



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ, ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΙΑΤΡΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»



**«Επίδραση των Αντιβιοτικών στην Βιοσύνθεση των Θυρεοειδικών
Ορμονών: Διερεύνηση του Μηχανισμού της Αλληλεπίδρασης της
Τετρακυκλίνης»**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΚΡΙΣΤΙ ΓΚΕΡΑΖΗ (Α.Μ.:326)

ΜΔΕ Χημείας Τροφίμων

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΣΩΤΗΡΙΟΣ ΧΑΤΖΗΚΑΚΟΥ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2025

Εισαγωγή στο Διατμηματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών

Σπουδών (Δ.Π.Μ.Σ.) «Ιατρική Χημεία»

της κα. Κρίστι Γκεράζη.

Επιβλέπων μέλος ΔΕΠ: Δρ Σωτήριος Χατζηκακού

**Θέμα: «Επίδραση των Αντιβιοτικών στην Βιοσύνθεση των Θυρεοειδικών Ορμονών:
Διερεύνηση του Μηχανισμού της Αλληλεπίδρασης Τετρακυκλίνης με την Horseradish
Peroxidase»**

Ορισμός Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής από την Επιτροπή Προγράμματος Σπουδών (ΕΠΣ):

- 1. Δρ. Σωτήριος Χατζηκακού, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων**
- 2. Δρ. Αχιλλέας Γαρούφης, Καθηγητής Ανόργανης Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων**
- 3. Δρ. Κωνσταντίνος Τέλλης Μέλος ΕΔΙΠ, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων**

Έγκριση

Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας στις

Ο Διευθυντής του Δ.Π.Μ.Σ.: Καθηγητής Αχιλλέας Γαρούφης



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ, ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΙΑΤΡΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»



**«Επίδραση των Αντιβιοτικών στην Βιοσύνθεση των Θυρεοειδικών
Ορμονών: Διερεύνηση του Μηχανισμού της Αλληλεπίδρασης της
Τετρακυκλίνης»**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΚΡΙΣΤΙ ΓΚΕΡΑΖΗ (Α.Μ.:326)

ΜΔΕ Χημείας Τροφίμων

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΣΩΤΗΡΙΟΣ ΧΑΤΖΗΚΑΚΟΥ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2025

Ευχαριστίες

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω το Διατμηματικό Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών «Ιατρική Χημεία» του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την ευκαιρία που μου προσέφερε να συμμετάσχω σε αυτό. Το πρόγραμμα αυτό αποτέλεσε πολύτιμη πηγή γνώσεων και εμπειριών, καθώς μέσα από τη σφαιρική και διεπιστημονική του προσέγγιση, κατάφερα να εμβαθύνω περαιτέρω στον τομέα της Χημείας. Ιδιαίτερα σημαντικό για εμένα ήταν η συνεργασία στο εργαστήριο «Βιολογικής Ανόργανης Χημείας» όπου εκπόνησα την διπλωματική μου εργασία. Σε αυτό μου δόθηκε η δυνατότητα να συσχετίσω την Ανόργανη Χημεία με τον τομέα της Βιολογίας και μπόρεσα να εμβαθύνω στην αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο επιστημών.

Αποτελεί για εμένα ιδιαίτερη τιμή η αποδοχή μου για την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας στο Εργαστήριο «Βιολογικής Ανόργανης Χημείας», υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Χατζηκακού Κ. Σωτηρίου. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω θερμά, για την αδιάκοπη καθοδήγηση και υποστήριξη του σε επιστημονικό και ακαδημαϊκό επίπεδο. Η συμβουλή του ήταν καθοριστική σε κάθε στάδιο της μεταπτυχιακής μου διαδρομής, αποτελώντας για μένα πηγή γνώσης και έμπνευσης. Μέσα από τις πολύτιμες συζητήσεις μας και των γνώσεων του μου μετέδωσε το πάθος του για τη Βιοανόργανη Χημεία.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω και στην κα Μπαντή Ν. Χριστίνα, Μεταδιδακτορική ερευνήτρια του Εργαστηρίου Βιολογικής Ανόργανης Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Η πολύτιμη βοήθεια της, τόσο σε θεωρητικό όσο και σε πειραματικό επίπεδο, υπήρξε καταλυτική για την επιτυχία της παρούσας ερευνητικής εργασίας, αλλά και συνολικά για την εργαστηριακή εμπειρία μου. Την ευχαριστώ θερμά για την μετάδοση των γνώσεων της στον τομέα της Βιολογίας.

Ευχαριστώ θερμά τον κ. Αχιλλέα Γαρούφη, Καθηγητή Ανόργανης Χημείας του Τμήματος Χημείας και Πρόεδρο του Διατμηματικού Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του «Ιατρικής Χημείας» Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, και τον κ. Κωνσταντίνο Τέλλη, Καθηγητή και Μέλος ΕΔΙΠ, του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την αποδοχή τους να συμμετάσχουν στην τριμελή επιτροπή αξιολόγησης της διπλωματικής μου εργασίας.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω από καρδιάς τους φίλους και συναδέλφους μου στο Εργαστήριο Βιολογικής Ανόργανης Χημείας, που με στήριξαν καθ' όλη τη διάρκεια της ερευνητικής μου πορείας. Η συνεργασία μας, το θετικό κλίμα και η αμοιβαία υποστήριξη υπήρξαν πολύτιμοι σύμμαχοι σε κάθε στάδιο της διατριβής μου.

Τέλος, οφείλω τις πιο θερμές ευχαριστίες στην οικογένεια μου – τη μητέρα μου Κατερίνα, τον πατέρα μου Παυλή, τα αδέρφια μου Μαριόλ και Ερτί, και την θεία μου Λουλιέτα για την αδιάκοπη εμπιστοσύνη, την ενθάρρυνση και τη στήριξή τους. Στάθηκαν δίπλα μου σε κάθε στιγμή, ακόμα και στις δυσκολίες, και με βοήθησαν να συνεχίσω με δύναμη και αποφασιστικότητα. Ευχαριστώ επίσης όλους εκείνους τους ανθρώπους της ζωής μου που στάθηκαν πλάι μου και με ενδυνάμωσαν με την παρουσία και την υποστήριξή τους.

Περίληψη

Ο θυρεοειδής αδένας αποτελεί έναν κρίσιμο αδένά στον οργανισμό, επειδή παράγει τις θυρεοειδικές ορμόνες όπως την T4 (θυροξίνη) και την T3 (τριϊωδοθυρονίνη). Ο υποθάλαμος παράγει την θυρεοειδοτρόπο ορμόνη, TSH, που ενεργοποιεί τα θυλακοειδή κύτταρα για την βιοσύνθεση των θυρεοειδικών ορμονών. Τα κύρια ένζυμα που συμμετέχουν σε αυτή την διαδικασία είναι η θυρεοειδική υπεροξειδάση (TPO) και η δε-ιωδινάση (DIO). Η έρευνα αποσκοπεί στην μελέτη της επίδρασης των αντιβιοτικών όπως της τετρακυκλίνης, (αντιβιοτικό με μεγάλη κλινική χρήση), στην βιοσύνθεση των θυρεοειδικών ορμονών και ιδιαίτερα στην διερεύνηση του μηχανισμού της αλληλεπίδρασης.

Στην προσπάθεια για την διαπίστωση αλληλεπιδράσεων μεταξύ της τετρακυκλίνης και του ενζύμου πραγματοποιήθηκαν πειράματα και θεωρητικοί υπολογισμοί μοριακής πρόσδεσης. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν φασματοφωτομετρικές μετρήσεις για να διερευνηθεί η πιθανή αναστολή της καταλυτικής δράσης του ενζύμου horseradish peroxidase (HRP) και της τετρακυκλίνης (TC). Η HRP είναι ένζυμο που περιέχει σίδηρο πορφυρίνη στην δραστική του περιοχή και καταλύει την οξείδωση του ιωδιδίου σε δραστικό δι-ιώδιο. Η HRP χρησιμοποιείται ως μοντέλο της θυρεοειδικής υπεροξειδάσης (TPO). Μελετάται ο μηχανισμός αναστολής και υπολογίζεται το IC_{50} της δράσης της TC στην HRP. Το είδος του αναστολέα -TC (αντιστρεπτός ή μη αντιστρεπτός) και το είδος της αναστολής προσδιορίζονται φασματοφωτομετρικά και υπολογίζονται οι τιμές της σταθεράς Michael Menten K_M και της μέγιστης ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης V_{max} από την εξίσωση του Lineweaver-Burk.

Ο μηχανισμός της αναστολής διερευνήθηκε περαιτέρω με την μελέτη της καταλυτικής δράσης της χλωριούχου σιδηροπορφυρίνης ($FeTTPCl$), στην οξείδωση του ιωδιδίου σε δι-ιώδιο.

Η FeTPPCl χρησιμοποιείται ως μοντέλο του ενεργού κέντρου της θυρεοειδικής υπεροξειδάσης (TPO).

Τέλος, πραγματοποιήθηκαν θεωρητικοί υπολογισμοί μοριακής πρόσδεσης docking μεταξύ του ενζύμου και της τετρακυκλίνης.

Όλη η παραπάνω μελέτη επαναλήφθηκε για τη μεθιμαζόλη MMI ένα γνωστό αντιθυρεοειδικό φάρμακο στην περίπτωση του υπερθυρεοειδισμού και τα αποτελέσματα συγκρίνονται με την μελέτη της TC.

Περιεχόμενα

Περιεχόμενα Εικόνων	11
A. Εισαγωγή	13
Σύνθεση θυρεοειδικών ορμονών στον Θυρεοειδή Αδένα.....	15
Παθήσεις του θυρεοειδούς αδένα.....	21
Η νόσος του Grave (υπερθυρεοειδισμός).....	21
Θυρεοειδίτιδα Hashimoto.....	22
Θυρεοειδίτιδα Riedel.....	23
Διάγνωση των παθήσεων υπερ και υποθυρεοειδισμού.....	23
Θυρεοειδικές Διαταραχές κατά την Εγκυμοσύνη	23
<i>Αντιθυρεοειδικά φάρμακα.....</i>	<i>24</i>
Ραδιενεργό Ιώδιο	27
<i>Τα αντιβιοτικά</i>	<i>28</i>
<i>Τετρακυκλίνη</i>	<i>29</i>
Μηχανισμός δράσης.	30
Παρενέργειες Τετρακυκλίνης.	31
<i>Σκοπός της διατριβής:</i>	<i>33</i>
Πειραματικό μέρος.....	35
<i>Αντιδραστήρια και Μεθοδολογία</i>	<i>35</i>

<i>Μελέτη της αναστολής και του μηχανισμού της καταλυτικής οξείδωσης του ιωδιδίου από το ενζύμου horseradish peroxidase (HRP) από την τετρακυκλίνη.</i>	<i>36</i>
<i>Μελέτη της αναστολής της καταλυτικής οξείδωσης του ιωδιδίου από FeTTPCl από TC</i>	<i>40</i>
<i>Υπολογιστικές Μέθοδοι- Μελέτη Docking</i>	<i>41</i>
Αποτελέσματα και Συζητήσεις	45
<i>Μελέτη της δράσης TC με horseradish peroxidase (HRP)/Φασματοσκοπία Υπεριώδους-Ορατού UV/Vis</i>	<i>45</i>
<i>Είδος Αναστολέα (αντιστρεπτός/ μη αντιστρεπτός)</i>	<i>46</i>
<i>Είδος Μηχανισμού Αναστολής</i>	<i>48</i>
<i>Αναστολή της καταλυτικής δραστηριότητας του FeTTPCl (μοντέλο της δραστηρικής περιοχής του ενζύμου TPO)</i>	<i>51</i>
<i>Θεωρητικοί Υπολογισμοί (μοριακή πρόσδεση)</i>	<i>55</i>
<i>Είδος αναστολής (molecular docking)</i>	<i>58</i>
Συμπεράσματα.....	61
Βιβλιογραφία.....	63

Περιεχόμενα Εικόνων

ΕΙΚΟΝΑ 1: ΘΥΡΕΟΕΙΔΗ ΑΔΕΝΑΣ.....	15
ΕΙΚΟΝΑ 2: ΔΟΜΕΣ ΤΩΝ T4, T3[3-8]	16
ΕΙΚΟΝΑ 3: ΔΟΜΗ ΤΗΣ ΚΑΛΣΙΤΟΝΙΝΗΣ [9]	17
ΕΙΚΟΝΑ 4: ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΘΥΡΕΟΕΙΔΙΚΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ[8-10]	18
ΕΙΚΟΝΑ 5: ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΘΞΕΙΔΩΣΗΣ ΤΟΥ ΙΩΔΙΔΙΟΥ ΣΕ ΔΡΑΣΤΙΚΟ ΔΙ-ΙΩΔΙΟ ΑΠΟ ΤΗΝ ΤΡΟ.....	20
ΕΙΚΟΝΑ 6: ΣΧΗΜΑ ΤΗΣ ΑΥΤΟΑΝΟΣΗΣ ΝΟΣΟΥ HASHIMO [19]	22
ΕΙΚΟΝΑ 7: ΤΑ ΕΥΡΕΟΣ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΜΕΝΑ ΦΑΡΜΑΚΑ ΓΙΑ GRAVES' DISEASE ΠΡΟΠΥΛΘΕΙΟΥΡΑΚΙΛΗ (Α), ΜΕΘΙΜΑΖΟΛΗ (Β), ΚΑΡΜΠΙΜΑΖΟΛΗ (Γ)	25
ΕΙΚΟΝΑ 8: ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΘΕΙΟΛΩΝ ΣΤΩΝ ΘΥΡΕΟΕΙΔΗ ΑΔΕΝΑ.....	26
ΕΙΚΟΝΑ 9: ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΗ.....	29
ΕΙΚΟΝΑ 10: ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΛΟΓΑΡΙΘΜΟΥ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ MMI ΜΕ ΤΗΝ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ A%	45
ΕΙΚΟΝΑ 11: ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΛΟΓΑΡΙΘΜΟΥ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ TC ΜΕ ΤΗΝ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ A%.....	46
ΕΙΚΟΝΑ 12: ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΑΡΧΙΚΗΣ ΤΑΧΥΤΗΤΑΣ V ₀ ΣΥΝΑΡΤΗΣΗ ΤΟΥ ΧΡΟΝΟΥ ΕΠΩΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΜΕ ΤΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ TIME (MIN) ΓΙΑ ΤΗΝ TC	47
ΕΙΚΟΝΑ 13: ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΑΡΧΙΚΗΣ ΤΑΧΥΤΗΤΑΣ V ₀ ΣΥΝΑΡΤΗΣΗ ΤΟΥ ΧΡΟΝΟΥ ΕΠΩΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΜΕ ΤΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ TIME (MIN) ΓΙΑ ΤΟ MMI.....	47

ΕΙΚΟΝΑ 14: ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ LINEWEAVER-BURK $1/V_0$ VS $1/[S]$ ΓΙΑ ΤΟ ΕΝΖΥΜΟΥ HRP	49
ΕΙΚΟΝΑ 15: ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ LINEWEAVER-BURK $1/V_0$ VS $1/[S]$ ΓΙΑ ΤΟ MMI	50
ΕΙΚΟΝΑ 16: ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ LINEWEAVER-BURK $1/V_0$ VS $1/[S]$ ΓΙΑ ΤΗΝ TC	50
ΕΙΚΟΝΑ 17: ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΕΙΣ ΤΟΥ ΚΑΤΑΛΥΤΗ ΜΕ ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΗ	52
ΕΙΚΟΝΑ 18: ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΕΙΣ ΤΟΥ ΚΑΤΑΛΥΤΗ ΜΕ ΜΕΘΙΜΑΖΟΛΗ.....	53
ΕΙΚΟΝΑ 19: ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΕΛΛΙΜΕΝΙΣΜΟΥ ΤΗΣ TC ΣΤΗΝ HRP	56
ΕΙΚΟΝΑ 20: ΔΕΣΜΟΙ ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ ΜΕΤΑΞΥ HRP-TC	57
ΕΙΚΟΝΑ 21: ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΕΛΛΙΜΕΝΙΣΜΟΥ ΤΗΣ MMI ΣΤΗΝ HRP	58
ΕΙΚΟΝΑ 22: ΒΡΑΒΕΙΟ ΑΠΟ ΤΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ SCDS-UDJG ΣΤΗΝ ΡΟΥΜΑΝΙΑ.....	70

Περιεχόμενα Πινάκων

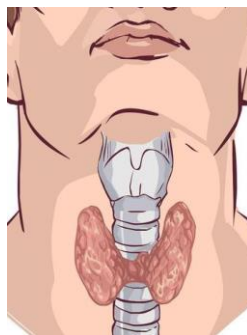
ΠΙΝΑΚΑΣ 1: ΤΙΜΕΣ ΤΩΝ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΕΩΝ ΤΩΝ ΦΑΣΜΑΤΩΝ ΜΕ ΤΟΥΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΣΤΑ 353 NM	53
ΠΙΝΑΚΑΣ 2: ΕΝΕΡΓΕΙΕΣ ΤΩΝ ΣΤΑΘΕΡΟΤΕΡΩΝ ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΕΩΝ ΠΟΥ ΥΠΟΛΟΓΙΖΟΝΤΑΙ ΓΙΑ ΤΟ ΣΥΜΠΛΟΚΟ HRP-TC	55
ΠΙΝΑΚΑΣ 3: ΔΕΣΜΟΙ ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ ΠΟΥ ΑΝΑΠΤΥΣΣΟΝΤΑΙ ΑΝΑΜΕΣΑ ΣΤΗΝ TC ΚΑΙ HRP ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΜΕΤΑΞΥ HRP-TC	56
ΠΙΝΑΚΑΣ 4: ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ MMI-HRP	57
ΠΙΝΑΚΑΣ 5: ΔΕΣΜΟΣ ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ ΠΟΥ ΑΝΑΠΤΥΣΣΟΝΤΑΙ ΑΝΑΜΕΣΑ ΣΤΟ MMI- HRP	58
ΠΙΝΑΚΑΣ 6: ΕΝΕΡΓΕΙΑΚΗ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ES, ESI ΚΑΙ EI (KCAL/MOL) ΟΠΟΥ I= TC, S= I ₂	59

A. Εισαγωγή

Ο θυρεοειδής αδένας είναι ένας από τους πιο κρίσιμους αδένες του οργανισμού, επειδή παράγει ορμόνες που ρυθμίζουν τον μεταβολισμό, την ανάπτυξη και πολλές άλλες βιολογικές διεργασίες. Υπάρχουν πολλές παθήσεις του θυρεοειδούς αδένος [1].

Σύνθεση θυρεοειδικών ορμονών στον Θυρεοειδή Αδένα

Ο θυρεοειδής αδένας βρίσκεται μπροστά και κάτω από το λάρυγγα και αποτελείται από δυο λοβούς που ενώνονται με έναν ισθμό. (Εικόνα 1)

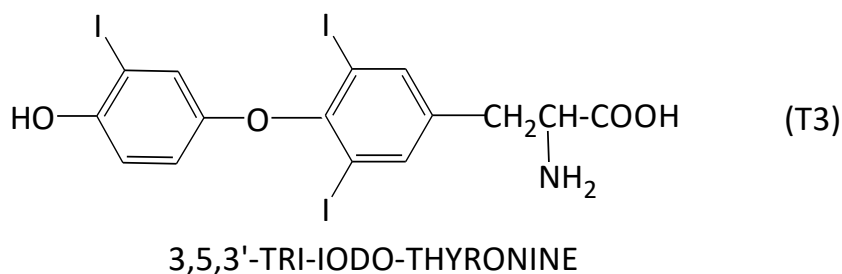
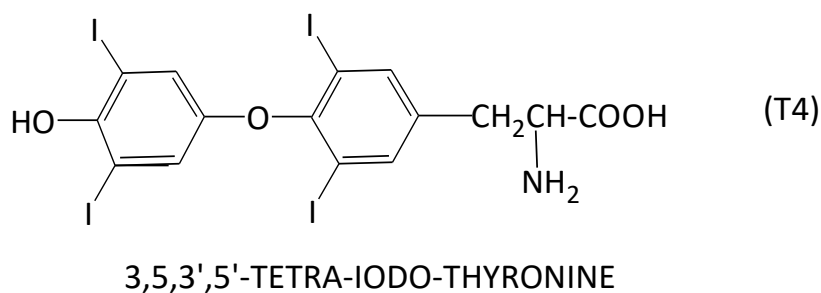


Εικόνα 1: Θυρεοειδή Αδένας

Στον αδένά αυτό συντίθεται οι θυρεοειδικές ορμόνες θυροξίνη (τετραϊωδοθυρονίνη ή T4) και τρι-ιωδοθυρονίνη (T3) (Εικόνα 2) που συμμετέχουν στην ρύθμιση του βασικού μεταβολικού ρυθμού των κυττάρων ολόκληρου του σώματος, καθώς και την πολυπεπτιδική καλσιτονίνη [2].

Η καλσιτονίνη (CT), είναι μια πολυπεπτιδική ορμόνη που εκκρίνεται από τα κύτταρα του θυρεοειδούς και συμμετέχει στη ρύθμιση των επιπέδων του ασβεστίου και του φωσφόρου στο αίμα (Εικόνα 3) [2].

Οι Θυρεοειδικές ορμόνες περιέχουν δύο δακτυλίους βενζολίου: έναν εσωτερικό δακτύλιο τυροσίνης, που συχνά ονομάζεται και άλφα δακτύλιος και έναν εξωτερικό φαινολικό ή β-δακτύλιο. Ο ένας δακτύλιος έχει υδροξύλομάδα (OH) και ο άλλος συνδέεται με την πλευρική αλυσίδα ($\text{CH}_2\text{-CH}(\text{NH}_2)\text{-COOH}$) παρόμοια με αυτήν της αλανίνης.



Εικόνα 2: Δομές των T4, T3[3-8]

Η σύνθεση των θυρεοειδικών ορμονών πραγματοποιείται στα θυλακοειδή κύτταρα του θυρεοειδούς και περιλαμβάνει τα παρακάτω διαδοχικά στάδια (Εικόνα 4):

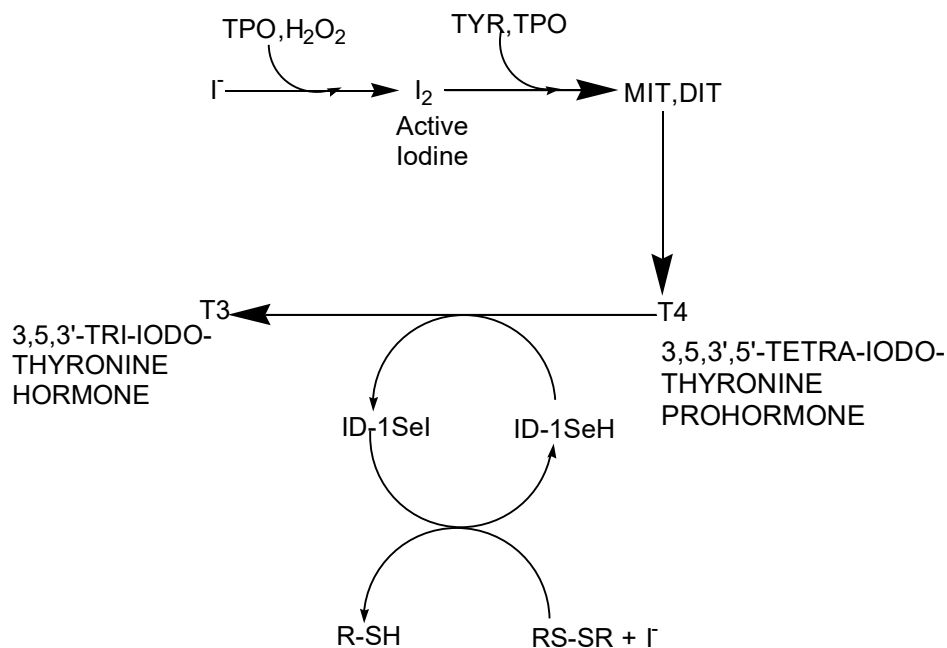
1. Πρόσληψη ανόργανου ιωδιδίου μέσω του συμμεταφορέα νατρίου-ιωδιδίου (NIS).
2. Οξείδωση του ιωδιδίου σε μοριακό δι-ιώδιο με τη δράση του υπεροξειδίου, του υδρογόνου (H_2O_2) και του ενζύμου θυρεοειδικής υπεροξειδάσης (TPO).
3. Προσθήκη του ενεργού δι-ιωδίου, σε κατάλοιπα τυροσίνης της θυρεοσφαιρίνης (Tg) και σχηματισμός μονο-ιώδο και δι-ιώδο τυροσίνης



Εικόνα 3: Δομή της καλσιτονίνης [9]

4. Στην συνέχεια μέσω κατάλληλης διαμόρφωσης της θυρεοσφαιρίνης δυο τυροσίνης σε θέσεις tail to tail συμπυκνώνονται με την βοήθεια της TPO και παράγεται η μονο-ιώδιο-τυροσίνη (MIT) και η δι-ιώδιο-τυροσίνη (DIT).
5. Σύζευξη ιωδοτυροσίνων, όπου δύο μόρια DIT σχηματίζουν θυροξίνη (T4), ενώ ένα μόριο MIT και ένα DIT παράγουν τρι-ιώδοτυροσίνη ή θυρονίνη (T3) .
6. Αποθήκευση των ορμονών στη θυρεοσφαιρίνη και απελευθέρωση τους στην κυκλοφορία μετά από πρωτεολυτική διάσπαση.
7. Ενεργοποίηση της ορμόνης με αποϊωδίνωση της T4 σε T3 από το ένζυμο δε-ιωδινάση.

Η ρύθμιση της έκκρισης των θυρεοειδικών ορμονών ελέγχεται από τον άξονα υποθάλαμος-θυρεοειδής. Η θυρεοειδοτρόπος ορμόνη (TSH) του υποθάλαμου προάγει τη σύνθεση και απελευθέρωση των T3 και T4 [2].



Εικόνα 4: Βιοσύνθεση των θυρεοειδικών ορμονών[8-10]

Το κυριότερο βιολογικό μόριο το οποίο συμμετέχει στην παραγωγή των θυρεοειδικών ορμονών είναι η γλυκοπρωτεΐνη/θυρογλομπουλίνη (Tg) η οποία βιοσυντίθεται από τα θυρεοειδικά κύτταρα. Επίσης πολλές ποσότητες του ιωδίου αποθηκεύονται στην Tg και αξίζει να σημειωθεί πως στις περιπτώσεις στις οποίες συμβαίνουν μεταλλάξεις εμφανίζονται παθήσεις [2].

Οι υπεροξειδάσες είναι ένζυμα που οξειδώνουν πληθώρα υποστρωμάτων με υπεροξείδιο του υδρογόνου [11]. Πρόκειται για γλυκοπρωτεΐνες που περιέχουν σίδηρο ή αιμικό σίδηρο στο

δραστικό κέντρο και έχουν μοριακό βάρος που κυμαίνεται μεταξύ 30 και 55 kDa. Οι υπεροξειδάσες λειτουργούν καλύτερα σε pH 4-7 και σε κάποιες περιπτώσεις ενεργοποιούνται από ιόντια ασβεστίου.

Η TPO είναι μια γλυκοζυλιωμένη, διαμεμβρανική αιμοπρωτεΐνη τύπου 1. Η σύνθεση της ξεκινά από τα θυλακοειδή κύτταρα και ακολουθεί η είσοδός της στη μεμβράνη του ενδοπλάσματικού δικτύου, όπου υφίσταται αρχική γλυκοζυλίωση. Στη συνέχεια, η TPO μεταφέρεται μαζί με τη θυρεοσφαιρίνη (Tg) μέσω εξωκυτταρικών κυστιδίων προς το σύμπλεγμα Golgi, όπου υποβάλλεται σε τελική επεξεργασία γλυκοζυλίωσης [12]. Η TPO προσανατολίζεται έτσι ώστε η καταλυτική της περιοχή, η οποία περιέχει την αιμική ομάδα, να εκτίθεται στον αυλό του θυρεοειδικού θυλακίου [8]. Η ενζυματική δραστηριότητα της TPO εξαρτάται από τη σύνδεση της με μια ομάδα αίμης, συγκεκριμένα τη σιδηροπρωτοπορφυρίνη IX ή κάποια συγγενή πορφυρίνη. Η απομάκρυνση αυτής της προσθετικής ομάδας καθιστά το ένζυμο ανενεργό, ενώ η εκ νέου σύνδεσή του με την αίμη αποκαθιστά τη λειτουργικότητά του [13].

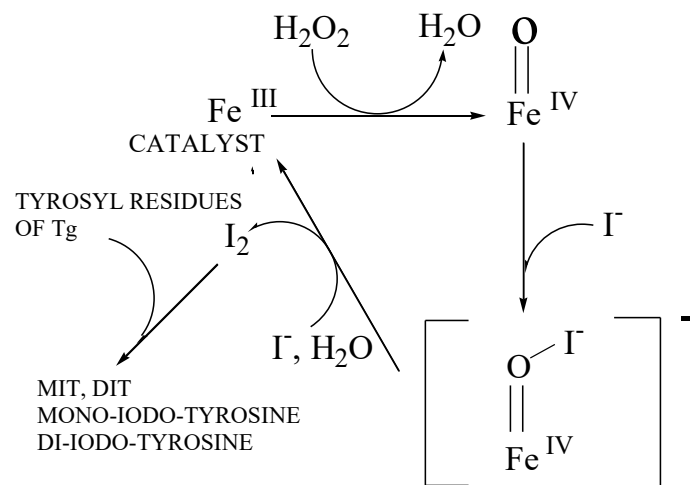
Ο αιμικός σίδηρος στην TPO βρίσκεται στη σιδηρούχο μορφή (Fe^{3+}). Η FeTTPCl χρησιμοποιείται ως μοντέλο του ενεργού κέντρου της TPO [14].

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) θεωρείται ότι οξειδώνει το σίδηρο του ενζύμου, (εικόνα 5). Σχηματίζεται ένα ενδιάμεσο προϊόν για πολύ μικρό χρονικό διάστημα και έπειτα ανάγεται σε σίδηρο τρισθενές και παράγει ως προϊόν το δι-ιωδίδιο. (Εικόνα 5) [6].

Οι δεϊωδινάσες ανήκουν στα σελενοενζύμα, καθώς περιέχουν σελήνιο στα ενεργά τους κέντρα. Η οικογένεια των δεϊωδινάσεων περιλαμβάνει τρεις τύπους ενζύμων: D1, D2 και D3. Καθένα από αυτά εξυπηρετεί διαφορετικούς ρόλους στον μεταβολισμό των θυρεοειδικών ορμονών [15-17].

- D1 (Δεϊωδινάσης τύπου 1): Παράγεται από το ήπαρ και τα νεφρά και αφαιρεί το ιώδιο από T4 σε T3, τη βιολογικά ενεργή μορφή της ορμόνης που είναι υπεύθυνη για το μεγαλύτερο μέρος της T3 στην κυκλοφορία του αίματος. Αυτός ο τύπος δεϊωδινάσης αναστέλλεται από την προπυλθυοθρακίλη, αντιθυρεοειδικό φάρμακο.
- D2 (Δεϊωδινάσης τύπου 2): Ρυθμίζεται επίπεδα T3 τοπικά στους ιστούς, όπως ο εγκέφαλος και ο σκελετικός μυς, λειτουργεί στην ανάπτυξη και στο νευρικό σύστημα. Το ένζυμο αυτό καταλύει τη μετατροπή της T4 σε T3.
- D3 (Δεϊωδινάσης τύπου 3): Εμποδίζει την μετατροπή της T4 σε T3 (rT3)

Η δράση αυτών των ενζύμων εξασφαλίζει την προσαρμογή της ορμονικής δραστηριότητας στις τοπικές και συστηματικές ανάγκες κάθε ιστού.



Εικόνα 5: Μηχανισμός οξείδωσης του ιωδιδίου σε δραστικό δι-ιώδιο από την TPO

Παθήσεις του θυρεοειδούς αδένα

Η πρώτη αναφορά για πάθηση του θυρεοειδούς αδένα έγινε κατά την αρχαιότητα, όταν Κινέζοι και Ινδοί θεραπευτές-«ιατροί» διέκριναν περιπτώσεις διόγκωσης στον λαιμό που εμπλέκονται με διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Ο όρος «βρογχοκήλη» περιγράφει αυτές τις διογκώσεις [1].

Στην αρχαία Κίνα και Ινδία έβρισκαν πληροφορίες σχετικά με τις ασθένειες του θυρεοειδούς αδένα. Οι αρχαίοι Κινέζοι χρησιμοποίησαν φύκια ως θεραπεία για την βρογχοκήλη, με απότοκο να καταλάβουν σε μεγάλο βαθμό την σημασία του ιωδίου για την λειτουργία του θυρεοειδούς. Για αυτό τον λόγο οι Ινδοί περιγράφουν θεραπείες για τη διόγκωση του λαιμού βασισμένες σε φυσικά προϊόντα [1]. Στην αρχαία Ελλάδα, ο Ιπποκράτης που αναγνωρίζεται ως «πατέρας της ιατρικής», δεν εντόπισε πολλά για τον θυρεοειδή όμως παρατήρησε θυρεοειδικές διαταραχές όπως η βρογχοκήλη. Οι Έλληνες και οι Ρωμαίοι ανακάλυψαν την βρογχοκήλη σε πολλά μέρη της γης και κατέληξαν στο συμπέρασμα, ότι, η έλλειψη του ιωδίου μπορεί να διαδραματίζει ρόλο [1].

Η νόσος του Grave (υπερθυρεοειδισμός)

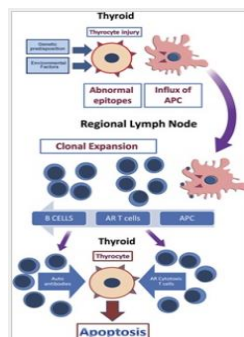
Η νόσος του Grave (GD) είναι ένα αυτόανοσο νόσημα στο οποίο το ανοσοποιητικό σύστημα παράγει αντισώματα που διεγείρουν τον υποδοχέα της θυρεοτροπίνης (TSHR), οδηγώντας σε αυξημένη λειτουργία του θυρεοειδούς αδένα. Αυτή η διέγερση προκαλεί υπερτροφία και υπερπλασία των θυλακίων, με αποτέλεσμα τη διόγκωση του θυρεοειδούς και την υπερπαραγωγή θυρεοειδικών ορμονών. Η GD επηρεάζει περίπου το 0.5-2% του πληθυσμού και αποτελεί την πιο συχνή αιτία υπερθυρεοειδισμού [18]. Η νόσος του Grave είναι η συχνότερη αιτία

υπερθυρεοειδισμού στις ανεπτυγμένες χώρες. Είναι πιο συχνή μεταξύ 30 και 60 ετών και εμφανίζεται 5-10 φορές συχνότερα στις γυναίκες. Η γενετική προδιάθεση ευθύνεται για το 79% του κινδύνου ανάπτυξης GD, ενώ οι περιβαλλοντικοί παράγοντες ηπία το 21%. Περίπου το 70% των γονιδίων που σχετίζονται με αυτόνοσα νοσήματα του θυρεοειδούς (AITD) εμπλέκονται στη λειτουργία των T-λεμφοκυττάρων.

Μεταξύ των ενδογενών παραγόντων της GD, σημαντικό ρόλο παίζουν τα οιστρογόνα, η αδρανοποίηση του χρωμοσώματος X. Από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες κινδύνου, το κάπνισμα, η υπερβολική πρόσληψη ιωδίου, η έλλειψη σεληνίου και βιταμίνης D έχουν συσχετιστεί με τη νόσου Graves [18].

Θυρεοειδίτιδα Hashimoto

Η χρόνια αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα γνωστή ως θυρεοειδίτιδα Hashimoto, είναι συχνότερη αιτία υποθυρεοειδισμού σε πληθυσμούς με μικρή κατανάλωσή ιωδίου. Βασικό χαρακτηριστικό της είναι η παρουσία αντιθυρεοειδικών αντισωμάτων, τα οποία προσφέρουν την δυνατότητα για διάγνωση και θεραπεία της παθολογείας αυτής [19].



Εικόνα 6: Σχήμα της αυτοάνοση νόσο Hashimo [19]

Θυρεοειδίτιδα Riedel

Η θυρεοειδίτιδα Riedel είναι μια σπάνια νόσος όπου οι ασθενείς συχνά παρουσιάζουν συμπτώματα όπως δυσκολία κατάποσης ή αναπνοής. Η ακριβής αιτιολογία παραμένει άγνωστη.[22] Τα κυριότερα συμπτώματα είναι πυρετός, εκτατός δυνατός πόνος στον λαιμό και πολλές φορές εντοπίζεται ως υποθυρεοειδισμός. Οι ασθενείς με θυρεοειδίτιδα Riedel συνήθως είναι ευ θυρεοειδείς [20-24].

Διάγνωση των παθήσεων υπερ και υποθυρεοειδισμού.

Και στις δύο περιπτώσεις η διάγνωση των υπερ και υποθυρεοειδισμού γίνεται με εξέταση αίματος όπου παρακολουθούνται τα επίπεδα των TSH στο αίμα. Σε περίπτωση που η τιμή του TSH είναι αυξημένη σημαίνει ότι υπάρχει περίπτωση να εμφανίζεται ο υποθυρεοειδισμός, και όταν είναι χαμηλή υπάρχει περίπτωση να εμφανίζεται ο υπερθυρεοειδισμός. Όταν η τιμή του TSH είναι αυξημένη, η κυκλοφορία των T3 και T4 είναι μειωμένη και αντίστροφα συμβαίνει όταν η τιμή του TSH είναι μειωμένη. Σε περιπτώσεις όπου η νόσος του υποθυρεοειδισμού δεν διαγιγνώσκεται από τις τιμές του TSH γίνεται η μέτρηση των αντισωμάτων του θυρεοειδούς, όπου σε περίπτωση που είναι αυξημένη σημαίνει πως ο υποθυρεοειδισμός έχει ανιχνευτεί [21].

Θυρεοειδικές Διαταραχές κατά την Εγκυμοσύνη

Κατά την εγκυμοσύνη, οι αλλαγές στη λειτουργία του θυρεοειδούς είναι πολύ σημαντικές τόσο για την υγεία της μητέρας όσο και για την ανάπτυξη του εμβρύου. Οι θυρεοειδικές ορμόνες αυξάνονται λόγω των αναγκών του εμβρύου και της δράσης της θυρεοειδοτρόπος ορμόνης (hCG) που εκκρίνεται από τον πλακούντα [22].

Ο υποθυρεοειδισμός φέρνει στην εγκυμοσύνη έναν αυξημένο κίνδυνο αποβολών, πρόωρων τοκετών και νεογνικής συστήματος του εμβρύου. Από την άλλη πλευρά, ο υπερθυρεοειδισμός επηρεάζει σε επιπλοκές όπως υπέρταση της κύησης. Γι' αυτό οι γυναίκες οποίες πάσχουν από κάποια διαταραχή θυρεοειδικών πρέπει να παρακολουθούνται [22].

Η θεραπεία με λεβοθυροξίνη (LT4) για τη διόρθωση του υποθυρεοειδισμού είναι πολύ σημαντική για την καλή ανάπτυξη του εμβρύου και τη διασφάλιση της υγείας της μητέρας.

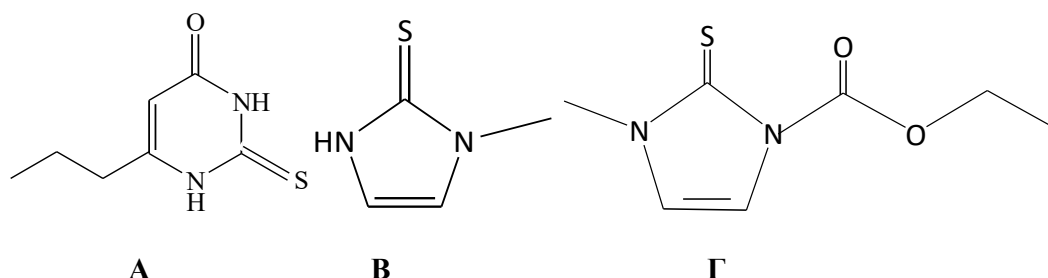
Η πρόωμη ανίχνευση του υποθυρεοειδισμού έχει καθιερωθεί ως μια από τις καλύτερες μεθόδους πρόληψης μόνιμων προβλημάτων υγείας στα παιδιά [23–24]. Τα αποτελέσματα της ερευνάς έδειξαν ότι ο υποθυρεοειδισμός εμφανίζεται σε περίπου 1 στα 4.000 έμβρυα. Η θεραπεία με θυροξίνη (T4) επέτρεψε τη φυσιολογική ανάπτυξη των παιδιών με ασθένεια μειώνοντας σημαντικά τις πιθανότητες εμφάνισης αναπτυξιακών και γνωστικών προβλημάτων [23-24].

Αντιθυρεοειδικά φάρμακα

Ο υπερθυρεοειδισμός αποτελεί μία από τις συχνότερες μορφές ενδοκρινολογικών διαταραχών. Τα αντιθυρεοειδικά φάρμακα και άλλες ουσίες με αντιθυρεοειδική δράση ασκούν την επίδρασή τους κυρίως μέσω αναστολής της σύνθεσης, απελευθέρωσης, ή του μεταβολισμού των θυρεοειδικών ορμονών [6-7].

Προπυλθειουρακίλη, μεθιμαζόλη και η καρμπιμαζόλη: Τα κυριότερα αντιθυρεοειδικά φάρμακα για τον υπερθυρεοειδισμό (Graves' disease) είναι η προπυλθειουρακίλη, μεθιμαζόλη και η καρμπιμαζόλη, που περιέχουν θειοαμιδικές ομάδες (Εικόνα 7). Η καρμπιμαζόλη θεωρείται προφάρμακο το οποίο μεταβολίζεται σε μεθιμαζόλη στον αδένα στόχο. Τα φάρμακα αυτά είναι τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα στη κλινική αντιμετώπιση [6-7].

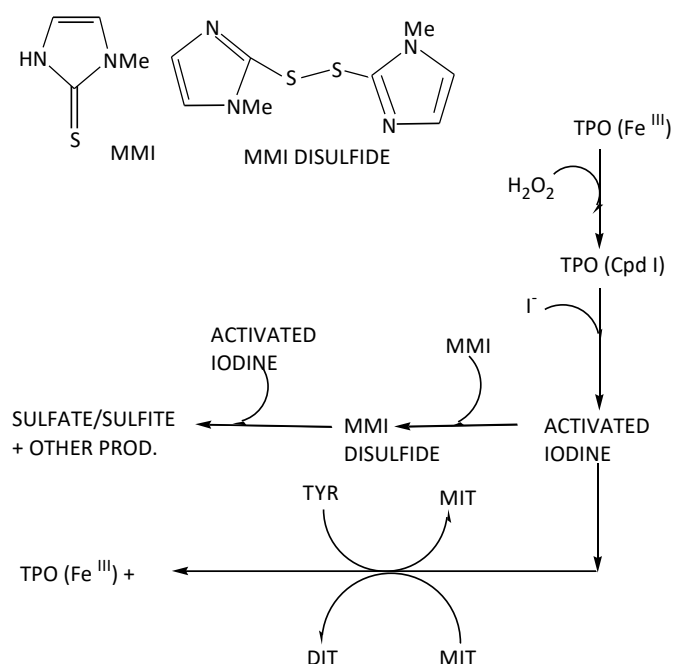
•



Εικόνα 7: Τα ευρέως χρησιμοποιούμενα φάρμακα για Graves' disease Προπυλθειουρακίλη (A), Μεθιμαζόλη (B), Καρμπιμαζόλη (Γ)

Το φαινόμενο οξείδωσης των θειολών με μοριακό ιώδιο και σχηματισμού δισουλφιδίων με ταυτόχρονη αναγωγή του δι-ιωδίου σε ιωδίδιο θα μπορούσε να εξηγήσει την δέσμευση και απενεργοποίηση του ενεργού δι-ιωδίου, που είναι απαραίτητο για τη σύνθεση των θυρεοειδικών ορμονών (T₃ και T₄) [6].

Τα ιμιδιαζολικά παράγωγα των θειονών όπως το MMI αναστέλλουν την σύνθεση των θυρεοειδικών ορμονών ανταγωνιζόμενα με την τυροσίνη της θυρογλομπουλίνης το δραστικό δι-ιώδιο. (Εικόνα 10) Ο σχηματισμός του τριϊωδιούχο ανιόντος όταν τα ιμιδιαζολικά θειοαμίδια αλληλεπιδρούν με το δι-ιώδιο δείχνει ότι ένας πιθανός μηχανισμός μπορεί να είναι ο ανταγωνισμός με την τυροσίνη της θυρογλομπουλίνη με το δραστικό ιώδιο που τελικά παράγεται σε δι-ιωδίδιο με παράλληλη οξείδωση του θειοαμιδίου σε δισουλφίδιο [23]. Επίσης το MMI ανατέλλει το ένζυμο θυρεοειδικής υπεροξειδάσης παρεμβαίνοντας στην βιοσύνθεση των θυρεοειδικών ορμονών μέσω της αναστολής της παραγωγής του δραστικού δι-ιωδίου [21].



Εικόνα 8: Μηχανισμός δράσης των θειολών στον θυρεοειδή αδένα

Οι αντιδράσεις των ιώδιο-οργανοσεληνολών με θειουρακηλικά φάρμακα, όπως η 6-προπυλ-2-θειουρακίλη (PTU) (εικόνα 6), δηλητηριάζουν το ένζυμο της θυρεοειδικής δεϊωδινάσης καθώς περιέχει σελήνιο στην δραστική του περιοχή. Οι θειουρακήλες και τα παράγωγα τους δρουν ως αναστολείς της αποϊωδίωση της T₄ [7]. Από την άλλη τα θειουρακηλικά παράγωγα αναστέλλουν την οξείδωση του δι-ιωδίου σε δραστικό ιώδιο δηλητηριάζοντας το ένζυμο θυρεοειδική υπεροξειδάση (TPO).

Λεβοθυροξίνη: Η λεβοθυροξίνη (Εικόνα) είναι η συνθετική μορφή της θυροξίνης (T₄), της κύριας ορμόνης που παράγεται από τον θυρεοειδή αδένα. Αποτελεί πρόδρομο μόριο της τριωδοθυρονίνη (T₃), της βιολογικά ενεργής μορφής των θυρεοειδικών ορμονών. Η μετατροπή της T₄ σε T₃

πραγματοποιείται στους περιφερικούς ιστούς μέσω της δράσης των ενζύμων ιωδοθυρονίνης δεϊωδινάσης [25].

Η λεβοθυροξίνη χρησιμοποιείται στην θεραπεία του υποθυρεοειδισμού. Η δόση της εξατομικεύεται με στόχο την επίτευξη φυσιολογικών επιπέδων της θυρεοειδοτρόπου ορμόνης TSH, λαμβάνοντας υπόψη παραμέτρους όπως η καρδιολογική κατάσταση και η συνύπαρξη αυτοάνοση θυρεοειδοπάθειας. Η θεραπεία με LT4 αποκαθιστά τα επίπεδα θυρεοειδικών ορμονών και εξασφαλίζει επαρκή μετατροπή της T4 σε T3 στην πλειονότητα των ασθενών [25].

Η αποτελεσματικότητά της θεραπείας εξαρτάται σημαντικά από τη σωστή απορρόφηση της λεβοθυροξίνης, η οποία επηρεάζεται από γαστρεντερικούς και φαρμακολογικούς παράγοντες [23].

Ραδιενεργό Ιώδιο: Το ραδιενεργό ιώδιο αποτελεί ευρέως χρησιμοποιούμενη θεραπεία για τον υπερθυρεοειδισμό του Graves, χάρη στην υψηλή αποτελεσματικότητα, την ασφάλεια και το χαμηλό κόστος του, καθιστώντας το την κύρια επιλογή για την αντιμετώπιση της νόσου. Το ραδιενεργό Ιώδιο (^{131}I) χρησιμοποιείται ως θεραπεία και για τον υπερθυρεοειδισμό και τον θυροειδή καρκίνο. Αυτή η μεθοδολογία οφείλεται στην ικανότητα του θυρεοειδή να προσροφά το ιώδιο εκλεκτικά οπότε καταστρέφονται οι καρκινικοί παθολογικοί ιστοί με ελάχιστες παρενέργειες στους υγιείς ιστούς. Σε ορισμένους ασθενείς, η θεραπεία με ραδιενεργό ιώδιο μπορεί να οδηγήσει σε επιδείνωση του υπερθυρεοειδισμού, γεγονός που αποδίδεται στη διατάραξη της δομής των θυλακίων του θυρεοειδή ακολουθούμενη από βλάβη από την ακτινοβολία, με αποτέλεσμα τη διαρροή ήδη παραγόμενων θυρεοειδικών ορμονών στην κυκλοφορία του αίματος [26].

Ο μηχανισμός δράσης του ραδιενεργού ιωδίου είναι φυσιολογικός. Το ιώδιο είναι η πρόδρομη ουσία της θυροξίνης. Η ραδιενεργός μορφή του ιωδίου προσλαμβάνεται από τον μεταφορέα ιωδίου του θυρεοειδούς αδένος με τον ίδιο τρόπο όπως το μη ραδιενεργό ιώδιο και υφίσταται παρόμοια επεξεργασία. Οι β ακτίνες καταστρέφουν το θυλάκιο κύτταρο, οδηγώντας σταδιακά σε μείωση του όγκου [26].

Τα αντιβιοτικά

Αρχικά, τα αντιβιοτικά είναι φυσικές ουσίες που παρήγαγαν μικροοργανισμοί με σκοπό την επιλεκτική αναστολή της ανάπτυξης άλλων μικροοργανισμών. Με την πάροδο του χρόνου, αναπτυχθήκαν συνθετικά αντιβιοτικά που έχουν παρόμοια δράση και συχνά παρουσιάζουν χημική συγγένεια με τα φυσικά αντιβιοτικά. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι τα αντιβιοτικά δεν επηρεάζουν τις ιογενείς λοιμώξεις, αλλά χρησιμοποιούνται κυρίως για τη θεραπεία βακτηριακών λοιμώξεων τόσο στον άνθρωπο όσο και στα ζώα [27].

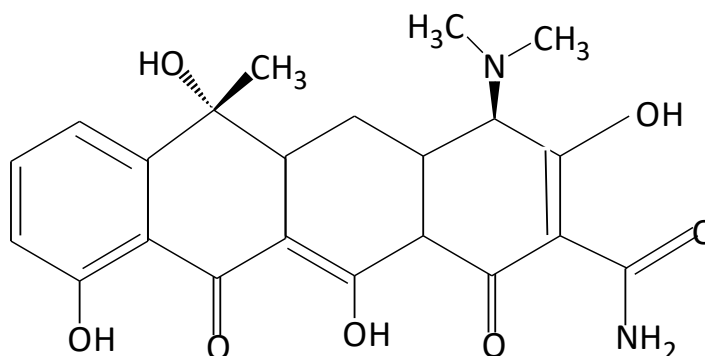
Η ταξινόμηση των αντιβιοτικών μπορεί να βασίζεται σε διάφορα κριτήρια, όπως η χημική δομή τους, ο τρόπος δράσης τους ή το είδος των βακτηρίων που αναστέλλουν. Οι περισσότερες κατηγοριοποιήσεις διακρίνουν τα αντιβιοτικά είτε με βάση τη χημική τους σύνθεση είτε σύμφωνα με τον μηχανισμό δράσης τους.

Ανάλογα με τη δράση τους, λοιπόν τα αντιβιοτικά διακρίνονται σε βακτηριοκτόνα και βακτηριοστατικά. Τα βακτηριοκτόνα σκοτώνουν τα βακτήρια, με χαρακτηριστικά παραδείγματα την πενικιλίνη, την κεφαλοσπορίνη και την αμινογλυκοσίδη. Αντίθετα, τα βακτηριοστατικά αναστέλλουν την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των βακτηρίων, δίνοντας στο ανοσοποιητικό σύστημα τον χρόνο να τα εξουδετερώσει όπως η οξαζολινόδες, η τετρακυκλίνη.

Ο μηχανισμός δράσης των αντιβιοτικών περιλαμβάνει διάφορους τρόπους καταπολέμησης των βακτηρίων, όπως την παρεμπόδιση της σύνθεσης της βακτηριακής κυτταρικής μεμβράνης, την αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης, την διακοπή της σύνθεσης του γενετικού υλικού (DNA/RNA), την αναστολή των βιοχημικών μεταβολικών διεργασιών, την δέσμευση μεταλλικών ιόντων όπου είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη των βακτηρίων και την αποδιοργάνωση της βακτηριακής μεμβράνης οδηγώντας στην καταστροφή της [27].

Τετρακυκλίνη

Η Τετρακυκλίνη είναι ένα ευρέως φάσματος αντιβιοτικό και δρα αναστέλλοντας την σύνθεση πρωτεϊνών σε ριβοσομικό επίπεδο (Εικόνα 15). Η χρήση τους έγινε ευρέως διαδεδομένη από τους δερματολόγους στις αρχές της δεκαετίας του 1950, όταν διαπιστώθηκε η αποτελεσματικότητά τους στη θεραπεία της ακμής. Τα τελευταία χρόνια, έχουν μελετηθεί οι βιολογικές τους ιδιότητες, οι οποίες επηρεάζουν διάφορες διαδικασίες, όπως η φλεγμονή, η πρωτεόλυση, η αγγειογένεση, η απόπτωση, η δέσμευση μετάλλων, η ιονοφόρηση και ο μεταβολισμός των οστών.



Εικόνα 9: Τετρακυκλίνη

Εκτός από την ακμή η θεραπευτική δράση της τετρακυκλίνης και των παράγωγων της έχει ερευνηθεί σε άλλες παθολογικές καταστάσεις όπως, οι πομφολυγώδεις δερματοπάθειες, οι ουδετεροφιλίες δερματικές παθήσεις, οι γαγγραινώδεις υπόδερμα, η σαρκοείδωση, τα ανευρύσματα τη αορτής, η μετάσταση καρκίνου, η περιοδοντίτιδα, καθώς και διάφορες αυτοάνοσες διαταραχές όπως η ρευματοειδή αρθρίτιδα και το σκληρόδερμα [28-29].

Χάρης στη βιολογική τους δράση έναντι ποικίλων μικροβιακών παθογόνων, αλλά και στις εφαρμογές τους σε θηλαστικά μοντέλα φλεγμονής, νευροεκφυλιστικών παθήσεων και άλλων βιολογικών διεργασιών, η τετρακυκλίνη πρόκειται να διατηρήσει τη σημασία της τόσο ως θεραπευτικό μέσον για λοιμώδη νοσήματα όσο και ως πιθανή θεραπεία για παθήσεις που σχετίζονται με φλεγμονώδεις διεργασίες.

Ωστόσο, λόγω των παρενεργειών τους, της αυξανόμενης αντοχής των μικροβίων αλλά και της ύπαρξης εναλλακτικών αντιβιοτικών η κλινική τους χρήση είναι πλέον περιορισμένη [27].

Μηχανισμός δράσης : Η τετρακυκλίνη αναστέλλει την κυτταρική ανάπτυξη μέσω παρεμπόδισης της μετάφρασης. Συνδέεται με το τμήμα 16S της ριβοσυμικής υπομονάδας 30S και αναστέλλει την πρωτεϊνσύνθεση. Αυτή η δέσμευση είναι αναστρέψιμη.

Για να εισαχθούν στο κύτταρο και να συνδεθούν με τα μόρια-στόχους, οι τετρακυκλίνες πρέπει να περάσουν από διάφορα μεμβρανικά συστήματα ανάλογα με τον τύπο του βακτηρίου. Αρχικά για να περάσουν την κυτταρική μεμβράνη των κατά gram-αρνητικών βακτηρίων πρέπει να περάσουν από κάποια κανάλια-πόρους με τη μορφή θετικά φορτισμένων συμπλοκών με κάποιο μέταλλο (τις περισσότερες φορές είναι το μαγνήσιο). Το σύμπλοκο τετρακυκλίνης-μαγνησίου στη συνέχεια διασπάται και το λιπόφιλο μόριο της τετρακυκλίνης απελευθερώνεται στην εσωτερική κυτταροπλασματική μεμβράνη. Στην περίπτωση των κατά gram θετικών βακτηρίων, η είσοδος

των τετρακυκλίνων από την κυτταροπλασματική μεμβράνη πραγματοποιείται μέσω ενεργητικής μεταφοράς, όπου οι τετρακυκλίνες βρίσκονται σε ελεύθερη μορφή και όχι συμπλοκοποιημένες, και συνδέονται με το 30S ανατέλλοντας έτσι την πρωτεϊνσύνθεση. Αυτό το είδος αναστολής όπου συνδέεται το σύμπλοκο τετρακυκλίνης με το σύμπλεγμα ριβοσώματος-rRNA είναι μια αντιστρεπτή διαδικασία, όπου και μας εξηγεί ότι η τετρακυκλίνη έχει δράση βακτηριοστατική και όχι βακτηριοκτόνα [27].

Παρενέργειες Τετρακυκλίνης: Οι ανεπιθύμητες ενέργειες των τετρακυκλίνων δεν είναι ιδιαίτερα συχνές, ωστόσο, ένα σημαντικό ζήτημα είναι η πιθανότητα εμφάνισης φωτοευαισθησίας, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένο κίνδυνο ηλιακού εγκαύματος κατά την έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία.

Είναι πιθανό να προκαλέσουν γαστρεντερικές διαταραχές, όπως ενοχλήσεις στο στομάχι και δυσλειτουργία του εντέρου, ενώ αλλεργικές αντιδράσεις εμφανίζονται σπάνια. Σε εξαιρετικά σπάνιες περιπτώσεις, η εμφάνιση έντονου πονοκέφαλου και προβλημάτων όρασης μπορεί να υποδηλώνει μια σοβαρή επιπλοκή, τη δευτερογενή υπέρταση, γνωστή και ως όγκος εγκεφάλου.

Οι τετρακυκλίνες έχουν τερατογόνο δράση, καθώς υπάρχει κίνδυνος να προκαλέσουν αποχρωματισμό των δοντιών στο αναπτυσσόμενο έμβρυο και τα βρέφη. Για τον λόγο αυτό, η χρήση τους οδηγείται σε παιδιά κάτω των 8 ετών. Επιπλέον, μπορούν να οδηγήσουν στην ηπατική τοξικότητα [27-29].

Σκοπός της διατριβής:

Η παρούσα έρευνα στοχεύει στην αξιολόγηση της πιθανής αλληλεπίδρασης της τετρακυκλίνης (TC) με τον θυρεοειδή αδένα. Στόχος της μελέτης είναι η διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων της τετρακυκλίνης στα στάδια της βιοσύνθεσης των θυρεοειδικών ορμονών (T4, T3). Μελετάται η αναστολή της δράσης της θυρεοειδικής υπεροξειδάσης (TPO) παρουσία και απουσία τετρακυκλίνης (TC). Εξετάζεται η επίδραση της τετρακυκλίνης στο μηχανισμό της καταλυτικής οξείδωσης του ιωδιδίου σε δραστικό διϊώδιο.

Για τον σκοπό αυτό γίνεται μελέτη της δράσης της τετρακυκλίνης στην horseradish peroxidase (HRP), που χρησιμοποιείται μοντέλο της TPO. Επίσης μελετάται η επίδραση της τετρακυκλίνης στην καταλυτική οξείδωση του ιωδιδίου σε ενεργό διϊώδιο από την σιδηροπορφυρίνης FeTPPCl που χρησιμοποιείται ως μοντέλο της δραστικής περιοχής της TPO.

Τα αποτελέσματα αιτιολογούνται και ερμηνεύονται με βάση θεωρητικούς υπολογισμούς μοριακής πρόσδεσης.

Πειραματικό μέρος

Αντιδραστήρια και Μεθοδολογία

Στην παρούσα μελέτη, όλοι οι διαλύτες (διχλωρομεθάνιο, μεθανόλη, διμεθυλοσουλφοξείδιο,) προέρχονται από την Sigma- Aldrich και Riedel-de Haën και είναι ποιότητας για ανάλυση. Τα αντιδραστήρια (δι-ιώδιο , ιωδιούχο κάλιο, σίδηρό πορφυρίνη τετρακυκλίνη, μεθιμαζόλη, οξικό Νάτριο) προέρχονται από την Sigma- Aldrich ή Fluka. Οι διαλύτες και τα αντιδραστήρια χρησιμοποιήθηκαν όπως παραλήφθηκαν χωρίς καμία κατεργασία ή καθαρισμό. Για τα βιολογικά πειράματα χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο horseradish peroxidase από την Sigma-Aldrich.

Για την καταγραφή των φασμάτων υπεριώδους -ορατού UV-Vis χρησιμοποιήθηκε PC UV-1600 (VWR). Για τη βελτιστοποίηση της πειραματικής διαδικασίας, χρησιμοποιήθηκε επιπλέον ένας ομογενοποιητής Vortex (Sanichem), ο οποίος εξασφάλισε την ομογένεια των δειγμάτων, καθώς και μικροπιπέτες υψηλής ακρίβειας (1000, 100 και 10 μ L). Επιπλέον, έγινε χρήση του αναλυτικού ζυγού Scatec 5 δεκαδικών ψηφίων .

Οι θεωρητικοί υπολογισμοί μοριακής πρόσδεσης πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό Auto Dock Tools [31] εγκαταστημένο σε περιβάλλον Windows 7. Για της εικόνες χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό PyMol το οποίο επιτρέπει την τρισδιάστατη οπτικοποίηση των δομών, τη χαρτογράφηση των κρίσιμων αλληλεπιδράσεων και την ενέργεια σχηματισμού από την αλληλεπίδραση του ligand με την πρωτεΐνη (Protein-Ligand Interaction Profile (PLIP))[32]. Οι μοριακή δομή του ενζύμου λήφθηκε από την βάση δεδομένων Protein Data Bank (PDB)[30] όπου μετατρέπονται από το πρόγραμμα σε PDBQT [31], ενώ η δομή του υποκαταστάτη από τα δεδομένα της PubChem (τρειςδιάστατης δομής).

Μελέτη της αναστολής και του μηχανισμού της καταλυτικής οξείδωσης του ιωδιδίου από το ενζύμου horseradish peroxidase (HRP) από την τετρακυκλίνη.

Προετοιμασία διαλυμάτων: Για την μελέτη της αναστολής της HRP παρασκευάζονται τα παρακάτω αρχικά διαλύματα :

A. Διάλυμα Phosphate buffer solution (PBS) 500 mL: Ζυγίζονται 6.8 g KH_2PO_4 και 8.7g K_2HPO_4 και διαλύεται το καθένα ξεχωριστά σε 500 ml δις-απεσταγμένο νερό. 31.5 mL από το παραπάνω διάλυμα KH_2PO_4 αναμιγνύονται με 68.5 mL από το παραπάνω διάλυμα K_2HPO_4 . Το διάλυμα που προκύπτει με όγκο 100 mL έχει $\text{pH}=7.2$.

B. Ρυθμιστικό διάλυμα όγκου 1000mL $\text{CH}_3\text{COONa}/\text{CH}_3\text{COOH}$ ($\text{pH}=5.5$) Παρασκευάζεται διάλυμα CH_3COONa 0.05M (6.8 g CH_3COONa σε 1000mL ddw).

Γ. Διάλυμα HRP :0.00006 g HRP ζυγίζονται σε κενό Eppendorf και προστίθεται 1000 μL PBS ώστε η συγκέντρωση να είναι 1.3 μM .

Δ. Διάλυμα KI: Ζυγίζονται 0.044g KI σε κενό δοκιμαστικό σωλήνα και προστίθεται 2650 μL οπότε παράγεται διάλυμα συγκέντρωσης 0.1M. Υστέρα γίνεται αραιώση όπου σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται (300 μL από KI 0.1M προστίθενται 2700 μL ρυθμιστικό $\text{CH}_3\text{COONa}/\text{CH}_3\text{COOH}$ ($\text{pH}=5.5$)).

E. Διάλυμα H_2O_2 30%w/w: Το διάλυμα αυτό έχει συγκέντρωση $C=9.7\text{M}$ Πραγματοποιείται η αραιώση σε συγκέντρωση 0.1M, όπου προστίθενται σε ένα κενό Eppendorf 989.7 μL δις-απεσταγμένο νερό και 10.3 μL από το διάλυμα του H_2O_2 με συγκέντρωση $C=9.7\text{M}$.

Z. Διάλυμα TC: Ζυγίστηκαν 0.009g σε δοκιμαστικό σωλήνα και προστίθεται 2025 μL DMSO όπου παράγεται διάλυμα με συγκέντρωση 0.01 M.

H. Διάλυμα MMI: Ζυγίστηκαν 0.009g σε κενό Eppendorf και προστίθεται 788 μL DMSO. οπότε το διάλυμα που παράγεται περιέχει συγκέντρωση 0.1M. Ύστερα γίνεται αραίωση του διαλύματος σε δοκιμαστικό σωλήνα σε συγκέντρωση 0.01M (100 μL από MMI 0.1M προστίθεται σε 900 μL DMSO)

Μέτρηση της δραστηρότητας-Activity (A%) του ενζύμου παρουσία και απουσία αναστολέα: Σε κυψελίδα χαλαζία 3mL προστίθεται διάλυμα buffer $\text{CH}_3\text{COONa}/\text{CH}_3\text{COOH}$ (pH=5.5) και 340 μL KI (0.01M), και 10 μL διάλυμα H_2O_2 (0.1M), και 2 μL διάλυμα HRP (1.3 μM). Στην περίπτωση που η κυψελίδα περιέχει αναστολέα η ποσότητες είναι σε διάφορες συγκεντρώσεις από 0.5-30 μM για το MMI και 10-60 μM για την TC. Ο όγκος του buffer προσαρμόζεται ανάλογα. Καταγράφεται η οπτική απορρόφηση συνάρτηση του χρόνου στα 346 nm.

Η ενζυμική δραστηρότητα της horseradish peroxidase (HRP) με παρουσία των αναστολέων τετρακυκλίνης και μεθιμαζόλης υπολογίστηκε ως ποσοστό (%) χρησιμοποιώντας την εξίσωση:

$$A\% = \left(\frac{V_o \text{ παρουσία αναστολέα}}{V_o \text{ απουσία αναστολέα}} \right) \times 100, \quad (\text{εξ. 1})$$

όπου V_o ($\mu\text{M min}^{-1}$) είναι η αρχική ταχύτητα

$$V_o = \frac{\Delta C}{\Delta t} = \frac{\Delta A}{\Delta t \cdot \epsilon} = \frac{t g \alpha}{\epsilon} \quad (\text{εξ. 2})$$

όπου C είναι η συγκέντρωση του προϊόντος (I_3^-), t ο χρόνος της αντίδρασης, ϵ η σταθερά απορρόφησης του τριωδίου, t_{ga} η κλίση της καμπύλης της κινητικής μελέτης που καταγράφεται ως απορρόφηση στην συνάρτηση χρόνου [8].

Μελέτη του είδους αναστολέα:

Για να διαπιστώσουμε αν η αναστολή είναι αντιστρεπτή ή μη αντιστρεπτή πραγματοποιείται επώαση. Επωάζουμε το ένζυμο με την συγκέντρωση του IC_{50} που έχουμε υπολογίσει από την μέτρηση της δραστηρότητας-Activity (A%) του ενζύμου παρουσία και απουσία αναστολέα η οποία έχει τιμή $35\mu M$ ($7\mu L$ από TC $0.01M$) και $19\mu M$ ($3.8\mu L$ από MMI $0.01M$) $2\mu L$ διάλυμα HRP ($1.3\mu M$). Η επώαση γίνεται από (2-10) λεπτά και έπειτα προστίθεται KI με συγκέντρωση $1.7mM$ ($340\mu L$ από $0.01M$) και $10\mu L$ διάλυμα H_2O_2 ($0.1M$) και το υπόλοιπο περιέχει ποσότητα ρυθμιστικού CH_3COONa/CH_3COOH . Καταγράφεται η οπτική απορρόφηση συναρτήσει του χρόνου στα 346 nm .

Μελέτη μηχανισμού αναστολής

Ε. . Διάλυμα KI: Ζυγίζονται 0.12 g KI σε κενό δοκιμαστικό σωλήνα και προστίθεται $7228\mu L$ buffer CH_3COONa/CH_3COOH ($pH=5.5$) οπότε παράγεται διάλυμα συγκέντρωσης $0.1M$. Υστέρα πραγματοποιείται αραίωση του διαλύματος σε δοκιμαστικό σωλήνα σε συγκέντρωση $0.01M$ ($600\mu L$ KI $0.1M$ και προστίθεται $5400\mu L$ buffer CH_3COONa/CH_3COOH ($pH=5.5$)).

Η. Διάλυμα H₂O₂ 30%w/w: Το διάλυμα αυτό έχει συγκέντρωση C=9.7M Πραγματοποιείται η αραιώση σε συγκέντρωση 0.1M, όπου προστίθενται σε ένα κενό Eppendorf 989.7μL δις-απεσταγμένο νερό και 10.3 μL από το διάλυμα του H₂O₂ με συγκέντρωση C=9.7M.

Μέτρηση και υπολογισμός του μηχανισμού αναστολής του ενζύμου σε διάφορες συγκεντρώσεις υποστρώματος: Σε κυψελίδα χαλαζία τριών mL προστίθεται διάλυμα buffer CH₃COONa/CH₃COOH (pH=5.5) και 10μL διάλυμα H₂O₂ (0.1M), και 2μL διάλυμα HRP (1.3 μM) και 35μM (7 μL από TC 0.01M) και 19μM (3.8μL από MMI 0.01M) Η συγκέντρωση του KI κυμαίνεται από 0.001M-0.008M (200-1600 μL από KI 0.01M). Καταγράφεται η οπτική απορρόφηση συνάρτηση του χρόνου στα 346 nm.

Η γραμμική εξίσωση που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό αυτών των τιμών είναι η εξής: [8-36]

$$\frac{1}{v_o} = \frac{K_m}{v_{max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{max}} \quad (\text{εξ. 3})$$

$$y = ax + b \text{ όπου } y = \frac{1}{v_o}; a = \frac{K_m}{v_{max}}; b = \frac{1}{v_{max}}; x = \frac{1}{[S]}$$

Η γραφική παράσταση της παραπάνω εξίσωσης χρησιμοποιείτε για διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος [S]. Από το σημείο τομής του άξονα x με την ευθεία υπολογίζεται το K_m/V_{max} και από σημείο τομής του άξονα του y υπολογίζεται η 1/V_{max} [36].

Μελέτη της αναστολής της καταλυτικής οξειδωσης του ιωδιδίου από FeTTPCl από TC

A. Διάλυμα KI: Ζυγίζεται 0.038g KI σε κενό δοκιμαστικό σωλήνα και προστίθεται 1831μL CH₂Cl₂/CH₃OH σε αναλογία 60/40. Από αυτή την διαδικασία παράγεται προϊόν με συγκέντρωση 0.125 M

B. Διάλυμα FeTTPCl: Ζυγίζεται 0.0004g FeTTPCl σε κενό Eppendorf και προστίθεται 568 μL από μίγμα CH₂Cl₂/CH₃OH σε αναλογία 60/40. Το διάλυμα που παράγεται έχει συγκέντρωση 0.001M.

Γ. Διάλυμα TC: Ζυγίζεται 0.0018g TC σε κενό δοκιμαστικό σωλήνα και προστίθεται 4054 μL από μίγμα CH₂Cl₂/CH₃OH σε αναλογία 60/40. Το διάλυμα που παράγεται έχει συγκέντρωση 0.001M

Δ. Διάλυμα MMI: Ζυγίζεται 0.00076 g σε κενό διάλυμα και προστίθεται 6569 μL από μίγμα CH₂Cl₂/CH₃OH σε αναλογία 60/40. Το διάλυμα που παράγεται έχει συγκέντρωση 0.001M.

E. Διάλυμα H₂O₂ 30% w/w. Το διάλυμα αυτό αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 9.7M. Για να πραγματοποιηθεί το πείραμά έγινε η αραίωση σε συγκέντρωση 0.01M με προθήκη 10.3 μL H₂O₂ 30% w/w (9.7M) σε ένα 9989.7μL CH₃OH.

Μέτρηση της καταλυτικής οξειδωτικής δράσης της FeTTPCl στην οξείδωση του δι-ιωδιδίου σε διϋώδιο: Καταγράφονται τα φάσματα υπεριώδους ορατού UV-Vis των διαλυμάτων

A: KI (10mM)

B. Διάλυμα KI (10mM) και H₂O₂ (50μM).

Γ. Διάλυμα KI (10mM), FeTTPCl (5μM) και H₂O₂ (50μM)

Δ. Διάλυμα KI (10 mM), FeTTPC1 (5μM), H₂O₂ (50μM) και TC (5 μM) ή MMI (5 μM)

Για σύγκριση καταγράφονται και τα φάσματα

E. FeTTPC1 (5 μM)

Z.FeTTPC1 (5μM) και H₂O₂ (50μM)

Υπολογιστικές Μέθοδοι- Μελέτη Docking

Το Auto Dock Tools, ένα εξειδικευμένο πρόγραμμα το οποίο χρησιμοποιείται για την μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ ενός προσδέτη και βιολογικού μορίου. Η χρήση του επιτρέπει τον λεπτομερή χαρακτηρισμό των δεσμών που σχηματίζονται, και δίνει πληροφορίες για την σταθερότητα και τη δυναμική συμπεριφορά των συμπλοκών [33].

A. Προετοιμασία της πρωτεΐνης: Για την μελέτη της δομής του ενζύμου horseradish peroxidase (HRP), χρησιμοποιήθηκε η κρυσταλλική δομή του ενζύμου με κωδικό (PDB: 2ATJ). Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη είναι προϊόν από βακτήριο *Escheria coli* και προέρχεται από το φυτό *Armoracia rusticana*. Μετά την έκφραση το ένζυμο απομονώθηκε και καθαρίστηκε για χρήση σε πειράματα κρυσταλλογραφίας ακτινών X. Η κρυσταλλική δομή προσδιορίστηκε με περίθλαση ακτινών X (X-ray diffraction) σε ανάλυση 2 Å, παρέχοντας υψηλής ακρίβειας εικόνα της τρισδιάστατης δομής του ενζύμου σε σύμπλοκο με βενζυδροξαμικό οξύ (benzohydroxamic acid), ένα μόριο το οποίο λειτουργεί ως υποκατάστατο υποστρώματος ή πιθανός αναστολέα. Το ένζυμο περιέχει στην δραστική του περιοχή αιμικό δακτύλιο (HEME). Για της ανάγκες του υπολογισμού αφαιρέθηκε το βενζυδροξαμικό οξύ και τα μόρια νερού από το περιβάλλον. Προστέθηκαν μη

πολικά υδρογόνα και τα μερικά φορτία Gasteiger που είναι προσεγγιστικά ηλεκτρικά φορτία κάθε ατόμου ενός μορίου με μια εμπειρική μέθοδο. Αυτά τα φορτία είναι σημαντικά γιατί επηρεάζουν τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στον υποδοχέα και τον υποκαταστάτη.

Β. Προετοιμασία της TC: Είναι μέρος της προετοιμασίας του αναστολέα. Η δομή της τετρακυκλίνης λαμβάνεται από την βάση δεδομένων PubChem σε μορφή *.sdf. Στη συνέχεια το αρχείο μετατρέπεται σε μορφή *.mol με το πρόγραμμα mercury [33]. Η μορφή αυτή είναι συμβατή με το input file του προγράμματος Auto Dock Tools. Η ίδια διαδικασία γίνεται και για την δομή της MMI και για το υπόστρωμα I₂.

Γ. Προετοιμασία του Auto Grid: Είναι ένα πρόγραμμα που δημιουργεί τρισδιάστατο πλέγμα (grid) γύρω από τον υποδοχέα, στο οποίο υπολογίζονται οι ενεργειακές των αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στον υποδοχέα και τα άτομα του υποκαταστάτη. Το Auto Grid περιορίζει τον χώρο αναζήτησης στον υποδοχέα.

Δ. Προετοιμασία του Auto Dock: Το Auto Dock χρησιμοποιεί τον αλγόριθμο βελτιστοποίησης για να γίνει η μοριακή πρόσδεση, χρησιμοποιώντας τεχνικές όπως επιλογή, μετάλλαξη και αναπαραγωγή. Δημιουργεί διαφορετικές θέσεις του υποκαταστάτη, τις αξιολογεί, επιλέγει τις καλύτερες και τις αναπαράγει δημιουργώντας νέες πιθανές διατάξεις. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται πολλές φορές, μέχρι να βρει την πιο ευνοϊκή θέση πρόσδεσης, αυτή που έχει την χαμηλότερη ενέργεια [33]. Ο αλγόριθμος βελτιστοποίησης του Auto Dock είναι στοχαστικός που σημαίνει ότι έχει την ικανότητα να αποφεύγει την σύγκλιση σε τοπικά ελάχιστα, γεγονός που του επιτρέπει να διερευνά μεγάλο αριθμό πιθανών διαμορφώσεων. Αυτό προσφέρει μια ολοκληρωμένη εικόνα των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του προσδέτη και του μακρομορίου, αποκαλύπτοντας πολλαπλές εναλλακτικές διαμορφώσεις με δυνητική βιολογική σημασία [37].

Ο υπολογισμός της ενέργειας των συμπλοκών πραγματοποιείται μέσω δυναμικών πεδίων (force fields), τα οποία περιγράφουν τις ενδομοριακές και διαμοριακές δυνάμεις που καθορίζουν τη δομή και τη σταθερότητα των βιομορίων. Τα δυναμικά πεδία βασίζονται σε μαθηματικές εξισώσεις που λαμβάνουν υπόψη την ενέργεια των δεσμών του μορίου, την ενέργεια παραμόρφωσης των δεσμών, την ενέργεια κάμψης δεσμού, την ενέργεια περιστροφής ομοιοπολικού δεσμού, την ενέργεια δυνάμεων Van der Waals, την ηλεκτροστατική ενέργεια δεσμών H [35].

$$E_{\text{total}} = E_{\text{stretching}} + E_{\text{bending}} + E_{\text{torsion}} + E_{\text{vdW}} + E_{\text{elstat}} + E_{\text{hbond}} \quad (\text{εξ. 4})$$

Ε. Τοποθέτηση (pose) παρέχει πληροφορίες για τη γεωμετρία του συμπλόκου, τη σχετική προσαρμογή του προσδέτη και τη διαμόρφωση του υποδοχέα, επιτρέποντας την αξιολόγηση της μοριακής συμπληρωματικότητας [33].

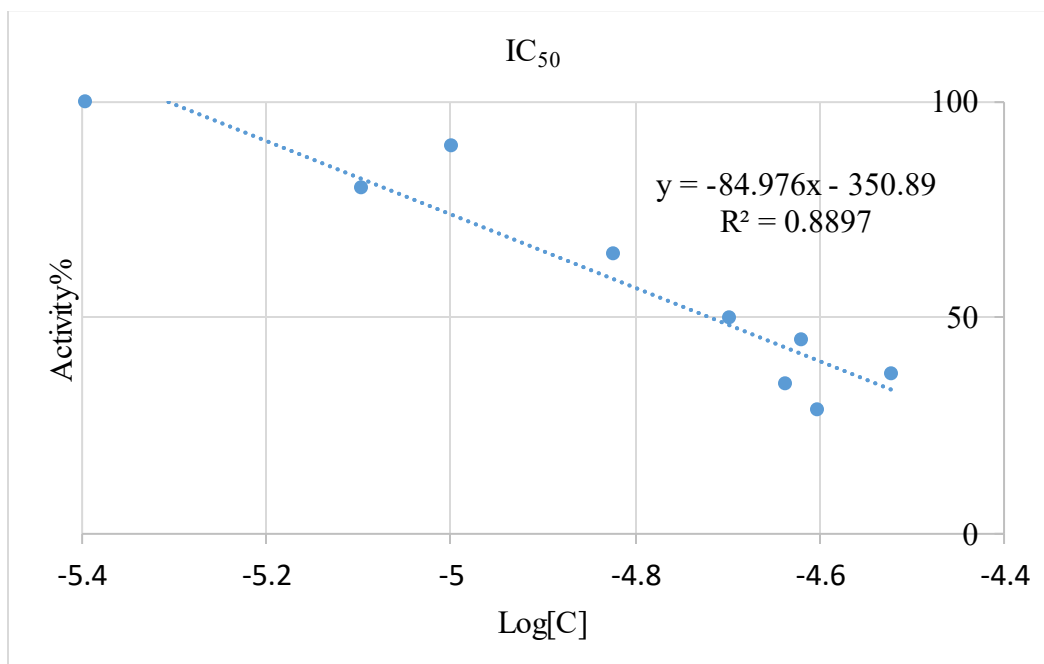
Για τη λεπτομερή ανάλυση των αποτελεσμάτων, χρησιμοποιείται η πλατφόρμα Protein-Ligand Interaction Profile (PLIP), η οποία επιτρέπει τον αυτόματο εντοπισμό και κατηγοριοποίηση των δεσμών που σχηματίζονται στο ολοένζυμο. Μέσω αυτού, καταγράφονται διάφοροι τύποι αλληλεπιδράσεων όπως δεσμοί υδρογόνου, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, ιοντικές και δεσμοί Van der Waals, προσφέροντας έτσι μια λεπτομερή απεικόνιση των χημικών δυνάμεων που διαμορφώνουν τη σταθερότητα του ολοενζύμου [33].

Αποτελέσματα και Συζητήσεις

Μελέτη της δράσης TC με horseradish peroxidase (HRP)/Φασματοσκοπία

Υπεριώδους-Ορατού UV/Vis

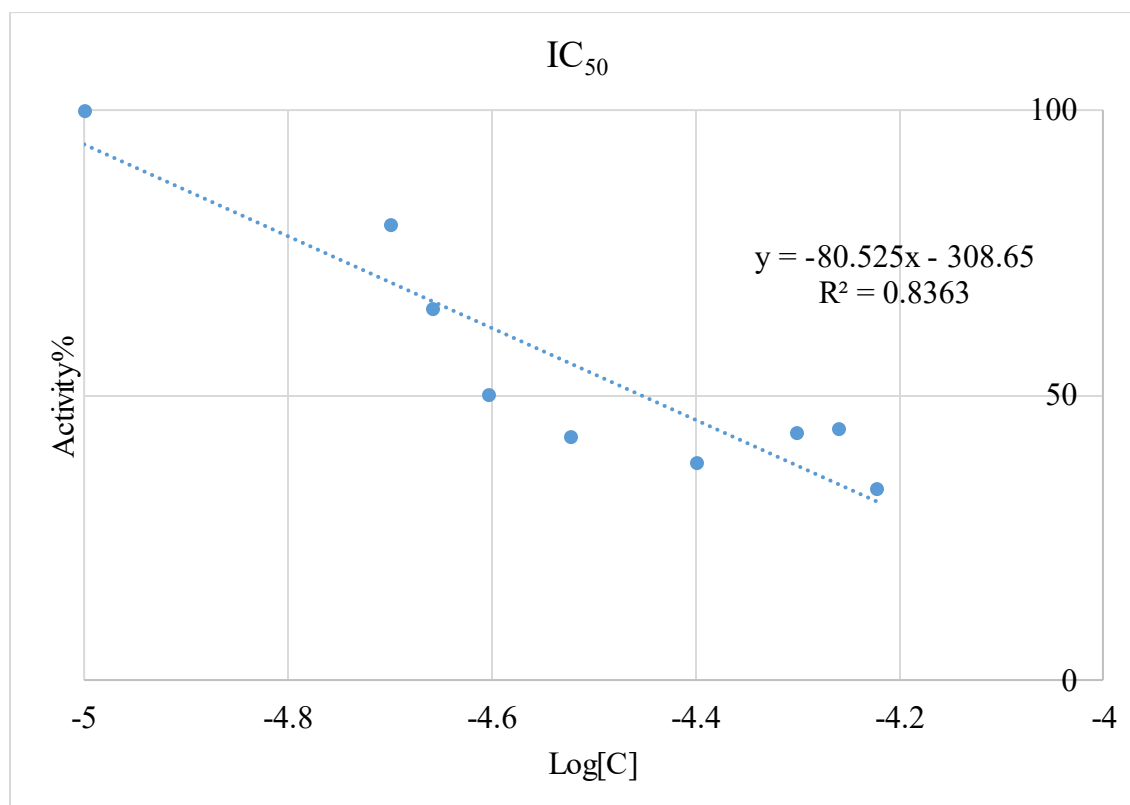
Στα διαγράμματα των Εικόνων 10 και 11 απεικονίζεται η καμπύλη αναστολής της ενζυμικής δραστηριότητας ως συνάρτηση του λογαρίθμου της συγκέντρωσης των αναστολέων (MMI και TC). Η συγκέντρωση του MMI που αναστέλλει το 50% της HRP έχει τιμή $IC_{50} = 19\mu M$ (Εικόνα 10). Η αρνητική κλίση δείχνει ότι όσο αυξάνεται το $\text{Log}[C]$, το $A\%$ μειώνεται.



Εικόνα 10: Διάγραμμα συσχέτισης Λογάριθμου συγκέντρωσης MMI με την δραστηριότητα του ενζύμου $A\%$

Αντίθετα η τιμή της συγκέντρωσης του TC που αναστέλλει το 50% της HRP είναι $IC_{50} = 35\mu M$ (Εικόνα 11). Η τιμή αυτή υποδηλώνει αλληλεπίδραση της TC με την HRP μικρότερη από

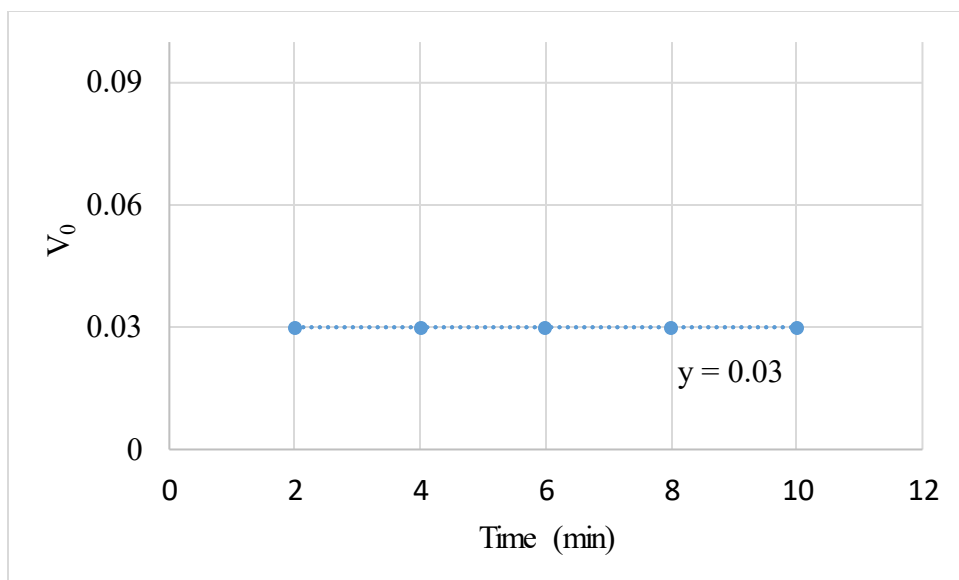
την αντίστοιχη του αντιθυρεοειδικού φαρμάκου MMI, αλλά υποδηλώνει και ανασταλτική δράση της TC και επόμενος συμμετοχή της TC στη αναστολή της βιοσύνθεσης των θυρεοειδικών ορμονών.



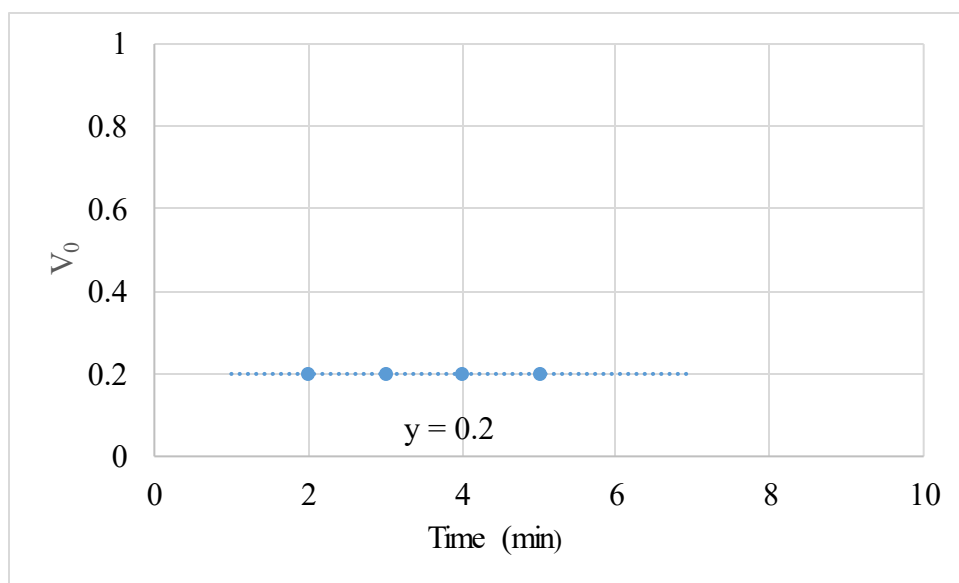
Εικόνα 11: Διάγραμμα συσχέτισης Λογάριθμου συγκέντρωσης TC με την δραστικότητα του ενζύμου A%

Είδος Αναστολέα (αντιστρεπτός/ μη αντιστρεπτός)

Για να προσδιοριστεί κατά πόσο η TC και το MMI είναι αντιστρεπτός ή μη αντιστρεπτός αναστολέας υπολογίζεται η δραστικότητα του ενζύμου A% συσχέτιση με τον χρόνο επώασης του ενζύμου με των αναστολέα (Εικόνα 12 και 13).



Εικόνα 12: Διάγραμμα συσχέτισης αρχικής ταχύτητας V_0 συνάρτηση του χρόνου επώασης του ενζύμου με των αναστολέα *Time (min)* για την TC



Εικόνα 13: Διάγραμμα συσχέτισης αρχικής ταχύτητας V_0 συνάρτηση του χρόνου επώασης του ενζύμου με των αναστολέα *Time (min)* για το MMI

Όπως φαίνονται στα διαγράμματα δεν παρατηρείται καμιά μεταβολή στην αρχική ταχύτητα συνάρτησης χρόνου επώασης επομένως οι αναστολείς MMI και TC είναι **αντιστρεπτοί** [34].

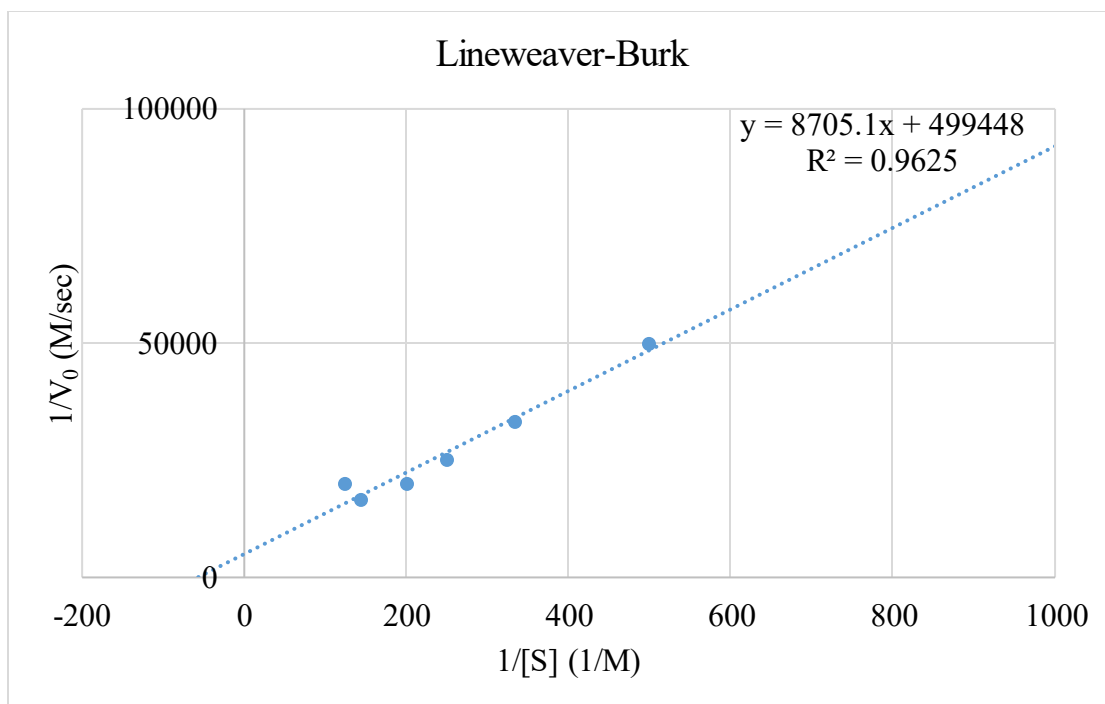
Είδος Μηχανισμού Αναστολής

Η ανασταλτική δράση της TC στην ενζυμική αντίδραση μελετήθηκε με κινητική κατάσταση ισορροπίας (steady-state kinetics) σε διάφορες συγκεντρώσεις υποστρώματος (από 1 έως 8 mM), τόσο απουσία όσο και παρουσία του φαρμάκου. Τα πειραματικά δεδομένα αναλύθηκαν με γραφική μέθοδο χρησιμοποιώντας τις συντεταγμένες Lineweaver–Burk (διπλός αντίστροφος τύπος) (Εικόνα 14, 15, 16). Οι κινητικές παράμετροι K_M και V_{max} εκτιμήθηκαν από την κλίση και την τομή της ευθείας (Εικόνα 14, 15, 16). Από της εξισώσεις Lineweaver-Burk απουσία ($y = 8705.1x + 499448$) και παρουσία ($y = 9060.4x + 416218$) MMI και παρουσία ($y = 21473x + 2 \cdot 10^6$) TC και την γενική εξίσωση 3 ($\frac{1}{v_o} = \frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$) της μεθόδου προκύπτει ότι η τιμή $1/V_{max}$ είναι 499448 (απουσία αναστολέα) και 416218 (παρουσία αναστολέα MMI) $\text{sec} \cdot \text{M}^{-1}$ και $2 \cdot 10^6$ (παρουσία αναστολέα TC) από όπου προκύπτει ότι η τιμή της V_{max} είναι $2 \cdot 10^{-6}$ (απουσία αναστολέα) και $2 \cdot 10^{-6}$ (παρουσία αναστολέα MMI) και $5 \cdot 10^{-7}$ (παρουσία αναστολέα TC) $\text{M} \cdot \text{sec}^{-1}$. Επίσης η τιμή της παραμέτρου K_M/V_{max} 8705.1 (απουσία αναστολέα) και 9060.4 (παρουσία αναστολέα MMI) και 21473 (παρουσία αναστολέα TC) $\text{sec} \cdot \text{M}^{-2}$ από όπου προκύπτει η τιμή για K_M είναι 0.017 (απουσία αναστολέα) και 0.022 (παρουσία αναστολέα MMI) και 0.010 (παρουσία αναστολέα TC) M^{-1} .

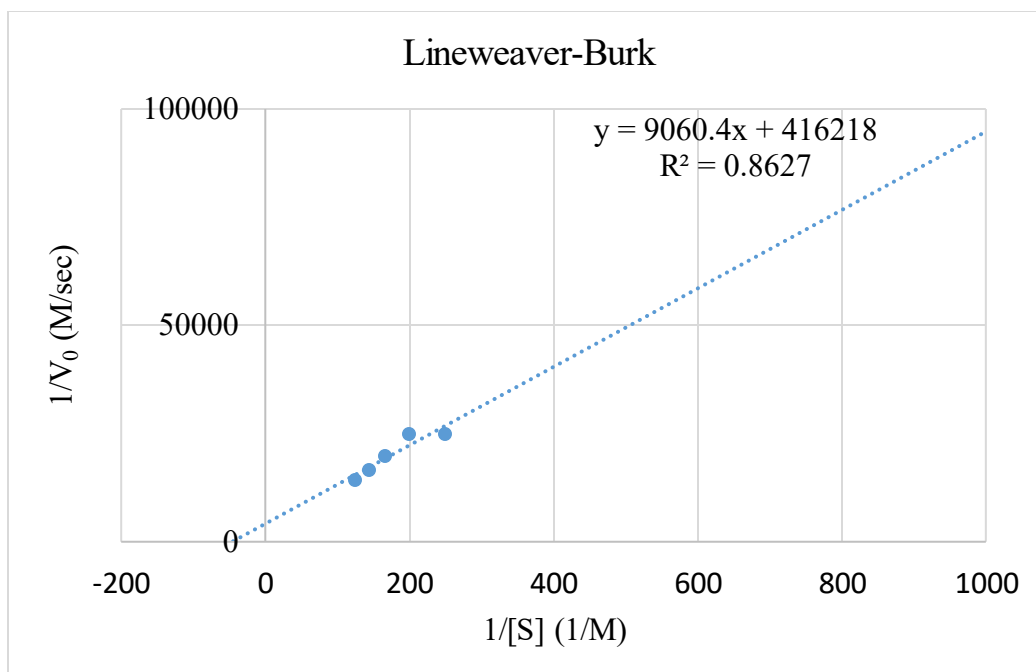
Η τιμή της K_M παρουσία αναστολέα MMI (Εικόνα 15) αυξάνεται σε σχέση με την αντίστοιχη τιμή απουσία αναστολέα, και η τιμή της V_{max} παρουσία αναστολέα δεν μεταβάλλεται

σε σχέση με την αντίστοιχη τιμή απουσία αναστολέα. Αυτό συμβαίνει όταν ο μηχανισμός αναστολής είναι ανταγωνιστικός. Στην περίπτωση αυτή ο αναστολέας αντιδρά με το ένζυμο και ανταγωνίζεται το υπόστρωμα, γι' αυτό τον λόγο υπάρχει αύξηση μόνο στην τιμή του K_M ενώ το V_{max} παραμένει σταθερό.

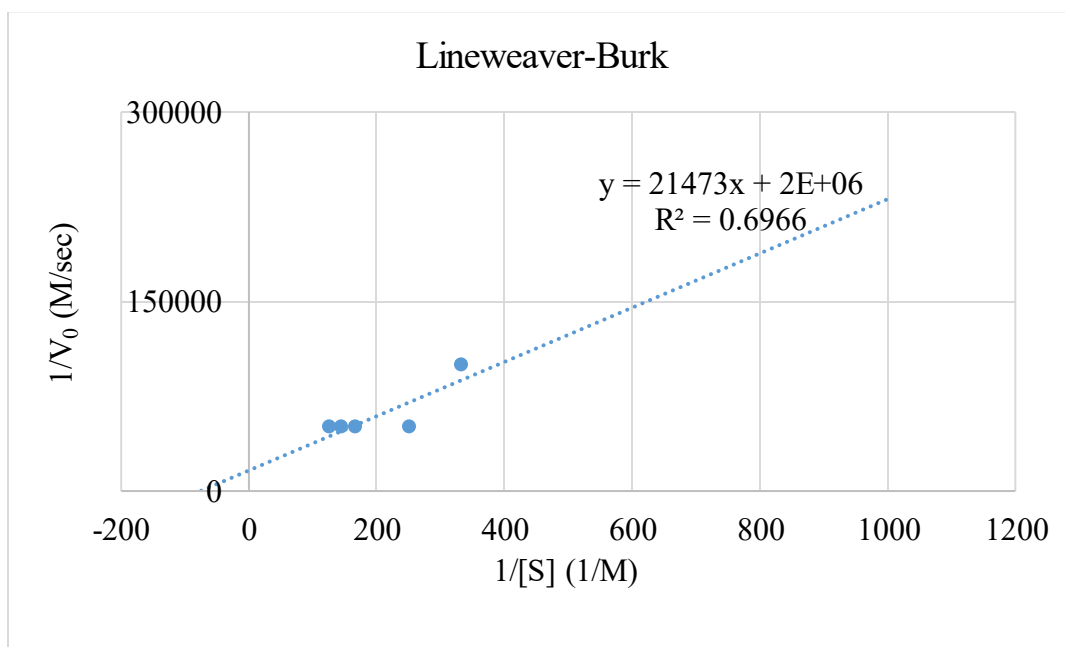
Η τιμή της K_M παρουσία αναστολέα TC (Εικόνα 16) μειώνεται σε σχέση με την αντίστοιχη τιμή απουσία αναστολέα, και η τιμή της V_{max} παρουσία αναστολέα μειώνεται σε σχέση με την αντίστοιχη τιμή απουσία αναστολέα. Αυτό συμβαίνει όταν ο μηχανισμός αναστολής είναι μη ανταγωνιστικός. Στην περίπτωση αυτή ο αναστολέας αντιδρά με το ένζυμο μόνο αφού το υπόστρωμα δεσμευτεί το ένζυμο. Επομένως υπάρχουν τόσο το $[ES]$ όσο και το $[ESI]$.



Εικόνα 14: Διάγραμμα Lineweaver-Burk $1/V_0$ vs $1/[S]$ για το ενζύμου HRP



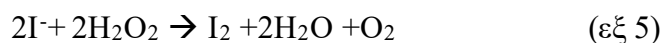
Εικόνα 15: Διάγραμμα Lineweaver-Burk $1/V_0$ vs $1/[S]$ για το MMI



Εικόνα 16: Διάγραμμα Lineweaver-Burk $1/V_0$ vs $1/[S]$ για την TC

Αναστολή της καταλυτικής δραστηρότητας του FeTTPCl (μοντέλο της δραστηρής περιοχής του ενζύμου TPO)

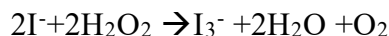
Το ιωδιούχου ανιόν (I^-) μπορεί να οξειδωθεί προς δι-ιωδίδιο από υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) μέσω μεταφοράς δύο ηλεκτρονίων. Η αντίδραση αυτή μπορεί να συμβεί είτε παρουσία ενζύμου υπεροξειδάσης και περιγράφεται από την εξής χημική εξίσωση:[6]



Το παραγόμενο δι-ιώδιο (I_2) στη συνέχεια αντιδρά με επιπλέον I^- , δημιουργώντας τριϊωδιούχο ανιόν (I_3^-) μέσω της εξίσωσης



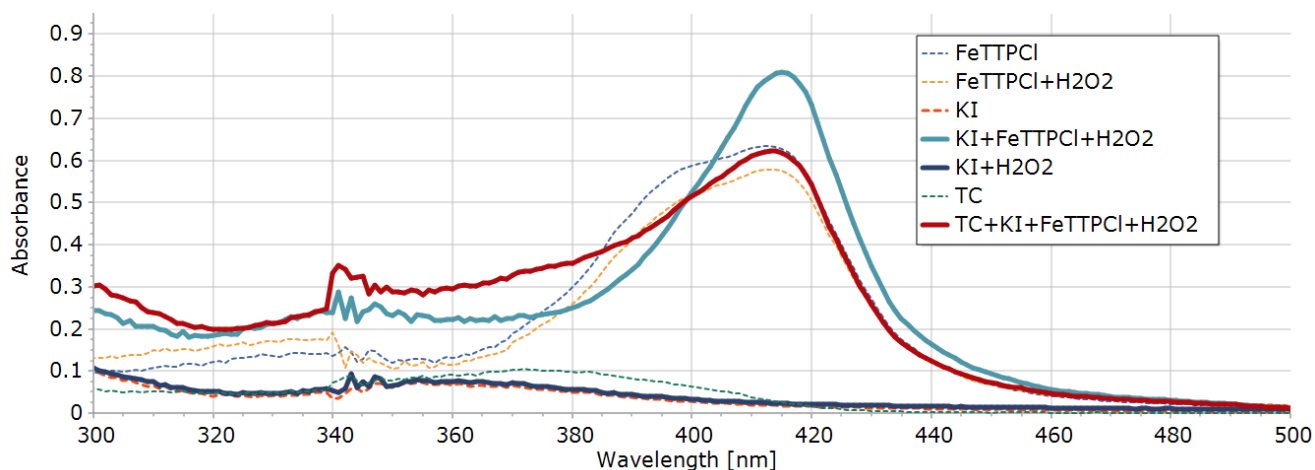
Επόμενος η συνολική αντίδραση είναι:



Η αντίδραση αυτή καταλύεται από την FeTTPCl. Η δραστηρή περιοχή του ενζύμου HRP, το οποίο επίσης καταλύει την αντίδραση περιέχει αιμικό σίδηρο. Στη εργασία αυτή μελετάτε η δράση στην αναστολή της οξείδωσης το ιωδιδίου με H_2O_2 από την TC και MMI. Η μελέτη αυτή αποσκοπεί στο να διαλευκάνει κατά πόσο οι ουσίες αυτές δρουν στην δραστηρή περιοχή της HRP ή όχι. Η χρήση της FeTTPCl γίνεται επειδή προσομοιάζει στο ενεργό κέντρο της HRP και κατά επέκταση στην TPO. Το τελικό προϊόν που ανιχνεύεται είναι το I_3^- , το οποίο παρουσιάζει χαρακτηριστική απορρόφηση με μήκος κύματος των 353 nm [6].

Η Εικόνα 20 παρουσιάζει τα φάσματα υπεριώδους-ορατού (UV-Vis) α) διαλύματος KI 10 mM σε διαλύτη CH_2Cl_2/CH_3OH 60/40. β) διαλύματος KI (10 mM) και H_2O_2 (50 μ M) σε διαλύτη CH_2Cl_2/CH_3OH 60/40. γ) διαλύματος KI (10mM), H_2O_2 (50 μ M) και FeTTPCl (5 μ M). δ)

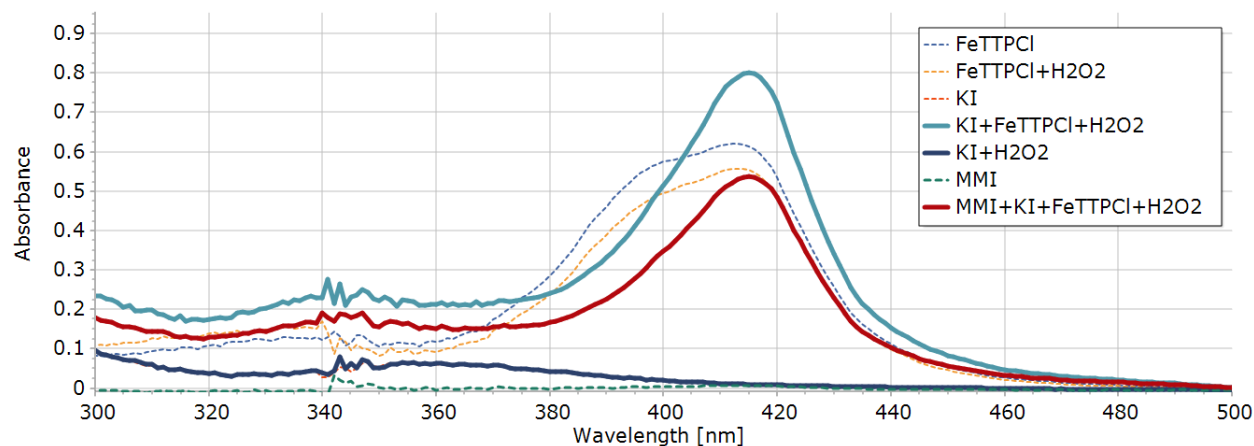
διαλύματος KI (10mM), H_2O_2 (50 μM), FeTPPCl (5 μM) και TC (5 μM). Για σύγκριση παρατίθενται στην Εικόνα 20 επιπλέον και τα φάσματα: ζ) διάλυμα TC (5 μM). η) διάλυμα FeTPPCl (5 μM). θ) διάλυμα FeTPPCl (5 μM) και H_2O_2 (50 μM). Η απορρόφηση στα 353 nm στο φάσμα του διαλύματος KI , H_2O_2 , FeTPPCl και TC είναι 0.334983 ενώ η απορρόφηση στο διάλυμα KI , H_2O_2 , FeTPPCl είναι 0.281747, η απορρόφηση στα 353 nm για το διάλυμα FeTPPCl και H_2O_2 είναι 0.15821. Η τιμές των απορροφήσεων των φασμάτων UV-Vis στα 353nm δίνονται στον Πίνακα 1. Όπως φαίνεται δεν υπάρχει επίδραση της TC στην καταλυτική οξείδωση του (I^-) σε (I_3^-).



Εικόνα 17: Απορροφήσεις του καταλύτη με τετρακυκλίνη

Η Εικόνα 21 παρουσιάζει φάσματα υπεριώδους-ορατού (UV-Vis) όπως των παραπάνω διαλυμάτων όπου προστίθεται και το διάλυμα με MMI (5 μM). Η απορρόφηση στα 353 nm στο φάσμα του διαλύματος KI , H_2O_2 , FeTPPCl και MMI είναι 0.216897 ενώ η απορρόφηση στο διάλυμα KI , H_2O_2 , FeTPPCl είναι 0.281747, η απορρόφηση στα 353 nm για το διάλυμα FeTPPCl και H_2O_2 είναι 0.15821. Ο Πίνακας 1 παραθέτει τις τιμές απορρόφησης στα φάσματα UV-Vis

αυτών των ενώσεων. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 1 το MMI προκαλεί μείωση στην απορρόφηση του διαλύματος $KI + H_2O_2 + FeTTPCl$ που αντιστοιχεί σε αναστολή κατά 52.5% της καταλυτικής δράσης [6].



Εικόνα 18: Απορροφήσεις του καταλύτη με μεθιμαζόλη.

Πίνακας 1: Τιμές των απορροφήσεων των φασμάτων με τους αναστολές στα 353 nm

Absorbance (353 nm)	MMI	TC
$FeTTPCl + H_2O_2$	0.15821	0.15821
$KI + FeTTPCl + H_2O_2$	0.281747	0.281747
$MMI + KI + H_2O_2 + FeTTPCl$	0.216897	
$TC + KI + H_2O_2 + FeTTPCl$		0.334983

Συμπερασματικά από τα πειραματικά αποτελέσματα δράση TC στην ενζυμική και καταλυτική οξείδωση του (I^-) σε (I_3^-) , το αντιβιοτικό αναστέλλει την HRP με $IC_{50} = 35 \mu M$, ενώ δεν δρα στο ενεργό κέντρο του ενζύμου.

Θεωρητικοί Υπολογισμοί (μοριακή πρόσδεση)

Υπολογισμοί μοριακής προσομοίωσης πραγματοποιήθηκαν για την απόκτηση δομικών πληροφοριών που αφορούν την αλληλεπίδραση της TC με την HRP. Αυτή η ανάλυση αποτελεί ένα κρίσιμο βήμα για την κατανόηση του μηχανισμού αναστολής της βιοσύνθεσης θυρεοειδικών ορμονών από την TC ως πιθανή παρενέργεια. Μέσω των υπολογιστικών εργαλείων μοριακής πρόσδεσης, παρέχονται πληροφορίες σχετικά με την θέση πρόσδεσης της TC στο ενεργό ή αλλοστερικό κέντρο της πρωτεΐνης καθώς και ποσοτικά δεδομένα που αφορούν τη συγγένεια πρόσδεσης (binding affinity), την ενέργεια πρόσδεσης και τη σταθερότητα του συμπλόκου. Παράλληλα γίνεται εξέταση του είδους των δεσμών που σχηματίζονται, όπως δεσμοί του υδρογόνου, υδρόφοβες αλληλεπίδρασης, υδατικές γέφυρες, ιοντικές ή π-π αλληλεπιδράσεις.

Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται η ενέργεια των σταθερότατων διαμορφώσεων που δημιουργούνται ανάμεσα στην πρωτεΐνη HRP (PDB ID: 2ATJ), και της TC.

Πίνακας 2: Ενέργειες των σταθερότερων διαμορφώσεων που υπολογίζονται για το σύμπλοκο

HRP-TC

Διαμορφώσεις	Ενέργεια πρόσδεσης (kcal/mol)
1	-3.94
2	-3.38
3	-3.10

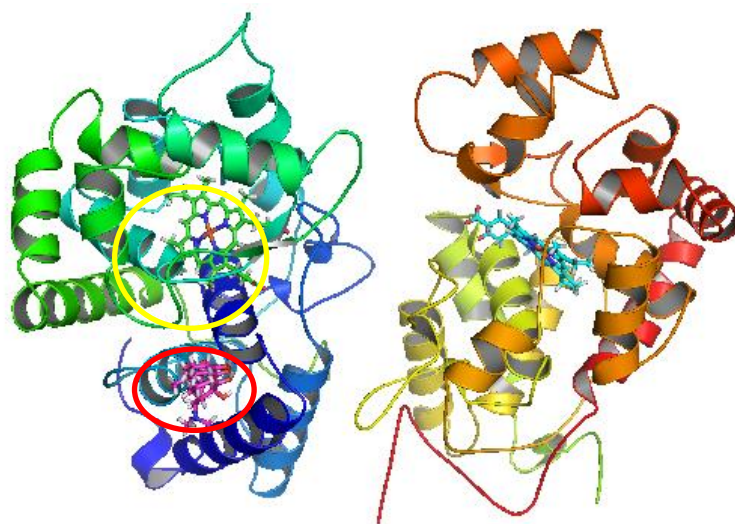
Από τις τιμές ενέργειας του Πίνακα 2 φαίνεται ότι η σταθερότερη διαμόρφωση είναι αυτή που έχει ενέργεια σχηματισμού -3.94 kcal/mol. Για την διαμόρφωση αυτή το φάρμακο TC αλληλεπιδρά ισχυρά μέσω δεσμών υδρογόνου με το αμινοξύ Θρεονίνης της HRP όπως φαίνεται

στον Πίνακα 3. Σχηματίζονται δύο ισχυροί δεσμοί υδρογόνου TC...THR-227A(HRP), με απόσταση δεσμού 2.42 Å. Στον πρώτο δεσμό μεταξύ TC...THR-227A(HRP) η TC λειτουργεί ως δότης υδρογόνου, ενώ στην δεύτερη ως δέκτης.

Πίνακας 3: Δεσμοί υδρογόνου που αναπτύσσονται ανάμεσα στην TC και HRP αλληλεπιδράσεις μεταξύ HRP-TC

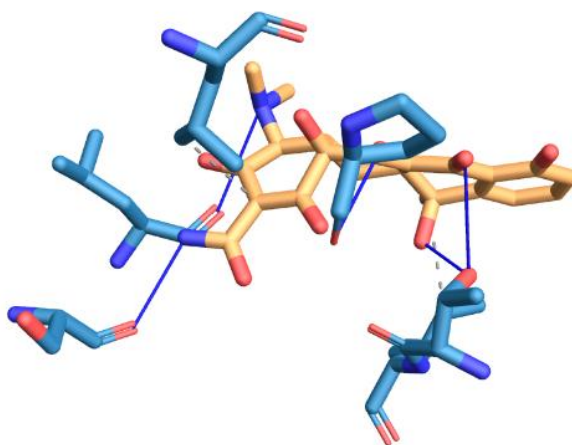
Index	Residue	AA	Hydrogen Bonds			
			Distance H-A	Distance D-A	Donor Angle	Protein donor
1	30A	PRO	2.83	3.72	146.75	X
2	108A	SER	2.23	3.16	155.02	X
3	111A	LEU	3.06	3.67	115.87	X
4	227A	THR	1.66	2.42	132.67	✓
5	227A	THR	1.87	2.42	110.42	X

την Εικόνα 19 φαίνεται η περιοχή ελλιμενισμού της TC στην HRP.



Εικόνα 19: Απεικόνιση περιοχής ελλιμενισμού της TC στην HRP

Στην Εικόνα 20 φαίνονται λεπτομέρεια της περιοχής πρόσδεσης της TC με τα αμινοξύ Θρεονίνη της HRP



Εικόνα 20: Δεσμοί υδρογόνου μεταξύ HRP-TC

Πραγματοποιήθηκε μοριακή πρόσδεση και με την MMI, το οποίο είναι ένα αντιθυρεοειδικό φάρμακο. Στον Πίνακα 4 παρουσιάζεται η ενέργεια της σταθερότερης διαμόρφωσης που δημιουργείται ανάμεσα στην πρωτεΐνη HRP (PDB ID: 2ATJ), και του MMI.

Πίνακας 4: Αλληλεπιδράσεις της MMI-HRP.

Διαμορφώσεις	Ενέργεια πρόσδεσης (kcal/mol)
1	-4.10

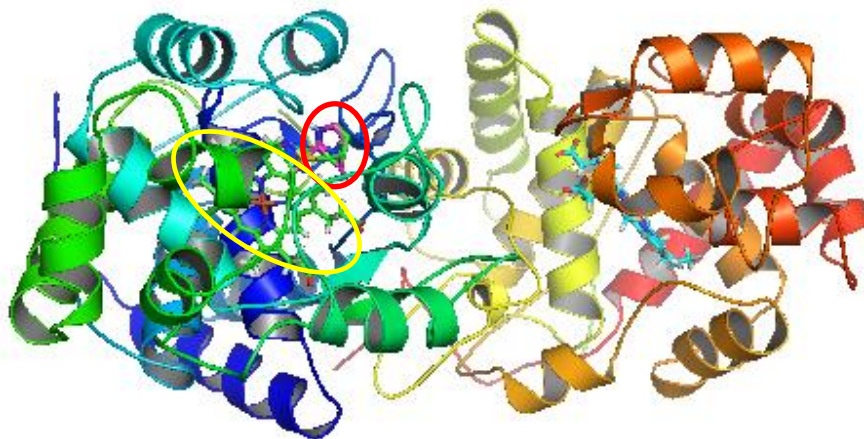
Εμφανίζεται μια σταθερή διαμόρφωση που έχει ενέργεια σχηματισμού -4.10 kcal/mol. Για την διαμόρφωση αυτή το φάρμακο MMI αλληλεπιδρά ισχυρά μέσω δεσμών υδρογόνου με το αμινοξύ

Προλίνη (Πίνακα 5). Σχηματίζεται ένας δεσμός υδρογόνου με απόσταση δεσμού 2.85 Å. Σε αυτό τον δεσμό το MMI συμπεριφέρεται δέκτης υδρογόνου.

Πίνακας 5: Δεσμός υδρογόνου που αναπτύσσονται ανάμεσα στο MMI-HRP

Index	Residue	AA	Hydrogen Bonds			
			Distance H-A	Distance D-A	Donor Angle	Protein donor
1	139A	PRO	1.87	2.85	158.23	X

Στην Εικόνα 21 φαίνεται η περιοχή ελλιμενισμού του MMI στην HRP.



Εικόνα 21: Απεικόνιση περιοχής ελλιμενισμού της MMI στην HRP

Είδος αναστολής (molecular docking)

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί ο μη ανταγωνιστικός μηχανισμός αναστολής της HRP από την TC υπολογίζεται η ενέργεια σχηματισμού των συμπλοκών ES (enzyme-substrate), ESI (enzyme-substrate-inhibitor) και το EI (enzyme-inhibitor).[31] Κατά τον μηχανισμό αυτό ο αναστολέας αντιδρά με το ένζυμο μόνο αφού το υπόστρωμα δεσμευτεί το ένζυμο. Επομένως

υπάρχουν τόσο το [ES] όσο και το [ESI]. Όπως φαίνεται από της τιμές ενέργειας στον Πίνακα 6 το σωματίδιο ESI (TC) είναι ενεργειακά σταθερότερο από το EI (TC) υποδηλώνοντας το σχηματισμό του σε διάλυμα. Τα αποτελέσματα των υπολογισμών επιβεβαιώνουν τα αντίστοιχα πειραματικά. Η ενεργειακή διαφορά ανάμεσα στο ESI (TC) και EI (TC) είναι 1.26 kcal/mol που σημαίνει ότι σχηματίζεται μόνο το σύμπλοκο ESI (TC) όπως οφείλετε στο μη ανταγωνιστικό μηχανισμό αναστολής. Αντιθέτως η ενεργειακή διαφορά ανάμεσα στο σύμπλοκο ESI (MMI) και EI (MMI) είναι 0.30 kcal/mol, όπου υποδηλώνεται ότι σχηματίζονται και το ESI (MMI) και EI (MMI) όπου ανταγωνίζονται την δέσμευση του ενζύμου με το υπόστρωμα.

Πίνακας 6: Ενεργειακή σχηματισμού συμπλοκών ES, ESI και EI (kcal/mol) όπου I= TC, S= I₂.

Διαμορφώσεις	Ενεργειακή πρόσδεσης (kcal/mol)
ES (I)	-3.50
ESI (TC)	-5.20
EI (TC)	-3.94
ESI (MMI)	-3.80
EI (MMI)	-4.10

Συμπεράσματα

Ο θυρεοειδής αδένας, όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, αποτελεί έναν ζωτικής σημασίας αδένα για τη ρύθμιση του οργανισμού. Η λειτουργία του εξαρτάται από τη δράση του ενζύμου «θυρεοειδική υπεροξειδάση (TPO), το οποίο διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην οξείδωση του ιωδιούχου ιόντος (I^-) σε ενεργό ιώδιο. Η διαδικασία αυτή οδηγεί στο σχηματισμό της μονι-ιωδοτυροσίνης (MIT) και διϊωδοτυροσίνης (DIT), οι οποίες, ανάλογα με τις μεταξύ τους συνδέσεις, συμβάλουν στη σύνθεση των προ-ορμονών θυροξίνης (T4) και τριϊωδοτυρονίνη (T3), οι οποίες κυκλοφορούν στον οργανισμό και ρυθμίζουν τις μεταβολικές διεργασίες.

Ο στόχος της παρούσας διατριβής είναι η διερεύνηση της πιθανής παρενέργειας της χρόνιας χορήγησης τετρακυκλίνης στην βιοσύνθεση των θυρεοειδικών ορμονών. Τα αποτελέσματα της έρευνας κατέδειξαν ότι η τετρακυκλίνη δεν ανταγωνίζεται την τυροσίνη της θυρογλομπουλίνης για το δραστικό δι-ιώδιο. Η TC αναστέλλει την δράση της HRP μοντέλο της TPO με $IC_{50} = 35\mu M$ έναντι IC_{50} τιμής του MMI $19\mu M$. Το MMI είναι αντιθυρεοειδικό φάρμακο που χρησιμοποιείται στην ασθένεια υπερθυρεοειδισμού. Η TC και το MMI δρουν ως αντιστρεπτοί αναστολείς και ο μηχανισμός ανατολής είναι μη ανταγωνιστικός και ανταγωνιστικός αντίστοιχα. Η τιμή K_M και η V_{max} της καταλυτικής οξείδωσης του ιωδιού σε δι-ιώδιο της HRP παρουσία TC ($0.010 M^{-1}$, $5 \cdot 10^{-7} M \cdot sec^{-1}$) είναι μειωμένη σε σχέση με της αντίστοιχες τιμές της αντίδρασης χωρίς παρουσία αναστολέα ($0.017 M^{-1}$, $2 \cdot 10^{-6} M \cdot sec^{-1}$) ενώ η τιμές K_M και η V_{max} για το αντιθυρεοειδικό φάρμακο MMI ($0.022 M$, $2 \cdot 10^{-6} M \cdot sec^{-1}$) όπου η τιμή του K_M αυξάνεται ενώ η τιμή του V_{max} παραμένει σταθερό, πράγμα που υποδηλώνει ότι ο μηχανισμός είναι ανταγωνιστικός. Κατά τον μηχανισμό με την TC ο αναστολέας αντιδρά με το ένζυμο μόνο αφού το υπόστρωμα δεσμευτεί το ένζυμο. Επομένως υπάρχουν τόσο το [ES] όσο και το [ESI].

Επίσης η τετρακυκλίνη δεν έδειξε ανασταλτική δράση στη καταλυτική οξείδωση της σίδηρο πορφυρίνης , σε αντίθεση με το MMI ο οποίος αναστέλλει 52% την οξειδωτική δράση του μοντέλου της TPO.

Τα συμπεράσματα αυτά προέκυψαν μέσω πειραματικών προσεγγίσεων, συμπεριλαμβανομένων φασματοφωτομετρικών μετρήσεων και θεωρητικών υπολογισμών. Επιπλέον, η αρνητική τιμή της ελεύθερης ενέργειας Gibbs υποδηλώνει την ύπαρξη αλληλεπιδράσεων μεταξύ του ενζύμου και του αναστολέα, ενισχύοντας την υπόθεση της δομικής τροποποίησης της TPO. Η TC αλληλεπιδρά σε διαφορετικό κέντρο του ενζύμου ενώ το MMI δρα στο ενεργό κέντρο του ενζύμου.

Βιβλιογραφία

- [1] K. J. Connelly, J. J. Park, and S. H. LaFranchi, "History of the Thyroid," *Horm Res Paediatr*, vol. 95, no. 6, pp. 546–556, 2022, doi: 10.1159/000526621.
- [2] A. L. Mescher, *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas, Thirteenth Edition*, Editing by Mc Graw Hill Education, 2013, pp. 935,
- [3] S. K. Hadjikakou, N. Hadjiliadis, *Interaction of Thioamides, Selenoamides, and Amides With Diiodine*, *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2006, pp. 1-10
- [4] G. J. Corban, S. K. Hadjikakou, N. Hadjiliadis, M. Kubicki, E. R. T. Tiekink, I. S. Butler, E. Drougas, A. M. Kosmas, *Synthesis, Structural Characterization, and Computational Studies of Novel Diiodine Adducts with the Heterocyclic Thioamides N-Methylbenzothiazole-2-thione and Benzimidazole-2-thione: Implications with the Mechanism of Action of Antithyroid Drugs*, *Inorg. Chem.* 2005, 44, 8617-8627
- [5] G. J. Corban, C. Antoniadis, S. K. Hadjikakou, N. Hadjiliadis, J-F Meng, I. S. Butler, *Pressure-Tuning Raman Spectra of Diiodine Thioamide Compounds: Models for Antithyroid Drug Activity*, *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2006, pp. 1-5, DOI 10.1155/BCA/2006/68542
- [6] G. J. Corban, S. K. Hadjikakou, A. C. Tsipis, M. Kubicki, T. Bakas, and N. Hadjiliadis, "Inhibition of peroxidase-catalyzed iodination by thioamides: experimental and theoretical study of the antithyroid activity of thioamides," *New J. Chem.*, vol. 35, no. 1, pp. 213–224, 2011, doi: 10.1039/C0NJ00626B.
- [7] C. D. Antoniadis, S. K. Hadjikakou, N. Hadjiliadis, A. Papakyriakou, M. Baril, and I. S. Butler, "Synthesis and Structures of Se Analogues of the Antithyroid Drug 6- *n* -Propyl-2-

- thiouracil and Its Alkyl Derivatives: Formation of Dimeric Se–Se Compounds and Deselenation Reactions of Charge-Transfer Adducts of Diiodine,” *Chemistry A European J*, vol. 12, no. 26, pp. 6888–6897, Sep. 2006, doi: 10.1002/chem.200501455.
- [8] C. N. Banti, N. Kourkoumelis, C. P. Raptopoulou, V. Psycharis, and S. K. Hadjikakou, “N-(4-Hydroxyphenyl)acetamide against diiodine towards polyiodide dianion,” *New J. Chem.*, vol. 41, no. 13, pp. 5555–5564, 2017, doi: 10.1039/C7NJ01117B.
- [9] E. Johansson, J-L Hansen, A-M Kruse Hansen, A-C Shaw, P. Becker, L. Schäffer, S. Reedtz-Runge “Type II Turn of Receptor-bound Salmon Calcitonin Revealed by X-ray Crystallography,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 291, no. 26, pp. 13689–13698, Jun. 2016, doi: 10.1074/jbc.M116.726034
- [10] Antoniadis C.D., Corban G.J., Hadjikakou S.K., Hadjiliadis N., Kubicki M., Warner S., Butler I.S. Antoniadis, Constantinos D., Corban, Ghada J. ; Hadjikakou, Sotiris K. Hadjiliadis, Nick; Kubicki, Maciej; Warner, Stephanie Butler, Ian S. ,Synthesis and characterization of (PTU)I₂ (PTU = 6-n-propyl-2-thiouracil) and (CMBZT)I₂ (CMBZT = 5-chloro-2-mercaptobenzothiazole) and possible implications for the mechanism of action of anti-thyroid drugs, *European Journal of Inorganic Chemistry*, ,(2003),(8), pp. 1635 - 1640, Cited 61 times.,DOI: 10.1002/ejic.200390215
- [11] M. Hamid, Khalil-ur-Rehman, Potential applications of peroxidases, *Food Chemistry* 115 (2009) 1177–1186
- [12] G. Medeiros-Neto, Thyroglobulin, *Encyclopedia of Hormones*, Editing by Elsevier Science (USA), 2003 ,pp 448]
- [13] G. Kelly, Peripheral Metabolism of Thyroid Hormones: A Review, *Alternative Medicine Review*, 5(4), 2000, pp.306,

- [14] G Corban, Σύνθεση, χαρακτηρισμός και μελέτη νέων συμπλοκών ενώσεων του δι-ιωδίου ή/και του σιδήρου με υποκατάστατες που δρουν ή πιθανά δρουν ως αντι-θυρεοειδικά φάρμακα. Πιθανή εμπλοκή των νέων ενώσεων στο μηχανισμό σύνθεσης των θυρεοειδικών ορμονών, Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Διατμηματικό Πρόγραμμα Σπουδών "Βιοανόργανη Χημεία", 2006, pp 45
- [15] J. Köhrle, The deiodinase family: selenoenzymes regulating thyroid hormone availability and action, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2000, pp. 1853-1863
- [16] G. Pinna *et al.*, "3,3'-Diiodothyronine concentrations in the sera of patients with nonthyroidal illnesses and brain tumors and of healthy subjects during acute stress," *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 83, no. 9, pp. 3071–3077, Sep. 1998, doi: 10.1210/jcem.83.9.5080.
- [17] M.-J. Obregon, "Thyroid hormone and adipocyte differentiation," *Thyroid*, vol. 18, no. 2, pp. 185–195, Feb. 2008, doi: 10.1089/thy.2007.0254.
- [18] R. Płoski, K. Szymański, and T. Bednarczuk, "The genetic basis of graves' disease," *Curr Genomics*, vol. 12, no. 8, pp. 542–563, Dec. 2011, doi: 10.2174/138920211798120772.
- [19] K. Kakudo, Y. Li, M. Hirokawa, and T. Ozaki, "Diagnosis of Hashimoto's thyroiditis and IgG4-related sclerosing disease," *Pathol Int*, vol. 61, no. 4, pp. 175–183, Apr. 2011, doi: 10.1111/j.1440-1827.2011.02661.
- [20] G. Papi and V. A. LiVolsi, "Current Concepts on Riedel Thyroiditis," *Pathology Patterns Reviews*, vol. 121, no. suppl_1, pp. S50–S63, May 2004, doi: 10.1309/NUU88VAFR9YEHKNA
- [21] J. Justad, *Thyroid Disorders, Health and Safety Guidelines*, 2015, pp. 7-8
- [22] R. Gärtner, "Thyroid diseases in pregnancy," *Curr Opin Obstet Gynecol*, vol. 21, no. 6, pp. 501–507, Dec. 2009, doi: 10.1097/GCO.0b013e328332a836.

- [23] A. Grüters, D l'Allemand, P Beyer, G Eibs, H Helge, S Korth-Schütz, U Oberdisse, D Schwartz-Bickenbach, B Weber., "Screening of newborn infants for hypothyroidism in Berlin (West) 1978-1982," *Monatsschr Kinderheilkd*, vol. 131, no. 2, pp. 100–105, Feb. 1983.
- [24] H. Samuels, "Subacute, silent, and postpartum thyroiditis," *Med Clin North Am*, vol. 96, no. 2, pp. 223–233, Mar. 2012, doi: 10.1016/j.mcna.2012.01.003.
- [25] G. J. Kahaly, U. Gottwald-Hostalek, Use of levothyroxine in the management of hypothyroidism: A historical perspective, *Frontiers in Endocrinology*, 2022, pp. 105–4983
- [26] M. Mumtaz, L. S. Lin, K. C. Hui, and A. S. Mohd Khir, "Radioiodine I-131 for the therapy of graves' disease," *Malays J Med Sci*, vol. 16, no. 1, pp. 25–33, Jan. 2009.
- [27] M. F. Haddad, B. A. Abdullah, H. A. AlObeidi, A. M. Saadi, and M. F. Haddad, "Antibiotic classification, mechanisms, and indications: A review," *IJMBHR*, vol. 5, no. 3, pp. 39–46, 2024, doi: 10.54660/IJMBHR.2024.5.3.39-46.
- [28] A. N. Sapadin and R. Fleischmajer, "Tetracyclines: nonantibiotic properties and their clinical implications," *J Am Acad Dermatol*, vol. 54, no. 2, pp. 258–265, Feb. 2006, doi: 10.1016/j.jaad.2005.10.004.
- [29] M. L. Nelson and S. B. Levy, "The history of the tetracyclines," *Ann N Y Acad Sci*, vol. 1241, pp. 17–32, Dec. 2011, doi: 10.1111/j.1749-6632.2011.06354.x.
- [30] L. Ravi, "A Handbook On Protein Ligand Docking Tool: AUTODOCK4," vol. 4, no. 3.
- [31] R. Huey, G. M. Morris, Using AutoDock 4 with AutoDockTools: A Tutorial, The Scripps Research Institute Molecular Graphics Laboratory, 2008, pp. 92037-1000
- [32] S. Salentin, S. Schreiber¹, V. J. Haupt, M. F. Adasme, Michael Schroeder, PLIP: fully automated protein–ligand interaction profiler, *Nucleic Acids Research*, 2015, 1, doi: 10.1093/nar/gkv315

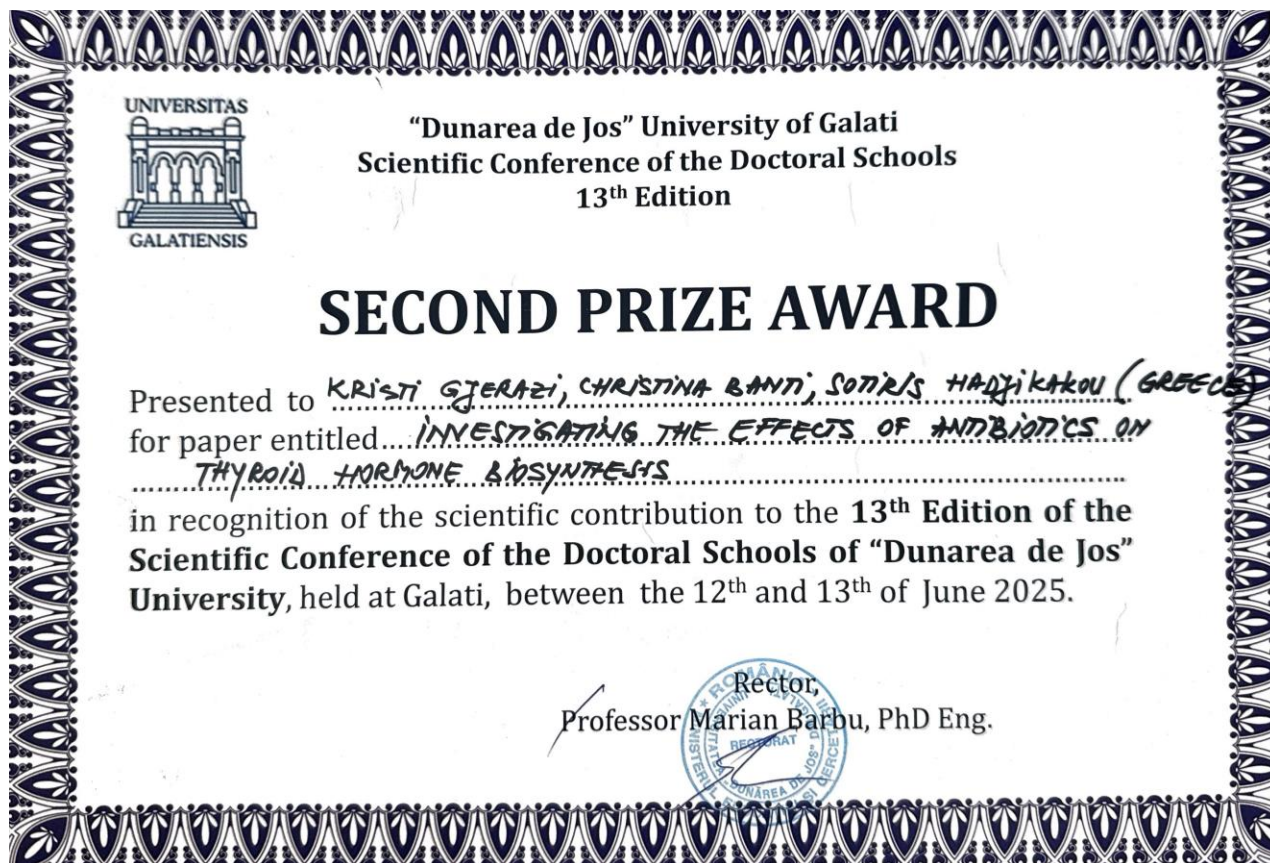
- [33] Σημειώσεις AutoDock μαθήματος Βιοφυσικής φαρμακευτικής δράσης καθ Ν. Κουρκουμέλης μεταπτυχιακό Βιολογική Ανόργανης Χημείας.
- [34] I. Ozturk, S. Filimonova, S.K. Hadjidakou, N. Kourkoumelis, V. Dokorou, M.J. Manos, A.J. Tasiopoulos, M.M. Barsan, I.S. Butler, E.R. Milaeva, J. Balzarini, N. Hadjiliadis, Structural Motifs and Biological Studies of New Antimony(III) Iodide Complexes with Thiones, *Inorg. Chem.* 2010, 49, 488–501 DOI: 10.1021/ic901442e
- [35] “Σημειώσεις_Force_fields_μαθήματος Βιοφυσικής φαρμακευτικής δράσης_ καθ Νικόλαος Κουρκουμέλης_μεταπτυχιακό_Βιολογική Ανόργανης Χημείας.”
- [36] I. H. Segel, *Biochemical Calculations*, J. Wiley & Sons Inc., NY, 2nd edn, 1976.
- [37] S. Salentin, S. Schreiber¹, V. J. Haupt, M. F. Adasme, Michael Schroeder, PLIP: fully automated protein–ligand interaction profiler, *Nucleic Acids Research*, 2015, 1, doi: 10.1093/nar/gkv315
- [38] S.V. Kathuria, Y.H. Chan, R.P. Nobrega, A. Ozen, C.R. Matthews, Clusters of isoleucine, leucine, and valine side chains define cores of stability in high-energy states of globular proteins: Sequence determinants of structure and stability, *The Protein Society*, 2015, 662—675, DOI: 10.1002/pro.2860
- [39] D. Zhang, Q. Meng, F. Guo, Incorporating Water Molecules into Highly Accurate Binding Affinity Prediction for Proteins and Ligands, *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25, 12676. <https://doi.org/10.3390/ijms252312676>
- [40] C.A. Hunter, J. Singh, J.M. Thornton, n-n: Interactions: the Geometry and Energetics of Phenylalanine-Phenylalanine Interactions in Proteins, *Journal of Molecular Biology*, 1991, 218,

[41] A. Henriksen, D.J. Schuller, K. Meno, K. G. Welinder, A. T. Smith, M. Gajhede, Structural Interactions between Horseradish Peroxidase C and the Substrate Benzhydroxamic Acid Determined by X-ray Crystallography, American Chemical Society, 1998, 8054-8060

Από τα αποτελέσματα αυτής της διατριβής έχουν προκύψει μέχρι στιγμής οι παρακάτω δημοσιεύσεις:

1. Κρίστι Γκεράζη, Χριστίνα Μπαντή, Σωτήρης Χατζηκακού «Επίδραση των Αντιβιοτικών στη Βιοσύνθεση των Θυρεοειδικών Ορμονών: Αντίδραση της Τετρακυκλίνης με Horseradish Peroxidase – Μηχανισμοί και Προοπτικές» Ημερίδα, «Διεθνή-Ξενόγλωσσα διδακτορικά στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωαννίνα, 21 Οκτωβρίου 2024.
2. Kristi Gjerazi, Christina N. Banti, Sotiris K. Hadjidakou «Antibiotics interference on Thyroid Hormone Synthesis: Mechanism and Implications of Tetracycline-Horseradish Peroxidase Interaction», 74ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Book of Abstract pp. 163, Θεσσαλονίκη, 13-15 Δεκεμβρίου 2024.
3. Kristi Gjerazi, Christina N. Banti, Sotiris K. Hadjidakou, «How Antibiotics Disrupt Thyroid Hormone Synthesis: Decoding the Tetracycline-Horseradish Peroxidase Interaction», 20th Symposium on Medicinal Chemistry (HSMC-20), Book of Abstract pg. 173, University of Ioannina, Ioannina, April 3-5, 2025.
4. Kristi Gjerazi, Christina N. Banti, Sotiris K. Hadjidakou, Investigating the Effects of Antibiotics on Thyroid Hormone Biosynthesis», 13th Edition of SCDS-UDJG, Perspectives and challenges in doctoral research, Book of Abstract pg. 76, Galati, Rumania, 12th and 13th of June 2025. Η προφορική παρουσία της εργασίας αυτής βραβεύτηκε από τον Πρύτανη του

Πανεπιστημίου «Dunarea de Jos», με το 2^ο βραβείο του συνεδρίου “Scientific Conference of Doctoral Schools, 13th Edition”.



Εικόνα 22: Βραβείο από το συνέδριο SCDS-UDJG στην Ρουμανία