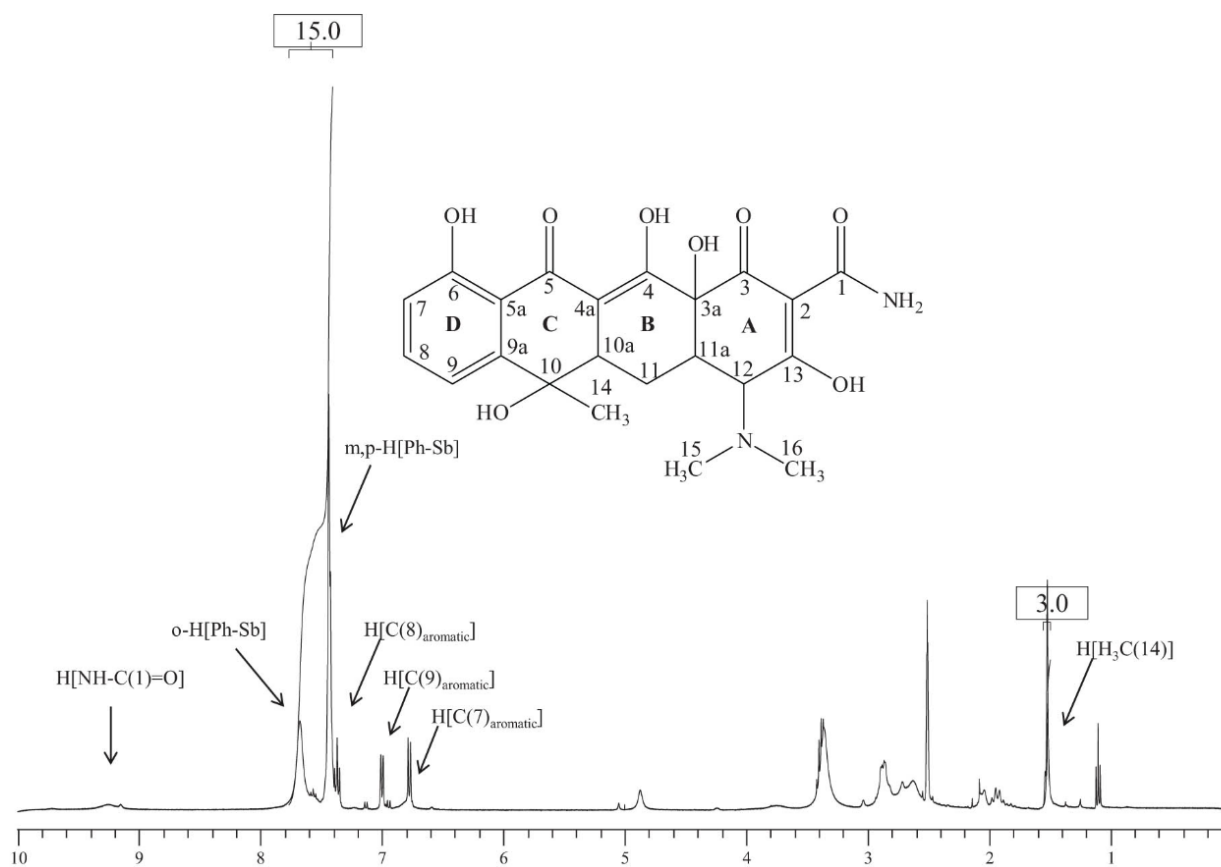
Τα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ των TecH_2 , Ph_3Sb και TecAn στο $\text{DMSO-}d_6$ φαίνονται στις Εικόνες 41 και 42. Τα ευρεία σήματα συντονισμού στα 9.15 και 8.78 ppm στο φάσμα της TecH_2 αποδίδονται στα πρωτόνια αμιδίου $\text{H}[\text{NH}_2\text{-C(1)=O}]$ (Σχήμα 2) [56]. Αυτά τα σήματα παρατηρούνται στα 9.21 και 9.25 ppm, αντίστοιχα, στο φάσμα του TecAn . Το σήμα συντονισμού στα 7.54 ppm στο φάσμα της TecH_2 αποδίδεται στο $\text{H}[\text{C(8)}_{\text{αρωματικό}}]$ του D δακτυλίου (Σχήμα 2), στα 7.12 ppm αποδίδεται στο $\text{H}[\text{C(9)}_{\text{αρωματικό}}]$ (Σχήμα 2) και το σήμα στα 6.91 ppm αντιστοιχεί στο $\text{H}[\text{C(7)}_{\text{αρωματικό}}]$ (Σχήμα 2) [56]. Κατά τον συντονισμό του ιόντος TecH_2 με το Sb(V) στο TecAn , αυτά τα σήματα μετατοπίζονται προς τα πάνω στα 7.37, 7.00 και 6.77 ppm αντίστοιχα, υποδηλώνοντας αποπρωτονίωση της ομάδας υδροξυλίου $\text{H}[\text{O-C(6)}]$. Τα αρωματικά πρωτόνια των φαινυλικών ομάδων του Ph_3Sb εμφανίζονται στα 7.39-7.31 ppm. Αυτά τα σήματα παρατηρούνται στα 7.74–7.62 (o- $\text{H}[\text{Ph-Sb}]$) και 7.44–7.42 ppm (p- $\text{H}[\text{Ph-Sb}]$) στο φάσμα του TecAn . Το ευρύ σήμα στα 5.06 ppm στο φάσμα της TecH_2 αντιστοιχεί στο υδροξυλικό $\text{H}[\text{O-C(10)}]$ πρωτόνιο [56], το οποίο παρατηρείται στα 4.88 ppm στο φάσμα του TecAn . Το σήμα συντονισμού στα 2.87 ppm στο φάσμα της TecH_2 αποδίδεται στο πρωτόνιο $\text{H}[\text{C(10a)}]$, ενώ το σήμα στα 2.0 ppm αφορά το πρωτόνιο $\text{H}[\text{C(11)}]$. Αυτά τα σήματα παρατηρούνται στα 2.87 και στα 2.04 ppm, αντίστοιχα, στο φάσμα του TecAn . Το σήμα στα 2.41 ppm αντιστοιχεί στα $\text{H}[\text{H}_3\text{C(15)}]$ και $\text{H}[\text{H}_3\text{C(16)}]$ της TecH_2 , ενώ εμφανίζεται στα 2.61 ppm στο TecAn . Το σήμα στα 1.50 ppm αποδίδεται στα μεθυλικά πρωτόνια του $\text{H}[\text{H}_3\text{C(14)}]$ και παραμένει αμετάβλητο.

Η αξιολόγηση του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ του TecAn οδηγεί στην καταγραφή τιμών $\Delta\delta$ σε σχέση με τις αντίστοιχες στην TecH_2 στο $\text{DMSO-}d_6$ (Πίνακας 4). Τα πρωτόνια που μετατοπίζονται έντονα είναι $\text{H}[\text{NH-C(1)=O}]$, $\text{H}[\text{H}_3\text{C(15)}]$ και $\text{H}[\text{H}_3\text{C(16)}]$ λόγω του συντονισμού της TecH_2 με το Sb μέσω ατόμων αμιδίου και καρβονυλικού οξυγόνου (Σχήμα 2). Η ολοκλήρωση των σημάτων

συντονισμού που αντιστοιχούν στο ο-H[Ph-] του φαινυλίου του Ph₃Sb στο TecAn (6 πρωτόνια) με εκείνα του μεθυλενίου H[C(14)] (3 πρωτόνια) επιβεβαιώνει τη μοριακή αναλογία 1:1 του Sb:TecH₂ στο TecAn (Εικόνα 42).

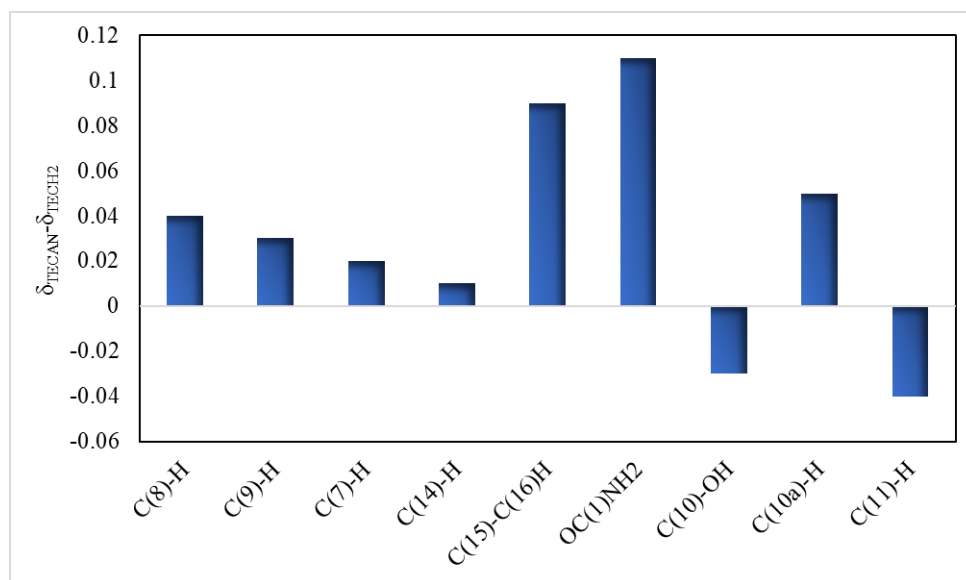


Εικόνα 41: Φάσματα ¹H-NMR των TecAn, TecH₂ και Ph₃Sb σε διάλυμα DMSO-d₆



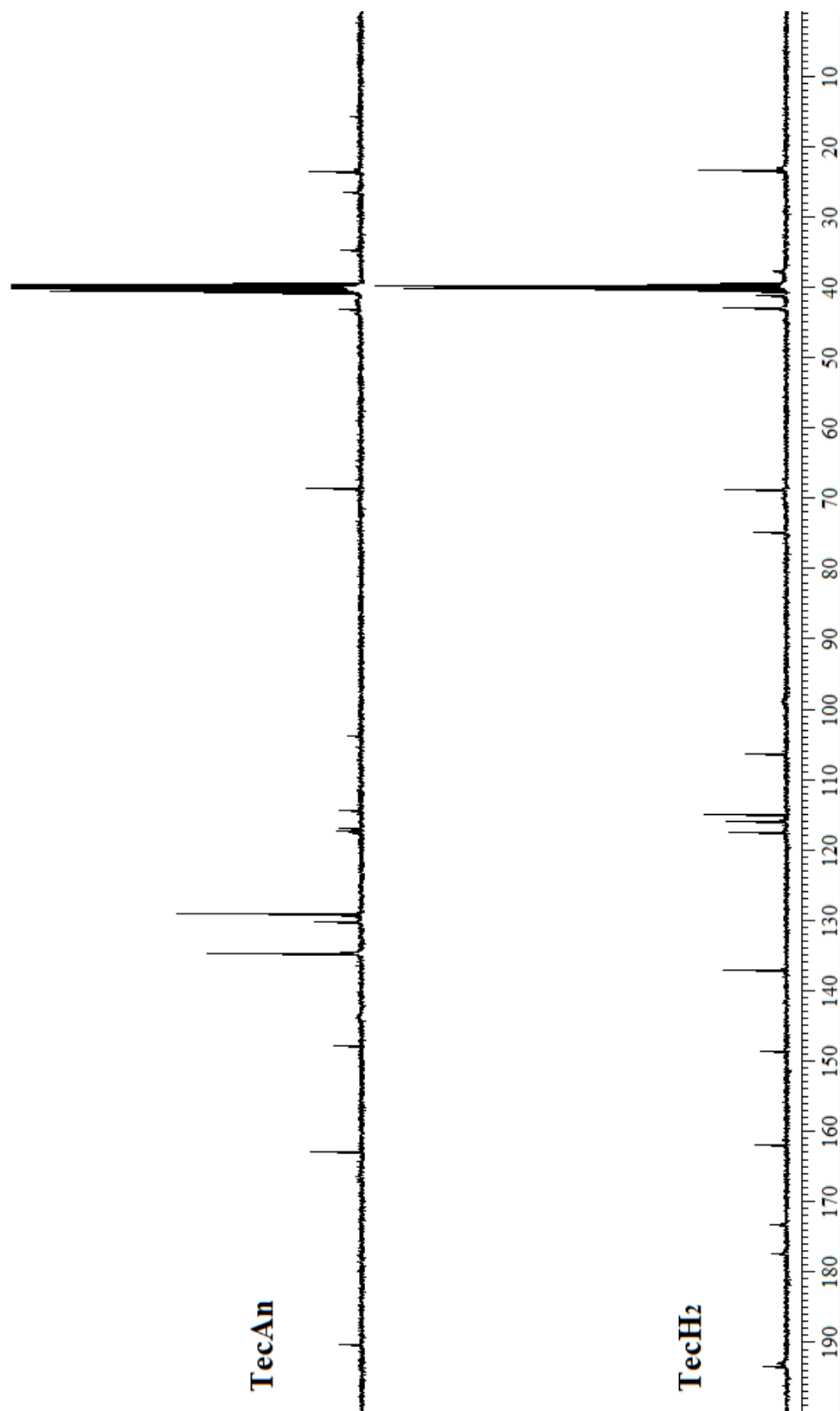
Εικόνα 42: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του TecAn σε διάλυμα DMSO-d_6 . Τα σήματα συντονισμού αποδίδονται στα αριθμημένα πρωτόνια και πραγματοποιείται ολοκλήρωση των κορυφών.

Πίνακας 4: Δδ των μετατοπίσεων στα σήματα των πρωτονίων μεταξύ του TecAn και της TeCH_2



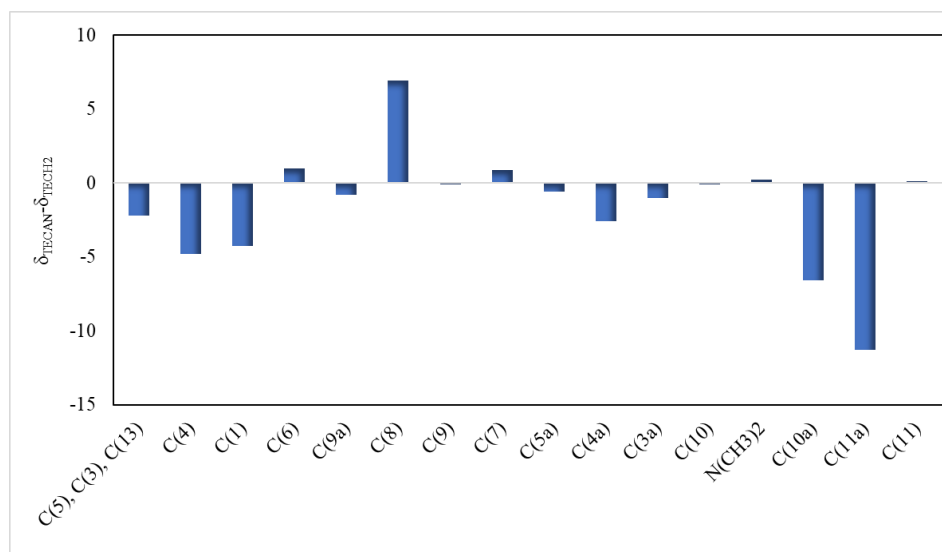
4.1.9. Φάσμα ^{13}C -NMR

Τα φάσματα ^{13}C -NMR των TecAn και TecH₂ στο DMSO-*d*₆ φαίνονται στην Εικόνα 43. Το σήμα συντονισμού στα 192.4 ppm στο φάσμα της TecH₂ αποδίδεται στους άνθρακες C(5), C(3), C(13) του Σχήματος 2 [57]. Το αντίστοιχο σήμα εμφανίζεται στα 190.2 ppm στο φάσμα του TecAn. Το σήματα συντονισμού στα 177.3, 173.13, και 161.9 ppm αντιστοιχούν στους άνθρακες C(4), C(1) και C(6) με βάση το Σχήμα 2, αντίστοιχα, στο φάσμα της TecH₂. Αυτά τα σήματα παρατηρούνται στα 172.5, 168.9 και 162.9 ppm στο φάσμα του TecAn. Στα 148.5 και 136.9 ppm παρατηρούνται δύο σήματα συντονισμού τα οποία αφορούν τους άνθρακες C(9a) και C(8), αντίστοιχα, στο φάσμα της TecH₂, ενώ αυτά τα σήματα μετατοπίζονται στα 147.7 και 143.8 ppm στο φάσμα του TecAn. Τα σήματα συντονισμού των ανθράκων C(9), C(7), C(5a) και C(4a) εντοπίζονται στα 117.4, 115.9, 114.9 και 106.3 ppm, αντίστοιχα, στο φάσμα της TecH₂. Τα σήματα αυτά όσον αφορά το φάσμα του TecAn μετατοπίζονται στα 117.3, 116.8, 114.3 και 103.7 ppm, αντίστοιχα. Το σήμα συντονισμού στα 68.6 ppm στο φάσμα της TecH₂ αποδίδεται στον άνθρακα C(10) (Σχήμα 2), και παρατηρείται ελάχιστη μετατόπιση στο φάσμα του TecAn στα 68.5 ppm. Επιπλέον, οι άνθρακες N(CH₃)₂, C(10a) και C(11a) συντονίζονται στα 42.9, 41.2 και 37.7 ppm, αντίστοιχα, στο φάσμα της TecH₂ με τα αντίστοιχα άτομα να μετατοπίζονται στα 43.1, 34.6 και 26.4 ppm, αντίστοιχα στο φάσμα του TecAn. Οι ισχυρές μετατοπίσεις που παρατηρούνται στα σήματα συντονισμού C(11a) και C(8) αποδίδονται σε δομές συντονισμού λόγω της ένταξης από το O(C1) και O(C3). Τέλος, το σήμα συντονισμού στα 23.4 ppm αντιστοιχεί στον C(11) του σχήματος 2, στο φάσμα της TecH₂, ενώ το ίδιο σήμα στο φάσμα του TecAn δεν έχει μετατοπιστεί σημαντικά καθώς βρίσκεται στα 23.5 ppm. Η αξιολόγηση του φάσματος ^{13}C -NMR του TecAn οδηγεί στην καταγραφή τιμών Δδ σε σχέση με τις αντίστοιχες στην TecH₂ στο DMSO-*d*₆ (Πίνακας 5).



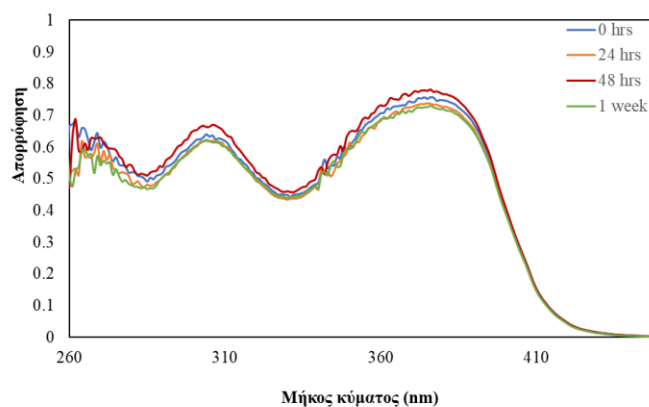
Εικόνα 43: Φάσματα ^{13}C -NMR των TecAn και TecH₂ σε διάλυμα $\text{DMSO-}d_6$

Πίνακας 5: Δδ των μετατοπίσεων στα σήματα των ανθράκων μεταξύ του TecAn και της TecH₂

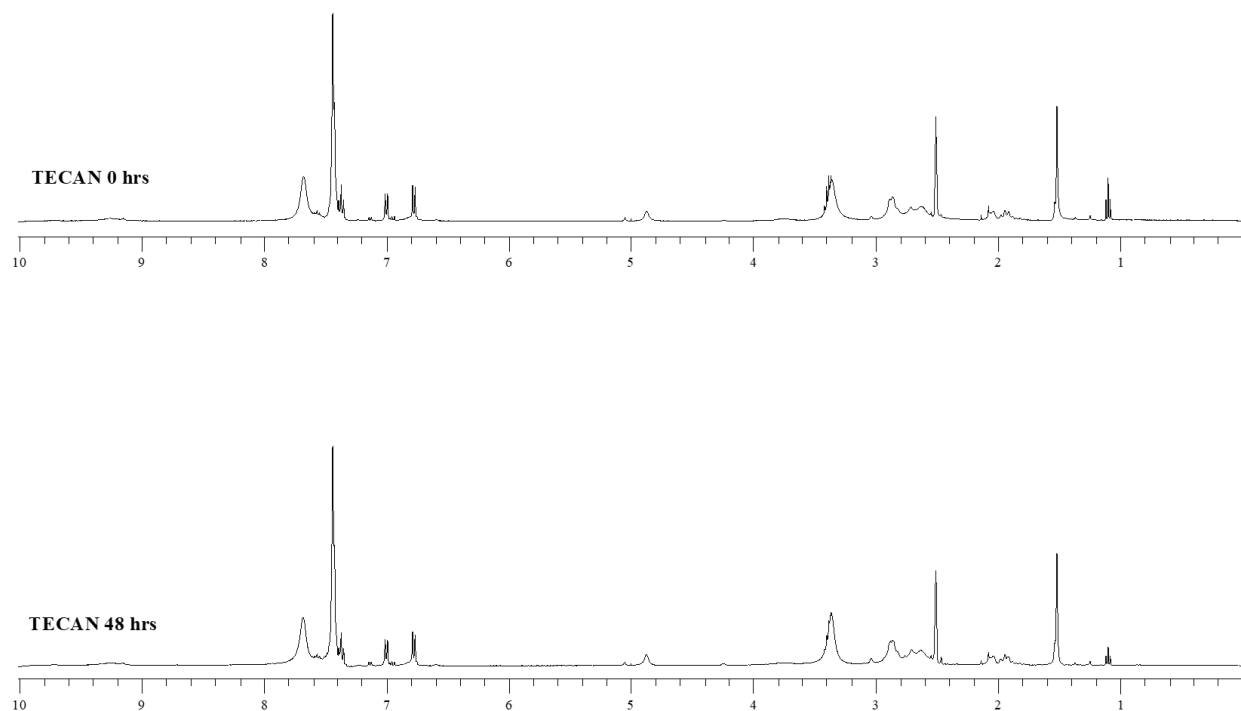


4.1.10. Σταθερότητα TecAn μέσω UV/Vis και ¹H-NMR

Η σταθερότητα του TecAn δοκιμάζεται με φασματοσκοπία UV (Εικόνα 44) και ¹H-NMR (Εικόνα 45) σε διάλυμα DMSO και DMSO-*d*₆, αντίστοιχα. Δεν παρατηρούνται αλλαγές μεταξύ των αρχικών φασμάτων UV και ¹H-NMR των πρόσφατα παρασκευασμένων διαλυμάτων και των αντίστοιχων που καταγράφονται έπειτα από 1 εβδομάδα για το UV και 48 h για το ¹H-NMR, επιβεβαιώνοντας τη διατήρηση της δομής του TecAn στο διάλυμα.



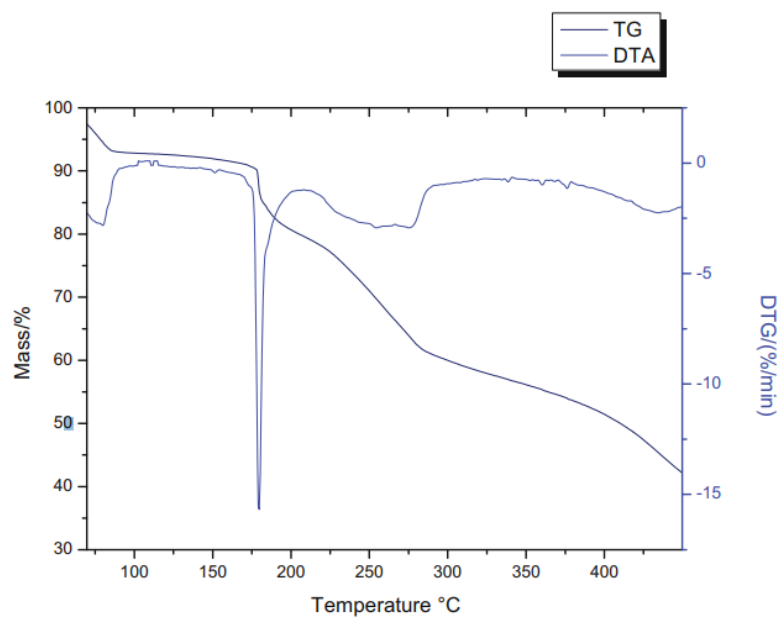
Εικόνα 44: Φάσμα UV του TecAn έπειτα από 1 εβδομάδα



Εικόνα 45: Φάσμα ^1H -NMR του TecAn έπειτα από 0 και 48 h

4.1.11. Φάσμα TG-DTA

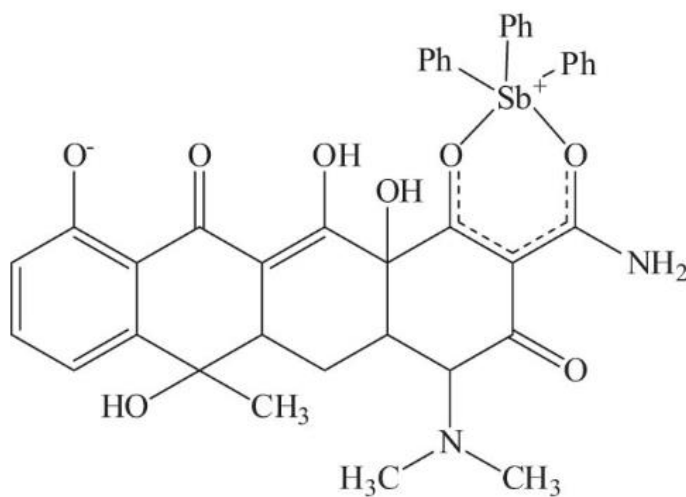
Η ανάλυση TG/DTA πραγματοποιείται υπό ροή αέρα με ρυθμό $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ έως $500\text{ }^\circ\text{C}$. Στο φάσμα TG/DTA (Εικόνα 46) δύο κύρια ενδόθερμα στάδια αποσύνθεσης παρατηρούνται για το TecAn: στους $170\text{--}200\text{ }^\circ\text{C}$ με απώλεια μάζας 10.3% που αντιστοιχεί στην έκλυση βενζολίου (Ph-H) από το Ph_3Sb (υπολογ. 9.8%), στους $200\text{--}285\text{ }^\circ\text{C}$ με απώλεια μάζας 19.3% που αντιστοιχεί στην έκλυση των άλλων δύο ομάδων φαινυλίου (Ph-H) του Ph_3Sb (υπολογ. 19.6%) και στους $296\text{--}450\text{ }^\circ\text{C}$ (απώλεια μάζας: 20%).



Εικόνα 46: Φάσμα TG/DTA του TecAn

4.1.12. Προτεινόμενη δομή

Με βάση όλες τις παραπάνω μεθόδους χαρακτηρισμού, η προτεινόμενη δομή της ένωσης TecAn είναι η εξής (Σχήμα 3):



Σχήμα 3: Προτεινόμενη δομή TecAn

4.2. Βιολογικό μέρος

4.2.1. Αποτελέσματα *in vivo* και *in vitro*

4.2.1.1. Μελέτη αντιπολλαπλασιαστικής δράσης *in vitro*

Η *in vitro* αντιπολλαπλασιαστική δράση του TecAn ελέγχεται έναντι δύο κυτταρικών σειρών ανθρώπινου αδenoκαρκινώματος του μαστού, MCF-7 (εξαρτώμενα από ορμόνες (HD)) και MDA-MB-231 (ανεξάρτητα από ορμόνες (HI)) με τη μέθοδο της σουλφοροδαμίνης B (SRB) μετά από επώαση για 48 ώρες. Οι τιμές IC_{50} του TecAn έναντι των MCF-7 (HD) και MDA-MB-231 (HI) είναι $26.0 \pm 1.4 \mu M$ και $27.8 \pm 0.9 \mu M$, αντίστοιχα (Πίνακας 6). Το αντιβιοτικό TecH₂ είναι ανενεργό έναντι και των δύο κυτταρικών σειρών στις συγκεντρώσεις που δοκιμάζονται (έως 40 μM). Επομένως, η σύζευξη τετρακυκλίνης με Ph₃Sb ενισχύει την αντιπολλαπλασιαστική δράση. Οι τιμές IC_{50} της σισπλατίνης είναι $6.8 \pm 0.3 \mu M$ (MCF-7(HD)) και $26.7 \pm 1.1 \mu M$ (MDA-MB-231(HI)). Ως εκ τούτου, το TecAn δεν εμφανίζει ισχυρότερη δράση από τη σισπλατίνη, αλλά παρουσιάζει παρόμοια δράση έναντι των κυττάρων MCF-7(HD) και MDA-MB-231(HI) υποδηλώνοντας ότι οι ορμονικοί υποδοχείς μπορεί να μην εμπλέκονται στον μηχανισμό δράσης της ένωσης.

4.2.1.2. Μελέτη τοξικότητας *in vitro*

Η τοξικότητα του TecAn εξετάζεται έναντι φυσιολογικών ανθρώπινων εμβρυϊκών ινοβλαστικών κυττάρων πνεύμονα (MRC-5). Η τιμή IC_{50} του TecAn έναντι των κυττάρων MRC-5 είναι $24.5 \pm 1.0 \mu M$, ενώ η αντίστοιχη τιμή της σισπλατίνης είναι $1.1 \pm 0.2 \mu M$. Ο Δείκτης Θεραπευτικής Ισχύος (TPI), ο οποίος ορίζεται ως το IC_{50} ενός παράγοντα έναντι μη καρκινικών κυττάρων προς το IC_{50} των καρκινικών κυττάρων, για το TecAn είναι 0.94 έναντι των MCF-7 (HD) και 0.88 έναντι των MDA-MB-231(HI), αντίστοιχα (Πίνακας 6). Δεδομένου ότι οι

αντίστοιχες τιμές TPI της σισπλατίνης έναντι των MCF-7 (HD) και MDA-MB-231(HI) είναι 0.20 και 0.04, το TecAn είναι σημαντικά πιο αποτελεσματικό έναντι των καρκινικών κυττάρων από τα φυσιολογικά κύτταρα από τη σισπλατίνη. Επιπλέον, ο Αμερικανικός Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) ορίζει έναν παράγοντα χωρίς εκλεκτικότητα μη τοξικό όταν εμφανίζει τιμή MTC/MEC μικρότερη από 2 (MTC = ελάχιστη τοξική συγκέντρωση και MEC = ελάχιστη αποτελεσματική συγκέντρωση) [56]. Έτσι, το TecAn θα μπορεί να θεωρηθεί ως τοξικός παράγοντας όπως θεωρείται και η σισπλατίνη, η οποία παρόλα αυτά αποτελεί ένα αντικαρκινικό φάρμακο με κλινική χρήση.

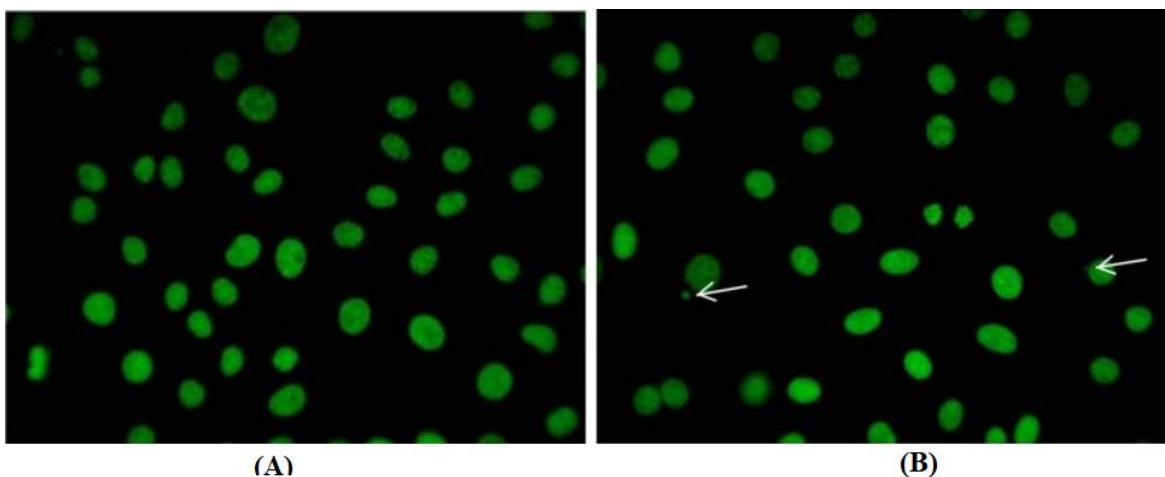
Πίνακας 6: Αντιπολλαπλασιαστική δράση των TecAn, TecH₂ και Ph₃Sb έναντι κυτταρικών σειρών MCF-7 (HD), MDA-MB 231 (HI) και MRC-5

Αντιπολλαπλασιαστική δράση	IC ₅₀ (μM)			TPI	
	MCF-7	MDA-MB-231	MRC-5	MCF-7	MDA-MB-231
TecAn	26.0±1.4	27.8±0.9	24.5±1.0	0.94	0.88
TecH₂	>40	>40	>40	-	-
Ph₃Sb	>30	>30	>30	-	-
Cisplatin	6.8 ± 0.3	26.7 ± 1.1	1.1 ± 0.2	0.20	0.04

4.2.1.3. Μελέτη της *in vitro* γενοτοξικότητας

Η *in vitro* γενετική βλάβη που προκαλείται από το TecAn προς τα κύτταρα MRC-5 αξιολογείται με τη μέθοδο των μικροπυρηνίσκων. Οι μικροπυρηνίσκοι σχηματίζονται κατά τη διέγερση της μετάφρασης-ανάφρασης της μίτωσης ενός φυσιολογικού κυττάρου, υπό την επίδραση ξενοβιοτικών παραγόντων (όπως χημικών). Εμφανίζονται κυρίως στα καρκινικά κύτταρα, με την ύπαρξή τους να είναι χαρακτηριστική ένδειξη γενοτοξικότητας και μεταλλαξογένεσης [56]. Τα

κύτταρα MRC-5 επωάζονται με TecAn στην τιμή IC_{50} . Η συχνότητα εμφάνισης μικροπυρηνίσκων των μη επεξεργασμένων κυττάρων (control) είναι $1.0 \pm 0.3\%$. Όταν τα κύτταρα MRC-5 υποβάλλονται σε επεξεργασία με TecAn, η συχνότητα εμφάνισης μικροπυρηνίσκων είναι $1.6 \pm 0.1\%$, εμφανίζοντας παρόμοια γενοτοξικότητα με εκείνη του control (Εικόνα 47). Η γενοτοξικότητα που προκαλείται από το TecAn είναι παρόμοια με εκείνη της σισπλατίνης, (συχνότητα εμφάνισης μικροπυρηνίσκων 1.6%).



Εικόνα 47: Φωτογραφίες από μη επεξεργασμένα κύτταρα MRC-5 (A) και μετά από την επεξεργασία τους με TecAn (B)

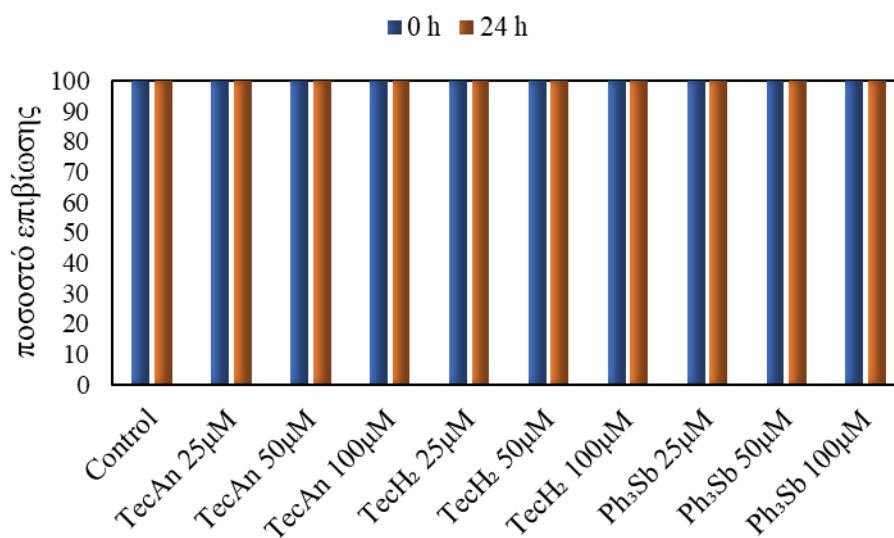
4.2.1.4. Μελέτη τοξικότητας *in vivo*

Προκειμένου να εξεταστεί η *in vivo* τοξικότητα του TecAn, χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία γαρίδας άλμης *Artemia salina*. Πολλά χαρακτηριστικά της γαρίδας άλμης, όπως η ευρεία κατανομή της, ο σύντομος κύκλος ζωής και η ευαισθησία σε τοξικές ουσίες, την καθιστούν τον ιδανικό υποψήφιο για τη διεξαγωγή αυτής της δοκιμής [56].

Το ποσοστό επιβίωσης (%) των προνυμφών *Artemia salina* σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις διαλυμάτων με ή χωρίς TecAn, $TecH_2$ και Ph_3Sb μετά από 24 h αξιολογείται και η θνησιμότητα σημειώνεται ως προς τους θανάτους των προνυμφών (Πίνακας 7). Οι

συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται είναι 25, 50 και 100 μM . Για αυτές τις συγκεντρώσεις τα ποσοστά επιβίωσης είναι 100%, αν και είναι έως και 4 φορές υψηλότερες από τις τιμές IC_{50} για το TecAn. Συμπεραίνεται ότι καμία από τις ενώσεις που χρησιμοποιούνται δεν είναι τοξική προς την *Artemia salina*.

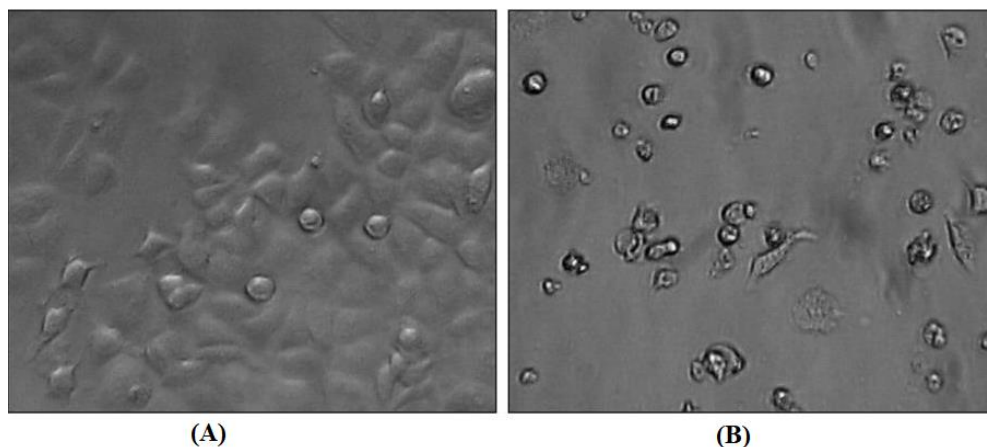
Πίνακας 7: Ποσοστά επιβίωσης της *Artemia salina* μετά από επώαση 24 ωρών με τις ουσίες TecAn, Tech_2 και Ph_3Sb



4.2.1.5. Μελέτη μορφολογίας κυττάρων

Τα κύτταρα MCF-7 υποβάλλονται σε επεξεργασία με TecAn στις τιμές IC_{50} για 48 h και παρατηρούνται σε ανεστραμμένο μικροσκόπιο, προκειμένου να εκτιμηθεί ο τύπος του θανάτου τους με βάση τη μορφολογία τους. Στην Εικόνα 48 παρουσιάζονται οι μορφολογικές αλλαγές. Ο πολλαπλασιασμός των μη επεξεργασμένων κυττάρων MCF-7 (HD) είναι φυσιολογικός εφόσον τα κύτταρα είναι επιμήκη, προσκολλώνται στο ταπήτιο και παρουσιάζουν κυτταρική ανάπτυξη. Ωστόσο, η μορφολογία των κυττάρων που υποβλήθηκαν σε επώαση με TecAn τροποποιήθηκε. Τα κύτταρα έχασαν τη χαρακτηριστική μορφολογία τους, συρρικνώθηκαν και έγιναν στρογγυλά,

αποκολλήθηκαν από το ταπήτιο του τρυβλίου, χάθηκε η κυτταρική επαφή μεταξύ τους και σχημάτισαν νησίδες στρογγυλεμένων κυττάρων σε αντίθεση με τα κύτταρα που δεν υποβλήθηκαν σε επεξεργασία [56]. Συμπερασματικά, πρόκειται για έναν αποπτωτικό τύπο κυτταρικού θανάτου, μετά την επεξεργασία των κυττάρων MCF-7 με TecAn, όπως αντίστοιχα και στη σισπλατίνη.



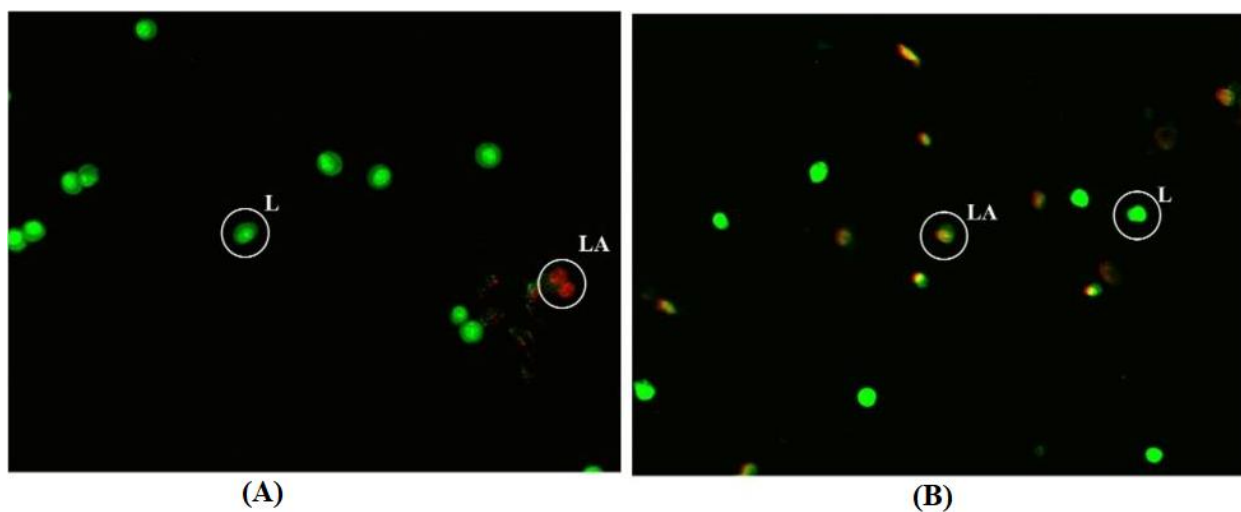
Εικόνα 48: Μορφολογικές αλλοιώσεις που παρατηρούνται στα μη επεξεργασμένα κύτταρα MCF-7 (A) και μετά από την επεξεργασία τους με TecAn (B)

4.2.1.6. Δοκιμασία χρώσης Acridine Orange/Ethidium Bromide (AO/EB)

Ο αποπτωτικός ή ο νεκρωτικός κυτταρικός θάνατος αξιολογείται με τη δοκιμασία χρώσης AO/EB. Το πορτοκαλόχρωμο της ακριδίνης (AO) είναι μια διαπερατή από τα κύτταρα φθορίζουσα χρωστική ουσία και χρωματίζει το πυρηνικό DNA τόσο σε ζωντανά όσο και σε νεκρά κύτταρα, ενώ το βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) είναι μια φθορίζουσα χρωστική ουσία που χρωματίζει μόνο το πυρηνικό DNA σε κύτταρα που έχουν χάσει την ακεραιότητα της μεμβράνης τους [56]. Με αυτόν τον τρόπο, παρατηρούνται τέσσερις διαφορετικοί τύποι κυττάρων, ανάλογα με την εκπομπή φθορισμού και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των χρωματισμένων πυρήνων. (i) τα ζωντανά κύτταρα είναι ομοιόμορφα πράσινα χρωματισμένα, (ii) τα πρώιμα αποπτωτικά κύτταρα χρωματίζονται πρασινοκίτρινα ή εμφανίζονται πράσινα-κίτρινα θραύσματα, (iii) τα όψιμα αποπτωτικά κύτταρα χρωματίζονται πορτοκαλί ή εμφανίζονται πορτοκαλί θραύσματα και (iv) τα

νεκρωτικά κύτταρα δείχνουν πορτοκαλί-κόκκινο χρωματισμό, χωρίς ένδειξη κατακερματισμού της χρωματίνης, φθορίζουν ομοιόμορφα το ερυθρό χρώμα και είναι διογκωμένα [56].

Τα μη επεξεργασμένα κύτταρα MCF-7 που εμφανίζουν φωτεινούς ομοιόμορφους πράσινους πυρήνες με οργανωμένο πυρήνα φαίνονται στην Εικόνα 49. Το ποσοστό απόπτωσης και νέκρωσης στην ομάδα ελέγχου (control) υπολογίζεται ότι είναι $26.8 \pm 1.5\%$ και 0% , αντίστοιχα. Στην περίπτωση των κυττάρων που υποβάλλονται σε θεραπεία με TecAn, παρατηρείται συρρίκνωση, συμπύκνωση της χρωματίνης και φυσαλίδες της πλασματικής μεμβράνης, υποδεικνύοντας ότι η πλειονότητα των κυττάρων υφίσταται αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο (Εικόνα 49). Το ποσοστό των αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων κατά τη θεραπεία με TecAn είναι $56.2 \pm 0.2\%$ και 0% . Όταν τα κύτταρα MCF-7 επωάζονται με σισπλατίνη, το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων αυξάνεται έως και 96.5% . Επομένως, το TecAn προκαλεί απόπτωση αλλά όχι στο μέγεθος που προκαλεί η σισπλατίνη.

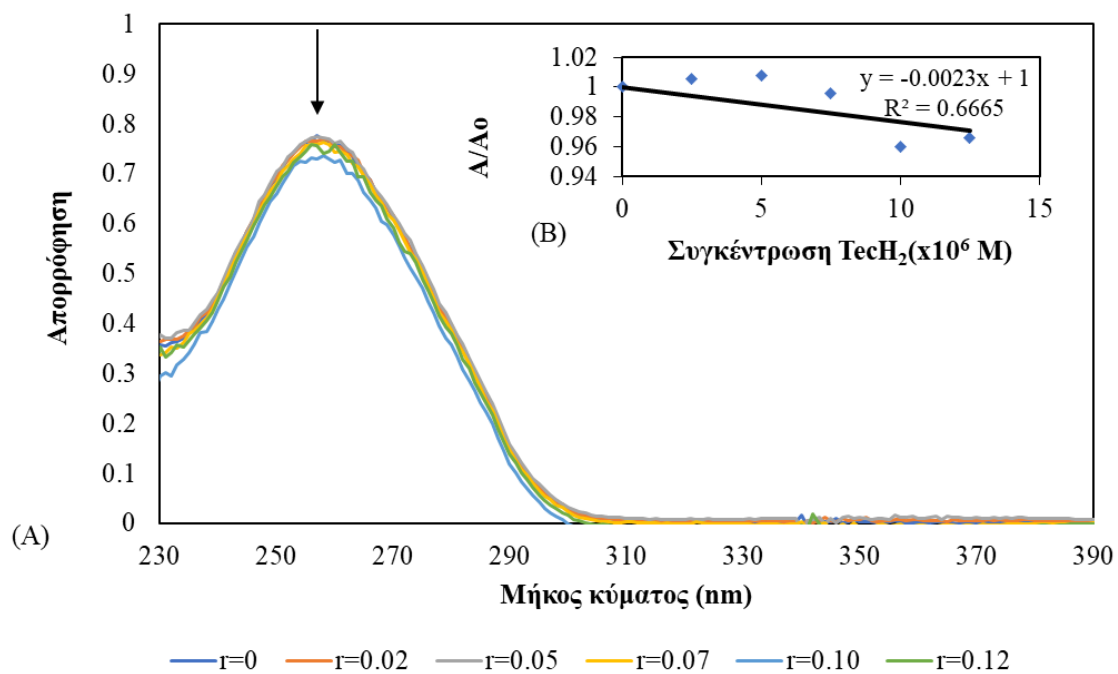
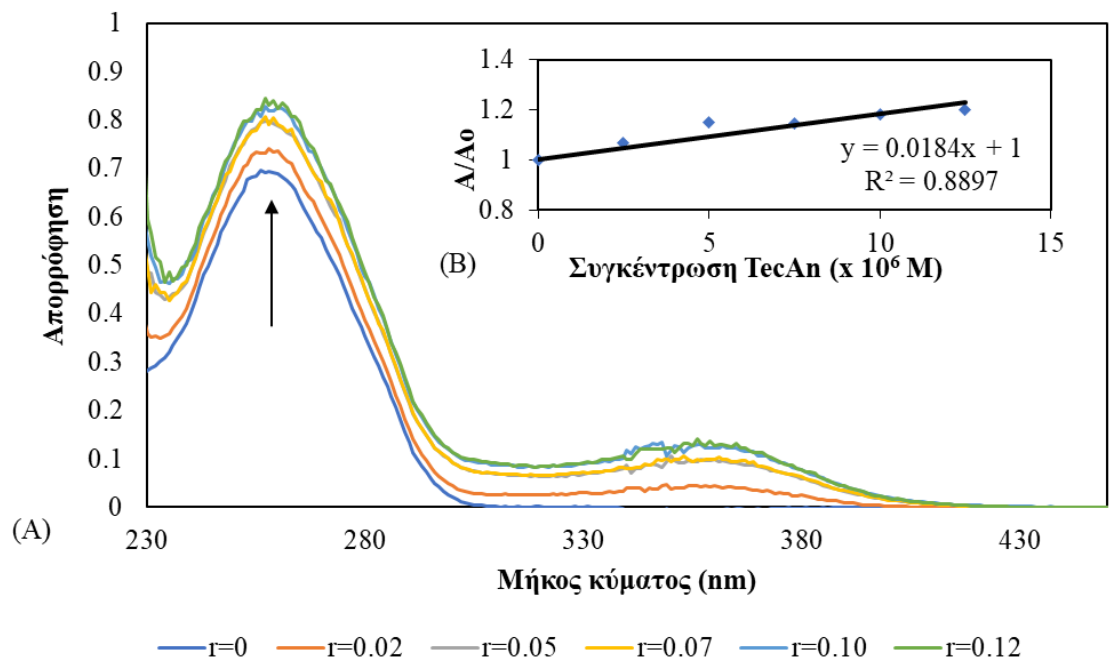


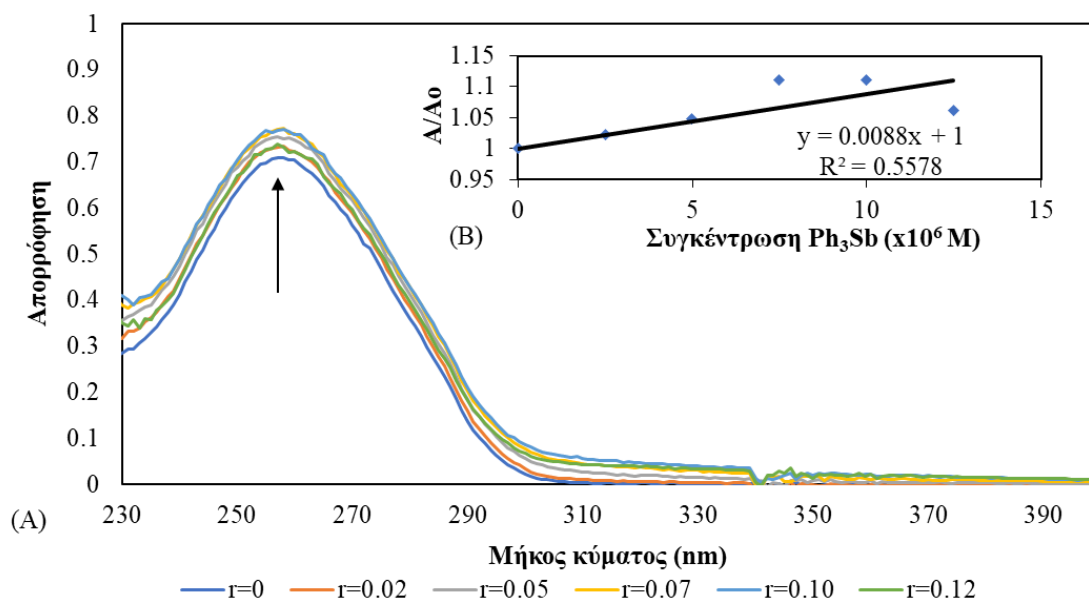
Εικόνα 49: Εικόνες φθορισμού των μη επεξεργασμένων κυττάρων MCF-7 (A), και των επεξεργασμένων κυττάρων με TecAn (b) για 48 h στους 37 °C στην τιμή IC₅₀, τα οποία χρωματίζονται με AO/EB. Το "L" υποδεικνύει ζωντανά κύτταρα, ενώ το "LA" υποδηλώνει όψιμα αποπτωτικά κύτταρα.

4.2.2. Αποτελέσματα *ex vivo*

4.2.2.1. Αλληλεπίδραση DNA με TecAn μέσω UV/Vis

Προκειμένου να εξεταστεί η ισχύς δέσμευσης του TecAn στο CT DNA χρησιμοποιείται φασματοσκοπία απορρόφησης UV-Vis. Όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 1.3.2., υπάρχουν τρεις πιθανοί τρόποι δέσμευσης με το DNA: (i) ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση με τα αρνητικά φορτισμένα νουκλεϊκά σάκχαρα-φωσφορικά, (ii) δέσμευση στις αύλακες της διπλής έλικας του DNA και (iii) παρεμβολή μεταξύ των στοιβαγμένων ζευγών βάσεων του DNA. Οι αλλαγές στη διαμόρφωση της διπλής έλικας του DNA μπορούν να αποδοθούν σε υποχρωμικά και υπερχρωμικά φαινόμενα. Συγκεκριμένα, ο υποχρωμισμός αντιστοιχεί σε παρεμβαλλόμενο και ηλεκτροστατικό τρόπο δέσμευσης και χαρακτηρίζεται από μείωση της απορρόφησης, ενώ ο υπερχρωμισμός είναι υπεύθυνος για τη θραύση των δεσμών υδρογόνου και για την σύνδεση της ένωσης στις αύλακες του DNA, καθώς χαρακτηρίζεται από αύξηση της απορρόφησης [56]. Μια σημαντική αύξηση στην ένταση απορρόφησης (σε $\lambda_{\max} = 258 \text{ nm}$) παρατηρείται με την παρουσία και απουσία TecAn σε διάφορες τιμές r ($r = [\text{ένωση}]/[\text{DNA}]$) σε μια σταθερή συγκέντρωση $[\text{DNA}] = 1 \times 10^{-4} \text{ M}$ (Εικόνα 50). Ο υπερχρωμισμός είναι 13.92% και υποδηλώνει είτε θραύση δεσμών υδρογόνου είτε δέσμευση του TecAn στην αύλακα του DNA. Όσον αφορά τους υποκαταστάτες, η TecH_2 εμφανίζει υποχρωμισμό σε ποσοστό 2.29% και το Ph_3Sb υπερχρωμισμό σε ποσοστό 5.96% (Εικόνα 50).





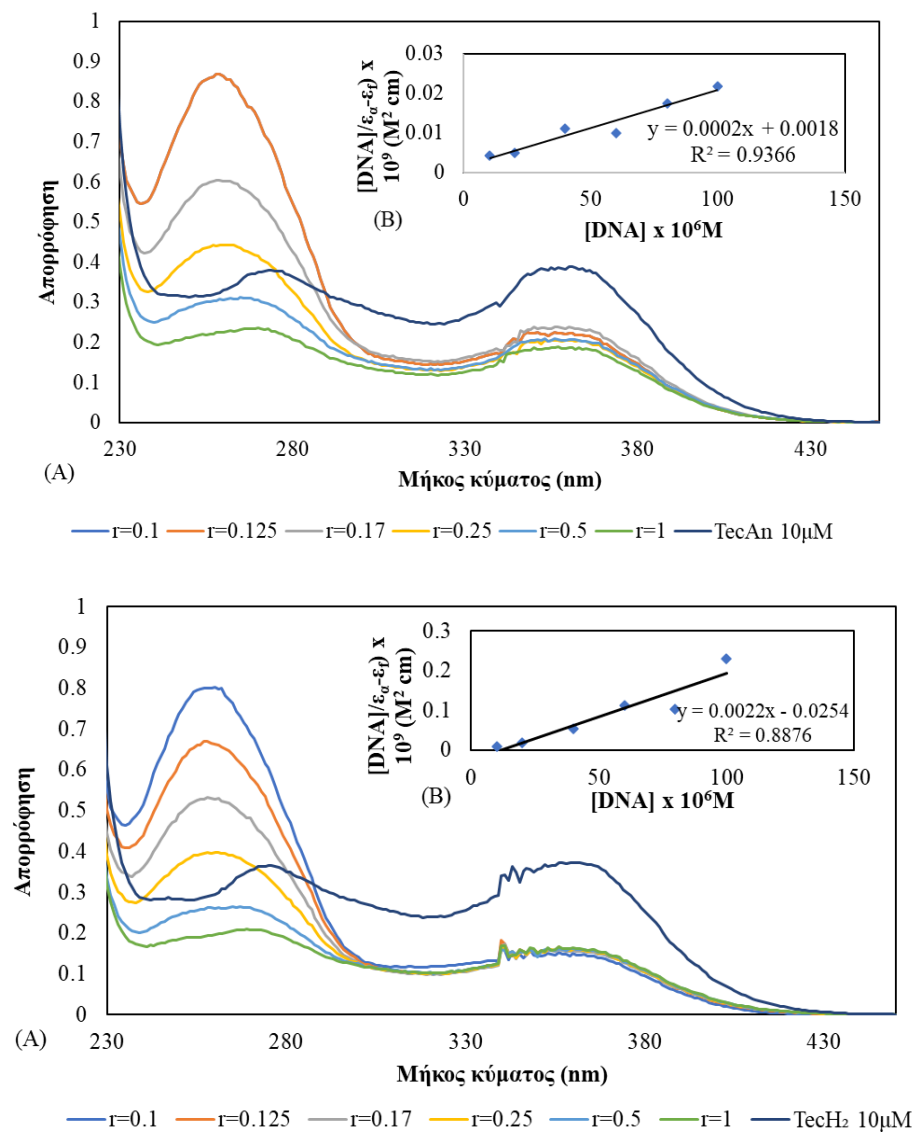
Εικόνα 50: (Α) Φάσματα UV/Vis του CT-DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα απουσία και παρουσία TecAn, TecH₂, Ph₃Sb σε διάφορες τιμές r (0, 0.02, 0.05, 0.07, 0.10 και 0.12· r = [ένωση]/[DNA], [DNA] = 10⁻⁴ M) και (Β) διάγραμμα A/A₀ vs [ένωση] στα 258 nm

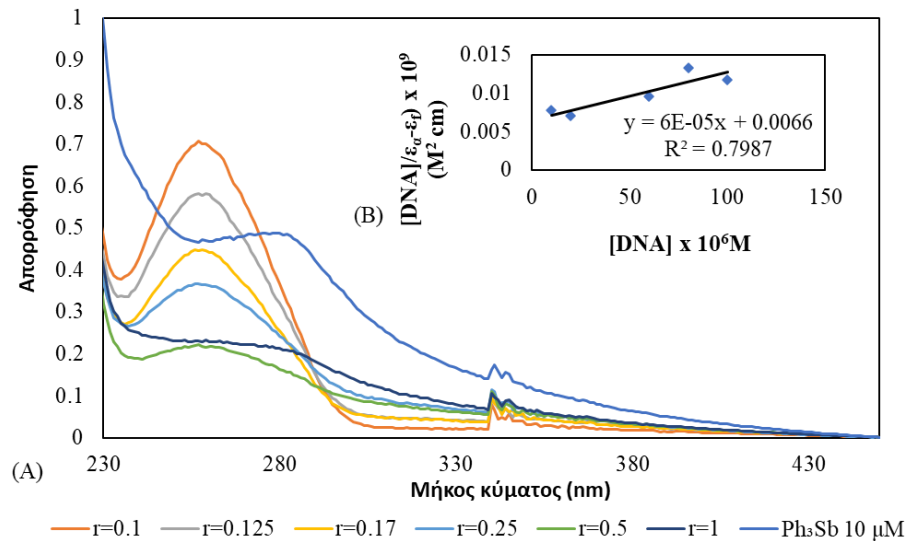
Η σταθερά δέσμευσης (K_b) του TecAn προς το CT DNA αξιολογείται παρακολουθώντας τις αλλαγές στην απορρόφηση των φασμάτων UV της ένωσης, ([Ένωση] = 10 μM), στα 370-380 nm, με αυξανόμενη συγκέντρωση CT-DNA (Εικόνα 51). Το K_b λαμβάνεται από τον λόγο της κλίσης προς την τομή y σε γραφήματα [DNA]/($\epsilon_A - \epsilon_f$) έναντι [DNA], σύμφωνα με την ακόλουθη εξίσωση [56]:

$$\frac{[DNA]}{(\epsilon_A - \epsilon_f)} = \frac{[DNA]}{(\epsilon_b - \epsilon_f)} + \frac{1}{K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)}$$

όπου [DNA] είναι η συγκέντρωση του CT DNA, $\epsilon_A = A_{\text{obsd}}/[\text{ένωση}]$, ϵ_f είναι ο συντελεστής απόσβεσης για την ελεύθερη ένωση και ϵ_b είναι ο συντελεστής απόσβεσης για την ένωση στην πλήρως δεσμευμένη μορφή. Η σταθερά σύνδεσης DNA (K_b) για το TecAn είναι $(11.08 \pm 0.53) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. Επιπλέον, οι τιμές K_b της τετρακυκλίνης (TecH₂) και του τριφαινυλαντιμονίου (Ph₃Sb) είναι

$(7.2 \pm 0.79) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ και $(3.7 \pm 1.1) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, αντίστοιχα, αποκαλύπτοντας σημαντικά ασθενέστερες αλληλεπιδράσεις σε σύγκριση με το TecAn.





Εικόνα 51: (Α) Φάσματα UV των TecAn, TecH₂, Ph₃Sb απουσία και παρουσία CT DNA σε τιμές r 1, 0.5, 0.25, 0.17, 0.125 και 0.1 ($r = [\text{ένωση}]/[\text{DNA}]$, $[\text{ένωση}] = 25 \mu\text{M}$, $[\text{CT DNA}] = 10\text{--}100 \mu\text{M}$). (Β) Γραφικό διάγραμμα $[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ vs $[\text{DNA}]$

4.2.2.2. Αλληλεπίδραση DNA με TecAn μέσω Φθορισμού

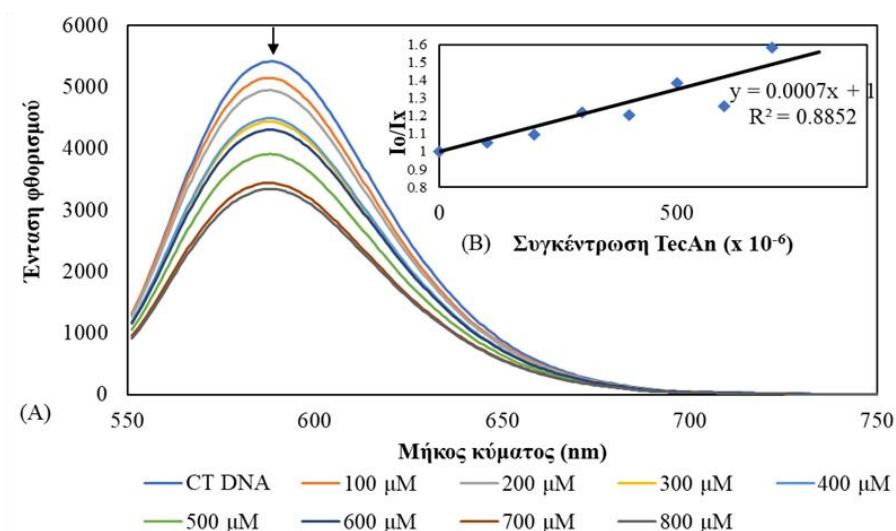
Οι ιδιότητες σύνδεσης του TecAn προς το DNA μελετώνται περαιτέρω με φασματοσκοπία φθορισμού. Το βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr), είναι ένας ισχυρός παρεμβολέας του DNA και για το λόγο αυτό εκπέμπει έντονο φθορίζον φως παρουσία DNA. Η μετατόπιση του EtBr μπορεί να πραγματοποιηθεί από μια ένωση, υποδεικνύοντας έναν τύπο παρεμβολής ή μικρή σύνδεση στην αύλακα μεταξύ του DNA και της ένωσης. Έτσι, καταγράφεται η προσθήκη του TecAn σε DNA προεπεξεργασμένο με EtBr και η μέτρηση της έντασης της εκπομπής. Το σύμπλοκο CT-DNA-EB εκπέμπει στα $\lambda_{\text{max}}=288\text{nm}$ κατά τη διέγερσή του στα $\lambda_{\text{ex}}=527\text{nm}$. Τα φάσματα φθορισμού της ένωσης CT-DNA-EB με αυξανόμενες συγκεντρώσεις TecAn, TecH₂, Ph₃Sb (0-600 μM) φαίνονται στην Εικόνα 52. Η ταινία εκπομπής στα 588 nm υφίσταται απόσβεση 20.3% κατά την αύξηση των συγκεντρώσεων της ένωσης σε σύγκριση με την αρχική ένταση φθορισμού των διαλυμάτων χωρίς TecAn. Η σταθερά δέσμευσης (K_{app}) υπολογίζεται χρησιμοποιώντας την εξίσωση [56]:

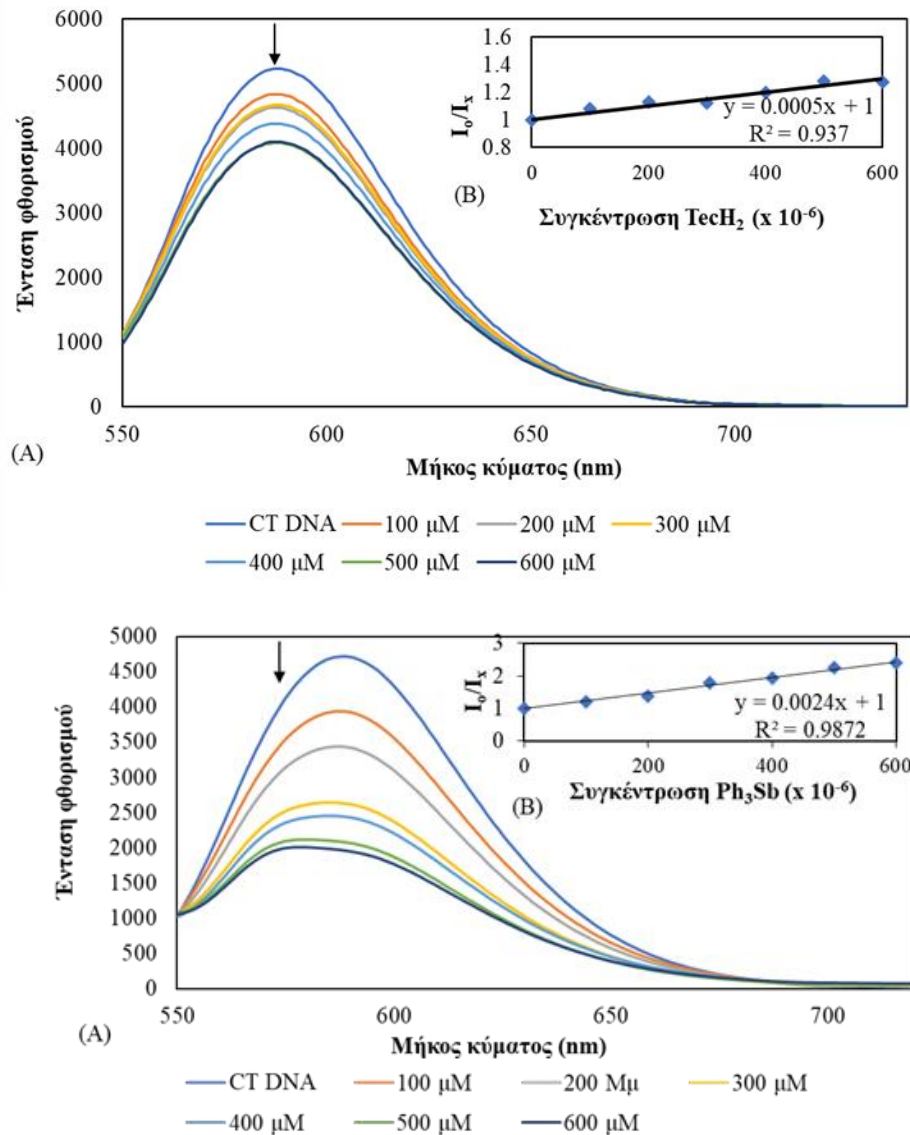
$$K_{EB} [EB] = K_{app} [drug]$$

όπου [φάρμακο] είναι η συγκέντρωση του TecAn σε μείωση 50% του φθορισμού, $K_{EB} = 10^7 \text{ M}^{-1}$, και η συγκέντρωση του [EB] είναι $2.3 \mu\text{M}$. Η συγκέντρωση του φαρμάκου σε μείωση 50% του φθορισμού προέρχεται από το διάγραμμα I_0/I_x έναντι της συγκέντρωσης TecAn (Εικόνα 52 (B)), όπου I_0 και I_x είναι οι εντάσεις φθορισμού του CT DNA απουσία και παρουσία της ένωσης. Το K_{SV} είναι η σταθερά απόσβεσης Stern–Volmer και το $[Q]$ είναι η συγκέντρωση του αποσβέστη. Η γραμμική εξίσωση Stern–Volmer είναι η εξής [56]:

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

Η φαινομενική σταθερά δέσμευσης K_{app} που υπολογίζεται για το TecAn είναι $1.1 \pm 0.21 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ με την τιμή να είναι πολύ χαμηλότερη από τις σταθερές δέσμευσης των κλασσικών παρεμβολέων (10^6 M^{-1}), επιβεβαιώνοντας τον ισχυρισμό ότι ο μηχανισμός δράσης του TecAn προς το DNA αποκαλύπτει θραύση δεσμών υδρογόνου ή αυλάκωσης. Επιπλέον, η σταθερά K_{app} της τετρακυκλίνης (TecH_2) και του τριφαινυλαντιμονίου (Ph_3Sb) είναι $0.8 \pm 0.35 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ και $5.3 \pm 0.54 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, αντίστοιχα.





Εικόνα 52: (Α) Φάσμα εκπομπής συμπλόκου CT-DNA-EB παρουσία TecAn, TecH₂, Ph₃Sb ([EB] = 2.3 μM, [DNA] = 26 μM, [ένωση] = 0–600 μM) λ_{ex} = 527 nm. Το βέλος δείχνει ότι η ένταση αλλάζει με την αύξηση της συγκέντρωσης του συμπλέγματος. (Β) Γραφικό διάγραμμα της έντασης εκπομπής I_0/I_x vs [ένωση].

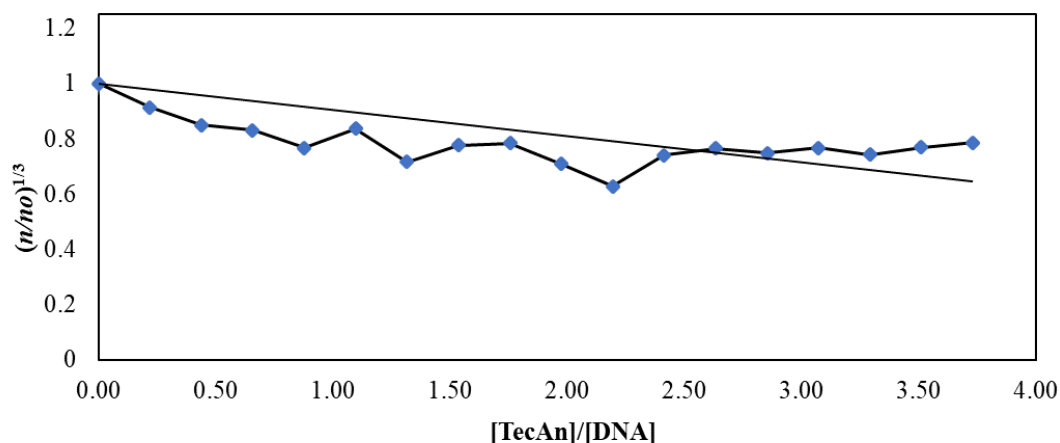
4.2.2.3. Αλληλεπίδραση DNA με TecAn μέσω Ιξωδομετρίας

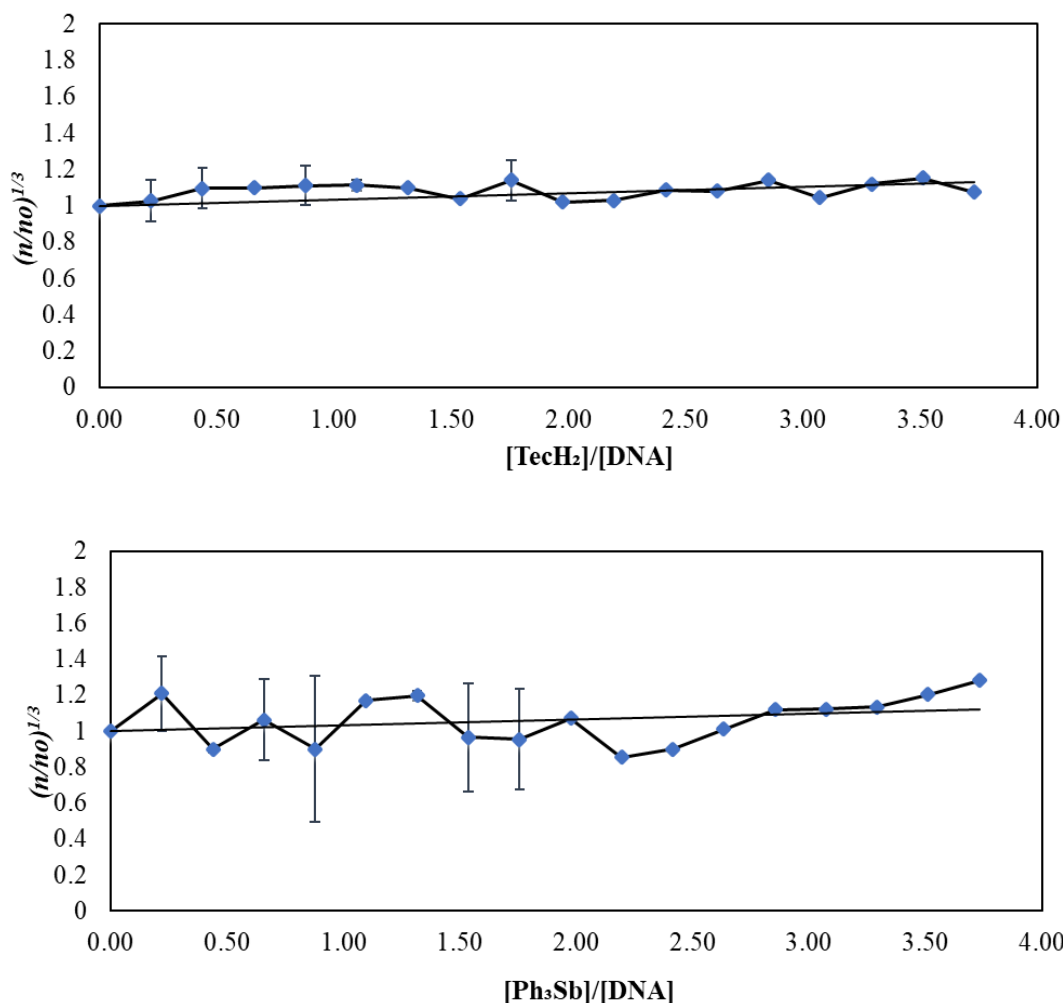
Το μήκος του DNA υφίσταται αλλαγές όταν επωάζεται με αντικαρκινικούς παράγοντες, με αποτέλεσμα την εναλλαγή του ιξώδους του διαλύματος. (i) εάν ο παράγοντας παρεμβάλλεται με τους κλώνους DNA, παρατηρείται επιμήκυνση του DNA με αύξηση του ιξώδους, (ii) εάν ο παράγοντας αλληλεπιδρά ηλεκτροστατικά με το DNA, αυτό δεν έχει καμία επίδραση στο μήκος

του DNA και έτσι δεν παρουσιάζεται σημαντική αλλαγή στο ιζώδες. Ωστόσο, (iii) στην περίπτωση διάσπασης των κλώνων DNA, το μήκος του DNA μειώνεται παράλληλα με το ιζώδες. Επιπλέον, (iv) εάν ο παράγοντας κάμπει την έλικα DNA που συνδέεται ομοιοπολικά με αυτήν, παρουσιάζεται επίσης μείωση του ιζώδους [56]. Το σχετικό μήκος DNA (L/L_0) υπολογίζεται από την εξίσωση:

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

όπου το $(n/n_0)^{1/3}$ δείχνει το σχετικό ειδικό ιζώδες των διαλυμάτων DNA. Διάλυμα CT-DNA (10 mM) επωάζεται με αυξανόμενες ποσότητες TecAn στη μοριακή αναλογία μέχρι $r = 3.73$ [ένωση]/[DNA]. Η Εικόνα 53 δείχνει τα διαγράμματα με το σχετικό ειδικό ιζώδες $(n/n_0)^{1/3}$ vs την αναλογία δέσμευσης. Η μείωση του ιζώδους του διαλύματος DNA, με την αύξηση των συγκεντρώσεων του TecAn, δείχνει μείωση του μήκους του DNA υποδηλώνοντας είτε διάσπαση των κλώνων DNA είτε ομοιοπολική σύνδεση με κάμψη των κλώνων DNA. Όσον αφορά τους υποκαταστάτες, η TecH₂ παρουσιάζει μικρή αύξηση του ιζώδους που είναι χαρακτηριστικό της παρεμβολής, ενώ το Ph₃Sb δεν εμφανίζει κάποια σημαντική μεταβολή.



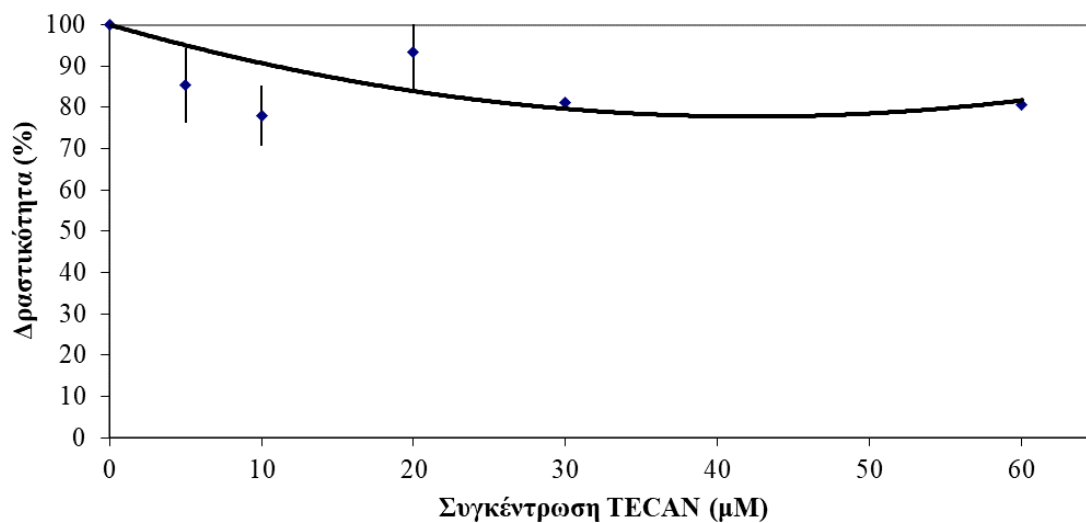


Εικόνα 53: Επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων TecAn, $TecH_2$, Ph_3Sb στο σχετικό ιξώδες του CT DNA στους 25 °C. ($[DNA] = 10 \text{ mM}$, $r = [\text{ένωση}]/[DNA]$, n είναι το ιξώδες του DNA παρουσία της ένωσης και n_o είναι το ιξώδες του καθαρού DNA)

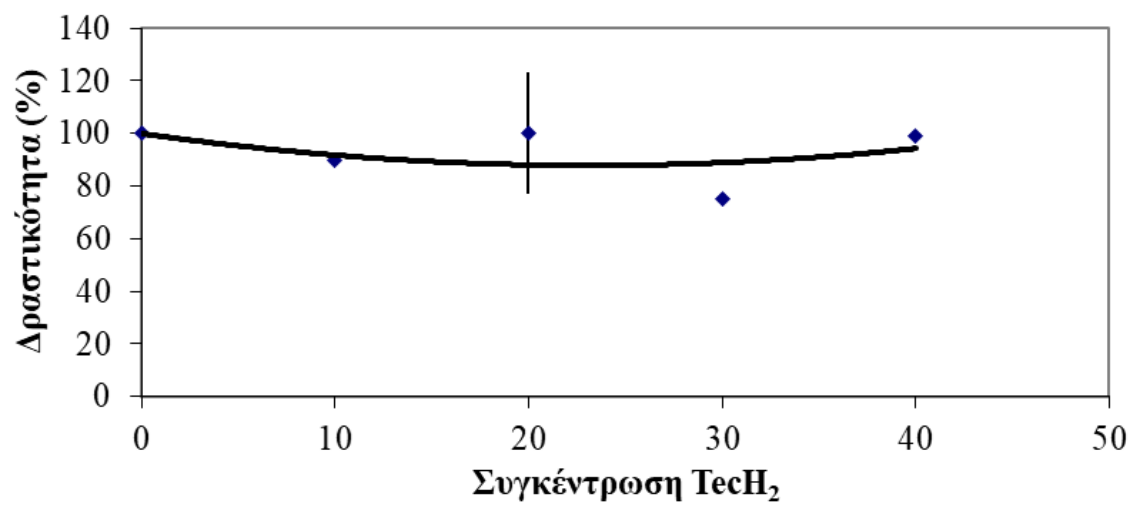
4.2.2.4. Δράση του TecAn στο ένζυμο λιποξυγενάση

Έχει μεγάλο ενδιαφέρον να εξεταστεί η αναστολή της λιποξυγενάσης από αντικαρκινικούς παράγοντες μιας και αυτό το ένζυμο κατανέμεται κυρίως στο μιτοχόνδριο και η αναστολή του προκαλεί απόπτωση. Η λιποξυγενάση καταλύει την οξείδωση του λινολεϊκού οξέος και για αυτό μελετάται η επίδραση του TecAn και της $TecH_2$ στο υπόστρωμα παρουσία του ενζύμου σε εύρος συγκεντρώσεων από 0-60 μM για το TecAn και από 0-40 μM για την $TecH_2$. Ωστόσο, όπως

φαίνεται στις Εικόνες 54 και 55, τόσο το TecAn όσο και η TecH₂ στις συγκεντρώσεις που μελετώνται, δεν αποκαλύπτουν ανασταλτική δράση έναντι της λιποξυγενάσης.



Εικόνα 54: Η % δραστηκότητα του ενζύμου λιποξυγενάση συναρτήσει των διαφορετικών συγκεντρώσεων αναστολέα-TecAn

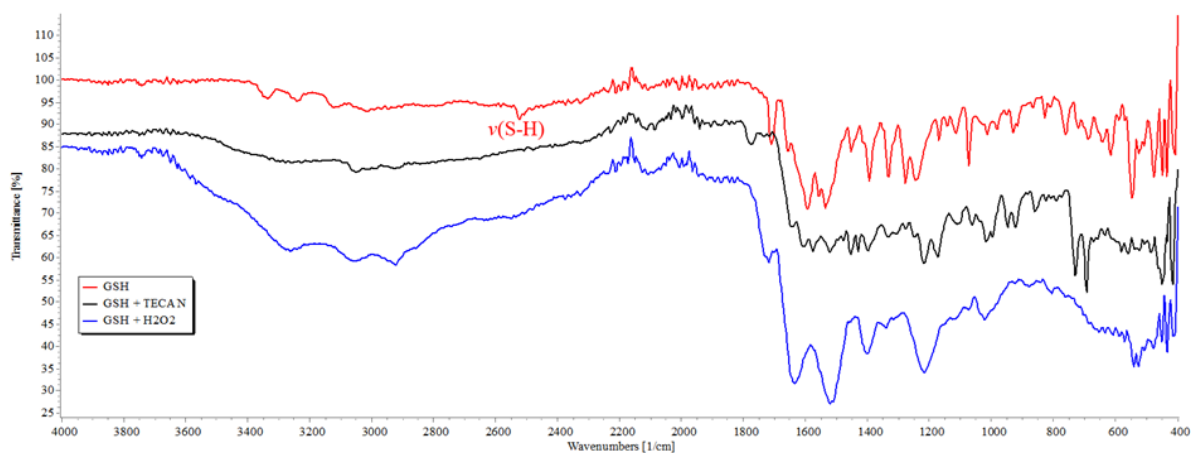


Εικόνα 55: Η % δραστηκότητα του ενζύμου λιποξυγενάση συναρτήσει των διαφορετικών συγκεντρώσεων αναστολέα-TecH₂

4.2.2.5. Αντίδραση TecAn με γλουταθειόνη (GSH) μέσω IR

Όπως αναφέρεται και στην ενότητα 1.5.1., το αντιμόνιο(V) είναι ένα προ-φάρμακο το οποίο ανάγεται σε ενεργό αντιμόνιο(III) από το τριπεπτίδιο GSH. Το Sb(V) είναι βιολογικά λιγότερο ενεργό, ενώ το Sb(III) είναι η δραστική μορφή του αντιμονίου. Η GSH από την άλλη υπερεκφράζεται στα καρκινικά κύτταρα (π.χ. η συγκέντρωσή της είναι διπλάσια στα καρκινικά κύτταρα του μαστού από αυτή που βρίσκεται στα φυσιολογικά). Παίζει ζωτικό ρόλο στην προστασία των καρκινικών κυττάρων και είναι ο λόγος της αντίστασης που αναπτύσσουν στη χημειοθεραπεία. Επομένως, η χρήση ενώσεων χαμηλής τοξικότητας Sb(V) που μετατρέπονται στα ενεργά Sb(III) σε καρκινικά κύτταρα από τη GSH αναμένεται να οδηγήσει σε νέα χημειοθεραπευτικά με υψηλή εκλεκτικότητα έναντι των καρκινικών κυττάρων από τα φυσιολογικά [51].

Η αντίδραση οξειδοαναγωγής μεταξύ της GSH και του TecAn μελετάται, χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία δόνησης. Η δονητική ταινία του δεσμού S–H στο φάσμα ATR-FT-IR της GSH (Εικόνα 56) απουσιάζει όταν οξειδώνεται από H₂O₂ (1: 1 μοριακή αναλογία) λόγω του σχηματισμού του δισουλφιδίου GS-SG. (Εικόνα 56) [56]. Όταν το H₂O₂ αντικαθίσταται από TecAn υπό τις ίδιες συνθήκες αντίδρασης, εμφανίζεται επίσης ο σχηματισμός του δισουλφιδίου με την εξάλειψη της ταινίας δόνησης ν(S–H) (Εικόνα 56).



Εικόνα 56 : ATR-FTIR της GSH, GS-SG και του μείγματος που προέκυψε από την αντίδραση μεταξύ GSH και TecAn

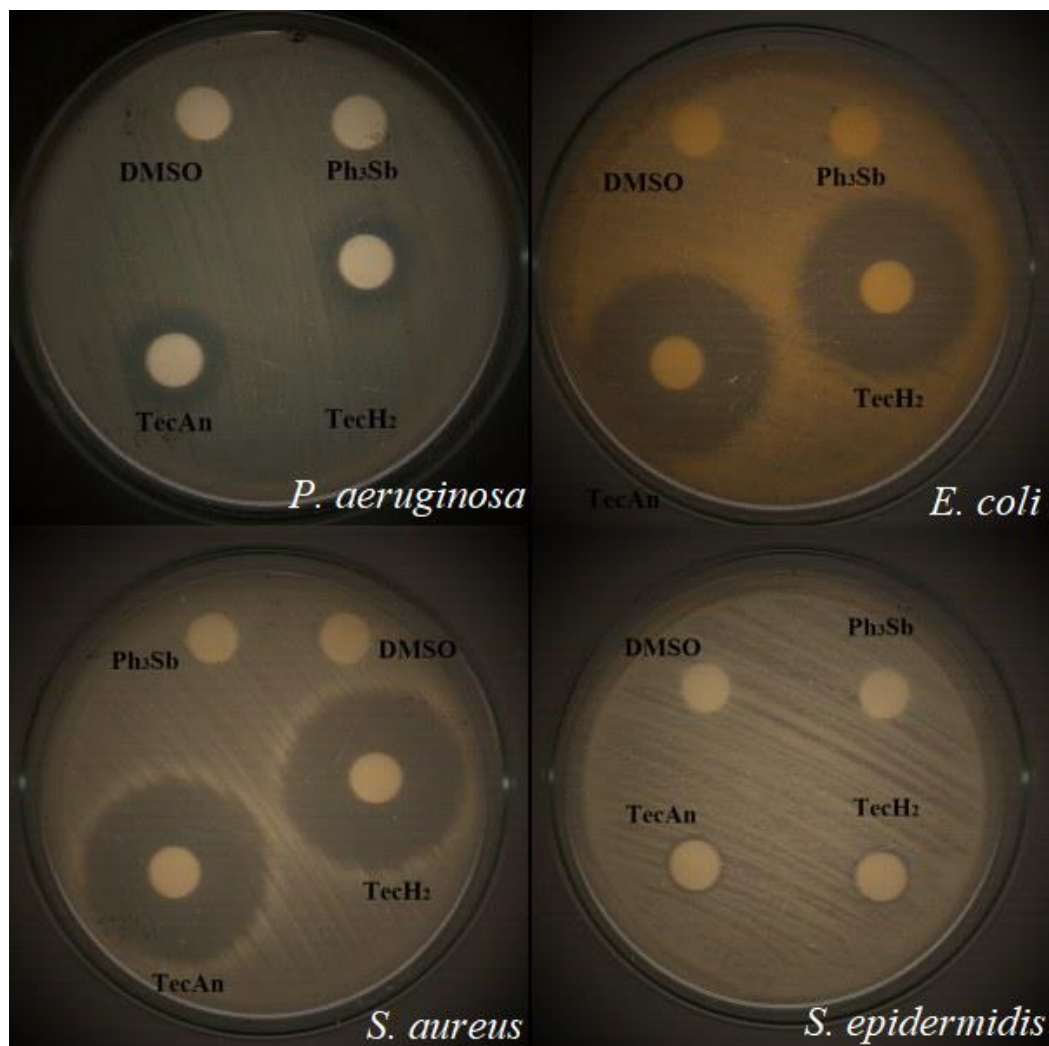
4.2.3. Αποτελέσματα αντιμικροβιακής δράσης

4.2.3.1. Ζώνες αναστολής (IZ)

Μέσω αυτής της δοκιμασία, χάρτινοι δίσκοι με ή χωρίς τις υπό μελέτη ενώσεις τοποθετούνται σε θρεπτικό υλικό άγαρ που περιέχει τα βακτηριακά στελέχη (10^8 cfu/mL). Μετά την επώαση των βακτηρίων με την υπό δοκιμή ουσία, αναπτύσσεται μια ορατή περιοχή χωρίς βακτήρια γύρω από τον δίσκο, εάν η ένωση σταματήσει την ανάπτυξη των βακτηρίων ή τα σκοτώσει. Αυτή είναι η λεγόμενη ζώνη αναστολής (IZ) [58]. Έτσι, δίσκοι με διάμετρο 10 mm, εμβαπτίζονται σε διαλύματα control (DMSO), TecAn, TecH₂ και Ph₃Sb (10^{-3} M) και τοποθετούνται σε τρυβλία άγαρ petri όπου προσδιορίζονται οι ζώνες αναστολής τους (IZ) έναντι των *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. epidermidis* και *S. aureus*. Οι ζώνες αναστολής καταγράφονται στον Πίνακα 8 με φωτογραφικό υλικό (Εικόνα 57) που ακολουθεί. Όπως συμπεραίνεται, το σύμπλεγμα TecAn διατηρεί την αντιμικροβιακή δράση της καθαρής τετρακυκλίνης (TecH₂).

Πίνακας 8: Ζώνες αναστολής (IZ)

	Ζώνες Αναστολής (mm)			
Ενώσεις/Βακτήρια	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i>
Control (DMSO)	10	10	10	10
TecH ₂	16.67±1.72	36.6±4.03	10.67±0.65	35±2.2
Ph ₃ Sb	10	10	10	10
TecAn	15.3±0.65	38±2.99	11	35.6±2.2



Εικόνα 57: Ζώνες αναστολής (IZ) των ενώσεων στα τέσσερα βακτήρια DMSO, TecH₂, Ph₃Sb και TecAn στα 4 βακτήρια

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Τα αντιβιοτικά επιλέγονται καθώς θεραπεύουν ασθένειες και προστατεύουν από λοιμώξεις, βελτιώνοντας την ποιότητα και το προσδόκιμο ζωής των ανθρώπων. Επιπλέον, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις διαδικασίες χειρουργικής επέμβασης, ακτινοθεραπείας, χημειοθεραπείας και ανοσοθεραπείας καρκίνων χάρη στις αντιμολυσματικές και αντικαρκινικές τους ιδιότητες. Όσον αφορά την αντικαρκινική τους δράση, τα αντιβιοτικά προκαλούν απόπτωση των καρκινικών κυττάρων μέσω της θραύσης των κλώνων του DNA μιας και το DNA είναι ένας από τους κύριους μοριακούς στόχους τους. Ωστόσο, η υπερβολική χρήση αυτών των φαρμακευτικών ουσιών έχει οδηγήσει στην ανθεκτικότητα των βακτηρίων, ενώ παράλληλα έχει αποδειχθεί ότι οδηγεί σε διαταραχή του ανθρώπινου μικροβιώματος. Έτσι, μειώνεται η ανοσοποιητική ικανότητα του σώματος προάγοντας τη φλεγμονή, γεγονός που μπορεί να επηρεάσει και την απόκριση στις θεραπείες κατά του καρκίνου.

Προκειμένου να ξεπεραστούν αυτά τα προβλήματα και να συσχετιστεί η αντιμικροβιακή με την αντικαρκινική δράση, παρασκευάζεται το σύμπλεγμα (TecAn) της τετρακυκλίνης με το αντιμόνιο(V) και εξετάζεται *in vitro* έναντι κυτταρικών σειρών ανθρώπινου αδеноκαρκινώματος μαστού: MCF-7 (θετικά σε ορμονικούς υποδοχείς (HR+), MDA-MB-231 (αρνητικά σε ορμονικούς υποδοχείς (HR-)). Το TecAn αναστέλλει και τις δύο κυτταρικές σειρές με παρόμοιο τρόπο, υποδεικνύοντας ότι οι ορμονικοί υποδοχείς δε διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στο μηχανισμό δράσης τους. Αν και το TecAn ταξινομείται ως τοξικός παράγοντας, σύμφωνα με τα κριτήρια του FDA, είναι πιο δραστικό έναντι των καρκινικών κυττάρων σε σχέση με τα υγιή κύτταρα, σε σύγκριση με τη σισπλατίνη η οποία εξακολουθεί να είναι ένα αντικαρκινικό φάρμακο σε κλινική χρήση. Το TecAn προκαλεί απόπτωση στο $56.2 \pm 0.2\%$ των κυττάρων MCF-7 (HD) ενώ το

ποσοστό απόπτωσης της σισπλατίνης αυξάνεται έως και 96.5%. Αν και το TecAn μπορεί να θεωρηθεί ως τοξικός παράγοντας, παρατηρείται μη τοξικότητα σε *in vivo* πειράματα γαρίδας άλμης όπου οι χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις είναι έως και 4 φορές υψηλότερες από τις τιμές IC_{50} . Τα δεδομένα ηλεκτρονικής απορρόφησης και φασματοσκοπίας φθορισμού υποδηλώνουν ότι το σύζευγμα αλληλεπιδρά ισχυρά με το DNA μέσω δέσμευσης στην αύλακα. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνονται από την ελάχιστη μεταβολή στο ιζώδες του διαλύματος DNA όταν υποβάλλεται σε επεξεργασία με TecAn. Έπειτα, το TecAn αντιδρά με την GSH σε μια αντίδραση οξειδοαναγωγής όπου το βιολογικά ανενεργό Sb(V) μετατρέπεται σε ενεργό Sb(III). Η GSH είναι ένα τριπεπτίδιο το οποίο υπερεκφράζεται στα καρκινικά κύτταρα και έχει αποδειχθεί ότι συνδέεται στενά με την εξέλιξη του όγκου και την αντίσταση στα χημειοθεραπευτικά φάρμακα. Στην προκειμένη περίπτωση, το αμυντικό εργαλείο των καρκινικών κυττάρων αξιοποιείται σχηματίζοντας τα τοξικά είδη Sb(III). Τέλος, από τη μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης του συζεύγματος συμπεραίνεται ότι το TecAn διατηρεί την αντιμικροβιακή του ιδιότητα παρά την τροποποίηση που υπέστη η τετρακυκλίνη.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1]: National Cancer Institute, “What is cancer?” δημοσιεύτηκε αρχικά από το National Cancer Institute
- [2]: Canadian Cancer Society, link: <https://cancer.ca/en/cancer-information/what-is-cancer/how-cancer-starts-grows-and-spreads>
- [3]: Patel A., Benign vs Malignant Tumors., *JAMA Oncol.*, Volume 6, Issue 9, Page 1488, 2020, doi: <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2020.2592>
- [4]: G. M Cooper., *The Cell, A Molecular Approach*, 2nd edition, 2000
- [5]: Very well health, link: <https://www.verywellhealth.com/more-cancer-types-4158486>
- [6]: S. Winters, C. Martin, D. Murphy, N. K. Shokar, Chapter One - Breast Cancer Epidemiology, Prevention, and Screening, *Prog Mol Biol Transl Sci*, Academic Press, Volume 151, 2017, Pages 1-32, <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.07.002>
- [7]: <https://www.dana-farber.org/ductal-carcinoma-in-situ-program>
- [8]: D.L. Holliday, V. Speirs, Choosing the right cell line for breast cancer research, *Breast Cancer Res.*, Volume 13, Page 215, (2011, doi: <https://doi.org/10.1186/bcr2889>
- [9]: S. S. Mohanty, C. R. Sahoo, R. N. Padhy, Role of hormone receptors and HER2 as prospective molecular markers for breast cancer: An update, *Genes Dis.*, Volume 9, Issue 3, 2022, Pages 648-658, doi: <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2020.12.005>
- [10]: M. Lekka, G. Leondaritis, K. Galanopoulou, & E. Kitsioulis, (2015). ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΜΕΤΑΓΩΓΗΣ ΣΗΜΑΤΟΣ: ΜΕΜΒΡΑΝΙΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ [Chapter]. In M. Lekka, G. Leondaritis, K. Galanopoulou, & E. Kitsioulis 2015. Βιολογικές μεμβράνες: από τη δομή στις λειτουργίες [Undergraduate textbook]. Kallipos, Open Academic Editions. chapter 6. Link: <http://hdl.handle.net/11419/4313>
- [11]: D. Shah, C. Osipo, Cancer stem cells and HER2 positive breast cancer: The story so far, *Genes Dis.* 2016, Volume 3, Issue 2, Pages 114-123, doi: <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2016.02.002>
- [12]: R. Zhang, T. Liu, W. Li, et al., Tumor microenvironment-responsive BSA nanocarriers for combined chemo/chemodynamic cancer therapy, *J Nanobiotechnol.*, Volume 20, Page 223, 2022, doi: <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01442-5>
- [13]: O. Trédan, C. M. Galmarini, K. Patel, I. F. Tannock, Drug Resistance and the Solid Tumor Microenvironment, *J. Natl. Cancer Inst.*, Volume 99, Issue 19, 2007, Pages 1441–1454, doi: <https://doi.org/10.1093/jnci/djm135>
- [14]: L. Kennedy, J.K. Sandhu, M.E. Harper, M. Cuperlovic-Culf, Role of Glutathione in Cancer: From Mechanisms to Therapies, *Biomolecules*, 2020, Volume 10, Issue 10, Pages 1429, doi: <https://doi.org/10.3390/biom10101429>
- [15]: link: <https://www.wikiwand.com/el/Γλουταθειόνη>
- [16]: M. J. Duffy, S. Walsh, E. W. McDermott, J. Crown, Chapter One - Biomarkers in Breast Cancer: Where Are We and Where Are We Going?, *Adv. Clin. Chem.*, Volume 71, 2015, Pages 1-23, doi: <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2015.05.001>
- [17]: A. Fujiwara and T. Hoshino, Anthracycline Antibiotics, *Crit. Rev. Biotechnol.*, Volume 3, Issue 2, 1985, 133-157, doi: <https://doi.org/10.3109/07388558509150782>

- [18]: C. Christowitz, T. Davis, A. Isaacs, et al., Mechanisms of doxorubicin-induced drug resistance and drug resistant tumour growth in a murine breast tumour model, *BMC Cancer*, Volume 19, Page 757, 2019, doi: <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5939-z>
- [19]: C. Angell, S. Xie, L. Zhang, Y. Chen, DNA Nanotechnology for Precise Control over Drug Delivery and Gene Therapy, *Small*, 2016, Volume 12, Issue 9, Pages 1117-1132, doi: <https://doi.org/10.1002/sml.201502167>
- [20]: F. Lumachi, D.A. Santeufemia, S.M. Basso, Current medical treatment of estrogen receptor-positive breast cancer. *World J Biol Chem.*, Volume 6, Issue 3, Pages 231-9. 2015, doi: <https://doi.org/10.4331/wjbc.v6.i3.231>
- [21]: K. C. Morello, G. T. Wurz and M. W. DeGregorio, Pharmacokinetics of Selective Estrogen Receptor Modulators, *Clin Pharmacokinet*, Volume 42, Issue 4, Pages 361-372, 2003
- [22]: A. L. Fymat, Antibiotics and Antibiotic Resistance, *Biomed J Sci & Tech Res*, Volume 1, Issue 1, 2017, doi: <https://doi.org/10.26717/bjstr.2017.01.000117>
- [23]: E. Etebu and I. Ariekpar, Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives, *Int. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. Res.*, Volume 4, Pages 90-101, 2016
- [24]: M. I. Hutchings, A. W. Truman, B. Wilkinson, Antibiotics: past, present and future, *Curr. Opin. Microbiol.*, Volume 51, Pages 72-80, 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>
- [25]: Wikipedia, link: https://el.wikipedia.org/wiki/Alexander_Fleming
- [26]: T.D.M. Pham, Z.M. Ziora, M.A.T. Blaskovich, Quinolone antibiotics. *Medchemcomm*, Volume 10, Issue 10, Pages 1719-1739, 2019, doi: <https://doi.org/10.1039/c9md00120d>
- [27]: A. Oving, J. Bhattacharyya, Sulfonamide drugs: structure, antibacterial property, toxicity, and biophysical interactions. *Biophys Rev.*, Volume 13, Issue 2, Pages 259-272. 2021, doi: <https://doi.org/10.1007/s12551-021-00795-9>
- [28]: Ε. Πάνου, 2020. Βιοπολυμερή (pdf), σελ. 73-81, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
- [29]: V. Ramakrishnan, Ribosome Structure and the Mechanism of Translation, *Cell*, Volume 108, Pages 557–572, 2002, doi: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00619-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00619-0)
- [30]: T.H. Grossman, Tetracycline Antibiotics and Resistance, *Cold Spring Harb Perspect Med.*, Volume 6, Issue 4:a025387, 2016, doi: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025387>
- [31]: E.F. Hut, M. Radulescu, N. Pilut, I. Macasoi, D. Berceanu, D. Coricovac, I. Pinzaru, O. Cretu, C. Dehelean, Two Antibiotics, Ampicillin and Tetracycline, Exert Different Effects in HT-29 Colorectal Adenocarcinoma Cells in Terms of Cell Viability and Migration Capacity, *Curr Oncol*, Volume 28, Issue 4, Pages 2466-2480, 2021, doi: <https://doi.org/10.3390/curroncol28040225>
- [32]: R. Daghrir, P. Drogui, Tetracycline antibiotics in the environment: a review, *Environ Chem Lett*, Volume 11, Pages 209–227, 2013, doi: <https://doi.org/10.1007/s10311-013-0404-8>
- [33]: A. N. Sapadin, and R. Fleischmajer, Tetracyclines: Nonantibiotic properties and their clinical implications, *J. Am. Acad. Dermatol.*, Volume 54, Issue 2, 2006, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2005.10.004>
- [34]: D. Fuoco, Classification Framework and Chemical Biology of Tetracycline-Structure-Based Drugs, *Antibiotics*, Volume 1, Pages 1-13, 2012, doi: <https://doi.org/10.3390/antibiotics1010001>

- [35]: C. Pfab, L. Schnobrich, S. Eldnasoury, A. Gessner, N. El-Najjar, Repurposing of Antimicrobial Agents for Cancer Therapy: What Do We Know?, *Cancers (Basel)*, Volume 13 Issue 13, Page 3193, 2021, doi: <https://doi.org/10.3390/cancers13133193>
- [36]: Gao Y., Shang Q., Li W., Guo W., Stojadinovic A., Mannion C., Man Y.G., Chen T., Antibiotics for cancer treatment: A double-edged sword, *J. Cancer*, Volume 11, Page 5135, 2020, doi: <https://doi.org/10.7150/jca.47470>
- [37]: K. D. Mjos and C. Orvig, Metallodrugs in Medicinal Inorganic Chemistry, *Chem. Rev.*, Volume 114, Issue 8, Pages 4540–4563, 2014, doi: <https://doi.org/10.1021/cr400460s>
- [38]: E. J. Anthony, E. M. Bolitho, H. E. Bridgewater, O. W. L. Carter, J. M. Donnelly, C. Imberti, E. C. Lant, F. Lermite, R. J. Needham, M. Palau, P. J. Sadler, H. Shi, F. Wang, W. Zhang and Z. Zhang, Metallodrugs are unique: opportunities and challenges of discovery and development, *Chem. Sci.*, Volume 11, Pages 12888-12917, 2020, doi: <https://doi.org/10.1039/D0SC04082G>
- [39]: G.N. Kaluderovic and R. Paschke, Anticancer Metallotherapeutics in Preclinical Development, *Curr. Med. Chem.*, Volume 18, Pages 4738-4752, 2011, doi: <https://doi.org/10.2174/092986711797535308>
- [40]: M. Sirajuddin, S. Ali, A. Badshah, Drug–DNA interactions and their study by UV–Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry, *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.*, Volume 124, Pages 1–19, 2013, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.03.013>
- [41]: Y. Sha, X. Chen, B. Niu, Q. Chen, The Interaction Mode of Groove Binding Between Quercetin and Calf Thymus DNA Based on Spectrometry and Simulation, *Chem. Biodivers.*, Volume 14, Issue 10, 2017, doi: <https://doi.org/10.1002/cbdv.201700133>
- [42]: G. D. Sepich-Poore, L. Zitvogel, R. Straussman, J. Hasty, J. A. Wargo, R. Knight, The microbiome and human cancer, *Science*, Volume 371, Page 6536:eabc4552, 2021, doi: <https://doi.org/10.1126/science.abc4552>
- [43]: C.M. Whisner, C. Athena Aktipis, The Role of the Microbiome in Cancer Initiation and Progression: How Microbes and Cancer Cells Utilize Excess Energy and Promote One Another's Growth, *Curr. Nutr. Rep.*, Volume 8, Issue 1, Pages 42-51 2019, doi: <https://doi.org/10.1007/s13668-019-0257-2>
- [44]: B. A. Helmink, M. A. Khan, A. Hermann, V. Gopalakrishnan and J. A. Wargo, The microbiome, cancer, and cancer therapy, *Nat. Med.*, Volume 25, Issue 3, Pages 377-388, 2019, doi: <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0377-7>
- [45]: S. Yan, L. Jin and H. Sun, 51Sb Antimony in Medicine, *Metallotherapeutic Drugs and Metal-Based Diagnostic Agents*, Pages 441-461, 2005, doi: <https://doi.org/10.1002/0470864052.ch23>
- [46]: N. Yang and H. Sun, Biological Chemistry of Antimony and Bismuth, *Biological Chemistry of Arsenic, Antimony and Bismuth*, Pages 53-81, 2010, doi: <https://doi.org/10.1002/9780470975503.ch3>
- [47]: E. R.T. Tiekink, Anticancer Activity of Molecular Compounds of Arsenic, *Antimony and Bismuth, Biological Chemistry of Arsenic, Antimony and Bismuth*, Pages 293-310, 2010, doi: <https://doi.org/10.1002/9780470975503.ch12>
- [48]: B. L Herwaldt, Leishmaniasis, *Lancet*, Volume 354, Issue 9185, Pages 1191-1199, 1999, doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)10178-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)10178-2)
- [49]: P. T. LoVerde, Schistosomiasis, *Digenetic Trematodes*, Pages 45-70, 2019, doi: https://doi.org/10.1007/978-3-030-18616-6_3

- [50]: P. Sharma, D. Perez, A. Cabrera, N. Rosa, J. L. Arias, Perspectives of antimony compounds in oncology, *Acta Pharmacol Sin*, Volume 8, Pages 881–890, 2008, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2008.00818.x>
- [51]: Kapetana M., Banti C. N., Papachristodoulou C., Psycharis V., Raptopoulou C. P., Hadjikakou S. K., Conjugation of triphenylantimony(V) with carvacrol against human breast cancer cells, *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, Volume 27, Pages 373–389, 2022, doi: <https://doi.org/10.1007/s00775-022-01936-5>
- [52]: C.N. Banti and S.K. Hadjikakou, Evaluation of Toxicity with Brine Shrimp Assay, *Bio-protocol*, Volume 11, Issue 02: e3895, 2021, doi: <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3895>
- [53]: C.N. Banti, C. P. Raptopoulou, V. Psycharis, S.K. Hadjikakou, Novel silver glycinate conjugate with 3D polymeric intermolecular self-assembly architecture; an antiproliferative agent which induces apoptosis on human breast cancer cells, *J Inorg Biochem*, Volume 216, Article 111351, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2020.111351>
- [54]: Banti, C. N.; Giannoulis, A. D.; Kourkoumelis, N.; Owczarzak, A. M.; Poyraz, M.; Kubicki, M.; Charalabopoulos, K.; Hadjikakou, S. K., Control Mixed ligand–silver(I) complexes with anti-inflammatory agents which can bind to lipoxygenase and calf thymus DNA, modulating their function and inducing apoptosis experiments with DMSO were performed, *Metallomics*, Volume 4, Pages 545–560, 2012, doi: <https://doi.org/10.1039/C2MT20039B>
- [55]: C.N. Banti, C. Papatriantafyllopoulou, M. Manoli, A. J. Tasiopoulos and Sotiris K. Hadjikakou, Nimesulide Silver Metallodrugs, Containing the Mitochondriotropic, Triaryl Derivatives of Pnictogen; Anticancer Activity against Human Breast Cancer Cells, *Inorg. Chem*, Volume 6, Issue 55(17), Pages 8681–96, 2016, doi: <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.6b01241>
- [56]: P.Z. Trialoni, Z-C. M. Fyrigou, C.N. Banti, S.K. Hadjikakou, "Conjugation of tetracycline and penicillin with Sb(V) and Ag(I) against breast cancer cells", *Main Group Met. Chem.*, Volume 45, Issue 1, 2022, Pages 152–168, doi: <https://doi.org/10.1515/mgmc-2022-0016>
- [57]: G. L. Asleson and C. W. Frank, Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectral analysis of tetracycline hydrochloride and related antibiotics, Communications to the Editor, *J. Am. Chem. Soc.*, Volume 97, Issue 21, Pages 6246–6248, 1975, doi: <https://doi.org/10.1021/ja00854a051>
- [58]: A.K. Rossos, C.N. Banti, A.G. Kalampounias, C. Papachristodoulou, K. Kordatos, P. Zoumpoulakis, T. Mavromoustakos, N. Kourkoumelis, S.K. Hadjikakou, pHEMA@AGMNA-1: A novel material for the development of antibacterial contact lens, *Mater. Sci. Eng. C*, Volume 111, Page 110770, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110770>

Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής περιλαμβάνονται σε δημοσίευση σε διεθνές περιοδικό μετά από κρίση και παρουσιάστηκαν σε δύο διεθνή συνέδρια.

◆ Δημοσίευση:

P.Z. Trialoni, Z-C. M. Fyrigou, C.N. Banti, S.K. Hadjikakou, "Conjugation of tetracycline and penicillin with Sb(V) and Ag(I) against breast cancer cells", *Main Group Met. Chem.*, vol. 45, no. 1, 2022, pp 152-168, doi: <https://doi.org/10.1515/mgmc-2022-0016>

◆ Συνέδριο:

P. Trialoni, C. Banti, and S. Hadjikakou, Conjugation of tetracycline Sb(V) against breast cancer cells, Athens Conference on Advances in Chemistry 2022 (acac2022), 26/06/2022 – 01/07/2022, NKUA, Athens, Greece, Book of Abstracts, Page 134, P-29
<https://conferences.uoa.gr/event/33>/<https://conferences.uoa.gr/event/33>

◆ Συνέδριο:

P. Trialoni, C. Banti, and S. Hadjikakou, Conjugation of antibiotics with metalloids in a single entity for the development of new chemotherapeutic agents for the treatment of breast cancer, 10th International Conference of the Hellenic Crystallographic Association (HeCrA), 15/10/2021 – 17/10/2021, NCSR "Demokritos", Athens, Greece, Book of abstracts, Page 88, <https://sites.google.com/view/hecra2020/home>