ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΕΘΝΙΚΗΣ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
Β' ΚΟΙΝΟΤΙΚΟ ΠΛΑΙΣΙΟ ΣΤΗΡΙΞΗΣ
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΑΡΧΙΚΗΣ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗΣ ΚΑΤΑΡΤΙΣΗΣ
ΠΑΙΔΕΙΑ ΑΝΟΙΧΤΩΝ ΟΡΙΖΟΝΤΩΝ
Συγχρηματοδότηση: Ευρωπαϊκή Επιτροπή, Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο, Δ/νση V & Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης, Δ/νση XVI.

ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΑΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ»

ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΑΖΩΜΕΘΙΝΙΚΟΥ ΔΕΣΜΟΥ ΣΤΟ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟ ΚΑΙ ΤΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΘΕΙΑΖΟΛΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΩΣ ΠΙΘΑΝΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΜΕΤΑΛΛΟΕΝΖΥΜΩΝ

ΣΤΑΥΡΟΥ ΚΩΣΤΟΥΔΗ

ΦΑΡΜΑΚΟΠΟΙΟΥ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2012

ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Η εργασία αυτή με τίτλο: « Αξιοποίηση του αζωμεθινικού δεσμού στο σχεδιασμό και τη σύνθεση θειαζολικών παραγώγων ως πιθανών αναστολέων μεταλλοενζύμων» εκπονήθηκε στα πλαίσια του Διατμηματικού Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών, με τίτλο «Παραγωγή και Έλεγχος Φαρμακευτικών Ενώσεων» που οργανώθηκε και λειτούργησε υπό την εποπτεία του Τομέα της Φαρμακευτικής Χημείας, του Φαρμακευτικού Τμήματος, του ΕΘΝΙΚΟΥ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ και του Τομέα της Φαρμακευτικής Χημείας, του Φαρμακευτικού Τμήματος, του ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές Φαρμακευτικής Χημείας του Ε.Κ.Π.Α., κυρίους Γ. Β. Φώσκολο και Γ. Φυτά και την καθηγήτρια Φαρμακευτικής Χημείας του Α.Π.Θ., κυρία Α. Γερονικάκη, οι οποίοι αποτέλεσαν την Επιτροπή Επιλογής Μεταπτυχακών Φοιτητών και μου έδωσαν την ευκαιρία να λάβω μέρος στο πρόγραμμα αυτό.

Πριν προχωρήσω στην ανάλυση της μεταπτυχιακής μου εργασίας θα ήθελα να αναφερθώ στα πρόσωπα που δράσανε καταλυτικά σε αυτή την δουλειά. Πρωτίστως, θέλω να εκφράσω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου στην επιβλέπουσα καθηγήτριά μου κ. Δήμητρα Χατζηπαύλου-Λίτινα για την άψογη οργάνωση του πειραματικού μέρους της δουλειάς, την αμέριστη συμπαράσταση της, τη διαλλακτικότητα, την επιμονή της αλλά και την υπομονή της. Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω την διδάκτορα Άννα-Μαρία Κατσώρη και τον υποψήφιο διδάκτορα Σωτήριο Κατσαμάκα για τις πολύτιμες συμβουλές τους. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές και λέκτορες του τομέα για την κατάρτιση που μου προσέφεραν, αλλά και γενικότερα τους ανθρώπους του τομέα για τη συνεισφορά τους, καθώς επίσης και τον αναπληρωτή καθηγητή Οργανικής Χημείας κ. Λίτινα Κωνσταντίνο του Α.Π.Θ. για την λήψη των φασμάτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR). Επιπλέον, θέλω να ευχαριστήσω τον Καθηγητή A. Leo και την εταιρεία Biobyte για τη διευκόλυνση στην ελεύθερη διαχείριση του υπολογιστικού προγράμματος C-QSAR.

Τέλος θέλω να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την ηθική στήριξη και για την ενθάρυνσή τους να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο αντικείμενο με σκοπό να διευρύνω τις γνώσεις μου .

Ευχή μου είναι αυτή η εργασία να εκτιμηθεί από την επιστημονική κοινότητα και να αποτελέσει έρεισμα για περαιτέρω έρευνα και εξέλιξη στον Τομέα της Φαρμακευτικής Χημείας.

Περιεχόμενα

Περίληψη……6

Abstract……9

I.Εισαγωγή……..12

1. Μεταλλοπρωτεΐνες και μεταλλοένζυμα…….....12
2. Αναστολή Μεταλλοενζύμων και εφαρμογές……..14
3. Παθοφυσιολογία φλεγμονής……....16
4. Λιποξυγονάση (LOX)……18
5. Κυκλοξυγονάση (COX)……20
6. Ματριξίνες (MMPs)……...22
7. Τυροσινάση……24
8. Ξανθινοξειδάση…..……25
9. Ελεύθερες ρίζες……...26
10. 2,4-διϋποκατεστημένα θειαζολικά παράγωγα και βάσεις Sciff……...28

10.1 Θειαζόλιο-φαρμακολογική δράση……28

10.2 Βάσεις Sciff……..29

10.3 Μέθοδοι σύνθεσης των 2,4-διϋποκατεστημένων θειαζολικών παραγώγων που φέρουν αζωμεθινική ομάδα……...……29

II. Αντικείμενο-σκοπός……39

III. Όργανα-αντιδραστήρια……43

3.1 Όργανα……43

3.2 Αντιδραστήρια……44

IV. Υπολογιστική Φαρμακοχημεία……46

4.1 Ποσοτικές σχέσεις δομής-δράσης, Quantitative Structure-Activity Relationships(QSAR)……...46

4.2 Εξαγωγή ποσοτικών σχέσεων δομής δράσης (QSAR) για 2,4-διϋποκατεστημένα θειαζολικά παράγωγα……..53

V. Πειραματικό μέρος……...59

5.1.1 Σύνθεση τελικών προϊόντων. Μέθοδος σύνθεσης 2,4-διϋποκατεστημένων θειαζολικών παραγώγων……..59

5.2 Φασματοσκοπικά Δεδομένα……63

5.3 In Silico, Θεωρητικός Υπολογισμός Τιμών Φυσικοχημικών Ιδιοτήτων……65

5.4 Δοκιμασία σύνθεσης τελικών προϊόντων μέσω μίας μεθόδου «πράσινης χημείας» ενός σταδίου……66

VI. Φαρμακοχημικές Δοκιμασίες *in vitro* και *in vivo*…….....67

6.1 Φαρμακοχημικές Δοκιμασίες *in vitro*……67

6.1.1 Αλληλεπίδραση των εξεταζόμενων ενώσεων με την ελεύθερη σταθερή 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλυδραζυλική ρίζα (DPPH) σε διαλύτη αιθανόλη……67

6.1.2 Ανασταλτική δράση επί της λιποξυγονάσης φυτικής προέλευσης από σόγια……68

6.1.3 Εκτίμηση της ικανότητας των ενώσεων να αναστέλλουν την υπεροξείδωση του λινελαϊκού οξέος που επάγεται από το διϋδροχλωρικό άλας του 2,2΄- διαζο-2-αμιδινοπροπανίου AAPH…69

6.1.4 Εκτίμηση της ικανότητας των ενώσεων να αναστέλλουν την τυροσινάση από μανιτάρι *in vitro*……...70

6.1.5 Εκτίμηση της ικανότητας των ενώσεων να αναστέλλουν την ξανθινοξειδάση……71

6.1.6 Εκτίμηση της ικανότητας των ενώσεων να σχηματίζουν σύμπλοκο με τον τριχλωριούχο σίδηρο ($FeCl_3$)……71

6.1.7 Εκτίμηση της σημασίας του αζωμεθινικού δεσμού στην εκδήλωση βιολογικής δράσης *in vitro*……..75

6.2.Βιολογικές Δοκιμασίες *in vivo*……..76

6.2.1 Επαγωγή οιδήματος άκρου ποδός επίμυα που προκαλείται από την ενδοδερμική χορήγηση καρραγενίνης……76

VII. Αποτελέσματα-Συζήτηση……79

7.1.1. Σύνθεση 2,4-διϋποκατεστημένων θειαζολικών παραγώγων…..79

7.1.2. Δοκιμασία σύνθεσης τελικών προϊόντων με εφαρμογή μεθόδου «πράσινης χημείας» ενός σταδίου……84

7.2. Βιολογικά πειράματα, *in vitro/in vivo* φαρμακοχημική μελέτη…85

VIII.Συμπεράσματα…… 105

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ-ΦΑΣΜΑΤΑ……...109

Περίληψη

Τα μεταλλοένζυμα αποτελούν οικογένεια ενζύμων που συζεύγνυνται με μεταλλικά ιόντα. Το ενεργό κέντρο του μεταλλοενζύμου φέρει ένα η περισσότερα μεταλλικά ιόντα που σχηματίζουν ένα ορισμένο περιβάλλον συναρμογής, που υφίσταται μέσα στο ευρύτερο περιβάλλον που ορίζεται από το σχήμα του πεπτιδικού μέρους του ενζύμου. Μεταλλοένζυμα όπως : η COX, η LOX, η οξειδάση της ξανθίνης κ.α. εμπλέκονται στην εμφάνιση φλεγμονωδών αποκρίσεων στους ιστούς.

Έχει παρατηρηθεί ότι η παρουσία θειαζολικού δακτυλίου σε βιολογικά ενεργά μόρια παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στο ζωικό και φυτικό βασίλειο. Παρόμοιος ρόλος έχει διαπιστωθεί και για αζωμεθινικές ενώσεις (-C=N-).

Η διαπίστωση αυτή ώθησε στην ανάπτυξη ενώσεων που συνδυάζουν τις δύο φαρμακοφόρες ομάδες στο ίδιο μόριο με δράση αντιβακτηριδιακή, αντιμυκητιασική, αντιφλεγμονώδη, αντικαρκινική και άλλες.

Αξιοποιώντας τα παραπάνω δεδομένα της βιβλιογραφίας προσπαθήσαμε να συνθέσουμε νέες δομές του παραπάνω τύπου ενώσεων με την βοήθεια ποσοτικών συσχετίσεων με χρήση του προγράμματος C-QSAR της Biobyte

Η σύνθεση των νέων παραγώγων έλαβε χώρα σε δύο στάδια: α) σύνθεση της βάσης Schiff της θειοσεμικαρβαζόνης με συμπύκνωση της κατάλληλα υποκατεστημένης αλδεΰδης με το θειοσεμικαρβαζίδιο και β) σύνθεση του θειαζολικού δακτυλίου κατά Hantzsch. Οι ενώσεις αυτές λήφθηκαν με πολύ καλές αποδόσεις 43 έως 100%.

Οι δομές των ενώσεων επιβεβαιώνονται με τις στοιχειακές αναλύσεις και φασματοσκοπικά (IR, ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, MS (ESI). Εφαρμόστηκε το πρόγραμμα Silicon Graphics (Spartan) για εξαγωγή φυσικοχημικών ιδιοτήτων. Οι τιμές λιποφιλικότητας των ενώσεων υπολογίστηκαν με τη θεωρητική υπολογιστική μέθοδο ClogP.

Οι ενώσεις μελετήθηκαν με τη βοήθεια πειραμάτων in vitro και in vivo για τη δράση τους ως αντιοξειδωτικά και ως πιθανοί αναστολείς μεταλλοενζύμων που εμπλέκονται στην διαδικασία της φλεγμονής . Ειδικότερα, οι ενώσεις δοκιμάστηκαν στα παρακάτω πειράματα:

Φαρμακοχημικές δοκιμασίες *in vitro*:

I. Αλληλεπίδραση των ενώσεων με την ελεύθερη σταθερή ρίζα του 1,1-διφαινυλο-πικρυλυδραζυλίου (DPPH)
II. Αναστολή της υπεροξείδωσης του λινελαϊκού οξέος
III. Αναστολή του ενζύμου λιποξυγονάση φυτικής προέλευσης (από σόγια)
IV. Αναστολή του ενζύμου τυροσινάση μανιταριού.
V. Αναστολή της οξειδάσης της ξανθίνης.
VI. Αλληλεπίδραση των ενώσεων με $FeCl_3$ για την διερεύνηση πιθανότητας σχηματισμού συμπλόκου με τον τρισθενή σίδηρο.

Βιολογικά πειράματα *in vivo*

I. Αναστολή της εμφάνισης του οιδήματος του άκρου ποδός επίμυα που προκαλείται από την ενδοδερμική χορήγηση της καρραγενίνης.

Από τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τις παραπάνω σειρές πειραμάτων, διαπιστώνουμε ότι η πλειοψηφία των ενώσεων έδειξαν να αλληλεπιδρούν ικανοποιητικά με τη σταθερή ελεύθερη ρίζα DPPH και μάλιστα χωρίς να μεταβάλλεται η δράση τους αυτή σε σχέση με τη συγκέντρωση και το χρόνο (με ισχυρότερη την **crosk 2e)**. Οι ενώσεις crosk 1c, crosk 5b, crosk 6b, crosk 7b και crosk 8b παρουσίασαν υψηλή ικανότητα αναστολής της λιπιδικής υπεροξείδωσης του λινελαϊκού οξέος που επάγεται από το AAPH. Οι ενώσεις crosk 1c, crosk 3b και crosk 6b παρουσίασαν αρκετά ισχυρή ανασταλτική δράση στην LOX φυτικής προέλευσης.Για τις crosk 1c και crosk 6b βρέθηκε ως πιθανός μηχανισμός αναστολής της LOX ο σχηματισμός συμπλόκου με τον Fe του ενζύμου. Οι τέσσερις ενώσεις crosk 1c, crosk 3b, crosk 6b και crosk 7b εμφάνισαν πολύ καλή ανασταλτική δράση επί της τυροσινάσης από μανιτάρι (>89%).

Η ένωση **crosk 1c** διαπιστώθηκε ότι αναστέλλει το οίδημα που προκαλείται από καρραγενίνη κατά 48%.

Συγκριτικά, τόσο οι θειοσεμικαρβαζόνες όσο και τα τελικά προϊόντα παρουσιάζουν καλές δράσεις , οι οποίες όμως αυξάνονται θεαματικά στα τελικά προϊόντα.

Γίνεται προσπάθεια α) να συσχετισθούν ποσοτικά τα in vitro/in vivo αποτελέσματα με τις σημαντικότερες φυσικοχημικές ιδιότητες των δομικών στοιχείων των μορίων και β) να διευκρινισθεί η συσχέτιση των δράσεων μεταξύ τους ώστε να προταθεί ένας πιθανός μηχανισμός δράσης.

Abstract

The metalloenzymes are a family of enzymes containing metal ions. The active site of a metalloenzyme features one or more metal ion(s) in a defined coordination environment that exists within a wider environment defined by the shape of the surrounding biopolymer. Metalloenzymes such as COX, LOX, Xanthinoxidase are involved into inflammatory responses appearing in tissues.

The presence of thiazole ring system in biologically active molecules has been found to play an important role in animal and plant kingdom. Similar clues have been found for compounds containing azomethine group (-C=N-).

As a result compounds which combine the two pharmacophores in the same molecule have been synthesized and possess activities such as antibacterial, antifungal, antiinflamatory, anticancer.

According to the literature some new thiazolyl derivatives as described above, have been designed and synthesized with the help of quantitative structure-activity relationships using the C-QSAR program of Biobyte.

The final product was obtained in two steps: a)the synthesis of the Schiff bases of thiosemicarbazones is taken place by the condensation of the appropriate substituted aldehyde with thiosemicarbazide, and b)the synthesis of thiazole according to the Hantzsch method. These compounds were obtained with good yield of 43-100%.

The structures of the compounds are confirmed by IR, ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, MS (ESI) and elemental analysis. Silicon Graphics (Spartan) Program was applied for extraction of the physicochemical properties . Lipophilicity values of compounds were calculated theoretically by the ClogP method .

The compounds were studied through in vitro and in vivo experiments for their activity as antioxidant and possible inhibitors of metalloenzymes. In particular, the compounds were tested in the following experiments:

Pharmacochemical tests *in vitro*:

I. DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scanvenging assay
II. Inhibition of lipid peroxidation using AAPH [2,2'-azobis-2-methyl-propanimidamide]
III. Soybean lipoxygenase inhibition assay
IV. Inhibition of mushroom tyrosinase
V. Inhibition of xanthinoxidase
VI. Interaction of our compounds with $FeCl_3$ in order to elucidate a possible mechanism of action by forming complex with Fe^{+3}

Biological experiments *in vivo*

I. Inhibition of the carrageenin-induced paw edema (CPE).

In the above series of experiments, we found that most of the compounds showed good to satisfactory interaction with the stable DPPH free radical independently to the concentration and time (**crosk 2e** was the most potent). Crosk 1c, crosk 5b, crosk 6b, crosk 7b and crosk 8b showed high inhibition of lipid peroxidation of linoleic acid induced by AAPH. Crosk 1c, crosk 3b and crosk 6b showed quite a strong inhibitory effect on LOX. Especially for crosk 1c and crosk 6b the supported mechanism of inhibition of LOX is through the complexation with the Fe atom of LOX. The four compounds crosk 1c, crosk 3b, crosk 6b and crosk 7b presented very strong inhibition on mushroom tyrosinase (>89%).

The compound crosk 1c was found to inhibit the carrageenin-induced paw edema (48%).

Finally, the combination of azomethine and thiazolyl groups lead to better biological results.

Efforts are conducted a) to correlate quantitatively the *in vitro* / *in vivo* results with the most important physicochemical properties of the structural

components of the molecules and b) to clarify the correlation of actions among them and to propose a possible mechanism of action.

Ι.Εισαγωγή

1.Μεταλλοπρωτεΐνες και μεταλλοένζυμα

Οι μεταλλοπρωτεΐνες αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια λειτουργικών πρωτεϊνών που, εκτός από αμινοξέα περιέχουν ως δομικούς λίθους και διάφορα ιόντα μετάλλων: είναι δηλαδή πρωτεΐνες συζευγμένες με μέταλλα ως προσθετικές ομάδες. Τα μέταλλα αυτά παίζουν σημαντικό ρόλο στη βιολογική λειτουργία των μεταλλοπρωτεϊνών [Nelson et al, 2005]. Μια υποκατηγορία μεταλλοπρωτεϊνών είναι και τα μεταλλοένζυμα, των οποίων η συνηθέστερη λειτουργία είναι η σύνδεση τους με ένα ειδικό οργανικό μόριο (υπόστρωμα) και η κατάλυση της χημικής μετατροπής του υποστρώματος σε ένα νέο προϊόν. Η σύνδεση του μεταλλοενζύμου γίνεται μέσω του ενεργού κέντρου του, όπου ένα ή περισσότερα μεταλλικά ιόντα κατάλληλα συναρμοσμένα βρίσκονται μέσα σε ένα περιβάλλον που ορίζεται από το σχήμα του πρωτεϊνικού(πολυπεπτιδικού) τμήματος του ενζύμου στο χώρο.

Ο ρόλος των μεταλλικών ιόντων στο μεταλλοένζυμο είναι πολλαπλός:

- Συναρμογή και ενεργοποίηση του υποστρώματος
- Διαμόρφωση του χώρου και αλλαγές στο pKa των αντιδρώντων μορίων για διευκόλυνση της αντίδρασης
- Παρουσία ενός ισχυρού ηλεκτρονιόφιλου κέντρου
- Χρήση των οξειδοαναγωγικών ιδιοτήτων του μεταλλικού ιόντος.

Για τα μεταλλοένζυμα ισχύουν τα γνωστά από την χημεία των ενώσεων συναρμογής . Οι συναρμοτές είναι βάσεις κατά *Lewis,* καθώς είναι δότες ζεύγους ηλεκτρονίων , ενώ τα μεταλλικά κέντρα είναι οξέα κατά *Lewis* καθώς είναι δέκτες ηλεκτρονίων. Σε ένα μεταλλοένζυμο οι ομάδες συναρμογής του μεταλλικού ιόντος είναι αφ'ενός της πρωτεΐνης του ενζύμου και αφ'ετέρου του υποστρώματος. Το πρωτεϊνικό μακρομόριο συναρμόζεται μέσω των

αποπρωτονιομένων αζώτων των αμιδικών δεσμών αλλά και των χαρακτηριστικών ομάδων που περιέχει όπως: -COOH, $-NH_2$, -OH και -SH . Η κυριότερη διαφορά των μεταλλοενζύμων σε σχέση με τις κλασικές ενώσεις συναρμογής έγκειται στο ότι η τρισδιάτατη δομή του πρωτεϊνικού πολυμερούς επιτρέπει την προσέγγιση ενός υποστρώματος συγκεκριμένου σχήματος και έτσι είναι πιο στερεοεκλεκτική -στερεοειδική η σύνδεση του υποστρώματος με το μέταλλο. Στην πραγματικότητα τα μεταλλοένζυμα είναι υπερμεγέθη σύμπλοκα όπου το ενεργό κέντρο αποτελεί ένα πολύ μικρό αλλά καίριας σημασίας τμήμα της συνολικής δομής του ενζύμου που επηρεάζει την διαμόρφωση του στο χώρο, κατά την σύνδεση του με τις ομάδες συναρμοτές και κατ'επέκταση επηρεάζει και την σύνδεση του υποστρώματος. Μέταλλα που έχουν ανιχνευθεί σε μεταλλοένζυμα είναι : Fe, Zn, Mg, Mn, Cu, Co, Ni, Mo, V και Cr [Lawrance, 2010] .

Τα μεταλλικά ιόντα των μεταλλοενζύμων συμμετέχουν σε αντιδράσεις κατάλυσης είτε δρώντας ως οξέα κατά Lewis είτε μεταβάλλοντας την οξειδωτική τους κατάσταση[Junghun Suh, 1992]. Υπάρχουν αρκετά μόρια με σχετικά μικρά μοριακά βάρη που μεσολαβούν στη δέσμευση και μεταφορά των μεταλλικών ιόντων στο χώρο συναρμογής τους: τα ιονοφόρα που μπορεί να είναι πεπτίδια, πολυαιθέρες , πολυκαρβοξυλικά ή υδροξαμικά συστήματα, κατεχόλες κλπ. Κατά το σχηματισμό του συμπλόκου τα ιονοφόρα αναδιατάσσονται ούτως ώστε το προκύπτον σύμπλοκο να διέρχεται εύκολα μέσω των λιπόφιλων κυτταρικών μεμβρανών.(Kesisoglou et al, 2006, vol I)

Η καταλυτική δράση των μεταλλοενζύμων εξακριβώθηκε χρησιμοποιώντας αναστολείς που συνδέονται με τα μεταλλικά ιόντα. Οι αναστολείς αυτοί συνδέθηκαν in situ με το αποένζυμο σχηματίζοντας ένα σύνθετο σύμπλοκο όπως φαίνεται στην παρακάτω σχέση:

$$[EMe] + nI \rightleftarrows [EMe]\,I_n$$

όπου παρατηρούμε ότι το ενεργό μεταλλοένζυμο [EMe] συνδέεται αναστρέψιμα με n μόρια αναστολέα ,I, για να δώσει το αδρανές από πλευρά ενζυματικής δράσης σύμπλοκο $[EMe]I_n$.

Η απενεργοποίηση του ενζύμου θα μπορούσε να προέλθει εναλλακτικά με την εκτόπιση από τον αναστολέα του μετάλλου από το ένζυμο. Η αναστρεψιμότητα αυτής της αντίδρασης καθορίζεται από την τάση επανασύνδεσης του μετάλλου με την πρωτείνη καθώς και την σταθερά διάστασης του συμπλόκου μέταλλο-αναστολέας.[Bourne et al, 1959]

$$[EMe] + nI \rightleftarrows E + Me\cdot I_n$$

Οι μεταλλοπρωτεΐνες καθορίζουν πολλές βιολογικές διαδικασίες που έχουν σχέση με την εκδήλωση και την διάδοση ποικίλων ασθενειών. Χρήση αναστολέων μεταλλοπρωτεϊνών αναφέρεται για πρώτη φορά πριν από τριάντα χρόνια όταν εγκρίθηκε από τον FDA η χρήση του αντιυπερτασικού captopril που είναι ένας αναστολέας του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης (ACE). Συγκεκριμένα η θειολική ομάδα του captopril συναρμόζεται εύκολα με το ιόν Zn(II) της ενεργού περιοχής του μετατρεπτικού ενζύμου με επακόλουθη αναστολή του. Ο σχεδιασμός φαρμάκων που θα στοχεύουν σε διάφορες μεταλλοπρωτεΐνες είναι μία πρόκληση για την σύγχρονη φαρμακευτική επιστήμη . Στον πίνακα που

ακολουθεί παρατίθενται μεταλλοπρωτεϊνες –στόχοι για την θεραπεία διαφόρων ασθενειών στις οποίες εμπλέκονται [Rouffet et al., 2011].

Metal	Metalloprotein	Indication
Zn^{2+}	VanX	Bacterial infection
Zn^{2+}	TNF-α converting enzyme	Cancer
Zn^{2+}	Methionyl-tRNA-synthetase	Bacterial infection
Zn^{2+}	Metallo-β-lactamases	Bacterial infection
Zn^{2+}	Matrix metalloprotease	Cancer, arthritis
Zn^{2+}	LpxC	Bacterial infection
Zn^{2+}	Histone deacetylase	Cancer
Zn^{2+}	Hepatitis C protease	Hepatitis C
Zn^{2+}	Glyoxalase	Cancer
Zn^{2+}	Farnesyl transferase	Cancer, malaria
Zn^{2+}	Carbonic anhydrase	Glaucoma
Zn^{2+}	Botulinum neurotoxin	Toxin (biodefense)
Zn^{2+}	Anthrax lethal factor	Toxin (biodefense)
Zn^{2+}	Angiotensin converting enzyme	Hypertension
Zn^{2+}	Aggrecanase	Arthritis
Zn^{2+}	Adenosine deaminase	Inflammation
Ni^{2+}	Urease	Bacterial infection
Ni^{2+}	Glyoxalase	Bacterial infection
Mg^{2+}	DXR	Bacterial infection
Mg^{2+}	HIV integrase	HIV infection
Fe (heme)	Nitric oxide synthase	Inflammation
Fe (heme)	Cyclooxygenase	Inflammation
Fe^{2+}	Ribonucleotide reductase	Cancer, viral infections
Fe^{2+}	Peptide deformylase	Bacterial infection
Fe^{2+}	Lipoxygenase	Inflammation
Fe^{2+}/Mn^{2+}	Methionine aminopeptidase	Cancer, bacterial infection
Cu^{2+}	Tyrosinase	Cancer

Πίνακας 1 : Κατάλογος μεταλλοπρωτεϊνών που αποτελούν πιθανούς στόχους φαρμάκων[Rouffet et al., 2011]

3. Παθοφυσιολογία φλεγμονής

Η φλεγμονή είναι μηχανισμός μη ειδικής άμυνας του οργανισμού που έχει στόχο να τον απαλλάξει από τα αίτια που διαταράσσουν την ομοιόστασή του αρχικά προκαλώντας βλάβες στα κύτταρα και στην συνέχεια με την αναπόφευκτη νέκρωσή τους. Τέτοιοι βλαπτικοί παράγοντες μπορεί να είναι : μία βακτηριακή μόλυνση, ένα τραύμα, φυσικοί και χημικοί παράγοντες, άλλα νεκρά κύτταρα, ξένα σώματα και αλλεργικές αντιδράσεις αυτοάνοσης και μη αιτιολογίας. Παρόλο που ο ρόλος της φλεγμονώδους απόκρισης του οργανισμού είναι προστατευτικός, εντούτοις μπορεί να αποδειχθεί καταστροφική όταν γίνει ανεξέλεγκτη , για αυτό είναι απαραίτητη η δυνατότητα καταστολής αυτής, όταν απαιτείται.

Διακρίνονται δύο είδη φλεγμονής: η οξεία και η χρόνια .

Κατά την διάρκεια της φλεγμονώδους απόκρισης συμβαίνουν τρία κύρια γεγονότα:

α) προκαλείται αγγειοδιαστολή λόγω απελευθέρωσης χημικών μεσολαβητών από τα κατεστραμμένα κύτταρα όπως είναι: η ισταμίνη, η προστακυκλίνη (PGI_2) και το μονοξείδιο του αζώτου (NO).

β) Αυξάνεται η διαπερατότητα των αγγείων λόγω απελυθέρωσης από τα κύτταρα χημικών μεσολαβητών όπως είναι : η ισταμίνη, και τα λευκοτριένια C_4, D_4, and E_4 .

γ) Διήθηση και μετανάστευση λευκοκυττάρων στον ιστό που έχει υποστεί κάκωση και λαμβάνει χώρα η φλεγμονή (χημειόταξις) [Walter L. Kemp et al., 2008].

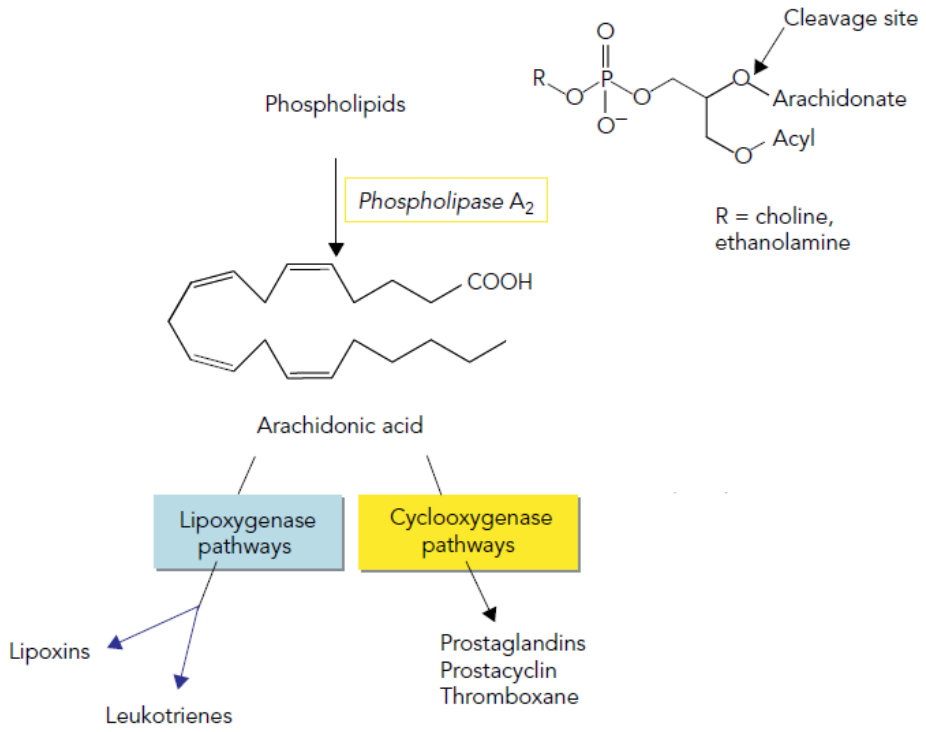
Επιπρόσθετα, η ανάπτυξη της φλεγμονώδους αντίδρασης ελέγχεται από κυτοκίνες και από προϊόντα ενζυμικών συστημάτων του πλάσματος (σύστημα πήξης και ινωδόλυσης) [Araico et al., 2006].

Σχέση φλεγμονής με μεταλλοένζυμα

Στην διαδικασία της φλεγμονής εμπλέκονται διάφορα μεταλλοένζυμα όπως : η λιποξυγονάση(LOX), η κυκλοξυγονάση(COX), η συνθετάση του NO(NOS), η ξανθινοξειδάση, οι ματριξίνες-μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPS) κ.ά..

Η COX και οι iNOS είναι ένζυμα με ιόντα σιδήρου τύπου αίμης. Οι LOX είναι ενζυμα με ιόντα σιδήρου μη τύπου αίμης, και οι MMPs είναι μεταλλοένζυμα εξαρτώμενα από ψευδάργυρο(Zn) [Rouffet et al 2011].

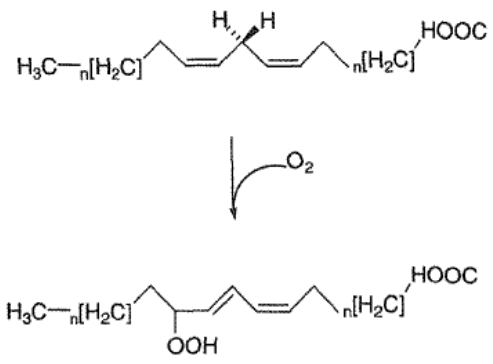
Στο επόμενο σχήμα (Σχήμα) δίνεται η πορεία και τα προϊόντα από την δράση της λιποξυγονάσης και της κυκλοξυγονάσης.



Εικόνα 1. Μεταβολικά μονοπάτια αραχιδονικού οξέος[Serhan et al, 2010]

4. Λιποξυγονάση

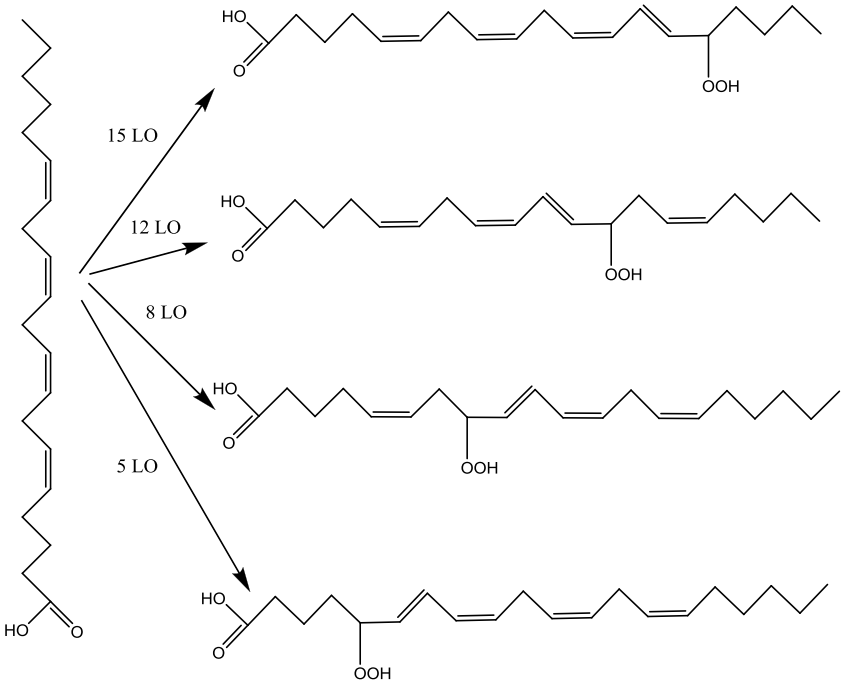
Οι λιποξυγονάσες (LOX) είναι μονομοριακές αιμοπρωτεΐνες ευρέως διαδεδομένες στη φύση. Οι λιποξυγονάσες αποτελούνται από μία απλή πολυπεπτιδική αλυσίδα , μοριακής μάζας 75-80 kDa στα θηλαστικά και 94-104 kDa στα φυτά. Στο ενεργό τους κέντρο, που έχει δομή τετραεδρικής διπυραμίδας , οκτάεδρο (εικόνα 4), ένα άτομο σιδήρου (Fe(II)) μη τύπου αίμης συναρμόζεται : α) κυρίως με μόρια ιστιδίνης αλλά και ασπαραγίνης ή σερίνης αναλογα με την ισομορφή του ενζύμου, β) μία καρβοξυλομάδα της ισολευκίνης που βρίσκεται στο C-τελικό άκρο της πολυπεπτιδικής αλυσίδας και γ) ένα μόριο νερού H_2O [Brash, 1999]. Καταλύουν την υδροϋπεροξείδωση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων προσθέτωντας μοριακό οξυγόνο σε λιπαρά οξέα με δύο cis διπλούς δεσμούς μεταξύ των οποίων παρεμβάλεται μια μεθυλενική ($-CH_2$) ομάδα και ανάλογα με την θέση εισαγωγής της υδροϋπεροξυομάδας στο



Εικόνα 2. Μηχανισμός δράσης LOX [Bertini, 2001]

αραχιδονικό οξύ, διακρίνονται σε 5-λιποξυγονάση (5-LOX), 8-λιποξυγονάση(8-LOX),12-λιποξυγονάση (12-LOX) και 15-λιποξυγονάση (15-LOX). Έτσι προκύπτουν τα αντίστοιχα υδροϋπερόξυεικοσιτετρανοϊκα οξέα (HPETEs): 5-HPETE, 8-HPETE, 12-HPETE και 15-HPETE. [Ivano Bertini et al., 2001]

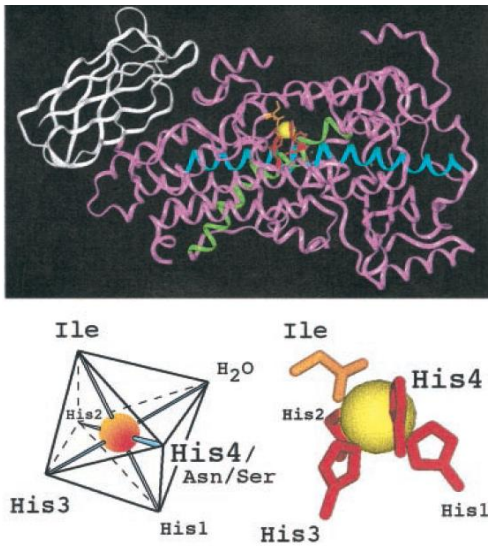
Οι λιποξυγονάσες καταλύουν μια οδό οξείδωσης του αραχιδονικού οξέος που βρίσκεται εστεροποιημένο στην κυτταρική μεμβράνη. Το αραχιδονικό οξύ απελευθερώνεται από την κυτταρική μεμβράνη είτε κατόπιν δράσης της φωσφολιπάσης A_2 (PLA_2) αποκλειστικά, ή μαζί με τη φωσφολιπάση D, είτε από τη συνδυασμένη δράση της φωσφολιπάσης C και της κινάσης της διακυλογλυκερόλης. Στα λευκοκύτταρα, κυτοκίνες συμπεριλαμβανομένων της ιντερλευκίνης IL-1 και του παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNF) μπορούν να ενεργοποιήσουν τη φωσφολιπάση A_2 (PLA_2). Αφού απελευθερωθεί το αραχιδονικό οξύ μπορεί να μεταβολιστεί προς HETEs από τη δράση των λιποξυγονασών ή να μεταβολιστεί προς λευκοτριένια ή λιποξίνες, παράγοντας έτσι δευτερογενείς αντιδράσεις. [Steele et al., 1999].



Εικόνα 3 Μεταβολισμός αραχιδονικού οξέος από τις τέσσερις ισομορφές LOX

Συγκεκριμένα, το ένζυμο 5-LOX μετατρέπει το αραχιδονικό οξύ σε 5-S-HETE (υδροξυεικοσατετρανοϊκό οξύ) και μετά σε λευκοτριένια (LTA_4, LTB_4) . Στη διαδικασία αυτή λαμβάνει μέρος η πρωτεΐνη FLAP (5-Lipoxygenase-activating protein). Η FLAP είναι μία μοναδική πρωτεΐνη μεταφοράς του αραχιδονικού οξέος που το προωθεί στην 5-LOX που βρίσκεται στην

πυρηνική μεμβράνη του άθικτου λευκοκυττάρου και ενεργοποιήται για να δράσει [Ruffet et al, 2011] .



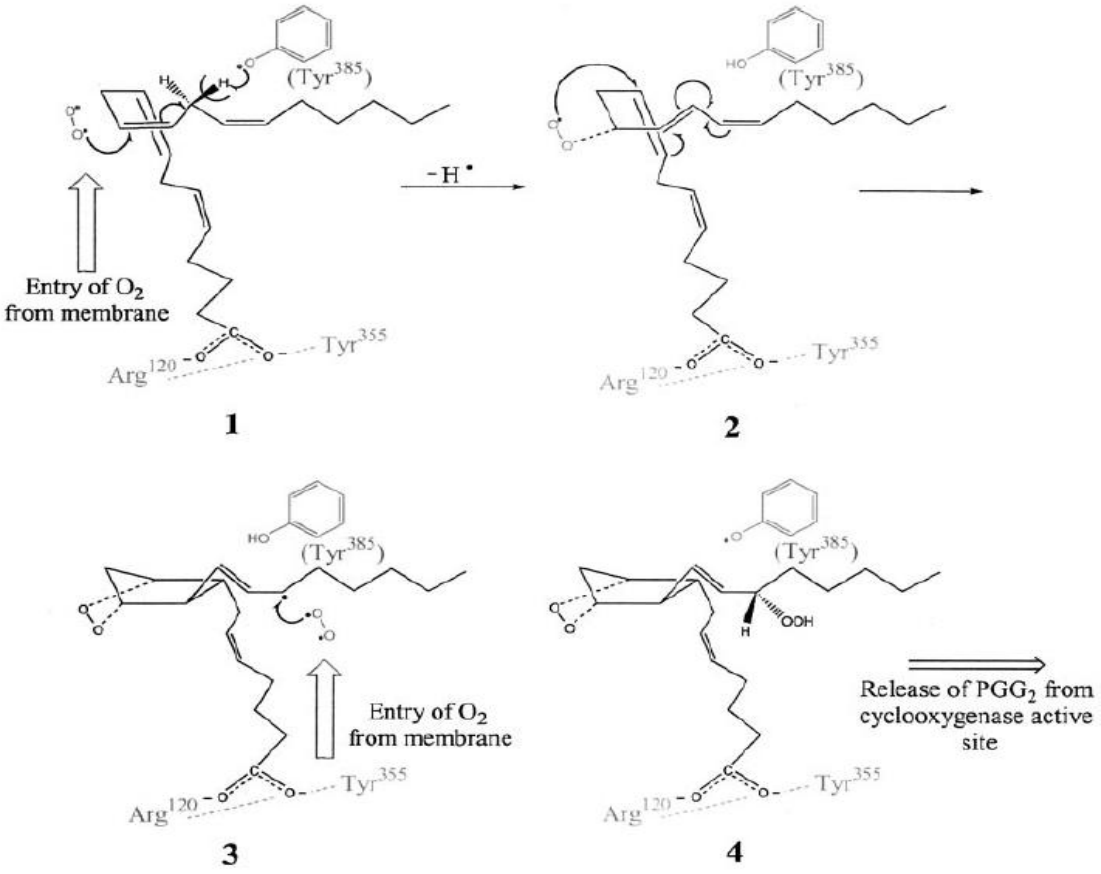
Εικόνα 4. Δομή λιποξυγονάσης[Brash,1999]

.5. Κυκλοξυγονάση (COX)

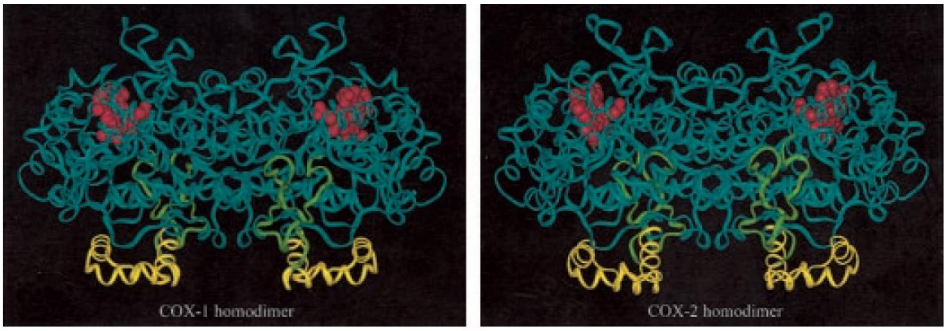
Οι κυκλοξυγονάσες είναι μεταλλοένζυμα που περιέχουν σίδηρο (Fe) τύπου αίμης και εντοπίζονται στην εσωτερική επιφάνεια του πυρηνικού φακέλου και στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Αποτελούνται από δύο μονομερή που εμφανίζουν τις εξής τέσσερις διακριτές δομικές μονάδες : α)μία N-τελική πεπτιδική περιοχή που κατευθύνει τις νεοσυντιθέμενες COX-1 και COX-2 στο ενδοπλασματικό δίκτυο, β) μία περιοχή που ενώνει τα δύο μονομερή του ενζύμου και που προσομοιάζει με τον παράγοντα αύξησης της επιδερμίδας (EGF) , γ)μία περιοχή πρόσδεσης της α-ελικάσης που «αγκυροβολεί» την πρωτεΐνη στην μία πλευρά της λιπιδικής διπλοστοιβάδας και που σχηματίζει ένα υδρόφοβο κανάλι που οδηγεί στο καταλυτικό κέντρο και τέλος δ) μία ευρεία καταλυτική C-τελική περιοχή με το ενεργό κομμάτι της κυκλοξυγονάσης που φιλοξενεί το υπόστρωμα ή τους αναστολείς και με το κομμάτι της υπεροξειδάσης. [Simmons et al., 2004].

Η κυκλοοξυγονάση εισάγει ένα μόριο O_2 στις θέσεις C-11 και C-15 του αραχιδονικού οξέος και σχηματίζεται PGG2. Η περιοχή της υπεροξειδάσης ανάγει το υπεροξείδιο PGG2 στο υδροξειδικό παράγωγο PGH2, που είναι το

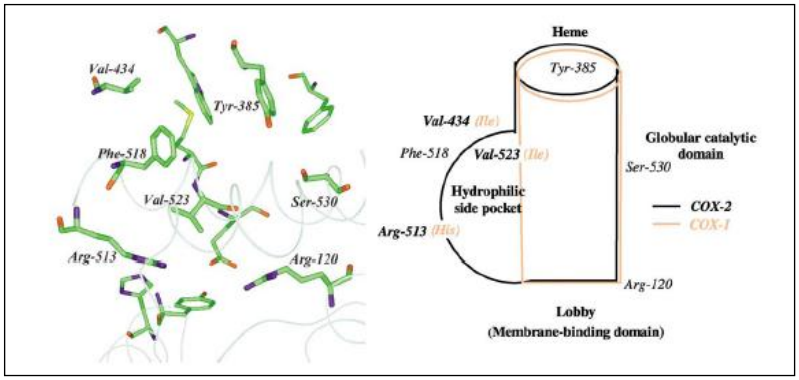
υπόστρωμα για τις διάφορες συνθετάσες των προσταγλανδινών.Οι προσταγλανδίνες (PG) είναι βιοδραστικά μόρια μεταφοράς σήματος που προκύπτουν από την δράση της κυκλοξυγονάσης (COX) και της συνθετάσης των προσταγλανδινών στο μόριο του αραχιδονικού οξέος. Στην κυκλοοξυγονάση διακρίνουμε δύο διακριτές ενεργές περιοχές: αυτή της κυκλοοξυγονάσης και αυτή της υπεροξειδάσης. Και οι δύο εκδηλώνουν την καταλυτική τους δράση χρησιμοποιώντας την ίδια ρίζα τυροσίνης και τον σίδηρο της αίμης . [Buczynski, 2008]



Εικόνα 5. Μηχανισμός δράσης κυκλοοξυγονάσης (COX) [Simmons et al, 2004]



Εικόνα 6 : Κρυσταλλογραφικές δομές COX-1 από αιγοπρόβατο(αριστερά) και COX-2 από ποντικό (δεξιά), ομοδιμερή.[Simmons et al., 2004]



Εικόνα 7 : Το ενεργό κέντρο της Cox-2 και η σχηματική απεικόνιση.

.6. Ματριξίνες (MMPs)

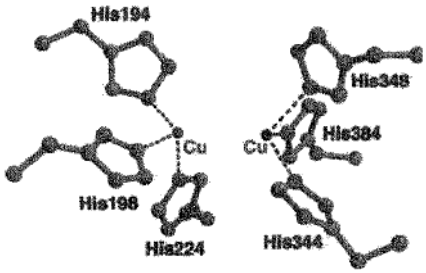
Οι ματριξίνες μεταλλοπρωτεϊνάσες είναι μια οικογένεια υδρολυτικών ενζύμων που καταλύουν την διάσπαση του συνδετικού ιστού. Εξαρτώνται από ιόντα ασβεστίου (Ca) και περιέχουν ιόντα ψευδαργύρου (Zn) στο ενεργό τους κέντρο. [Kontogiorgis et al, 2005] Ενεργές MMPs διευκολύνουν την ανάπτυξη των νεύρων και των οστών, τον ενδομήτριο κύκλο , την επούλωση τραυμάτων και την αγγειογένεση. Ακόμη σχετίζονται με χρόνιες φλεγμονώδεις ασθένειες , καρδιομυοπάθεια και μεταστάσεις καρκίνου. Έτσι η ανάπτυξη φαρμάκων με ανασταλτική δράση επί των ματριξινών (MMPs) θα έχει θεραπευτική δράση σε διάφορες ασθένειες που σχετίζονται με αυτές.

No.	MMP No.	Class	Enzyme
1	MMP-1	Collagenases	Collagenase-1
2	MMP-8		Neutrophil collagenase
3	MMP-13		Collagenase-3
4	MMP-18		Collagenase-4
5	MMP-2	Gelatinases	Gelatinase-A
6	MMP-9		Gelatinases-B
7	MMP-3	Stromelysins	Stromelysin-1
8	MMP-10		Stromelysin-2
9	MMP-11		Stromelysin-3
10	MMP-27		Homology to stromelysin-2 (51.6%)
11	MMP-7	Matrilysins	Matrilysin (PUMP)
12	MMP-26		Matrilysin-2
13	MMP-14	MT-MMP (membrane type)	MT1-MMP
14	MMP-15		MT2-MMP
15	MMP-16		MT3-MMP
16	MMP-17		MT4-MMP
17	MMP-24		MT5-MMP
18	MMP-25		MT6-MMP
19	MMP-12	Other enzymes	Macrophage metalloelastase
20	MMP-19		RASI 1
21	MMP-20		Enamelysin
22	MMP-21		MMP identified on chromosome 1
23	MMP-22		MMP identified on chromosome 1
24	MMP-23		From human ovary cDNA
25	MMP-28		Epilysin
26	MMP-29		Unnamed

Πίνακας 2: Κατηγορίες Ματριξινών-Μεταλλοπρωτεϊνασών[Rajeshwar et al,2007]

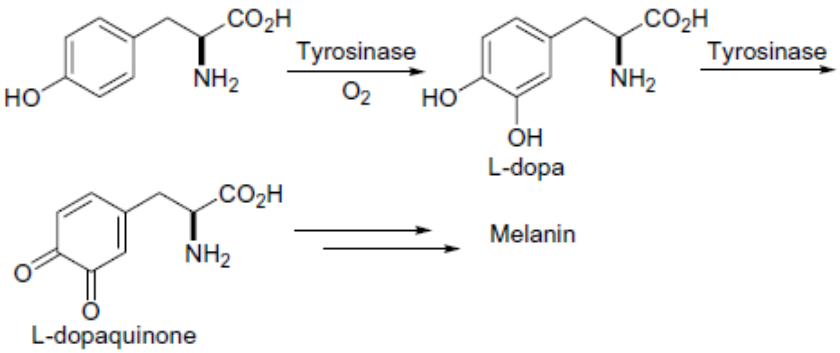
.7.Τυροσινάση

Η τυροσινάση είναι ένα μεταλλοένζυμο που έχει στο ενεργό του κέντρο άτομο χαλκού (Cu) και καταλύει δύο διαφορετικές αντιδράσεις :I) την υδροξυλίωση των μονοφαινολών σε ορθο-διφαινόλες (δράση μονοοξυγόνωσης φαινολών) και II) την οξείδωση των ορθο-διφαινολών ή αλλιώς κατεχολών, σε ορθο-κινόνες (δράση οξείδωσης κατεχολών) . Είναι ένα από τα ένζυμα που εμπλέκεται στην εμφάνιση δερματικών αλλοιώσεων όπως η λεύκη και σχετίζεται με φλεγμονώδεις αποκρίσεις του οργανισμού στο δέρμα και την βιοσύνθεση της μελανίνης. Η ανθρώπινη τυροσινάση που ταυτίζεται σε ποσοστό 81% με την τυροσινάση του βατράχου και του ποντικού , αποτελείται από 548 αμινιξέα με μοριακό βάρος περίπου 61kDa.



Εικόνα 8. Δομή τυροσινάσης [Ivano Bertini et al,2001]

Η τυροσινάση έχει δύο ιόντα χαλκού στο ενεργό της κέντρο που συναρμόζονται με 6 υπόλοιπα ιστιδίνης όπως παρατηρούμε στο διπλανό σχήμα , δομή ανάλογη με την αιμοκυανίνη και την κατεχολική οξειδάση. Περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι σε μερικά είδη τυροσινάσης μία από τις παραπάνω ιστιδίνες τροποποιείται κατά την μετάφραση του πολυπεπτιδίου και σχηματίζει δεσμό με μία κυστεΐνη (His-Cys cross-link). [Bertini et al.]

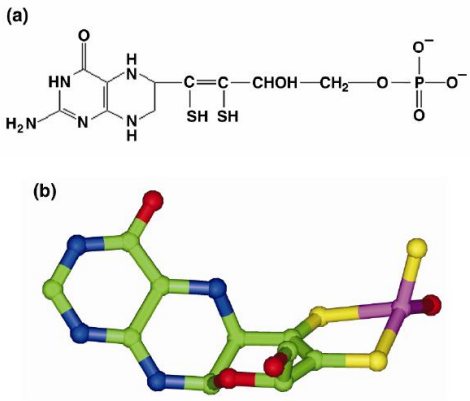


Εικόνα 9 : Αντίδραση οξείδωσης L-DOPA καταλυόμενη από την τυροσινάση[Germanas et al , 2007].

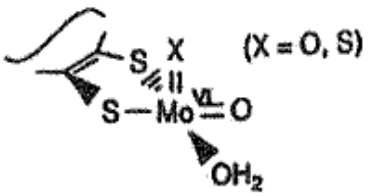
8.Ξανθινοξειδάση

Τα ένζυμα που υπάγονται στην οικογένεια της οξειδάσης της ξανθίνης έχουν στο ενεργό τους κέντρο μολυβδαίνιο (Mo) και καταλύουν αντιδράσεις υδροξυλίωσης του τύπου : $RH + H_2O \rightarrow ROH + 2H^+ + 2e^-$
όπου όταν RH : ξανθίνη τότε ROH: ουρικό οξύ.[Bertini et al., 2001]

Όλα τα ένζυμα με μονοπυρηνικό κέντρο μολυβδαινίου όπως είναι η ξανθινοξειδάση περιέχουν και ένα συμπαράγοντα μολυβδαινίου (molybdenum cofactor , Moco) που είναι μια υποκατεστημένη πτερίνη. Ο συμπαράγοντας αυτός αναφέρεται συχνά ως συμπαράγοντας μολυβδαινίου πτερίνης (molybdenum pterin cofactor , MPT) και παίρνει διαμόρφωση όπως φαίνεται στην εικόνα [Graeme Hanson et al, 2010].



Εικόνα 10. Δομή MPT[Graeme Hanson et al, 2010]



Εικόνα 11. Δομή συμπλόκου Mo στην ξανθινοξειδάση [Bertini et al, 2001]

Το ενεργό κέντρο κατόπιν συναρμογής με τον MPT θα έχει διαμόρφωση τύπου fac-$MoOX(H_2O)$, όπου X=O ή S. Η σφαίρα συναρμογής του Μολυβδαινίου επηρεάζει την δραστικότητα του ενεργού κέντρου , ενώ το κανάλι που σχηματίζεται στο εξωτερικό του ενζύμου και οδηγεί προς το ενεργό κέντρο , καθώς και η θέση σύνδεσης του υποστρώματος είναι σημαντικοί παράγοντες ως προς την εκλεκτικότητα του ενζύμου [Bertini et al., 2001].

Η ουρική αρθρίτιδα είναι μεταβολική διαταραχή που χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα ουρικού οξέος στο αίμα . Ως αποτέλεσμα εναποτίθενται κρύσταλλοι ουρικού νατρίου στους ιστούς ειδικά των νεφρών και των

αρθρώσεων, γεγονός που σημαίνει την έναρξη μιας φλεγμονώδους διεργασίας , που περιλαμβάνει διήθηση από κοκκιοκύτταρα τα οποία φαγοκυτταρώνουν τους κρυστάλλους του ουρικού νατρίου. Αυτή η διεργασία παράγει μεταβολίτες οξυγόνου (ρίζες υπεροξειδικού ανιόντος) , οι οποίοι καταστρέφουν τους ιστούς , με αποτέλεσμα την απελευθέρωση λυσοσωμικών ενζύμων τα οποία παράγουν φλεγμονώδη αντίδραση.

Οι περισσότερες θεραπευτικές στρατηγικές για την ουρική αρθρίτιδα περιλαμβάνουν την ελάττωση του επιπέδου του ουρικού οξέος κάτω από το επίπεδο κορεσμού , εμποδίζοντας έτσι την εναπόθεση κρυστάλλων ουρικού οξέος. Ένας τρόπος για να επιτευχθεί το παραπάνω είναι η αναστολή της ξανθινοξειδάσης, που καταλύει την δημιουργία του ουρικού οξέος. Χαρακτηριστικός αναστολέας αυτού του τύπου είναι η αλλοπουρινόλη. Η αλλοπουρινόλη συναγωνίζεται με την υποξανθίνη και την ξανθίνη ως προς την σύνδεσή τους με την οξειδάση της ξανθίνης, οπότε έτσι αναστέλλεται συναγωνιστικά η βιοσύνθεση του ουρικού οξέος [Mycek et al. 2000].

9. Ελεύθερες ρίζες

Ως ελεύθερη ρίζα ορίζεται κάθε αυθύπαρκτο χημικό είδος , το οποίο περιέχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Οι ελεύθερες ρίζες είναι παραμαγνητικά και συχνά πολύ δραστικά σώματα.

Μέσα στον οργανισμό επιτελούν διάφορες άμεσες και έμμεσες λειτουργίες:

- Προσβάλλουν πρωτεΐνες, λιπίδια και νουκλεϊνικά οξέα με αποτέλεσμα την άμεση νέκρωση των κυττάρων
- Αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες του πλάσματος και αδρανοποιούν αναστολείς των πρωτεασών

- Αυξάνουν έμμεσα τη διαπερατότητα των τριχοειδών των αγγείων, μετά από έκκριση ισταμίνης, και πρόκληση οιδήματος
- Διεγείρουν έμμεσα την χημειοταξία και επιτείνουν την εμφάνιση των φλεγμονωδών αποκρίσεων.

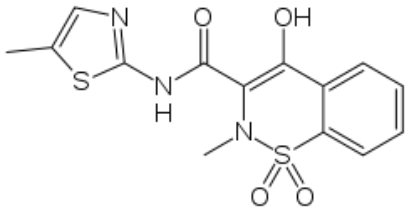
Η ρίζα του ανιόντος υπεροξειδίου μπορεί να δημιουργήσει ακόμη περισσότερο δραστικές ρίζες, όπως η ρίζα υδροξυλίου :

$$O_2^{-\cdot} + Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+} + O_2$$
$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + HO^{\cdot} + HO^{-}$$
$$O_2^{-\cdot} + H_2O_2 \xrightarrow{Fe^{2+}/Fe^{3+}} O_2 + H_2O_2$$

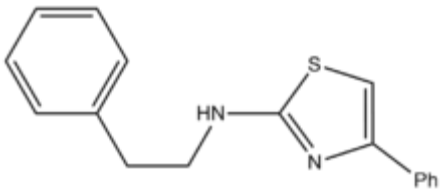
Ορισμένες ενεργές ρίζες οξυγόνου αντιδρούν με τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και προκαλούν οξειδωτική βλάβη στην κυτταρική μεμβράνη. Το οξειδωτικό στρες που εμφανίζεται σχετίζεται με πολλές φυσιολογικές και μη καταστάσεις του οργανισμού όπως : φλεγμονή , καρκίνος, γήρανση των κυττάρων. Ο οργανισμός αμύνεται φυσιολογικά απέναντι στο οξειδωτικό στρες με τη βοήθεια αντιοξειδωτικών χαμηλού μοριακού βάρους, συμπεριλαμβανομένων των τοκοφερολών, της γλουταθειόνης και αντιοξειδωτικών ενζύμων. Εντούτοις, έχει διαπιστωθεί πως οι παραπάνω αμυντικοί μηχανισμοί καταστρέφονται ή διακόπτονται σε παθολογικές καταστάσεις. Υπάρχει αυξημένο ενδιαφέρον εκτός από τα ενδογενή αντιοξειδωτικά μέσα να σχεδιαστούν και συντεθούν ενώσεις με προστατευτικό ρόλο απέναντι στο οξειδωτικό στρες που προξενούν οι ρίζες οξυγόνου, αλλά και οι ελεύθερες ρίζες γενικότερα.

10.1 Θειαζόλιο-Φαρμακολογική δράση

Η πρώτη σύνθεση θειαζολικού δακτυλίου πραγματοποιήθηκε κατά τα τέλη του 19ου αιώνα όταν ασχολούνταν με το αντικείμενο επιστήμονες όπως οι : Hantzsch, Hubacher, Traumann, Miolatti, Tcherniac, και Gabriel. Σύντομα τα θειαζολικά παράγωγα μαζί με τα παράγωγα πυριδίνης κατέκτησαν μία σημαντική θέση στο χώρο της χημείας των ετεροκυκλικών ενώσεων γεγονός που ενισχύθηκε από την παρατήρηση ότι η παρουσία θειαζολικού δακτυλίου σε βιολογικά ενεργά μόρια όπως η βιταμίνη B_1, παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στο ζωικό και φυτικό βασίλειο[Metzger, 1978]. Μέχρι σήμερα ένας μεγάλος αριθμός ενώσεων παραγώγων του θειαζολίου βρέθηκαν να εμφανίζουν βιολογική δράση όπως είναι οι πενικιλλίνες και οι κεφαλοσπορίνες , ενώσεις με αντιφλεγμονώδη δράση όπως η μελοξικάμη (Meloxicam) και η φανετιζόλη (Fanetizole). [Lednicer et al. 1990, Rehman et al 2005] [Hadjipavlou et al. 1996], αντιμυκητιασική [Wilson et al, 2001], αντιβακτηριακή[Kaspady et al, 2009], αντιϊική[Bell et al, 1995], αντικαρκινική[Lu et al, 2009], αντισχιστοσωμιακή και ανθελμινθική[Metzger , 1984], αντιυπερτασική[Patt et al, 1992] και νευροπροστατευτική [Zhang et al] Leone et al].



Μελοξικάμη



Φανετιζόλη

Εικόνα 12. Βιοδραστικές ενώσεις που φέρουν θειαζολικό δακτύλιο

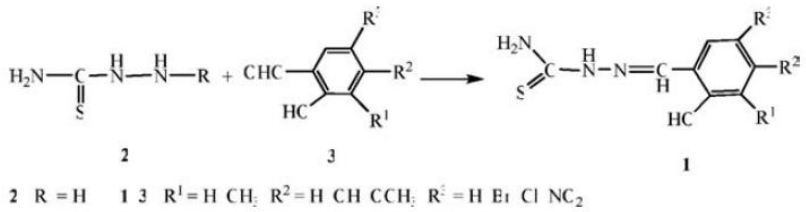
10.2 Βάσεις Schiff

Ο αζωμεθινικός δεσμός (-C=N-) είναι ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των βάσεων Schiff που μπορεί να λειτουργήσει ως ομάδα συναρμοτής (ligand) σε φαρμακευτικές ενώσεις που είναι σύμπλοκα μεταλλικών ιόντων αλλά ακόμη και στο ενεργό κέντρο μεταλλοενζύμων και να παρουσιάσει αντίστοιχη βιολογική δράση [Vallee et al]. Έχει αναφερθεί ότι οι βάσεις Schiff συμμετέχουν ως ενδιάμεσα προϊόντα σε διάφορες ενζυματικές αντιδράσεις που εμπλέκουν την αλληλεπίδραση μιας αμινομάδας ενός ενζύμου, συνήθως υπόλοιπο λυσίνης, με μια καρβονυλομάδα του υποστρώματος, ενώ εμπλέκονται και σε αντιδράσεις μεταφοράς φορτίου[Rauf, 2005].

10.3 Μέθοδοι σύνθεσης των 2,4-διϋποκατεστημένων θειαζολικών παραγώγων βάσεων Sciff

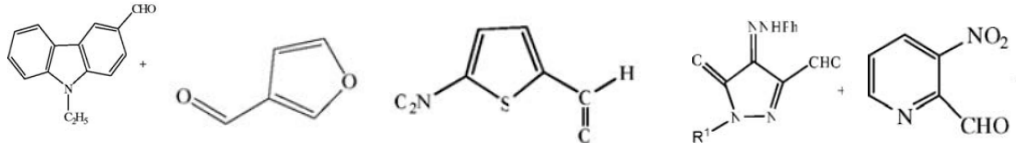
10.3.1. Για τη σύνθεση βάσεων Schiff έχουν αναφερθεί γενικά οι εξής μέθοδοι [Hassan et al 2012] :

i. Θέρμανση κατάλληλα υποκατεστημένων αρωματικών αλδεϋδών με θειοσεμικαρβαζίδιο στους 50-60° C με συνεχή ανάδευση και παρουσία μερικών σταγόνων π-τολουολοσουλφονικού οξέος ως καταλύτη



Εικόνα 13. Σύνθεση θειοσεμικαρβαζονών παρουσία p-τολουολοσουλφονικού οξέος.

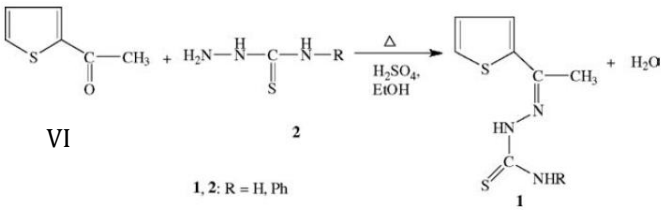
ii. Θέρμανση θειοσεμικαρβαζιδίου με διάφορες ετεροκυκλικές αλδεΰδες όπως : καρβαζολικά παράγωγα (I), φουραλδεΰδη(II), 5-νιτροθειοφαιν-2-καρβοξαλδεΰδη(III), πυραζολοκαρβοξαλδεΰδες(IV), 3-νιτροπικολιναλδεΰδη(V).



(I) (II) (III) (IV) (V)

Εικόνα 14. Διάφορες αλδεΰδες που χρησιμοποιήθηκαν για την σύνθεση θειοσεμικαρβαζονών

iii. Θέρμανση θειοσεμικαρβαζδίου ή παραγώγων του και αρωματικές ή ετεροκυκλικές κετόνες σε διαλύτη αιθανόλη και παρουσία πυκνού θειικού οξέος (H_2SO_4) όπως για παράδειγμα στην παρακάτω αντίδραση με την 1-(2-θειενυλ)αιθανόνη(VI):

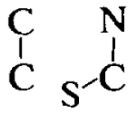


Εικόνα 15. Σύνθεση θειοσεμικαρβαζόνης με πρώτη ύλη ετεροκυκλική κετόνη

10.3.2. Σύνθεση του θειαζολικού δακτυλίου

Η μέθοδος Hantzsch είναι η πρώτη ιστορικά μέθοδος που εφαρμόστηκε για τον σχηματισμό του θειαζολικού δακτυλίου (Ia). Με την χρήση των κατάλληλα υποκατεστημένων αντιδρώντων επιτρέπεται η εφαρμογή 168 Γενικών Συνθετικών Μεθόδων για την σύνθεση θειαζολικών δακτυλίων και αλάτων αυτών, ενώσεων που θα διαθέτουν αλκυλ-, αρυλ-, αραλκυλ-, ή ετεροκυκλικούς υποκαταστάτες σε οποιαδήποτε από τις διαθέσιμες θέσεις 2-, 3-, 4-, ή 5- του πενταμελούς θειαζολικού δακτυλίου[Metzger, 1975]. Η μέθοδος αυτή καθιερώθηκε από τον γερμανό χημικό Hantzsch το 1887 και είναι ουσιαστικά μια αντίδραση συμπύκνωσης μιας ένωσης που φέρει τα δύο ετεροάτομα S και N στο ίδιο άτομο C με μια ένωση που φέρει ένα άτομο αλογόνου και μια καρβονυλομάδα (C=O) σε δύο γειτονικά άτομα άνθρακα (C) . Ένα πλήθος ενώσεων μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πυρηνόφιλοι παράγοντες σε αυτή την αντίδραση όπως είναι: θειοαμίδια, θειουρία, θειοκαρβαμιδικό αμμώνιο ή διθειοκαρβαμίδιο και άλλα παράγωγά τους.

Θεωρείται ως μία κλασική αντίδραση της χημείας του θειαζολίου. Η σπουδαιότητα της φαίνεται καθαρά από την διαχρονική χρήση της καθώς αποδείχθηκε η πιο χρήσιμη και εφαρμόσιμη μέθοδος για την σύνθεση διαφόρων τύπων θειαζολίων.

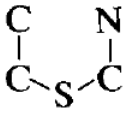


Ia

Hantzsch (1887)

Εικόνα 16. Κλείσιμο θειαζολικού δακτυλίου κατά Hantzsch

Μια παραλλαγή της μεθόδου Hantzsch εισήχθει από τον Tcherniac ο οποίος κυκλοποίησε α-θειοκυανοκετόνες IIb(οι οποίες παρασκευάζονται από α-αλογονοκετόνες κατόπιν επεξεργασίας τους με θειοκυανικό άλας όπως κάλιο). Αυτή η αντίδραση οδηγεί σε 2-υποκατεστημένα θειαζόλια κυρίως, ανάλογα βέβαια και με τις συνθήκες του πειράματος. Παρόλες τις εκτεταμένες μελέτες πάνω σε αυτή την μέθοδο έχει περιορισμένα αποτελέσματα και συχνά αποτυγχάνει.

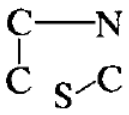


Ib

Tcherniac (1919)

Εικόνα 17. Κλείσιμο θειαζολικού δακτυλίου κατά Tcherniac

Ο θειαζολικός δακτύλιος μπορεί να συντεθεί και με άλλες μεθόδους που έχουν όμως περιορισμένη εφαρμογή. Μια από αυτές είναι η σύνθεση των



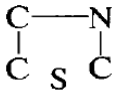
II

Cook and Heilbronn (1947)

Εικόνα 18. Κλείσιμο θειαζολικού δακτυλίου κατά Cook και Heilron

Cook και Heilbron όπου χρησιμοποιούνται α-αμινονιτρίλια ή α-αμινοαμίδια και διθειάνθρακας (CS_2) .

Άλλη γενική μέθοδος σύνθεσης θειαζολίων είναι η επίδραση πεντασουλφίδιου του φωσφόρου σε α-ακυλαμινοκαρβονυλικές ενώσεις.

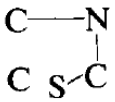


IIIa

Gabriel (1910)

Εικόνα 19. Κλείσιμο θειαζολικού δακτυλίου κατά Gabriel

Στο τελευταίο τύπο σύνθεσης κατά Hartke και Seib, ένα από τα αντιδρώντα θα ενσωματώσει ένα άτομο άνθρακα και θα κλείσει ο θειαζολικός δακτύλιος

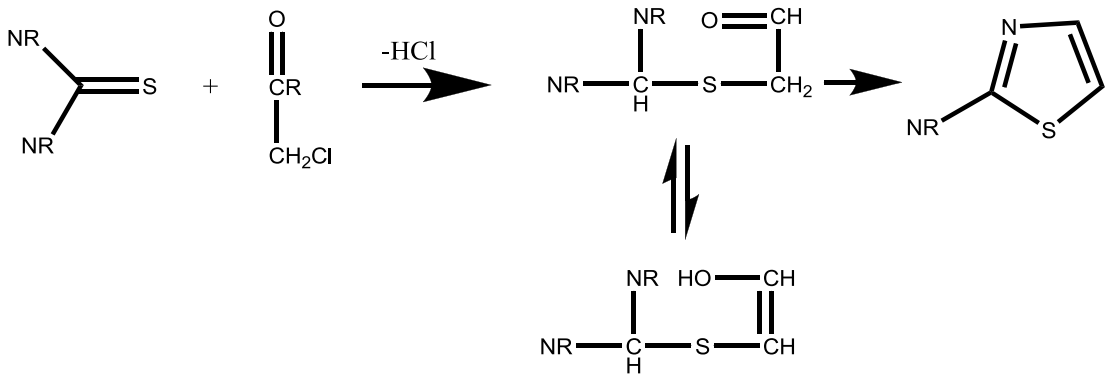


Hartke και Seib (1971)

Εικόνα 20 Κλείσιμο θειαζολικού δακτυλίου κατά Hartke και Seib

10.3.3. Σύνθεση θειαζολικών παραγώγων με αζωμεθινικό υποκαταστάτη

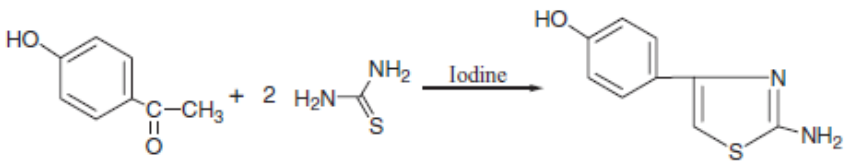
Στις πιο σύγχρονες βιβλιογραφίες το κλείσιμο του δακτυλίου γίνεται με την γενική μέθοδο Hantzsch: συμπύκνωση ενός θειοαμιδικού παραγώγου με ένα α-αλογονοκαρβονυλικό παράγωγο.



Εικόνα 21 . Σύνθεση θειαζολικού δακτυλίου κατά Hantzsch

Η αντίδραση άλλοτε πραγματοποιείται σε διαλύτη αιθανόλη ή μεθανόλη [Holla et al, 2003, Karegoudar et al 2008, Bharti et al, 2010, Ramadan E. Sayed,Alam et al, 2011, Hassan et al, 2012] και άλλοτε γίνεται με την χρήση άλλου διαλύτη, όπως ισοπροπυλική αλκοόλη [2010, Peng-Cheng Lv et al, 2009, Chimenti et al , 2010] .

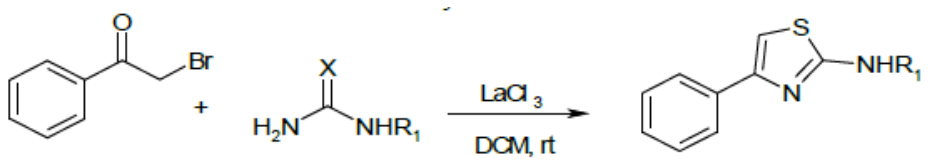
Σύμφωνα με άλλες βιβλιογραφίες πρώτα συντίθεται ο θειαζολικός δακτύλιος και έπειτα ο αζωμεθινικός δεσμός. Αναφέρεται η αντίδραση 4-υδροξυακετοφαινόνης με θειουρία παρουσία ιωδίου[Taile et al. 2010] που δίνει 2-αμινοθειαζόλικό παράγωγο όπως φαίνεται παρακάτω:



Εικόνα 22. Σύνθεση 2-αμινοθειαζολίου παρουσία I_2

Έχει αναφερθεί σύνθεση 2,4-υποκατεστημένου 2-αμινοθειαζολίου με πρώτες ύλες φαινακυλοβρωμίδιο και παράγωγα θειουρίας , παρουσία

τριχλωριούχου λανθανίου ($LaCl_3$) , μέσα σε διαλύτη διχλωρομεθάνιο(CH_2Cl_2) και σε θερμοκρασία δωματίου [Ramesh et al, 2012].

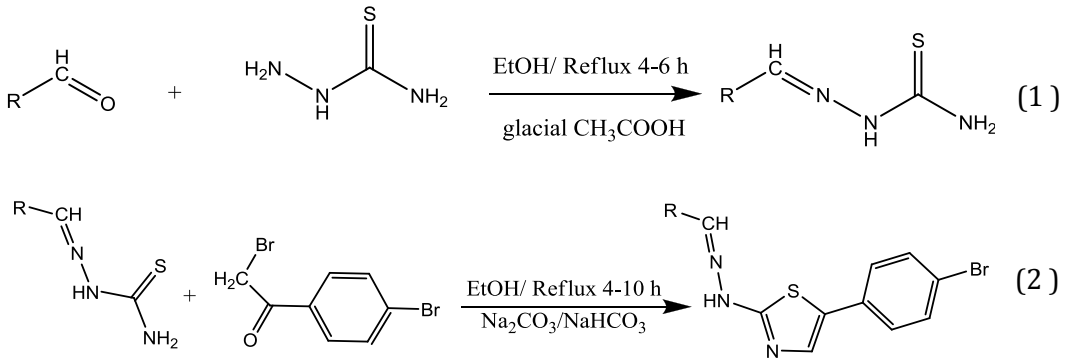


Όπου X:S

Εικόνα 23. Σύνθεση 2,4 υποκατεστημένου αμινο-θειαζολίου[Ramesh et al 2012]

Στη συνέχεια έχοντας ως πρώτη ύλη 2-αμινοθειαζόλιο και επιδρώντας με μία κατάλληλα υποκατεστημένη αλδεΰδη προκύπτουν ενώσεις που συνδυάζουν τα δύο φαρμακοφόρα : θειαζολικό δακτύλιο και βάση Schiff [Geronikaki et al, 2003, Metwally et al, 2010, Taile et al , 2010].

Στην βιβλιογραφία [Bharti et al , 2010] αναφέρεται η σύνθεση βάσεων Schiff των θειοσεμικαρβαζονών από τις οποίες σε δεύτερο στάδιο λαμβάνονται σύμφωνα με την μέθοδο του Hantzsch, τα τελικά 2,4-υποκατεστημένα θειαζολικά παράγωγα.

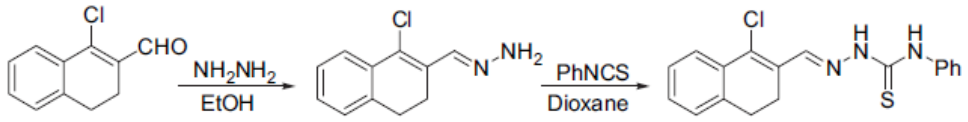


Εικόνα 24. Αντιδράσεις σύνθεσης 2,4-υποκατεστημένων θειαζολίων [S.K. Bharti et al, 2010]

Σύμφωνα με την αντίδραση (1) συντίθεται η βάση Schiff της θειοσεμικαρβαζόνης σαν πρώτη ύλη.

Στο πρώτο στάδιο της συνθετικής πορείας αναφέρεται και μεθανόλη ως διαλύτης- , με την παρουσία παγόμορφου οξικού οξέος ως καταλύτη και θέρμανση. Η αντίδραση (1) σε διαλύτη αιθανόλη και με πρώτη ύλη 1-χλωρο-3,4-διϋδροναφθαλινο-2-καρβοξαλδεΰδη, αναφέρεται και χωρίς την χρήση

καταλύτη [Bondock et al, 2007]. Επίσης προτείνεται η παρακάτω μέθοδος με επίδραση στην αρχή με υδραζίνη (NH_2NH_2) σε αιθανόλη και έπειτα με ισοθειοκυανικό φαινύλιο(PhNCS) σε διοξάνιο:



Εικόνα 25. Μέθοδος σύνθεσης θειοσεμικαρβαζόνης σε δύο στάδια [S. Bondock et al, 2007]

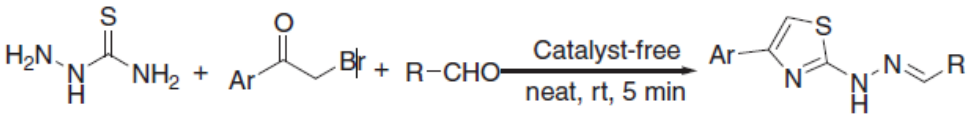
Σε παραλλαγές της αντίδρασης (1) σύμφωνα με την βιβλιογραφία, χρησιμοποιούνται πυκνό θειικό οξύ (H_2SO_4) ως καταλύτης [Holla et al 2002, Karegoudar et al 2008] ενώ σύμφωνα με άλλες πηγές [Alam et al, 2011] η αντίδραση (1) πραγματοποιείται σε διαλύτη μίγμα αιθανόλης –νερού (EtOH-H_2O) και χωρίς την χρήση περαιτέρω καταλύτη. Ακόμη έχει αναφερθεί η σύνθεση αναλόγων θειοσεμικαρβαζόνων με απευθείας αντίδραση καρβονυλικών ενώσεων με θειοσεμικαρβαζίδιο, με καταλύτη οξικό οξύ σε διαλύτη ισοπροπυλική αλκοόλη (2-προπανόλη) [Peng-Cheng Lv et al, 2009, Chimenti et al , 2010] .

Αξίζει να αναφερθεί ότι έχουν γίνει αξιόλογες προσπάθειες στο πεδίο της Πράσινης Χημείας, προκειμένου να βρεθεί συνθετική μέθοδος που θα είναι πιο φιλική προς το περιβάλλον. Τα χαρακτηριστικά τέτοιων μεθόδων είναι τα εξής:

- Απλές πειραματικές διαδικασίες
- Μικρός χρόνος αντίδρασης
- Αντιδράσεις χωρίς χρήση καταλυτών και οργανικών διαλυτών
- Χαμηλό κόστος
- Ικανοποιητικές αποδόσεις και
- Ήπιες συνθήκες αντίδρασης.

Ενδεικτικά αναφέρεται μία τέτοια πράσινη μέθοδος με εφαρμογή στην σύνθεση 2,4-υποκατεστημένων θειαζολικών παραγώγων που περιέχουν στο μόριό τους και την αζωμεθινική ομάδα των βάσεων Schiff [Quansheng et al,

2010]. Στην μέθοδο αυτή χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλα υποκατεστημένες αρωματικές αλδεΰδες, θειοσεμικαρβαζίδιο και υποκατεστημένο φαινακυλο βρωμίδιο ως πρώτες ύλες , ενώ ως συνθήκες της αντίδρασης αναφέρεται λειοτρίβηση σε γουδί για πέντα λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και χωρίς την χρήση καταλύτη ή διαλύτη.



Εικόνα 26. Πράσινη μέθοδος σύνθεσης 2,4-υποκατεστημένων θειαζολίων.

Τα αποτελέσματα της παραπάνω μεθόδου είναι αρκετά ικανοποιητικά αφορούν όμως την χρήση των συγκεκριμένων πρώτων υλών και των συγκεκριμένων πειραματικών συνθηκών που επιτρέπουν οι πρώτες ύλες.

Βιβλιογραφίες

1. Alam Mohammad S., L. Liu, Yong-Eok Lee, D.-U. Lee, *Chem. Pharm. Bull.* ,2011, Vol 59(5), 568-573.
2. Araico A.; Terencio M. C.; Alcaraz M. J.; Dominguez J. N.; Leon C.; Ferrandiz M. L. *Life Sciences,* 2006, 78, 2911-2918
3. Bell F. W. ,Cantrell A. S., M. Hoegberg et al., *Journal of Medicinal Chemistry*, 1995, vol. 38, no. 25, pp. 4929–4936.
4. Bertini Ivano, Astrid Sigel, Helmut Sigel, *Handbook on Metalloproteins*, 2001 Marcel Dekker, Inc. , New York.
5. Bharti S.K., G. Nath, R. Tilak, S.K. Singh, *European J. Med.Chem.*, 2010, 45, 651-660
6. Bondock S., Khalifa W., Fadda A. A., *European J. of Medicinal Chemistry*, 2007, Vol 42, 948-954.
7. Bourne G.H. , Danielli J.F., *International Review of Cytology*, 1959 Academic Press Inc. (London) Ltd .
8. Brash Alan R., *J. Biol, Chem.*,1999, Vol. 274, No. 34, Issue of August 20, pp. 23679–23682.
9. Buczynski Matthew Wallace, Thesis McD , University of California, San Diego 2008.
10. Charlier C.; Michaux C. *Eur. J. Med. Chem*. 2003, 38, 645-659.
11. Chimenti F., Bizzari B., Bolasco A., Secci D., Chimenti P., Granesse A., Carradori S., D'Ascenzio M., Lilli D., Rivanera D., *Europ. J. Med. Chem.*,2011, 46, pg 378-382.
12. Germanas Juris P., Shugauang Wang, Andrew Miner, Wayne Hao and Joseph M. Ready, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* , 2007 ,Vol 17, 6871-6875.
13. Geronikaki A., Hadjipavlou-Litina D., Amourgianou M., *Il Farmaco* , 2003, Vol 58, 489-495.

14. Graeme Hanson, Lawrence Berliner, *Biological Magnetic Resonance*, 2010,Vol 29, 83-87, 2010.
15. Hadjipavlou-Litina D, Geronikaki A. ,*Arz. Forsch./Drug Res.* 46 (1996) 805-808.
16. Hadjipavlou-Litina D. ,Geronikaki A., E. Sotiropoulou, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol*. 79 (1993) 355-362.
17. Hassan Alaa A., Ahmed M Shawky and Hamdy S. Shehatta, *J. Heterocyclic Chem.*, 2012, 49, 21.
18. Holla B. S., Malini K.V., Rao B.S., Sarojini B.K., Kumari N. S., *Europ. J. Med. Chem., 2003,* Vol 38, 313-318.
19. Junghun Suh, *Accounts of Chemical Research*, 1992, Vol 25, No 7.
20. Karegoudar P., Karthikeyan M.S., Prasad D. J., Mahalinga M.,Holla B. S., Kumari N.S., *European J. Chem.*, 2008, Vol 43, 261-267.
21. Kontogiorgis C.A., Papaioannou P., Hadjipavlou-Litina D., *Current Medicinal Chemistry*, 2005, Vol 12 , No 3, 339-355.
22. Lawrance Geoffrey A., *Introduction to Coordination Chemistry,* 2010 John Wiley & Sons Ltd
23. Lednicer D., L.A. Mitscher, G.I. George, *Organic Chemistry of Drug Synthesis*, 1990, Vol. 4, Wiley, New York, pp. 95–97.
24. Leone S., Mutti C., Kazantsev A., Sturlese M., Moro S., Cattaneo E., Rigamonti D., Contini A., *Bioorg. Med. Chem.*, 2008,16, 5695—5703.
25. Lu Y., Li C. M., Wang Z., Ross C. R., Chen J., Dalton J. T., Li W.,Miller D. D., *J. Med. Chem.*, 2009, 52, 1701—1711.
26. Metwally M.A., Abdel-Latif E., Amer F.A., Kaupp G., *J. Sulfur Chemistry*, 2004, Vol 25, 63-85.
27. Metzger Jacques V., *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 1979, Volume 34, part 1, John Wiley & Sons.
28. Metzger J.V. , *Comprehensive Heterocyclic Chemistry I*, 1984, Vol. 6, Pergamon, New York, NY, p. 328.
29. Mohamed Kaspady, Venugopala Katharigatta Narayanaswamy, Mohana Raju, Gopal Krishna Rao, *Letters in Drug Design & Discovery,* 2009, 6, 21-28.
30. Mycek Mary J., Richard A. Harvey, Pamela C. Champe, *Lipincott's Illustrated Reviews: Pharmacology,* Pennsylvania 2000.
31. Nelson David L., Michael M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, fourth edition, 2005 W.H, Freeman and Company.
32. Patt W.C., Hamilton H. W., Taylor M. D. et al., *Journal of Medicinal Chemistry*, 1992,vol. 35, no. 14, pp. 2562–2572.
33. Peng-Cheng Lv, K.-R. Wang, Y. Yang, W.-J. Mao, J. Chen, J. Xiong, H.-L. Zhu, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* , 2009, 19, 6750-6754.
34. Quansheng Ding, D. Zhu, H. Jin, J. Chen, J. Ding, H. Wu, *Phosphorus, Sulfur, and Silicon*, 2011, Vol 186, pg 220-224.
35. Ramadan El Sayed, *Chin. J. Chem.*, 2010, Vol 28, pg 594-600.
36. Ramesh S. Kumar, Y. Venkateswarlu, P. Leelavathi, *Org. Synthesis and Med. Chem.*, 2012, Vol 1, 1, pg 11-14.
37. Rajeshwar P. Verma and Corwin Hansch, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2007, Vol 15, 2223-2268.
38. Rauf Abdul, Thesis McD , University of Bahauddin Zakariya , Multan(Pakistan), 2005.
39. Rehman M.Z., C.J. Anwar, S. Ahmad, *Bull. Korean Chem. Soc.* 26 (2005), 1771–1775.

40. Rouffet Matthieu and Seth M. Cohen, *The Royal Society of Chemistry, Dalton Trans.*, 2011, 40, 3445-3454.
41. Serhan Charles N., Peter A. Ward, Derek W. Gilroy, *Fundamentals of Inflammation*, Cambridge University Press 2010, New York.
42. Simmons Daniel L., Regina M. Botting, And Timothy Hla, *Pharmacological Reviews*, 2004, Vol 56, No 3, 387-437.
43. Steele V. E.; Holmes C. A.; Hawk E. T.; Kopelovich L.; Lubet R. A.; Crowell J. A.; Sigman C. C.; Kelloff G. *J. Cancer Epidem. Biomark. Prevention* , 1999, 8, 467-483 .
44. Taile V.S., Ingle V.N., Hatzade K. M., *J. Carbohydrate Chem.,* 2010, Vol 29, 207-221.
45. Vallee Bert L. and Robert J. P. Williams, *Biochemistry,* 1967, Vol 59, 498-505.
46. Viccini P. , Geronikaki A., Incerti M., Busonera B., Poni G., Cabras C.A., Paola La Cola, *Bioorg. Chem.,* 2003, Vol 11, pg 4785-4789.
47. Walter L. Kemp, Dennis K. Burns, Travis G. Brown, *The Big Picture Pathology,* 2008 The McGraw-Hill Companies, Inc. United States of America.
48. Wilson K.J., C.R. Illig, N. Subasinghe, J.B. Hoffman, M.J. Rudolph, R. Soll,C.J. Molloy, R. Bone, D. Green, T. Randall, M. Zhang, F.A. Lewandowski, Z. Zhou,C. Sharp, D. Maguire, B. Grasberger, R.L. DesJarlais, J. Spurlino, Bioorg. *Med.Chem. Lett.* 11 (2001) 915–918.
49. Δημόπουλος Β., *Φαρμακευτική Χημεία*, Εκδόσεις Πήγασος, Θεσσαλονίκη 2002.
50. Κεσίσογλου Δ., Ακρίβος Π., *Βιοσυναρμοστική Χημεία*, Τόμος 1, Εκδόσεις ΖΗΤΗ 2006.

II. Αντικείμενο-Σκοπός

Όπως αναφέραμε τα μεταλλοένζυμα αποτελούν μια κατηγορία ενζύμων των οποίων η συνηθέστερη λειτουργία είναι η σύνδεση τους με ένα ειδικό οργανικό μόριο (υπόστρωμα) και η κατάλυση της χημικής μετατροπής του υποστρώματος σε ένα νέο προϊόν. Τα μεταλλοένζυμα εμπλέκονται σε διάφορες παθοφυσιολογικές διαδικασίες όπως η φλεγμονή, ο καρκίνος, η χρώση του δέρματος και των τριχών κ.ά.

Στην διαδικασία της φλεγμονής εμπλέκονται διάφορα μεταλλοένζυμα όπως : η λιποξυγονάση(LOX), η κυκλοξυγονάση(COX), η συνθετάση του NO(NOS) και οι ματριξίνες-μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPS) αλλά και η τυροσινάση, η ξανθινοξειδάση και άλλα ένζυμα.

Λαμβάνοντας υπόψη τα προαναφερθέντα στην εισαγωγή παθοβιοχημικά και παθοφυσιολογικά γεγονότα προσπαθήσαμε να συνθέσουμε πρωτότυπες και πολυλειτουργικές νέες ενώσεις που να εκδηλώνουν δράση κατά της φλεγμονής και των εμπλεκόμενων παραγόντων-μεταλλοενζύμων, πιθανούς αναστολείς της λιποξυγονάσης, της τυροσινάσης, της ξανθινοξειδάσης με αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση. Στον ανθρώπινο οργανισμό η χρώση του δέρματος μέσω της παραγόμενης μελανίνης με την ενζυμική δράση της τυροσινάσης, αποτελεί τον πρώτο μηχανισμό αντιμετώπισης των διαφόρων μελανωμάτων-καρκίνων του δέρματος. Ταυτόχρονα όμως η υπερδραστηριότητα του ενζύμου οδηγεί σε υπερπαραγωγή της μελανίνης με εκδήλωση δυσχρωμιών στην επιδερμίδα.

Ως βασικό δομικό λίθο επιλέξαμε τον θειαζολικό δακτύλιο Η επιλογή του ως βασικού δομικού σκελετού των ενώσεων που σχεδιάστηκαν, βασίστηκε:

- στις πλούσιες βιβλιογραφικές αναφορές,
- στην ενδιαφέρουσα βιολογική του δράση σε μόρια όπως βιταμίνη B_1, διάφορες κεφαλοσπορίνες, η μελοξικάμη

- και στα αποτελέσματα μας από την QSAR ανάλυση θειαζολικών παραγώγων με αντιφλεγμονώδη δράση.

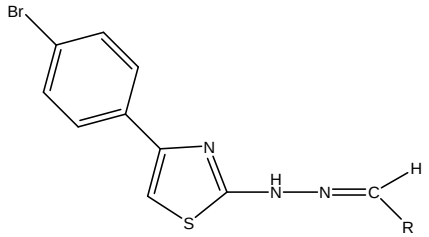
Επίσης συνδυάσαμε την ταυτόχρονη παρουσία μιας αζωμεθινικής ομάδας επειδή ο ρόλος της ως ομάδας συναρμοτή (ligand) σε φαρμακευτικές ενώσεις που είναι σύμπλοκα μεταλλικών ιόντων αλλά ακόμη και στο ενεργό κέντρο μεταλλοενζύμων με αντίστοιχη βιολογική δράση [Bert L. Vallee et al, 1967], είναι διακριτός.

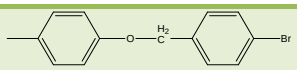
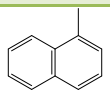
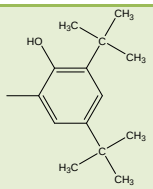
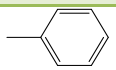
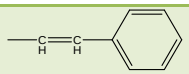
Η παρούσα εργασία έχει ως στόχο να μελετήσει τη σύνθεση και τις βιολογικές ιδιότητες 2,4-διϋποκατεστημένων θειαζολικών παραγώγων σε *in vivo* πειράματα που σχετίζονται με τη φλεγμονή αλλά και σε *in vitro* δοκιμασίες που σχετίζονται με την α) ανασταλτική δράση επί μεταλλοενζύμων που εμπλέκονται στην φλεγμονή και β) αντιοξειδωτική δράση που εμπλέκεται άμεσα ή έμμεσα στο φαινόμενο της φλεγμονής.

Μελετάται ο πιθανός μηχανισμός δράσης και ο ρόλος των επιμέρους δομικών στοιχείων για την βιολογική δράση.

Γίνεται προσπάθεια να αξιοποιηθούν τα δημοσιευμένα βιολογικά αποτελέσματα θειαζολικών παραγώγων που περιέχουν αζωμεθινική ομάδα,για την εξαγωγή ποσοτικών σχέσεων δομής-δράσης. Τα αποτελέσματα αυτά λήφθηκαν καταρχήν υπόψη στο σχεδιασμό και τη σύνθεση των νέων παραγώγων.

Πίνακας 2. Δομές , θεωρητικά βιολογικά δεδομένα (με βάση τα προκύπτοντα μοντέλα) και φυσικοχημικές παράμετροι ενώσεων που θα συντεθούν .



No	Όνομα	R	Υπολ. Log% αναστολής CPE	CMR
1	Crosk 1		1.62	13.32
2	Crosk 3		1.37	11.10
3	Crosk 5		1.61	13.28
4	Crosk 7		1.18	9.41
5	Crosk 8		1.32	10.70

Για τη σύνθεση των νέων ενώσεων, εφαρμόστηκαν γνωστές αλλά και τροποποιημένες αντιδράσεις και τεχνικές και καταβλήθηκε προσπάθεια να βρεθούν μέθοδοι απλές στην εφαρμογή αλλά και αποτελεσματικές στην απόδοση. Για την ταυτοποίηση των δομών, χρησιμοποιήθηκαν μέθοδοι ενόργανης ανάλυσης, φασματοσκοπία IR, ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, MS, στοιχειακή ανάλυση και χρωματογραφικές μέθοδοι.

Οι ενώσεις που συντέθηκαν φαίνονται στον Πίνακα 2 και δοκιμάστηκαν στις παρακάτω φαρμακοχημικές δοκιμασίες:

Φαρμακοχημικές δοκιμασίες *in vitro*:

VII. Αλληλεπίδραση των ενώσεων με την ελεύθερη σταθερή ρίζα του 1,1-διφαινυλο-πικρυλυδραζυλίου (DPPH)

VIII. Αναστολή της υπεροξείδωσης του λινελαϊκού οξέος

IX. Αναστολή του ενζύμου λιποξυγονάση φυτικής προέλευσης (από σόγια)

X. Αναστολή του ενζύμου τυροσινάση μανιταριού.

XI. Αναστολή της οξειδάσης της ξανθίνης.

XII. Αλληλεπίδραση των ενώσεων με $FeCl_3$ για την διερεύνηση πιθανότητας σχηματισμού συμπλόκου με τον τρισθενή σίδηρο.

Βιολογικά πειράματα *in vivo*

II. Αναστολή της εμφάνισης του οιδήματος του άκρου ποδός επίμυα που προκαλείται από την ενδοδερμική χορήγηση της καρραγενίνης.

Επίσης, λόγω της σημασίας της λιποφιλικότητας για την απορρόφηση, την κατανομή, τον μεταβολισμό και την απομάκρυνση από τον οργανισμό των ξενοβιοτικών προσδιορίζεται θεωρητικά με την βοήθεια διαφόρων υπολογιστικών πακέτων.

Τέλος, συσχετίζονται οι βιολογικές δράσεις που προσδιορίσαμε, με επιλεγμένες φυσικοχημικές ιδιότητες με σκοπό τη συγκριτική τους μελέτη. Οι τιμές των φυσικοχημικών ιδιοτήτων λήφθηκαν από τη βιβλιογραφία ή υπολογίσθηκαν με το πρόγραμμα C-QSAR. Μελετώνται οι δομικές σχέσεις που διέπουν τις βιολογικές δράσεις των νέων ενώσεων που συνθέσαμε και καταβάλλεται προσπάθεια διερεύνησης του μηχανισμού δράσης τους, ώστε να εξαχθούν χρήσιμα συμπεράσματα για τις αναγκαίες δομικές τροποποιήσεις για τη σύνθεση νέων μορίων.

III. 'Οργανα- Αντιδραστήρια

3.1 'Οργανα

- Τα σημεία τήξης των ενώσεων προσδιορίστηκαν με συσκευή Mell Temp II, Laboratory Devices USA. Τα σημεία τήξεως δίνονται μη διορθωμένα.
- Τα φάσματα υπερύθρου (IR) καταγράφηκαν σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης FTIR-8101M Infrared Spectrophotometer SHIMADZU.
- Τα φάσματα υπεριώδους (UV) λαμβάνονται με φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης Perkin-Elmer UV-Vis Lambda 20 , Hitachi U-2001 και SHIMADZU UV-1700 , χρησιμοποιώντας, κυψελίδα χαλαζία πάχους 1 cm.
- Τα φάσματα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR καταγράφηκαν με την βοήθεια φασματομέτρου Bruker AM-300 στα 300 και 75 MHz. Οι τιμές της χημικής μετατόπισης καταγράφηκαν σε μέρη ανά εκατομμύριο (δ), χρησιμοποιώντας τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS) σαν εσωτερικό πρότυπο (δ_{TMS}=0).
- Τα φάσματα μάζας καταγράφηκαν με τη βοήθεια φασματοφωτόμετρου MS(ESI) 2010 EV Shimadzu.
- Οι στοιχειακές αναλύσεις έγιναν με αυτόματο αναλυτή τύπου Perkin - Elmer 240B.
- Για την χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας χρησιμοποιήθηκαν πλάκες silica gel Merck 5554 F_{254}. Για την εμφάνιση των ουσιών χρησιμοποιήθηκε λάμπα UV ή θάλαμος ατμών I_2.
- Για την προπαρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας χρησιμοποιήθηκαν πλάκες PLC silica gel 60 Merck F_{254} KGaA.
- Για τη χρωματογραφία στήλης ως προσροφητικό χρησιμοποιείται Kieselgel 60 (Korngrobe 0,063-0,200 mm και 70-230 mesh ASTM). Για την εμφάνιση των ουσιών χρησιμοποιήθηκε λάμπα UV ή θάλαμος ατμών I_2.

3.2 Αντιδραστήρια

I. Χημικά Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν, προέρχονταν από εμπορικές πηγές και ήταν της μεγίστης καθαρότητας.

II. Αντιδραστήρια για βιολογικές δοκιμασίες

- Λιποξυγονάση φυτικής προέλευσης (σόγια) [Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA]
- Καρραγενίνη K-100 εμπορίου
- 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), Nordihydroguaretic acid (NDGA), 2,2΄-Azobis-2-methyl-propanimidamide (AAPH), 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-carboxylic acid (Trolox) [Aldrich Chemical Co. Milwaukee, WI, USA]
- Άλας λινελαϊκού οξέος με νάτριο, Ινδομεθακίνη, L-DOPA, Ξανθίνη, τυροσινάση μανιταριού, ξανθινοξειδάση, Koic acid(CA), Caffeic acid, NBT Sigma Chemical Co. [St. Louis, MO, USA]

<u>Πειραματόζωα</u>

Τα πειραματόζωα που χρησιμοποιούνται είναι επίμυες, της αιμομικτικής σειράς Fischer–344, τους οποίους διατηρούμε σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας (20 ± 2 ^{o}C), με τεχνητή φωτοπεριοδικότητα 12 ωρών. Οι επίμυες ζουν μέσα σε κλωβούς από plexiglass σε ομάδες των 6-8 ζώων. Έχουν ελεύθερη πρόσβαση σε τυποποιημένη ειδική τροφή για επίμυες (ζωοτροφή Rat Feed Extra και ΕΛΒΙΖ 40Κ, μίγμα για αιγοπρόβατα γαλακτοπαραγωγής) και σε νερό του δικτύου ύδρευσης.

Υπολογιστικά Προγράμματα

* Χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Clog *P* της Biobyte Corp. Για τον υπολογισμό της λιποφιλικότητας και το πρόγραμμα C-QSAR για την εξαγωγή ποσοτικών σχέσεων δομής δράσης.
* Χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Spartan v.5.1.3 για τον υπολογισμό διαφόρων φυσικοχημικών παραμέτρων.

4. Υπολογιστική Φαρμακοχημεία

4.1 Ποσοτικές σχέσεις δομής-δράσης , Quantitative structure activity relationships(QSAR)

ΑΡΧΗ - ΜΕΘΟΔΟΣ

Η μελέτη των σχέσεων δομής-δράσης των στοιχείων καθιερώνεται από την εποχή που ο Μεντελέγιεφ συγκροτούσε τον Περιοδικό Πίνακα, ενώ συνεχίζει να αναπτύσσεται μέχρι και σήμερα χάρη στην ολοένα αυξανόμενη χρήση των ηλεκτρονικών υπολογιστών και την εξέλιξη της κβαντοχημείας. Ως προς τις ποσοτικές εκφράσεις τέτοιων σχέσεων , ο Hansch υπήρξε πρωτοπόρος στην προσπάθεια να αποδώσει τη σημασία της λιποφιλικότητας των μορίων για την βιολογική τους δράση, καθώς επίσης ήταν κι ο πρώτος που εισήγαγε την έννοια του QSAR.

Η αρχή που διακατέχει το QSAR είναι ότι οι διαφορές στις δομικές ιδιότητες των μορίων, οι οποίες μπορούν να υπολογιστούν πειραματικά, βρίσκονται σε αντιστοιχία με τις διαφορές τους σε βιολογικό ή χημικό επίπεδο και άρα υπάρχει μία σχέση που τις συνδέει. Στην πράξη λοιπόν, η μέθοδος αναγνωρίζει και περιγράφει σημαντικά δομικά χαρακτηριστικά των χημικών ενώσεων, τα οποία μπορούν να διαχωριστούν και να χρησιμοποιηθούν για να ερμηνευτεί η βιολογική ποικιλότητα των ίδιων ενώσεων από τον χρήστη της μεθόδου.

Διερεύνηση των σχέσεων μεταξύ χημικής δομής και δραστικότητας των χημικών ενώσεων (SAR) συντελεί στην κατανόηση της επιθυμητής δράσης και υποβοηθάει στην πρόβλεψη νέων δραστικών χημικών ενώσεων, που βασίζεται πλέον στη γνώση της χημικής δομής. Αυτές οι προβλέψεις επιτυγχάνονται μέσω ποσοτικοποίησης του SAR και έτσι προκύπτουν οι σχέσεις QSAR (Quantitative Structure Activity Relationships). Στόχος της μεθόδου QSAR είναι η άντληση όσο το δυνατόν περισσότερων πληροφοριών από όσο το δυνατόν λιγότερα πειράματα και η εξαγωγή ενός μοντέλου SAR , ούτως ώστε

να κατανοήσουμε των μηχανισμό δράσης των ενώσεων και να προβλέψουμε την σύνθεση ή όχι νέων δραστικών παραγώγων.

Η βιολογική δραστικότητα *(ΒΔ)* είναι όρος που εξαρτάται από ποικίλες μεταβλητές, όπως η λιποφιλικότητα, οι ηλεκτρονιακές αλληλεπιδράσεις και οι στερεοχημικές αλληλεπιδράσεις. Οπότε η εξίσωση QSAR είναι συνάρτηση της γενικής μορφής:

ΒΔ = { Σ (υδροφοβικές) + Σ (στερεοχημικές) + Σ (ηλεκτρονιακές) } αλληλεπιδράσεις

Προκειμένου να καταλήξουμε σε μια QSAR εξίσωση ακολουθούμε τα εξής βήματα:

1. *Προσδιορισμός της ομάδας των μορίων που θα δοκιμαστούν*
2. *Εισαγωγή των δεδομένων της βιολογικής δραστικότητας*
3. *Υπολογισμός φυσικοχημικών παραμέτρων*
4. *Ανάλυση και επεξεργασία δεδομένων*
5. *Εξαγωγή QSAR εξίσωσης*
6. *Εκτίμηση της QSAR εξίσωσης*
7. *Ανάλυση της εξίσωσης*
8. *Πρόβλεψη δραστικότητας*
9. *Μελλοντική χρήση της εξίσωσης QSAR*

Αφού τελειώσει ολόκληρη η συγκεκριμένη QSAR ανάλυση, η εξίσωση, που έχει εξαχθεί για τις χημικές ενώσεις, που επεξεργάστηκαν, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μελλοντικά για άλλες δομές, υπό την προϋπόθεση ότι δρουν επί του ιδίου ενζυμικού συστήματος ή υποδοχέα.

Η μέθοδος βρίσκει συνεχώς ευρύτερη εφαρμογή και εμπλουτίζεται με περισσότερα στοιχεία, χωρίς όμως να παρακάμπτεται το πείραμα. Μια στατιστική επεξεργασία οφείλει να στηρίζεται σε σαφή και επαρκή δεδομένα. Τότε και μόνο η επεξεργασία τους με τους ηλεκτρονικούς υπολογιστές οδηγεί σε ασφαλή και χρήσιμα για τη φαρμακευτική έρευνα αποτελέσματα.

Συστατικά μιας μελέτης QSAR (Hansch και Leo, 1995)

Για μια αξιόπιστη μελέτη QSAR απαιτούνται:

α. Επαναλήψιμες και καλά κατανεμημένες τιμές μιας συγκεκριμένης βιολογικής δράσης.

β. Επιλογή των παραμέτρων (πειραματικών ή και θεωρητικών) για την ακριβή περιγραφή της δομής όλων των ενώσεων.

γ. Στατιστική μέθοδος που επιτρέπει την αξιολόγηση μιας Ποσοτικής Σχέσης, ενός προτύπου QSAR.

δ. Μέθοδος που επιτρέπει τον έλεγχο αξιοπιστίας του μοντέλου QSAR που προέκυψε.

Βιολογική Δράση

Τα βιολογικά δεδομένα εκφράζονται με τη μορφή αρνητικού δεκαδικού λογάριθμου, ώστε τα αριθμητικά δεδομένα να αυξάνουν με την αύξηση της δράσης και να έχουμε καλύτερη κατανομή των δεδομένων. Συχνά χρησιμοποιείται η έκφραση log BR (λογάριθμος βιολογικής απόκρισης) ή log 1/C, όπου C η μοριακή συγκέντρωση της ουσίας που προκαλεί μια συγκεκριμένη βιολογική απόκριση, π.χ. ED_{50}, IC_{50}, LD_{50}, log% [Hansch and Leo, **1995**].

Φυσικοχημικές Ιδιότητες - Παράμετροι

Οι σημαντικότερες φυσικοχημικές ιδιότητες που επηρεάζουν την βιολογική συμπεριφορά των χημικών ενώσεων είναι η λιποφιλία-υδροφοβικότητα, οι ηλεκτρονιακές και οι στερεοχημικές ιδιότητες.

Οι παραπάνω φυσικοχημικές ιδιότητες μπορούν να εκφραστούν ποσοτικά με τις κατάλληλες παραμέτρους:

1. Υδρόφοβες παράμετροι

Σύμφωνα με τον ορισμό κατά IUPAC η λιποφιλικότητα εκφράζει την συγγένεια ενός μορίου ή τμήματος μορίου ως προς ένα λιπόφιλο περιβάλλον.

Η λιποφιλικότητα αποτελεί ιδιότητα καίριας σημασίας για την εμφάνιση βιολογικής δράσης, διότι υπεισέρχεται τόσο στις παθητικές διαδικασίες μεταφοράς του μορίου όσο και στις διαδικασίες σύνδεσης (αλληλεπίδραση με υποδοχέα), επηρεάζοντας έτσι τη φαρμακοκινητική αλλά και τη φαρμακοδυναμική συμπεριφορά του.

Στο σχεδιασμό φαρμάκων το πλέον καθιερωμένο μέτρο εκτίμησης της λιποφιλικότητας είναι ο συντελεστής μερισμού στο σύστημα n-οκτανόλης – νερού θεωρώντας ότι ισχύει η σχέση (Hansch και Leo, 1995):

$$\log P_{bio} = a \log P_{octanol} + b$$

Ο Hansch και οι συνεργάτες του, δημιούργησαν το σύστημα των υδρόφοβων σταθερών των υποκαταστατών - π, που δίνονται από την σχέση :

$$\pi = \log PX - \log PH$$

Όπου log PX, log PH είναι οι τιμές των λογαρίθμων των συντελεστών κατανομής του υποκατεστημένου και του μητρικού μορίου αντίστοιχα (C. Hansch 1974, A. Leo 1971).

Ένας άλλος τρόπος έκφρασης της λιποφιλικότητας αποτελεί το σύστημα των υδρόφοβων κλασματικών σταθερών f που αναπτύχθηκε από τον Rekker, οι οποίες αργότερα τροποποιήθηκαν από τους Leo-Hansch, που επινόησαν έναν άλλο τρόπο πρόβλεψης της λιποφιλικότητας. Σύμφωνα με αυτόν χρησιμοποιούνται τιμές f για πολύ βασικά τμήματα του μορίου (π.χ. για άνθρακα αρωματικό ή αλειφατικό) και στην συνέχεια προστίθενται οι κατάλληλοι διορθωτικοί «παράγοντες» για να προβλέψουν τις ειδικές περιπτώσεις κάθε φορά πχ. διακλάδωση αλυσίδας, διακλάδωση ομάδας κ.ά.

2. Ηλεκτρονιακές παράμετροι

Η ηλεκτρονιακή σταθερά του Hammet ήταν η πρώτη ημιεμπειρική παράμετρος, η οποία αρχικά αναπτύχθηκε για την μελέτη της επίδρασης των ηλεκτρονικών φαινομένων στον ιονισμό του βενζοϊκού οξέος:

$$\log K_x = \rho\sigma + \log K_H$$

όπου:

K_H και K_X : οι σταθερές ιονισμού του βενζοϊκού οξέος και του μ- ή π-υποκατεστημένου παραγώγου στους 250˚C.

ρ : η σταθερά της αντίδρασης – μέτρο της ευαισθησίας αυτής στο ηλεκτρονικό φαινόμενο και

σ : ηλεκτρονική σταθερά του υποκαταστάτη

Λαμβάνοντας υπόψιν ως πρότυπο σύστημα την επίδραση των υποκαταστατών του βενζοϊκού οξέος στον ιονισμό του , μπορούμε να υπολογίσουμε την ηλεκτρονική επίδραση των υποκαταστατών σε παρόμοια συστήματα αντιδράσεων.

Άλλες ηλεκτρονιακές σταθερές είναι η σ* σταθερά του Taft, που αποτελεί επαγωγική πολική σταθερά και εφαρμόζεται σε κεκορεσμένες ενώσεις καθώς και οι F (επαγωγικές), R (συντονισμού) των Swain και Lumpton και σ˙ για αντιδράσεις ριζών.

3. Στερεοχημικές Παράμετροι (steric)

Οι στερεοχημικές παράμετροι σχετίζονται με το μέγεθος, τον όγκο, την επιφάνεια και το σχήμα των μορίων.

Οι πιο γνωστές στερεοχημικές παράμετροι είναι του Verloop, που σχετίζονται με το μήκος του υποκαταστάτη L προς την κατεύθυνση, που συνδέεται με το μητρικό μόριο καθώς και με το εύρος του υποκαταστάτη σε τέσσερις διαφορετικές κάθετες μεταξύ τους κατευθύνσεις B (B_1 και B_4 αντιστοιχούν στο μικρότερο και μεγαλύτερο εύρος του υποκαταστάτη, οι δε B_2 και B_3 σε ενδιάμεσα εύρη).

Επίσης μια άλλη στερεοχημική παράμετρος είναι η μοριακή διαθλασιμότητα MR (Molecular Refractivity), που εκφράζει την συνεισφορά του όγκου (bulk) και της πολωσιμότητας (polarizability) της ένωσης ή ενός υποκαταστάτη. Η MR αποτελεί μια από τις παλαιότερες προσθετικές ιδιότητες και περικλείει το μοριακό βάρος (MW), το δείκτη διάθλασης (n), την

πυκνότητα (d) και συσχετίζεται με δυνάμεις London και διασποράς. Αρνητική τιμή συντελεστή συσχέτισης - MR δηλώνει στερεοχημική παρεμπόδιση του ligand ενώ θετική τιμή υποδηλώνει ασάφεια σχετικά με το τί συμβαίνει σε επίπεδο υποδοχέα. Η παράμετρος είναι χρήσιμη στην εξαγωγή βιολογικών σχέσεων QSAR, όπου οι διαμοριακές επιδράσεις είναι σημαντικότερες των ενδομοριακών

Τέλος μια άλλη στερεοχημική παράμετρος είναι η E_S, που αναφέρεται ως σταθερά του Taft και εκφράζει τις στερικές τοπικές ενδομοριακές επιδράσεις, που αφορούν ομοιογενή διαλύματα. Οι τιμές E_s φέρουν αρνητικό πρόσημο και σχετίζονται πολύ καλά με την ακτίνα van der Waals των υποκαταστατών. [Σημειωσεις Προχ. Φαρμακοχ. Χατζηπαύλου].

<u>Στατιστικές μέθοδοι</u>

Στο κλασσικό QSAR χρησιμοποιείται η πολλαπλή γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης (Multiple Linear Regression Analysis), που επιτρέπει τη συσχέτιση μιας εξαρτημένης μεταβλητής με περισσότερες ανεξάρτητες μεταβλητές. Τα απαραίτητα στατιστικά στοιχεία που πρέπει να συνοδεύουν μια εξίσωση παλινδρόμησης είναι

- **n** : ο αριθμός των δεδομένων- ενώσεων
- **DF , n-K**: οι βαθμοί ελευθερίας με K τον αριθμό των μεταβλητών
- **r** : ο συντελεστής συσχέτισης που πρέπει να τείνει στη μονάδα και λαμβάνει τιμές από -1 έως και +1
- $\mathbf{r^2}$: το ποσοστό των περιπτώσεων που ερμηνεύει η εξίσωση x100
- **s** : η τυπική απόκλιση που πρέπει να τείνει στο μηδέν
- $\mathbf{q^2}$: ο διασταυρούμενος συντελεστής που είναι μέτρο της ικανότητας πρόβλεψης του μοντέλου για (n) αριθμό ενώσεων
- **F- test**: ορίζει το επίπεδο εμπιστοσύνης σε σχέση παραμέτρων- εξίσωσης- βαθμών ελευθερίας. Συνήθως γίνεται χρήση επιπέδου εμπιστοσύνης 95%

- **( ) , confidence limits / standard errors** : συνοδεύουν το συντελεστή κάθε παραμέτρου και είναι όρια οπωσδήποτε μικρότερα από το μισό της τιμής του συντελεστή
- **outliers** : «έκτροπα» δεδομένα- πειραματικές τιμές που απορρίπτονται και δεν συμπεριλαμβάνονται για την εξαγωγή της εξίσωσης

Διακρίνουμε δύο μεθόδους για την πολλαπλή γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης: α) την ανάλυση Hansch, που συσχετίζει τη βιολογική δράση με τις φυσικοχημικές ιδιότητες, και β)την ανάλυση Free-Wilson, που μελετά τη συμβολή των επιμέρους υποδομικών χαρακτηριστικών των μορίων στη βιολογική δράση.

Ειδικότερα, η ανάλυση Hansch τεκμηριώνει την επίδραση τριών κατηγοριών φυσικοχημικών ιδιοτήτων στη βιολογική δραστικότητα: λιποφιλικότητα, ηλεκτρονιακές ιδιότητες και στερεοχημικές ιδιότητες. Το ολικό αποτέλεσμα συνοψίζεται παρακάτω:

$$Log\ BR = -a\ (log\ P)^2 + b\ log\ P + \rho\sigma + d\ Es + C$$

,όπου το log P εκφράζει τη λιποφιλικότητα, το σ τις ηλεκτρονιακές ιδιότητες και το Es τις στερεοχημικές ιδιότητες, ενώ a, b, ρ, d και C είναι οι συντελεστές που προκύπτουν από τη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης.

4.2. Εξαγωγή Ποσοτικών σχέσεων Δομής-Δράσης QSAR για 2,4-διϋποκατεστημένα θειαζολικά παράγωγα

2,4- Διϋποκατεστημένα θειαζόλια μελετήθηκαν *in vivo* για την ικανότητά τους να αναστέλλουν την φλεγμονή που επάγεται από την ενδοδερμική χορήγηση καραγενίνης (Carageenan induced paw edema CPE).

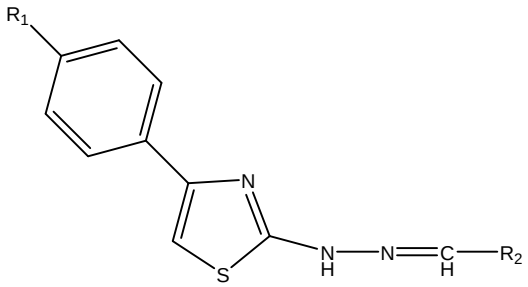
1) Η ποσοτική αναλυτική συσχέτιση των δομικών στοιχείων 2,4-διϋποκατεστημένων θειαζολίων [Sanjay Kumar Bharti et al. 2010] έδειξε ότι στατιστικά σημαντικότερη παράμετρος είναι η μοριακή διαθλασιμότητα (CMR) ακολουθούμενη από την λιποφιλικότητα (1). Οι δύο παράμετροι είναι ανεξάρτητοι μεταξύ τους :

$$Log(CPE)\% = -0.155(0.049)CMR + 0.310(0.057)CLogP + 1.659(0.569) \quad \textbf{(1)}$$

$$n = 10\,,\ r = 0.984,\ r^2 = 0.968,\ q^2 = 0.942,\ s = 0.045,\quad F_{2,7}=109.75\,,\ a=0.01$$

Από την σχέση έχουν εξαιρεθεί δύο ενώσεις η (3) και η (5). Η (3) δεν εμφανίζει κάποιο ιδιαίτερο δομικό χαρακτηριστικό , ενώ στην ένωση (5) όλοι οι υποκαταστάτες είναι μεθόξυ- (CH_3O) ομάδες. Το αρνητικό πρόσημο(-) στο συντελεστή του CMR δηλώνει τον σημαντικό ρόλο που διαδραματίζει για τη δράση του μορίου και συγκεκριμένα αύξηση του όγκου συνδέεται με μείωση της αναστολής της φλεγμονής.

Πίνακας 3. Δομές , βιολογικά δεδομένα και φυσικοχημικές παράμετροι, που χρησιμοποιούνται για την εξαγωγή της εξίσωσης (1)



No	R_1	R_2	Υπολ. Log% αναστολής CPE	Δ log% αναστολής CPE	Πειρ. Log% αναστολής CPE	CMR	CLOGP
1	OCH_3	C_6H_5	1.68	0.04	1.72	9.25	4.82
2	OCH_3	C_6H_4F	1.63	-0.03	1.60	9.27	4.62
***3**	OCH_3	C_6H_4OH	1.82	-0.32	1.50	9.41	5.42
4	OCH_3	$C_6H_2(OCH_3)_3$	1.41	-0.10	1.31	11.10	4.38
***5**	OCH_3	$C_6H_3(OCH_3)_2$	1.56	0.29	1.85	10.49	4.76
6	OCH_3	$C_6H_4NO_2$	1.57	0.0	1.57	9.87	4.60
7	Br	C_6H_5	1.88	0.06	1.94	9.41	5.67
8	Br	$C_6H_4OCH_3$	1.88	0.05	1.93	10.03	5.89
9	Br	$C_6H_3(OH)_2$	1.89	0.04	1.93	9.72	5.79
10	Br	$C_6H_2(OCH_3)_3$	1.61	-0.13	1.48	11.26	5.23
11	Br	$C_6H_4NO_2$	1.77	0.11	1.88	10.03	5.45
12	Br	$CH_2CH{=}CHC_6H_5$	1.89	0.0	1.89	10.70	6.14

*Ενώσεις που δεν συμπεριλήφθηκαν στην εξαγωγή της σχέσης (1).

2) Συντέθηκαν παράγωγα φαινυλοθειαζολίου [Shashikant R Pattan et al. 2009] και εξετάστηκε η αντιφλεγμονώδης δράση τους. Από την ανάλυση διαφαίνεται ότι η % αναστολή της φλεγμονής (Log(CPE)%) σχετίζεται με το ηλεκτρονιακό φαινόμενο(σταθερά του Hammett) σ_π του υποκαταστάτη R_1(π-

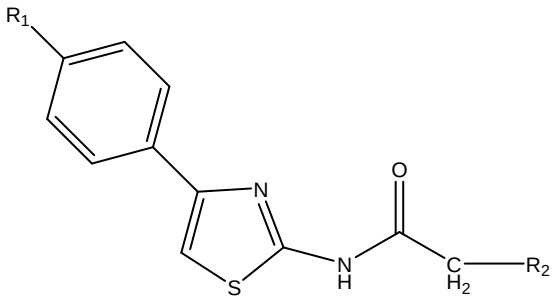
υποκατάσταση), ενώ η λιποφιλικότητα δεν φαίνεται να διαδραματίζει ουσιαστικά σημαντικό ρόλο. Η ποσοτική σχέση (2) λόγω της περιορισμένης διασποράς των βιολογικών δεδομένων παρουσιάζει χαμηλό συντελεστή συσχέτισης (r= 0.741) και στατιστική αξιοπιστία(α=0.05).

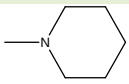
$$\text{Log(CPE)\%} = 0.160(0.130)\ \sigma_{\pi} + 1.409(0.034) \qquad \textbf{(2)}$$

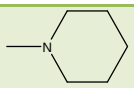
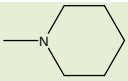
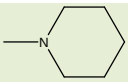
$$n = 9,\ r = 0.741,\ r^2 = 0.549,\ q^2 = 0.229,\ s = 0.034,\ F=8.75,\ \alpha=0.05$$

Έχουν εξαιρεθεί δύο ενώσεις από την εξίσωση η T11 και η T12 και οι δύο είναι N-διφαίνυλο υποκατεστημένα παράγωγα.

Πίνακας 4. Δομές , βιολογικά δεδομένα και φυσικοχημικές παράμετροι, που χρησιμοποιούνται για την εξαγωγή της εξίσωσης (2)



No	Όνομα	R_1	R_2	Υπολ. Log% αναστολής CPE	Δ log% αναστολής CPE	Πειρ. Log% αναστολής CPE	σ_{π}
1	T5	H	$-N(C_6H_5)_2$	1.41	-0.03	1.38	0.0
2	T6	H		1.41	0.01	1.42	0.0
3	T7	OH	$-N(C_6H_5)_2$	1.35	-0.01	1.34	-0.37
4	T8	OH	$-N(C_2H_5)_2$	1.35	-0.03	1.32	-0.37

5	T9	OCH_3		1.37	-0.03	1.34	-0.27
6	T10	OCH_3	$-N(C_2H_5)_2$	1.37	0.01	1.38	-0.27
***7**	T11	OCH_3	$-N(C_6H_5)_2$	1.37	0.05	1.42	-0.27
***8**	T12	Cl	$-N(C_6H_5)_2$	1.45	-0.09	1.36	0.23
9	T13	Cl		1.45	-0.03	1.42	0.23
10	T14	H	$-N(C_2H_5)_2$	1.41	0.06	1.47	0.0
11	T15	OH		1.35	0.03	1.38	-0.37

*Ενώσεις που δεν συμπεριλήφθηκαν στην εξαγωγή της σχέσης (2).

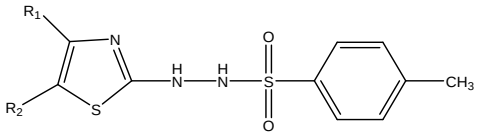
3) Νέα βιολογικά δραστικά παράγωγα θειαζολίου εμφάνισαν μεταξύ άλλων και αντιφλεγμονώδη δράση[Adriana Ignat PhD Thesis Abstract 2010] και στην περίπτωση αυτή η % αναστολή της φλεγμονής (Log(CPE)%) σχετίζεται με την μοριακή διαθλασιμότητα (CMR) ολόκληρου του μορίου . Η λιποφιλικότητα δεν φάνηκε να επηρεάζει την δράση και δεν συσχετίζεται με την μοριακή διαθλασιμότητα:

$$\text{Log(CPE)\%} = 0.068(0.061)\text{CMR} + 1.008(0.627) \quad \textbf{(3)}$$

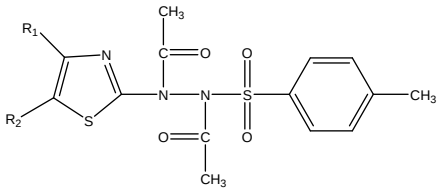
$n=6$, $r=0.836$, $r^2=0.700$, $q^2=0.252$, $s=0.047$, $F_{1,4}=9.33$, $\alpha=0.05$

Έχουν εξαιρεθεί δύο ενώσεις η 2α και η 2b , οι οποίες δεν έχουν υποκαταστάτη στη θέση R_2 και εμφανίζουν τις χαμηλότερες τιμές CMR.

Πίνακας 5. Δομές , βιολογικά δεδομένα και φυσικοχημικές παράμετροι, που χρησιμοποιούνται για την εξαγωγή της εξίσωσης (3)



2a-f



3b-f

No	Όνομα	R_1	R_2	Υπολ. Log% αναστολής CPE	Δ log% αναστολής CPE	Πειρ. Log% αναστολής CPE	CMR
*1	2A	$-CH_3$	H	1.50	0.14	1.64	7.34
*2	2B	$-CH_2Cl$	H	1.54	0.21	1.75	7.83
3	2C	$-C_6H_5$	H	1.64	-0.03	1.61	9.38
4	2F	$-CH_2COOCH_2CH_3$	H	1.61	-0.01	1.60	8.92
5	3B	$-CH_2Cl$	H	1.67	0.03	1.70	9.75
6	3C	$-C_6H_5$	H	1.77	-0.06	1.71	11.31
7	3E	$-CH_3$	$COOCH_2CH_3$	1.74	0.05	1.79	10.84
8	3F	$-CH_2COOCH_2CH_3$	H	1.74	0.02	1.76	10.84

*Ενώσεις που δεν συμπεριλήφθηκαν στην εξαγωγή της σχέσης(3).

Βιβλιογραφίες

1. Bharti S.K., G. Nath, R. Tilak, S.K. Singh, *European J. Med.Chem.*, 2010, 45, 651-660
2. Hansch C.; Leo A. Exploring QSAR, *Fundamentals and applications in Chemistry and Biology*, ACS Professional Reference Book, **1995**
3. Hansch C.; Rockwell S. D.; Jow P.Y.C.; Leo A. *J. Med. Chem.* **1974**, 20, 304
4. Hansch C.; Leo A.; Taft R.W. *Chem. Rev.* **1991**, 91, 165

5. Ignat Adriana, PhD Thesi Abstract, 2010, "BABEŞ-BOLYAI" University Cluj-Napoca.
6. Leo A.; Hansch C.; Elkins D. *Chem. Rev.* **1971**, 71, 525
7. Shashikant R. Pattan, R. L. Hullolikar, Nachiket. S. Dighe, B.N.Ingalagi, V. M. Gaware, P.A. Chavan, J. Pharm. Sci & Res. , 2009, Vol 1(4), 96-102.
8. Χατζηπαύλου-Λίτινα Δ. *Σημειώσεις Προχωρημένης Φαρμακοχημείας, Ποσοτικές Σχέσεις Δομής - Δράσης*

V. Πειραματικό Μέρος

5.1.1 Σύνθεση τελικών προϊόντων. Μέθοδος σύνθεσης 2,4-διϋποκατεστημένων θειαζολικών παραγώγων[Bharti et al 2010].

Τα τελικά προϊόντα παραλαμβάνονται σε δύο στάδια.

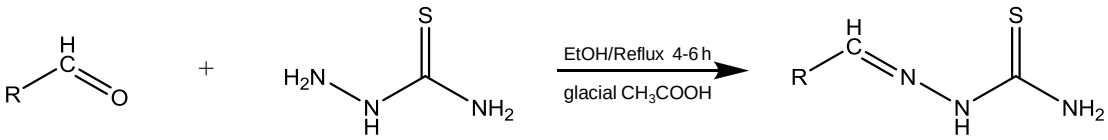
Κατά το πρώτο στάδιο συνθέτουμε την βάση Schiff . Σε σφαιρική φιάλη προστίθενται ισομοριακές ποσότητες κατάλληλα υποκατεστημένης αρωματικής αλδεΰδης και θειοσεμικαρβαζιδίου ($NH_2C(=S)NHNH_2$) σε διαλύτη αιθανόλη(CH_3CH_2OH) και προστίθενται μερικές σταγόνες παγόμορφου οξικού οξέος (glacial CH_3COOH) ως καταλύτη. Το διάλυμα θερμαίνεται με επαναρροή σε κάθετο ψυκτήρα και αναδεύεται για περίπου 4-6 ώρες μέχρι εξάντλησης των αντιδρώντων. Η περίσσεια του διαλύτη απομακρύνεται με ελαττωμένη πίεση σε περιστρεφόμενο συμπυκνωτή.

Κατά το δεύτερο στάδιο συνθέτουμε τον θειαζολικό δακτύλιο του προϊόντος , σύμφωνα με την μέθοδο σύνθεσης θειαζολίου κατά Hantzsch. Ισομοριακές ποσότητες του θειοσεμικαρβαζονικού παραγώγου , που παραλάβαμε κατά το πρώτο στάδιο, και 4-βρωμοφαινακυλοβρωμίδιο θερμαίνονται με επαναρροή και αναδεύονται για περίπου 4-10 ώρες παρουσία Na_2CO_3 . Ακολουθεί κατεργασία του προϊόντος με $NaHCO_3$. . Το στερεό ή ημιστερεό υπόλειμμα διηθείται και καθαρίζεται με ανακρυστάλλωση από κατάλληλους διαλύτες, όπως αιθανόλη 95° ή μίγμα πετρελαϊκού αιθέρα : οξικού αιθυλεστέρα.

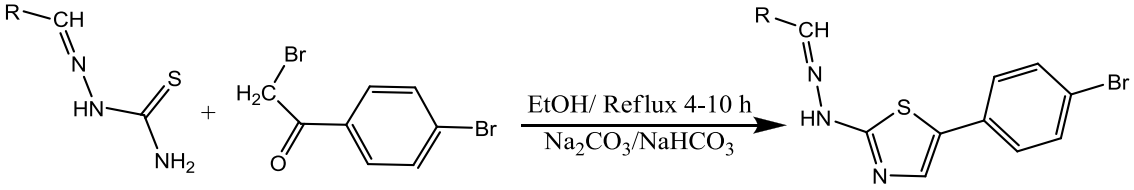
Η γενική πορεία των αντιδράσεων απεικονίζεται στο Σχήμα 5.1 , ενώ ο έλεγχός τους γίνεται χρωματογραφικά με TLC σε μίγμα διαλυτών εξάνιο:ακετόνη (2:1) και πετρελαϊκό αιθέρα : οξικό αιθυλεστέρα (1:1, 2:1, 2:7, 7:1 και 10:1) ανά τακτά χρονικά διαστήματα . Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των ενώσεων παραθέτονται στους Πίνακες 6 και 7 . Οι δομές

που συντίθενται επιβεβαιώνονται από τα φασματοσκοπικά δεδομένα και τις στοιχειακές αναλύσεις.

1ο Στάδιο



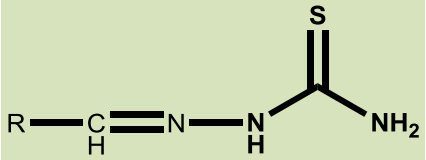
2ο Στάδιο



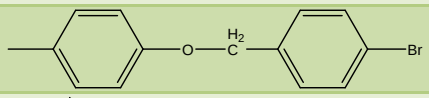
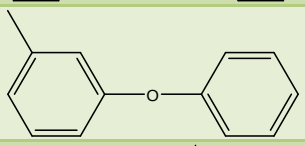
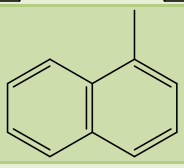
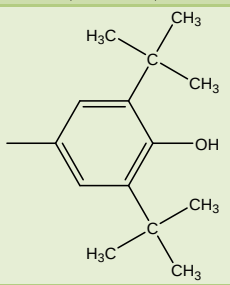
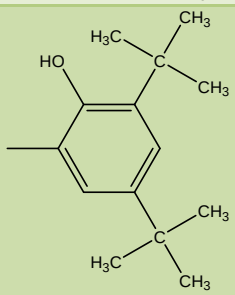
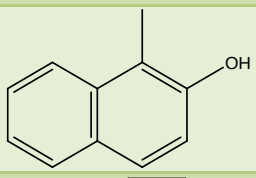
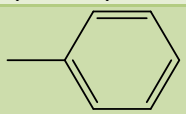
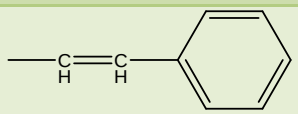
Εικόνα 27. Πορεία σύνθεσης 2,4-υποκατεστημένων θειαζολικών παραγώγων

Στον πίνακα 6 παρουσιάζονται οι θειοσεμικαρβαζόνες που συντέθηκαν κατά το πρώτο στάδιο της συνθετικής πορείας. Παρατίθενται τιμές R_f των TLC σε συστήματα 2 εξάνιο:1 ακετόνη και 2:1, 2:7, 1:1 οξικού αιθυλεστέρα:πετρελαϊκό αιθέρα, σημεία τήξεως χωρίς διόρθωση και αποδόσεις των αντιδράσεων του πρώτου σταδίου.

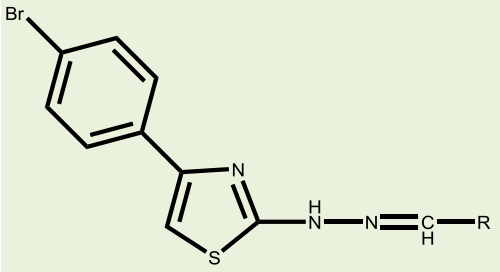
Στον πίνακα 7 παρουσιάζονται τα τελικά προϊόντα που συντέθηκαν κατά το δεύτερο στάδιο της συνθετικής πορείας. Παρατίθενται τιμές R_f των TLC σε συστήματα 2 εξάνιο:1 ακετόνη και 1:3, 1:7 οξικό αιθυλεστέρα:πετρελαϊκό αιθέρα, σημεία τήξεως χωρίς διόρθωση και ολικές αποδόσεις των συνθέσεων.



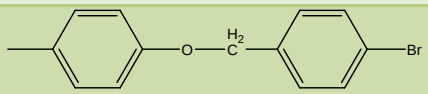
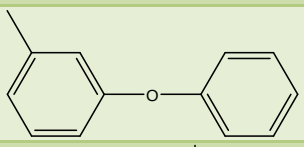
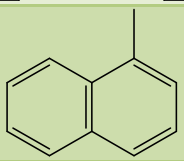
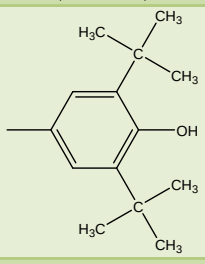
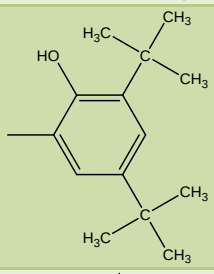
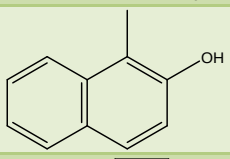
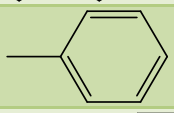
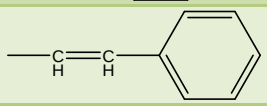
Πίνακας 6. *Ενδιάμεσα προϊόντα που παρασκευάστηκαν, φυσικές σταθερές και αποδόσεις.*

A/A	R	R_f	σ.τ. °C	A%
Crosk 1a		0.5 (2 Εξάνιο:1 ακετόνη)	192-195	99
Crosk 2a		0.5 (2 Εξάνιο:1 ακετόνη)	215-217	71
Crosk 3a		0.5 (2 Εξάνιο:1 ακετόνη)	207-211	84
Crosk 4a		0.5 (2 Εξάνιο:1 ακετόνη)	181-183	100
Crosk 5a		0.4 (2 Εξάνιο:1 ακετόνη)	210-212	100
Crosk 6a		0.8(2ΕΑ/1ΡΕ)*	283-285	69
Crosk 7a		0.4(2ΕΑ/7ΡΕ)*	156-158	77
Crosk 8a		0.8(1ΕΑ/1ΡΕ)*	139-140	81

*ΕΑ: οξικός αιθυλεστέρας, ΡΕ : πετρελαϊκός αιθέρας



Πίνακας 7. *Τελικά προϊόντα που παρασκευάστηκαν, φυσικές σταθερές και αποδόσεις.*

A/A	R	R_f	σ.τ. °C	A%
Crosk 1c		0.5(2 εξάνιο/1 ακετόνη)	196-199	90
Crosk 2e		0.7(1EA/3PE)	138-140	43
Crosk 3b		0.8 (2 Εξάνιο:1 ακετόνη)	184-186	74
Crosk 4b		0.5 (2 Εξάνιο:1 ακετόνη)	219-222	100
Crosk 5b		0.7 (2 Εξάνιο:1 ακετόνη)	202-205	73
Crosk 6b		0.5 (2 Εξάνιο:1 ακετόνη)	240-243	69
Crosk 7b*		0.4(1 EA/7PE)	196-200**	68
Crosk 8b*		0.5(1EA/7PE)	217-219**	90

*ΕΑ: οξικός αιθυλεστέρας, PE : πετρελαϊκός αιθέρας

**Οι αντίστοιχες ενώσεις αναφέρονται στην βιβλιογραφία[Bharti et al. 2010]

Ακολουθούν τα αποτελέσματα από τις στοιχειακές αναλύσεις των τελικών προϊόντων : θεωρητικά και πειραματικά.

Πίνακας 8. *Στοιχειακές αναλύσεις των ενώσεων που συντέθηκαν*

Ένωση	Μοριακός Τύπος	C%	H%	N%	C%	H%	N%
		ΥΠΟΛΟΓΙΣΘΕΝΤΑ			ΕΥΡΕΘΕΝΤΑ		
Crosk 1c	$C_{23}H_{17}Br_2N_3OS$	50.85	3.15	7.73	50.92	3.53	7.47
Crosk 2e	$C_{22}H_{16}BrN_3OS$	58.67	3.58	9.33	58.81	3.54	9.66
Crosk 3b	$C_{20}H_{14}BrN_3S$	58.83	3.46	10.29	58.58	3.40	10.11
Crosk 4b	$C_{24}H_{28}BrN_3OS$	59.26	5.80	8.64	59.52	5.66	8.95
Crosk 5b	$C_{24}H_{28}BrN_3OS$	59.26	5.80	8.64	59.66	6.11	8.47
Crosk 6b	$C_{20}H_{14}BrN_3OS$	56.61	3.33	9.90	56.60	3.46	9.56

5. 2 Φασματοσκοπικά Δεδομένα

Πίνακας 9. Φασματοσκοπική εξέταση των ενώσεων με τη φασματοσκοπία υπερύθρου, τη φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού και τη φασματοσκοπία μαζών.

Ένωση	
Crosk 1a	IR (Nujol) (cm^{-1}): 3417(NH_2), 3283(NH), 1592(C=N), 1236, 116
Crosk 1c	IR (Nujol) (cm^{-1}): 3305(NH), 1620(C=N), 1248, 1170
	^{1}H-NMR($CDCl_3$) δ (ppm): 5.07(s, 2H, -CH_2-) , 6.76(br, 2H), 7,00 (d, 2H, J=9 Hz), 7.19-7.31(m, 1H), 7.51-7.65(m, 9H), 8.1(s, 1H)
	MS(ESI) m/z : 543 (M+1)$^+$
Crosk 1d	^{1}H-NMR($CDCl_3$) δ (ppm):3.10(b, 2H, -CH_2-)
Crosk 2a	IR (Nujol) (cm^{-1}): 3389(NH_2), 3232(NH), 1533(C=N), 1298(C=S), 1214(-O-)
Crosk 2e	IR (Nujol) (cm^{-1}):3165(NH), 1571(C=N), 1257(-O-)
	^{1}H-NMR($CDCl_3$) δ (ppm): 6.85(s, 1H), 6.98-7.21 (m, 6H), 7.30-7.60(m, 7H), 7.66(d, 1H, J=18Hz), 10.38-10.41(b, 1H)
	^{13}C-NMR($CDCl_3$) δ (ppm): 104.3, 141.3, 152, 156.9, 157.7, 169.1
Crosk 3a	IR (Nujol) (cm^{-1}): 3440(NH_2), 3261(NH), 1597(C=N),1547, 1301(C=S)
Crosk 3b	IR (Nujol) (cm^{-1}):3171(NH), 1592(C=N), 1564(C=C)
	^{1}H-NMR($CDCl_3$) δ (ppm): 6.89(s, 1H), 7.46-7.58 (m, 6H), 7.71-7.73(m, 3H), 7.87(d, 2H, J=9 Hz), 8.36(s, 1H), 8.48(d, 1H, J=6 Hz)
	MS(ESI) m/z : 409 (M+1)$^+$

Crosk 4a	IR (Nujol) (cm^{-1}): 3602(OH), 3436(NH_2), 3150(NH), 1595(C=N), 1296(C=S)
Crosk 4b	IR (Nujol) (cm^{-1}): 3624(OH), ~3300(NH), 1621(C=N), 1614(C=C)
	^{1}H-NMR($CDCl_3$) δ (ppm): 1.25-1.47(m, 18H), 7.04-7.18(m, 4H), 7.32-7.77(m, 5H), 8.13(s, 1H)
	^{13}C-NMR($CDCl_3$) δ (ppm): 30.22-34.34(8C aliphatic), 103.89, 118.64, 124.29, 125.29, 129.36, 132.31, 132.65, 132.78, 136.79, 138.77, 147.07, 157.45, 182.78
	MS(ESI) m/z : 487 $(M+1)^+$
Crosk 5a	IR (Nujol) (cm^{-1}): 3457(OH), 3266(NH_2), 3160(NH), 1611(C=N), 1264(C=S)
Crosk 5b	IR (Nujol) (cm^{-1}): ~3500(OH), 3171(NH), 1608(C=N), 1586(C=C)
	^{1}H-NMR($CDCl_3$) δ (ppm): 1.26-1.46(m, 18H), 6.78-6.95(m, 2H), 7.18-7.43(m, 2H), 7.51-7.65(m, 4H), 8.18(s, 1H), 9.92(s, 1H)
Crosk 6a	IR (Nujol) (cm^{-1}): 3445(OH), 3244(NH_2), 3165(NH), 1611(C=N), 1276(C=S)
Crosk 6b	IR (Nujol) (cm^{-1}):3328(OH), 3104(NH), 1620(C=N), 1572(C=C)
	^{1}H-NMR($CDCl_3$) δ (ppm): 6.98(s, 1H), 7.18(d, 1H), 7.33-7.38 (m, 1H), 7.51-7.61(m, 5H), 7.71-7.78(m, 4H), 8.12-8.15(m, 1H), 9.2(s, 1H)
	^{13}C-NMR($CDCl_3$) δ (ppm): 102, 109, 118, 122, 123, 126, 128, 128.4, 130, 131, 131.7, 132, 134, 136, 142, 144, 156, 161, 166.7, 211
Crosk 7a*	IR (KBr)* (cm^{-1}): 3422(NH_2), 3251(NH), 1590(C=N), 1298(C=S)
	^{1}H-NMR (DMSO-*d*6) δ(ppm) : 7.35—7.52 (m, 3H), 7.87—8.00 (m, 2H), 7.74 and 7.81 (2_s, 2H), 8.17 (s, 1H), 11.40 (s, 1H)
Crosk 7b	IR (Nujol) (cm^{-1}):3296(NH), 1574(C=N), 1567(C=C)
	^{1}H-NMR (DMSO-d6) δ (ppm): 7.1–7.3 (m, 5H),7.4 (d, 2H), 7.5 (s, 1H,), 7.7 (d, 2H),7.8 (s, 1H), 8.0 (s, 1H)*
	13C NMR (DMSOd6) δ (ppm): 38.6, 39.0, 40.3,126.5,128.8, 129.7 , 130.7,131.8, 132.4 , 134.7 , 165.3 , 187.4 *
	MS (ESI) m/z : 359 $(M + 1)^{+}$**
Crosk 8a	IR (Nujol) (cm^{-1}): 3417(NH_2), 3260(NH), 1592(C=N), 1294(C=S)
Crosk 8b	IR (Nujol) (cm^{-1}):3298(NH), 1564(C=N)
	^{1}H NMR (DMSO-d6, 300 MHz) δ (ppm): 6.8 (d, 2H), 7.0–7.3 (m, 5H), 7.4 (d, 2H), 7.7 (s,1H), 7.8 (s, 1H), 9.2 (s,1H)**
	^{13}C NMR (DMSO-d6) d (ppm): 101.3 , 115.5, 123.0, 126.1, 129.0 , 139 , 139.1 , 148.7, 155.4, 161.0 **
	MS (ESI) m/z : 385 $(M + 1)^{+}$***

*Οι αντίστοιχες τιμές συμφωνούν με τις αναφερόμενες στην βιβλιογραφία[Mohammad Sayed Alam et al.2011]

**Οι αντίστοιχες τιμές αναφέρονται στην βιβλιογραφία[S.K. Bharti et al. 2010]

5.3 In Silico, Θεωρητικός Υπολογισμός Τιμών Φυσικοχημικών Ιδιοτήτων.

Για τον υπολογισμό των τιμών των φυσικοχημικών ιδιοτήτων, έγινε αρχικά προσδιορισμός διαμόρφωσης ελάχιστης ενέργειας των ενώσεων με το πρόγραμμα Spartan v. 5.1.3 (Wavefunction Inc.).

Συνοπτικά, για κάθε ένωση έγινε α) βελτιστοποίηση της δομής με χρήση της κβαντομηχανικής ημιεμπειρικής μεθόδου PM3 και β)στο διαμορφομερές με την ελάχιστη ενέργεια έγιναν υπολογισμοί με μεθόδους κβαντομηχανικής σε επίπεδο *6-31G**. Απ' αυτούς τους υπολογισμούς προήλθαν οι τιμές των υπολοίπων φυσικοχημικών ιδιοτήτων .

Ακόμη με το πρόγραμμα C-QSAR της Biobyte υπολογίστηκαν οι φυσικοχημικές ιδιότητες των νέων ενώσεων, όπως η λιποφιλικότητα, η ολική μοριακή διαθλασιμότητα των μορίων αλλά και η μοριακή διαθλασιμότητα ορισμένων υποκαταστατών και ο συνολικός μοριακός όγκος.

Πίνακας 10. *Φυσικοχημικές ιδιότητες που σχετίζονται με ενεργειακά φαινόμενα των ενώσεων (kJ/mol).*

α/α	E(HOMO) (eV)	E(LUMO) (eV)	Δ [E(HOMO)-E(LUMO)]	Ενέργεια Εφυδατώσεως (Kj/mol)
Crosk 1c	-7.65	2.40	7.96	-17487863
Crosk 2e	-7.71	2.26	9.97	-10633848
Crosk 3b	-7.62	2.00	9.62	-10235423
Crosk 4b	-7.52	2.53	10.05	-10851088
Crosk 5b	-7.51	2.49	10.00	-10851029
Crosk 6b	-7.63	1.96	9.59	-10431989
Crosk 7b	-7.70	2.31	10.01	-9834647
Crosk 8b	-7.59	1.97	9.56	-10036515
Crosk 1d	-7.85	2.73	10.58	-17490920

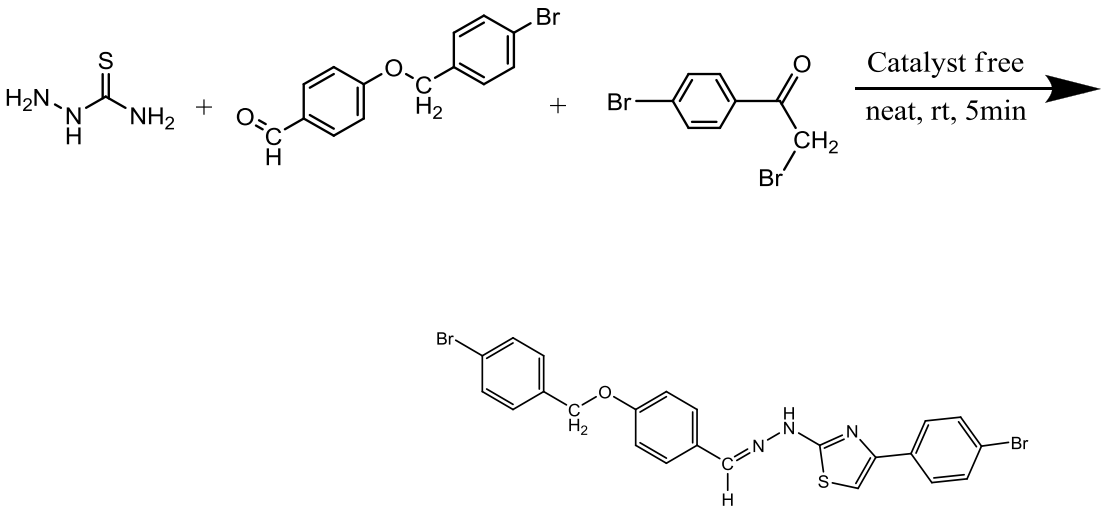
Πίνακας 11. *Φυσικοχημικές ιδιότητες που αναφέρονται στη μορφή-στερεοδιάταξη και στην κατανομή φορτίου των μορίων.*

Ένωση	Διπολική ροπή	Επιφάνεια ηλεκτρ. Πυκνότητα A^2	Όγκος ηλεκτρ. Πυκνότητα A^3
Crosk 1c	2.26	448.07	444.48
Crosk 2e	2.82	404.61	400.04
Crosk 3b	4.99	360.62	360.25
Crosk 4b	5.14	453.23	468.42
Crosk 5b	7.41	454.46	467.63
Crosk 6b	4.40	365.53	367.27
Crosk 7b	4.80	318.35	310.48
Crosk 8b	5.34	351.70	342.48
Crosk 1d	2.41	453.66	450.57

5.4 Δοκιμασία σύνθεσης τελικών προϊόντων μέσω μίας μεθόδου «πράσινης χημείας» ενός σταδίου[Quansehng et al 2011].

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία [Quansehng et al. 2011] εφαρμόστηκε για την σύνθεση 2,4-διϋποκατεστημένων θειαζολικών παραγώγων μία πράσινη, απλή και πρακτική μέθοδος ενός σταδίου, μέσω λειοτρίβησης όλων των αντιδρώντων σε ένα ιγδίο, και μάλιστα χωρίς καταλύτη και διαλύτη . Η μέθοδος εφαρμόστηκε δοκιμαστικά στην σύνθεση της ένωσης crosk 1c.

Σε ένα ιγδίο εισάγουμε ισομοριακές ποσότητες θειοσεμικαρβαζιδίου, 4-βρωμο-φαινοξυ-4-βενζαλδεΰδης και 4-βρωμο-φαινακυλο-βρωμιδίου και το μίγμα αυτό λειοτριβείται έντονα σε θερμοκρασία δωματίου για 5(-10) λεπτά και έχουμε την αντίδραση:



Εικόνα 28. Πορεία πράσινης σύνθεσης 2,4-υποκατεστημένων θειαζολικών παραγώγων

Μετά την παρέλευση του προβλεπόμενου χρόνου της αντίδρασης διαπιστώθηκε χρωματογραφικά μεγάλος αριθμός κηλίδων που αντιστοιχούσε σε προϊόντα που δεν μπορούσαν να ταυτοποιηθούν.

VI.Φαρμακοχημικές Δοκιμασίες *in vitro* και *in vivo*

6.1. Φαρμακοχημικές Δοκιμασίες *in vitro* .

6.1.1. Αλληλεπίδραση των εξεταζόμενων ενώσεων με την ελεύθερη σταθερή 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλυδραζυλική ρίζα (DPPH) σε διαλύτη αιθανόλη. [Pontiki E. and Hadjipavlou D., 2007]

Στο πείραμα αυτό μελετάται η αλληλεπίδραση των νέων ενώσεων με τη ελεύθερη σταθερή ρίζα του 1,1 - διφαινυλο - 2 - πικρυλυδραζυλίου DPPH.

Σε 1 ml αιθανολικών διαλυμάτων των υπό εξέταση ενώσεων (τελική συγκέντρωση 0,05 mM και 0,1 mM) από stock διάλυμά τους σε DMSO, προστίθεται ίσος όγκος αιθανολικού διαλύματος DPPH (0,1mM). Τα διαλύματα αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 20 και 60 λεπτά αντίστοιχα και μετράται η απορρόφηση στο υπεριώδες-ορατό (UV-Vis) στα 517 nm. Ίσης συγκέντρωσης αιθανολικό διάλυμα DPPH χρησιμοποιήθηκε ως διάλυμα αναφοράς. Ως τυφλό χρησιμοποιούμε 1 ml αιθανόλης μαζί με ίσο όγκο αιθανολικού διαλύματος των υπό εξέταση ενώσεων.

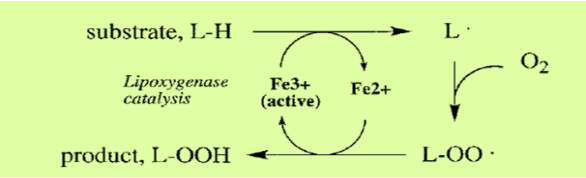
Τα αποτελέσματα που ακολουθούν παρουσιάζονται ως μέσος όρος 3 μετρήσεων χωρίς η τυπική απόκλιση να αποκλίνει περισσότερο από 10% (± SD < 10%).

Πίνακας 12. Αλληλεπίδραση (%) των συντεθειμένων ενώσεων με την ελεύθερη ρίζα DPPH. Μελέτη της δράσης των ενώσεων σε σχέση με τη συγκέντρωση και με το χρόνο.

Κωδικός	0,05mM t=20 min	0,05mM t=60 min	0,1mM t=20 min	0,1mM t=60 min
Crosk 1a	NO*	NO	18,9	27,9
Crosk 1c	88,5	84,0	82,2	80
Crosk 1d	NO	NO	-60,8	-77,3
Crosk 2a	NO	NO	12,5	-1,8
Crosk 2e	92,5	93,3	100,0	100,0
Crosk 3a	NO	NO	32,8	41,6
Crosk 3b	73,6	84,7	80,6	77,3
Crosk 4a	75,9	82,7	86,3	58,4
Crosk 4b	NO	NO	25,0	1,3
Crosk 5a	NO	NO	36,7	34,6
Crosk 5b	75,3	70,0	70,6	66,2
Crosk 6a	75,3	87,3	69,4	92,2
Crosk 6b	63,2	80,7	87,2	78,6
Crosk 7a	NO	NO	17,8	14,3
Crosk 7b	73,6	100,0	76,1	68,8
Crosk 8a	NO	NO	13,9	9,1
Crosk 8b	69	74,0	77,2	72,1
NDGA	84,8	83,1	81,0	82,6

6.1.2 Ανασταλτική δράση επί της λιποξυγονάσης φυτικής προέλευσης από σόγια [Kontogiorgis and Hadjipavlou, 2003]

Στο πείραμα γίνεται προσπάθεια να μελετηθεί η ικανότητα των νέων ενώσεων να αναστέλλουν τη λιποξυγονάση, ένζυμο που εμπλέκεται στον κύκλο του αραχιδονικού οξέος. Η αναστολή της φυτικής προέλευσης LOX (από σόγια) (1: $9x10^4$ w/v σε φυσιολογικό ορό) έγινε σε συγκέντρωση 0,1 mM για τον υπολογισμό της % αναστολής των εξεταζομένων ενώσεων, υπόστρωμα το άλας με νάτριο του λινελαϊκού οξέος σε pH 9 με ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl, σε θερμοκρασία δωματίου. Καταγράφεται στα 234 nm η μεταβολή της απορρόφησης (μετατροπή του λινελαϊκού οξέος σε 13-υπεροξυλινελαϊκό οξύ). Τα αποτελέσματα δίνονται στον πίνακα 6.2. Για τις ενώσεις crosk 1c, crosk 3b, crosk 6a, crosk 6b και crosk 7b προσδιορίζονται οι τιμές IC_{50} (Πίνακας 13) χρησιμοποιώντας διαφορετικές συγκεντρώσεις των ενώσεων (0.05 mM – 0,1 mM).



Πίνακας 13. Τιμές % αναστολής των εξεταζομένων ενώσεων επί του ενζύμου λιποξυγονάση από σόγια (SLOX).

Κωδικός	% Αναστολή LOX 0,1mM
Crosk 1a	32,0
Crosk 1c	88,1
Crosk 1d	3,9
Crosk 2a	9,9
Crosk 2e	7,3
Crosk 3a	20,2
Crosk 3b	84,1
Crosk 4a	30,1
Crosk 4b	44,9
Crosk 5a	7,9
Crosk 5b	5,1
Crosk 6a	65,4
Crosk 6b	80,3
Crosk 7a	9,7
Crosk 7b	53,6
Crosk 8a	6,2
Crosk 8b	45,8
NDGA	83.7

Πίνακας 14. IC_{50} τιμές των ενώσεων crosk 1c, crosk 3b, crosk 6a, crosk 6b και crosk 7b για τη λιποξυγονάση από σόγια(SLOX)

Κωδικός	IC_{50}
Crosk 1c	56,5μM
Crosk 3b	55μM
Crosk 6a	77,5μM
Crosk 6b	59,5μM
Crosk 7b	100μM
Καφφεϊκό οξύ	600μM

6.1.3. Εκτίμηση της ικανότητας των ενώσεων να αναστέλλουν την υπεροξείδωση του λινελαϊκού οξέος που επάγεται από το διϋδροχλωρικό άλας του 2,2΄- διαζο-2-αμιδινοπροπανίου AAPH [Liégeois et al., 2000]

Στο συγκεκριμένο πείραμα γίνεται προσπάθεια να μελετηθεί η ικανότητα των ενώσεων να αναστέλλουν τη λιπιδική υπεροξείδωση του λινελαϊκού οξέος. Σε κυψελίδα χαλαζία περιεκτικότητας 1 ml, που περιέχει 930 μl ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων pH 7,4 προστίθενται 10 μl διαλύματος άλατος με νάτριο του λινελαϊκού οξέος (16 mM) σε pH 9 με ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl και 10 μl διαλύματος των υπό εξέταση ενώσεων (10 mM). Η οξειδωτική διαδικασία ξεκινά με την προσθήκη 50 μM AAPH (40 mM σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με pH 7,4) σε θερμοκρασία 37°C παρουσία αέρα. Καταγράφεται η μεταβολή της τιμής απορρόφησης στα 234 nm (μετατροπή του λινελαϊκού οξέος σε 13-υπεροξυ-λινελαϊκό οξύ). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί:

Πίνακας 15. Μελέτη αναστολής λιπιδικής υπεροξείδωσης

Κωδικός	% Αναστολή λιπιδικης υπεροξειδωσης 0,1mM
Crosk 1a	57,8
Crosk 1c	91,2
Crosk 1d	28,6
Crosk 2a	26,6
Crosk 2e	45,5
Crosk 3a	98,5
Crosk 3b	68,2
Crosk 4a	77,6
Crosk 4b	47,1

Crosk 5a	83,3
Crosk 5b	75,1
Crosk 6a	48,7
Crosk 6b	88,3
Crosk 7a	48,5
Crosk 7b	79,5
Crosk 8a	34,8
Crosk 8b	87,0
Trolox	63,0

6.1.4. Εκτίμηση της ικανότητας των ενώσεων να αναστέλλουν την τυροσινάση από μανιτάρι in vitro [Khan et al 2000]

Στο πείραμα γίνεται προσπάθεια να μελετηθεί η ικανότητα των νέων ενώσεων να αναστέλλουν την τυροσινάση, ένα μεταλλοένζυμο που σχετίζεται με φλεγμονώδεις αποκρίσεις του οργανισμού στο δέρμα και την βιοσύνθεση της μελανίνης. Η αναστολή της τυροσινάσης (5370 U/mg σε 2.6 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών KH_2PO_4 0.1 M pH 6.5) προσδιορίσθηκε σε συγκέντρωση 0.1 mM των εξεταζόμενων ουσιών , με υπόστρωμα 0.2 ml (1.5mM) L-Dopa σε pH 6.5 με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0.1 M, σε θερμοκρασία 37° C για 10 λεπτά 0.1 M . Καταγράφεται στα 490 nm η μεταβολή της απορρόφησης (μετατροπή της L-DOPA σε DOPA quinone). Τα αποτελέσματα δίνονται στον πίνακα 16 σε σύγκριση με το κοϊκό οξύ που χρησιμοποιείται σαν ένωση αναφοράς.

Πίνακας 16. ***Τιμές % αναστολής των εξεταζομένων ενώσεων επί του ενζύμου τυροσινάση***

Κωδικός	**% Αναστολή τυροσινάσης**
Crosk 1c	89,3
Crosk 3b	96,3
Crosk 6b	91,1
Crosk 7b	96,9
Κοϊκό οξύ	18,6

6.1.5. Εκτίμηση της ικανότητας των ενώσεων να αναστέλλουν την ξανθινοξειδάση [Chioua et al, 2012]

Στο πείραμα γίνεται προσπάθεια να μελετηθεί η ικανότητα των νέων ενώσεων να αναστέλλουν την ξανθινοξειδάση, ένα μεταλλοένζυμο που σχετίζεται με την εμφάνιση ουρικής αρθρίτιδας λόγω καταλύσεως της μετατροπής ξανθίνης σε ουρικό οξύ. Η αναστολή της ξανθινοξειδάσης έγινε σε συγκέντρωση 0,1 mM για τον υπολογισμό της % αναστολής των εξεταζομένων ενώσεων, υπόστρωμα η ξανθίνη σε pH 7.4 με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών .

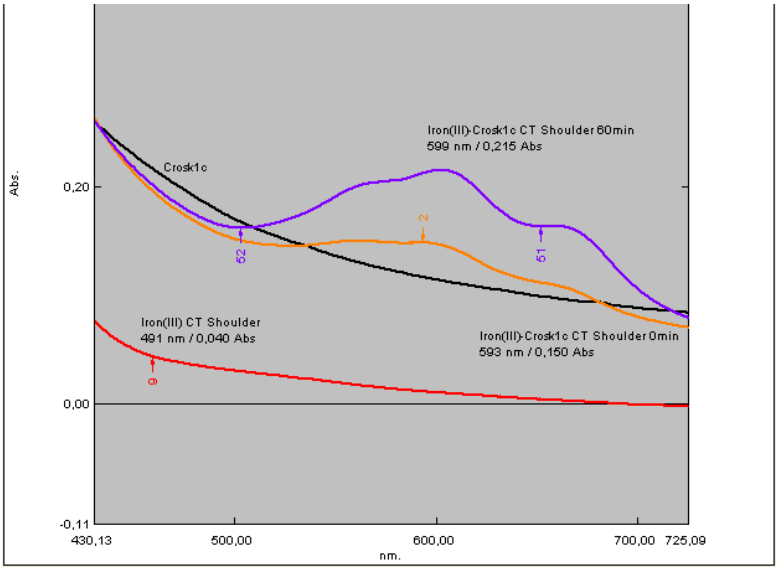
Πίνακας 17. ***Τιμές % αναστολής των εξεταζομένων ενώσεων επί του ενζύμου ξανθινοξειδάση.***

Κωδικός	% Αναστολή ξανθινοξειδάσης
Crosk 1c	NO*
Crosk 3b	NO
Crosk 6b	NO
Crosk 7b	NO
Καφφεϊκό οξύ	15,0

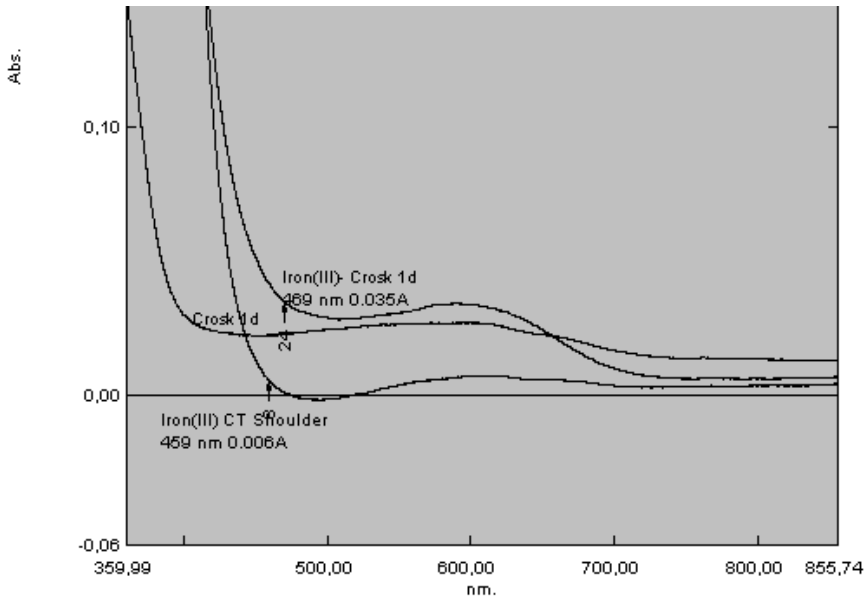
* Δεν έδειξε κάποιο αποτέλεσμα.

6.1.6. Εκτίμηση της ικανότητας των ενώσεων να σχηματίζουν σύμπλοκο με τον τριχλωριούχο σίδηρο ($FeCl_3$)

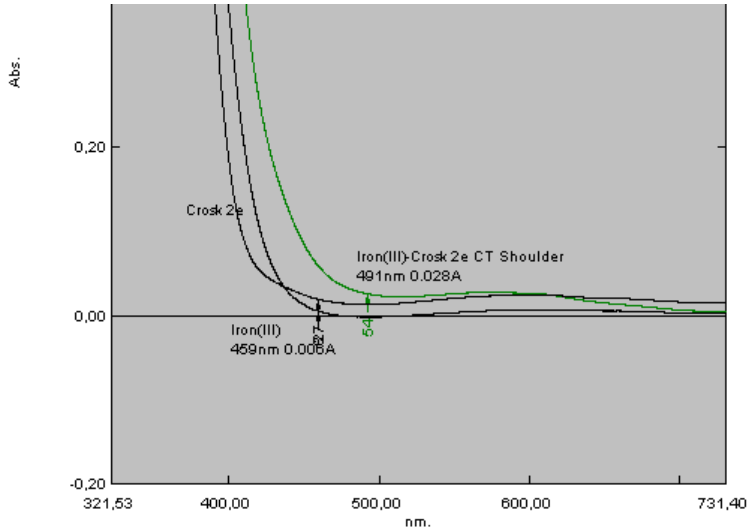
Μελετήθηκε η εμφάνιση ταινίας μεταφοράς φορτίου σε πιθανές ενώσεις συναρμογής των ενώσεών μας με τρισθενές μεταλλικό ιόν του σιδήρου (Fe[III]). Για τις μετρήσεις, χρησιμοποιήθηκαν αιθανολικά διαλύματα των ενώσεών μας(10^{-2} M) και αιθανολικό διάλυμα $FeCl_3$ (10^{-2} M). Οι κυψελίδες που χρησιμοποιήσαμε είναι από χαλαζία.



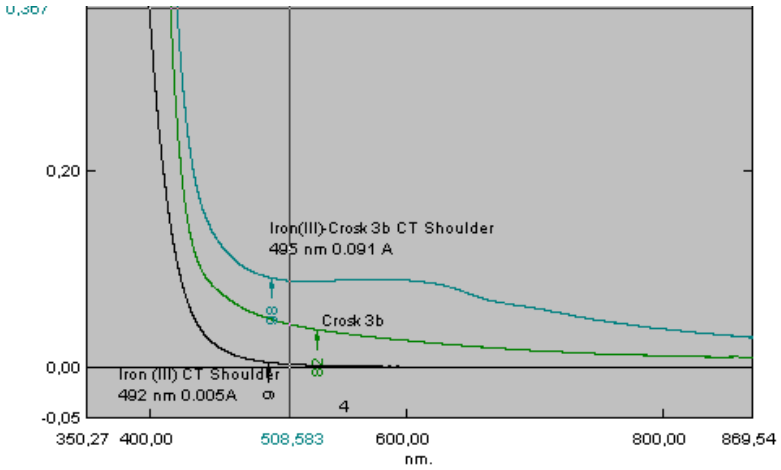
Εικόνα 29. Ταινία μεταφοράς φορτίου Fe(III)-Crosk 1c



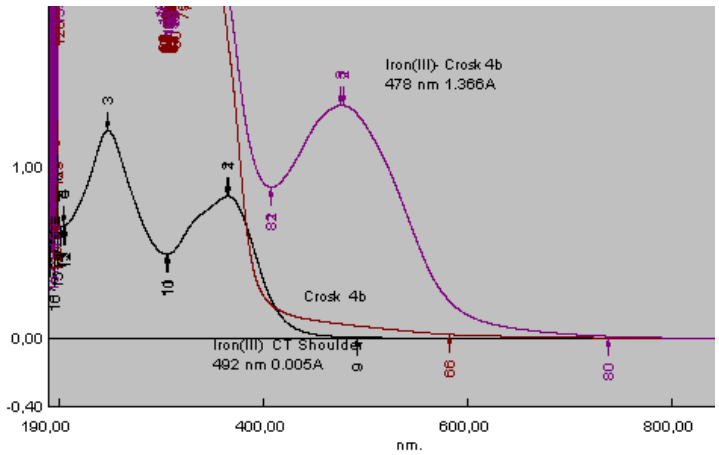
Εικόνα 30. Ταινία μεταφοράς φορτίου Fe(III)-Crosk 1d



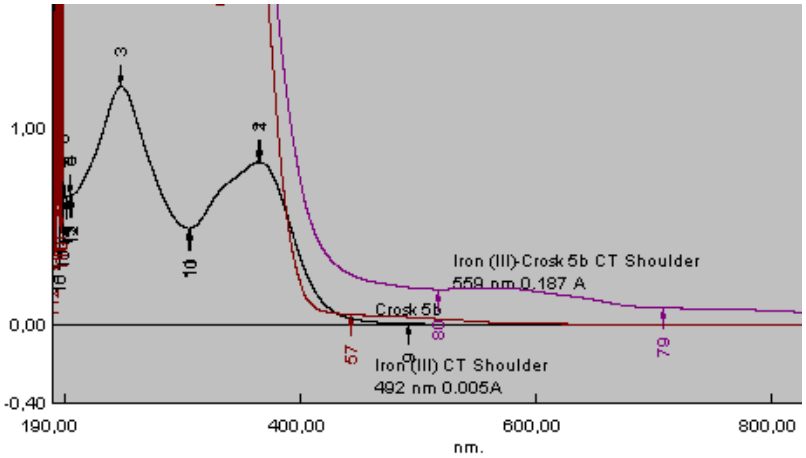
Εικόνα 31. Ταινία μεταφοράς φορτίου Fe(III)-Crosk 2e



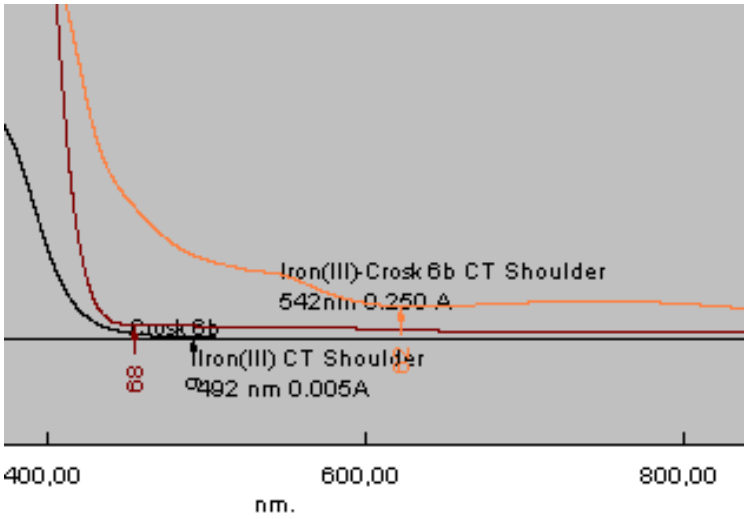
Εικόνα 32. Ταινία μεταφοράς φορτίου Fe(III)-Crosk 3b



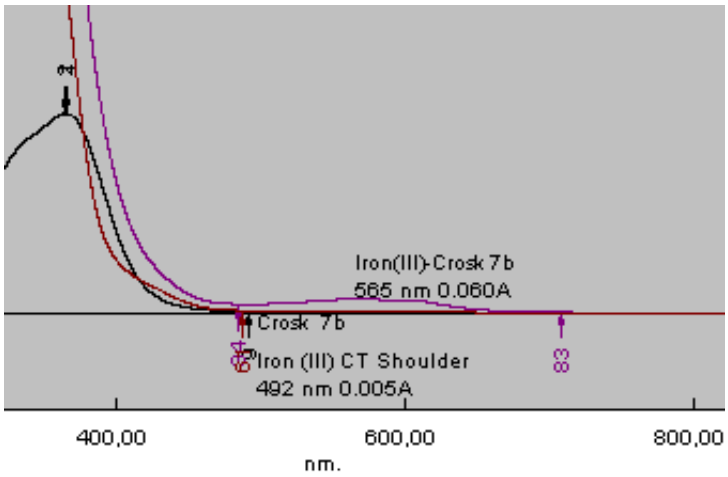
Εικόνα 33. Ταινία μεταφοράς φορτίου Fe(III)-Crosk 4b



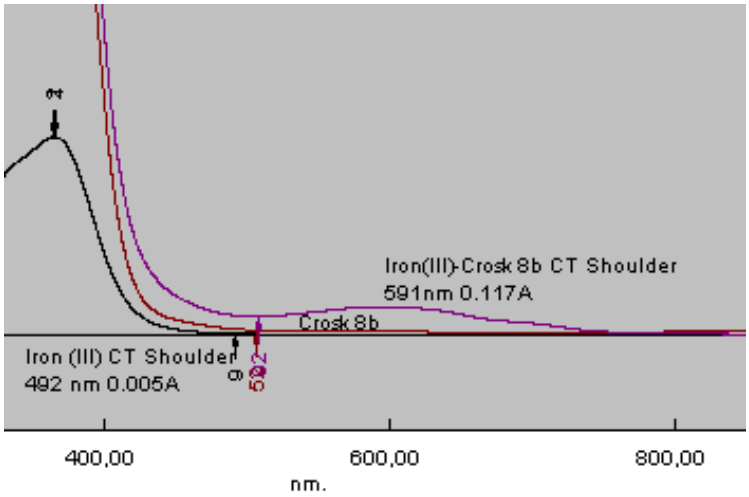
Εικόνα 34. Ταινία μεταφοράς φορτίου Fe(III)-Crosk 5b



Εικόνα 35. Ταινία μεταφοράς φορτίου Fe(III)-Crosk 6b



Εικόνα 36. Ταινία μεταφοράς φορτίου Fe(III)-Crosk 7b



Εικόνα 37. Ταινία μεταφοράς φορτίου Fe(III)-Crosk 8b

6.1.7. Εκτίμηση του ρόλου της παρουσίας του αζωμεθινικού δεσμού στην *in vitro* βιολογική δράση.

Γίνεται αναγωγή του αζωμεθινικού δεσμού της ένωσης crosk 1c, η οποία επιβεβαιώνεται φασματοσκοπικά. Το προϊόν ελέγχεται ως προς την βιολογική του δραστικότητα σε όλες τις *in vitro* δοκιμασίες.

6.2.Βιολογικές Δοκιμασίες *in vivo*

6.2.1. Επαγωγή οιδήματος άκρου ποδός επίμυα που προκαλείται από την ενδοδερμική χορήγηση καρραγενίνης. [Kalsi et al.1990, Chi and Won1990, Pontiki E. and Hadjipavlou D., 2006]

Διαδικασία του Πειράματος

Χρησιμοποιούμε τρεις ομάδες πειραματόζωων-επίμυες Fisher 344 σωματικού βάρους 150-200g. Χρησιμοποιήθηκαν θηλυκοί και αρσενικοί επίμυες, ενώ εξαιρέθηκαν οι θηλυκοί που βρίσκονταν σε φάση εγκυμοσύνης. Περίπου μια ώρα πριν από την έναρξη του πειράματος αφαιρείται η τροφή και το νερό από τα πειραματόζωα.

Οι ενώσεις χορηγούνται αρχικά ενδοπεριτοναϊκά, ώστε να εξασφαλισθεί ταχύτατη βιοδιαθεσιμότητα της ένωσης και κυκλοφορία της σε όλο το σώμα του πειραματόζωου και ταυτόχρονα προκαλείται φλεγμονή στο πέλμα του δεξιού άκρου ποδός με την ενδοδερμική χορήγηση διαλύματος καραγεννίνης.

Στην πρώτη ομάδα πειραματόζωων χορηγείται ενδοπεριτοναϊκά εφάπαξ δόση της εξεταζόμενης ένωσης (0,01mmol/ml/kg σωματικού βάρους), με τη μορφή εναιωρήματος που σχηματίζεται με βάση το H_2O και τη βοήθεια του γαλακτοματοποιητή Tween 80. Σε μια δεύτερη ομάδα πειραματόζωων χορηγείται μόνο ο υγρός φορέας σε ίσο όγκο. Στην τρίτη ομάδα, χορηγείται κατά τον ίδιο τρόπο, ένα κλασσικό μη στεροειδές αντιφλεγμονώδες φάρμακο, η ινδομεθακίνη (Sigma) ως πρότυπη ένωση αναφοράς. Στη συνέχεια προκαλείται πειραματικά οξεία φλεγμονή, χρησιμοποιώντας ως φλογιστικό την καρραγενίνη, η οποία διαλύεται σε φυσιολογικό ορό, (σε συγκέντρωση2%, 0,1ml διαλύματος της καρραγενίνης) ενίεται ενδοδερμικά στο πέλμα του πίσω δεξιού άκρου ποδιού των επιμύων και στις τρεις ομάδες των πειραματόζωων, ενώ το αριστερό άκρ ο χρησιμοποιείται ως μάρτυρας.

Στη συνέχεια, μετά από 3,5 ώρες από τη χορήγηση του φλογιστικού, οι επίμυες θανατώνονται, με αυχενική εξάρθρωση και λαμβάνονται τα πίσω άκρα τους τα οποία ζυγίζονται.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % αύξηση του βάρους του άκρου ποδιού στο οποίο ενέθηκε το φλογιστικό, συγκρινόμενο με το αντίστοιχο άκρο πόδι στο οποίο δεν ενέθηκε το φλογιστικό. Με βάση τον υπολογισμό αυτό, προσδιορίζεται στη συνέχεια η % μέση αναστολή του οιδήματος που προκαλεί η εξεταζόμενη ένωση, σε σχέση με τους μάρτυρες [Kalsi et al.1990, Chi and Won,1990 (29,30)].

Οι τιμές των αποτελεσμάτων είναι ο μέσος όρος τουλάχιστον δύο διαφορετικών πειραμάτων και η τυπική απόκλιση δεν ξεπερνά το 10%. Τα αποτελέσματα δίνονται στον Πίνακα 18.

$$\% \text{ Μέση Αναστολή} = \frac{\text{Μ.Ο. \% αύξησης του βάρους άκρου ποδιού (μάρτυρες) - Μ.Ο. \% αύξησης βάρους άκρου ποδιού (αγωγής)}}{\text{Μ.Ο. \% αύξησης βάρους άκρου ποδιού (μάρτυρες)}} \times 100$$

Πίνακας 18. *% In vivo αναστολή που προκαλείται από τις εξεταζόμενες ενώσεις στο οίδημα του άκρου ποδός από καρραγενίνη*

ΚΩΔΙΚΟΣ	% Αναστολή οιδήματος που επάγεται από καρραγενίνη (CPE%)
Crosk 1c	48 *
Crosk 3b	25,5 *
Crosk 5b	36.5**
Crosk 7b	16,5*
Crosk 8b	17,1*
Ινδομεθακίνη	47**

Τα πειράματα αποτελούν το μέσο όρο από δύο σειρές πειραμάτων (από έξι πειραματόζωα)

*$p<0.05$, **$p<0.01$ συγκρινόμενα με τους μάρτυρες (student's test).

Βιβλιογραφίες

1. Billman John H., Kwang M. Tai, *J. Org. Chem.*, 1958, Vol 23, 535-539 .
2. Bharti S.K., G. Nath, R. Tilak, S.K. Singh, *European J. Med.Chem.*, 2010, 45, 651-660.
3. Chi S.C.; Won Jun H., *J. Pharm. Sci.* **1990**, 79, 974.
4. Chioua M. et al, *J. Med. Chem.*, 2012, 55(1),153-68.
5. Hansch C.; Leo A. Exploring QSAR, *Fundamentals and applications in Chemistry and Biology,* ACS Professional Reference Book, **1995.**
6. Kalsi R.; Rande K.; Bhalla T.N.; Barthwal J.P.; Parmar S.S., *J. Pharm. Sci.* **1990**, 79, 317.
7. Khan K.M. et al , *Biorg. Med. Chem.*, 2006, 14, 6027-6033.
8. Kontogiorgis C.; Hadjipavlou-Litina D. *J. Enz. Inhib. Med. Chem.* **2003**, 19, 63-69.
9. Mohammad S. Alam, L. Liu, Yong-Eok Lee, D.-U. Lee, *Chem. Pharm. Bull.* ,2011, Vol 59(5), 568-573.
10. Liégeois C.; Lermeau G.; Collins S. *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 1129-1134.

11. Pontiki E. and Hadjipavlou-Litina D., Arzneim. Forsch./*Drug Res.,* 2003, 53, 780.
12. Pontiki E.; Hadjipavlou-Litina D. *Med. Chem,* 2006, 2, 251-264.
13. Pontiki E.; Hadjipavlou-Litina D. *Bioorg. Med. Chem*. 2007, 15, 5819-5827.
14. Quansehng Ding, Dongjian Zhu, Huile Jin, Jiuxi Chen, Jinchang Ding, and Huayue Wu, *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, 2011, 186:2, 220-224.

VII. Αποτελέσματα-Συζήτηση

7.1.1 Σύνθεση 2,4-υποκατεστημένων θειαζολικών παραγώγων

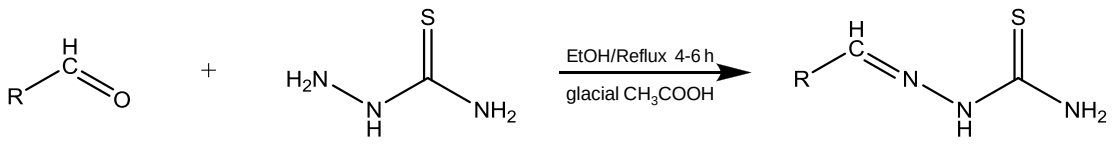
Η τελική επιλογή των μορίων που συντέθηκαν προέκυψε από προκαταρκτική μελέτη και διαμόρφωση μοντέλων ποσοτικών συσχετίσεων δομής-δράσης βιολογικών αποτελεσμάτων της βιβλιογραφίας[Bharti et al., 2010]

$$Log(CPE)\% = -0.155(0.049)CMR + 0.310(0.057)CLogP + 1.659(0.569) \quad \textbf{(1)}$$

Για την σύνθεση των τελικών μας προϊόντων ακολουθήθηκε συνθετική πορεία αποτελούμενη από δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο συντέθηκαν οι αντίστοιχες βάσεις Schiff, από τις οποίες στο δεύτερο στάδιο με το κλείσιμο του θειαζολικού δακτυλίου, ελήφθησαν τα τελικά 2,4-υποκατεστημένα θειαζολικά παράγωγα.

<u>1ο Στάδιο-σύνθεση θειοσεμικαρβαζονών</u>

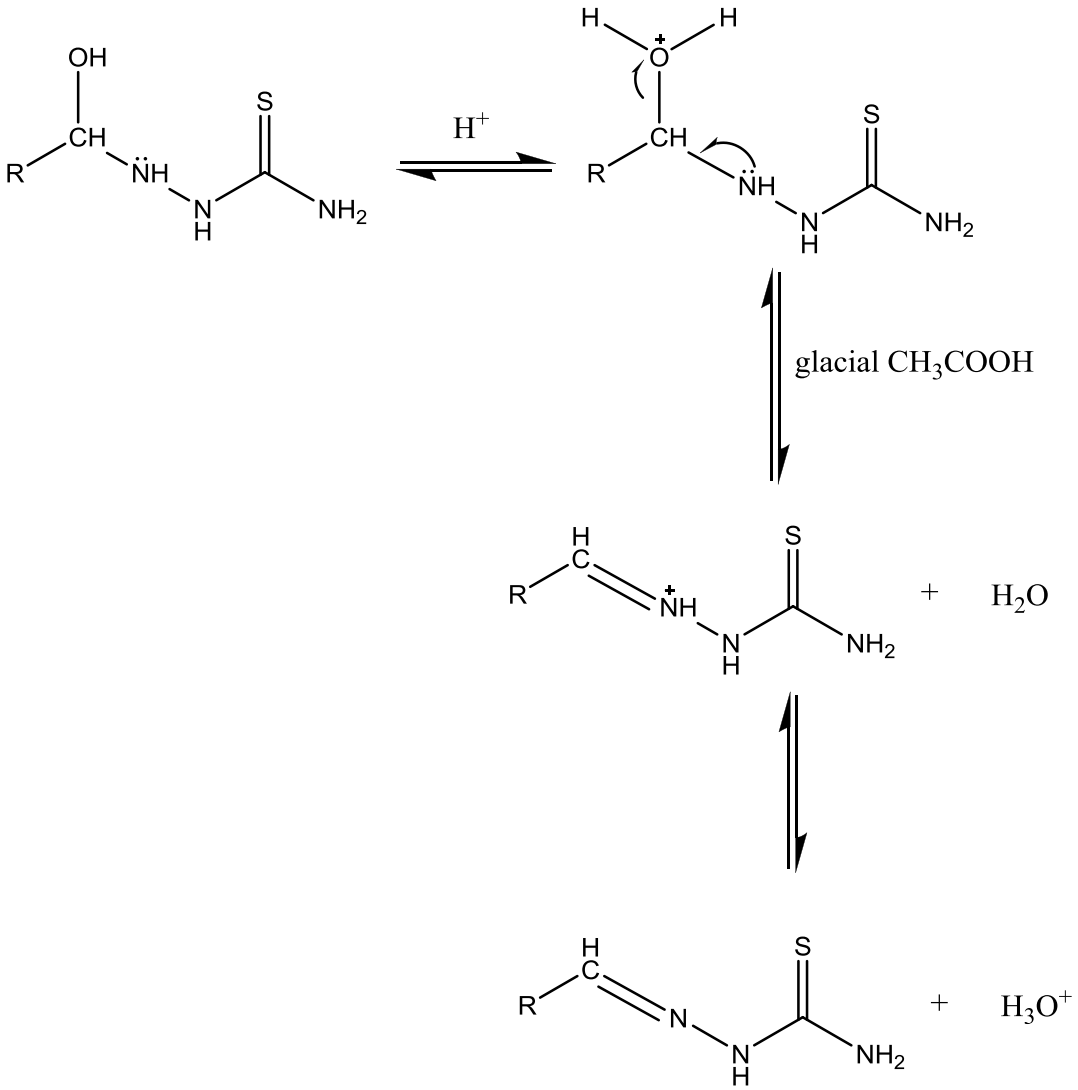
Οι θειοσεμικαρβαζόνες συνήθως προκύπτουν από την συμπύκνωση μιας αλδεΰδης ή κετόνης με θειοσεμικαρβαζίδιο. Στην περίπτωση μας η αντίδραση σχηματισμού έλαβε χώρα μεταξύ μιας κατάλληλα υποκατεστημένης αλδεΰδης και του θειοσεμικαρβαζιδίου , ακολουθώντας την παρακάτω αντίδραση:



Η αντίδραση είναι αμφίδρομη και συνήθως χρησιμοποιείται όξινη κατάλυση , ή και χρήση θέρμανσης. Στην περίπτωσή μας χρησιμοποιήσαμε όξινη κατάλυση με παγόμορφο οξικό οξύ(glacial CH_3COOH) και θέρμανση με επαναροή για 4-6 ώρες, ενώ ως διαλύτης της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε αιθανόλη όπου και τα δύο αντιδρώντα είναι διαλυτά [Bharti et al 2010]. Η

πορεία της αντίδρασης ελέγχθηκε και επιβεβαιώθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας. Για την περίπτωση της στερεοχημικά παρεμποδισμένης αλδεΰδης απαιτήθηκε περισσότερος χρόνος θέρμανσης.

Η σύνθεση αποτελεί μία αντίδραση πυρηνόφιλης προσθήκης στην καρβονυλομάδα. Αρχικά γίνεται ένα ασταθές προϊόν προσθήκης μία ιμίνη, από την οποία αποσπάται ένα μόριο νερού σε συνθήκες όξινης κατάλυσης. Συνοπτικά έχουμε τις εξής αντιδράσεις:



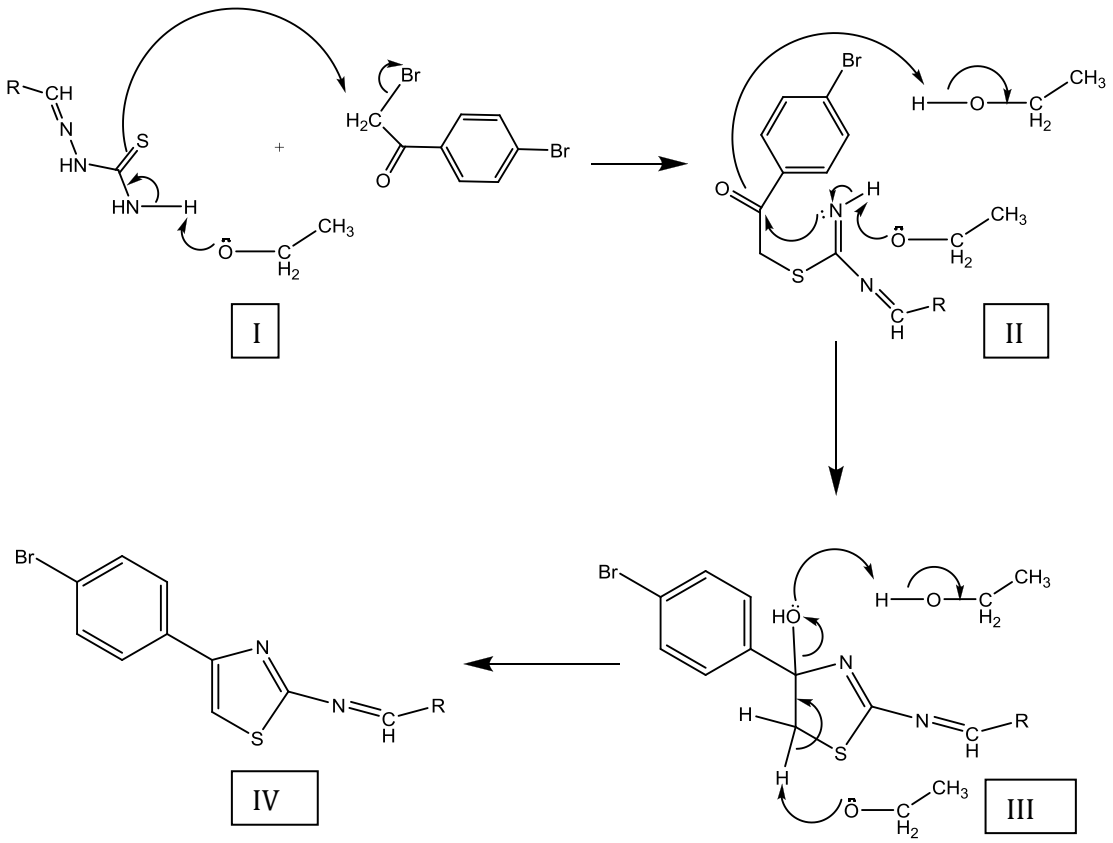
Εικόνα 38. Μηχανισμός αντίδρασης

Το στάδιο αποπρωτονίωσης της ιμίνης είναι το στάδιο που καθορίζει την ταχύτητα σχηματισμού της. Η συγκέντρωση του οξέος είναι καταλυτική, απαιτούνται ήπιες τιμές όξινου pH (και γι'αυτό προτιμάται η προσθήκη του οξικού οξέος).

Τα προϊόντα του πρώτου σταδίου της συνθετικής πορείας λαμβάνονται σε ικανοποιητικές αποδόσεις που κυμαίνονται από 69 έως 100%. Τα δεδομένα από την φασματοσκοπική εξέταση στο φάσμα υπερύθρου (αιωρήματα σε Nujol), που συμφωνούν και με τη βιβλιογραφία [S.K. Bharti et al 2010] , έδειξαν χαρακτηριστικές απορροφήσεις που αντιστοιχούν στον αζωμεθινικό δεσμό (**-CH=N-**) στα 1532 έως 1611 cm^{-1} και τις ομάδες: ***–NH₂*** και ***-NH-*** στα 3149 έως 3440 cm^{-1}. Η απουσία απορρόφησης στα 1700-1750 cm^{-1} επιβεβαιώνει το γεγονός ότι το καρβονύλιο (**C=O**) έχει μετατραπεί πλήρως σε αζωμεθινική ομάδα (**-C=N-**).

<u>2ο Στάδιο-σύνθεση θειαζολικού δακτυλίου</u>

Στο δεύτερο στάδιο της συνθετικής μας πορείας έχουμε τον σχηματισμό του θειαζολικού δακτυλίου σύμφωνα με την μέθοδο σύνθεσης θειαζολίου κατά Hantzsch, όπως μπορούμε να δούμε στην παρακάτω εικόνα 38. [Ikemoto et al, 2003, Qiao Q. Et al, 2003]. Είναι μία SN_2 υποκατάσταση όπου το πυρηνόφιλο είναι το αιθοξείδιο (EtO^-) [I]. Ακολουθεί αποπρωτονίωση του αζώτου που γειτονεύει με το άτομο θείου και πρωτονίωση του οξυγόνου της καρβονυλομάδας, που καταλήγει στο κλείσιμο του δακτυλίου(II). Στη συνέχεια έχουμε αποπρωτονίωση με σχηματισμό διπλού δεσμού και απόσπαση ενός μορίου νερού αφού προηγουμένως πρωτονιωθεί η υδροξυλομάδα (III) . Έτσι καταλήγουμε στο τελικό προϊόν (IV).



Εικόνα 39. Μηχανισμός αντίδρασης σύνθεσης θειαζολίου κατά Hantzsch

Τα τελικά θειαζολικά παράγωγα λαμβάνονται σε ικανοποιητικές αποδόσεις που κυμαίνονται από 43 έως 100%. Η μορφή τους είναι κρυσταλλική και είναι έγχρωμα. Η σύνθεση των ενώσεων Crosk 7b και Crosk 8b με αντιβακτηριακή και αντιμυκητιασική δράση είναι γνωστή από την βιβλιογραφία [Bharti et al. 2010] . Κρίθηκε όμως απαραίτητη η σύνθεσή τους για την συγκριτική βιολογική μελέτη μας.

Τα δεδομένα από την φασματοσκοπική εξέταση στο φάσμα υπερύθρου (αιωρήματα σε Nujol), έδειξαν χαρακτηριστικές απορροφήσεις που αντιστοιχούν στον αζωμεθινικό δεσμό ***-HC=N-*** στα 1564 έως 1621 cm^{-1} .

Η εξέταση των ενώσεων με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR($CDCl_3$, TMS) και οι παρατηρηθείσες χημικές μετατοπίσεις επιβεβαίωσαν την προτεινόμενη δομή. Παρατηρήθηκε συντονισμός των πρωτονίων στις αντίστοιχες περιοχές του φάσματος και ο ακριβής αριθμός των πρωτονίων βρέθηκε από την ολοκλήρωση. Σε μεγάλες

τιμές δ μεγαλύτερες ή ίσες με 8.1 έχουμε εμφάνιση απλών συνήθως κορυφών που αποδίδονται στο αζωμεθινικό πρωτόνιο σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα για ανάλογες ενώσεις [Bharti et al 2010]. Η εμφάνιση πολλαπλών κορυφών σε τιμές δ 6,76 έως 7,89 οφείλεται στα αρωματικά πρωτόνια. Το πρωτόνιο του φαινολικού υδροξυλίου αλλά και της αμινομάδας βρέθηκαν μετατοπισμένα. . Συχνά μπορεί να περιέχεται σε μια πολλαπλή κορυφή μαζί με τα αρωματικά πρωτόνια ή αλλού, εξαιτίας της θερμοκρασίας, του διαλύτη ή της συγκέντρωσης της ουσίας [Silverstein, 1981].

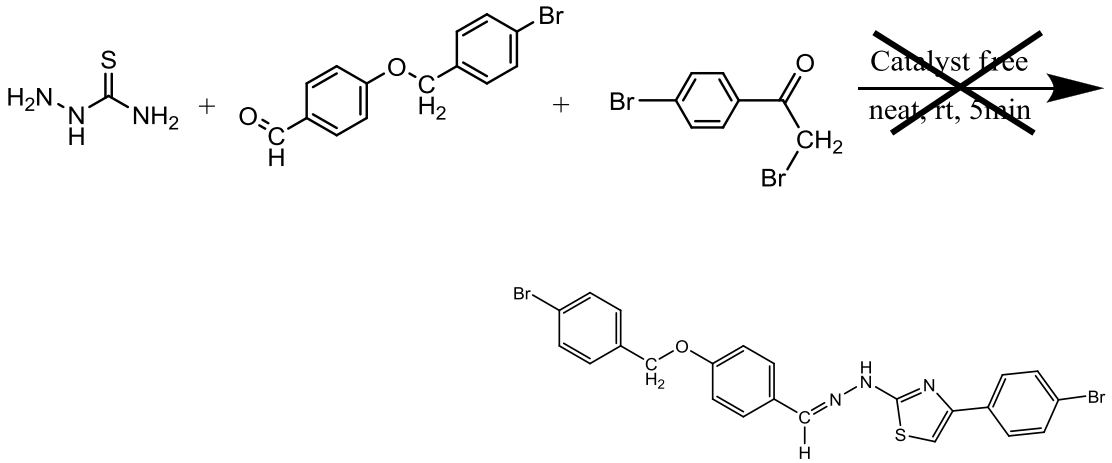
Αντίστοιχη μελέτη που αφορά τους άνθρακες, έγινε με τη μελέτη των φασμάτων ^{13}C-NMR.

Φάσματα MS (ESI) έχουν ληφθεί αντιπροσωπευτικά για τις ενώσεις και επιβεβαιώνουν την δομή crosk 1c 535$[M+1]^+$, crosk 3b 409$[M+1]^+$ και crosk 4b 487 $[M+1]^+$.

Τα αποτελέσματα επίσης των στοιχειακών αναλύσεων συνηγορούν στην προτεινόμενη δομή των τελικών προϊόντων.

7.1.2 Δοκιμασία σύνθεσης τελικών προϊόντων με εφαρμογή μεθόδου «πράσινης χημείας» ενός σταδίου[Quansehng Ding et al 2011].

Η εφαρμογή της αναφερόμενης σαν μεθόδου «πράσινης χημείας» στη βιβλιογραφία [Quansehng et al 2011] για την σύνθεση της ένωσης Crosk 1c δεν οδήγησε στην σύνθεση του επιθυμητού προϊόντος. Οπως επιβεβαιώθηκε από την χρωματογραφία, τα αποτελέσματα ήταν αρνητικά.



Εικόνα 40. Αντίδραση σύνθεσης 2,4-υποκατεστημένων θειαζολίων.

Πιθανή εξήγηση για τα αρνητικά αποτελέσματα στην εξέλιξη της αντίδρασης, αποτελεί η παρουσία ογκωδών υποκαταστατών στην 4-(4-βρωμοβενζυλοξυ) βενζαλδεΰδη που προκαλεί στερεοχημική παρεμπόδιση. Στην βιβλιογραφική πηγή οι πρώτες ύλες που ανταποκρίθηκαν στην παραπάνω αντίδραση ήταν απλές βενζαλδεΰδες.

7.2. Βιολογικά πειράματα

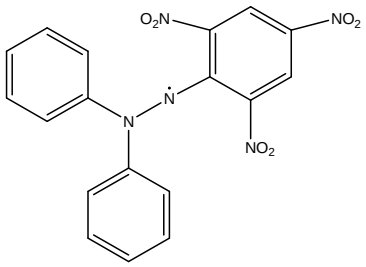
In vitro/ in vivo φαρμακοχημική μελέτη

Τα μεταλλοένζυμα καταλύουν βιολογικές αντιδράσεις που διεξάγονται μέσα στους ζώντες οργανισμούς και μάλιστα ρυθμίζουν μεταβολικά μονοπάτια που συνθέτουν μια συγκεκριμένη αλληλουχία διεργασιών απαραίτητη για την επιβίωση και ανάπτυξη του οργανισμού. Κάθε μεταλλοένζυμο είναι δυνατόν να καταλύει μόνο μια βιολογική δράση , ή ακόμη και μία μόνο ομάδα συγγενών αντιδράσεων .

Τα μεταλλοένζυμα ως βασικά συστατικά του οργανισμού εμπλέκονται στην εμφάνιση διαφόρων νόσων που σχετίζονται με φλεγμονώδεις και μη καταστάσεις. Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι σε πολλές φυσιολογικές και μη καταστάσεις του οργανισμού όπως : φλεγμονή , καρκίνος, γήρανση των κυττάρων εμπλέκονται οι ελεύθερες ρίζες , ενώ πολλά μεταλλοένζυμα μέσω των μετάλλων που περιέχουν στο ενεργό τους κέντρο συμμετέχουν σε οξειδοαναγωγικές διαδικασίες. Συνεπώς θεωρείται σκόπιμο στην έρευνα για την ανακάλυψη νέων φαρμάκων να εξετάζεται παράλληλα και η ικανότητα των υποψήφιων φαρμακομορίων για αντιοξειδωτική δράση, ούτως ώστε να ενισχύεται σημαντικά η κυτταροπροστατευτική τους δράση .

Η μελέτη των ενώσεων για τη δράση τους ως αντιοξειδωτικά και ως πιθανοί αναστολείς μεταλλοενζύμων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια πειραμάτων *in vitro*. Η αξιολόγηση των συγκεκριμένων ενώσεων έγινε με τη χρήση γνωστών ή τροποποιημένων τεχνικών από τη βιβλιογραφία και τα αποτελέσματά τους συγκρίθηκαν ως προς αυτά που παρουσίασαν οι πρότυπες ουσίες αναφοράς, στις ίδιες πειραματικές συνθήκες.

Μια χρήσιμη παράμετρος που σχετίζεται με την αντιοξειδωτική ικανότητα των ενώσεων είναι η ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με οξειδωτικές ελεύθερες ρίζες, οι οποίες βρίσκονται επικεντρωμένες στο άτομο του αζώτου· εκφράζεται έτσι έμμεσα η αναγωγική τους ικανότητα.



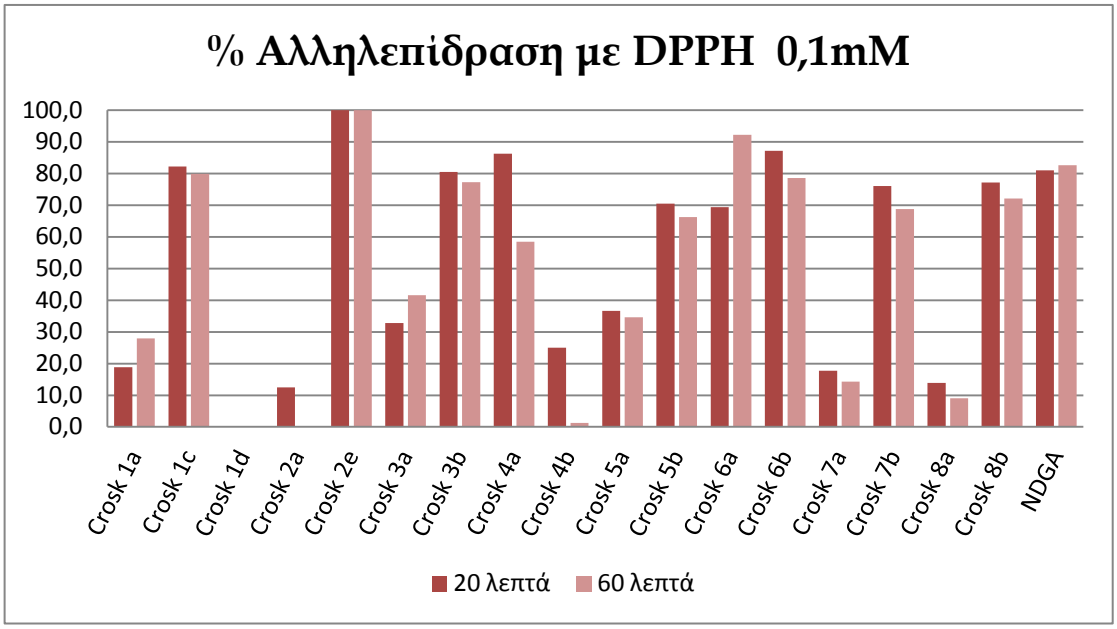
Εικόνα 41. *1,1-διφαινυλο-2-πικρυλυδραζυλική ρίζα (DPPH)*

Η αλληλεπίδραση των εξεταζόμενων ενώσεων με την ελεύθερη σταθερή ρίζα της 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλυδραζίνης (DPPH) (εικόνα 41), που είναι ένα τέτοιο οξειδωτικό σώμα, μπορεί να εκφράσει την αναγωγική ικανότητα των ενώσεων. Η ρίζα αυτή παρουσιάζει μεγάλη σταθερότητα, λόγω μεσομέρειας κατά την οποία το μονήρες ηλεκτρόνιο βρίσκεται κατανεμημένο σε ευρύτερη περιοχή [Gryglewski, 1987]. Όπως φαίνεται, πρόκειται για λιπόφιλο μόριο με το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο επικεντρωμένο στο άζωτο, όμως, λόγω εκτεταμένης συζυγίας στο μόριο εμφανίζεται ιδιαίτερα σταθερό, αφού το ηλεκτρόνιο κατανέμεται σε μεγάλη περιοχή. Η ρίζα DPPH, παρουσιάζει μεγάλη απορρόφηση στα 517 nm, ενώ μετά την αναγωγή της, η ρίζα προσλαμβάνει ένα πρωτόνιο και μετατρέπεται σε σταθερό διαμαγνητικό μόριο χάνοντας το έντονο χρώμα της.

Ο αποχρωματισμός που προκύπτει είναι στοιχειομετρικός και παρουσιάζεται όταν το ασύζευκτο μονήρες ηλεκτρόνιο συζεύγνυται, ενώ επιπλέον είναι αντιπροσωπευτικός της ικανότητας των ενώσεων να σαρώνουν τις σταθερές ελεύθερες ρίζες, ανεξάρτητα από οποιαδήποτε ενζυμική δραστηριότητα. Σε αυτήν την ιδιότητα του DPPH βασίζεται και ο φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της αναγωγικής ικανότητας των εξεταζόμενων ενώσεων.

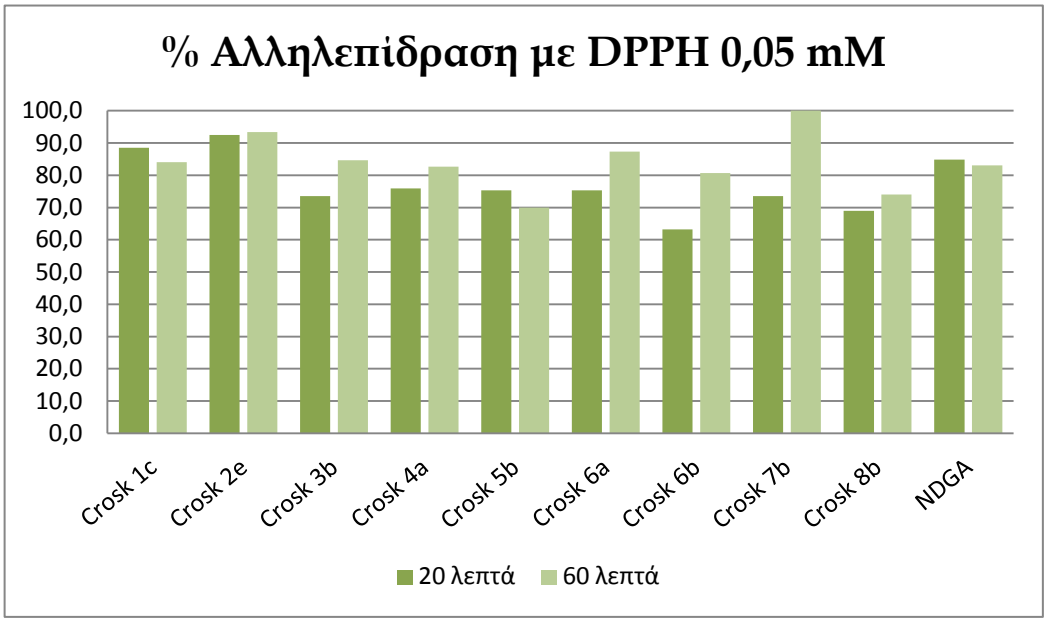
Η μελέτη της πορείας της αντίδρασης έγινε σε συνάρτηση με το χρόνο, κατόπιν 20 και 60 λεπτών (Πίνακας 12). Οι ενώσεις εξετάστηκαν σε συγκέντρωση 0,1mM.[Pontiki E and Hadjipavlou D., 2007] Στο πείραμα συμπεριλάβαμε και τις θειοσεμικαρβαζόνες του πρώτου σταδίου της

συνθετικής πορείας για να γίνει συσχέτιση της δράσης μεταξύ των δύο φαρμακοφόρων ομάδων: της βάσης Schiff και του θειαζολίου, καθώς επίσης έχει συμπεριληφθεί και το προϊόν της αναγωγής της crosk 1c σε crosk 1d για να επιβεβαιωθεί ο ρόλος της αζωμεθινικής ομάδας για την βιολογική δράση. Από τα αποτελέσματα των μετρήσεων για συγεντρώσεις 0,1mM φαίνεται ότι τα θειαζολικά παράγωγα crosk 1c, crosk 2e και crosk 6b αλληλεπιδρούν ισχυρότερα με την ελεύθερη σταθερή ρίζα DPPH και μάλιστα η crosk 1c και η crosk 2e εμφανίζουν αύξηση της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας σε σύγκριση με τις αντίστοιχες θειοσεμικαρβαζόνες τους : crosk 1a και crosk 2a. Η αλληλεπίδρασή τους δεν επηρεάζεται ιδιαίτερα με την πάροδο του χρόνου. Αρκετά καλή εμφανίζεται και η αντιοξειδωτική δράση των ενώσεων crosk 3b, crosk 7b και crosk 8b και μάλιστα το αντιοξειδωτικό τους προφίλ είναι πολύ καλύτερο από τις αρχικές τους θειοσεμικαρβαζόνες. Παρατηρούμε ότι στις ενώσεις crosk 4b και crosk 5b η αλλαγή θέσης της υδροξυλομάδας από την θέση 4 στην θέση 2 έχει σαν αποτέλεσμα αύξηση της δράσης , που μπορεί πιθανότατα να αιτιολογηθεί ως απότέλεσμα της μικρότερης παρεμπόδισης από τις δύο ογκώδεις tert-butyl ομάδες.



Γράφημα 1. % Αλληλεπίδραση των ενώσεων (0,1mM) με DPPH

Στη συνέχεια για τις ενώσεις που εμφάνισαν καλή δράση σε συγκέντρωση 0,1 mM πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις και σε συγκέντρωση 0,05mM και τα αποτελέσματα φαίνονται στο παρακάτω γράφημα:



Γράφημα 2. % Αλληλεπίδραση των ενώσεων (0,5 mM) με DPPH

Παρατηρείται διατήρηση της αντιοξειδωτικής δράσης χωρίς να μεταβάλλεται με την πάροδο του χρόνου συνεπώς η αλληλεπίδρασή τους με την ρίζα DPPH δεν επηρεάζεται από την μεταβολή του χρόνου ή της συγκέντρωσης.

Πίνακας 19. *Ποσοτική συσχέτιση των βιολογικών μας δεδομένων που αφορούν την ανασταλτική δράση των ενώσεων επί του DPPH*

No	Όνομα	Πειρ. Log% αναστολής DPPH 0.1mM	Θεωρ. Log% αναστολής DPPH 0.1mM	Δ log% αναστολής DPPH	Mg Vol
1	Crosk 1c	1,90	0,92	0,99	543,30
2	Crosk 2e	2	1,50	0,50	450,38
3	Crosk 3b	1,89	1,77	0,12	408,34
4	Crosk 4b	0,11	1,27	-1,16	486,52
5	Crosk 5b	1,82	1,27	0,55	486,52

6	Crosk 6b	1,90	1,67	0,23	424,34
7	Crosk 7b	1,84	2,09	-0,25	358,28
8	Crosk 8b	1,86	1,92	-0,06	384,32
9	Crosk 1d	0,0	0,90	-0,90	545,32

Προσπάθεια συσχέτισης της αντιοξειδωτικής δράσης(πίνακας 19) με τις φυσικοχημικές ιδιότητες των μορίων[Hansch C., 1995] κατέληξε στην επόμενη σχέση η οποία όμως δεν είναι πολύ ικανοποιητική από την άποψη του συντελεστή συσχέτισης r, ενώ στατιστικά είναι πολύ σημαντική:

Log(DPPH) %= -0,012(0,009)MgVol + 6,511(3,959)

$n = 7$, $r = 0,833$, $r^2 = 0,694$, $q^2 = 0,472$, $s = 0,545$, $F_{1,5}=11,35$, $\alpha=0,05$

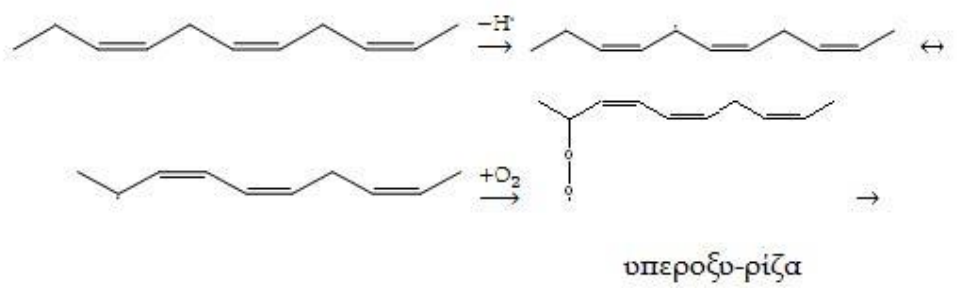
Από την ποσοτική συσχέτιση προκύπτει ο ρόλος των στερεοχημικών επιδράσεων, εκφρασμένος με την μορφή του μοριακού όγκου των μορίων MgVol και αρνητικό πρόσημο. Ενώσεις με μεγαλύτερο όγκο δεν μπορούν να προσεγγίσουν και να αλληλεπιδράσουν με το DPPH επιδεικνύοντας μικρή-μέτρια αντιοξειδωτική δράση.

Έγινε προσπάθεια μελέτης της ικανότητας των ενώσεων να αναστέλλουν τη λιπιδική υπεροξείδωση του λινελαϊκού οξέος που επάγεται από την παρουσία του AAPH (2,2΄- διαζο-2-αμιδινοπροπανίου)[Liégeois C. et al. 2000].

Η λιπιδική υπεροξείδωση είναι οξειδωτική αλλοίωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων που αποτελούν και βασικά συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών. Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα περιέχουν μη διακλαδιζόμενες αλυσίδες με άρτιο αριθμό ατόμων άνθρακα (συνήθως 14-24) με cis διπλούς δεσμούς και λόγω ιδιομορφίας της δομής τους συμβάλλουν στη ρευστότητα της κυτταρικής μεμβράνης. Κατά συνέπεια, κάθε αλλοίωση αυτών

συνεπάγεται τη μείωση της ρευστότητας και τελικώς την απώλεια της λειτουργικότητα της μεμβράνης.

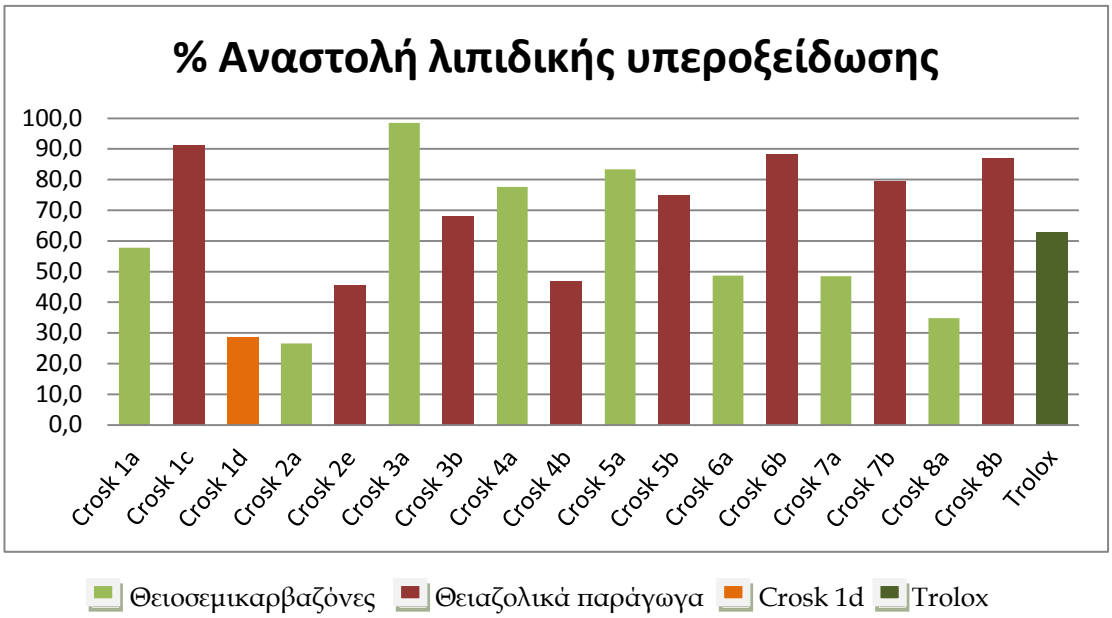
Η διαδικασία της λιπιδικής υπεροξείδωσης (εικόνα 42) ξεκινά με την προσβολή του πολυακόρεστου λιπαρού οξέος από οποιοδήποτε χημικό είδος ικανό να προκαλέσει την απόσπαση ατόμου υδρογόνου από μεθυλενική ομάδα, π.χ. ρίζα υδροξυλίου, ρίζα ανιόντος υπεροξειδίου κ.ά.. Μετά την απόσπαση του υδρογόνου, η επικεντρωμένη στο άτομο του άνθρακα λιπιδική ρίζα βρίσκεται σε ισορροπία με τη διενική της μορφή. Στη συνέχεια εισάγεται ένα μόριο οξυγόνου και προκύπτει η υπεροξυ-ρίζα, οπότε αρχίζει η διάδοση της αλυσιδωτής αντίδρασης που καλείται λιπιδική υπεροξείδωση. Η απόσπαση του υδρογόνου μπορεί να γίνει σε διάφορα σημεία της ανθρακικής αλυσίδας, π.χ. για το αραχιδονικό οξύ στους άνθρακες C-7, C-10 και C-13. Κύριο προϊόν είναι η μηλονική διαλδεΰδη, ενώ προκύπτουν και άλλα προϊόντα πολυμερισμού.



Εικόνα 42. ***Η διαδικασία της λιπιδικής υπεροξείδωσης***

Από τα πειραματικά αποτελέσματα προκύπτει ότι οι ενώσεις crosk 1c, crosk 5b, crosk 6b, crosk 7b και crosk 8b που δοκιμάστηκαν παρουσίασαν υψηλή ικανότητα αναστολής της λιπιδικής υπεροξείδωσης του λινελαϊκού οξέος με δράση που κυμαίνεται από 75-100%. Μάλιστα τα τελικά θειαζολικά παράγωγα εμφανίζουν μεγαλύτερη δράση σε σχέση με τις ενδιάμεσες θειοσεμικαρβαζόνες γεγονός που συνηγορεί στην επιλογή του συνδυασμού της θειαζολικής με την αζωμεθινική ομάδα για βελτιστοποίηση της δράσης.

Εξαίρεση αποτελεί η crosk 5a που έχει μεγαλύτερη δράση από το αντίστοιχο θειαζολικό παράγωγο crosk 5b. Η αναγωγή της crosk 1c έχει σαν αποτέλεσμα την απώλεια της υψηλής δράσης της όσον αφορά την αναστολή της λιπιδικής υπεροξείδωσης και δικαιολογείται από την απουσία της αζωμεθινικής ομάδας.



Γράφημα 3. % Αναστολή λιπιδικής υπεροξείδωσης 0,1mM

Στο συγκεκριμένο πείραμα η αντιοξειδωτική ικανότητα μπορεί να αποδοθεί στη σταθεροποίηση μέσω δομών συντονισμού, μιας ενδιάμεσης ρίζας, η οποία σχηματίζεται κατά την προσβολή του μορίου από μια ελεύθερη ρίζα με τελικό αποτέλεσμα την διακοπή της αλυσιδωτής αντίδρασης λιπιδικής υπεροξείδωσης.

Πίνακας 20. *Δεδομένα που αφορούν την ανασταλτική δράση των ενώσεων επί της λιπιδικής υπεροξείδωσης (LP)*

No	Όνομα	Πειρ. Log% αναστολής LP 0.1mM	Θεωρ. Log% αναστολής LP 0.1mM	Δ log% αναστολής LP	Mg Vol
1	Crosk 1c	1,96	1,70	0,26	543,30
2	Crosk 2e	1,66	1,81	-0,15	450,38
3	Crosk 3b	1,83	1,86	-0,03	408,34

4	Crosk 4b	1,67	1,77	-0,09	486,52
5	Crosk 5b	1,88	1,77	0,11	486,52
6	Crosk 6b	1,95	1,84	0,10	424,34
7	Crosk 7b	1,90	1,92	-0,02	358,28
8	Crosk 8b	1,94	1,89	0,05	384,32
9	Crosk 1d	1,46	1,69	-0,24	545,32

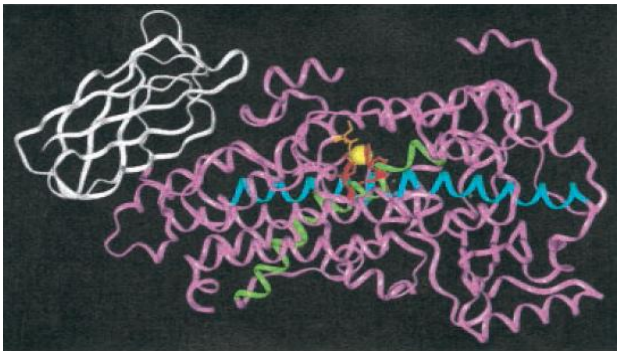
Προσπάθεια συσχέτισης της ικανότητας των ενώσεων να αναστέλλουν την λιπιδική υπεροξείδωση που επάγετα από ΑΑΡΗ με τις φυσικοχημικές ιδιότητες κατέληξε στην επόμενη σχέση:

Log(LP)%= -0,003(0,001)MgVol + 2,914(0,610)

$n = 7$, $r = 0,908$, $r^2 = 0,825$, $q^2 = 0,683$, $s = 0,084$, $F_{1,5}=23,71$, $\alpha=0,01$

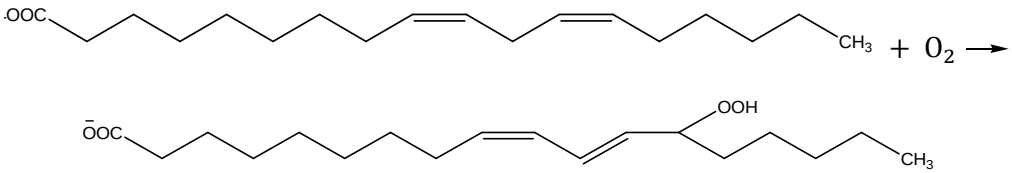
Αναλύοντας τα αποτελέσματα των ενώσεων που συσχετίσαμε φαίνεται ότι η αναστολή της λιπιδικής υπεροξείδωσης αυτή επηρεάζεται κύρια από τον μοριακό όγκο (MgVol) που περιγράφει στερεοχημικές επιδράσεις, και μάλιστα όσο αυξάνεται ο μοριακός όγκος τόσο ελαττώνεται η δράση (αρνητικό πρόσημο).

Η λιποξυγονάση είναι ένα μεταλλοένζυμο με καθοριστικό ρόλο στο μηχανισμό της φλεγμονής αφού καταλύει τη μετατροπή του αραχιδονικού οξέος στα λευκοτριένια, γνωστούς παράγοντες στην εκδήλωση των φλεγμονωδών αποκρίσεων που σχετίζονται με διάφορες ασθένειες .



Εικόνα 43. Δομή λιποξυγονάσης

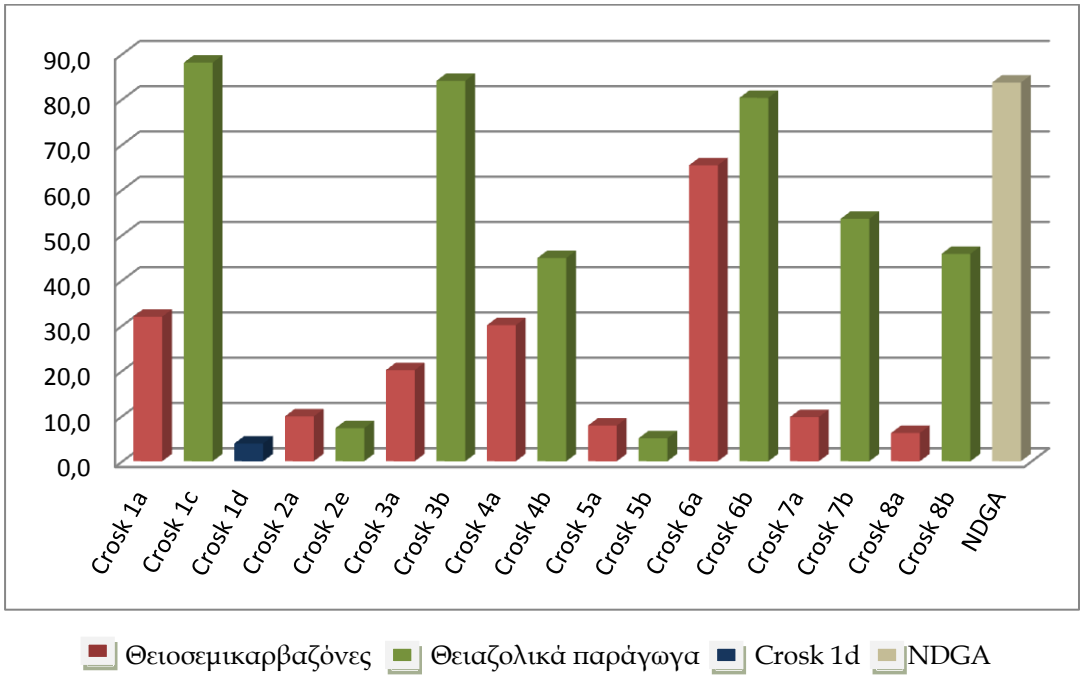
Οι ενώσεις που συντέθηκαν δοκιμάστηκαν για τη δράση τους στη λιποξυγονάση χρησιμοποιώντας σαν υπόστρωμα το λινελαϊκό οξύ [Pontiki E. and Hadjipavlou D., 2003, 2006]. Η λιποξυγονάση καταλύει την είσοδο δύο ατόμων οξυγόνου με τη μορφή της υπεροξυ-ρίζας στο άκρο ενός cis-1,4-διενίου. Το αλλυλικό υδρο-υπεροξείδιο που προκύπτει απορροφά στα 234 nm. Στην περίπτωση του λινελαϊκού οξέος, η αντίδραση ακολουθεί σχηματικά την παρακάτω πορεία (Εικόνα 44):



Εικόνα 44. Αντίδραση του λινελαϊκού οξέος με το οξυγόνο

Έχει βρεθεί ότι υπάρχει ποιοτική αναλογία μεταξύ της αναστολής που προκαλείται από NSAIDs στην φυτικής προέλευσης (σόγια) LOX και της αναστολής της ζωικής LOX [Taraborewala, R.B. and Kauffman, 1990]. Έτσι, η φυτική LOX μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μια απλή κατά προσέγγιση δοκιμασία αναστολής .

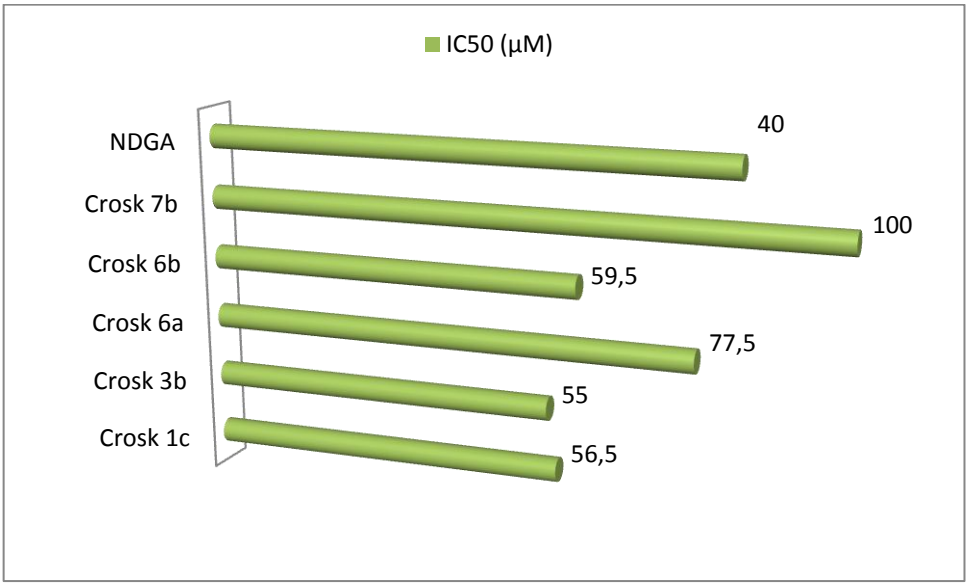
Τα αποτελέσματα δίνονται στο γράφημα 4



Γράφημα 4 % αναστολή Λιποξυγονάσης των ενώσεων

Ισχυρότερη αναστολή προκαλούν οι ενώσεις crosk 1c , crosk 3b και crosk 6b και ακολουθεί η crosk 7b. Οι αντίστοιχες θειοσεμικαρβαζόνες αν εξαιρέσουμε την crosk 6a δεν εμφανίζουν δράση, όπως και το προϊόν αναγωγής της crosk 1c. Η παρουσία δύο συζυγιακών δεσμών (crosk 8b) φαίνεται να οδηγεί σε σχετική μείωση αν συγκριθεί με το απλούστερο μόριο crosk 7b. Αντίθετα η αντικατάσταση της φαινυλο- ομάδας από την ναφθυλο- οδηγεί σε αύξηση της αναστολής.

Για τις ενώσεις προσδιορίστηκαν οι τιμές IC_{50} όπου ήταν δυνατόν υπό τις δοθείσες πειραματικές συνθήκες, όπως φαίνεται παρακάτω στο σχήμα 7.3.7:



Γράφημα 5. *In vitro* ικανότητα των ενώσεων να αναστέλλουν την LOX από σόγια.

Φαίνεται ότι ισχυρότερη είναι η crosk 3b αλλά και οι ενώσεις crosk 1c και crosk 6b παρουσιάζουν αρκετά κοντινές τιμές γεγονός που υποστηρίζει ότι πιθανά για την δράση αυτή τα μόρια δεν είναι εκλεκτικοί αναστολείς αλλά τα μόρια πιθανά λόγω του όγκου και της διαμόρφωσης τους να επηρεάζουν τον μακρομοριακό στόχο.

Πίνακας 21. *Δεδομένα που αφορούν την ανασταλτική δράση των ενώσεων επί της λιποξυγονάσης (LOX)*

No	Όνομα	Πειρ. Log% αναστολής LOX 0.1mM	Θεωρ. Log% αναστολής LOX 0.1mM	Δ log% αναστολής LOX	CMR
1	Crosk 1c	1,95	1,20	0,74	13,32
2	Crosk 2e	0,87	1,42	-0,55	12,08
3	Crosk 3b	1,93	1,59	0,33	11,10
4	Crosk 4b	1,65	1,21	0,45	13,28
5	Crosk 5b	0,70	1,21	-0,50	13,28
6	Crosk 6b	1,91	1,56	0,34	11,25
7	Crosk 7b	1,73	1,89	-0,16	9,41
8	Crosk 8b	1,66	1,68	-0,02	10,62
9	Crosk 1d	0,59	1,22	-0,63	13,19

Προσπάθεια συσχέτισης της συγκεκριμένης ανασταλτικής δράσης με τις φυσικοχημικές ιδιότητες οδήγησε στην επόμενη σχέση που παρουσιάζει χαμηλή τιμή συσχέτισης r μεταξύ των μεταβλητών αλλά περιγράφει χαρακτηριστικά τον ρόλο των στερεοχημικών επιδράσεων με την μορφή της μοριακής διαθλασιμότητας.

Log(LOX)%= -0,354(0,269)CMR + 5,434(3,130)

n =7 , r = 0,834 , r^2 = 0,696 , q^2 = 0,340 , s = 0,358, $F_{1,5}$=11,45 , α=0,05

Οι περισσότεροι αναστολείς της λιποξυγονάσης είναι αντιοξειδωτικές ενώσεις ή σαρωτές ελευθέρων ριζών [McMillan and Walker, 1992; Julemont, 2003]. Αυτό συνδυάζεται με το γεγονός ότι κατά την ενζυμική αντίδραση της LOX επί του υποστρώματος (ακόρεστο λιπαρό οξύ) εμφανίζεται/σχηματίζεται μια ρίζα άνθρακα. Τα αποτελέσματα από την αντιοξειδωτική μελέτη, συνηγορούν για την σχέση της αντιοξειδωτικής δράσης των ενώσεων με την ανασταλτική τους επί της LOX.

Υπάρχουν όμως και αναστολείς οι οποίοι εκδηλώνουν την δράση τους σαν συναρμοτές του σιδήρου (Fe) που βρίσκεται στο ενεργό κέντρο του μεταλλοενζύμου . Στη συγκεκριμένη περίπτωση και επειδή η δομή των ενώσεων υποστηρίζει βιβλιογραφικά αυτό τον μηχανισμό, εξετάσαμε το ενδεχόμενο να αναστέλλεται η λιποξυγονάση μέσω σχηματισμού συμπλόκου μεταξύ του τρισθενούς σιδήρου (Fe) του μεταλλοενζύμου με την ένωση-αναστολέα *in vitro*. Για τον σκοπό αυτό μελετήθηκε *in vitro* η πιθανότητα σχηματισμού συμπλόκου μεταξύ των ενώσεών μας με τριχλωριούχο σίδηρο $FeCl_3$.

Το κύριο χαρακτηριστικό των ενώσεων συναρμογής είναι η εμφάνιση χρώματος. Αυτή οφείλεται στις μεταπτώσεις ηλεκτρονίων μεταξύ κυρίως των τροχιακών, που εντοπίζονται στην τροχιά σθένους του μετάλλου και

εξαρτάται από τις διαφορές στις ενέργειές τους, οι οποίες με την σειρά τους εξαρτώνται από την γεωμετρική διάταξη των ligands γύρω από το μέταλλο.

Η φασματοσκοπική μέτρηση στην περιοχή του ορατού και του υπεριώδους τμήματος του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος πραγματοποιείται συνήθως σε διάλυμα της ένωσης σε κατάλληλο διαλύτη, ο οποίος πρέπει να τη διαλύει χωρίς να αντιδρά μαζί της , χωρίς να ανταγωνίζεται τα διάφορα ligands για τη συναρμογή προς το μεταλλικό κέντρο και χωρίς να υποβοηθά φωτοχημικές ή άλλου είδους δράσεις είτε στο μέταλλο είτε στο συναρμοσμένο ligand [Kesisoglou et al,2006]

Οι ενέργειες που απαιτούνται για ηλεκτρονικές μεταπτώσεις βρίσκονται κυρίως στην άπω υπεριώδη (Far UV), υπεριώδη (UV), ορατή (Vis) και εγγύς υπέρυθρη (Near IR) περιοχή του φάσματος. Τα συνήθη όργανα καλύπτουν την περιοχή από 50.000 cm^{-1} έως 5.000 cm^{-1} (200 έως 2000 nm)

Τα ηλεκτρονικά φάσματα (Uv-Vis) των ενώσεων που πήραμε καλύπτουν την περιοχή 190-900 nm και εστιάσαμε στις διεγέρσεις μεταξύ τροχιακών του μετάλλου και των ligands. Οι διαδικασίες αυτές είναι δύο τύπων, αναλόγως του ποια ενεργειακή κατάσταση αποτελεί την αφετηρία και ποια το τέλος της διέγερσης. Ονομάζονται ταινίες μεταφοράς φορτίου (Charge transfer, CT), επειδή στη διεγερμένη κατάσταση ένα ηλεκτρόνιο βρίσκεται σε τροχιακό που εντοπίζεται σε άλλο τμήμα του μορίου από εκείνο στο οποίο ανήκε στην βασική του κατάσταση. Έτσι οι τανίες αυτές διακρίνονται σε ταινίες μεταφοράς από το ligand προς το μέταλλο (Ligand-to-Metal CT, LMCT), ή από το μέταλλο προς το ligand (Metal-to-Ligand CT, MLCT). Και στις δύο περιπτώσεις το μεταλλικό ιόν βρίσκεται σε διαφορετική οξειδωτική βαθμίδα στη διεγερμένη κατάσταση από ότι στη βασική και για το λόγο αυτό το συγκεκριμένο τμήμα του φάσματος ονομάζεται και «φάσμα οξειδοαναγωγής».

Μελετώντας τα φάσματα απορρόφησης στο UV παρατηρούμε ότι εμφανίζεται μετατόπιση της ταινίας απορρόφησης του Fe με έντονη

απορρόφηση 0,215 στα 599 nm, συνεπώς η ένωση crosk 1c σχηματίζει σύμπλοκο με τον τρισθενή Fe (III). Δεν ισχύει το ίδιο για το προϊόν της αναγωγής της crosk 1c, οπότε συμπεραίνουμε ότι η παρουσία της αζωμεθινικής ομάδας στην crosk 1c σταθεροποιεί το σύμπλοκο με τον τρισθενή σίδηρο. Και για την crosk 6b εμφανίζεται απορρόφηση 0,250 στα 542 nm και το δεδομένο αυτό συμφωνεί με την υψηλή ανασταλτική δράση επί της LOX.

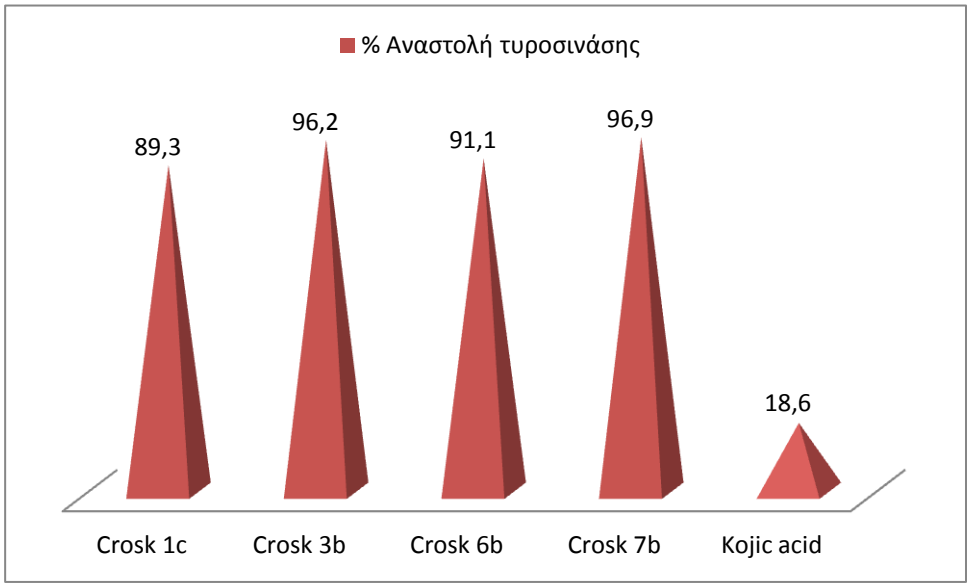
Η crosk 3b αν και εμφανίζει ανασταλτική δράση επί της LOX εν τούτοις δεν εμφανίζει ισχυρή απορρόφηση στο πείραμα, οπότε η αναστολή της LOX πιθανώς επιτυγχάνεται μέσω της αντιοξειδωτικής της δράσης. Αντίστοιχα ισχύουν και για την crosk 7b.

Σχετικά με τις ενώσεις που ανταποκρίνονται στο πείραμα αλλά δεν αναστέλλουν την λιποξυγονάση, διαθέτουν καλές ομάδες ligands για να συναρμοστούν με τον τρισθενή σίδηρο Fe(III), όμως προφανώς οι διαμορφώσεις τους στον χώρο εμποδίζουν την προσέγγιση τους στον σίδηρο (Fe) του ενεργού κέντρου του μεταλλοενζύμου.

Οι ενώσεις που εμφανίζουν ανασταλτική δράση επί της λιποξυγονάσης επιλέχθηκαν για να δοκιμασθεί η ικανότητα τους να αναστέλλουν δύο άλλα μεταλλοένζυμα : την τυροσινάση και την οξειδάση της ξανθίνης.

Η τυροσινάση είναι ένα μεταλλοένζυμο που σχετίζεται με φλεγμονώδεις αποκρίσεις του οργανισμού στο δέρμα και την βιοσύνθεση της μελανίνης. Η τυροσινάση διαθέτει στο ενεργό της κέντρο δύο ιόντα χαλκού (Cu) και στο πείραμα που αφορά την αναστολή της γίνεται προσπάθεια να μελετηθεί η ικανότητα των νέων ενώσεων να αναστέλλουν την τυροσινάση μανιταριού που δίνει συγκρίσιμα αποτελέσματα με την ανθρώπινη τυροσινάση [Chioua M. et al, 2012]. Η ανασταλτική δράση πιθανά να οφείλεται στον σχηματισμό συμπλόκων με τους χαλκούς του ενεργού κέντρου

όπως αναφέρεται και σε σχετική βιβλιογραφία [Y. M. Ha et al. 2011]. Τα αποτελέσματα δίνονται σε σύγκριση με το κοϊκό οξύ που χρησιμοποιείται σαν ένωση αναφοράς:



Γράφημα 6. *In vitro % αναστολή τυροσινάσης*

Και οι τέσσερις ενώσεις crosk 1c, crosk 3b, crosk 6b και crosk 7b εμφάνισαν πολύ καλή ανασταλτική δράση επί της τυροσινάσης και μάλιστα πολύ καλύτερη από την ένωση αναφοράς : το κοϊκό οξύ.

Προκαταρκτικές μελέτες συσχέτισης της συγκεκριμένης ανασταλτικής δράσης με τις φυσικοχημικές ιδιότητες οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η χαμηλή λιποφιλικότητα παίζει ρόλο στην δραστικότητα των ενώσεων και μάλιστα όσο πιο υδρόφιλη είναι η ένωση τόσο μεγαλύτερη η δράση που παρουσιάζει (r^2=0,865).

Η οξειδάση της ξανθίνης αποτελεί ένα μεταλλοένζυμο στόχο για την θεραπεία της ουρικής αρθρίτιδας όπου εμφανίζονται υψηλά επίπεδα ουρικού οξέος. Αναστέλλοντας την δράση της οξειδάσης της ξανθίνης μειώνεται η παραγωγή ριζών υπεροξειδικού ανιόντος και ελαττώνονται τα επίπεδα του ουρικού οξέος. Εκτιμήθηκαν οι ενώσεις ως προς την εμφάνιση ανασταλτικής

δράσης επί της οξειδάσης της ξανθίνης σε υπόστρωμα ξανθίνη. Στις δοθείσες πειραματικές συνθήκες τα παράγωγα που εξετάσαμε δεν αλληλεπιδρούν με την οξειδάση της ξανθίνης.

Προκειμένου να διαπιστωθεί αν οι ενώσεις που παρουσιάζουν αναστολή των μεταλλοενζύμων που εμπλέκονται στην φλεγμονή εκδηλώνουν αντιφλεγμονώδη δράση *in vivo,* μελετήσαμε την επίδραση των ενώσεων στη φλεγμονή από καρραγενίνη για 3,5 ώρες μετά τη χορήγηση του φλογιστικού. Η καραγεννίνη είναι ένα γνωστό φλογιστικό μέσο που μπορεί να προκαλέσει επαγωγή της φλεγμονής. Ειδικότερα, η καραγεννίνη είναι πολυσακχαρίτης του φύκους Chondrus crispus, ενώ είναι γνωστές 5 μορφές της (κ,λ,μ,ν,ι) που διαφέρουν ως προς το βαθμό σουλφούρωσης και την αναλογία της λακτόζης.

Το οίδημα από καραγεννίνη χαρακτηρίζεται ως διφασικό. Κατά την πρώτη φάση η ανάπτυξη του οιδήματος οφείλεται στην απελευθέρωση της ισταμίνης και της σεροτονίνης και διαρκεί 0,5-1,5 ώρα μετά από τη χορήγηση του φλογιστικού. Η δεύτερη φάση (3-6 ώρες) χαρακτηρίζεται από τη συμμετοχή των προσταγλανδινών. Στη φάση αυτή λαμβάνει χώρα η μετανάστευση των λευκοκυττάρων (πολυμορφοπύρηνα ουδετερόφιλα), καθώς και η απελευθέρωση των λυσοσωμικών ενζύμων. Ανάμεσα στις δύο φάσεις παρεμβάλλεται η φάση των κινινών (1,5-2,5 ώρες).

Η αντιφλεγμονώδης δράση των όξινων μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων (NSAIDs) είναι συχνά ασθενής στην πρώτη φάση του οιδήματος καρραγενίνης, σε αντίθεση με την επόμενη φάση, όπου συμμετέχουν οι προσταγλανδίνες και εκδηλώνεται ισχυρή αντιφλεγμονώδης δράση.

Η δοσολογία των ενώσεων, που χορηγούνται ενδοπεριτοναϊκά είναι 0,01 mmol/kg σωματικού βάρους. Το ίδιο χρονοδιάγραμμα εφαρμόζεται και στη χορήγηση ινδομεθακίνης (ένωση αναφοράς), ενός κλασικού αναστολέα της κυκλοξυγονάσης [Pontiki and Hadjipavlou, 2003, 2006]. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα από την *in vivo* πειραματική δοκιμασία , η ένωση crosk 1c

παρουσιάζει ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση 48%, συγκρίσιμη με την ένωση αναφοράς : ινδομεθακίνη 47% , ενώ οι υπόλοιπες ενώσεις δεν παρουσιάζουν υψηλή δράση.

Προσπάθεια συσχέτισης της συγκεκριμένης αντιφλεγμονώδους δράσης με τις φυσικοχημικές ιδιότητες οδήγησε στο συμπέρασμα ότι ο όγκος των μορίων(MgVol) είναι καθοριστικός για την αύξηση της δράσης.

Πίνακας 22. *Δεδομένα που αφορούν την ανασταλτική δράση των ενώσεων επί φλεγμονής που επάγεται από καρραγενίνη (CPE)*

No	Όνομα	Πειρ. Log% αναστολής CPE 0.1mM	Θεωρ. Log% αναστολής CPE 0.1mM	Δ log% αναστολής CPE	Mg Vol
1	Crosk 1c	1,68	1,70	-0,02	543,30
3	Crosk 3b	1,41	1,35	0,06	408,34
5	Crosk 5b	1,56	1,55	0,01	486,52
7	Crosk 7b	1,22	1,22	0,0	358,28
8	Crosk 8b	1,23	1,29	-0,05	384,32

Log(CPE)%= 0,003(0,001)MgVol + 0,290(0,432)

n =5 , r = 0,980 , r^2 = 0,959 , q^2 = 0,909 , s = 0,047, $F_{1,3}$=67,71 , α=0,1

Όπως φαίνεται η ανασταλτική δράση επί της φλεγμονής που προκαλείται κατόπιν χορήγησης καραγεννίνης στο άκρο ποδός επίμυα σχετίζεται με τον μοριακό όγκο (MgVol) που περιγράφει στερεοχημικές επιδράσεις.

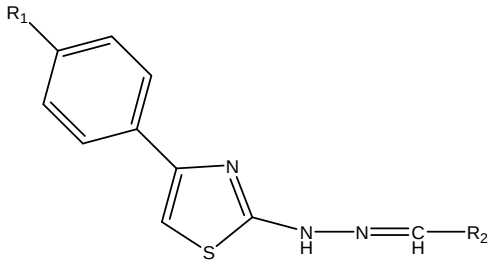
Εξετάσαμε συνδυαστικά και ενώσαμε τα δεδομένα της βιβλιογραφίας με τα παραπάνω, ώστε να διαπιστώσουμε αν ακολουθείται ο ίδιος μηχανισμός δράσης και αν οι ίδιες φυσικοχημικές ιδιότητες παίζουν ρόλο. Προκύπτει ότι η % αναστολή της φλεγμονής (Log% CPE) σχετίζεται με την στερεοχημεία των μορίων (είτε σαν μοριακή διαθλασιμότητα, CMR, είτε σαν μοριακός όγκος, MgVol) και με την παρουσία του βρωμίου (δείκτης I-4 που παίρνει τιμή «1» όταν ο υποκαταστάτης R_1 είναι βρώμιο). Ο δείκτης I-4 είναι ποιοτικός και εκφράζει την σημασία της παρουσίας του Br στο βιολογικό αποτέλεσμα. Η λιποφιλικότητα δεν φαίνεται να διαδραματίζει κάποιο ρόλο (r=0,034) . Γενικά η εξίσωση δεν είναι πολύ σημαντική από την άποψη του συντελεστή συσχέτισης. Περιγράφει με αδρομερή τρόπο τις φυσικοχημικές ιδιότητες που επηρεάζουν την δράση. Η διακύμανση είναι πολύ μικρή και επηρεάζει την ποιότητα των στατιστικών χαρακτηριστικών.

$$Log(CPE)\% = -0.103(0.076)CMR + 0.329(0.208)I\text{-}4 + 2.548(0.762)$$

$$n = 14,\ r = 0.755,\ r^2 = 0.571,\ q^2 = 0.342,\ s = 0.152,\ F_{2,11}=1.33,\ a=0.1$$

ClogP vs CMR=0.671, ClogP vs I_4=0.347, CMR vs I_4=0.195

Πίνακας 23. *Δομές , βιολογικά δεδομένα της βιβλιογραφίας και της πειραματικής μας προσπάθειας*



No	R_1	R_2	Υπολ. Log% αναστολής CPE	Δ log% αναστολής CPE	Πειρ. Log% αναστολής CPE	CMR	I-4
1	OCH_3	C_6H_5	1.67	0.05	1.72	9.25	0
2	OCH_3	C_6H_4F	1.67	-0.07	1.60	9.27	0

3	OCH_3	C_6H_4OH	1.67	-0.17	1.50	9.41	0
4	OCH_3	$C_6H_2(OCH_3)_3$	1.66	-0.35	1.31	11.10	0
***5**	OCH_3	$C_6H_3(OCH_3)_2$	1.67	0.18	1.85	10.49	0
6	OCH_3	$C_6H_4NO_2$	1.67	-0.10	1.57	9.87	0
7	Br	C_6H_5	1.67	0.27	1.94	9.41	1
8	Br	$C_6H_4OCH_3$	1.67	0.26	1.93	10.03	1
9	Br	$C_6H_3(OH)_2$	1.67	0.26	1.93	9.72	1
10	Br	$C_6H_2(OCH_3)_3$	1.67	-0.19	1.48	11.26	1
11	Br	$C_6H_4NO_2$	1.67	0.21	1.88	10.03	1
12	Br	$CH_2CH=CHC_6H_5$	1.67	0.22	1.89	10.70	1
13	Br	$-C_6H_4OCH_2C_6H_4Br$	1.68	0.00	1.68	13.32	1
14	Br	-napthalene	1.68	-0.27	1.41	11.10	1
15	Br	3,5-di-tert-butyl-2-hydroxybenzene	1.69	-0.13	1.56	13.28	1
***16**	Br	C_6H_5	1.67	-0.45	1.22	9.41	1
***17**	Br	$CH_2CH=CHC_6H_5$	1.67	-0.44	1.23	10.70	1

*Ενώσεις που δεν συμπεριλήφθηκαν στην εξαγωγή της σχέσης (3).

Βιβλιογραφίες

1. Billman John H., Kwang M. Tai, *J. Org. Chem.*, 1958, Vol 23, 535-539
2. Bharti S.K., G. Nath, R. Tilak, S.K. Singh, *European J. Med.Chem.*, 2010, 45, 651-660
3. Chioua M. et al, *J. Med. Chem.*, 2012, 55(1),153-68.
4. Gryglewski R.J., Korbut R., Robak J., Swies J., *Biochem. Pharmacol*. 1987, 36, 317-322
5. Ha Y.M. et al. 2011] / *Bioorg. Med. Chem. Lett. 21* (2011) 2445–2449
6. Hansch C.; Leo A. Exploring QSAR, *Fundamentals and applications in Chemistry and Biology,* ACS Professional Reference Book, **1995**
7. Ikemoto N.; Liu J.; Brands K.M.J.; McNamara J.M.; Reider P.J.; *Tetrahedron*, 2003, Volume 59, Issue 8, 1317-1325
8. Khan K.M. et al , *Biorg. Med. Chem.*, 2006, 14, 6027-6033.

9. Liégeois C.; Lermeau G.; Collins S. *J. Agric. Food Chem*. 2000, 48, 1129-1134
10. McMillan R.M.; Walker E.R. *Trends Pharmacol. Sci*. 1992, 13, 323
11. Pontiki E. and Hadjipavlou-Litina D., Arzneim. Forsch./*Drug Res.,* 2003, 53, 780.
12. Pontiki E.; Hadjipavlou-Litina D. *Med. Chem,* 2006, 2, 251-264
13. Pontiki E.; Hadjipavlou-Litina D. *Bioorg. Med. Chem*. 2007, 15, 5819-5827
14. Qiao Q.; So S.S.; Goodnow Jr. R.A.; *Org. Lett*., 2001; Volume 3 Issue 23, 3655-3658
15. Quansehng Ding, Dongjian Zhu, Huile Jin, Jiuxi Chen, Jinchang Ding, and Huayue Wu, *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, 2011, 186:2, 220-224
16. Silverstein R.M.; Webster F. *Spectrometric Identification of organic compounds* 4th Ed. Wiley, **1981**
17. Taraborewala R.B.; Kauffman J.M. *J. Pharm. Sci*. 1990, 173
18. Κεσίσογλου Δ., Ακρίβος Π., Ασλανίδης Π., Καραφίλογλου Π., Δενδρινού-Σαμαρά Α., *Βιοσυναρμοστική Χημεία*, τόμος ΙΙ, Εκδόσεις ΖΗΤΗ , Μάρτιος 2006

8. Συμπεράσματα

Μελετήσαμε τη σύνθεση και τη βιολογική δράση μιας σειράς νέων 2,4-υποκατεστημένων θειαζολικών παραγώγων που φέρουν αζωμεθινικό δεσμό.

1. Συνθέσαμε 8 ενδιάμεσα παράγωγα που είναι βάσεις Schiff θειοσεμικαρβαζονών και 8 τελικά θειαζολικά παράγωγα που φέρουν αζωμεθινικό δεσμό από τα οποία τα 6 είναι πρωτότυπα και στα δύο στάδια. Για την σύνθεση αξιοποιήσαμε τα αποτελέσματα προκαταρκτικής ανάλυσης QSAR που αφορούν κυρίως 2,4-διϋποκατεστημένα θειαζολικά παράγωγα που εκδηλώνουν αντιφλεγμονώδη δράση.
2. Τα ενδιάμεσα προϊόντα-θειοσεμικαρβαζόνες που συνθέσαμε λαμβάνονται μέσω αντίδρασης συμπύκνωσης κατάλληλα υποκατεστημένης αρυλαλδεΰδης σε αλκοολικό διάλυμα με θειοσεμικαρβαζίδιο και παρουσία σταγόνων παγόμορφου οξικού οξέος
3. Τα τελικά προϊόντα που συνθέσαμε λαμβάνονται μέσω αντίδρασης σύνθεσης θειαζολίων κατά Hantzsch από ένα μίγμα θειοσεμικαρβαζονών και βρωμο-φαινακυλο-βρωμιδίου, παρουσία Na_2CO_3.
4. Οι νέες ενώσεις λαμβάνονται με αποδόσεις από 43 έως 100%. Έγιναν προσπάθειες για την εφαρμογή πράσινης χημείας στην συνθετική πορεία.
5. Οι δομές όλων των ενώσεων που συντέθηκαν, επιβεβαιώθηκαν με στοιχειακές αναλύσεις και φασματοσκοπική εξέταση IR, ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR και MS.
6. Προσδιορίστηκαν υπολογιστικά οι τιμές διαφόρων φυσικοχημικών παραμέτρων όλων των ενώσεων με διάφορα υπολογιστικά προγράμματα.
7. Μελετήθηκε η δράση των ενώσεων σε διάφορα πειραματικά πρωτόκολλα φαρμακοχημικών δοκιμασιών *in vitro* και *in vivo* και έγινε

προσπάθεια να διευκρινισθεί ο ρόλος των δομικών χαρακτηριστικών στη δράση και ο μηχανισμός δράσης.

8. Οι ενδιάμεσες θειοσεμικαρβαζόνες και οι τελικές ενώσεις μελετήθηκαν για τη δυνατότητα τους να αλληλεπιδρούν με την ελεύθερη ρίζα του DPPH στις συγκεντρώσεις (0,05mM και 0,1mM σε δύο διαφορετικούς χρόνους (20min και 60min). Από τις 16 ενώσεις οι crosk 1c, crosk 2e, crosk 3b, crosk 5b, crosk 6b, crosk 7b και crosk 8b έδειξαν ισχυρή αλληλεπίδραση με τη σταθερή ελεύθερη ρίζα DPPH και μάλιστα πολύ καλύτερη σε σχέση με τις αντίστοιχες θειοσεμικαρβαζόνες τους. Βελτίωση της δράσης από τις θειοσεμικαρβαζόνες προς τα τελικά προϊόντα δεν παρατηρήθηκε μόνο για τις θειοσεμικαρβαζόνες crosk 5a και crosk 6a. Επίσης δεν παρατηρήθηκε μεταβολή της δράσης σε σχέση με τη συγκέντρωση και το χρόνο.

9. Οι περισσότερες ενώσεις crosk 1c, crosk 5b, crosk 6b, crosk 7b και crosk 8b παρουσίασαν υψηλή ικανότητα αναστολής της λιπιδικής υπεροξείδωσης του λινελαϊκού οξέος που επάγεται από το AAPH. Μάλιστα τα τελικά θειαζολικά παράγωγα εμφανίζουν μεγαλύτερη δράση σε σχέση με τις ενδιάμεσες θειοσεμικαρβαζόνες γεγονός που συνηγορεί στην επιλογή του συνδυασμού της θειαζολικής με την αζωμεθινική ομάδα για βελτιστοποίηση της δράσης. Εξαίρεση αποτελεί η crosk 5a που έχει μεγαλύτερη δράση από το αντίστοιχο θειαζολικό παράγωγο crosk 5b. Η αναγωγή της crosk 1c είχε σαν αποτέλεσμα την απώλεια της ανασταλτικής δράσης επί της λιπιδικής υπεροξείδωσης, γεγονός που δικαιολογείται από την απώλεια της αζωμεθινικής ομάδας.

10. Η αναστολή της λιποξυγονάσης φυτικής προέλευσης μελετήθηκε σε όλες τις ενώσεις και έγινε προσπάθεια υπολογισμού των τιμών IC_{50}. Ισχυρότερη αναστολή προκαλούν οι ενώσεις crosk 1c , crosk 3b και crosk 6b και ακολουθεί η crosk 7b. Οι αντίστοιχες θειοσεμικαρβαζόνες αν εξαιρέσουμε την crosk 6a δεν εμφανίζουν δράση, όπως και το προϊόν

αναγωγής της crosk 1c. Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες των ενώσεων φαίνεται να δικαιολογούν την αντι-LOX δράση.

11. Μελετήθηκαν τα τελικά προϊόντα ως προς την ικανότητά τους να σχηματίζουν σύμπλοκο με τον τρισθενή σίδηρο του $FeCl_3$ στην προσπάθεια να εξηγήσουμε ή να προτείνουμε ένα μηχανισμό δράσης. Βρέθηκε ότι για τις ενώσεις crosk 1c και crosk 6b ο πιθανός τρόπος αναστολής της LOX είναι μέσω σχηματισμού συμπλόκου με το τρισθενή σίδηρο του ενεργού κέντρου του μεταλλοενζύμου , ενώ για την crosk 3b δεν ισχύει κάτι τέτοιο.

12. Οι τέσσερις ενώσεις crosk 1c, crosk 3b, crosk 6b και crosk 7b εμφάνισαν πολύ καλή ανασταλτική δράση επί της τυροσινάσης (>89%).

13. Οι ενώσεις που δοκιμάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν την οξειδάση της ξανθίνης δεν έδειξαν αποτελέσματα.

14. Επιλέχθηκαν και μελετήθηκαν μερικές ενώσεις *in vivo* για την αντιφλεγμονώδη τους δράση με το πείραμα της καρραγενίνης (ενδοπεριτοναϊκή έγχυση 0,01 mmol/ Kg σωματικού βάρους). Η crosk 1c εμφανίζει αναστολή κατά 48%.

15. Για τις νέες ενώσεις που συνθέσαμε έγινε ακόμη προσπάθεια συσχέτισης των *in vitro* βιολογικών δράσεων που προσδιορίστηκαν, με επιλεγμένες φυσικοχημικές ιδιότητες καθώς και προσπάθεια συσχέτισης των σχέσεων που προέκυψαν με προηγούμενες που αναφέρθηκαν, με σκοπό τη συγκριτική τους μελέτη. Οι τιμές των φυσικοχημικών ιδιοτήτων που χρησιμοποιήθηκαν είτε προέρχονται από βιβλιογραφικές πηγές, είτε υπολογίστηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος *C-QSAR*. Σημαντικό ρόλο φαίνεται να παίζουν η μοριακή διαθλασιμότητα(CMR) και ο μοριακός όγκος (MgVol) που εκφράζουν στερεοχημικές επιδράσεις.

16. Στην παρούσα μελέτη QSAR φαίνεται να διαδραματίζει θετικό και κύριο ρόλο ο μοριακός όγκος (Mg Vol) για την in vivo

αντιφλεγμονώδη δράση. Κατά συνέπεια, η δράση μπορεί να βελτιωθεί με τη σύνθεση μορίων με μεγαλύτερο μοριακό όγκο.

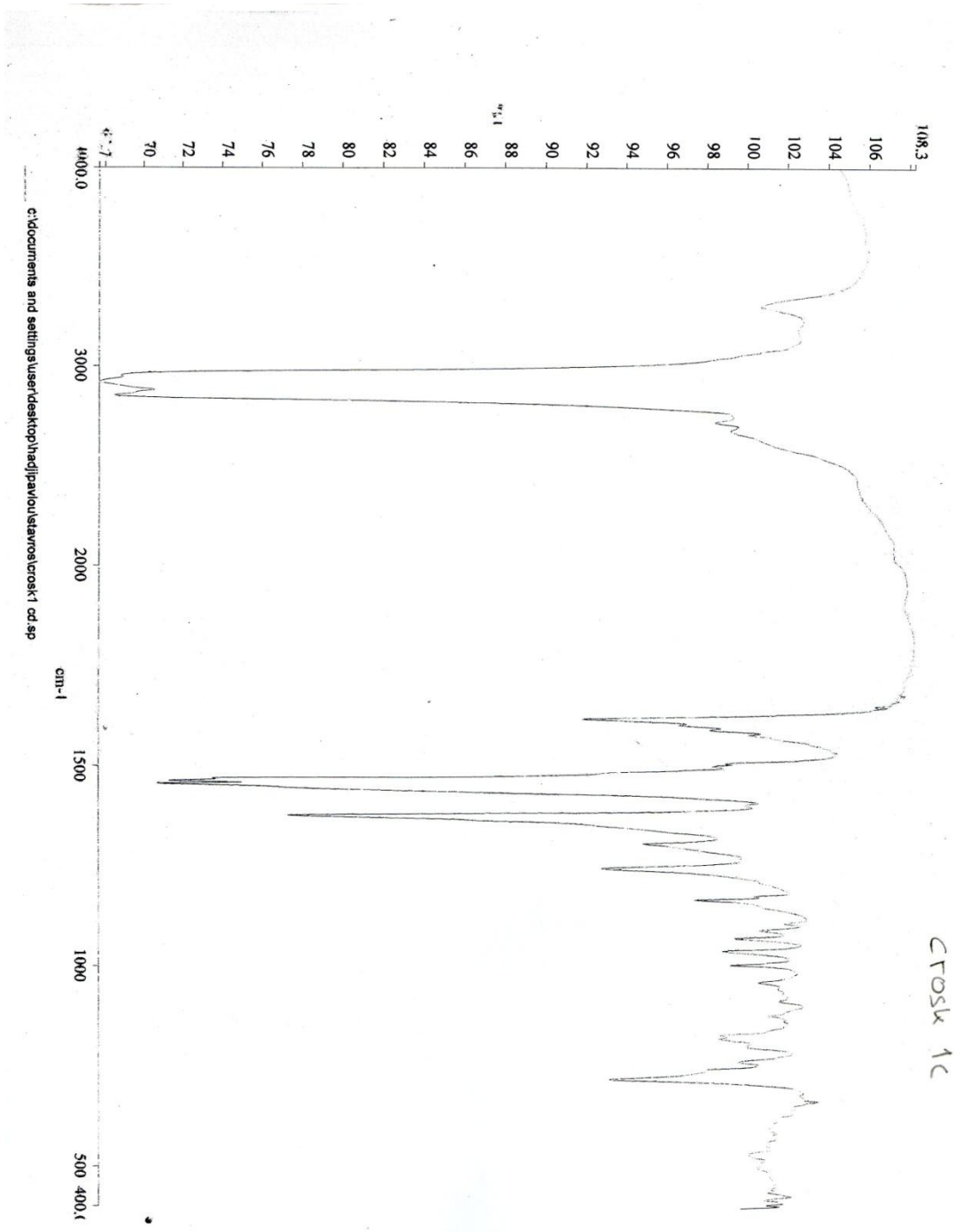
17. Από τα αποτελέσματα που λάβαμε επιβεβαιώνεται η ύπαρξη της προβλεφθείσας βιολογικής δράσης για τις ενώσεις που συνθέσαμε, ενώ μπορούμε να καταλήξουμε με ασφάλεια σε συμπεράσματα όσον αφορά στα δομικά και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των υπό εξέταση παραγώγων, τα οποία είναι σημαντικά για την εμφάνιση δράσης: ο συνδυασμός δηλαδή της αζωμεθινικής ομάδας και του θειαζολικού δακτυλίου.

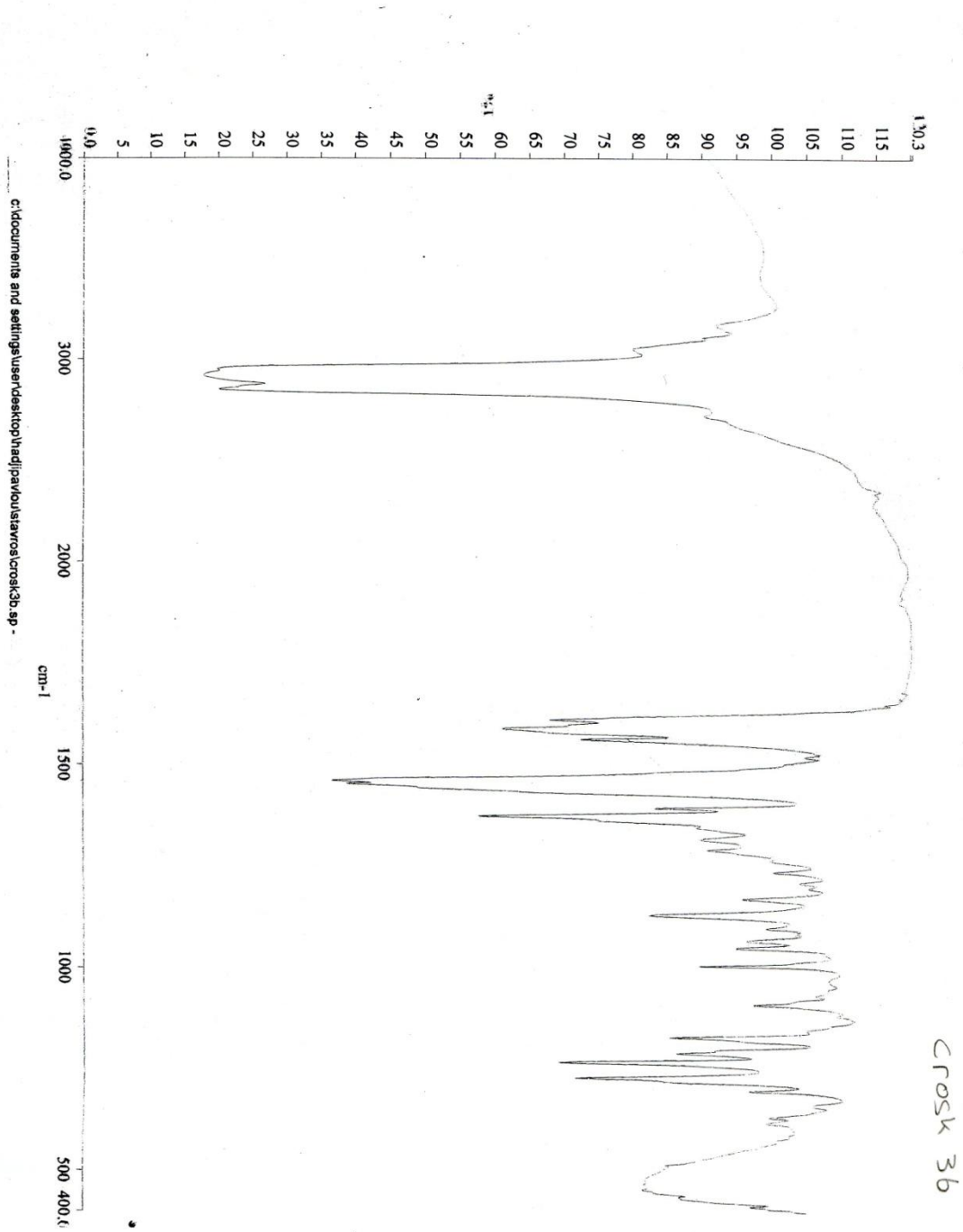
Προοπτικές

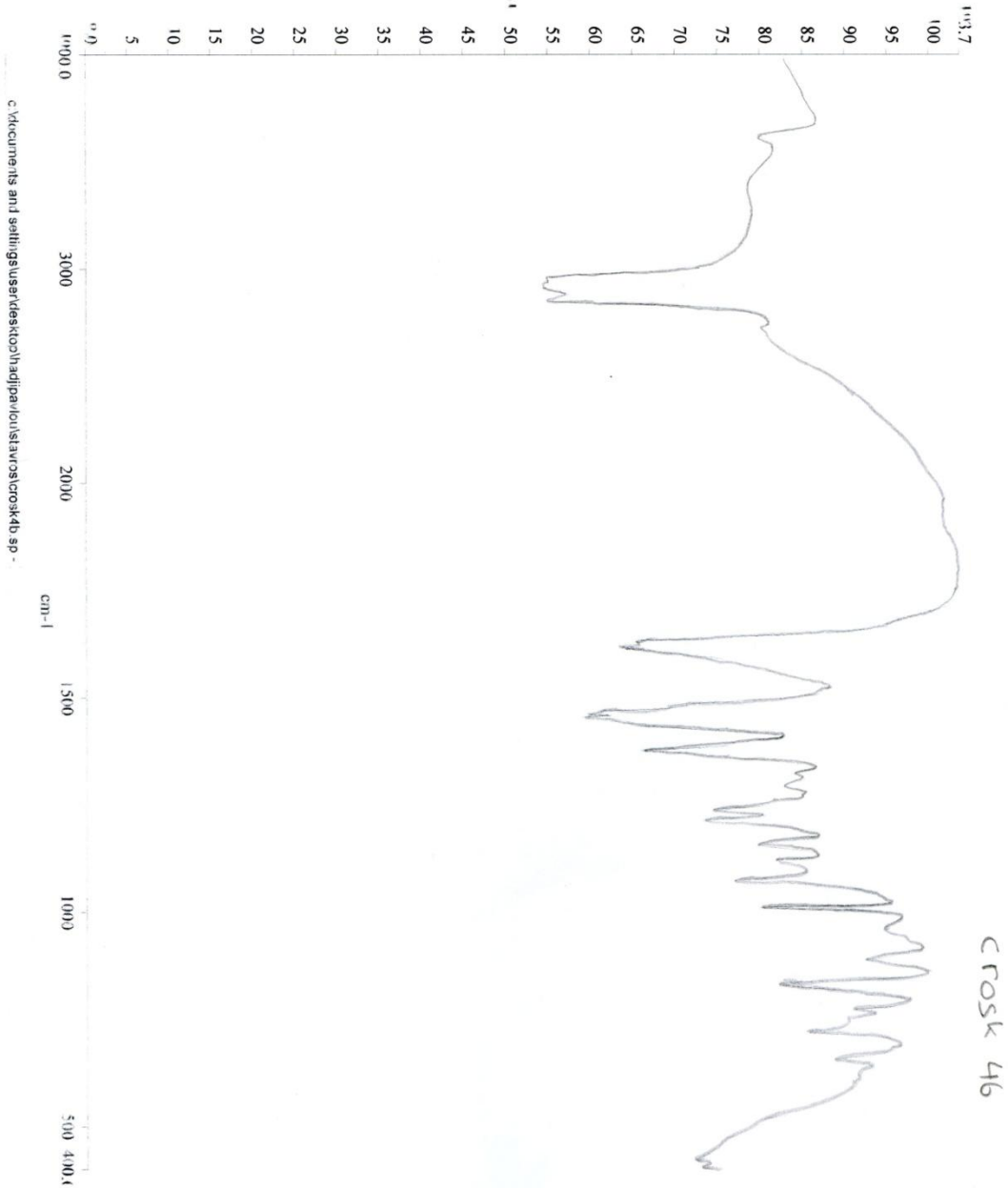
- Από τα αποτελέσματα που λαμβάνονται επιβεβαιώνεται η ύπαρξη της προβλεφθείσας αντιφλεγμονώδους-αντιοξειδωτικής-ανασταλτικής δράσης επί συγκεκριμένων μεταλλοενζύμων για τις νέες ενώσεις και εξάγονται συμπεράσματα σχετικά με τα δομικά και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των εξεταζόμενων ενώσεων, τα οποία είναι σημαντικά για την εμφάνιση της δράσης.
- Η ένωση **crosk 1c** που φαίνεται να αναστέλλει ικανοποιητικά τόσο την λιποξυγονάση και την τυροσινάση *in vitro* όσο και την επαγόμενη από καρραγενίνη φλεγμονή *in vivo,* μπορεί να αποτελέσει οδηγό ένωση στο σχεδιασμό μορίων με αντιφλεγμονώδη δράση.
- Τα συμπεράσματα που έχουν εξαχθεί από τις Ποσοτικές Σχέσεις Δομής – Δράσης (QSARs) τόσο των νέων ενώσεων για τις διάφορες δράσεις όσο και των άλλων ενώσεων που δρουν ως αντιφλεγμονώδη/αντιοξειδωτικά, μπορούν να αποτελέσουν σημαντικό οδηγό για το σχεδιασμό νέων ενώσεων.
- Συνολικά θεωρούμε ότι οι ενώσεις, μπορούν να μας δώσουν πολύ χρήσιμα συμπεράσματα και πληροφορίες για τις σχέσεις δομής δράσης και για το σχεδιασμό πολυδραστικών μορίων που να στοχεύουν μεταλλοένζυμα που εμπλέκονται στη φλεγμονή.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ-ΦΑΣΜΑΤΑ

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ ΦΑΣΜΑΤΩΝ ΥΠΕΡΥΘΡΟΥ (IR)

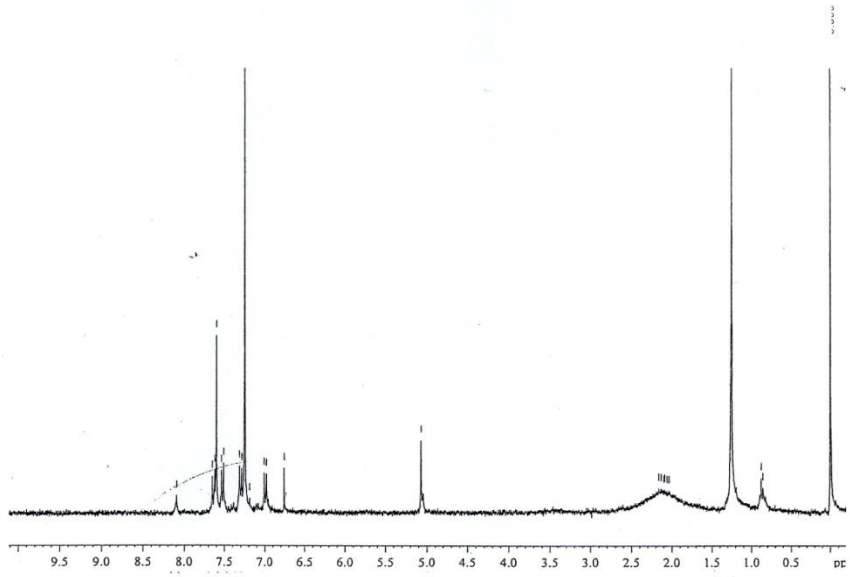

108.3
106
104
102
100
98
96
94
92
90
88
86
84
82
80
78
76
74
72
70
4000.0
3000
2000
1500
1000
500 400.0
cm-1
c:\documents and settings\user\desktop\hadjipaviou\stavros\crosk1 cd.sp
crosk 1c

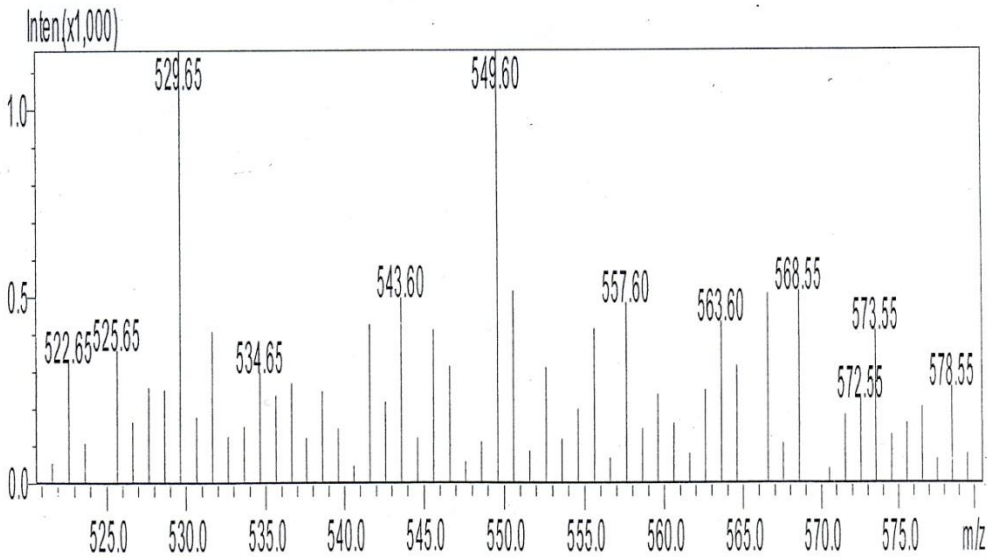

Crosk 3b
%T
cm-1
4000.0
3000
2000
1500
1000
500 400.0
c:\documents and settings\user\desktop\hadjipaviou\stavros\crosk3b.sp -


crosk 46
cm-1
3000
2000
1500
1000
500
4000
3000
2000
c:\documents and settings\user\desktop\haidjpa\louis\avrosi\crosk4b.sp

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ ΦΑΣΜΑΤΩΝ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ ΠΡΩΤΟΝΙΟΥ (^{1}H –NMR), ΑΝΘΡΑΚΑ (^{13}C –NMR) ΚΑΙ ΦΑΣΜΑΤΟΣ ΜΑΖΩΝ [MS(ESI)]

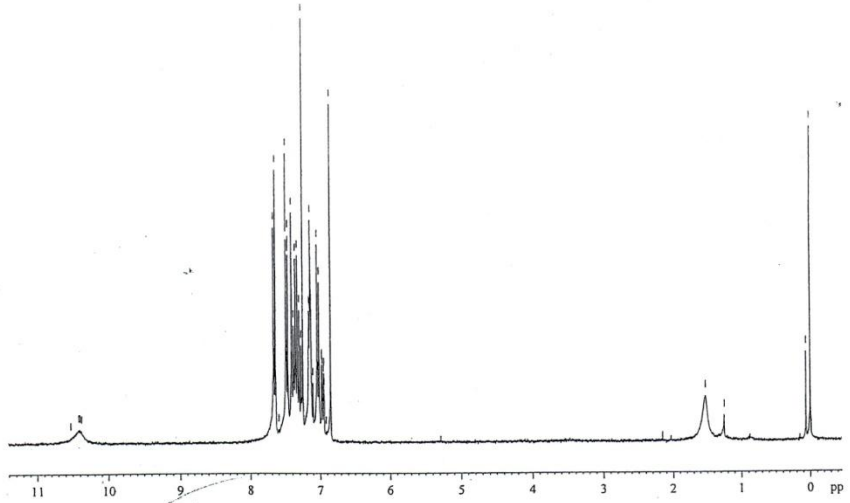
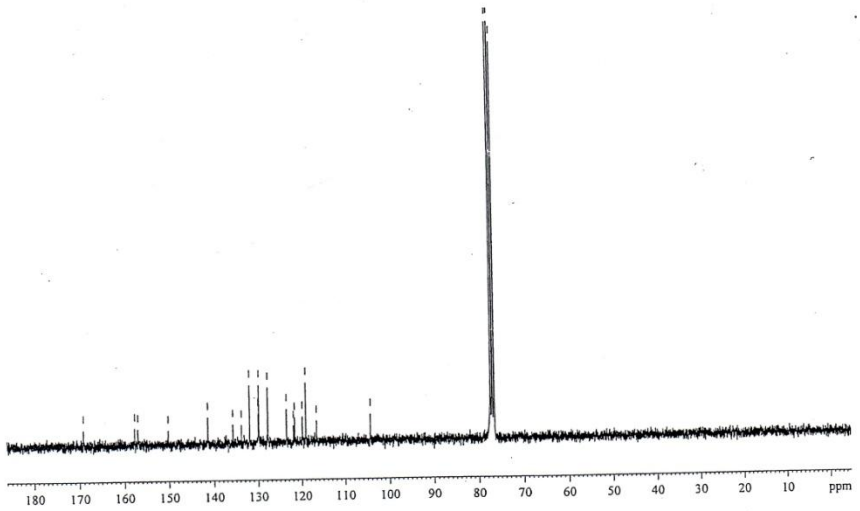
CROSK 1C





CROSK 1C

croskze



CROSK2e