



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΕΘΝΙΚΗΣ
ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
Β' ΚΟΙΝΟΤΙΚΟ ΠΛΑΙΣΙΟ ΣΤΗΡΙΞΗΣ**



Συγχρηματοδότηση: Ευρωπαϊκή
Επιτροπή, Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο, Δ/ση V
& Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής
Ανάπτυξης, Δ/ση XVI.



**ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΔΙΑΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ»**

**ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ, ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ
ΕΝΟΝΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ**

**ΛΙΑΡΓΚΟΒΑ ΘΑΛΕΙΑ
ΦΑΡΜΑΚΟΠΟΙΟΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2012**

ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Η εργασία αυτή με τίτλο: «Σχεδιασμός, σύνθεση και βιολογική αξιολόγηση ενονικών παραγώγων.» 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 Μεταπτυχιακών Φοιτητών και μου έδωσαν την ευκαιρία να λάβω μέρος στο πρόγραμμα αυτό.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου κ. Δήμητρας Χατζηπαύλου-Λίτινα την οποία για τη μεταλαμπάδευση των γνώσεών της, την αμέριστη συμπαράστασή της και φυσικά την υπομονή της. Θερμές ευχαριστίες και στον Δρ. Κολιοπουλο Γ., από το φυτοπαθολογικό Μπενάκειο Ινστιτούτο για τις μελέτες τοξικότητας στις προνύμφες των κουνουπιών. Επιπλέον, θέλω να ευχαριστήσω τους καθηγητές και λέκτορες του τομέα για την κατάρτιση που μου προσέφεραν και τον Καθηγητή Α. Λεο για τη διευκόλυνση στην ελεύθερη διαχείριση του υπολογιστικού προγράμματος C-QSAR καθώς και την εταιρεία Biobyte.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την ηθική στήριξη, την ενθάρρυνση και την πίστη τους στις δυνατότητές μου και όλους του συνεργάτες μου στο εργαστήριο για την βοήθεια τους και την φιλία τους.

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

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	1
1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
2. ABSTRACT	8
3. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
3.1. ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ	10
3.2. ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ.....	10
3.3. ΚΥΚΛΟΞΥΓΟΝΑΣΗ.....	14
3.4. ΛΙΠΟΞΥΓΟΝΑΣΗ	14
3.5. ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΔΡΑΣΗ ΛΕΥΚΟΤΡΙΕΝΙΩΝ	15
3.6. ΦΛΕΓΜΟΝΗ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ.....	15
3.7. ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ.....	18
3.7.1. ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΟΡΙΣΜΟΣ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ.....	18
3.8. ΧΑΛΚΟΝΕΣ.....	19
3.8.1. ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΧΑΛΚΟΝΩΝ	22
3.9. ΑΟΥΡΟΝΕΣ.....	22
3.9.1. ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΑΟΥΡΟΝΩΝ.....	23
4. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ – ΣΚΟΠΟΣ	28
5. ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗ ΦΑΡΜΑΚΟΧΗΜΕΙΑ	31
5.1. ΠΟΣΟΤΙΚΕΣ ΣΧΕΣΕΙΣ ΔΟΜΗΣ ΔΡΑΣΗΣ, QUANTITATIVE STRUCTURE ACTIVITY RELATIONSHIPS (QSAR)	29
5.1.1. ΑΡΧΗ-ΜΕΘΟΔΟΣ.....	29
5.1.2. ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΜΙΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ QSAR.....	30
5.1.3. ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΗ.....	31
5.1.4. ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ - ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ.....	31
5.1.5. ΥΔΡΟΦΟΒΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ.....	32
5.1.6. ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΑΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ.....	33
5.1.7. ΣΤΕΡΕΟΧΗΜΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ (STERIC).....	33
5.1.8. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	34

5.2. ΕΞΑΓΩΓΗ ΠΟΣΟΤΙΚΩΝ ΣΧΕΣΕΩΝ ΔΟΜΗΣ- ΔΡΑΣΗΣ (QSAR).....	35
6. ΟΡΓΑΝΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	44
6.1. ΟΡΓΑΝΑ	44
6.2. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ.....	44
7. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	46
7.1. ΓΕΝΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΧΑΛΚΟΝΩΝ	46
7.1.1. ΣΥΝΘΕΣΗ ΕΠΙΜΕΡΟΥΣ ΧΑΛΚΟΝΩΝ.....	44
7.1.2. ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ ΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕ ΤΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΥΘΡΟΥ, ΤΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ, ΤΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΜΑΖΩΝ.....	50
7.2. ΓΕΝΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΑΟΥΡΟΝΩΝ	51
7.2.1. ΣΥΝΘΕΣΗ ΑΟΥΡΟΝΩΝ.....	49
7.2.2. ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ ΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕ ΤΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΥΘΡΟΥ, ΤΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ, ΤΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΜΑΖΩΝ.....	55
7.3. ΓΕΝΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ 4'',4'''-ΤΡΙΜΕΘΥΛΕΝΟ-ΔΙΟΞΥ-ΔΙΣ-ΥΠΟΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΩΝ ΧΑΛΚΟΝΩΝ.....	56
7.3.1. ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ ΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕ ΤΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΥΘΡΟΥ, ΤΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ, ΤΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΜΑΖΩΝ.....	61
7.4. ΑΠΟΤΥΧΙΑ ΣΥΝΘΕΣΗΣ.....	61
8. ΦΑΡΜΑΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ IN VITRO ΚΑΙ IN VIVO	65
8.1. ΦΑΡΜΑΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ in vitro	65
8.1.1. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΕΛΕΥΘΕΡΗ ΣΤΑΘΕΡΗ 1,1- ΔΙΦΑΙΝΥΛΟ-2-ΠΙΚΡΥΛΥΔΡΑΖΥΛΙΚΗ ΡΙΖΑ (DPRH) ΣΕ ΔΙΑΛΥΤΗ ΑΙΘΑΝΟΛΗ.	65
8.1.2. ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΕΠΙ ΤΗΣ ΛΙΠΟΞΥΓΟΝΑΣΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ IN VITRO.	66
8.1.3. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΝΑ ΑΝΑΣΤΕΛΟΥΝ ΤΗΝ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΩΣΗ ΤΟΥ ΛΙΝΕΛΑΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΠΟΥ ΕΠΑΓΕΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟ ΔΙΪΔΡΟΧΛΩΡΙΚΟ ΑΛΑΣ ΤΟΥ 2,2-ΔΙΑΖΩ-2-ΜΕΘΥΛΟ-ΠΡΟΠΑΝΙΜΙΔΑΜΙΔΙΟ (AAPH).	68
8.1.4. IN VITRO ΜΕΛΕΤΗ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗ GSH.....	69
8.2. ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ in vivo	71
8.2.1. ΕΠΑΓΩΓΗ ΟΙΔΗΜΑΤΟΣ ΑΚΡΟΥ ΠΟΔΟΣ ΕΠΙΜΥΑ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΕΙΤΑΙ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΝΔΟΔΕΡΜΙΚΗ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΚΑΡΡΑΓΕΝΙΝΗΣ.	71
8.2.2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΠΡΟΝΥΜΦΕΣ ΚΟΥΝΟΥΠΙΩΝ.....	71
9. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ	75

9.1. ΣΥΝΘΕΣΗ ΧΑΛΚΟΝΩΝ.....	75
9.2. ΣΥΝΘΕΣΗ ΑΟΥΡΟΝΩΝ	77
9.3. ΣΥΝΘΕΣΗ 4'',4'''-ΤΡΙΜΕΘΥΛΕΝΟ-ΔΙΟΞΥ-ΔΙΣ-ΥΠΟΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΩΝ ΧΑΛΚΟΝΩΝ	81
9.4. In vitro ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	84
9.4.1. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ, ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΕΛΕΥΘΕΡΗ ΣΤΑΘΕΡΗ 1,1-ΔΙΦΑΙΝΥΛΟ-2-ΠΙΚΡΥΛΥΔΡΑΖΥΛΙΚΗ ΡΙΖΑ (DPPH).	84
9.4.2. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΝΑ ΑΝΑΣΤΕΛΛΟΥΝ ΤΗΝ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΩΣΗ ΤΟΥ ΛΙΝΕΛΑΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΠΟΥ ΕΠΑΓΕΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟ ΔΙΪΔΡΟΧΛΩΡΙΚΟ ΑΛΑΣ ΤΟΥ 2,2'- ΔΙΑΖΩ-2-ΑΜΙΔΙΝΟΠΡΟΠΑΝΙΟΥ ΑΑΡΗ.	88
9.4.3. ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΕΠΙ ΤΗΣ ΛΙΠΟΞΥΓΟΝΑΣΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΑΠΟ ΣΟΓΙΑ.....	91
9.4.4. IN VITRO ΜΕΛΕΤΗ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗ GSH...93	
9.5. In vivo ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	98
9.5.1. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΟΙΔΗΜΑΤΟΣ ΑΚΡΟΥ ΠΟΔΟΣ ΕΠΙΜΥΑ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΕΙΤΑΙ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΝΔΟΔΕΡΜΙΚΗ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΚΑΡΑΓΕΝΙΝΗΣ.....	98
9.5.2. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΟΥ-ΤΟΞΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΣΕ ΠΡΟΝΥΜΦΕΣ ΚΟΥΝΟΥΠΙΩΝ	97
10. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	100
11. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	103
12. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	107

1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι ενόνες αποτελούν μια ομάδα χημικών ενώσεων με ποικιλία βιολογικών δράσεων. Μερικές από αυτές είναι η αντιφλεγμονώδης δράση, η παγίδευση και η σάρωση ελευθέρων ριζών, η αντικαρκινική, εντομοαπωθητική και η αντιμικροβιακή. Εκτενέστερα μελετήθηκαν ως ενονικά παράγωγα οι 2-υδροξυ-χαλκόνες, οι αουρόνες και οι 4'',4'''-τριμεθυλενο-διοξυ-δισ-υποκατεστημένες χαλκόνες. Οι ενώσεις αυτές παρουσιάζουν ιδιαίτερο συνθετικό ενδιαφέρον. Μετά από επισκόπηση της βιβλιογραφίας έγινε επεξεργασία και ανάλυση δεδομένων που αφορούν χαλκόνες και αουρόνες με τη βοήθεια του προγράμματος C-QSAR της BioByte για την εξαγωγή ποσοτικών σχέσεων που θα αποτελέσουν οδηγό για τον μελλοντικό σχεδιασμό και σύνθεση αποτελεσματικότερων ενώσεων. Χρησιμοποιώντας αυτά τα αποτελέσματα προχωρήσαμε στη σύνθεση μιας σειράς χαλκονών, αουρονών και 4'',4'''-τριμεθυλενο-διοξυ-δισ-υποκατεστημένων χαλκονών.

Η σύνθεση των χαλκονών στηρίζεται στην αντίδραση Claisen-Schmidt μεταξύ μιας αλδεΐδης και της 2-υδροξυακετοφαινόνης.

Η σύνθεση των αουρονών έγινε με βάση την οξειδωτική κυκλοποίηση των αντίστοιχων 2-υδροξυ- υποκατεστημένων χαλκονών με διαλύτη πυριδίνη και οξικό υδράργυρο.

Η σύνθεση των διπλών χαλκονών (4'',4'''-τριμεθυλενο-διοξυ-δισ-υποκατεστημένες χαλκόνες) στηρίζεται στην αντίδραση Claisen-Schmidt μεταξύ μιας αλδεΐδης και των αντιστοίχων διπλών αιθέρων της υδρόξυ-υποκατεστημένης ακετοφαινόνης.

Οι δομές των ενώσεων επιβεβαιώνονται με τις στοιχειακές αναλύσεις και φασματοσκοπικά (IR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, MS (ESI)).

Οι ενώσεις μελετήθηκαν με τη βοήθεια πειραμάτων *in vitro* και *in vivo* για τη δράση τους ως αντιφλεγμονώδη, αντιοξειδωτικά, αντικαρκινικά και για την τοξικότητά τους σε προνύμφες κουνουπιών. 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 υπεροξειδωσής του λινελαϊκού οξέος
- III. Αναστολή του ενζύμου λιποξυγονάση φυτικής προέλευσης (από σόγια)
- IV. Αλληλεπίδρασης των ενώσεων με γλουταθειόνη GSH για τον προσδιορισμό πιθανής αντικαρκινικής δράσης

Βιολογικά πειράματα *in vivo*

- I. Αναστολή της εμφάνισης του οιδήματος του άκρου ποδός επίμυα που προκαλείται από την ενδοδερμική χορήγηση της καρραγενίνης.
- II. Επίδραση σε καλλιέργειες προνυμφών κουνουπιών

Από τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τις παραπάνω σειρές πειραμάτων, διαπιστώνουμε ότι όλες οι ενώσεις έδειξαν να αλληλεπιδρούν μέτρια με τη σταθερή ελεύθερη ρίζα DPPH σε σχέση με τη συγκέντρωση και το χρόνο (με ισχυρότερη την ουρόνη **TAL3**). Οι περισσότερες ενώσεις παρουσίασαν πολύ υψηλή ικανότητα αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσής του λινελαϊκού οξέος που επάγεται από το AAPH. Οι 4'',4'''-τριμεθυλενο-διοξυ-δισ-υποκατεστημένες χαλκόνες **FWD3** και **FWD4** παρουσίασαν 100% δραστηριότητα. Όλες οι ενώσεις αναστέλλουν την LOX φυτικής προέλευσης, με τις **TAL4**, **FWD2**, **FWD3** και **FWD4** να εμφανίζουν 100% δράση. Σχεδόν όλες οι ενώσεις αντιδρούν με την γλουταθειόνη, ενώ οι **FWD3** και **FWD4** εμφανίζουν αυξημένη σύνδεση με αυτήν.

Οι ενώσεις διαπιστώθηκε ότι αναστέλλουν σε χαμηλό βαθμό το οίδημα που προκαλείται από καρραγενίνη με καλύτερη την ουρόνη **TAL1** που εμφανίζει αναστολή κατά 41,5%. Τα πειράματα της αντικουνουπικής δράσης βρίσκονται σε εξέλιξη.

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.

2. ABSTRACT

Enones are a group of compounds with a variety of biological effects. Some of them showed: anti-inflammatory, scavenging of free radicals, anticancer, antitumor, larvae, antioxidant activity and inhibition of lipid peroxidation. These compounds are of particular synthetic interest.

We reviewed the literature data on chalcones and aurones and we analyzed them with the help of the C-QSAR program of Biobyte to extract quantitative structure-activity relationships that will guide the future design and synthesis of more effective compounds. Using these conclusions we proceeded with the synthesis of a series of compounds bearing the enone structure as, chalcones, aurones and 4''-4'''-trimethyleno-dioxy-bis substituted chalcones.

The synthesis of chalcones and 4''-4'''-trimethyleno-dioxy-bis substituted chalcones is based on the Claisen-Schmidt condensation between an aldehyde and 4-hydroxy-acetophenone after etherification.

The synthesis of aurones follows an oxidative cyclization between mercury acetate and a 2'-hydroxy-chalcone in pyridine.

The structures of the compounds are confirmed by IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, MS (ESI) and elemental analysis.

The compounds were studied through in vitro and in vivo experiments for their activity as anti-inflammatory, antioxidant, larvae and anticancer. In particular, the compounds were tested in the following experiments:

Pharmacochemical tests *in vitro*:

- I. DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging assay
- II. Inhibition of lipid peroxidation using AAPH [2,2'-azobis-2-methyl-propanimidamide]
- III. Soybean lipoxygenase inhibition assay
- IV. Interaction with glutathione

Biological experiments *in vivo*

- I. Inhibition of the carrageenin-induced rat edema (CPE)
- II. Toxicity against mosquito larvae.

In the above series of experiments, we found that all the compounds showed moderate interaction with the stable DPPH free radical in relation to the concentration and time (among the auronones **TAL3** was the most potent). Most of the compounds showed high inhibition of lipid peroxidation of linoleic acid induced by AAPH. **FWD3** and **FWD4** showed 100% inhibition of lipid peroxidation. All compounds presented strong inhibitory effect on LOX (**TAL4**, **FWD2**, **FWD3** and **FWD4** 100%). Most of the compounds showed high interaction with glutathione. The strongest were **FWD3** and **FWD4**.

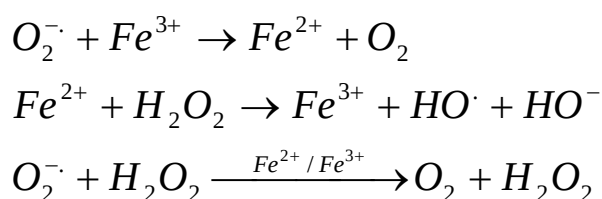
The tested compounds did not seem to inhibit significantly the carrageenin-induced rat paw edema with the exception of **TAL1** showing 41.5% inhibition.

Efforts are conducted a) to correlate quantitatively the *in vitro* / *in vivo* results with the most important physicochemical properties of the molecules and b) to clarify the correlation of actions among them in order to propose a possible mechanism of action.

3. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

3.1. ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ

Το σημαντικότερο στοιχείο για τη ζωή όλων των αερόβιων οργανισμών είναι το οξυγόνο. Το οξυγόνο μπορεί να γίνει τόσο απαραίτητο όσο και μοιραίο, καθώς σε υψηλές συγκεντρώσεις μπορεί να γίνει τοξικό. Στη σταθερή του κατάσταση είναι αρκετά αδρανές, ενώ όταν αναχθεί δημιουργεί δραστικές μορφές οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) όπως μονήρες οξυγόνο, υπεροξειδίο του υδρογόνου, ρίζα ανιόντος υπεροξειδίου, ενεργή ρίζα υδροξυλίου κτλ. (Σχήμα 1) Οι ελεύθερες ρίζες έχουν την ιδιότητα να οδηγούν σε ταχείες αντιδράσεις αφού το μονήρες ηλεκτρόνιο τους τις καθιστά εξαιρετικά δραστικές. Με τον τρόπο αυτό διαταράσσουν την ισορροπία άλλων μορίων και συστημάτων και οδηγούν στο σχηματισμό άλλων ελεύθερων ριζών.

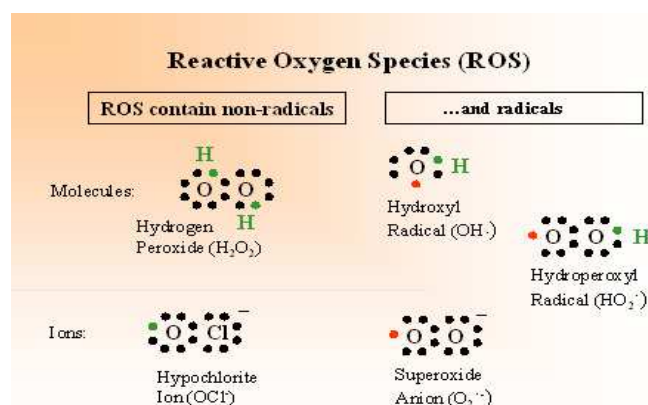


Σχήμα 1: Αντιδράσεις σχηματισμού δραστικών μορφών οξυγόνου

Τα κλινικά και επιδημιολογικά δεδομένα δείχνουν μια άμεση συσχέτιση της ύπαρξης ελεύθερων ριζών και δραστικών μορφών οξυγόνου, που αναπόφευκτα δημιουργούνται στους οργανισμούς λόγω του μεταβολισμού των κυττάρων τους, με σύγχρονες παθήσεις όπως ογκογένεση και διάφοροι τύποι καρκίνου, φλεγμονώδεις και εκφυλιστικές νόσοι, αρθρίτιδα, γήρανση κτλ (Mandal S. et al, 2009).

Υπεύθυνη για τη δημιουργία τέτοιων αλλοιώσεων είναι η δράση των ελεύθερων ριζών στα μόρια του DNA, καθώς είναι δυνατό να αλληλεπιδρούν μαζί του προκαλώντας μεταλλάξεις στο μιτοχονδιακό και πυρηνικό DNA αλλά και επηρεάζοντας τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου αντιδρούν ταχύτατα με πρωτεΐνες, υδρογονάνθρακες και λιπίδια οδηγώντας στη δημιουργία προϊόντων που σε μεγάλο βαθμό επηρεάζουν την

ομοιόσταση του κυττάρου αλλά και του ιστού, μέχρι τη δημιουργία μετάλλαξης του DNA (Pontiki E. et al., 2009).



Εικόνα 1 : δραστικές μορφές οξυγόνου

Ορισμένες ενεργές μορφές οξυγόνου επιτίθενται στα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα προκαλώντας εκτενή οξειδωτική βλάβη στην κυτταρική μεμβράνη και οξειδωτικό στρες. Το οξειδωτικό στρες έχει ευθέως συσχετιστεί με τη διαδικασία της φλεγμονής. Δραστικές μορφές οξυγόνου παράγονται κατά τη διαδικασία της φλεγμονής από τα φαγοκύτταρα και λευκοκύτταρα που συγκεντρώνονται στους ιστούς. Επιπλέον, οι ενεργές αυτές μορφές οξυγόνου εμπλέκονται στη μετατροπή του αραχιδονικού οξέος σε προφλεγμονώδη ενδιάμεσα, από την κυκλοξυγονάση(COX) και λιποξυγονάση(LOX) (Weber V., et al., 2005).

Η σχέση μεταξύ της φλεγμονής του καρκίνου και του μεταβολισμού των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων αποτελεί αντικείμενο μελέτης πλήθους ερευνών δίνοντας τη δυνατότητα δημιουργίας μορίων με δράση σε πολλούς διαφορετικούς στόχους όπως η χημειοπροφύλαξη στους διάφορους τύπους καρκίνου, η αναστολή των ενζύμων του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος (LOX, COX), η σάρωση των ελευθέρων ριζών κτλ.

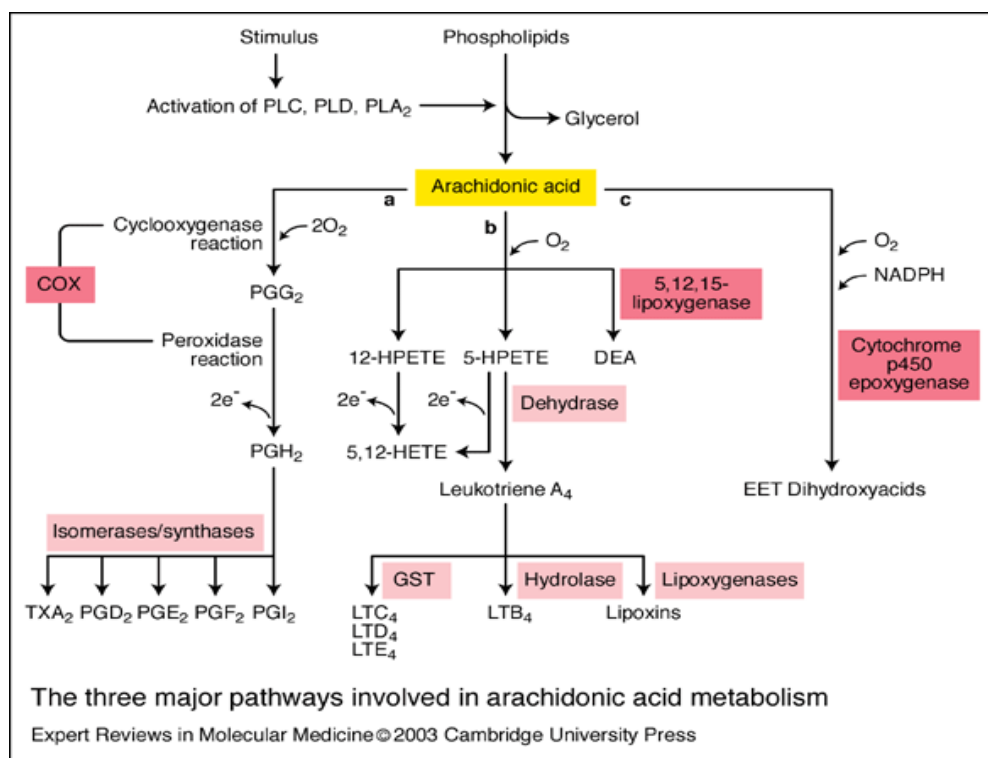
3.2. ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ

Η φλεγμονή αντιπροσωπεύει τη διεργασία με την οποία ο οργανισμός αμύνεται στην εισβολή λοιμογόνου παράγοντα, μικροβίου ή χημικής ουσίας, ή σε οποιαδήποτε αιτία προσπαθεί να μεταβάλει την ομοιόστασή του προκαλώντας απλή φυσική βλάβη, όπως ο τραυματισμός και η θερμότητα. Εφόσον προκληθεί κάποιας μορφής και έκτασης ιστική βλάβη, τότε, από τον ιστό που έχει υποστεί βλάβη, απελευθερώνονται μεγάλες ποσότητες ουσιών που προκαλούν εντυπωσιακές δευτερογενείς αλλοιώσεις στους ιστούς. Το σύμπλεγμα των διεργασιών που ενεργοποιείται καλείται φλεγμονή και χάρη σε αυτή ο οργανισμός επιτυγχάνει την ανατομική και λειτουργική αποκατάσταση των ιστικών βλαβών.

Τρία κύρια γεγονότα συμβαίνουν στη διάρκεια της φλεγμονώδους απόκρισης: α) αυξημένη εισροή αίματος στην περιοχή της βλάβης, β) αυξημένη διαβατότητα των τριχοειδών με συνέπεια να διευκολύνεται η διάβαση ογκωδών μορίων διαμέσου του ενδοθηλίου (αντισώματα, ανοσοσφαιρίνες, μόρια ενζυμικών συστημάτων του πλάσματος) και γ) διήθηση και μετανάστευση λευκών αιμοσφαιρίων, τα οποία κατευθύνονται από χημειοτακτικά ερεθίσματα. Η ανταπόκριση των μακροφάγων και των ουδετερόφιλων στη φλεγμονή αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας. Η διήθηση και μετανάστευση των λευκοκυττάρων γίνεται με τη βοήθεια μεμβρανικών πρωτεϊνών των κυττάρων και ονομάζονται προσκολλητικά μόρια (σελεκτίνες, ιντεγκρίνες και υπερικογένεια των ανοσοσφαιρινών Ig). Επιπρόσθετα, η ανάπτυξη της φλεγμονώδους αντίδρασης ελέγχεται από κυτοκίνες και από προϊόντα ενζυμικών συστημάτων του πλάσματος (σύστημα πήξης και ινωδόλυσης) (Araico et al., 2006).

Η καταστροφή των κυττάρων στο σημείο της φλεγμονής ενεργοποιεί μια υδρολάση, τη φωσφολιπάση A_2 (PLA_2), που απελευθερώνει με τη σειρά της αραχιδονικό οξύ (Arachidonic Acid, AA) από τη φωσφολιπιδική μεμβράνη των κυττάρων. Το αραχιδονικό οξύ αποτελεί πολυακόρεστο λιπαρό οξύ σε αφθονία στη διπλοστοιβάδα των κυτταρικών τοιχωμάτων, που μπορεί περαιτέρω να μεταβολιστεί μέσω δύο κύριων οδών, της κυκλοξυγονάσης και της λιποξυγονάσης. Η δράση των δύο ενζύμων οδηγεί σε πρώιμους διαμεσολαβητές της φλεγμονής (προσταγλανδίνες

(PGs), προστακυκλίνη (PGI₂), θρομβοξάνια (TXs) και λευκοτριένια (LTs))(Morreau et al., 2006)



Εικόνα 2 : μονοπάτι της φλεγμονής

Η συνθετάση του ενδοϋπεροξειδίου Η της προσταγλανδίνης, ευρύτερα γνωστή ως κυκλοξυγονάση (cyclooxygenase, COX) πραγματοποιεί δύο ξεχωριστές καταλυτικές αντιδράσεις: (1) της κυκλοξυγονάσης, που οξειδώνει το αραχιδονικό οξύ σε υδροϋπεροξυ-ενδοϋπεροξειδίο (PGG₂) και (2) της υπεροξειδάσης, που δρα επακόλουθα επί του PGG₂ και το μετατρέπει στο υδροξυ-ενδοϋπεροξειδίο PGH₂ (Εικόνα). Στη συνέχεια το ασταθές PGH₂ μετατρέπεται με τη δράση ποικίλων συνθετασών και ισομερασών σε προσταγλανδίνες (PGD₃, PGE₂, PGF_{2a}), προστακυκλίνη (PGI₂) και θρομβοξάνιο A₂ (TXA₂). Τα παραπάνω «προστανοειδή» εμπλέκονται στις αποκρίσεις του οργανισμού σε ιστική βλάβη ή φλεγμονή. Η PGE₂ και η PGI₂ είναι δυναμικοί διεγέρτες φλεγμονής, που δρουν συνεργιστικά με την ισταμίνη ή τη βραδυκινίνη (Charlier et al., 2003; Morreau et al., 2006). Η συνδυαστική δράση τους στα αγγεία συνεισφέρει στην ερυθρότητα και αυξάνει τη ροή του αίματος σε οξείες φλεγμονώδεις περιοχές, ευνοεί τη διαπερατότητα των

αγγείων, προξενώντας το χαρακτηριστικό οίδημα των ιστών, και παράγει υπεραλγησία μέσω περιφερικών απολήξεων των αισθητικών νεύρων. Ειδικότερα όσον αφορά στην PGE_2 , η συγκεκριμένη προσταγλανδίνη επιδρά στους νευρώνες και συνεισφέρει σε εκτεταμένα συμπτώματα της φλεγμονής, όπως ο πυρετός, η κούραση και η υπερευαισθησία στο άλγος.

3.3. ΚΥΚΛΟΞΥΓΟΝΑΣΗ

Μόλις την περασμένη δεκαετία έγινε ο διαχωρισμός ανάμεσα στις δύο ισομορφές του συγκεκριμένου ενζύμου, ενώ το 2002 δημοσιεύθηκε η απομόνωση της COX-3 ισομορφής (COX-1b ή COX-1 variant) που αναστέλλεται εκλεκτικά από αναλγητικά/αντιπυρετικά φάρμακα όπως η ακεταμινοφαίνη, η φαινακετίνη, η αντιπυρίνη, κ.ά. (Charlier et al., 2003). Τόσο η COX-1 όσο και η COX-2 μοιράζονται την ίδια καταλυτική αντίδραση, ενώ διαφέρουν στη διαμόρφωση, την έκφραση και τη λειτουργία.

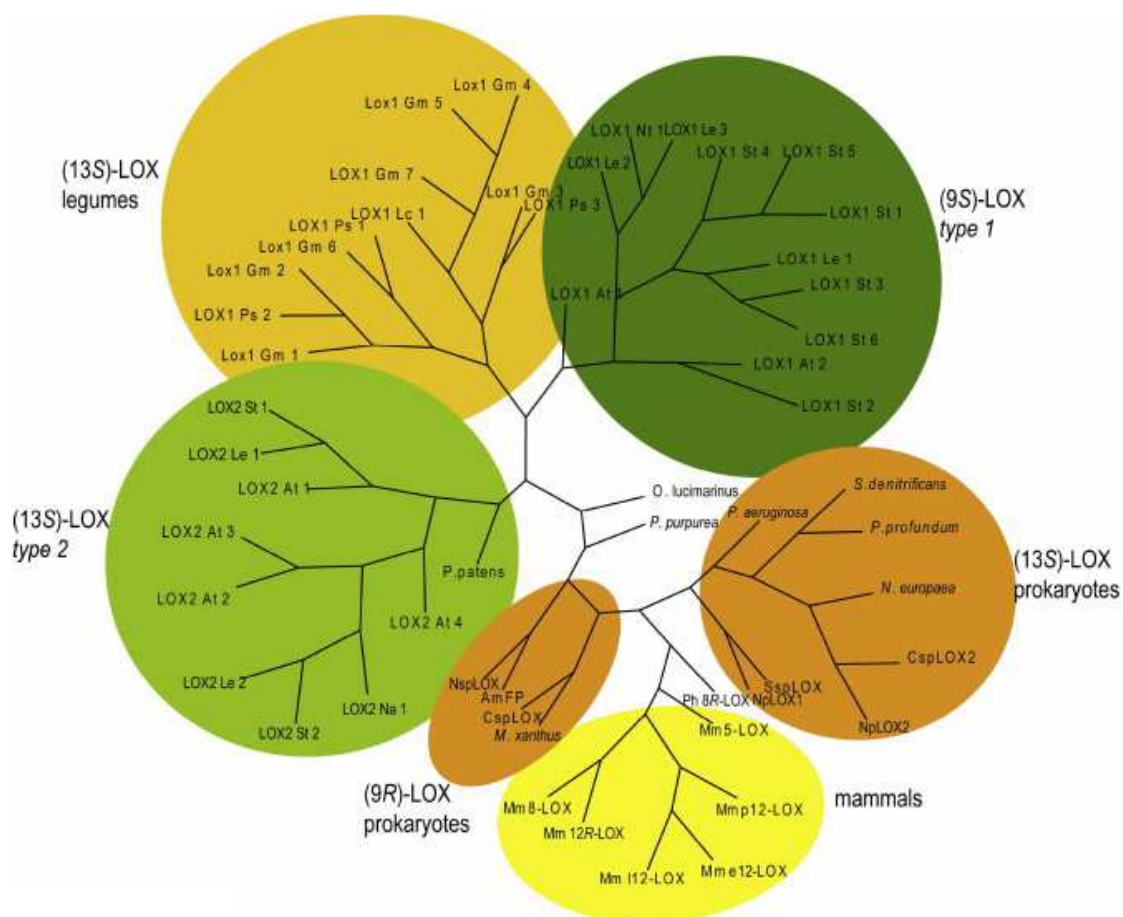


Εικόνα 3 : Δομή της κυκλοξυγονάσης

3.4. ΛΙΠΟΞΥΓΟΝΑΣΗ

Η οικογένεια των λιποξυγονασών (Lipoxygenase, LOX) περιλαμβάνει τέσσερα διακριτά ταυτοποιημένα ισοένζυμα υπεροξειδωσης λιπιδίων (5-LOX, 8-LOX, 12-LOX, 15-LOX) που απαντώνται τόσο στο φυτικό και ζωικό βασίλειο. Οι λιποξυγονάσες περιέχουν στο ενεργό τους κέντρο άτομο σιδήρου ενωμένο με πέντε μόρια ιστιδίνης,

όχι όμως σε δακτύλιο αίμης. Οι παραπάνω διοξυγονάσες καταλύουν την οξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (οξείδωση ατόμων άνθρακα 5-, 8-, 12-, 15- του αραχιδονικού οξέος ή του ατόμου 15- του λινελαϊκού οξέος) που περιέχουν ομάδα 1,4-cis-πενταδιενίου, ώστε να παράγουν υδροϋπεροξυ-παράγωγα (Araico et al., 2006; Charlier et al., 2003).

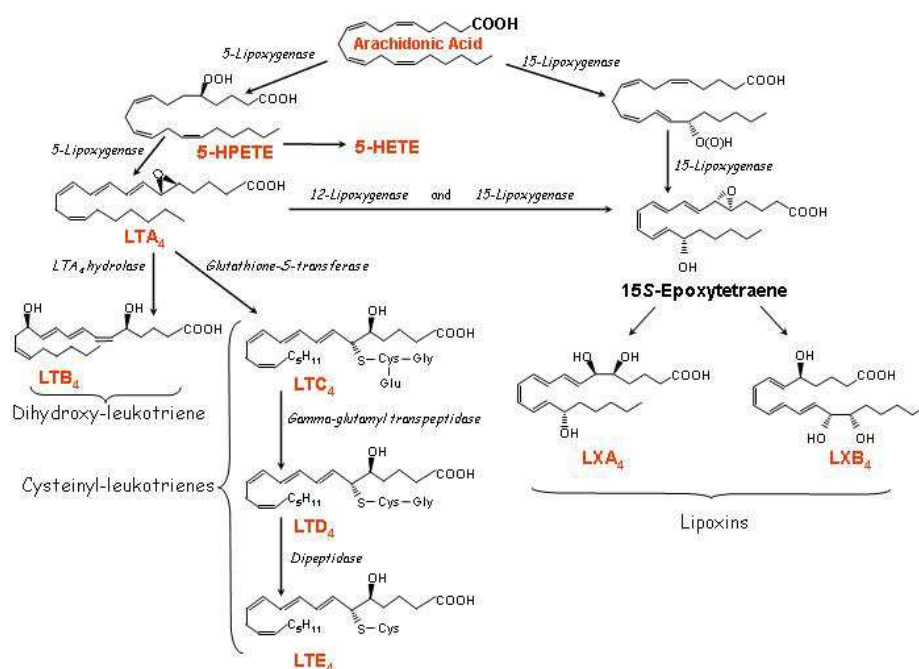


Εικόνα 4: Η λιποξυγονάση στους ζωντανούς οργανισμούς.

3.5. ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΔΡΑΣΗ ΛΕΥΚΟΤΡΙΕΝΙΩΝ

Ο όρος λευκοτριένια (εικόνα 5) αντιπροσωπεύει τα κύτταρα καταγωγής αυτών των παραγώγων, τα λευκοκύτταρα, και τη χαρακτηριστική δομή τους με τη μορφή συζευγμένων τριενίων. Το ένζυμο λιποξυγονάση (LOX) καταλύει τα δύο πρώτα στάδια στη βιοσύνθεση των λευκοτριενίων: πρώτα λαμβάνει χώρα η οξείδωση του αραχιδονικού οξέος και η παραγωγή του αντίστοιχου υδροϋπεροξεικοσιτετρανοϊκού οξέος (HPETE) και ακολούθως η απόσπαση ενός μορίου νερού από το υδροϋπεροξείδιο, από όπου προκύπτει το σημαντικό ενδιάμεσο λευκοτριένιο. Ειδικότερα, τα λευκοτριένια LTA_4 λόγω του ασταθούς τους χαρακτήρα

μπορεί να μεταπέσουν στα λευκοτριένια LTB_4 μέσω της δράσης μιας υδρολάσης ή στα ανάλογα LTC_4 τα οποία συζεύγνυνται με την γλουταθειόνη. Τα τελευταία αυτά παράγωγα μπορούν να μεταβολιστούν σε λευκοτριένια LTD_4 ή LTE_4 , μέσω συνεχόμενων αποβολών γλουταμινικού οξέος και γλυκίνης, αντίστοιχα (Charlier et al., 2003).



Εικόνα 5: Μονοπάτι λευκοτριενίων

Τα λευκοτριένια γενικότερα αποτελούν «παρακρινείς ορμόνες» και ασκούν ευρέου φάσματος βιολογικές δράσεις όπου χρησιμοποιούνται ως μεσολαβητές ειδικοί υποδοχείς G-πρωτεϊνών. Το LTB_4 είναι ένας δυναμικός χημειοτακτικός παράγοντας σε κύτταρα φλεγμονής, όπως είναι τα ουδετερόφιλα, τα μακροφάγα και τα εωσινόφιλα. Εμπλέκεται ακόμα στη μετανάστευση των λευκοκυττάρων προς φλεγμονώδεις ζώνες. Τα κυστεϊνικά λευκοτριένια (LTC_4 , LTD_4 , LTE_4) αποτελούν το βιολογικό μίγμα γνωστό ως «αργά δρώσα ουσία της αναφυλαξίας». Τα παράγωγα αυτά διαδραματίζουν παθοφυσιολογικό ρόλο στη διαδικασία οξείας υπερευαισθησίας. Επίσης, αποτελούν συσπαστικές ουσίες, αφού οδηγούν σε σημαντικό βρογχόσπασμο, και ενεργοποιούν την έκκριση μουκοειδών εκκρίσεων.

3.6. ΦΛΕΓΜΟΝΗ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Είναι αποδεδειγμένο από μελέτες ότι η διατροφή με αυξημένη λήψη πολυακόρεστων λιπαρών οξέων προάγει μέσω της μεταβολικής οξείδωσης την ογκογένεση. Η κυκλοξυγονάση (COX) και η λιποξυγονάση (LOX) είναι ένζυμα που ελέγχουν τον οξειδωτικό μεταβολισμό των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (κύκλος του αραχιδονικού οξέος).

Το μονοπάτι της κυκλοξυγονάσης οδηγεί στον σχηματισμό προσταγλανδινών (PGs) και θρομβοξανίου (THX) (Schneider C. Et al., 2006). Οι μεταβολίτες αυτοί παίζουν σημαντικό ρόλο σε ρυθμιστικές φυσιολογικές διεργασίες του οργανισμού όπως η αγγειογένεση, η πηκτικότητα του αίματος, η ανοσοαπόκριση, η μίτωση και η φλεγμονή. Ειδικότερα, οι προσταγλανδίνες και κυρίως οι PGE₂ φαίνεται να κατέχουν κυρίαρχο ρόλο στην καρκινογένεση αφού η ενεργοποίηση των υποδοχέων της σηματοδοτεί την μιτωτική διαδικασία και διάφορα μονοπάτια όπως στην αύξηση του αυξητικού επιδερμικού παράγοντα (EGFR). Η χρόνια φλεγμονή αναγνωρίζεται σαν αυξημένος παράγοντας κινδύνου ανάπτυξης διαφόρων τύπων καρκίνου τόσο στα ζώα όσο και στον άνθρωπο.

Παράλληλα αποδεικνύεται ότι και τα ένζυμα της οικογένειας της λιποξυγονάσης εμπλέκονται σε ένα ευρύ φάσμα φυσιολογικών διεργασιών τόσο σε μοριακό όσο και σε κυτταρικό αλλά και συστηματικό επίπεδο αφού επηρεάζουν την μεταβίβαση των κυτταρικών σημάτων, τον μεταβολισμό, τον πολλαπλασιασμό και την φλεγμονή. Επιπλέον, το μονοπάτι της LOX αλληλεπιδρά με πολλαπλά μονοπάτια μετάδοσης σήματος που ελέγχουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων εμφανίζοντας έκδηλη επιρροή στην ανάπτυξη και την εξέλιξη διαφόρων τύπων καρκίνου. (Catalano A. et al., 2005).

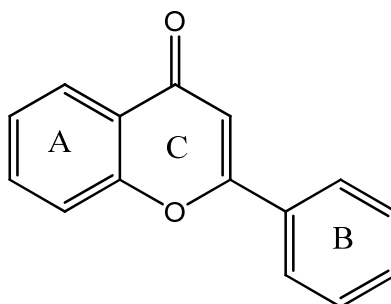
Η κυκλοξυγονάση και η λιποξυγονάση καθώς και τα τελικά προϊόντα τους μέσω του κύκλου του αραχιδονικού οξέος υπερεκφράζονται κατά την καρκινογένεση και την ανάπτυξη όγκων και τα δύο ένζυμα εμπλέκονται τόσο με την φλεγμονή όσο και με την φλεγμονή που σχετίζεται με την καρκινογένεση. Οι παρατηρήσεις αυτές μπορούν να οδηγήσουν στην ανεύρεση νέων στρατηγικών ανάπτυξης

χημειοπροστατευτικών ενώσεων όπως αναστολείς της LOX. Η καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών ανάπτυξης του καρκίνου και συμπεριφοράς των καρκινικών κυττάρων οδηγεί στην δημιουργία φαρμάκων με καλύτερη, πολλαπλή δράση και λιγότερες παρενέργειες (Menna C. et al., 2010).

3.7. ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ

3.7.1. ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΟΡΙΣΜΟΣ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ

Τα φλαβονοειδή απαρτίζουν μια ευρύτατη κατηγορία ενώσεων και αποτελούν δευτερογενείς φυτικούς μεταβολίτες. Ονομάστηκαν έτσι από την λατινική λέξη flavus που σημαίνει κίτρινο χρώμα. Στη φύση απαντώνται σε πάρα πολλά είδη φυτών, αρκετά από τα οποία είναι βρώσιμα. Υπολογίζεται ότι ως σήμερα έχουν ανακαλυφθεί πάνω από εννιά χιλιάδες φυσικά φλαβονοειδή. Αν και γενικά αποτελούν πολυφαινολικές ενώσεις, εμφανίζουν πολλές δομικές διαφορές με αποτέλεσμα να χωρίζονται σε διάφορες υποκατηγορίες.



Σχήμα 2: Γενική δομή φλαβονοειδών

Ως φλαβονοειδή μπορούν να χαρακτηριστούν μόρια που δομικά αποτελούνται από δύο αρωματικούς βενζολικούς δακτυλίους ενωμένους με μια γέφυρα τριών ατόμων άνθρακα. Η δομή αυτή αποτελεί το βασικό φλαβονικό σκελετό. Τα φλαβονοειδή χωρίζονται σε υποκατηγορίες ανάλογα με τον βαθμό οξειδωσης και τους υποκαταστάτες ως εξής :

1. Παράγωγα του 2-φαινυλοβενζοπυριλίου: ανθοκυανιδίνες
2. Παράγωγα του 2-φαινυλο-3-χρωμανόλης: φλαβαν-3-όλες, φλαβαν-4-όλες,

φλαβανόνες, φλαβόνες, φλαβονόλες.

3. Παράγωγα του 3-φαινυλοχρωμανίου: ισοφλαβονοειδή

4. Παράγωγα της βενζυλιδενεκουμαρόνης: αουρόνες

Ένας άλλος διαχωρισμός μπορεί να γίνει ανάλογα με τη θέση σύνδεσης του αρωματικού δακτυλίου στον βενζοπυρανικό δακτύλιο ως εξής :

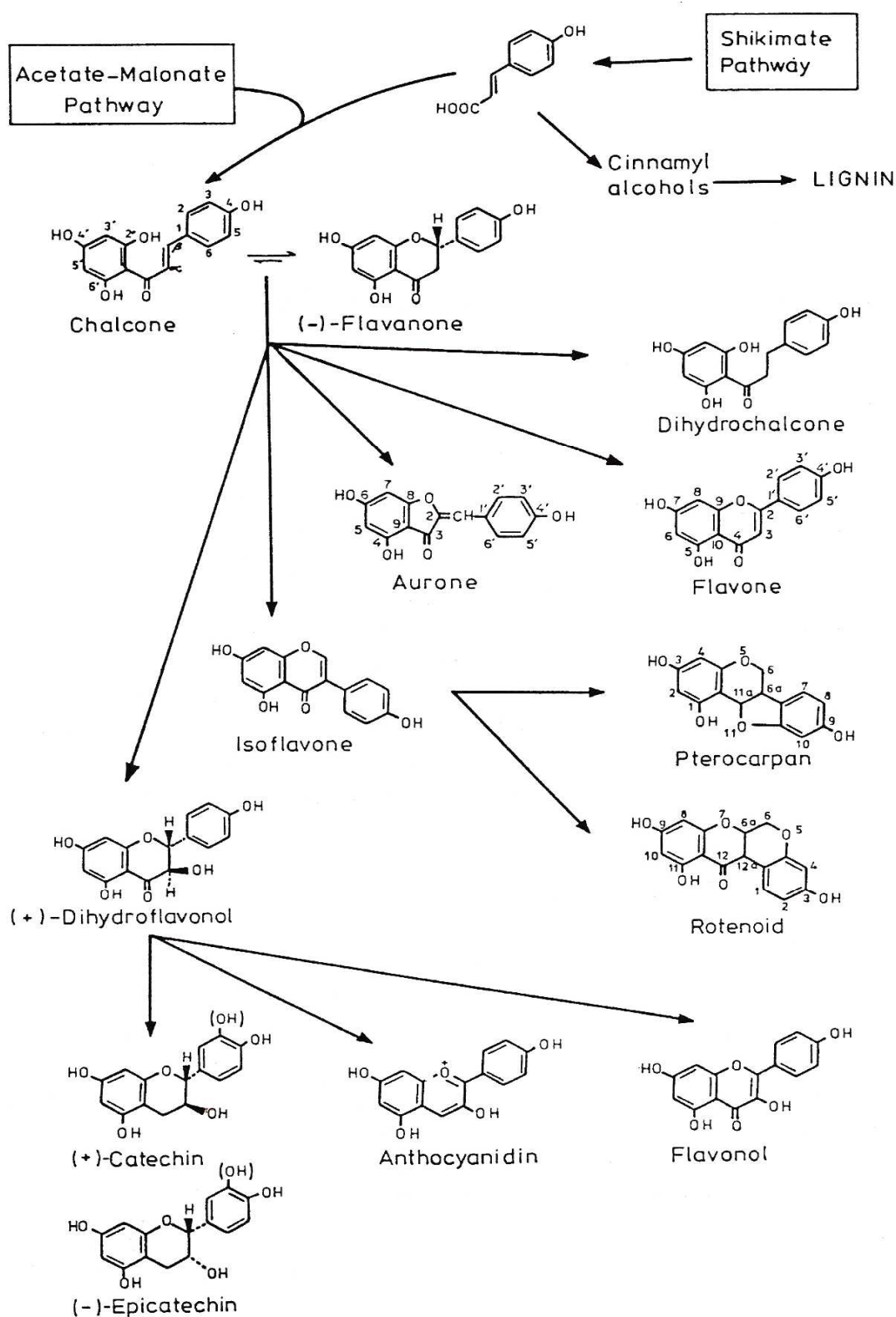
- Φλαβονοειδή
- Ισοφλαβονοειδή
- Νεοφλαβονοειδή
- Ελάσσονα φλαβονοειδή.

Τα φλαβονοειδή κατέχουν σημαντική θέση στη φυσιολογία των φυτών αφού λαμβάνουν μέρος στην σύνθεση δομικών συστατικών τους όπως για παράδειγμα τα εικοσανοειδή. Στα φυτά επίσης, παρουσιάζουν κυτταροπροστατευτικό ρόλο αφού προστατεύουν το γενετικό τους υλικό από τυχόν μεταλλάξεις. Με τον ίδιο τρόπο που τα φλαβονοειδή λειτουργούν προστατευτικά για τους φυτικούς οργανισμούς, έχουν την δυνατότητα να προστατεύουν και τον ανθρώπινο οργανισμό.

Με αφορμή τις ιδιότητες τους αυτές τα φλαβονοειδή έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον του επιστημονικού κόσμου αφού αποτελούν πολύπλευρο στόχο τόσο διατροφικών αλλά και φαρμακευτικών προκλήσεων. Ως τώρα μελέτες έχουν αποδείξει τις αντιοξειδωτικές, αντιθρομβωτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντιμικροβιακές τους ιδιότητες. Η ποικιλία των φαρμακολογικών τους δράσεων είναι άμεσα συσχετισμένη με την ποικιλομορφία της δομής τους.

Το σύνολο των φλαβονοειδών ακολουθεί ένα κοινό βιοσυνθετικό μονοπάτι και για το λόγο αυτό εμφανίζεται ο κοινός δομικός σκελετός τους. Στο πρώτο στάδιο το αμινοξύ φαινυλαλανίνη μετατρέπεται σε 4-κουμαρυλο-Co A που με τη βοήθεια του μηλόνυλο-Co A και της συνθετάσης των χαλκόνων οδηγεί στο σχηματισμό της χαλκόνης. Ο σχηματισμός της χαλκόνης με τους δύο αρωματικούς δακτυλίους αποδεικνύει την προέλευση των μορίων τόσο μέσω του 'σικιμικού' όσο και του

‘οξικού’ μονοπατιού (Andersen, Markham, 2006). Στη συνέχεια μέσω του ίδιου μονοπατιού και με τη βοήθεια του ενζύμου αουρεσιδίνη προκύπτουν οι αουρόνες.

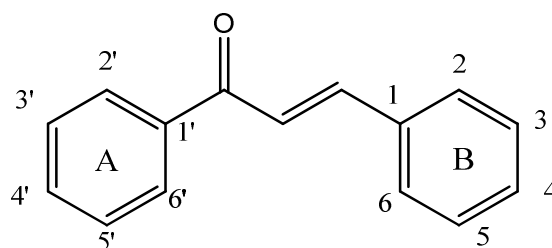


Εικόνα 6: Βιοσύνθεση των φλαβονοειδών

3.8. ΧΑΛΚΟΝΕΣ

Οι χαλκόνες ή 1,3-διαρυλο-2-προπεν-1-όνες είναι ένα σύνολο αρωματικών κετονών, που αποτελούν πρόδρομες ενώσεις της βιοσύνθεσης των φλαβονοειδών. Οι χαλκόνες θεωρούνται φλαβονοειδή από τα οποία λείπει ο ετεροκυκλικός δακτύλιος C.

Στην φύση εντοπίζονται σε διάφορα λαχανικά και φρούτα (σταυρανθή, εσπεριδοειδή, κόκκινα φρούτα κ.α.) καθώς και σε καλλωπιστικά φυτά και άνθη (Dahlia, Petunia κ.α.) και το έντονο κίτρινο και κόκκινο χρώματος τους αποδίδεται στην παρουσία τους.



Σχήμα 3: Γενική δομή χαλκονών

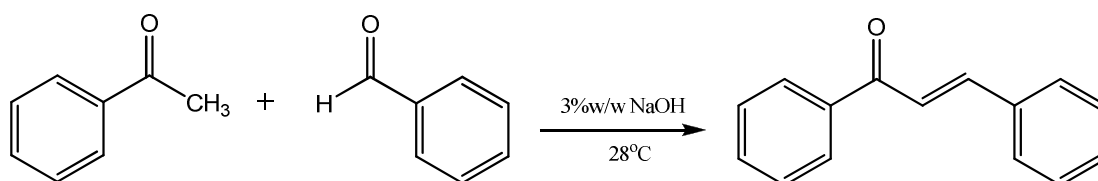
Οι χαλκόνες που απαντώνται στην φύση περιέχουν κυρίως μεθοξυ-, μεθυλο-, υδροξυ- και πρενυλο- ομάδες ως υποκαταστάτες στους δακτυλίους A και B. Οι περισσότερες χαλκόνες που αναφέρονται στη βιβλιογραφία είναι E-ισομερή, καθώς είναι πιο σταθερές. Η αρίθμηση του μορίου της χαλκόνης είναι διαφορετική σε σχέση με τα άλλα φλαβονοειδή: οι θέσεις στον A-δακτύλιο προσδιορίζονται από αριθμούς που τονίζονται, ενώ για να προσδιοριστούν τα άτομα C στο B-δακτύλιο των χαλκονών και των διϋδροχαλκονών χρησιμοποιούνται μη-τονούμενοι αριθμοί. Επίσης, οι άνθρακες του διπλού δεσμού χαρακτηρίζονται ως α και β, σε σχέση με τον άνθρακα του καρβονυλίου της θέσης 1' (Andersen, Markham, 2006) Οι χαλκόνες σχηματίζουν ένα ευρύ φάσμα διμερών, ολιγομερών, παραγώγων Diels-Alder και ενώσεων διαφόρων ειδών, μπορούν να τροποποιηθούν δομικά χρησιμοποιώντας μεγάλη ποικιλία υποκαταστατών με αποτέλεσμα να διαφοροποιείται η βιολογική δράση τους και να μπορούν να εξαχθούν

συμπεράσματα για τη σχέση δομής- βιολογικής δράσης. (Andersen, Markham, 2006)

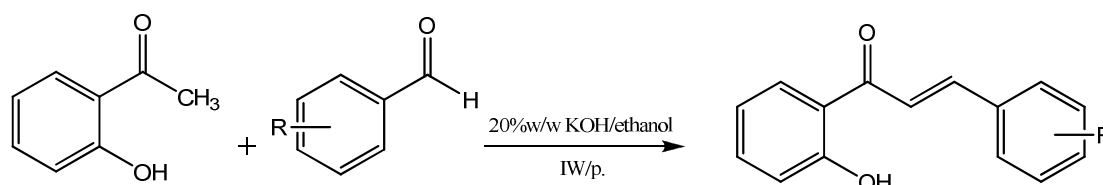
Οι χαλκόνες παρουσιάζουν πολλές χρήσιμες ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένης, της αντιοξειδωτικής, της αντιφλεγμονώδους, της αντιμικροβιακής, της αντιμυκητιασικής, της αντιπαρασιτικής, της κυτταροτοξικής, της αντινεοπλασματικής και της αντιαγγειογενετικής

3.8.1. ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΧΑΛΚΟΝΩΝ

1. Η καταλυόμενη από βάση αντίδραση συμπύκνωσης Claisen-Schmidt, ανάμεσα σε μια κετόνη και σε μια βενζαλδεΐδη, σε ένα πολικό διαλύτη, όπως π.χ. μεθανόλη, χρησιμοποιώντας διάφορους καταλύτες (Detsi A. Et al., 2009).



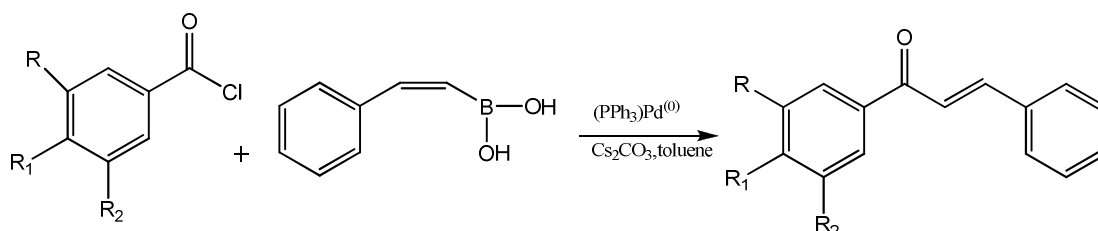
2. Σύνθεση με τη χρήση μικροκυμάτων: Η απόδοση της αντίδρασης Claisen-Schmidt βελτιώνεται σημαντικά, όταν πραγματοποιηθεί υπό την επίδραση μικροκυμάτων, ταυτόχρονα περιορίζεται ο σχηματισμός παραπροϊόντων όπως οι φλαβανόνες. Γενικά, η αύξηση της θερμοκρασίας, με ταυτόχρονη μείωση του χρόνου θέρμανσης, βελτιώνουν την απόδοση της αντίδρασης (Srivastava Y.K. et al, 2008).



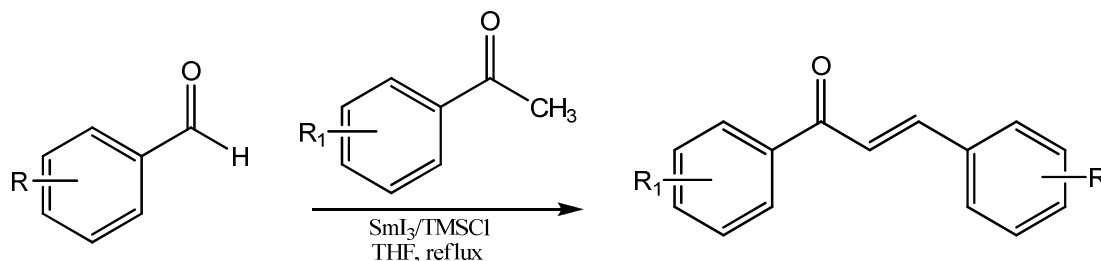
Επιπλέον, η χρήση των μικροκυμάτων παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις συμβατικές τεχνικές θέρμανσης, διευκολύνοντας

την επεξεργασία των προϊόντων, ενώ οι αντιδράσεις μπορούν να διεξάγονται απουσία διαλυτών, γεγονός ιδιαίτερα σημαντικό, αφού οι διαλύτες είναι συχνά πολύ τοξικοί, δύσχρηστοι και έχουν υψηλό κόστος. Η χρήση της ενέργειας των μικροκυμάτων για τη σύνθεση χαλκονών αποτελεί τμήμα της πράσινης χημείας.

3. Η σύζευξη Suzuki αποτελεί μία ακόμα μέθοδο σύνθεσης των χαλκονών, που πραγματοποιείται ανάμεσα σε παράγωγα του βενζοϊκού οξέος και βένζολοαιθενοβορονικά οξέα, χρησιμοποιώντας ως καταλύτη σύμπλοκα του παλλαδίου. Αποτελεί μια μέθοδο διασταυρούμενης σύζευξης που επιτρέπει τη σύνθεση συζευγμένων ολεφινών, στυρενίων και διφαινυλίων. Η συγκεκριμένη αντίδραση οδηγεί στην παραγωγή προϊόντων με υψηλές αποδόσεις που κυμαίνονται από 68-93% (Eddarir et al., 2003).



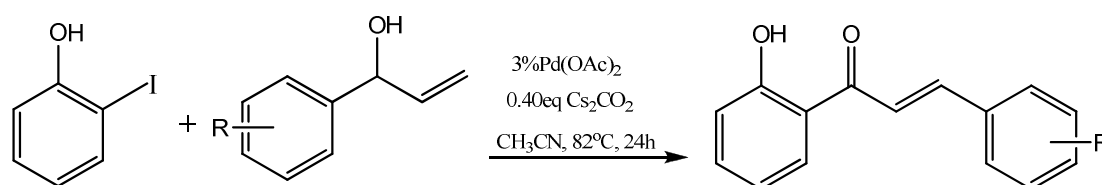
4. Η τύπου Mukaiyama αλδολική συμπύκνωση μεταξύ μη κυκλικών κετονών και βενζαλδεΐδων, παρουσία ιωδιούχου σαμαρίου και τριμεθυλοσιλυλοχλωριδίου:



Η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιείται κυρίως για τη σύνθεση προϊόντων μικτής αλδολικής συμπύκνωσης. Η παραπάνω αντίδραση οδηγεί στην απομόνωση

μόνο των trans ισομερών. Οι αποδόσεις των παραγόμενων ενώσεων είναι ικανοποιητικές και κυμαίνονται σε ποσοστά 75-82% (Fan, X.-S. Et al., 2002). Παρατηρήθηκε επίσης ότι τα προϊόντα με τις μεγαλύτερες αποδόσεις λαμβάνονται στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται ως υποκαταστάτες ομάδες-δέκτες ηλεκτρονίων. Αντίθετα, οι μικρότερες αποδόσεις σημειώνονται με την παρουσία ομάδων που είναι δότες ηλεκτρονίων (Fan, X.-S. Et al., 2002).

5. Η καταλυόμενη από παλλάδιο σύζευξη των ο-αλογονοφαινολών και των 1-αρυλο-2-προπεν-1 ολών (Briot A. et al., 2004).

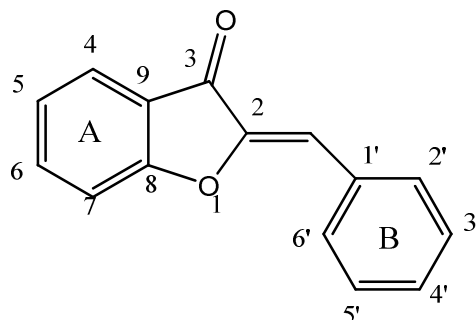


3.9. ΑΟΥΡΟΝΕΣ

Οι αουρόνες ή 2-βενζυλιδενο-3-κουμαρόνες, είναι μια υποκατηγορία φλαβονοειδών. Ονομαστήκαν έτσι λόγω του έντονου κίτρινου χρώματος τους από την λατινική λέξη “Aurum”, Χρυσός, εξαιτίας του έντονου κίτρινου χρώματος. Στην φύση δεν συναντώνται σε αφθονία αφού, είναι γνωστές ως τώρα περίπου 100 αουρόνες. Υπάρχουν κυρίως σαν συστατικά των καλλωπιστικών και ανθοφόρων φυτών, καθώς και σε μερικές φτέρες, βρύα και θαλάσσιες καφέ άλγες προσδίδοντάς τους ένα λαμπερό κίτρινο χρώμα (*Antirrhinum majus*, *Scrophulariaceae*, *Coreopsis sp.*, *Comos sp.*, *Dahlia sp.*)(Choudhary, M.I. et al., 2001).

Δομικά προέρχονται από τα φλαβονοειδή και εμφανίζονται σε δύο ισομερείς μορφές, τις E και Z. Οι περισσότερες αουρόνες βρίσκονται σε Z-διαμόρφωση η οποία είναι θερμοδυναμικά σταθερότερη, ενώ λίγες βρίσκονται σε E-διαμόρφωση (Andersen, Markham, 2006). Βιοσυντίθενται από τις χαλκόνες μέσω της δράσης του ενζύμου συνθετάση της αουρεοσιδίνης. Οι αουρόνες προκύπτουν από την

οξειδωτική κυκλοποίηση των χαλκονών προς ένα πενταμελή δακτύλιο αντί για ένα εξαμελή.



Σχήμα 4: Γενική δομή αουρονών

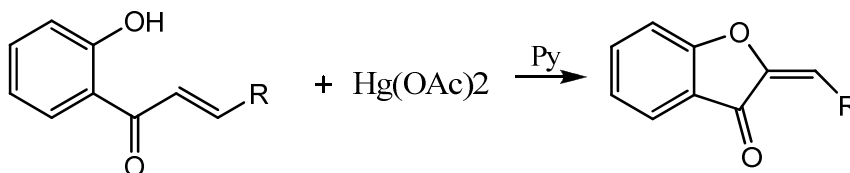
3.9.1. ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΑΟΥΡΟΝΩΝ

1. Μια από τις παλαιότερες τεχνικές σύνθεσης των αουρονών, είναι η οξειδωτική κυκλοποίηση των 2'- υδροξυχαλκονών, χρησιμοποιώντας οξικό υδράργυρο ως οξειδωτικό, παρουσία διαλύτη οξικού οξέος (Sekizaki et al., 1988). Η χαλκόνη και ο οξικός υδράργυρος προστίθενται σε γραμμομοριακή αναλογία 1:2 και η αντίδραση αναπτύσσεται με θέρμανση στους 90-95°C για 8 h. Η παραγωγή της αουρόνης συνοδεύεται και από το σχηματισμό μιας ποσότητας φλαβόνης.

2. Μια εναλλακτική μέθοδος σύνθεσης των αουρονών περιλαμβάνει την οξειδωτική κυκλοποίηση των χαλκονών με οξικό υδράργυρο, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη πυριδίνη. Η μέθοδος αυτή οδηγεί στην παραγωγή προϊόντων σε υψηλότερες αποδόσεις (44-70%) σε σχέση με την προηγούμενη (VenkateswarluS. et al., 2007 και Usami Y. et al, 2009)

Σύμφωνα με τους Detsi et al., η σύνθεση των αουρονών πραγματοποιείται μέσω μίας τροποποιημένης σύνθεσης της αντίδρασης της οξειδωτικής κυκλοποίησης της αντίστοιχης χαλκόνης. Τα αντιδρώντα, η χαλκόνη και ο οξικός υδράργυρος προστίθενται σε ισομοριακές ποσότητες, παρουσία πυριδίνης ως διαλύτη. Η

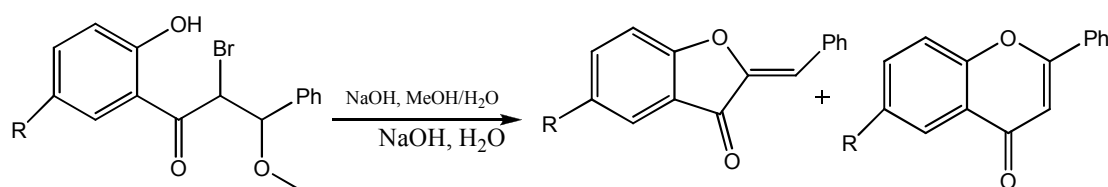
αντίδραση επιτυγχάνεται με θέρμανση στους 110°C για 1h. Από την παραπάνω αντίδραση λαμβάνεται το θερμοδυναμικά σταθερότερο Z-γεωμετρικό ισομερές χωρίς να εντοπίζεται φλαβόνη.



Σχήμα 5: Οξειδωτική κυκλοποίηση χαλκονών

4. Μια άλλη τεχνική σύνθεσης αουρονών, είναι η οξειδωτική κυκλοποίηση των χαλκονών, χρησιμοποιώντας ως οξειδωτικό μέσο, αντί για τον οξικό υδράργυρο, το οξικό μαγγάνιο παρουσία διαλύτη οξικού οξέος. Τα αντιδρώντα, η χαλκόνη και το οξικό μαγγάνιο προστίθενται σε γραμμομοριακή αναλογία 1:3. Η αντίδραση πραγματοποιείται με θέρμανση στους 100°C για 30 min. Η αντίδραση αυτή παράγει ένα μίγμα E- και Z- αουρονών καθώς και ένα μίγμα καρβοξυλικών οξέων (Kurosawa et al., 1972),.

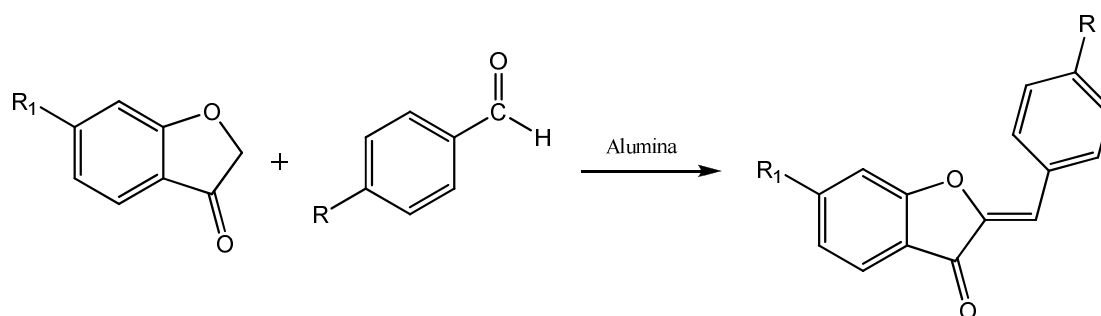
5. Οι αουρόνες μπορούν να συντεθούν επίσης από διϋδροχαλκόνες με την μέθοδο σύνθεσης Wheeler. Σε διάλυμα διϋδροχαλκόνης προστίθεται NaOH σε συγκεντρώσεις 0,2M έως 10M, παρουσία μεθανόλης, σύμφωνα με την αντίδραση:



Σχήμα 6: Μέθοδος σύνθεσης αουρονών κατά Wheeler

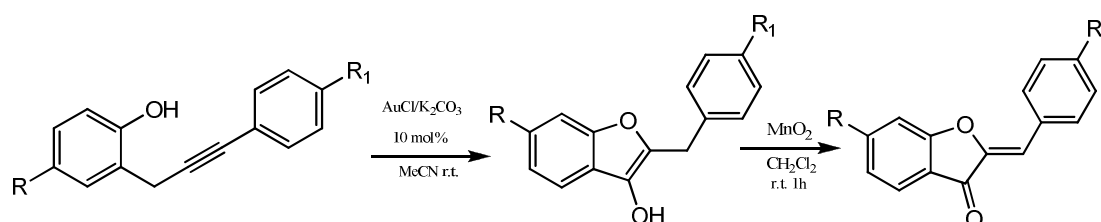
Το μειονέκτημα της αντίδρασης αυτής είναι η μικρή απόδοση της αουρόνης σε σχέση με τις φλαβόνες που παράγονται σαν κύριο προϊόν..

6. Αουρόνες μπορούν να συντεθούν από την αντίδραση μιας 3-κουμαρανόνης με μια αρωματική αλδεΐδη με καταλύτη Alumina. Τα αντιδρώντα, η 3-κουμαρανόνη και η αρωματική αλδεΐδη προστίθενται σε γραμμομοριακή αναλογία 1:1,5 και η αντίδραση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου για 4h. Από το συγκεκριμένο τύπο αντίδρασης λαμβάνεται το Z-γεωμετρικό ισομερές σε υψηλές αποδόσεις (Varma R. S. Et al., 1992).



Σχήμα 7 : Σύνθεση αουρονών με καταλύτη Alumina.

7. Αντίδραση σύνθεσης αουρονών μπορεί να πραγματοποιηθεί σε τρία στάδια. Αρχικά, πραγματοποιείται κυκλοποίηση μιας υποκατεστημένης 1-(2-υδροξυφαινυλ)-3-φαινυλοπροπυνόλης με καταλύτη χρυσό και στη συνέχεια, το προϊόν οξειδώνεται. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Από αυτήν την αντίδραση, μπορεί να προκύψει μεγάλη ποικιλία προϊόντων. Οι αποδόσεις είναι συνήθως άνω του 70% .



4. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ – ΣΚΟΠΟΣ

Οι χαλκόνες αποτελούν μια ομάδα ενώσεων που σχετίζονται με πλειάδα βιολογικών δράσεων, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται η αντιφλεγμονώδης δράση, η παγίδευση και η εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών, η αναστολή ποικίλων ενζύμων και παραγόντων που εμπλέκονται στη διαδικασία της φλεγμονής αλλά και η κυτταροτοξικότητα και η αντικαρκινική δράση.

Οι ενώσεις αυτές παρουσιάζουν συνθετικό ενδιαφέρον ως τελικά αλλά και ως ενδιάμεσα προϊόντα. Προκύπτουν από την εφαρμογή της αντίδρασης Claisen-Schmidt μεταξύ κατάλληλα υποκατεστημένων αρωματικών αλδεϋδών και κετονών.

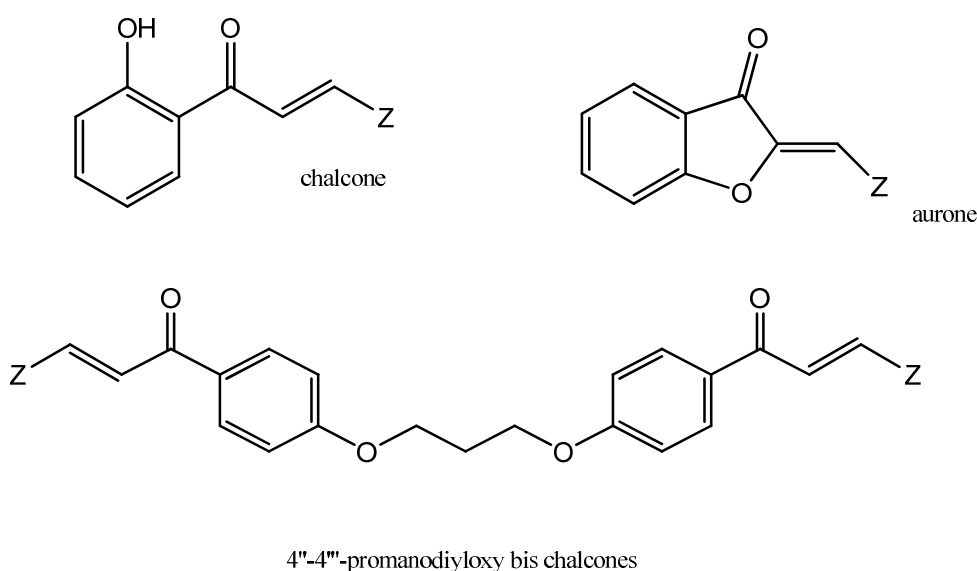
Ιδιαίτερη σημασία παρουσιάζουν οι μόνο- ή οι πολυ-υδροξυ-υποκατεστημένες χαλκόνες, σαν ενδιάμεσα σύνθεσης των φλαβονών, ενώσεων που απαντώνται στη φύση με ποικιλία βιολογικών ιδιοτήτων (Go et al., 2005, Dimmock et al., 1999) αλλά και των αουρονών. Προηγούμενες φαρμακοχημικές μελέτες οδήγησαν στο σχεδιασμό, τη σύνθεση και τη βιολογική μελέτη χαλκονών και παραγώγων τους με ισχυρή αντιφλεγμονώδη/αντιοξειδωτική δράση. (Detsi et al., 2009, Kouskoura M. et al., 2008, Msc. Giakoumakou, 2005). Εκμεταλλευόμενοι τα αποτελέσματα αυτά θελήσαμε να διαπιστώσουμε την διατήρηση, αύξηση ή εξαφάνιση της δράσης των αουρονών που προκύπτουν από την οξείδωση βιολογικά δραστικών 2'-υδροξυ-χαλκονών και τον ρόλο του συνδυασμού διπλής αιθερικής ομάδας και διπλής χαλκόνης στο ίδιο μόριο, στην βιολογική δράση.

Έτσι στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια να αξιοποιηθούν τα δημοσιευμένα βιολογικά αποτελέσματα αντιοξειδωτικής-αντιφλεγμονώδους δράσης χαλκονών και αουρονών στην εξαγωγή ποσοτικών σχέσεων δομής – δράσης. Τα αποτελέσματα αυτά λήφθηκαν υπόψη στο σχεδιασμό και τη σύνθεση των νέων παραγώγων, που συνθέσαμε και στην προσπάθεια διερεύνησης του μηχανισμού δράσης τους.

Πρόσφατα στην βιβλιογραφία αναφέρθηκαν πολυμεθυλενο-διπλες χαλκόνες (Sodani R.S. et al., 2009) με πιθανό βιολογικό ενδιαφέρον και ιδιαίτερα με ρόλο στην καταπολέμηση των προνυμφών των κουνουπιών.

Λόγω του οξύτατου προβλήματος που αντιμετωπίζουν οι παραμεσόγειες χώρες, θεωρήσαμε ενδιαφέρον να συνθέσουμε τροποποιημένα μόρια και να τα μελετήσουμε (εκτός για την αντιοξειδωτική-αντιφλεγμονώδη δράση τους) και για αυτήν τους την συμπεριφορά.

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 σε απόδοση. Για την ταυτοποίηση των δομών των ενώσεων χρησιμοποιήθηκαν μέθοδοι ενόργανης ανάλυσης, φασματοσκοπία IR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, MS, στοιχειακή ανάλυση και χρωματογραφικές (TLC).



Σχήμα 8: Γενικές δομές των ενώσεων που συντέθηκαν

Επιδιώχθηκε η θεωρητική πρόβλεψη των τιμών της λιποφικτικότητας επειδή η φυσικοχημική αυτή ιδιότητα συνδέεται άμεσα με τη φαρμακολογική δράση. Η παρούσα εργασία έχει ως στόχο να μελετήσει τη σύνθεση και τις βιολογικές ιδιότητες ενονικών παραγώγων σε *in vivo* πειράματα που σχετίζονται με τη φλεγμονή αλλά και σε *in vitro* δοκιμασίες που σχετίζονται με την αντιοξειδωτική δράση που εμπλέκεται άμεσα ή έμμεσα στο φαινόμενο της φλεγμονής.

Οι ενώσεις που συντέθηκαν 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 υπεροξειδωσής του λινελαϊκού οξέος
 - III. Αναστολή του ενζύμου λιποξυγονάση φυτικής προέλευσης (από σόγια)
 - IV. Πιθανότητα εμφάνισης αντικαρκινικής.
- *Βιολογικό πειράμα in vivo:*
- Μελέτη της αντιφλεγμονώδους δράσης των ενώσεων:
 - I. Αναστολή της εμφάνισης του οιδήματος του άκρου ποδός επίμυα που προκλήθηκε με την ενδοδερμική χορήγηση της καρραγενίνης.
- *Ελεγχος της δράσης των ενώσεων επί του χρόνου ζωής πονομυών κουνουπιών in vivo*

Τέλος, γίνεται προσπάθεια να συσχετισθούν οι βιολογικές δράσεις που προσδιορίσαμε, με επιλεγμένες φυσικοχημικές ιδιότητες και να συσχετισθούν με όσες προηγούμενες αναφέρθηκαν με σκοπό τη συγκριτική τους μελέτη. Οι τιμές των φυσικοχημικών ιδιοτήτων υπολογίσθηκαν πχ. η λιποφιλικότητα, 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.

5. ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗ ΦΑΡΜΑΚΟΧΗΜΕΙΑ

5.1. ΠΟΣΟΤΙΚΕΣ ΣΧΕΣΕΙΣ ΔΟΜΗΣ ΔΡΑΣΗΣ, QUANTITATIVE STRUCTURE ACTIVITY RELATIONSHIPS (QSAR)

5.1.1. ΑΡΧΗ-ΜΕΘΟΔΟΣ

Από την εποχή Μεντελέγιεφ και της δημιουργίας του Περιοδικού Πίνακα των στοιχείων εμφανίστηκε επιτακτική η ανάγκη για την οργανωμένη μελέτη των σχέσεων μεταξύ της δομής και της δράσης των στοιχείων. Η πρακτική αυτή συνεχίζει την ανάπτυξη της ως τις μέρες μας καθώς, αυξάνεται ραγδαία η χρήση των ηλεκτρονικών υπολογιστών και η εφαρμογή των αρχών της κβαντοχημείας. Πρωτοπόρος στην έκφραση κυρίως ποσοτικών τέτοιων σχέσεων υπήρξε ο Hansch, ο οποίος πρώτος ασχολήθηκε με τη σημασία της λιποφιλικότητας των μορίων και τον ρόλο της στη βιολογική τους δράση. Δικαίως λοιπόν, θεωρείται ο πατέρας της έννοιας του QSAR.

Βασική αρχή του QSAR αποτελεί το γεγονός ότι διάφορες δομικές ιδιότητες των μορίων, πειραματικά υπολογιζόμενες, αντιστοιχούν στις διαφορές τους σε βιολογικό ή χημικό επίπεδο και συνεπώς εμφανίζεται μια σχέση που την συνδέει.

Το QSAR αποτελεί μια αναλυτική διαδικασία των δεδομένων, ένα εργαλείο, το οποίο δίνει τη δυνατότητα στο χρήστη να διεисδύσει μέσα στις σχέσεις δομής και δράσης. Οι σχέσεις δομής-δράσης, δηλαδή οι σχέσεις QSAR αποτελούν πολυποίκιλα μαθηματικά μοντέλα που αποδίδουν τους συσχετισμούς δισδιάστατων ή και τρισδιάστατων φυσικοχημικών ιδιοτήτων και της βιολογικής δραστηριότητας.

Χρησιμοποιώντας λοιπόν το QSAR:

- προβλέπεται η πιθανή βιολογική δράση των υποψήφιων χημικών ενώσεων.
- μελετώνται σε βάθος βιολογικές διαδικασίες.

Οι προβλέψεις επιτυγχάνονται μέσω ποσοτικοποίησης του SAR και έτσι προκύπτουν οι σχέσεις QSAR (Quantitative Structure Activity Relationships). 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:

$$ΒΔ = \{ \Sigma (\text{στερεοχημικές}) + \Sigma (\text{ηλεκτρονιακές}) + \Sigma (\text{υδροφοβικές}) \} \text{ αλληλεπιδράσεις}$$

Η γενική διαδικασία, που οδηγεί σε μια QSAR εξίσωση περιλαμβάνει 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

Παρά το γεγονός πως η μέθοδος τυγχάνει συνεχώς ευρύτερης αποδοχής και εφαρμογής και εμπλουτίζεται με περισσότερα στοιχεία, αυτό που είναι πραγματικά αναντικατάστατο είναι το ίδιο το πείραμα. Όταν τα πειραματικά στοιχεία είναι επαρκή, τότε και η επεξεργασία τους με τους ηλεκτρονικούς υπολογιστές οδηγεί σε ασφαλή και χρήσιμα για τη φαρμακευτική έρευνα δεδομένα.

5.1.2. ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΜΙΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ QSAR (Hansch και Leo, 1995)

Για την επιβεβαίωση της αξιοπιστίας μιας μελέτης QSAR είναι απαραίτητα τα εξής:

- Επαναληψιμότητα και καλή κατανομή των τιμών μιας συγκεκριμένης βιολογικής δράσης.

- Επιλογή των παραμέτρων (πειραματικών ή και θεωρητικών) για την ακριβή περιγραφή της δομής όλων των ενώσεων.
- Στατιστική μέθοδος που επιτρέπει την αξιολόγηση μιας Ποσοτικής Σχέσης, ενός προτύπου QSAR.
- Μέθοδος που επιτρέπει τον έλεγχο αξιοπιστίας του μοντέλου QSAR που προέκυψε.

5.1.3. ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΗ

Οι απαιτούμενες προϋποθέσεις για τα βιολογικά δεδομένα είναι:

- Οι ενώσεις να έχουν τον ίδιο μηχανισμό δράσης και να δρουν στον ίδιο υποδοχέα.
- Η βιολογική δράση να είναι εκφρασμένη σε αριθμητικά δεδομένα, τα οποία αντιστοιχούν σε μοριακές συγκεντρώσεις.
- Να είναι γνωστό το επίπεδο διεξαγωγής των βιολογικών πειραμάτων π.χ. μοριακό ή κυτταρικό απομονωμένο όργανο ή σύστημα.
- Τα βιολογικά πειράματα να συνοδεύονται από πληροφορίες για την αξιοπιστία και την επαναληψιμότητά τους.
- Η βιολογική δράση να είναι διαφοροποιημένη και καλά κατανεμημένη.

Τα βιολογικά δεδομένα εκφράζονται με την μορφή αρνητικού δεκαδικού λογαρίθμου ώστε τα αριθμητικά δεδομένα να αυξάνουν με αύξηση της δράσης. Συχνά χρησιμοποιείται η έκφραση $\log BR$ (λογάριθμος της 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} ή $\log \% \text{ επί τοις } \% \text{ απόκριση σε μια συγκεκριμένη δόση}$. (Hansch και Leo, 1995).

5.1.4. ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ - ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ

Η μεταβολή της βιολογικής δράσης είναι συνάρτηση παραμέτρων-ιδιοτήτων όπως :

Υδρόφοβες π.χ. συντελεστής κατανομής, διαλυτότητα

Ηλεκτρονιακές π.χ. σταθερά ιονισμού, επίδραση λόγω συντονισμού

Στερεοχημικές επιδράσεις π.χ. μοριακός όγκος, διατομικές επιδράσεις, ακτίνα van der Waals.

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

5.1.5. ΥΔΡΟΦΟΒΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ

Η λιποφιλικότητα σύμφωνα με τον ορισμό της κατά IUPAC εκφράζει τη συγγένεια ενός μορίου ή τμήματος μορίου ως προς ένα λιπόφιλο περιβάλλον. Αποτελεί μια ιδιότητα ύψιστης σημασίας για τη βιολογική δράση αφού επηρεάζει τις παθητικές διαδικασίες αλλά και τις διαδικασίες σύνδεσης των μορίων δηλαδή τη φαρμακοκινητική και τη φαρμακοδυναμική συμπεριφορά τους.

Στο σχεδιασμό φαρμάκων το πλέον καθιερωμένο μέτρο 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 :

$$\pi = \log P_X - \log P_H$$

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

Τέλος, 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 «παράγοντες» για να προβλέψουν τις ειδικές περιπτώσεις κάθε φορά πχ. διακλάδωση αλυσίδας, διακλάδωση ομάδας κ.ά.

5.1.6. ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΑΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ

Η ηλεκτρονική σταθερά του Hammett 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

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

5.1.7. ΣΤΕΡΕΟΧΗΜΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ (STERIC)

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

Οι γνωστότερες στερεοχημικές παράμετροι είναι αυτές 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 (B₁ και B₄ αντιστοιχούν στο

μικρότερο και μεγαλύτερο εύρος του υποκαταστάτη, οι δε B_2 και B_3 σε ενδιάμεσα εύρη).

Μία άλλη στερεοχημική παράμετρος είναι η σταθερά του Taft που συμβολίζεται E_s . Εκφράζει τις στερεοχημικές τοπικές ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις που αφορούν σε ομοιογενή διαλύματα και οι τιμές της σχετίζονται πολύ καλά με την ακτίνα van der Waals των υποκαταστατών, έχοντας αρνητικό πρόσημο.

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 (Σημειώσεις Προχ. Φαρμακοχ. Λίτινα).

5.1.8. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Η πολλαπλή γραμμική ανάλυση (Multiple Linear Regression Analysis) που αποτελεί εργαλείο του κλασσικού QSAR, συσχετίζει μια εξαρτημένη μεταβλητή με περισσότερες ανεξάρτητες μεταβλητές. Κάθε εξίσωση παλινδρόμησης αυτού του τύπου είναι απαραίτητο να συνοδεύεται από στατιστικά στοιχεία, όπως (Chi S.C.1990):

n: ο αριθμός των δεδομένων – ενώσεων.

DF, n-K, οι βαθμοί ελευθερίας όπου K ο αριθμός των μεταβλητών.

r: ο συντελεστής συσχέτισης, που πρέπει να τείνει στην μονάδα, λαμβάνει τιμές από -1 έως 1.

r²: το ποσοστό των περιπτώσεων που ερμηνεύει η εξίσωση x100.

s: η τυπική απόκλιση. Πρέπει να τείνει στο μηδέν.

Q2: διασταυρωμένος συντελεστής, μέτρο της ικανότητας πρόβλεψης του προτύπου.

F-test: ορίζουν το επίπεδο εμπιστοσύνης σε σχέση παραμέτρων-εξίσωσης-βαθμών ελευθερίας. Συνήθως χρησιμοποιείται επίπεδο εμπιστοσύνης 95%.

(), **confidence limits / standard errors:** συνοδεύουν τον συντελεστή κάθε παραμέτρου, οπωσδήποτε μικρότερα από το μισό της τιμής του συντελεστή.

outliers: δεδομένα - πειραματικές τιμές, που απορρίπτονται, που δεν συμπεριλαμβάνονται στην εξαγωγή της εξίσωσης.

Διακρίνουμε δύο μεθόδους για την πολλαπλή γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης: την ανάλυση Hansch, που συσχετίζει τη βιολογική δράση με τις φυσικοχημικές ιδιότητες, και 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 δραστηριότητα: λιποφιλικότητα, ηλεκτρονιακές ιδιότητες και στερεοχημικές ιδιότητες. Το ολικό αποτέλεσμα συνοψίζεται παρακάτω:

$$\text{Log BR} = -a (\log P)^2 + b \log P + \rho \sigma + d E_s + C$$

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

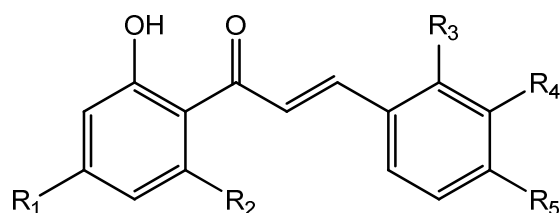
5.2. ΕΞΑΓΩΓΗ ΠΟΣΟΤΙΚΩΝ ΣΧΕΣΕΩΝ ΔΟΜΗΣ- ΔΡΑΣΗΣ (QSAR)

Τα αποτελέσματα που περιέχονται στους πίνακες που ακολουθούν προέρχονται από τη βιβλιογραφία και αφορούν 2'-υδροξυ-χαλκόνες (Detsi et al., 2009) και αουρόνες (Detsi et al., 2009). Οι ενώσεις που σημειώνονται με αστερίσκο στους Πίνακες έχουν απορριφθεί με τη διαδικασία "jackknife" και δεν περιλαμβάνονται στην εξαγωγή των εξισώσεων. Ο υπολογισμός της ολικής λιποφιλικότητας των μορίων, που ορίζεται ως $clogP$, και του μοριακού όγκου έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος C-QSAR (Hansch et al., 1991). Με τη βοήθεια του ίδιου προγράμματος επιτελέστηκε και η επεξεργασία των στοιχείων, με

σκοπό να καταλήξουμε σε μια μαθηματική έκφραση-εξίσωση, που να δύναται να περιγράψει με αριθμούς τη σχετική σπουδαιότητα των φυσικών και χημικών ιδιοτήτων, οι οποίες συνδέονται με τη βιολογική δραστικότητα των μορίων

- **2'-υδροξυ-χαλκόνες** (Detsi et al., 2009)

2-υδροξυ-χαλκόνες συντέθηκαν και εκτιμήθηκαν (Detsi et al., 2009) ως αναστολείς της λιποξυγονάσης και της λιπιδικής υπεροξειδωσης. Στους πίνακες που ακολουθούν παρατίθενται τα δομικά δεδομένα και τα δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν για την εξαγωγή της εξίσωσης [1].



Σχήμα 9: 2'-υδροξυ-χαλκόνες

A/A	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
1	H	H	H	H	OCH ₃
2	H	H	H	H	CH ₃
3	H	H	H	H	Cl
4	H	H	H	OCH ₃	H
5	H	H	OCH ₃	H	H
6	H	H	H	OCH ₃	OCH ₃
7	OCH ₃	OCH ₃	H	H	OCH ₃
8	OCH ₃	OCH ₃	H	H	Cl
9	OCH ₃	OCH ₃	H	H	CH ₃
10	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	H
11	OH	OH	H	OH	OH

Πίνακας 1 : Δομή χαλκονών που μελετήθηκαν

Πίνακας 2: Φυσικοχημικές παράμετροι και βιολογικά δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν για την εξαγωγή της εξίσωσης 1.

A/A	Υποκαταστάτης	AAPH%*	AAPH%**	$\Delta[AAPH\%^* - AAPH\%^{**}]$	ClogP	I _{OCH₃}
1	OCH ₃	1,81	1,76	0,05	3,43	0
2	CH ₃	1,63	1,71	-0,08	4,01	0
3	Cl	1,67	1,69	-0,02	4,22	0
4	OCH ₃	1,79	1,72	0,07	3,86	0
5	OCH ₃	1,85	1,80	0,05	2,97	0
6	OCH ₃ , OCH ₃	1,73	1,79	-0,06	3,17	0
7#	OCH ₃ , OCH ₃ , OCH ₃	1,63	1,95	-0,32	3,41	1
8	OCH ₃ , OCH ₃ , Cl	1,92	1,88	0,04	4,21	1
9	OCH ₃ , OCH ₃ , CH ₃	1,86	1,90	-0,04	3,99	1
10	OCH ₃ , OCH ₃ , OCH ₃	1,94	1,95	-0,01	3,41	1
11	OH, OH, OH, OH	1,89	1,99	-0,01	1,88	0

*Πειραματικές τιμές, ** τιμές θεωρητικά προκύπτουσες από την εφαρμογή της εξίσωσης, #ένωση που δεν έχει συμπεριληφθεί

$$\log AAPH\% = -0,092(0,066)ClogP + 0,186(0,098)I_{OCH_3} + 2,078(0,226)$$

[1]

$$n = 10, r = 0,880, r^2 = 0,774, q^2 = 0,602, s = 0,056, F_{2,7}=12,09 \alpha=0,01$$

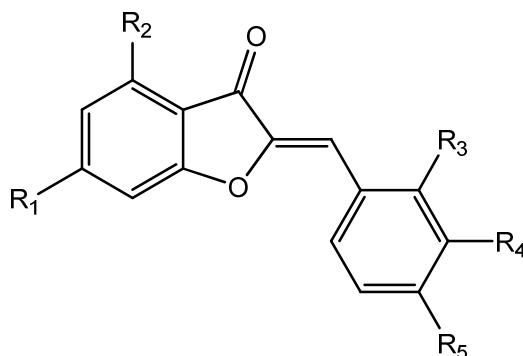
Η αύξηση της αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης, όπως προκύπτει από την ανάλυση μας, φαίνεται να συσχετίζεται με χαμηλή λιποφιλικότητα ή με αύξηση της υδροφιλικότητας των μορίων (αρνητικό πρόσημο της clog P, που εκφράζει την θεωρητικά υπολογισμένη ολική λιποφιλικότητα των μορίων). Θετικό ρόλο για την δράση διαδραματίζει η παρουσία μεθοξυ ομάδας σαν υποκαταστάτη στην θέση R₁ όπως δηλώνεται με τον δείκτη I_{OCH₃}

Οι παράμετροι δεν συσχετίζονται μεταξύ τους, είναι ανεξάρτητοι. Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης υποστηρίζουν την στατιστική αξιοπιστία της συσχέτισης. Μια ένωση απορρίπτεται από την διαμόρφωση της σχέσης [1]

Από την σχέση αυτή εκλείπει ο ρόλος του στεreoχημικού και του ηλεκτρονιακού φαινομένου.

- **Αουρόνες**

Αουρόνες συντέθηκαν και εκτιμήθηκαν (Detsi et al., 2009) σαν αναστολείς της λιποξυγονάσης. Στους πίνακες που ακολουθούν παρατίθενται τα δομικά δεδομένα και τα δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν για την εξαγωγή της εξίσωσης [2].



Σχήμα 10: Αουρόνες

A/A	R1	R2	R3	R4	R5
1	H	H	H	H	CH3
2	H	H	H	H	Cl
3	H	H	H	OCH3	H
4	H	H	OCH3	H	H
5	OCH3	OCH3	H	H	Cl

Πίνακας 3: Δομή αουρονών που μελετήθηκαν

Πίνακα 4: Φυσικοχημικές παράμετροι και βιολογικά δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν για την εξαγωγή της εξίσωσης 2.

A/A	Υποκαταστάτης	LOX%*	LOX%**	Δ[*-]**	ClogP	CMR	MgVol
1	CH ₃	1,51	1,62	-0,11	3,79	7,07	238,30
2	Cl	1,42	1,45	-0,003	4,22	7,37	256,69
3	OCH ₃	1,54	1,49	0,05	3,43	7,50	252,28
4	OCH ₃	1,60	1,49	0,11	3,43	7,50	252,28
5	OCH ₃ ,OCH ₃ ,Cl	0,89	0,91	-0,02	4,21	8,61	316,75

*Πειραματικές τιμές, ** τιμές θεωρητικά προκύπτουσες από την εφαρμογή της εξίσωσης [2]

Η επεξεργασία των δεδομένων του πίνακα έδειξε ότι δεν μπορεί να προκύψει κάποιος ρόλος για την λιποφιλικότητα. Αντίθετα ο συνολικός όγκος των μορίων MgVol αποτελεί την στατιστικά σημαντικότερη ιδιότητα για την εκδήλωση της δράσης. Όπως φαίνεται από την εξίσωση [2], το αρνητικό πρόσημο στο MgVol υποδηλώνει καθαρά το ρόλο των στερεοχημικών επιδράσεων στη δράση. Ουδεμία συσχέτιση μεταξύ του μοριακού όγκου και της λιποφιλικότητας σαν clog P δεν έχει βρεθεί (clog P vs MgVol = 0,319).

$$\log \text{LOX\%} = -0,009(0,004)\text{MgVol} + 3,641(0,924)$$

[2]

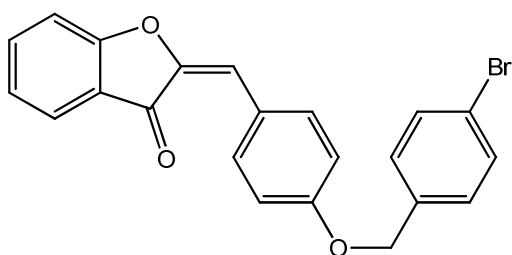
$$n = 5, r = 0,976, r^2 = 0,953, q^2 = 0,634, s = 0,042, F_{1,7} = 59,25 \alpha = 0,01$$

Πίνακα 5: Φυσικοχημικές παράμετροι και θεωρητικά βιολογικά δεδομένα που προέκυψαν από την εξίσωση 2 και αντιστοιχούν στις ενώσεις που σχεδιάσαμε (6-11).

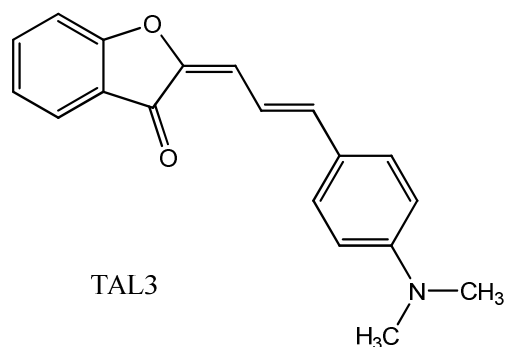
A/A	Υποκαταστάτης	LOX%*	ClogP	CMR	MgVol
6	Bromobenzyloxy	0,24	5,20	10,63	391,27
7	Phenoxy	0,03	5,61	9,55	314,35
8	dimethaminocinammome	1,14	4,28	9,23	291,37
9	naphthyl	1,17	4,87	8,72	288,31
10	Tert-butyl	0,61	6,40	10,74	350,49
11	Hydroxyl-naphthyl	1,17	4,02	8,72	288,31

* τιμές θεωρητικά προκύπτουσες από την εφαρμογή της εξίσωσης

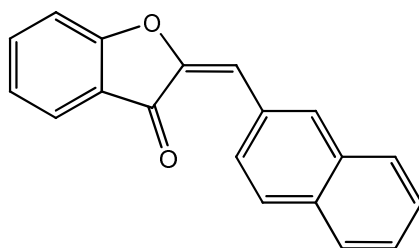
Με βάση την εξίσωση [2] σχεδιάσαμε τις αουρόνες για τις οποίες προκύπτουν οι θεωρητικές τιμές αναστολής της LOX που φαίνονται στον παραπάνω πίνακα.



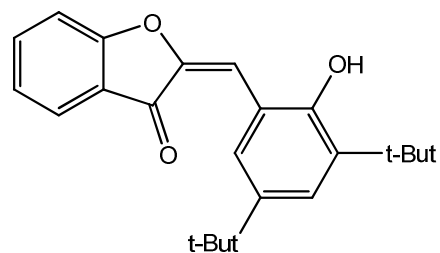
TAL1



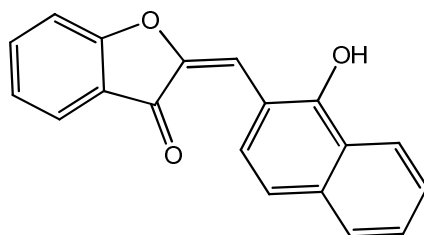
TAL3



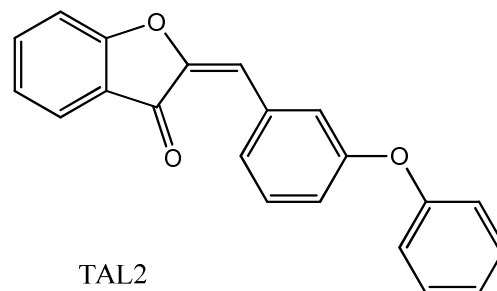
TAL4



TAL6



TAL7



TAL2

Σχήμα 11: Αουρόνες που σχεδιάστηκαν

6. ΟΡΓΑΝΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

6.1. ΌΡΓΑΝΑ

- Τα σημεία τήξης των ενώσεων προσδιορίστηκαν με συσκευή Mell Temp II, Laboratory Devices USA ή με τη συσκευή θερμαινόμενης τράπεζας τύπου Carl Zeiss Zenna. Τα σημεία τήξεως δίνονται μη διορθωμένα.
- Τα φάσματα υπερύθρου (IR) καταγράφηκαν σε φασματοφωτόμετρο FTIR-8101M Infrared Spectrophotometer SHIMADZU.
- Τα φάσματα υπεριώδους (UV) λαμβάνονται με φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης Perkin-Elmer UV-Vis Lambda 20 και Hitachi U-2001, χρησιμοποιώντας κυψελίδα πάχους 1cm.
- Τα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$ καταγράφηκαν σε φασματόμετρο Bruker AM-300 στα 300 και 75 MHz αντίστοιχα. Οι τιμές της χημικής μετατόπισης καταγράφηκαν σε μέρη ανά εκατομμύριο (δ), χρησιμοποιώντας τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS) σαν εσωτερικό πρότυπο ($\delta_{\text{TMS}}=0$).
- Τα φάσματα μάζας καταγράφηκαν με τη βοήθεια φασματογράφου LC-MS 2010 EV Shimadzu.
- Οι στοιχειακές αναλύσεις έγιναν με αυτόματο αναλυτή τύπου Perkin - Elmer 240B.
- Για την χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, κανονικής φάσης, χρησιμοποιήθηκαν πλάκες Silica gel/TLC cards, DC-Alufohlen-Kieselgel, Fluka.
- Για τον πειραματικό προσδιορισμό της λιποφιλικότητας με τη μέθοδο Χρωματογραφίας Λεπτής Στοιβάδας Αντίστροφης Φάσης (RPTLC) χρησιμοποιήθηκαν πλάκες TLC-Silica gel 60 Merk 5554 F₂₅₄.
- Για τη χρωματογραφία στήλης ως προσροφητικό χρησιμοποιείται Kieselgel 60 (Korngroße 0,063-0,200 mm και 70-230 mesh ASTM). Για την εμφάνιση των ουσιών χρησιμοποιήθηκε λάμπα UV ή θάλαμος ατμών I₂.
- Για την προπαρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας χρησιμοποιήθηκαν πλάκες silica gel Merck No 5721.

6.2. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Χημικά Αντιδραστήρια

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

Αντιδραστήρια για βιολογικές δοκιμασίες

- Λιποξυγονάση φυτικές προέλευσης (Σόγια) Sigma Chemical Co. (St. Louis, MI, USA)
- Καρραγενίνη K-100 εμπορίου

- 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλυδραζυλική ρίζα (DPPH), νορ-διυδρογουαρετικό οξύ (NDGA), διαμμωνιακό άλας του 2,2-διαζω-3-αιθυλο-βενζοθειαζολινο-σουλφονικού οξέος (ABTS), 2,2-διαζω-2-μεθυλο-προπανιμιδαμίδιο (AAPH), Τρολόξη από Aldrich Chemical Co. Milwaukee, WI, (USA)
- Άλας λινελαϊκού οξέος με νάτριο και ινδομεθακίνη, Sigma Chemical Co. (St. Louis, MI, USA)

Πειραματόζωα

Τα πειραματόζωα που χρησιμοποιούνται είναι επίμυες, της αιμομικτικής σειράς Fischer-344, τους οποίους διατηρούμε σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας ($20 \pm 2^{\circ}\text{C}$), 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) και σε νερό του δικτύου ύδρευσης.

Υπολογιστικά Προγράμματα

Χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Clog *P* της Biobyte Corp. 4.31. Για τον υπολογισμό της λιποφιλικότητας και το πρόγραμμα C-QSAR για την εξαγωγή ποσοτικών σχέσεων δομής δράσης.

7. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

7.1. ΓΕΝΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΧΑΛΚΟΝΩΝ (Detsi A.et al., 2009)

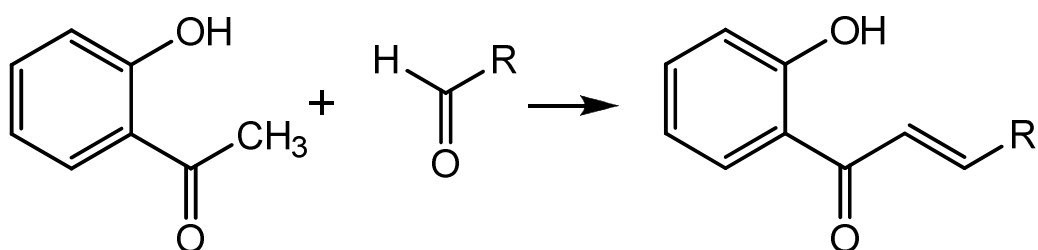
Σε εσφυρισμένη σφαιρική φιάλη των 50ml διαλύονται 2'-υδροξυ-ακετοφαινόνη και η αντίστοιχη υποκατεστημένη αρωματική αλδεΐδη σε αναλογία 1:1 σε αιθανόλη. Προστίθενται 3 ml KOH 20% και το διάλυμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται χρωματογραφικά με TLC με μίγμα διαλυτών εξάνιο : ακετόνη (2:1) ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Το στερεό που παραλαμβάνεται κατεργάζεται σε παγόλουτρο με HCL μέχρι οξίνισης. Το προϊόν παραλαμβάνεται με διήθηση υπό κενό και ανακρυσταλλώνεται από αιθανόλη ή κάποιο άλλο κατάλληλο διαλύτη που δηλώνεται παρακάτω. Ελέγχεται η καθαρότητα του προϊόντος με TLC. Η γενική πορεία της αντίδρασης απεικονίζεται στο Σχήμα 12. Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των ενώσεων παρουσιάζονται στους Πίνακες 7 και 8. Οι δομές που συντέθηκαν επιβεβαιώνονται από τα φασματοσκοπικά δεδομένα και τις στοιχειακές τους αναλύσεις.

7.1.1. ΣΥΝΘΕΣΗ ΕΠΙΜΕΡΟΥΣ ΧΑΛΚΟΝΩΝ

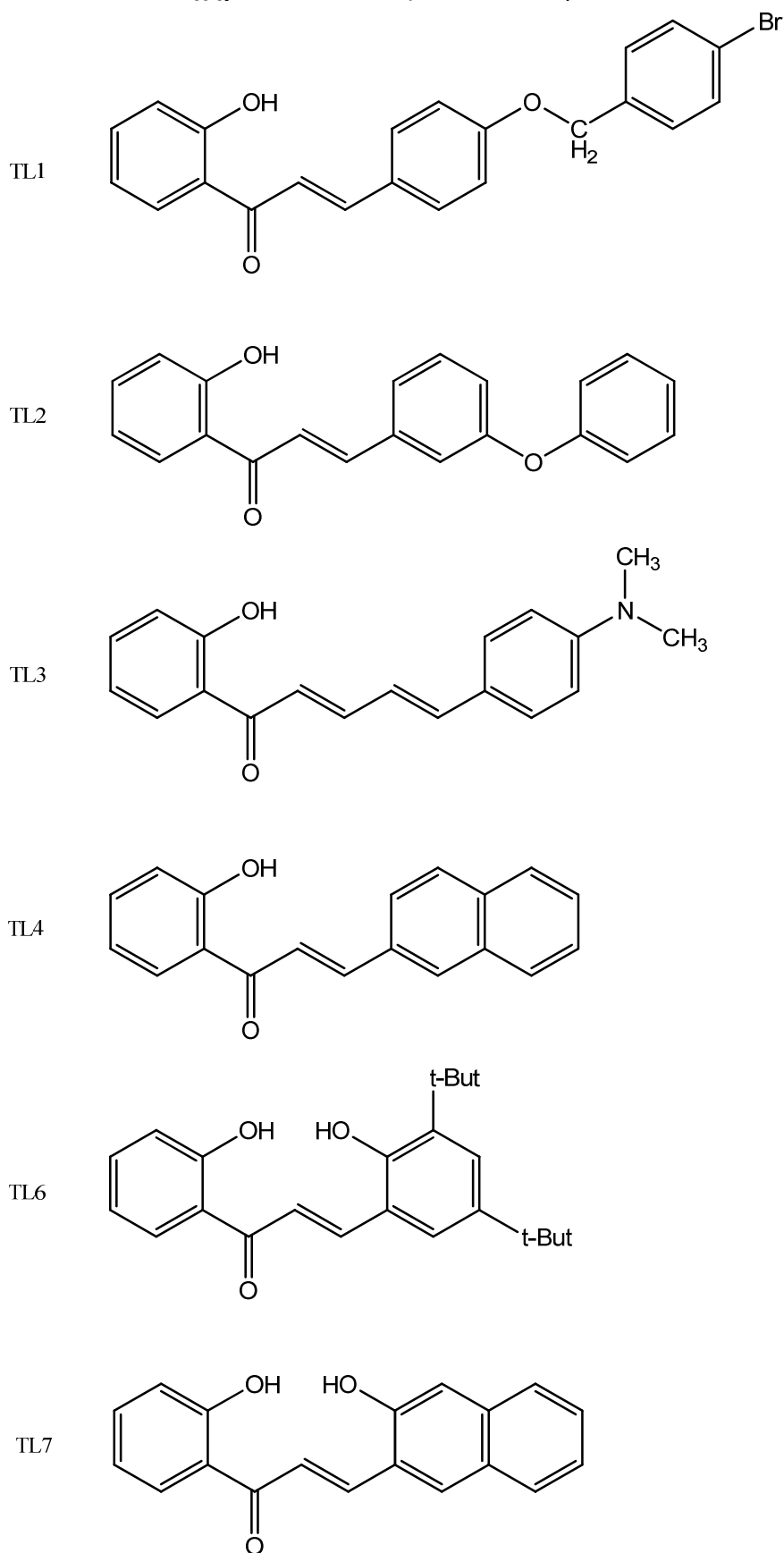
- **TL1:** για την σύνθεση της ακολουθήθηκε η γενική μέθοδος και το προϊόν ανακρυσταλλώθηκε από αιθανόλη.
- **TL2:** για τη σύνθεση της τροποποιήθηκε η γενική μέθοδος και αντικαταστάθηκε η ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου από παραμονή σε λουτρό υπερήχων για 24 ώρες. Το τελικό προϊόν ανακρυσταλλώθηκε από χλωροφόρμιο-μεθανόλη.
- **TL3:** για τη σύνθεση της τροποποιήθηκε η γενική μέθοδος και αντικαταστάθηκε η ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου από παραμονή σε λουτρό υπερήχων για 24 ώρες. Το τελικό προϊόν ανακρυσταλλώθηκε από μεθανόλη.

- **TL4:** για τη σύνθεση της τροποποιήθηκε η γενική μέθοδος και αντικαταστάθηκε η ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου από παραμονή σε λουτρό υπερήχων για 24 ώρες. Το τελικό προϊόν απομονώθηκε μετά από χρωματογραφία στήλης με διαλύτη πετρελαϊκό αιθέρα/οξικό αιθυλεστέρα 4:1.
- **TL6:** για την σύνθεση της ακολουθήθηκε η γενική μέθοδος και το προϊόν ανακρυσταλλώθηκε από πεντάνιο.
- **TL7:** για τη σύνθεση της τροποποιήθηκε η γενική μέθοδος και αντικαταστάθηκε η ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου από παραμονή σε λουτρό υπερήχων για 24 ώρες. Το τελικό προϊόν ανακρυσταλλώθηκε από πεντάνιο.

Οι χαλκόνες TL1, TL2, TL3 και TL4 είναι γνωστές από την βιβλιογραφία (Kouskoura et al., 2008)



Σχήμα 12: Πορεία σύνθεσης χαλκονών

Σχήμα 13: Χαλκόνες που συντέθηκαν

Πίνακας 7: Τελικά προϊόντα που παρασκευάστηκαν, σημεία τήξης και αποδόσεις.

ΕΝΩΣΗ	Απόδοση(%)	Σημείο τήξης(°C)
TL1	82,70	76
TL2	68,60	62
TL3	78,60	Ημι-στερεό
TL4	64,20	85
TL6	63,45	Ημι-στερεό
TL7	77,35	Ημι-στερεό

Πίνακας 8 : Στοιχειακές αναλύσεις των ενώσεων που συντέθηκαν

ΕΝΩΣΗ	ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΤΥΠΟΣ	C%, H%, N% ΥΠΟΛΟΓ.		C%, H%, N% ΕΥΡΕΘ.	
TL6	$C_{23}H_{28}O_3$	78,38	8,01	78,54	7,69
			-		
TL7	$C_{19}H_{14}O_3$	78,61	4,86	78,22	4,62
			-		

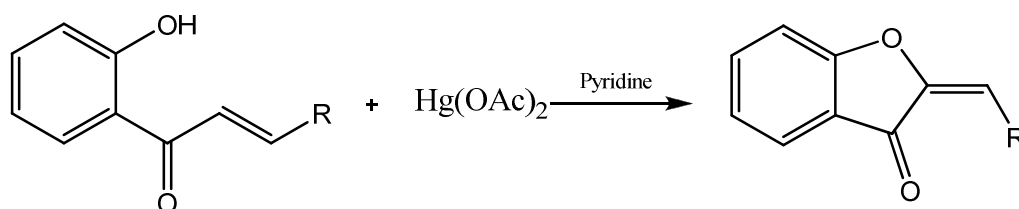
7.1.2. ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ ΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕ ΤΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΥΘΡΟΥ, ΤΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΜΑΖΩΝ**TL6:****IR (KBr) (cm^{-1}):** 1700, 1610 **^1H -NMR (CDCl_3): δ (ppm)** 1,81 (s, 18H), 6,79-6,96 (br, 2H), 7,38-7,68 (m, 3H), 7,75-7,97 (m, 3H), 9,9 (s, 1H), 10,9 (s, 1H)**MS (ESI):** 353 $[\text{M}+1]^+$ **TL7:****IR (Nujol) (cm^{-1}):** 1710, 1610 **^1H -NMR (CDCl_3): δ (ppm)** 6,02-8,16 (br, 1H), 6,79-6,96 (br, 2H), 7,41-7,99 (m, 8H), 8,25 (d, 1H $J=27\text{Hz}$), 10,3 (s, 1H), 11,90 (s, 1H)**MS (ESI):** 320 $[\text{M}+\text{CH}_3\text{OH}]^+$

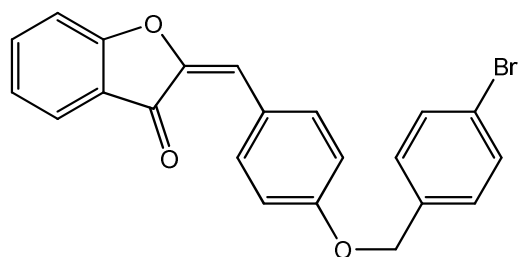
7.2. ΓΕΝΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΑΟΥΡΟΝΩΝ (Detsi A. et al., 2009)

Σε εσφυρισμένη σφαιρική φιάλη των 50ml διαλύονται σε 10ml πυριδίνη η 2'-υδροξυ υποκατεστημένη χαλκόνη και ο οξικός υδράργυρος σε αναλογία 1:1. Το μείγμα θερμαίνεται υπό ανάδευση με κάθετο ψυκτήρα επαναρροής για 1 ώρα. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται χρωματογραφικά με TLC με μίγμα διαλυτών εξάνιο : ακετόνη (2:1) ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Το στερεό που παραλαμβάνεται κατεργάζεται σε παγόλουτρο με HCl μέχρι οξίνισης. Το προϊόν εκχυλίζεται με μίγμα χλωροφορμίου και διχλωρομεθανίου (3x50 ml) και ξηραίνεται. Στη συνέχεια ο διαλύτης απομακρύνεται με συμπύκνωση υπό κενό με την βοήθεια περιστροφικού συμπυκνωτή. Το προϊόν ανακρυσταλλώνεται από κατάλληλο διαλύτη. Ελέγχεται ποιοτικά με TLC. Η γενική πορεία της αντίδρασης απεικονίζεται στο Σχήμα 14. Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των ενώσεων παρουσιάζονται στους Πίνακες 9 και 10. Οι δομές που συντέθηκαν επιβεβαιώνονται από τα φασματοσκοπικά δεδομένα και τις στοιχειακές τους αναλύσεις.

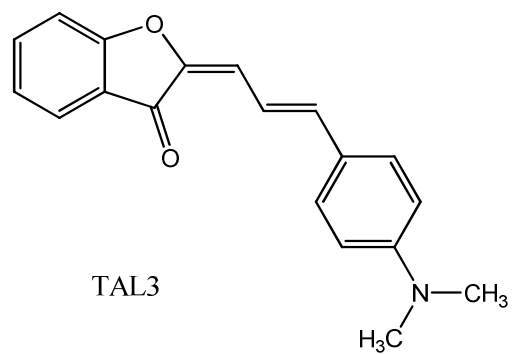
7.2.1. ΣΥΝΘΕΣΗ ΑΟΥΡΟΝΩΝ

- TAL1: για την σύνθεση της ακολουθήθηκε η γενική μέθοδος και το προϊόν ανακρυσταλλώθηκε από αιθανόλη.
- TAL2: για την σύνθεση της ακολουθήθηκε η γενική μέθοδος και το προϊόν απομονώθηκε με χρωματογραφία στήλης με διαλύτη πετρελαϊκό αιθέρα/οξικό αιθυλεστέρα 80:20.
- TAL3: Η ένωση διαλύεται σε αιθανόλη προστίθεται αιθέρας στον οποίο έχει διαβιβαστεί αέριο HCl . Το υδροχλωρικό άλας που παράγεται καταβυθίζεται με ξηρό αιθέρα και ανακρυσταλλώνεται από ακετόνη.
- TAL4: για την σύνθεση της ακολουθήθηκε η γενική μέθοδος και το προϊόν απομονώθηκε με χρωματογραφία στήλης με διαλύτη πετρελαϊκό αιθέρα/οξικό αιθυλεστέρα 4:1.
- TAL6: για την σύνθεση της ακολουθήθηκε η γενική μέθοδος και το προϊόν ανακρυσταλλώθηκε από επτάνιο.
- TAL7: για την σύνθεση της ακολουθήθηκε η γενική μέθοδος και το προϊόν ανακρυσταλλώθηκε από επτάνιο.

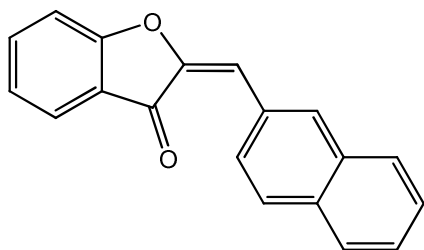
Σχήμα 14: Πορεία σύνθεσης αουρονών

Σχήμα 15: Αουρόνες που συντέθηκαν

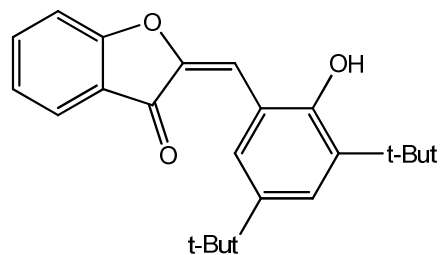
TAL1



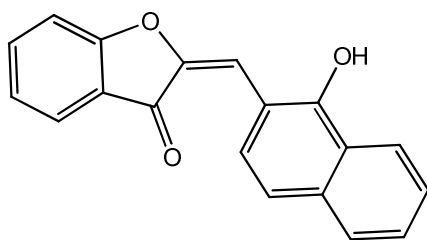
TAL3



TAL4



TAL6



TAL7

Πίνακας 9: Τελικά προϊόντα που παρασκευάστηκαν, σημεία τήξης και αποδόσεις.

ΕΝΩΣΗ	Απόδοση(%)	Σημείο τήξης(°C)
TAL1	58,60	206
TAL3	61,50	Ημι-στερεό
TAL4	58,7	182
TAL6	69,45	Ημι-στερεό
TAL7	48,75	Ημι-στερεό

Πίνακας 10: Στοιχειακές αναλύσεις των ενώσεων που συντέθηκαν

ΕΝΩΣΗ	ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΤΥΠΟΣ	C%, H%, N% ΥΠΟΛΟΓ.			C%, H%, N% ΕΥΡΕΘ.		
TAL1	$C_{22}H_{15}BrO_3$	64,88	3,71	-	65,06	3,52	
TAL3	$C_{19}H_{18}ClNO_2$	69,62	5,53	4,27	69,48	5,88	4,43
TAL4	$C_{19}H_{12}O_2$	83,81	4,44	-	84,07	4,58	
TAL6	$C_{23}H_{26}O_3$	78,83	7,48	-	78,91	7,63	
TAL7	$C_{19}H_{12}O_3$	79,16	4,20	-	79,25	4,54	

7.2.2. ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ ΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕ ΤΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΥΘΡΟΥ, ΤΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΜΑΖΩΝ

TAL1:

IR (KBr) (cm^{-1}): 1710, 1690, 1630

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) 5,08 (s, 2H), 6,78(s, 1H), 7,025 (d, 2H), 7,18-7,33 (m, 4H), 7,525 (d, 2H), 7,60-7,64 (m, 1H), 7,805 (d, 1H), 7,89 (d, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): 69,4, 112,8, 115, 115,4, 116, 122, 122,3, 124, 124,6, 125,6, 129, 130, 131, 131,,,8, 133, 133,4, 135,5, 136, 146, 158, 160, 171

TAL3:

IR (Nujol) (cm^{-1}): 1690, 1630

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) 2,96-3,07 (m, 6H), 6,72-6,76 (m, 2H), 6,805 (d, 1H J=15Hz), 6,88 (s, 1H), 7,045 (d, 1H J=15Hz), 7,12-7,65 (m, 4H), 7,67-7,92 (m, 2H)

TAL4:

IR (KBr) (cm^{-1}): 1700, 1600

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) 6,8 (s 1H), 7,14-7,48 (m, 2H), 7,52-7,90 (m, 5H), 8,22 (d, 2H), 8,46 (d, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): 108,6, 113, 113,4, 123, 123,4, 123,5, 124,8, 124,9, 125,6, 126,2, 127,1, 128,8, 128,9, 130,2, 130,6, 136,9, 147,8, 153,2, 177,8

MS (ESI): 276[M]⁺, 300[M+1+Na]⁺

TAL6:

IR (Nujol) (cm^{-1}): 1750, 1660

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) 2,307-2,98 (br, 18H), 6,93-6,96(s, 1H), 8,7-8,9(br, 1H), 7,42-7,67(m, 3H), 7,85-8,1(m,3H)

MS (ESI): 421[M+CH₃OH + K]⁺

TAL7:

IR (Nujol) (cm^{-1}): 1700, 1610

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) 9,86 (s, 1H), 6,19 (s, 1H), 6,89-6,98 (m, 7H), 7,35-8,15 (m, 3H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): 112, 114,3, 117,5, 119,2, 120, 120,1, 125,8, 130,8, 132, 136, 142, 143, 144, 145,4, 146,5, 162, 166, 170, 179,6

MS (ESI): 312 [M+CH₃OH]⁺

7.3. ΓΕΝΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ 4'', 4'''- ΠΡΟΠΑΝΟΔΙΟΞΥΔΙΧΑΛΚΟΝΩΝ (Sodani R.S. et al., 2009)

Στάδιο 1^ο:

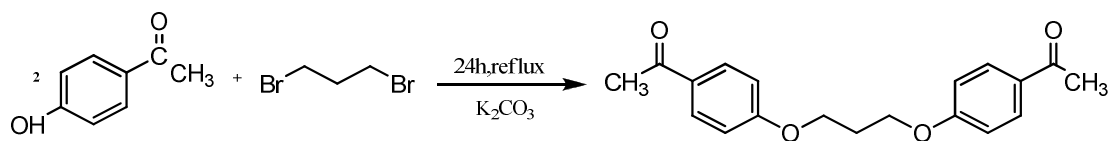
Η 4'-υδροξυ-ακετοφαινόνη και το 1,3-διβρωμοπροπάνιο σε αναλογία 2:1 παρουσία άνυδρου K_2CO_3 , διαλύονται σε 50 ml ακετόνη και θερμαίνονται για 18 ώρες. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται χρωματογραφικά με TLC με μίγμα διαλυτών εξάνιο : ακετόνη (2:1) ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Το τελικό στάδιο της αντίδρασης επιβεβαιώνεται από αρνητική δοκιμασία με $FeCl_3$. Στην συνέχεια απομακρύνεται ο διαλύτης με συμπύκνωση υπό κενό σε περιστροφικό αποστακτήρα και το στερεό προϊόν κατεργάζεται με νερό. Στην συνέχεια ανακρυσταλλώνεται από αιθανόλη.

Στάδιο 2^ο:

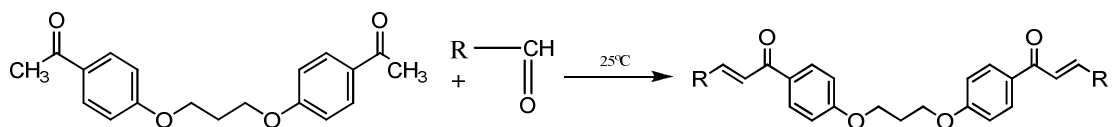
Σε εσφυρισμένη σφαιρική φιάλη των 100 ml διαλύονται η διακετοφαινόνη και η αντίστοιχη υποκατεστημένη αρωματική αλδεΐδη σε αναλογία 1:2, σε αιθανόλη. Προστίθενται 10 ml διαλύματος KOH 20% w/v και το διάλυμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου επί 24 ώρες. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται χρωματογραφικά με TLC με μίγμα διαλυτών εξάνιο : ακετόνη (2:1) ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Το στερεό που παραλαμβάνεται κατεργάζεται σε παγόλουτρο με HCl μέχρι οξίνισης. Το προϊόν παραλαμβάνεται με εκχύλιση με χλωροφόρμιο (3x50ml) και στην συνέχεια απομακρύνεται ο διαλύτης με συμπύκνωση υπό κενό με περιστροφικό αποστακτήρα. Το προϊόν ανακρυσταλλώνεται από κατάλληλο διαλύτη. Ελέγχεται ποιοτικά με TLC. Η γενική πορεία της αντίδρασης απεικονίζεται στο Σχήμα 15. Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των ενώσεων παρουσιάζονται στους Πίνακες 11 και 12. Οι δομές που συντέθηκαν επιβεβαιώνονται από τα φασματοσκοπικά δεδομένα και τις στοιχειακές αναλύσεις.

Σχήμα 16: Αντίδραση σύνθεσης 4'',4'''-τριμεθυλενο-διοξυ-δισ-υποκατεστημένων χαλκόνων

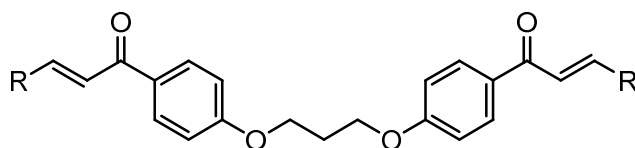
Στάδιο 1^ο:



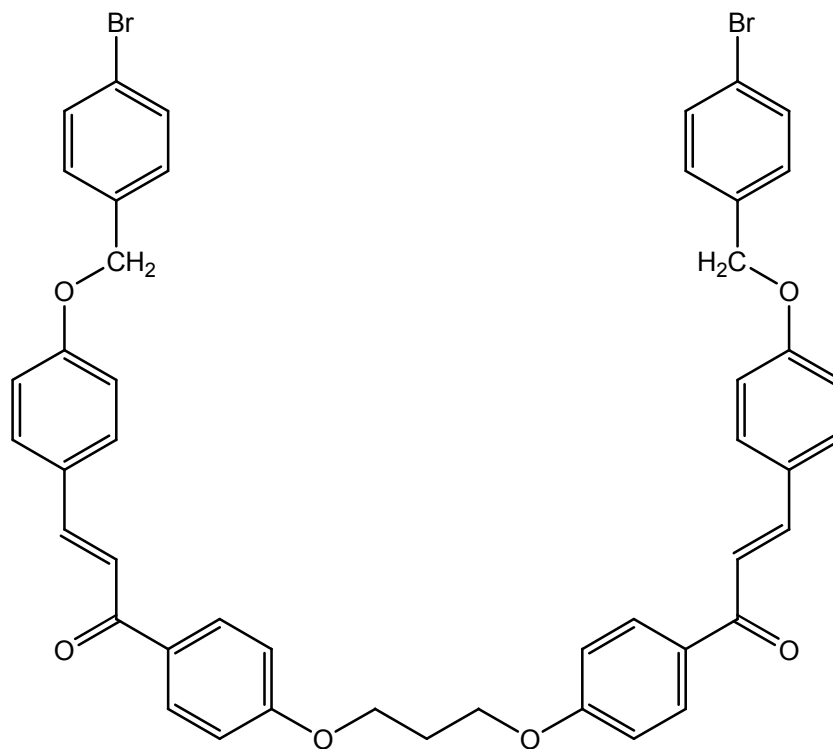
Στάδιο 2^ο:



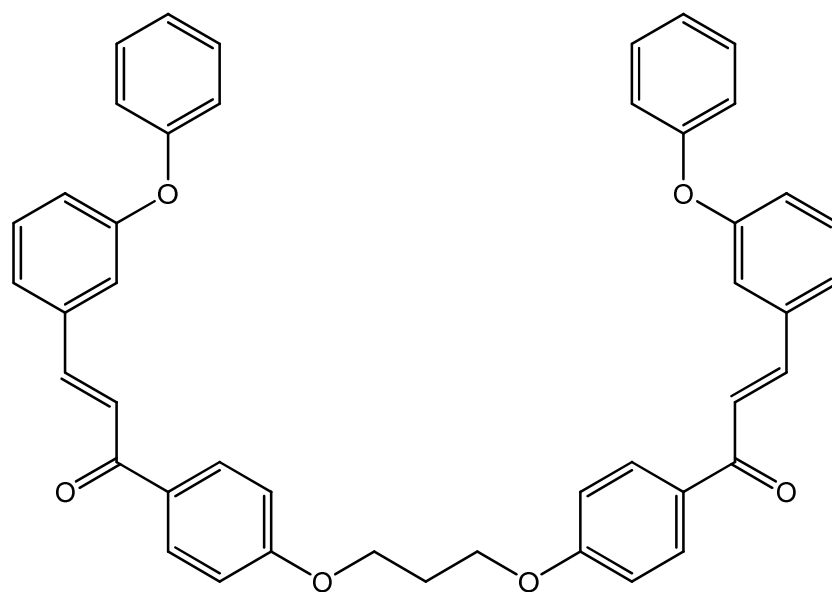
Σχήμα 17 : 4'',4'''-τριμεθυλενο-διοξυ-δισ-υποκατεστημένες χαλκόνες που συντέθηκαν



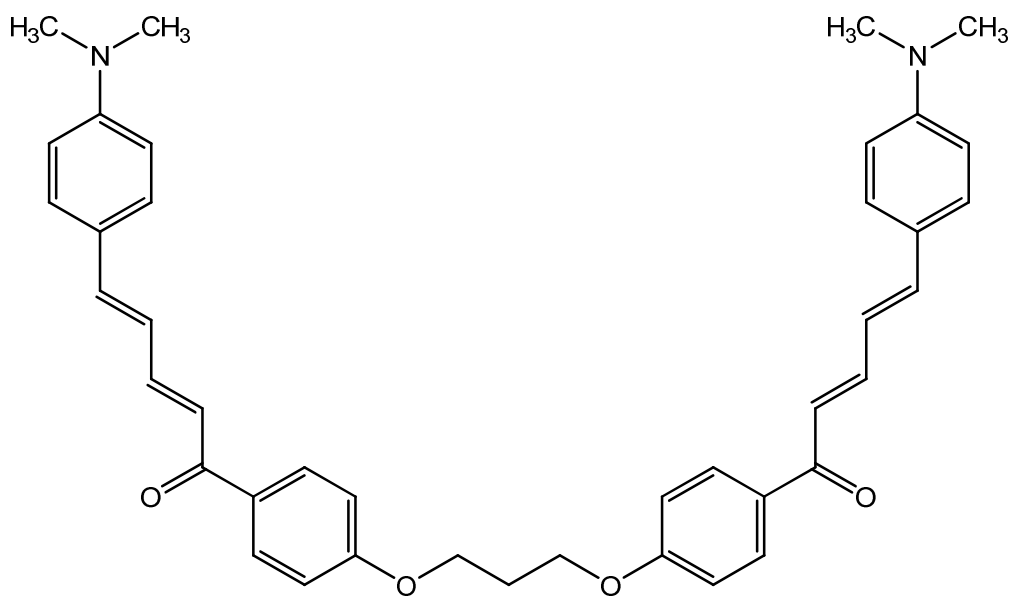
FW1



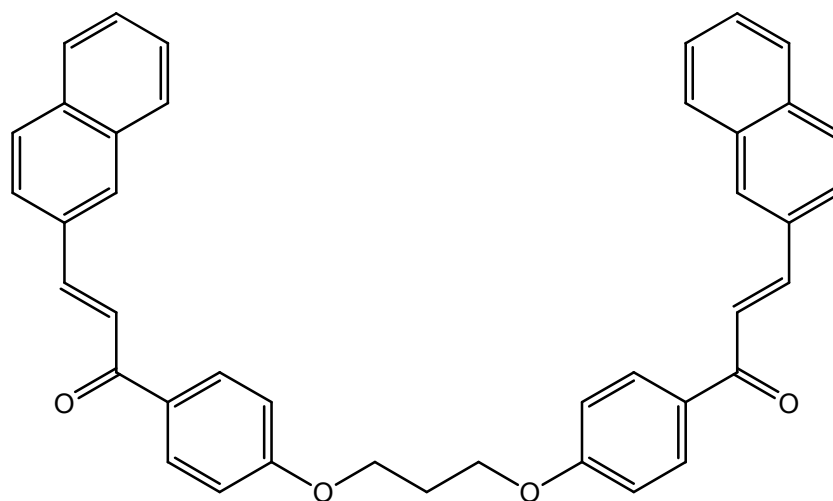
FWD1



FWD2



FWD3



FWD4

Πίνακας 11: Τελικά προϊόντα που παρασκευάστηκαν, φυσικές σταθερές και αποδόσεις.

ΕΝΩΣΗ	Απόδοση(%)	Σημείο τήξης(°C)
FW1	90,30	115
FWD1	88,70	199
FWD2	71,60	174
FWD3	78,60	156
FWD4	74.20	168

Πίνακας 12: Στοιχειακές αναλύσεις των ενώσεων που συντέθηκαν

ΕΝΩΣΗ	ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΤΥΠΟΣ	C%, H%, N% ΥΠΟΛΟΓ.			C%, H%, N% ΕΥΡΕΘ.		
FW1	$C_{19}H_{20}O_4$	73,06	6,45	-	72,98	6,37	
FWD1	$C_{47}H_{38}Br_2O_6$	65,75	4,46	-	70,13	4,34	
FWD2	$C_{45}H_{36}O_6$	80,34	5,39	-	80,34	5,43	
FWD3	$C_{41}H_{42}N_2O_4$	78,57	6,75	4,47	78,4	7,03	4,10
FWD4	$C_{41}H_{32}O_4$	83,65	5,48	-	83,63	5,87	

7.3.1. ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ ΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕ ΤΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΥΘΡΟΥ, ΤΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΜΑΖΩΝ**FW1:****IR (KBr) (cm^{-1}):** 1750, 1670 **^1H -NMR (CDCl_3): δ (ppm)** 2,54 (br/s 6H), 2,27-2,35 (m, 2H), 4,21-4,25 (m, 4H), 6,94 (dd, 4H), 7,91-7,94 (m, 4H) **^{13}C -NMR (CDCl_3):** 26,3, 26,2, 29,1, 64,5, 65, 114,2, 130,6, 130,6, 136,4, 162,7, 196,6, 196,6**FWD1:****IR (KBr) (cm^{-1}):** 1660, 1630 **^1H -NMR (CDCl_3): δ (ppm)** 5,06 (s, 4H), 4,24-4,28 (m, 4H), 2,31-2,35 (m, 2H), 6,93-7,05 (m, 4H), 7,26-7,31 (m, 8H), 7,38-7,43 (m, 4H), 7,755 (d, 2H), 8,015 (4H), 7,36 (2H), 7,43-7,66 (m, 4H) **^{13}C -NMR (CDCl_3):** 45,6, 64,5, 69,4, 76,6, 77, 77,4, 114,3, 115, 120, 122, 128, 129, 130, 130,7, 132, 135, 135,6, 143,7, 151,6, 160,4, 188,7, 188,7**MS (ESI):** 891 $[\text{M}+\text{CH}_3\text{OH}+1]^+$ **FWD2:****IR (KBr) (cm^{-1}):** 1680, 1650 **^1H -NMR (CDCl_3): δ (ppm)** 2,16-2,54 (m, 2H), 4,24-4,28 (m, 4H), 6,93-7,22 (m, 12H), 7,28-7,56 (m, 8H), 7,62-7,69 (m, 4H), 7,75-7,91 (m, 2H), 7,97-8,07 (m, 4H) **^{13}C -NMR (CDCl_3):** 29, 54, 54,6, 64,6, 114,4, 118,1, 119, 120,6, 122,7, 123,4, 12,6, 129,9, 130,2, 130,9, 131,2, 137, 143, 153, 156,9, 157,9, 162,7 188,5**FWD3:****IR (KBr) (cm^{-1}):** 1710, 1670 **^1H -NMR (CDCl_3): δ (ppm)** 2,29-2,54 (s, 2H), 2,99-3,08 (br, 12H), 4,22-4,26 (m, 4H), 6,68-6,94 (m, 10H), 7,31-7,56 (m, 2H), 7,59-7,64 (m, 2H), 7,91-7,98 (m, 10H) **^{13}C -NMR (CDCl_3):** 29,40, 64, 100,4, 109, 111,2, 112,4, 114,2, 118,3, 121,5, 128,8, 130,5, 130,6, 131,9, 135,6, 141,6, 124,5, 145,5, 158,3, 186,2

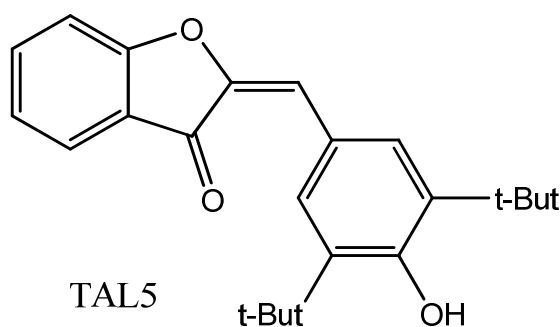
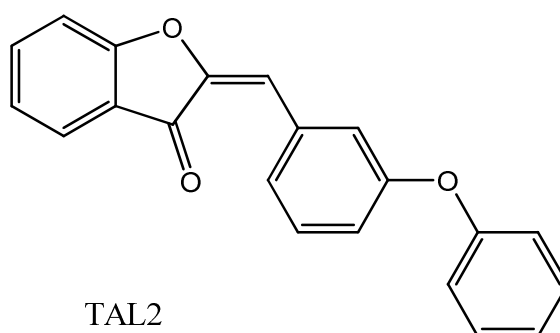
FWD4:**IR (KBr) (cm^{-1}):** 1680, 1630 **^1H -NMR (CDCl_3): δ (ppm)** 2,31-2,54 (m, 2H), 4,2-4,28 (m, 4H), 7,0-7,03 (m, 4H), 7,48-7,64 (m, 8H), 7,86-7,92 (m, 8H), 8,07-8,27 (m, 2H), 8,255 (d, 2H), 8,64 (d, 2H) **^{13}C -NMR (CDCl_3):** 29,6, 64, 76, 114,4, 117,1, 123,6, 124,7, 124,9, 125,4, 126,3, 126,9, 128,7, 130,6, 130,9, 131,3, 131,8, 132,7, 133,8, 141, 162,7, 18,5**MS (ESI):** 611[M+Na]⁺

7.4. ΑΠΟΤΥΧΙΑ ΣΥΝΘΕΣΗΣ

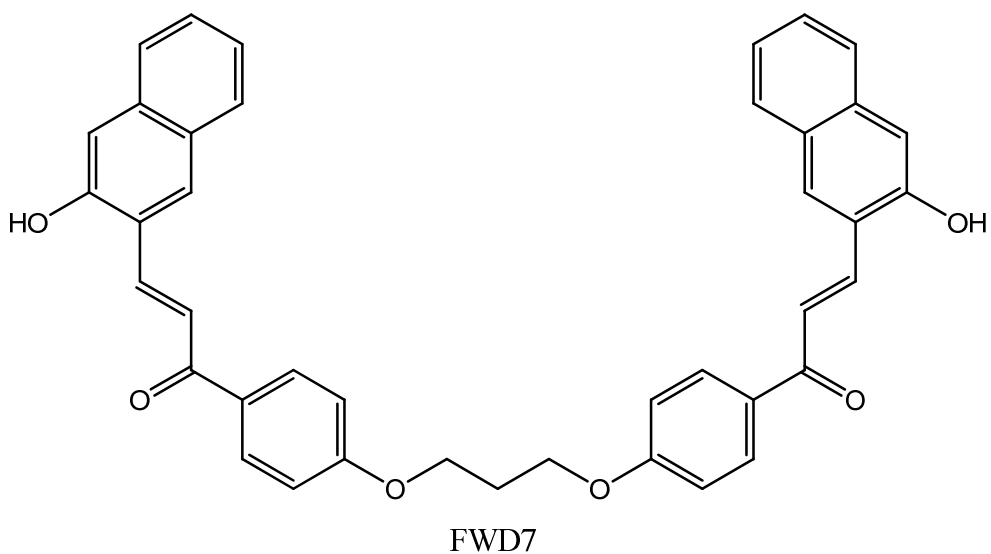
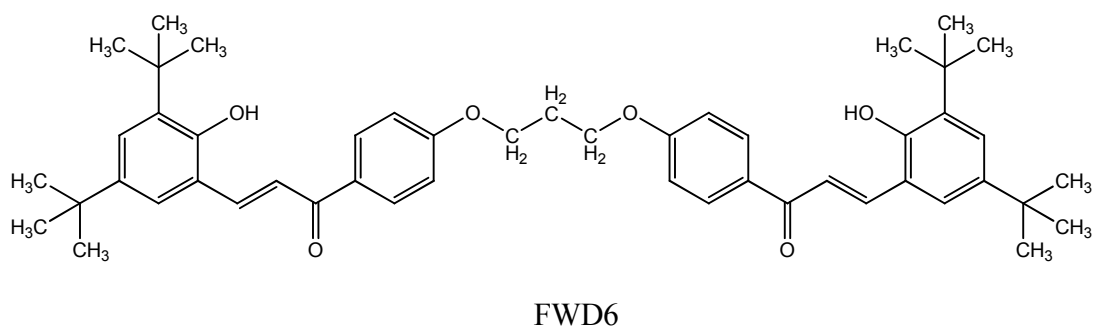
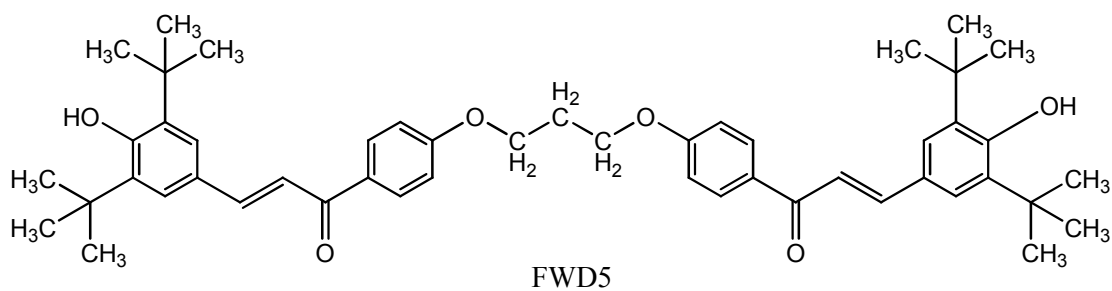
Με βάση την μελέτη αναλόγων με το πρόγραμμα QSAR σχεδιάστηκε μια ομάδα ενονικών παραγώγων με κοινούς υποκαταστάτες ώστε να υπάρχει η δυνατότητα σύγκρισης της βιολογικής δραστηρότητάς τους. Ορισμένες αντιδράσεις δεν είχαν το αναμενόμενο αποτέλεσμα. Το αρνητικό αποτέλεσμα επιβεβαιώθηκε από χρωματογραφία TLC και φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$.

Έγινε προσπάθεια σύνθεσης των εξής ενώσεων :

Αουρόνες :



4'',4'''-τριμεθυλενο-διοξυ-δισ-υποκατεστημένες χαλκόνες :



8. ΦΑΡΜΑΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ IN VITRO ΚΑΙ IN VIVO

8.1. ΦΑΡΜΑΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ in vitro

Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον δύο φορές και η τυπική απόκλιση που εμφάνισαν ήταν μικρότερη από 10 %.

8.1.1. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΕΛΕΥΘΕΡΗ ΣΤΑΘΕΡΗ 1,1-ΔΙΦΑΙΝΥΛΟ-2-ΠΙΚΡΥΛΥΔΡΑΖΥΛΙΚΗ ΡΙΖΑ (DPPH) ΣΕ ΔΙΑΛΥΤΗ ΑΙΘΑΝΟΛΗ. (Pontiki E. and Hadjipavlou D., 2007)

Με το πείραμα αυτό μελετήθηκε η αλληλεπίδραση των ελεγχόμενων ενώσεων με τη ελεύθερη σταθερή ρίζα του 1,1 - διφαινυλο - 2 - πικρυλυδραζυλίου DPPH.

Σε 1 ml αιθανολικών διαλυμάτων των ενώσεων (τελική συγκέντρωση 0,1 mM) από stock διάλυμά τους σε DMSO, προστέθηκε ίσος όγκος αιθανολικού διαλύματος DPPH (0,1mM). Τα διαλύματα αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 20 και 60 λεπτά και μετρήθηκε η απορρόφηση UV στα 517 nm. Ως αναφορά χρησιμοποιήθηκε ίσης συγκέντρωσης αιθανολικό διάλυμα DPPH. Ως τυφλό χρησιμοποιήθηκε 1 ml αιθανόλης με ίσο όγκο αιθανολικού διαλύματος των υπό μελέτη ενώσεων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 13.

ΕΝΩΣΗ	(% 0,1mM)20 λεπτά	(% 0,1mM)60λεπτά
TAL1	6,7	4,3
TAL3	80,8	80,4
TAL4	50,3	No
TAL6	57,42	61,72
TAL7	31,6	27,3
FW1	No	No
FWD1	35,9	54,7
FWD2	No	8,1
FWD3	16,7	14,3
FWD4	19,1	50,0
NDGA	81,0	82,6

* Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος 3 τιμών και η $\pm$ SD είναι μικρότερη του 10%.

Πίνακας 13: % Αλληλεπίδραση των υπό μελέτη ενώσεων με την ελεύθερη ρίζα DPPH (RA %). Μελέτη της δράσης τους σε σχέση με τη συγκέντρωση και με το χρόνο.

8.1.2. ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΕΠΙ ΤΗΣ ΛΙΠΟΞΥΓΟΝΑΣΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ IN VITRO. (Pontiki E. and Hadjipavlou D., 2007)

Με το πείραμα μελετήθηκε η επίδραση των προς εξέταση ενώσεων στην αναστολή της λιποξυγονάσης, ένζυμου που εμπλέκεται στον κύκλο του αραχιδονικού οξέος.

Η αναστολή της φυτικής προέλευσης λιποξυγονάσης (soyabean lipoxygenase) ($1:9 \times 10^{-4}$ w/v σε φυσιολογικό ορό) έγινε σε συγκεντρώση 0,01mM για τον υπολογισμό της % αναστολής των εξεταζόμενων ουσιών, ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε το μετά νατρίου άλας του λινελαϊκού οξέος σε pH 9 με ρυθμιστικό διάλυμα Tris·HCl, σε θερμοκρασία δωματίου. Μετρήθηκε η μεταβολή της απορρόφησης (μετατροπή του λινελαϊκού σε 13-υπεροξυλινελαϊκό οξύ) στα 234 nm. Τα αποτελέσματα δίνονται στον Πίνακα 14.

ΕΝΩΣΗ	% Αναστολή LOX (100μM)
TAL1	56,5
TAL3	21,8
TAL4	94,7
TAL6	64,3
TAL7	22,8
FW1	0
FWD1	40,5
FWD2	100
FWD3	93,1
FWD4	100
NDGA	83,7

* Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος 3 τιμών και η $\pm$ SD είναι μικρότερη του 10%.

Πίνακας 14: Τιμές % αναστολής των εξεταζόμενων ενώσεων επί του ενζύμου λιποξυγονάση από σόγια (SLOX).

Για ορισμένες ενώσεις προσδιορίστηκαν οι IC_{50} .

ΕΝΩΣΗ	IC_{50}
TAL1	100 μ M
TAL4	55,5 μ M
FDW2	55 μ M
FDW3	56 μ M
FDW4	55 μ M

Πίνακας 15: IC_{50} των ενώσεων με μεγαλύτερη δραστικότητα στην LOX.

8.1.3. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΝΑ ΑΝΑΣΤΕΛΟΥΝ ΤΗΝ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΩΣΗ ΤΟΥ ΛΙΝΕΛΑΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΠΟΥ ΕΠΑΓΕΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟ ΔΙΥΔΡΟΧΛΩΡΙΚΟ ΑΛΑΣ ΤΟΥ 2,2-ΔΙΑΖΩ-2-ΜΕΘΥΛΟ-ΠΡΟΠΑΝΙΜΙΔΑΜΙΔΙΟ (AAPH). (Liégeois C. Et al., 2000)

Στο μελετούμενο πείραμα έγινε προσπάθεια να υπολογιστεί η ικανότητα των ενώσεων που συντέθηκαν να αναστέλλουν τη λιπιδική υπεροξειδωση του λινελαϊκού οξέος. Σε κυψελίδα χαλαζία περιεκτικότητας 1ml, με περιεχόμενο 930μl ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων pH 7,4 προστέθηκαν 10μl διαλύματος του μετά νατρίου άλατος του λινελαϊκού οξέος (16mM) σε pH 9 με ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl και 10μl διαλύματος των υπό εξέταση ενώσεων (10mM). Η οξειδωτική διαδικασία πυροδοτήθηκε με την προσθήκη 50μM AAPH (40mM σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με pH 7,4) σε θερμοκρασία 37°C παρουσία αέρα. Καταγράφηκε η μεταβολή της τιμής απορρόφησης στα 234nm (μετατροπή του λινελαϊκού οξέος σε 13-υπεροξυ-λινελαϊκό οξύ). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 16.

ΕΝΩΣΗ	% Αναστολή Λιπιδικής Υπεροξειδωσης 100μM (επαγόμενης από AAPH)
TAL1	42,4
TAL3	70,0
TAL4	95,0
TAL6	68,0
TAL7	25,5
FW1	20,2
FWD1	51,0
FWD2	78,5
FWD3	100,0
FWD4	100,0
Trolox	63,0

Πίνακας 16: % Αναστολή των ενώσεων στη λιπιδική υπεροξειδωση του λινελαϊκού οξέος.

* Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος 3 τιμών και η $\pm SD$ είναι μικρότερη του 10%.

8.1.4. IN VITRO ΜΕΛΕΤΗ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗ GSH (Dimmock et al., 1998)

Προετοιμάστηκαν υδατικά διαλύματα των ενώσεων με τη βοήθεια ρυθμιστικού διαλύματος pH 7.4 φωσφορικών και με την προσθήκη 20μl από διάλυμα 10mM των ενώσεων σε διμεθυλο-σουλφοξείδιο. Οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων επιλέχθηκαν έτσι ώστε το μέγιστο της απορρόφησης να περιλαμβάνεται μεταξύ 0.5 και 1. Οι ενώσεις επώαστηκαν για 24h στους 37°C. Στη συνέχεια προσδιορίστηκαν μετά την καταγραφή με την βοήθεια φασματοφωτομετρίας UV οι τιμές ϵ στα αντίστοιχα λ_{max} . Τα όρια σφάλματος των τιμών ϵ δεν είναι μεγαλύτερα του 2%. Όλες οι μετρήσεις επαναλαμβάνονται εις διπλούν.

Το πείραμα επαναλήφθηκε με προσθήκη της GSH γλουταθειόνης χρησιμοποιώντας θειόλη: ένωση 2:1 και 10:1 και επώαση στους 37°C για 24h. Μετρήθηκαν οι απορροφήσεις και υπολογίστηκαν όπως προηγούμενα οι τιμές ϵ . Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 17.

ΕΝΩΣΗ	$\lambda_{max}(nm)$	ϵ_{max}
TAL1	223	33800
2 TAL1	225	35500
10 TAL1	253	2200
TAL3	223	38600
2TAL3	223	37300
10 TAL3	278	5600
TAL4	283	8200
2 TAL4	283	950
10 TAL4	254	4500
TAL6	285	6300

2 TAL6	285	2700
10 TAL6	285	3300
TAL7	284	6400
2 TAL7	284	4600
10 TAL7	284	7000
FW1	245	0
2 FW1	245	600
10 FW1	245	2750
FWD1	246	1500
2 FWD1	246	1500
10 FWD1	246	2200
FWD2	341	12700
2 FWD2	341	3700
10 FWD2	341	5000
FWD3	320	9900
2 FWD3	320	0
10 FWD3	320	1000
FWD4	443	12460
2 FWD4	443	0
10 FWD4	443	800

Πίνακας 17: Αποτελέσματα από την *In vitro* μελέτη αλληλεπίδρασης των ενώσεων με γλουταθειόνη GSH

*Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο 2-4 τιμών και η $\pm$ SD είναι μικρότερη του 10%.

8.2. ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ *in vivo*

8.2.1. ΕΠΑΓΩΓΗ ΟΙΔΗΜΑΤΟΣ ΑΚΡΟΥ ΠΟΔΟΣ ΕΠΙΜΥΑ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΕΙΤΑΙ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΝΔΟΔΕΡΜΙΚΗ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΚΑΡΡΑΓΕΝΙΝΗΣ.

(Pontiki E. and Hadjipavlou D., 2006, Kalsi et al.1990, Chi and Won1990,)

Πειραματική διαδικασία

Χρησιμοποιήθηκαν τρεις ομάδες πειραματόζων-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 αφαιρέθηκε η τροφή και το νερό από τα πειραματόζωα.

Οι ενώσεις χορηγήθηκαν αρχικά ενδοπεριτοναϊκά, ώστε να εξασφαλισθεί ταχύτατη βιοδιαθεσιμότητα της ένωσης και κυκλοφορία της σε όλο το σώμα του πειραματόζωου και ταυτόχρονα έγινε ενδοδερμική χορήγηση διαλύματος καρραγεννίνης ώστε να προκληθεί φλεγμονή στο πέλμα του δεξιού άκρου ποδός.

Στην πρώτη ομάδα πειραματόζων χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά εφάπαξ δόση της εξεταζόμενης ένωσης (0,01mmol/ml/kg σωματικού βάρους), με τη μορφή εναιωρήματος που σχηματίζεται με βάση το H₂O και τη βοήθεια του Tween 80. Σε μια δεύτερη ομάδα πειραματόζων χορηγήθηκε μόνο ο υγρός φορέας σε ίσο όγκο. Στην τρίτη ομάδα, χορηγήθηκε κατά τον ίδιο τρόπο, ένα κλασσικό μη στεροειδές αντιφλεγμονώδες φάρμακο, η ινδομεθακίνη (Sigma) ως πρότυπη ένωση αναφοράς. Στη συνέχεια προκλήθηκε πειραματικά οξεία φλεγμονή, χρησιμοποιώντας ως φλογιστικό την καρραγενίνη, η οποία διαλύεται σε φυσιολογικό ορό, (σε συγκέντρωση 2%, 0,1ml διαλύματος της καρραγεννίνης) χορηγήθηκε ενδοδερμικά στο πέλμα του πίσω δεξιού άκρου ποδιού των επιμύων και στις τρεις ομάδες των πειραματόζων, ενώ το αριστερό άκρο χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας.

Σε χρόνο 3,5 ώρες μετά από τη χορήγηση του φλογιστικού, οι επίμυες θανατώθηκαν, με αυχενική εξάρθρωση και παρελήφθησαν και ζυγίστηκαν τα πίσω άκρα τους.

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, προσδιορίστηκε στη συνέχεια η % μέση αναστολή του οιδήματος που προκλήθηκε από την εξεταζόμενη ένωση, σε σχέση με τους μάρτυρες (Kalsi et al.1990, Chi and Won,1990).

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

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.

ΕΝΩΣΗ	CPE% 0,01mmol/ml/kg σωματικού βάρους
TAL1	41,5*
FW1	12,4*
FWD1	2,7*
FWD4	5,2*
Indomethacin	47,0**

Η στατιστική επεξεργασία έγινε με το student's T-test, *p<0,01, **p<0,005

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

8.2.2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΠΡΟΝΥΜΦΕΣ ΚΟΥΝΟΥΠΙΩΝ

Εκτροφή πειραματόζων

Οι εντομοκτόνες ιδιότητες των υπό μελέτη ενώσεων αξιολογήθηκαν σε εργαστηριακές συνθήκες στις προνύμφες κουνουπιών του είδους *Cx. pipiens* του τύπου *molestus*. Οι προνύμφες των κουνουπιών συλλέχτηκαν από μια αποικία, που διατηρείται στο εργαστήριο του Μπενάκειου φυτοπαθολογικού ινστιτούτου, για περισσότερα από είκοσι χρόνια. Τα ενήλικα έντομα διατηρούνται σε ξύλινους κλωβούς (33x33x33 cm) με μέγεθος βρόγχων 32x32 σε θερμοκρασία 25 ± 2 °C, σχετική υγρασία $80 \pm 2\%$ και φωτεινότητα 14:10(L:D)h. Ως πηγή τροφής για τα κουνούπια χρησιμοποιούνται φυτίλια βάμβακος εμποτισμένα με διάλυμα σακχαρόζης 10%. Τα θηλυκά κουνούπια εναποθέτουν τα αυγά τους σε κυλινδρικά πλαστικά δοχεία διαμέτρου 10cm και βάθους 5cm, γεμάτα με 150ml νερό του δικτύου ύδρευσης. Οι αποικίες των αυγών αφαιρούνται καθημερινά και τοποθετούνται σε κυλινδρικά εμαγιέ σκεύη διαμέτρου 35cm και βάθους 10cm, ώστε να εκκολαφτούν. Οι προνύμφες εκτρέφονται κάτω από τις προαναφερόμενες συνθήκες θερμοκρασίας, υγρασίας και φωτεινότητας και τρέφονται καθημερινά με τροφή για νεαρά ψάρια (TetraMin, Baby Fish Food) σε συγκέντρωση 0.25 gL^{-1} σε νερό έως ότου μετατραπούν σε νύμφες. Οι νύμφες στη συνέχεια, συγκεντρώνονται και ενσωματώνονται στους κλωβούς εκτροφής των ενήλικων εντόμων.

Βιολογικές δοκιμασίες σε προνύμφες (Koliopoulos G. Et al., 2007)

Οι βιολογικές δοκιμασίες θνητότητας των προνυμφών εκτελέστηκαν σύμφωνα με τις μεθόδους δοκιμής της ευαισθησίας των προνυμφών όπως ορίζεται από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO, 1981) με κάποιες τροποποιήσεις.

Ικανοποιητική ποσότητα της κάθε μελετώμενης ουσίας μεταφέρθηκε σε φιαλίδιο από όπου απομακρύνθηκε τυχόν υπόλειμμα διαλύτη υπό κενό. Δημιουργήθηκαν Stock διαλύματα συγκέντρωσης 10% w/v. Είκοσι τετράδες από προνύμφες κουνουπιών τοποθετήθηκαν σε υδατικό διάλυμα DMSO 2% v/v (99ml νερό του δικτύου ύδρευσης και 2ml DMSO). Στη συνέχεια, προστέθηκε διάλυμα των προς μελέτη ουσιών και ανακινήθηκαν ελαφρά για επιβεβαίωση της πλήρους

ομογενοποίησης των διαλυμάτων. Τέσσερις τέτοιες ομάδες χρησιμοποιήθηκαν για κάθε συγκέντρωση διαλύματος, καθώς συμπεριλήφθηκε και μία ομάδα ελέγχου που περιείχε μόνο νερό και DMSO για κάθε βιολογική δοκιμή. Τα δοχεία με τις προνύμφες τοποθετήθηκαν σε θερμοκρασία 25 ± 2 °C, $80 \pm 2\%$ σχετική υγρασία και 14:10 (L:D) η φωτεινότητα.

Στατιστική ανάλυση

Το αποτέλεσμα της δοκιμής στις προνύμφες μετρήθηκε μετά από κατεργασία 24h. Τα δεδομένα που συγκεντρώθηκαν από κάθε βιολογική δοκιμή που συσχέτιζε τη δόση με την επίδραση στις προνύμφες (συνολική θνησιμότητα, συγκέντρωση σε νερό mgL^{-1}) υποβλήθηκαν σε στατιστική επεξεργασία. Σε κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα δείγματα ($n=4$).

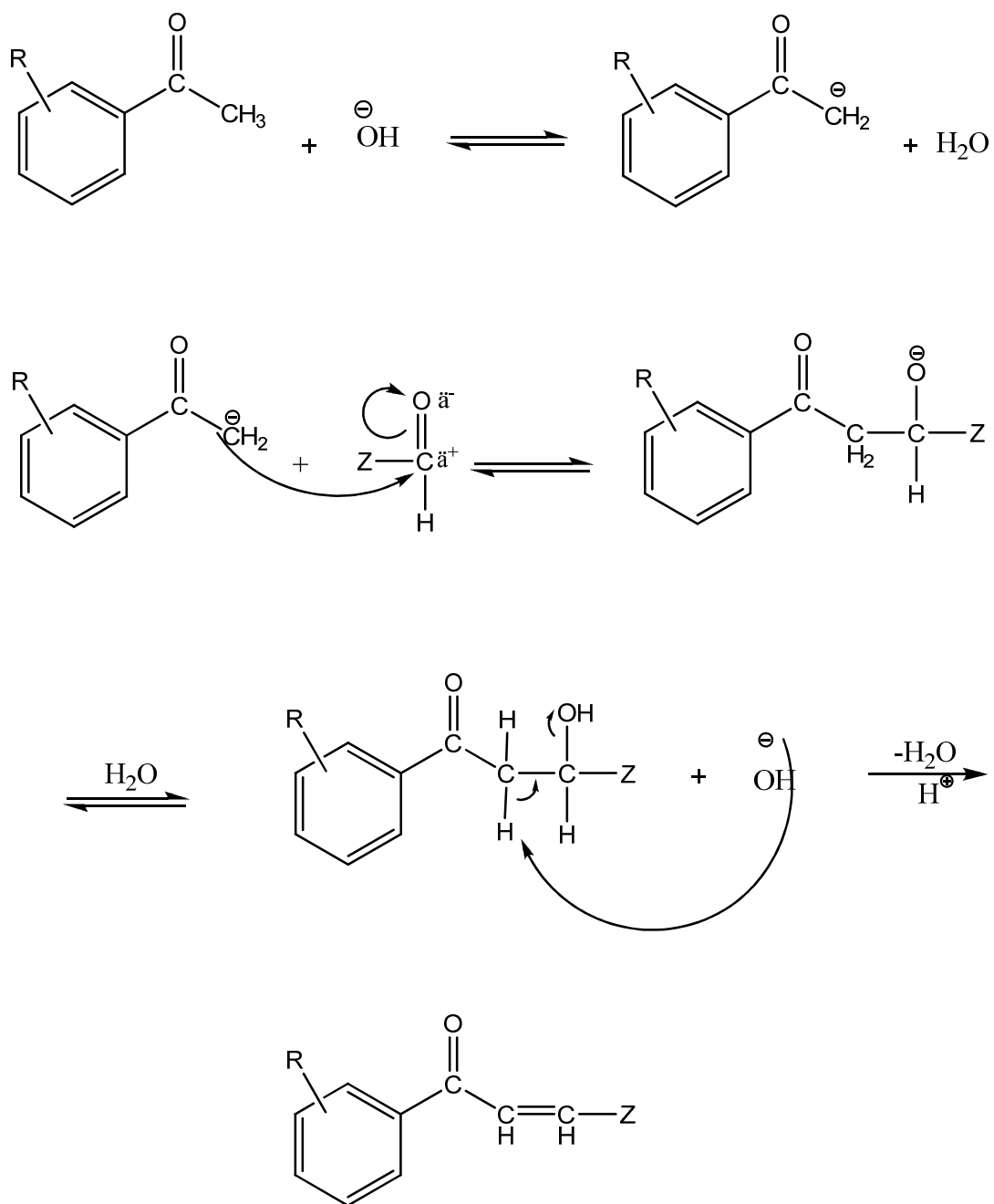
9. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

9.1. ΣΥΝΘΕΣΗ ΧΑΛΚΟΝΩΝ

Η σύνθεση των χαλκονών ακολούθησε την αντίδραση συμπύκνωσης Claisen-Schmidt, που πραγματοποιείται ανάμεσα σε μια κετόνη και μια αλδεΐδη, σε βασικό περιβάλλον παρουσία ενός πολικού διαλύτη, όπως π.χ. αιθανόλη ή μεθανόλη. Οι χαλκόνες στην περίπτωση μας αποτέλεσαν την πρώτη ύλη για την σύνθεση των ουρονών που σχεδιάσαμε. Στις αντιδράσεις αυτού του τύπου, οι αρωματικές αλδεΐδες συμπυκνώνονται με αλειφατικές ή μικτές αλκυλαρωματικές κετόνες με την παρουσία υδατικού διαλύματος αλκάλεως, δίνοντας α,β-ακόρεστες κετόνες (Detsi et al., 2009).

Ο μηχανισμός ο οποίος ακολουθείται κατά αντίδραση συμπύκνωσης Claisen-Schmidt, περιλαμβάνει την απόσπαση του όξινου υδρογόνου από το $-CH_3$ της 2'-υδροξυ-ακετοφαινόνης από το ισχυρά βασικό ανιόν HO^- οπότε σχηματίζεται το αντίστοιχο ενολικό ιόν. Ακολουθεί μια αντίδραση πυρηνόφιλης προσθήκης κατά την οποία το ενολικό ιόν προσβάλλει τον ηλεκτρονιόφιλο άνθρακα του καρβονυλίου της αλδεΐδης και σχηματίζεται το αντίστοιχο ενδιάμεσο αλδολικό προϊόν. Τέλος, στο βασικό περιβάλλον της αντίδρασης, πραγματοποιείται απόσπαση ενός μορίου H_2O , οπότε σχηματίζεται η χαλκόνη ως το τελικό προϊόν της αλδολικής συμπύκνωσης. Το τελικό προϊόν που προκύπτει από την απόσπαση ενός μορίου είναι ένα εκτεταμένο συζυγιακό σύστημα (Solomons, 1984). Όπως παρουσιάζεται στο σχήμα 18.

Τα προϊόντα που λαμβάνονται έχουν μορφή κρυσταλλική είτε ημίρρευστη κολλώδη σύσταση και είναι έγχρωμα (κίτρινα, πορτοκαλόχρωα και καστανέρυθρα). Λαμβάνονται με αποδόσεις μέχρι 82%. Εγινε προσπάθεια για την βελτίωση των χαμηλών αποδόσεων με τροποποίηση της μεθόδου σύνθεσης με την χρήση λουτρού υπερήχων. Παρατηρήθηκε αύξηση της απόδοσης μέχρι και 25%. Στη βιβλιογραφία (Kouskoura M. Et al., 2008) αναφέρονται οι TL1, TL2, TL3 και TL4 καθώς και οι βιολογική τους αξιολόγηση.



Σχήμα 18: Μηχανισμός Claisen-Schmidt για παραγωγή των ενδιαμέσων χαλκονών.

9.2. ΣΥΝΘΕΣΗ ΑΟΥΡΟΝΩΝ

Το πρώτο στάδιο στην αντίδραση είναι ο σχηματισμός του οργανοϋδραργυρικού ενδιαμέσου (Α). Στην συνέχεια, η ομολυτική διάσπαση του δεσμού O-Hg οδηγεί στο σχηματισμό μιας ενδιάμεσης ασταθούς ένωσης, αφού η ρίζα προσβάλλει το δεσμό C-H της α-θέσης του διπλού δεσμού και οδηγεί στο σχηματισμό του πενταμελούς δακτυλίου της αουρόνης. Ο σχηματισμός του πενταμελούς δακτυλίου αποδίδεται πιθανώς σε στερεοχημικές αλληλεπιδράσεις εξαιτίας του όγκου του οξικού υδραργύρου.

Τα προϊόντα που λαμβάνονται έχουν μορφή κρυσταλλική είτε ημίρρευστη κολλώδη σύσταση και είναι έγχρωμα (κίτρινα, πορτοκαλόχρωα και καστανέρυθρα). Οι κρυσταλλικές ενώσεις εμφανίζουν αρκετά υψηλά σημεία τήξης (πάνω από 160°C), ενώ οι υπόλοιπες βρίσκονται σε ελαιώδη μορφή σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Λαμβάνονται με αποδόσεις μέχρι 70%, παρά το γεγονός του αυξημένου όγκου και μεγέθους των υποκαταστατών. Γενικότερα στην βιβλιογραφία συναντώνται αουρόνες με πολλαπλούς μικρούς από την άποψη του μεγέθους και του όγκου υποκαταστάτες όπως για παράδειγμα μεθυλο-, υδροξυ-, και μεθοξυ- ομάδες.

Σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές, ως παραπροϊόν της σύνθεσης των αουρονών μπορεί να προκύψουν φλαβόνες σε διαφορετική κάθε φορά αναλογία. Στις περιπτώσεις που αναφέρονται στην βιβλιογραφία (Sekizaki H., 1988) οι αποδόσεις των αουρονών κυμαίνονται από 25-65% ενώ αντίστοιχα των φλαβονών από 5-20%. Η δομή των νέων ενώσεων επιβεβαιώθηκε από τα αποτελέσματα των στοιχειακών τους αναλύσεων και την φασματοσκοπική εξέταση.

Τα αποτελέσματα της φασματοσκοπικής εξέτασης με IR (δισκία KBr για τις στερεές ουσίες και αιωρήματα με Nujol για τις κολλώδεις), έδειξαν χαρακτηριστικές απορροφήσεις που αντιστοιχούν στα καρβονύλια και στον διπλό δεσμό της ενόνης. Η παρουσία των καρβονυλίων επιβεβαιώνεται από τις χαρακτηριστικές απορροφήσεις στα 1680, 1700 cm⁻¹. Οι απορροφήσεις στα 1600, 1610, 1620 cm⁻¹ αντιστοιχούν στη δόνηση τάσης του συζυγιακού συστήματος.

Από τη φασματοσκοπική εξέταση με ^1H -NMR και ^{13}C -NMR (CDCl_3 , TMS), οι χημικές μετατοπίσεις επιβεβαίωσαν την προτεινόμενη δομή. Στα φάσματα ^1H -NMR παρατηρήθηκε συντονισμός των πρωτονίων στις αντίστοιχες περιοχές του φάσματος και ο ακριβής αριθμός πρωτονίων βρέθηκε από την ολοκλήρωση. Η ταυτοποίηση των μελετώμενων ενώσεων από φάσματα ^1H NMR βασίζεται σε ορισμένα ενδεικτικά χαρακτηριστικά. Συγκεκριμένα για της χαλκόνες, η παρουσία των υδρογόνων του διπλού δεσμού του μορίου, του ενολικού υδροξυλίου και των αρωματικών υδρογόνων του δακτυλίου της ακετοφαινόνης αποτελούν χαρακτηριστικά στοιχεία των φασμάτων ^1H NMR χαλκονών και συναντώνται σε συγκεκριμένα δ του πεδίου. Ενώ, βασικό χαρακτηριστικό για την ταυτοποίηση των ουρονών είναι η παρουσία του πρωτονίου του διπλού δεσμού στα φάσματα ^1H -NMR.

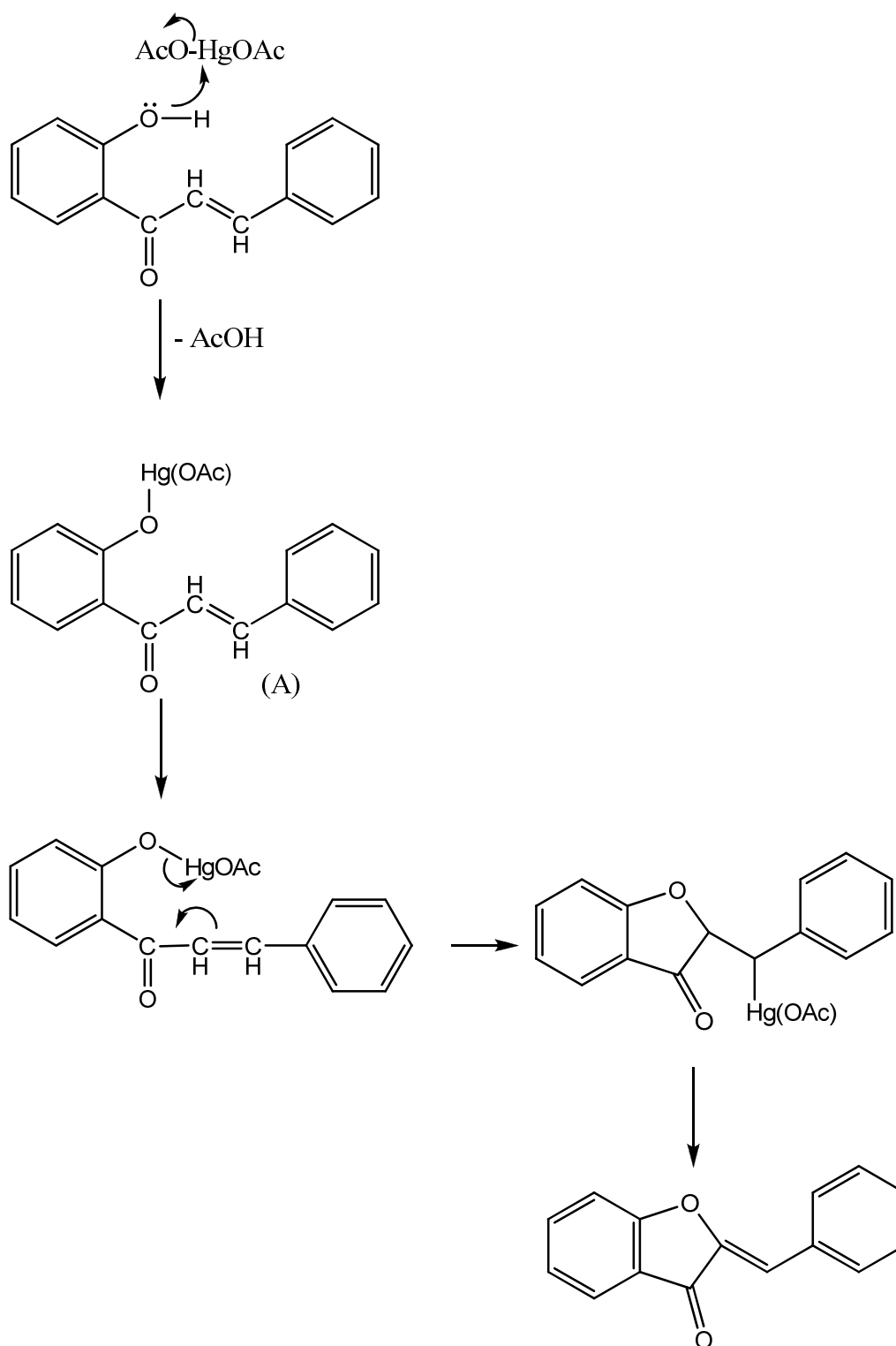
Τα υδρογόνα του διπλού δεσμού ($\text{CH}=\text{CH}$) εμφανίζονται με τη μορφή δύο διπλών κορυφών *E* ισομερή, με μεγάλες σταθερές σύζευξης ($J=15\text{ Hz}$) για τις χαλκόνες. Στα φάσματα των υπό μελέτη χαλκονών και σύμφωνα με παλιότερες βιβλιογραφικές αναφορές η διπλή κορυφή του ενός πρωτονίου του διπλού δεσμού εμφανίζεται πάντα σε χαμηλότερο πεδίο από τη διπλή κορυφή του πρωτονίου που βρίσκεται κοντύτερα στο καρβονύλιο. (Thirunaryanan G. et al., 2007)

Για τις ουρόνες, το χαρακτηριστικό σήμα αποδίδεται στο πρωτόνιο του ολεφινικού δεσμού που εμφανίζεται με τη μορφή μιας απλής κορυφής στην περιοχή κοντά στα 6,68-6,77 ppm αντιστοιχώντας στο *Z* ισομερές. Το *Z* ισομερές είναι θερμοδυναμικά σταθερότερο σύμφωνα με την βιβλιογραφία (Ur- Rahman et al, 1981)

Τα δεδομένα που προκύπτουν από τα φάσματα ^1H NMR των ουρονών που συντέθηκαν δείχνουν ότι με την αντίδραση της οξειδωτικής κυκλοποίησης αποδίδεται αποκλειστικά το *Z* γεωμετρικό ισομερές ενώ στις συνθετικές μας συνθήκες δεν εντοπίστηκε σαν παραπροϊόν φλαβόνη.

Αντίστοιχη μελέτη που αφορά τους άνθρακες, έγινε με τη μελέτη των φασμάτων ^{13}C -NMR όπου η χημική μετατόπιση για τον εξωκυκλικό άνθρακα $=\text{CH}$ βρίσκεται σε δ 111. Τα δεδομένα αυτά φαίνονται να συμφωνούν με παραδείγματα της βιβλιογραφίας (Go et al 2008)

Η δομή ορισμένων χαλκονών και αουρονών ταυτοποιήθηκε περαιτέρω με φασματοσκοπία μάζας MS(ESI). Παρατηρήθηκε η εμφάνιση του μοριακού ιόντος $[M+1]^+$ καθώς και το $[M+1+Na]^+$.



Σχήμα 19: Μηχανισμός οξειδωτικής κυκλοποίησης 2-υδροξυ-χαλκονών προς σχηματισμό αουρονών.

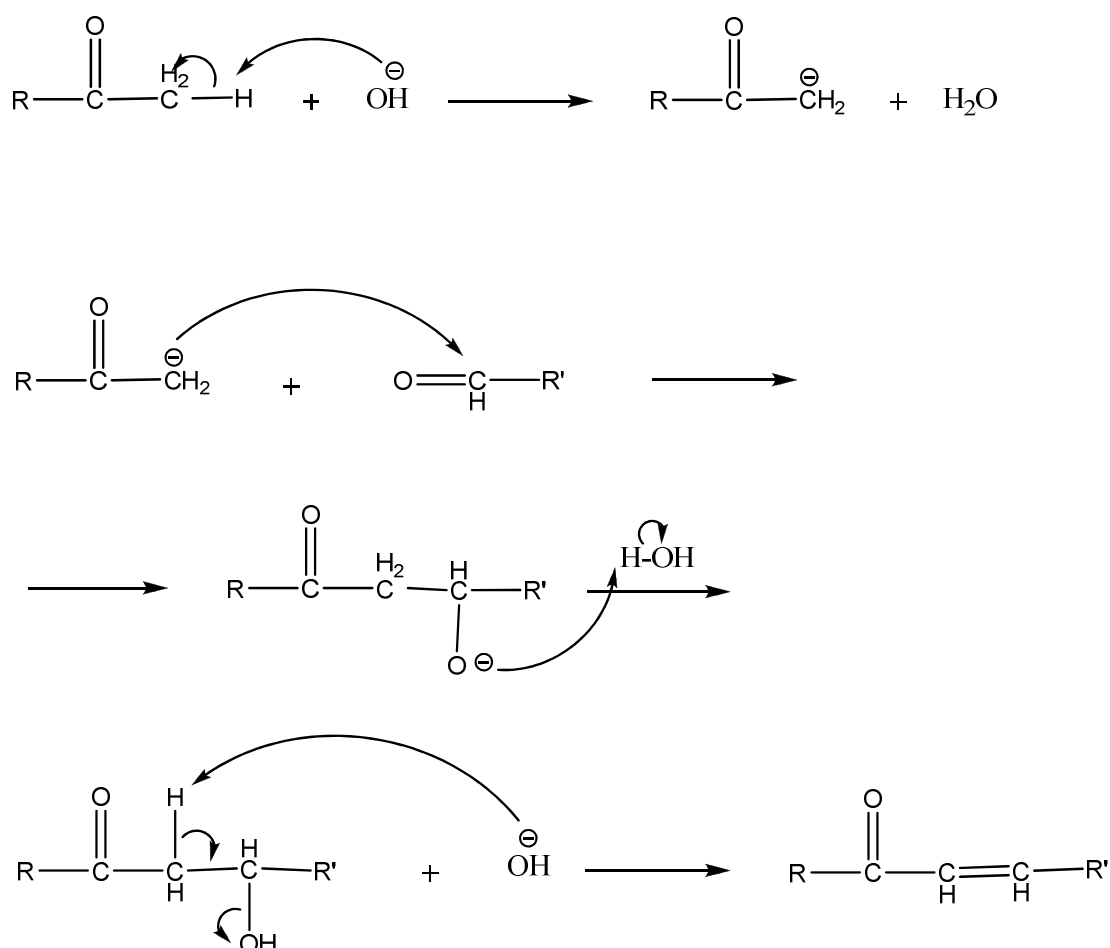
9.3. ΣΥΝΘΕΣΗ 4'', 4'''-ΠΡΟΠΑΝΟΔΙΟΞΥΔΙΧΑΛΚΟΝΩΝ

Η σύνθεση των 4'', 4'''-προπανοδιοξυδιχαλκονών ακολουθεί δύο βασικά στάδια.

Στο πρώτο στάδιο πραγματοποιείται μια συμμετρική αιθεροποίηση κατά Williamson ανάμεσα στο 1,3-διβρωμοπροπάνιο και την π-υδροξυ-ακετοφαινόνη ώστε να δημιουργηθεί ένας διπλός αιθέρας με δύο ελεύθερες καρβονυλικές ομάδες σε 4'', 4'''- συμμετρικές θέσεις. Η πορεία της αντίδρασης ακολουθεί πυρηνόφιλο $\text{S}_{\text{N}}2$ μηχανισμό σε αλκαλικές συνθήκες όπου με την παρουσία του K_2CO_3 επιτυγχάνεται η απόσπαση ενός πρωτονίου από την π-υδροξυ-ακετοφαινόνη. Στην συνέχεια ακολουθεί η αιθεροποίηση και το ηλεκτραρνητικό αλογόνο απομακρύνεται ως άλας καλίου.

Η αντίδραση έχει πολύ καλή απόδοση, πάνω από 90% και το στερεό προϊόν συλλέγεται μετά την απομάκρυνση του διαλύτη με διήθηση.

Στο δεύτερο στάδιο αντιδρούν οι διπλοί αιθέρες με την κατάλληλα υποκατεστημένη αλδεΐδη ακολουθώντας τον μηχανισμό της αλδολικής συμπύκνωσης κατά Claisen-Schmidt. Η αντίδραση πραγματοποιείται συμμετρικά και στις δυο ελεύθερα κετονικά καρβονύλια. Τα προϊόντα παραλαμβάνονται μετά από οξίνιση σε πολύ καλές αποδόσεις και είναι όλα έγχρωμα στερεά. Η δομή των νέων ενώσεων επιβεβαιώθηκε από τα αποτελέσματα των στοιχειακών τους αναλύσεων και την φασματοσκοπική εξέταση



Σχήμα 21: Μηχανισμός αλδολικής συμπύκνωσης

Τα αποτελέσματα της φασματοσκοπικής εξέτασης με IR (δισκία KBr), έδειξαν χαρακτηριστικές απορροφήσεις που αντιστοιχούν στα καρβονύλια και στον διπλό δεσμό της ενόνης. Η παρουσία των καρβονυλίων επιβεβαιώνεται από τις χαρακτηριστικές απορροφήσεις στα 1680, 1700 cm⁻¹. Οι απορροφήσεις στα 1600, 1610, 1620 cm⁻¹ αντιστοιχούν στη δόνηση τάσης του συζυγιακού συστήματος. Για την δόνηση τάσης του συμμετρικού αιθέρα η κορυφή αποτυπώνεται στα 1150-1070 cm⁻¹ με αποτέλεσμα να βρίσκεται μέσα στην περιοχή του δακτυλικού αποτυπώματος των ενώσεων και γα τον λόγο αυτό να είναι δυσδιάκριτη.

Από τη φασματοσκοπική εξέταση με ¹H-NMR και ¹³C-NMR (CDCl₃, TMS), οι χημικές μετατοπίσεις επιβεβαίωσαν την προτεινόμενη δομή. Στα φάσματα ¹H-NMR παρατηρήθηκε συντονισμός των πρωτονίων στις αντίστοιχες περιοχές του φάσματος και ο ακριβής αριθμός πρωτονίων βρέθηκε από την ολοκλήρωση.

Χαρακτηριστική είναι η εμφάνιση των κορυφών που αντιστοιχούν στα αλειφατικά πρωτόνια του αιθερικού τμήματος μια πολλαπλή κορυφή από δύο πρωτόνια σε δ 2,1-2,3 ppm και μιας πολλαπλής κορυφής από τέσσερα πρωτόνια σε δ 4,2-4,3 ppm. Όπως και για τις απλές χαλκόνες τα υδρογόνα του διπλού δεσμού εμφανίζονται με τη μορφή δύο διπλών κορυφών *E* ισομερή, που αντιστοιχούν σε δύο πρωτόνια και οι οποίες έχουν μεγάλες σταθερές σύζευξης (*J*=15 Hz). Η διπλή κορυφή του πρωτονίου του ενός διπλού δεσμού εμφανίζεται πάντα σε χαμηλότερο πεδίο από τη διπλή κορυφή του πρωτονίου που βρίσκεται κοντύτερα στο καρβονύλιο.

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

Η δομή ορισμένων 4'',4'''-τριμεθυλενο-διοξυ-δισ-υποκατεστημένων χαλκονών μελετήθηκε περαιτέρω με φασματοσκοπία μάζας MS(ESI). Παρατηρήθηκε η εμφάνιση του [M+CH₃OH+1]⁺ καθώς και το [M+Na]⁺.

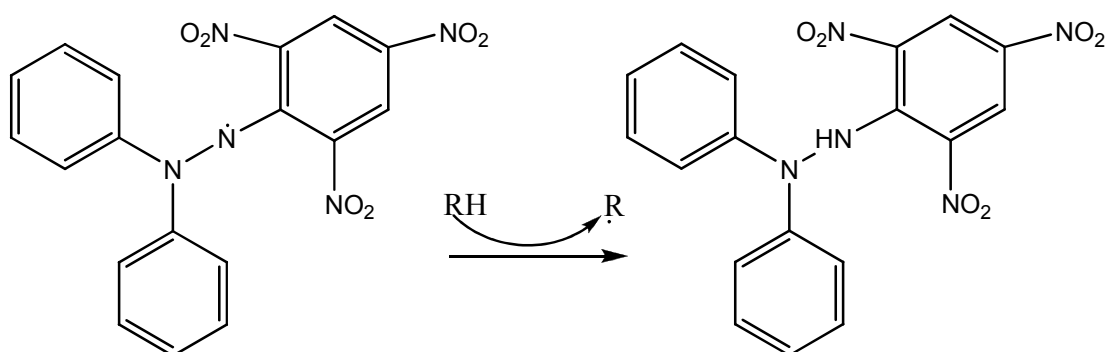
9.4. *In vitro* ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η μελέτη των ενώσεων για τη δράση τους ως αντιοξειδωτικά, αντιφλεγμονώδη, και αντικαρκινικά 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.

9.4.1. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ, ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΕΛΕΥΘΕΡΗ ΣΤΑΘΕΡΗ 1,1-ΔΙΦΑΙΝΥΛΟ-2-ΠΙΚΡΥΛΥΔΡΑΖΥΛΙΚΗ ΡΙΖΑ (DPPH).

Ο ρόλος των ελεύθερων ριζών σε πολλές φυσιολογικές και μη καταστάσεις στον ανθρώπινο οργανισμό, όπως είναι ο καρκίνος, η φλεγμονή, η γήρανση κ.λ.π. είναι καθοριστικός. Συνεπώς, είναι αυτονόητο είναι πως η ικανότητα για αντιοξειδωτική δράση μιας ένωσης θα ενίσχυε σημαντικά την κυτταροπροστατευτική της δράση. Οι περισσότερες ελεύθερες ρίζες είναι δραστηκότερα μόρια με μικρό χρόνο ζωής. Δραστηκότερες όλων είναι οι ρίζες υδροξυλίου με ημιπερίοδο ζωής 10^{-9} sec.

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

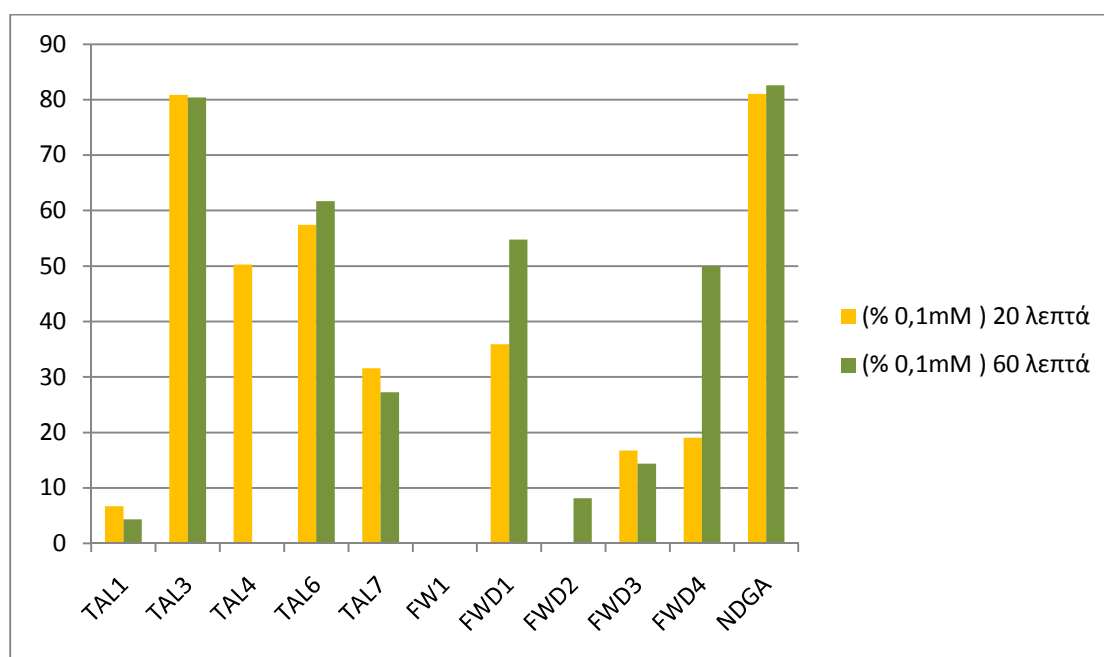


Σχήμα 22: 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλυδραζυλική ρίζα (DPPH)

Η αλληλεπίδραση των εξεταζόμενων ενώσεων με την ελεύθερη σταθερή ρίζα της 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλυδραζίνης (DPPH) (Σχήμα 21), που είναι ένα τέτοιο οξειδωτικό σώμα, μπορεί να εκφράσει το αναγωγικό δυναμικό των ενώσεων, καθώς και την ικανότητά τους να παγιδεύουν σταθερές ελεύθερες ρίζες σε ένα σύστημα όπου απουσιάζει ο σίδηρος (Denzlinger, 1990). 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. Λόγω του ηλεκτρονίου που κατέχει η ρίζα DPPH, παρουσιάζει μεγάλη απορρόφηση στα 517 nm (περιοχή του ορατού με βαθύ πορφυρό χρώμα). Κατά 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 με τον αριθμό των ηλεκτρονίων που προσλαμβάνονται 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 χρωματομετρικός προσδιορισμός της αναγωγικής ικανότητας των εξεταζόμενων ενώσεων.

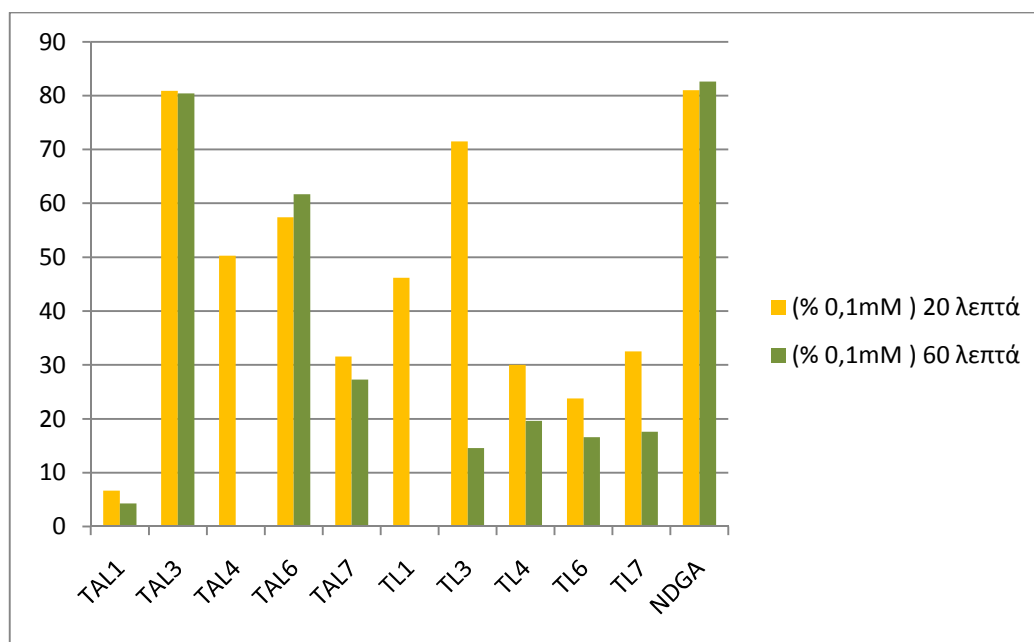
Η μελέτη της πορείας της αντίδρασης έγινε σε συνάρτηση με το χρόνο, για διάστημα 20 και 60 λεπτών (Σχήμα 22). Οι ενώσεις εξετάστηκαν σε συγκεντρώσεις 0,1mM ενώ η συγκέντρωση της DPPH έμεινε σταθερή (0,05mM).



Σχήμα 23: % αλληλεπίδραση με DPPH σε 0,1mM

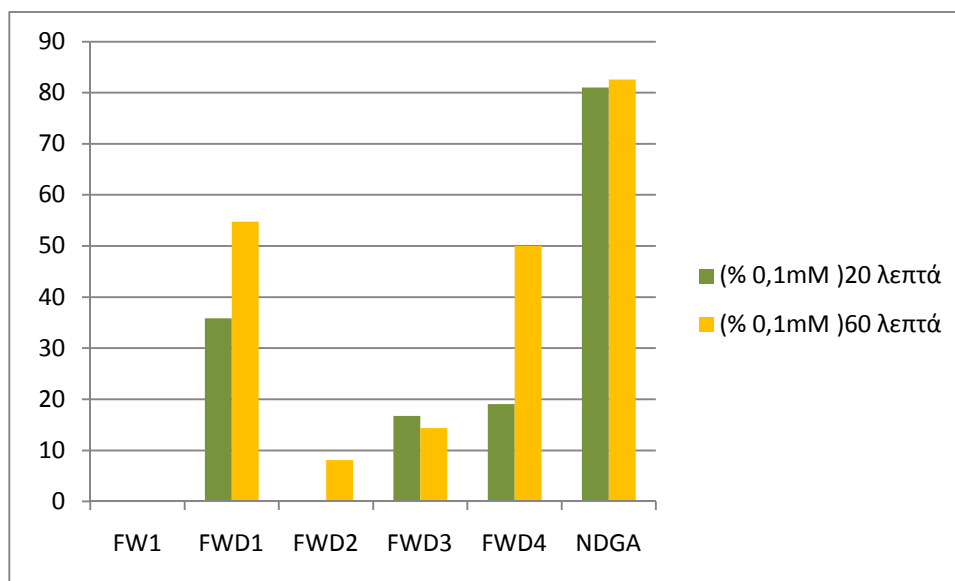
Οι αουρόνες TAL4 και TAL7 φαίνεται πως αλληλεπιδρούν μέτρια με την ελεύθερη σταθερή ρίζα DPPH ενώ οι TAL3 και TAL6 εμφάνισαν ισχυρότερη δράση συγκρίσιμη με την ένωση αναφοράς NDGA. Η TAL1 παρουσιάζει ελάχιστη αλληλεπίδραση. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των αουρονών με τα αποτελέσματα των αντιστοιχών χαλκονών, φαίνεται ότι οι αουρόνες εκδηλώνουν ισχυρότερη αναγωγική ικανότητα από τις αντίστοιχες χαλκόνες TL1, TL3, TL4, TL6 και TL7 στις ίδιες πειραματικές συνθήκες (Kouskoura et al., 2008). Γενικότερα οι αουρόνες φαίνεται να εμφανίζουν ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση που παραμένει σταθερή σε σχέση με τον χρόνο, με εξαίρεση την TAL4 που δεν φαίνεται να αλληλεπιδρά με το DPPH στα 20 min, ενώ οι χαλκόνες φαίνεται πως εμφανίζουν ισχυρότερη δράση με την πάροδο του χρόνου. Το μοτίβο των συζυγιακών διπλών δεσμών στην TAL3 πιθανά να αποτελεί ένα στοιχείο δομικό που να δικαιολογεί την ισχυρότερη αλληλεπίδραση (όπως και στην αντίστοιχη χαλκόνη). Η παρουσία της αρωματικής υδροξυλικής ομάδας στην TAL6 υποστηρίζει την καλή αντιοξειδωτική δράση. Αντίθετα λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης το DPPH δεν μπορεί να προσεγγίσει την TAL1 και να αλληλεπιδράσει μαζί της, με αποτέλεσμα το πολύ πτωχό

αποτέλεσμα. Για την TAL7 ο πιθανός σχηματισμός ενδομοριακά δεσμού υδρογόνου μεταξύ του $-OH$ και του καρβονυλικού οξυγόνου φαίνεται να εμποδίζει την αλληλεπίδραση της με το DPPH και να ελαττώνει την αναγωγική της ικανότητα .



Σχήμα 24: % αλληλεπίδραση TAL και TL με DPPH σε 0,1mM

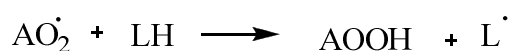
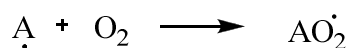
Η ένωση FW1 (μητρικός διπλός αιθέρας) δεν εμφανίζει αλληλεπίδραση με το DPPH. Η μετατροπή σε διπλή χαλκόνη οδηγεί στην εκδήλωση αναγωγικής ικανότητας. Επομένως η αλληλεπίδραση με το DPPH σχετίζεται με την παρουσία των δύο ενονικών ομάδων. Γενικά τα λαμβανόμενα αποτελέσματα της αλληλεπίδρασης είναι χαμηλότερα από τα αντίστοιχα της ένωσης αναφοράς. Με την αύξηση του χρόνου μόνο σε δύο περιπτώσεις FWD1 και FDW4 έχουμε και αύξηση της αναγωγικής ικανότητας. Στις άλλες περιπτώσεις καμιά στατιστικά σημαντική αλλαγή δεν παρατηρείται σε σχέση με τον χρόνο.



Σχήμα 25: % αλληλεπίδραση FWD με DPPH σε 0,1mM

9.4.2. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΝΑ ΑΝΑΣΤΕΛΛΟΥΝ ΤΗΝ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΩΣΗ ΤΟΥ ΛΙΝΕΛΑΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΠΟΥ ΕΠΑΓΕΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟ ΔΙΪΔΡΟΧΛΩΡΙΚΟ ΑΛΑΣ ΤΟΥ 2,2'-ΔΙΑΖΩ-2-ΑΜΙΔΙΝΟΠΡΟΠΑΝΙΟΥ ΑΑΡΗ.

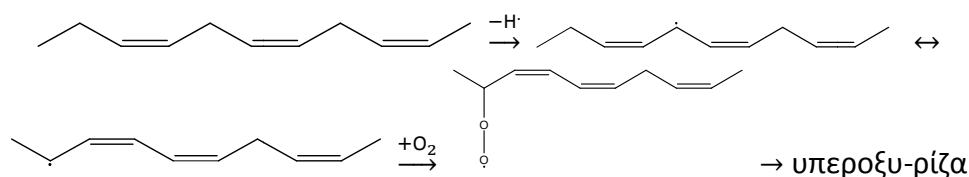
Η ΑΑΡΗ είναι μια υδατοδιαλυτή αζω-ένωση που χρησιμοποιείται για την παραγωγή ελευθέρων ριζών σε μελέτες λιπιδικής υπεροξειδωσής, για τον έλεγχο της αντιοξειδωτικής ικανότητας των ενώσεων. Επιπλέον δίνει ένα μόριο αζώτου και δύο εντοπισμένες στον άνθρακα ρίζες που μπορούν να «συνενωθούν» παράγοντας σταθερά προϊόντα ή να αντιδράσουν με μοριακό οξυγόνο και να δώσουν υπεροξυ-ρίζες:



Η οξειδωτική αλλοίωση των πολυακόρεστων λιπιδίων ονομάζεται λιπιδική υπεροξείδωση. Η διαδικασία αυτή είναι γνωστή από παλιά και προκαλεί το «τάγγισμα» των λιπών και των ελαίων.

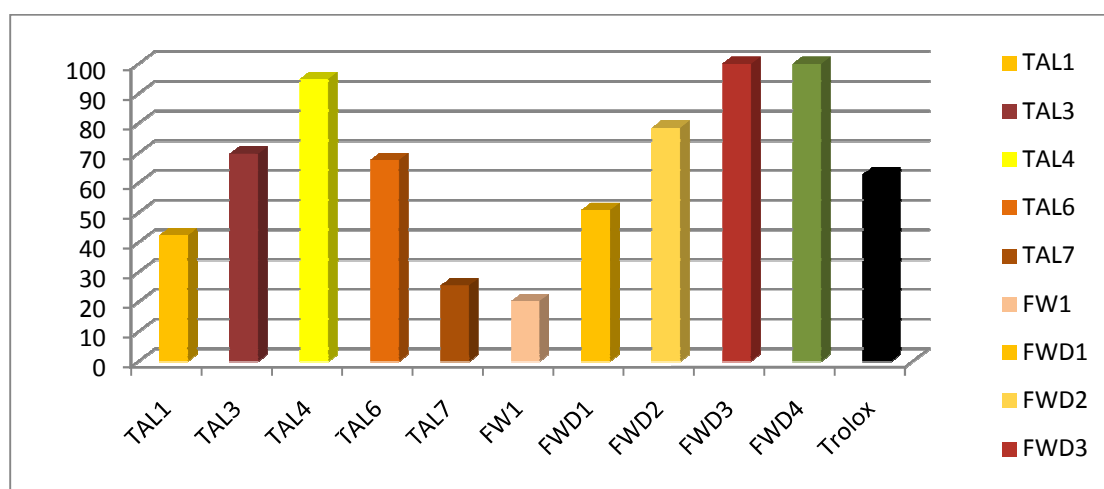
Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα αποτελούν συστατικά των φωσφολιπιδίων των κυτταρικών μεμβρανών. Περιέχουν μη διακλαδιζόμενες αλυσίδες με άρτιο αριθμό ατόμων άνθρακα (συνήθως 14-24) με *cis* διπλούς δεσμούς. Τα φωσφολιπίδια των μεμβρανών διατάσσονται σε διπλοστοιβάδα. Σε κάθε πλευρά της μεμβράνης μπορούν να κινούνται ταχύτατα, καθώς διαχέονται, μόρια λιπιδίων και πρωτεϊνών. Η ικανότητα αυτή προσδίδει τον δυναμικό, και όχι στατικό χαρακτήρα της μεμβράνης και αποτελεί βασική ιδιότητα αυτής, τη ρευστότητα. Η ρευστότητα διευκολύνεται και από τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα λόγω του χαμηλού σημείου τήξεώς τους. Κατά συνέπεια, κάθε αλλοίωση αυτών συνεπάγεται τη μείωση της ρευστότητας και τελικώς την απώλεια της λειτουργικότητας της μεμβράνης.

Η διαδικασία της λιπιδικής υπεροξείδωσης (Σχήμα 25) 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. Μια υπεροξυ-ρίζα μπορεί να: α) δώσει κυκλικά υπεροξειδία, β) αποσπάσει άτομο υδρογόνου από άλλο πολυακόρεστο λιπαρό οξύ, ώστε να αρχίσει η προηγούμενη διαδικασία, γ) δώσει υπεροξειδίο λιπιδίου και τέλος δ) δύο μόρια ριζών να συνενωθούν δίνοντας ένα «συζευγμένο διένιο» (η αντίδραση αυτή γίνεται μόνο σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου). 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 διαλδεΐδη, ενώ προκύπτουν και άλλα προϊόντα πολυμερισμού.



Σχήμα 26: Διαδικασία λιπιδικής υπεροξειδωσης

Έγινε προσπάθεια μελέτης της ικανότητας των ενώσεων να αναστέλλουν τη λιπιδική υπεροξειδωση του λινελαϊκού οξέος που επάγεται από την παρουσία του AAPH. Συγκεκριμένα οι νέες ενώσεις που δοκιμάστηκαν παρουσίασαν (3 από 5) μέτρια έως και πολύ υψηλή (υψηλότερη από την ένωση αναφοράς) κανότητα αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης του λινελαϊκού οξέος με δράση που κυμαίνεται από 20,2-100%.



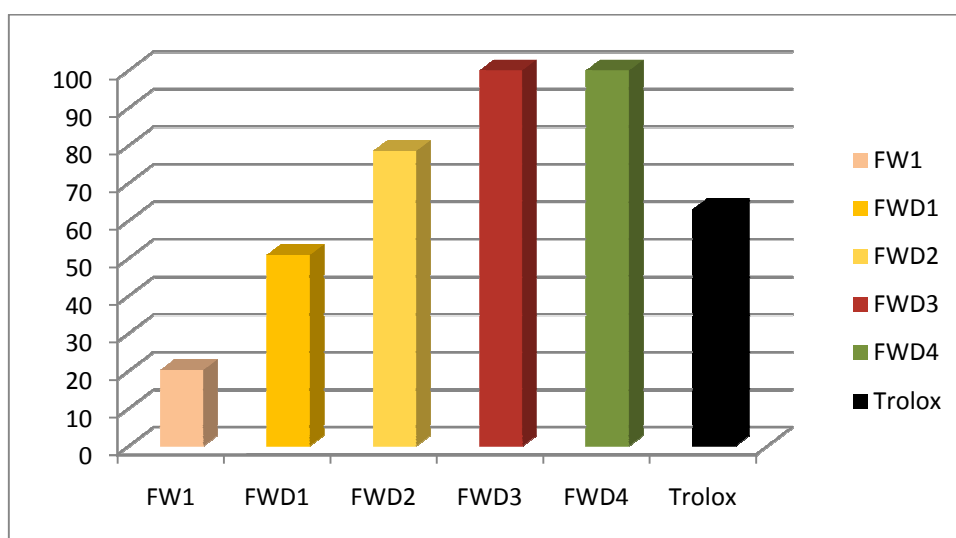
Σχήμα 27: % Αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης

Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η ναφθυλο-υποκατεστημένη αουρόνη TAL4 παρουσιάζει την ισχυρότερη αναστολή. Προηγούμενες μελέτες μας έχουν συνδυάσει την καλή αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης με την παρουσία της ομάδας αυτής. Οι TAL3 και TAL6 παρουσιάζουν υψηλή και σχεδόν ανάλογη δράση. Τα ιδιαίτερα δομικά στοιχεία των ενώσεων αυτών (συζυγιακός διπλός δεσμός, t-

βουτυλο-υδροξυ ομάδα) υποστηρίζουν το αποτέλεσμα. Η μειωμένη δράση των TAL1 και TAL7 όπως και στην περίπτωση της αλληλεπίδρασης με το DPPH μπορεί να αποδοθεί σε στερεοχημικούς λόγους.

Η μετατροπή των χαλκονών στις αντίστοιχες αουρόνες δεν φαίνεται να επηρεάζει την ανασταλτική επί της λιπιδικής υπεροξειδωσης συμπεριφορά.

Η αυξημένη δραστικότητα φαίνεται να διατηρείται και στις FWD αφού τα ποσοστά δραστικότητας για τις FWD3 και FWD4 εμφανίζονται στο 100% και για την FWD2 μεγαλύτερο από το 70%. Χαμηλότερη είναι η δράση για τις FWD1 και FWD7. Ο αιθέρας έχει πολύ χαμηλή συνεισφορά στη δράση. Έτσι επιβεβαιώνεται ότι η παρουσία της διενόνης επηρεάζει καθοριστικά το αποτέλεσμα.

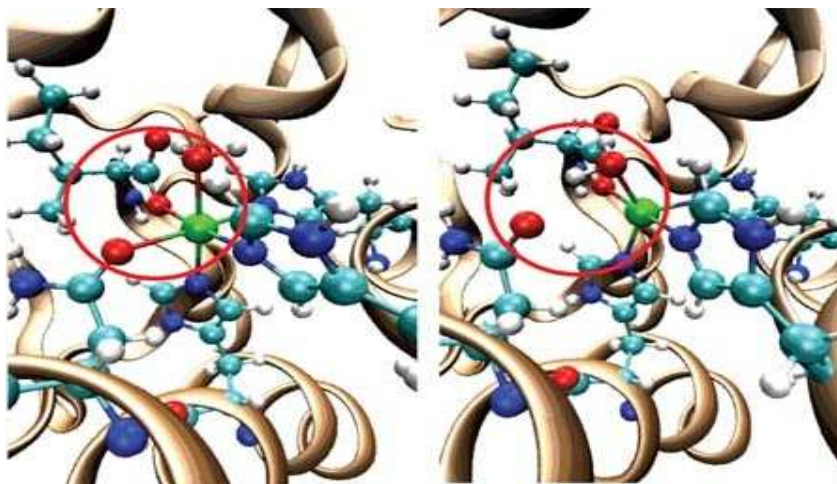


Σχήμα 28: % Αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωση FWD

9.4.3. ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΕΠΙ ΤΗΣ ΛΙΠΟΞΥΓΟΝΑΣΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΑΠΟ ΣΟΓΙΑ.

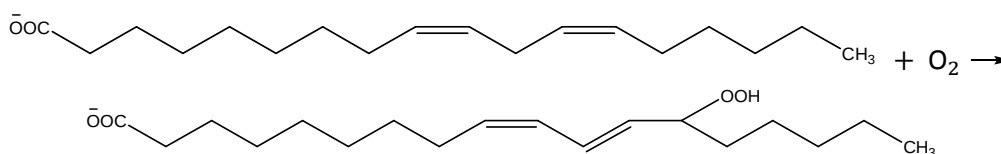
Η λιποξυγονάση (εικόνα 7) αποτελεί καθοριστικό ένζυμο που συμμετέχει στο μηχανισμό της φλεγμονής. Όπως αναφέρθηκε, τελικά προϊόντα από τη μετατροπή του αραχιδονικού οξέος δια μέσου της λιποξυγονάσης είναι τα λευκοτριένια, που

εμπλέκονται σε αρκετές παθοφυσιολογικές καταστάσεις, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, το άσθμα, η ψωρίαση και οι φλεγμονώδεις παθήσεις του εντέρου.



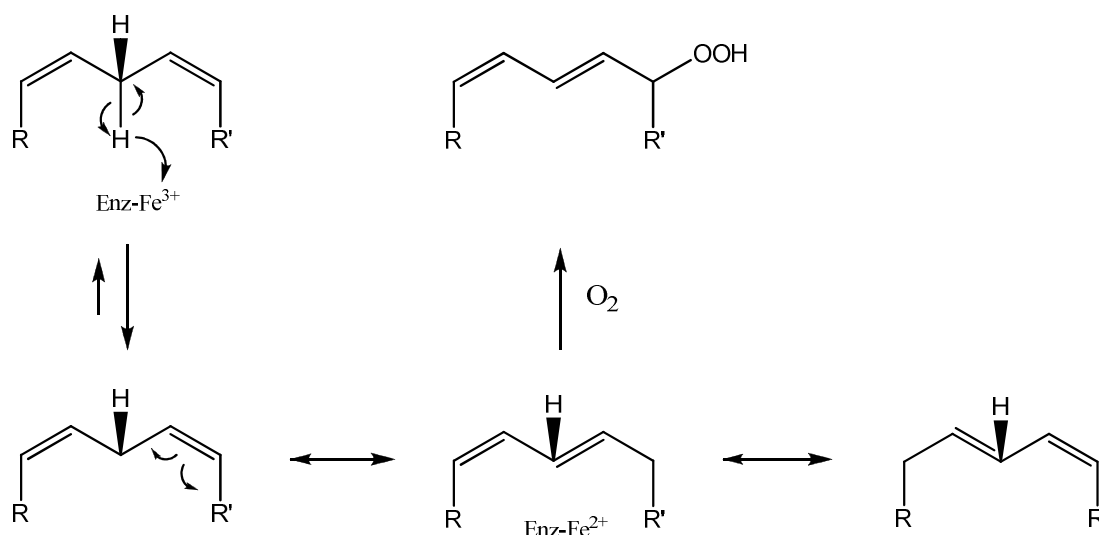
Εικόνα 7: Λιποξυγονάση από σόγια

Οι ενώσεις που συντέθηκαν δοκιμάστηκαν για τη δράση τους στη λιποξυγονάση χρησιμοποιώντας σαν υπόστρωμα το λινελαϊκό οξύ. Η λιποξυγονάση καταλύει την είσοδο δύο ατόμων οξυγόνου με τη μορφή της υπεροξυ-ρίζας στο άκρο ενός *cis*-1,4-διενίου. Το αλλυλικό υδρο-υπεροξειδίο που προκύπτει απορροφά στα 234 nm. Στην περίπτωση του λινελαϊκού οξέος, η αντίδραση ακολουθεί σχηματικά την παρακάτω πορεία (Σχήμα 29):



Σχήμα 29 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 (Σχήμα 30).



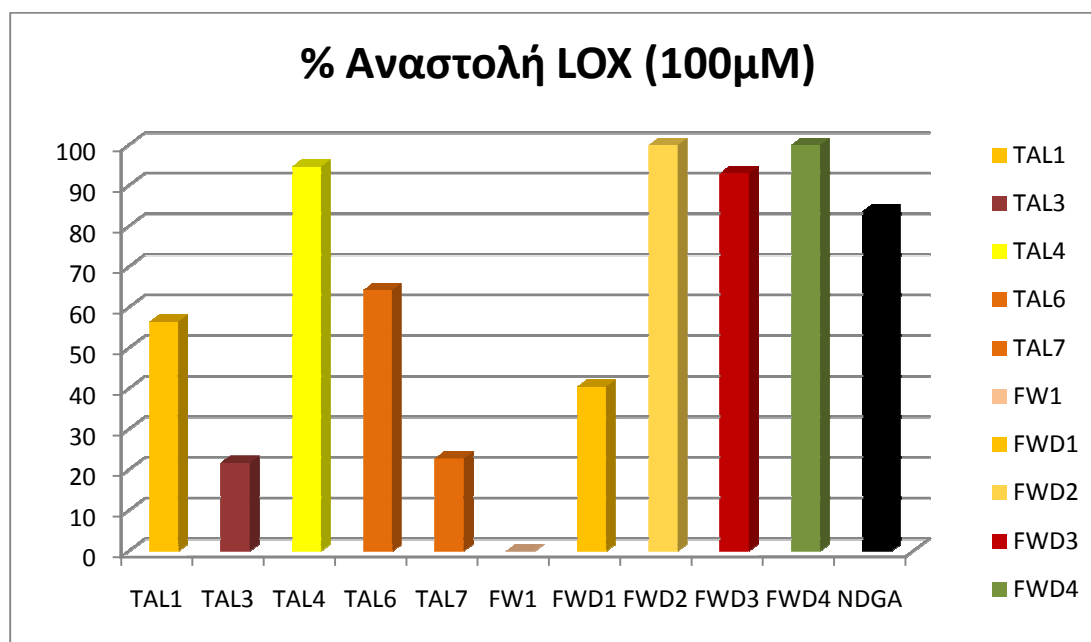
Σχήμα 30: Μηχανισμός αναστολής της λιποξυγονάσης

Στο πείραμα γίνεται προσπάθεια να μελετηθεί η ικανότητα των νέων ενώσεων να αναστέλλουν τη λιποξυγονάση, ένζυμο που εμπλέκεται στον κύκλο του αραχιδονικού οξέος.

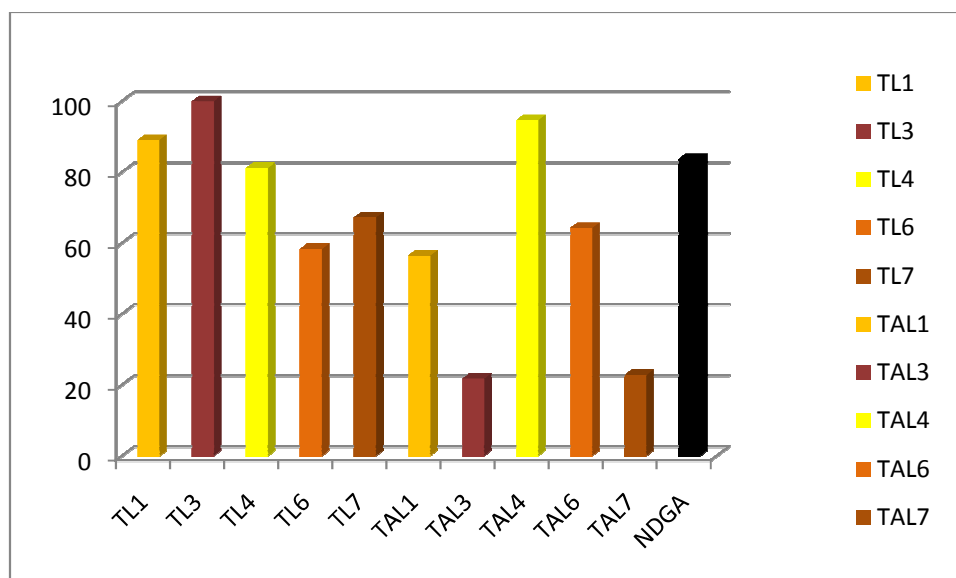
Από τα πειραματικά δεδομένα παρατηρείται πως οι σουρόνες εμφανίζουν ασθενέστερη ανασταλτική δράση έναντι της λιποξυγονάσης σε σχέση με τις αντίστοιχες χαλκόνες με εξαίρεση τις TAL4 και TAL6 όπου παρατηρείται αύξηση.

Η παρουσία της αιθερικής γέφυράς δεν φαίνεται να υποστηρίζει ανασταλτική δράση άρα δεν προσφέρει στη συνολική ανασταλτική δράση των μορίων. Αντίθετα η δράση φαίνεται να οφείλεται στην μετατροπή του αιθέρα σε διπλή χαλκόνη. Έτσι όλες οι διπλές χαλκόνες είναι αναστολείς της LOX, με ισχυρότερες τις FWD2, FWD3 και FWD4, χωρίς να παρουσιάζουν διακύμανση στις IC₅₀ τιμές τους.

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. Στη συγκεκριμένη περίπτωση τα πειραματικά μας δεδομένα υποστηρίζουν την γενικά την ύπαρξη σχέσης μεταξύ της αναστολής που εκδηλώνουν οι ενώσεις επί της LOX και των αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων (προκαλούμενη αναστολή στη λιπιδική υπεροξείδωση).

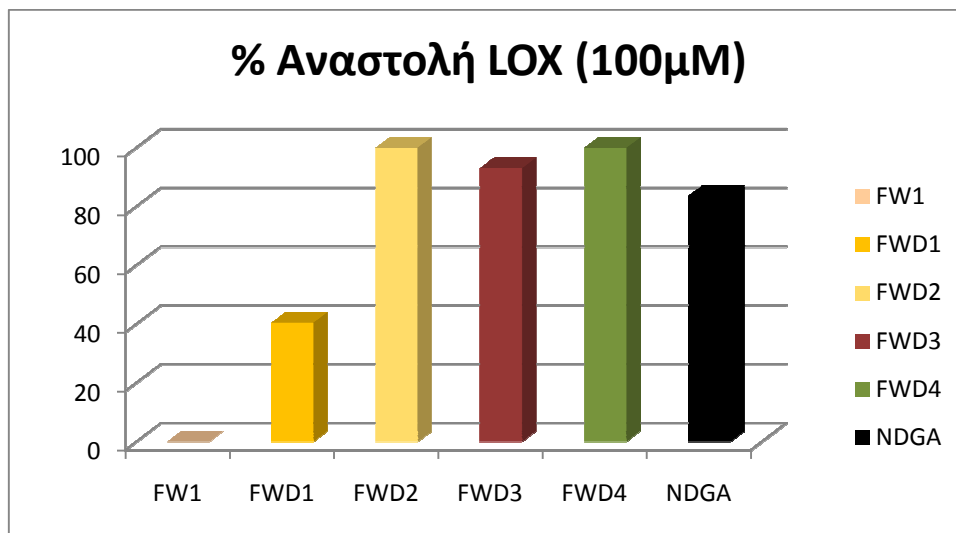


Σχήμα 31: % Αναστολή της λιποξυγονάσης (LOX)



Σχήμα 32: % Αναστολή της λιποξυγονάσης (LOX) TAL-TL

Αφού συσχετίστηκαν τα πειραματικά δεδομένα, παρατηρήθηκε πως η λιποφιλικότητα είναι σημαντική φυσικοχημική παράμετρος αν και ο συντελεστής συσχέτισης που προέκυψε είναι χαμηλός, $R = 0,667$.



Σχήμα 33: % Αναστολή της λιποξυγονάσης (LOX) FWD

Στη συνέχεια, για να επιβεβαιώσουμε ότι τόσο οι αυρόνες τις ποίες συνθέσαμε όσο και οι αυρόνες της βιβλιογραφίας ακολουθούν τον ίδιο μηχανισμό δράσης και ότι αυτός επηρεάζεται από τις ίδιες φυσικοχημικές παραμέτρους, συσχέτισαμε όλα τα δεδομένα μαζί, όπως φαίνεται στον επόμενο πίνακα.

Από το σύνολο των δεδομένων προέκυψε η εξίσωση [3] από την οποία φαίνεται ότι η λιποφιλικότητα είναι περισσότερο σημαντική. Για τις αυρόνες της βιβλιογραφίας, οι οποίες ήταν μικρά μόρια σημαντικότερη παράμετρος προέκυψε να είναι ο μοριακός όγκος.

$$\log \text{LOX\%} = 0,177(0,146)\text{ClogP} + 0,707(0,692)$$

[3]

$$n = 6, r = 0,860, r^2 = 0,739, q^2 = 0,421, s = 0,115, F_{1,4} = 11,39 \alpha = 0,05$$

Πίνακας 13: Φυσικοχημικές παράμετροι και βιολογικά δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν για την εξαγωγή της εξίσωσης 3.

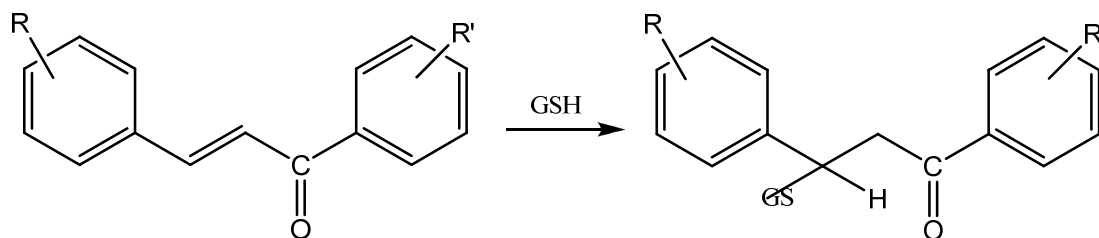
A/A	Υποκαταστάτης	LOX%*	LOX%**	$\Delta[*]**$	ClogP
1	CH ₃	1,51	1,38	0,13	3,79
2	Cl	1,42	1,46	-0,04	4,22
3	OCH ₃	1,54	1,31	0,23	3,43
4	OCH ₃	1,60	1,31	0,29	3,43
5	OCH ₃ ,OCH ₃ ,Cl	0,89	1,45	-0,56	4,21
6	Bromobenzyloxy	1,75	1,63	0,12	5,20
7	Phenoxy	-	1,70	-	5,61
8	dimethyaminocinammome	1,34	1,47	-0,13	4,28
9	naphthyl	1,98	1,57	0,41	4,87
10	Tert-butyl	1,81	1,84	-0,03	6,40
11	Hydroxyl-naphthyl	1,36	1,42	-0,06	4,02

*Πειραματικές τιμές, ** τιμές θεωρητικά προκύπτουσες από την εφαρμογή της εξίσωσης

9.4.4. IN VITRO ΜΕΛΕΤΗ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗ GSH

Από τη βιβλιογραφία (Dimmock et al., 1998) είναι γνωστό ότι α,β -ακόρεστες κετόνες αντιδρούν εκλεκτικά με θειολικές ομάδες και όχι με OH και NH₂ των αμινοξέων του DNA, με αποτέλεσμα να μην προκαλούν καρκινογένεση ή μεταλλάξεις, προβλήματα που εκδηλώνουν αρκετά αλκυλιωτικά μέσα που χρησιμοποιούνται στην χημειοθεραπεία του καρκίνου.

Έγινε προσπάθεια αλκυλίωσης των διπλών χαλκονών και των αουρονών που συντέθηκαν, με τη γλουταθειόνη. Τα αποτελέσματα της αντίδρασης και η πορεία της αξιολογούνται από τις αντίστοιχες τιμές ϵ και λ_{max} .



Όλες οι ενώσεις αντιδρούν με την γλουταθειόνη και στις δυο συγκεντρώσεις γλουταθειόνης που δοκιμάστηκαν με εξαίρεση τις ενώσεις FW1 και FWD1. Η αουρόνη TAL7 δεν έδειξε κάποιο αποτέλεσμα. Οι TAL1 και TAL3 δείχνουν καλύτερα αποτελέσματα με δεκαπλάσια συγκέντρωση γλουταθειόνης. Η TAL4 και η TAL6 με την διπλάσια ποσότητα. Οι αιθέρες όπως ήταν αναμενόμενο δεν έδωσε θετική επίδραση. Ορισμένες ενώσεις αντιδρούν μόνο στην μία από της δύο συγκεντρώσεις. Θεαματικά ισχυρότερη είναι η δράση για τις ενώσεις FWD3 και FWD4. Η στερεοχημεία φαίνεται να είναι σημαντικότερος παράγοντας επίδρασης.

9.5. In vivo ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η μελέτη των ενώσεων για τη δράση τους ως αντιφλεγμονώδη, και εντομοκτόνα πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια πειραμάτων *in vivo*. 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.

9.5.1. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΟΙΔΗΜΑΤΟΣ ΑΚΡΟΥ ΠΟΔΟΣ ΕΠΙΜΥΑ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΕΙΤΑΙ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΝΔΟΔΕΡΜΙΚΗ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΚΑΡΑΓΕΝΙΝΗΣ.

Η καραγεννίνη είναι ένας πολυσακχαρίτης που παραλαμβάνεται από το φύκος *Chondrus crispus*. Συναντάται σε διαφορετικούς τύπους που όμως εμφανίζουν κατά κύριο λόγο τις ίδιες ιδιότητες. Η καραγεννίνη αποτελεί γνωστό φλογιστικό μέσο και οδηγεί στο σχηματισμό φλεγμονής.

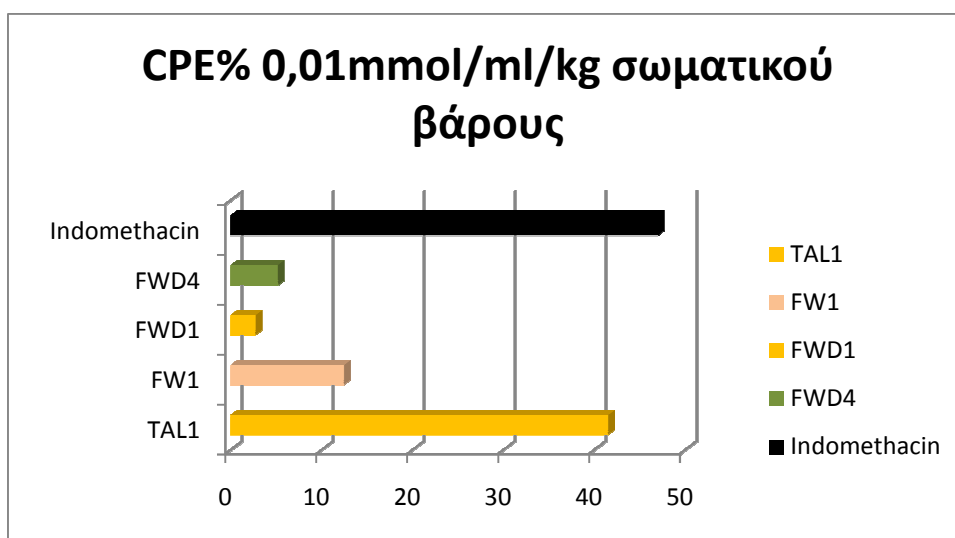
Το οίδημα που προκαλείται από καραγεννίνη εξελίσσεται σε διαφορετικές φάσεις, που ενεργοποιεί τα στάδια του κύκλου του αραχιδονικού οξέος (α: απελευθέρωση ισταμίνης, β: ενεργοποίηση προσταγλανδινών).

Η πλειοψηφία των μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων (NSADs) δρα κυρίως κατά το στάδιο της ενεργοποίησης των προσταγλανδινών, αναστέλλοντας την δράση των ισομορφών του ενζύμου κυκλοξυγονάση (COX).

Μελετάται η επίδραση των ενώσεων στη φλεγμονή από καραγεννίνη για 3,5 ώρες μετά τη χορήγηση φλογιστικού. 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. Για τον έλεγχο της αντιφλεγμονώδους δράσης επιλέγονται παράγωγα που παρουσίασαν ενδιαφέρουσα δράση στα προηγούμενα *in vitro* πειράματα.

Η δράση της ένωσης TAL1 είναι αρκετά καλή, καθώς η δράση της πλησιάζει

τη δράση του φαρμάκου αναφοράς (ινδομεθακίνη, 47%). Οι ενώσεις, FWD1 και FWD4 παρουσίασαν πολύ μικρή και μη στατιστικά σημαντική δράση στο δοθέν πειραματικό πρωτόκολλο. Αντίθετα η FWD7 παρουσίασε αρκετά σημαντική απόκριση στο συγκεκριμένο πειραματικό πρωτόκολλο. Η ένωση αυτή παρουσίασε μέτρια δράση επί της λιποξυγονάσης και πιθανά να εκδηλώνει την δράση της στο *in vivo* Πείραμα μέσω κάποιου άλλου μηχανισμού πχ μέσω της αναστολής της κυκλοξυγονάσης.



Σχήμα 34 : CPE% 0,01mmol/ml/kg σωματικού βάρους

9.5.2. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΟΥ-ΤΟΞΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΣΕ ΠΡΟΝΥΜΦΕΣ ΚΟΥΝΟΥΠΙΩΝ .

Από τα αποτελέσματα δεν προέκυψε κάποια ιδιαίτερη εντομοκτόνος δράση στις προνύμφες. Εκτενέστερες δοκιμές είναι σε εξέλιξη.

10. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Μελετήσαμε τη σύνθεση και τη βιολογική δράση μιας σειράς νέων ενονικών παραγώγων.

1. Συντέθηκαν 3 σειρές ενονικών παραγώγων, εκ των οποίων 7 χαλκόνες (3 πρωτότυπες), 7 πρωτότυπες αουρόνες και 7 4'',4'''-τριμεθυλενο-διοξυ-δισ-υποκατεστημένες χαλκόνες.
2. Οι χαλκόνες και οι 4'',4'''-τριμεθυλενο-διοξυ-δισ-υποκατεστημένες χαλκόνες που συντέθηκαν λαμβάνονται μέσω αντίδρασης Claisen-Schmidt από ένα μίγμα υδροξυ-ακετοφαινόνης, κατάλληλα υποκατεστημένης αρυλαλδεΐδης σε αλκοολικό διάλυμα παρουσία υδατικού διαλύματος ΚΟΗ.
3. Οι αουρόνες συντέθηκαν μέσω της οξειδωτικής κυκλοποίησης από τις αντίστοιχες χαλκόνες παρουσία πυριδίνης.
4. Οι σύνθεση όλων των παραγώγων δεν παρουσίασε το αναμενόμενο αποτέλεσμα.
5. Οι νέες ενώσεις λαμβάνονται με αποδόσεις έως 90%, καθώς έγιναν προσπάθειες για τη βελτίωσή τους με τροποποιήσεις της συνθετικής μεθόδου.
6. Οι δομές όλων των ενώσεων που συντέθηκαν, επιβεβαιώθηκαν με στοιχειακές αναλύσεις και φασματοσκοπική εξέταση IR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ και MS.
7. Προσδιορίστηκαν υπολογιστικά οι τιμές διαφόρων φυσικοχημικών παραμέτρων όλων των ενώσεων με διάφορα υπολογιστικά προγράμματα.
8. Μελετήθηκε η δράση των ενώσεων σε διάφορα πειραματικά πρωτόκολλα φαρμακοχημικών δοκιμασιών *in vitro* και *in vivo*.
9. Οι ενώσεις μελετήθηκαν για τη δυνατότητα τους να αλληλεπιδρούν με την ελεύθερη ρίζα του DPPH σε συγκέντρωση 0,1mM σε δύο διαφορετικούς χρόνους (20min και 60min). Από το σύνολο των ενώσεων μόνο η **TAL3** εμφάνισε ισχυρή αλληλεπίδραση με τη σταθερή ελεύθερη ρίζα DPPH σε σχέση με τη συγκέντρωση και το χρόνο.

10. Οι περισσότερες ενώσεις παρουσίασαν υψηλή ικανότητα αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης του λινελαϊκού οξέος που επάγεται από το AAPH.
11. Η αναστολή της λιποξυγονάσης φυτικής προέλευσης μελετήθηκε σε όλες τις ενώσεις και έγινε προσπάθεια υπολογισμού των τιμών IC₅₀. Ισχυρότερη αναστολή της λιποξυγονάσης προκαλούν οι **TAL4**, **FWD2**, **FWD3** και **FWD4**.
12. Μελετήθηκε η ικανότητα των ενώσεων σε συγκέντρωση 0.1 mM να αντιδρούν με την γλουταθειόνη. Οι ενώσεις που δοκιμάσθηκαν έδειξαν ικανοποιητική αναστολή, με άριστη αυτή των **FWD3** και **FWD4**.
13. Μελετήθηκαν όλες οι ενώσεις *in vivo* για την αντιφλεγμονώδη τους δράση με το πείραμα της καρραγενίνης (ενδοπεριτοναϊκή έγχυση 0,01 mmol/ Kg σωματικού βάρους). Οι ενώσεις διαπιστώθηκε ότι δεν αναστέλλουν ισχυρά το οίδημα που προκαλείται από καρραγενίνη με καλύτερη την ένωση **TAL1** που εμφανίζει αναστολή κατά 41,5%.
14. Μελετήθηκε η τοξική δράση των ενώσεων σε πονύμφες κουνουπιών.
15. Για τις νέες αυτές 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 λιποφιλικότητα, η ύπαρξη υποκαταστατών σε συγκεκριμένες θέσεις και ο μοριακός όγκος.
16. Με επεξεργασία δεδομένων της βιβλιογραφίας που αφορούν κυρίως χαλκόνες και αουρόνες που εκδηλώνουν ανασταλτική δράση επί της LOX, έγινε προσπάθεια εξαγωγής «ποσοτικών σχέσεων δομής-δράσης» με το υπολογιστικό πρόγραμμα C-QSAR της Biobyte. Οι σχέσεις που προέκυψαν, μελετήθηκαν και έγινε προσπάθεια να εξηγηθούν και τα συμπεράσματα τα οποία εξήχθηκαν να συγκριθούν με προηγούμενες σχέσεις που βρέθηκαν από τη βιβλιογραφία και αφορούν στην ανασταλτική δράση επί της LOX και να χρησιμοποιηθούν στο σχεδιασμό και τη σύνθεση των νέων παραγώγων μας.

Από τα αποτελέσματα που λάβαμε επιβεβαιώνεται η ύπαρξη της προβλεφθείσας βιολογικής δράσης για τις ενώσεις που συνθέσαμε, ενώ μπορούμε να καταλήξουμε σε ορισμένα συμπεράσματα όσον αφορά στα δομικά και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των υπό εξέταση παραγώγων, τα οποία είναι σημαντικά για την εμφάνιση δράσης.

Προοπτικές

- Από τα αποτελέσματα που λαμβάνονται επιβεβαιώνεται η ύπαρξη της προβλεφθείσας αντιφλεγμονώδους-αντιοξειδωτικής-αντικαρκινικής δράσης 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 **FWD4** που φαίνεται να αναστέλλει 100% την LOX, έχει δράση κατά της λιπιδικής υπεροξειδωσης (100%) και ισχυρή σύνδεση με την γλουταθειόνη μπορεί να αποτελέσει οδηγό ένωση στο σχεδιασμό μορίων με αντιφλεγμονώδη-αντικαρκινική 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 της πιθανώς καταλληλότερης ένωσης για τα ένζυμα που εμπλέκονται στη φλεγμονή, όπως η λιποξυγονάση.

11. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΕΣ

1. Andersen Ø. M., Markham K. R., Flavonoids Chemistry, Biochemistry and Applications, **2006**
2. Araico A.; Terencio M. C.; Alcaraz M. J.; Dominguez J. N.; Leon C.; Ferrandiz M. L. *Life Sciences*, **2006**, 78, 2911-2918
3. Bandgar B. P., Gawande S. S., Bodade R. G., Totre J. V., Khobragade C. N. , *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 18, **2010** 13641370
4. Briot, A.; Baehr, C.; Brouillard, R.; Wagner, A.; Mioskowski, C., *Org. Chem.*, **2004**, 69, 1374-7
5. Cheng J.-H., Hung C.-F., Yang S.-C., Wang J.-P., S.-J. Won, C.-N. Lin , *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16, **2008** 7270-7276
6. Charlier C.,Michaux C. *Eur. J. Med. Chem.*, **2003**, 38, 645-659
7. Chi S.C., Won Jun H., *J. Pharm. Sci.*, **1990**, 79, 974
8. Catalano A, Rodilossi S, Caprari P, Coppola V, Procopio A., *EMBO J*, **2005**, 24: 170-9.
9. Detsi A., Majdalani M., Kontogiorgis C.A., Hadjipavlou-Litina D., Kefalas P., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2009**,17, 8073–8085
10. Dannhart G., Kiefer W., Kramer G., Mahrlein S., Nowe U., Fiebich B.*Eur.J.Med.Chem.*35, **2000**, 499-510
11. Dimmock J. R.; Elias D. W.; Beazely M. A.; Kandepu N. M. *Curr. Med. Chem.*, **1999**, 6, 1125-1149
12. Denzlinger C.; Grimberg M.; Kapp A.; Whilmanns W. *J. Allergy Clin. Immunol.* , **1990**, 85, 218
13. Dimmock J.R., Kandepu N.M., Hetherington M., Quail J.W., Pugazhenth U. and Fan, X.-S., Zhang, Y.-M.'A ,*Chinese Journal of Chemistry*, **2002**, 20, 198-201
14. Denzlinger C.; Grimberg M.; Kapp A.; Whilmanns W. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **1990**, 85, 218
15. Donnelly J. A., Higginbotham C. L., *Tetrahedron* , **1990**, 46; 20, 7219-7226

16. Eddarir, S.; Cotellet, N.; Bakkour, Y.; Rolando, C., *Tetrahedron Lett.*, **2003**, 44, 5359-63.
17. Fan, X.-S., Zhang, Y.-M., *A.Chinese Journal of Chemistry*, **2002**, 20, 198-201
18. Hu N., Ty Y.-P., Liu Y., Jiang K., Pan Y., **2008**, 73, 3369-3376
19. Glusa E.; Paintz M.; Bretschneider E. *Semin. Thromb. Hemost.*, **1996**, 22, 261-266.
20. Grand R.; Turnell A.; Grabham P. *Biochem. J.* , **1996**, 313, 353-358
21. Gryglewski R.J., Korbut R., Robak J., Swies J., *Biochem. Pharmacol.*, **1987**, 36, 317-322
22. Go M.L., Wu X., Liu X., *Med. Chem.*, **2005**, 12, 483
23. Hansch C.; Rockwell S. D.; Jow P.Y.C.; Leo A. *J. Med. Chem.*, **1974**, 20, 304
24. Hansch C.; Leo A.; Taft R.W. *Chem. Rev.*, **1991**, 91, 165 Hansch C.; Leo A. Exploring QSAR, *Fundamentals and applications in Chemistry and Biology*, ACS Professional Reference Book, **1995**
25. Ito K.; Kagaya H.; Satoh I.; Tsukamoto G.; Nose T. *Arzneim. –Forsch./ Drug Res.*, **1982**, 32, 117
26. Julemont F. ; Dogne J.M. ; Laeckmann D. ; Pirotte B. ; de Leval X. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2003**, 13, 1
27. Kalsi R.; Rande K.; Bhalla T.N.; Barthwal J.P.; Parmar S.S., *J. Pharm. Sci.*, **1990**, 79, 31710
28. Katsori A.-M., Hadjipavlou-Litina D., *Expert Opin Ther Pat.*, **2011**
29. Kouskoura M., Hadjipavlou-Litina D. and Giakoumakou M., 2008 *Med.Chem*, **2008**, 4, 586-596
30. Koliopoulos G., Michaelakis A., Mihou A.P., Couladouros E.A., *Society of Chemical Industry*, **2007**, 63, 954–959
31. Kurosawa K., Higuchi J., **1972**, 45, 1132-1136
32. Liégeois C.; Lermusieau G.; Collins S. *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48, 1129-1134
33. Leo A.; Hansch C.; Elkins D. *Chem. Rev.* **1971**, 71, 525
34. Mandal S., Yadav S., Yadav S., Nema R. K., **2009** 1 (1):102-104
35. McMillan R.M.; Walker E.R. *Trends Pharmacol. Sci.*, **1992**, 13, 323

36. Moreau A., Praveen Rao P. N.; Knaus E. E. *Bioorg. Med. Chem.*, **2006**, 14, 5340-5350
37. Menna C., Olivieri F, Catalano A. , Procopio A., *Current Pharmaceutical Design*, **2010**, 16, 000-000
38. Patil C.B., Mahajan S.K., Katti S.A., *J. Pharm. Sci. & Res. Vol.1(3)*, **2009**, 11-22
39. Pelter, A., Ward, R.S., Heller, H.G., **1979** 1, 328-329
40. Pontiki E., Hadjipavlou-Litina D. *Med. Chem*, **2006**, 2, 251-264
41. Pontiki E., Hadjipavlou-Litina D. *Bioorg. Med. Chem.*, **2007**, 15, 5819-5827
42. Pontiki E., Hadjipavlou-Litina D., Geromichalos G., Papageorgiou A., *Chem. Biol. Drug Des.*, **2009**, 74, 266
43. Sim H.-M., Lee C.-Y., Ee P. L. R., Go M.-L., *European journal of pharmaceutical sciences*, 35, **2008** 293-306
44. Solomons T.W. G. *Organic Chemistry*, 3rd edition, **1984**, p. 790-791
45. Srivastava Y.K., , *Rasayan J. Chem.*, **2008** 1:4, 884-886
46. Sekizaki H., , *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1988**, 61, 1407-1409
47. Schneider C, Boeglin WE, Yin H, Stec DF, Voehler M. *J Am Chem Soc* **2006**; 128: 720-1
48. Sodani R.S. et al., *e-Journal of Med.*, **2009**, 7, 763-760
49. Sudom A.M. *J. Med. Chem.* 41, **1998**, 1014-1026
50. Taraborewala R.B.; Kauffman J.M. *J. Pharm. Sci.*, **1990**, 173
51. Taylor & Francis Group Beney, C., Mariotte, A.-M., Boumendjel, A., *Heterocycles*, **2001** 55, 967-972
52. Thakkar, K., Cushman, M *J. Org. Chem.*, **1995** 60, 6499-65
53. Thirunarayanan, G.; Gopalakrishnan, M.; Vanangamudi, G., *Spectrochimica Acta Part A.*, **2007**, 67, 1106–1112
54. Venkateswarlu, S.; Panchagnula, G. K.; Gottumukkala, A. L.; Subbaraju, G. *V. Tetrahedron*, **2007**, 63, 6909
55. Ur-Rahman A., Choudhary, M.I., Hayat, S., Khan, A.M., Ahmed, A, **2001**. *Chem. Pharm. Bull.* 49, 105
56. Usami Y. , *Mar. Drugs* , **2009**, 7, 314-330
57. Fan, X.-S., Zhang, Y.-M. *A Chinese Journal of Chemistry*, **2002**, 20, 198-201

58. Varma R. S. and Varma M. *Tetrahedron Letters*, **1992**, 33, 40, 5937-3940
59. Verloop A.; Hoogenstraaten W.; Tripker J. J. *Drug Design*, **1976**, 7, 165
60. Venkateswarlu, S.; Panchagnula, G. K.; Gottumukkala, A. L.; Subbaraju, G. V. *Tetrahedron*, **2007**, 63, 6909
61. World Health Organization, **1981**. Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. World Health Organization, Geneva, WHO/VBC/81.807. 6 p.
62. Weber, V., Rubat, C., Duroux, E., Lartigue, C., Madesclaire, M., Coudert, P., **2005** *Bioorg Med Chem*; 13: 4552-4564.
63. Zhao W., Sun J., Xiang H., Zeng Y.-y., Li X.-b, Xiao H., Chen D.-y., Ma R.-l. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 19, **2011** 3192-3203
64. Χατζηπαύλου-Λίτινα Δ. Σημειώσεις Προχωρημένης Φαρμακοχημείας, Ποσοτικές Σχέσεις Δομής – Δράσης

12. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

