



Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών



Εργαστήριο Χημείας, Βιοχημείας, Κοσμητολογίας

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μεταλλικά σύμπλοκα πυραζολίνης, ως στρατηγική για την ανάπτυξη
βιολογικά ενεργών μορίων**

GRADUATE THESIS

**Pyrazoline metal complexes, as a strategy for the development of
biologically active molecules**

ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ/NAME OF STUDENT

Κωνσταντίνος Σκέρλος
Konstantinos Skerlos

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR

Δημήτρης Ματιάδης
Dimitris Matiadis

ΑΙΓΑΛΕΩ/AIGALEO 2023



Faculty of Health and Caring Professions
Department of Biomedical Sciences



Laboratory of Chemistry, Biochemistry, Cosmetology

GRADUATE THESIS

Pyrazoline metal complexes, as a strategy for the development of biologically active molecules

KONSTANTINOS SKERLOS

18678046

con.skerlos@gmail.com

FIRST SUPERVISOR

DIMITRIS MATIADIS

SECOND SUPERVISOR

CHRISTINA FOUNTZOULA

THIRD SUPERVISOR

MARIA TRAPALI

AIGALEO 2023

Επιτροπή εξέτασης

Ημερομηνία εξέτασης: 07/07/2023

Ονόματα εξεταστών

1^{ος} Εξεταστής Δημήτρης Ματιάδης

2^{ος} Εξεταστής Χριστίνα Φούντζουλα

3^{ος} Εξεταστής Μαρία Τράπαλη

Περιεχόμενα

Περιεχόμενα	iv
Δήλωση συγγραφέα προπτυχιακής διπλωματικής εργασίας.....	v
Ευχαριστίες	vi
Πρόλογος	7
1. Εισαγωγή.....	10
1.1 Πυραζολίνη, ένα πολυδιάστατο μόριο.....	10
1.2 Τα μέταλλα στην Ιατρική.....	14
2. Μεταλλικά σύμπλοκα Πυραζολίνης.....	18
2.1 Μεταλλικά σύμπλοκα πυραζολίνης με Cu	18
2.2 Μεταλλικά Σύμπλοκα Πυραζολίνης με Ag	40
2.3 Μεταλλικά σύμπλοκα πυραζολίνης με Pd	48
2.4 Μεταλλικά σύμπλοκα Πυραζολίνης με Fe	63
2.5 Μεταλλικά Σύμπλοκα Πυραζολίνης με Co	91
2.6 Μεταλλικά σύμπλοκα πυραζολίνης με Ru	107
2.7 Μεταλλικά Σύμπλοκα Πυραζολίνης με B	128
2.8 Μεταλλικά σύμπλοκα Πυραζολίνης με Ir.....	139
2.9 Μεταλλικά σύμπλοκα Πυραζολίνης με Re	153
2.10 Μεταλλικά Σύμπλοκα Πυραζολίνης με Rh	166
Προοπτικές και προτάσεις.....	172
3. Επίλογος.....	173
4. Βιβλιογραφία	174

Δήλωση συγγραφέα προπτυχιακής διπλωματικής εργασίας

Ο κάτωθι υπογεγραμμένος Κωνσταντίνος Σκέρλος του Γεωργίου, με αριθμό μητρώου 18678046 φοιτητής του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής/διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολο τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για ανάκληση του πτυχίου μου».

Όνομα φοιτητή

Κωνσταντίνος Σκέρλος

Υπογραφή φοιτητή

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω για την σημαντική βοήθεια που μου παρείχαν την συμφοιτήτρια μου Δέσποινα Μαντζάνα και τον επιβλέποντα καθηγητή μου, Δημήτριο Ματιάδη. Η συνεισφορά και των δύο ήταν πολύτιμη, έως και απαραίτητη, για την περάτωση της εργασίας αυτής.

Πρόλογος

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η ανάδειξη των βιολογικών εφαρμογών των μεταλλικών συμπλόκων πυραζολίνης, η περιγραφή των μηχανισμών με τους οποίους δρουν, καθώς και η ταξινόμηση των συμπλόκων αυτών, βάσει της βιολογικής τους δραστηριότητας.

Στην σημερινή εποχή, η ανάγκη για νέα, πιο δραστικά, αλλά ταυτόχρονα, λιγότερο τοξικά φάρμακα κρίνεται επιτακτική. Η αλόγιστη χρήση αντιβιοτικών οδήγησε στην εμφάνιση νέων βακτηριακών στελεχών, τα οποία αντιστέκονται σε αυτά και που προκαλούν σοβαρές λοιμώξεις, οι οποίες δύσκολα αντιμετωπίζονται. Νέα ιικά στελέχη κάνουν την εμφάνισή τους, όπου και αυτά καταφέρνουν να επιβιώνουν έναντι των παρόντων αντιικών φαρμάκων. Ο σύγχρονος τρόπος ζωής και οι περιβαλλοντικές συνθήκες έχουν αυξήσει δραματικά την εμφάνιση διαφόρων ειδών καρκίνου, και άλλων χρόνιων νοσημάτων, όπως ο διαβήτης και οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες.

Για τους λόγους αυτούς, καταβάλλονται μεγάλες προσπάθειες για την ανάπτυξη νέων φαρμακευτικών προϊόντων που θα συμβάλλουν στην αντιμετώπιση αυτών των καίριων προβλημάτων. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχουν επιδείξει τα μεταλλικά σύμπλοκα, καθώς τα μέταλλα παίζουν ιδιαίτερο ρόλο στην ανθρώπινη υγεία δρώντας ως καταλύτες σε βιοχημικές αντιδράσεις και ως συμπράγοντες σε διάφορα ένζυμα. Επίσης ορισμένα μέταλλα που ανήκουν στα «στοιχεία μετάπτωσης» στον περιοδικό πίνακα, π.χ., χαλκός, χρυσός και κοβάλτιο, παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδη, αντιμικροβιακή και αντιδιαβητική δράση όταν χρησιμοποιούνται ως φάρμακα. Τα μέταλλα αυτά γίνονται ακόμη πιο δραστικά όταν σε αυτά προστεθούν μόρια πυραζολίνης ως υποκαταστάτες.

Ειδικότερα, Οι πυραζολίνες αποτελούν μία ενδιαφέρουσα κατηγορία ετεροκυκλικών αρωματικών μορίων, λόγω του εξαιρετικά σημαντικού τους ρόλου στην ανάπτυξη φαρμάκων και στην κατασκευή ενώσεων με ευρύ φάσμα βιολογικών ιδιοτήτων. Οι πυραζολίνες χρησιμοποιούνται ως ισοστερή σε ετεροκυκλικούς δακτύλιους, όπως στο ιμιδαζόλιο, θειαζόλιο, τετραζόλιο, ισοξαζόλιο, τριαζόλιο, και οξαζόλιο, αλλά και σε πολλά ακόμη, λόγω της ιδιότητάς τους να μεταβάλλουν τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες. Τα παράγωγα πυραζολίνης έχουν ποικίλες βιολογικές

εφαρμογές, όπως αντικαρκινική (Wang, et al., 2012), αντιφλεγμονώδη (Aggarwal, et al., 2013), αντικαταθλιπτική (Prasad, Rao, Prasoona, Murali, & Kumar, 2005), αντιβακτηριδιακή (Ozdemir, Zitouni, Kaplancikli, Revial, & Guven, 2007), αντιελονοσική (Acharya, et al., 2010), αντιμυκητιακή (Zitouni, Kaplancikli, Revial, Demirci, & Iscan, 2009) και αναλγητική (Kaplancikli, Zitouni, Ozdemir, Can, & Chevallet, 2009).

Όταν ένα μόριο πυραζολίνης συμπλοκοποιηθεί με την χρήση ενός μετάλλου που χρησιμοποιείται ιατρικά, π.χ. χαλκός, τότε, τα υβρίδια που προκύπτουν φέρουν μεγαλύτερη διαπερατότητα(permeability) σε σχέση και με την αδέσμευτη πυραζολίνη, αλλά και με το αδέσμευτο μέταλλο. Αυτό συμβαίνει, διότι, η χηλίωση αυτή διευκολύνει το σύμπλοκο να εισέλθει εντός του κυττάρου-στόχου και να ασκηθούν οι φαρμακευτικές επιδράσεις τόσο της πυραζολίνης όσο και του μετάλλου (Announced, 2023). Σε αυτό το φαινόμενο αναφέρονται οι θεωρίες του Overton και του Tweedy, οι οποίες περιγράφονται συνοπτικά στο κεφάλαιο «2.3 Έννοιες-Ορισμοί». Αξίζει να αναφέρουμε ότι και τα μέταλλα και οι πυραζολίνες (όντας αζωτούχες ετεροκυκλικές ενώσεις) ασκούν αντιμικροβιακή κυρίως, αλλά και αντικαρκινική, δράση, ανεξάρτητα η μία από την άλλη. Αυτό φαίνεται να οφείλεται στην βαριά οξειδωτική δράση που ασκεί το άζωτο(ως ηλεκτραρνητικό στοιχείο) και στην ιδιότητα των μετάλλων να δεσμεύονται στο DNA των κυττάρων-στόχων, με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η αντιγραφή του. (Singh, Kumar, Prasad, & Bhardwaj, 2018) (Lemire, Harrison, & Turner, 2013).

Έχοντας υπόψιν μας όλες αυτές τις θεραπευτικές δυνατότητες που μας προσφέρουν μεμονομένα, τόσο τα μέταλλα, όσο και τα μόρια πυραζολίνης, κρίνεται σκόπιμη η συλλογή και η ταξινόμηση των υβριδίων που σχηματίζουν μεταξύ τους, ταξινομημένα με βάση την βιολογική τους δράση, με απώτερο σκοπό την δημιουργία μιας «εργασίας-βιβλιοθήκης» για αυτά τα πολλά υποσχόμενα μόρια, η οποία θα επιτρέπει την εύκολη και γρήγορη αναζήτηση τους από ερευνητές που θα θελήσουν να τα μελετήσουν και εκείνοι.

Όσον αφορά στην δομή της εργασίας: η περιγραφή των ενώσεων γίνεται ανά μέταλλο (ένα κεφάλαιο για τα συμπλέγματα πυραζολίνης-χαλκού, ένα άλλο για τα συμπλέγματα πυραζολίνης χρυσού κ.ο.κ), και σημαντικότερα, συγκρίνονται με ήδη υπάρχουσες φαρμακευτικές ενώσεις (π.χ., σισπλατίνη ως αντικαρκινικό φάρμακο,

καναμυκίνη ως αντιβιοτική ένωση, κλπ.) αλλά και νεοσυντιθέμενες, π.χ., μια οργανική πυραζολινική ένωση, χωρίς την παρουσία μετάλλου. Όπως αναφέρεται και στο κυρίως κείμενο, σε κάποια άρθρα έχουν συγκριθεί οι βιολογικές δράσεις μεταξύ δύο ή και περισσότερων μεταλλικών συμπλόκων πυραζολίνης. Για λόγους απλούστευσης, τέτοιου είδους άρθρα ταξινομήθηκαν βάσει του πιο αποτελεσματικού μεταλλικού συμπλόκου, π.χ., εάν μεταξύ των συμπλόκων χαλκού, αργύρου και παλλαδίου πιο αποτελεσματικό ήταν το τελευταίο, τότε το συγκεκριμένο άρθρο θα βρίσκεται στο κεφάλαιο με τα σύμπλοκα παλλαδίου, χωρίς να αναφέρονται οι ευρεθείσες τιμές των υπόλοιπων μεταλλικών συμπλόκων.

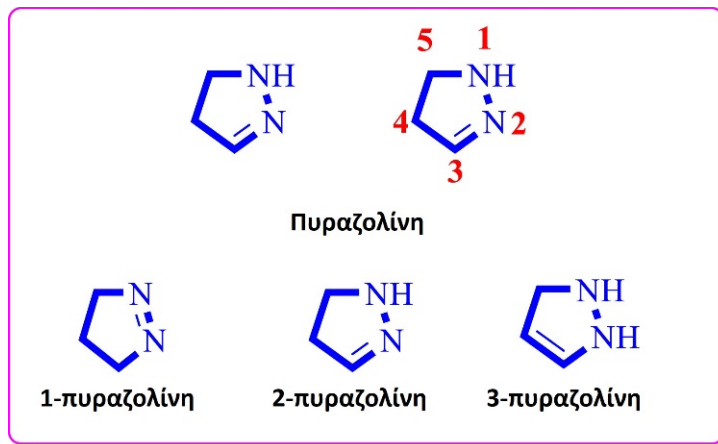
Παρότι ανασκοπήσεις με παρόμοια προσέγγιση υπάρχουν για άλλες ενώσεις, ακόμα και για τα πυραζόλια, πρόδρομες ενώσεις των πυραζολινών (**Keter & Darkwa, 2011**), (**Mukherjee, 2000**), η παρούσα ανασκόπηση αποτελεί την πρώτη διεθνώς απόπειρα που αφορά τις τελευταίες. Πρέπει να αναφερθεί επίσης, ότι δεν περιέχει όλη την βιβλιογραφία που υπάρχει έως τώρα, αλλά ένα πολύ μεγάλο μέρος αυτής, καθώς σκοπεύει στην ενημέρωση των επιστημονικής κοινότητας επί του θέματος και στην παρακίνηση της να ασχοληθεί πιο διεξοδικά με τις ιδιότητες των αναφερόμενων μορίων.

1.Εισαγωγή

1.1 Πυραζολίνη, ένα πολυδιάστατο μόριο

Οι ετεροκυκλικές ενώσεις είναι ζωτικής σημασίας για την ιατρική χημεία, επειδή διαθέτουν ευρύ φάσμα βιολογικών δραστηριοτήτων. Οι ετεροκυκλικές ενώσεις που περιέχουν άζωτο, συγκεκριμένα, προκαλούσαν πάντα το ενδιαφέρον των επιστημόνων λόγω του εκτεταμένου φάσματος βιολογικών λειτουργιών που μπορούν να επιτελέσουν. Η πυραζολίνη είναι ένα τέτοιο ετεροκυκλικό μόριο που περιέχει άζωτο με πέντε μέλη δακτυλίου. Ονομάζεται επίσης και διυδροπυραζόλη και είναι ένα παράγωγο πυραζόλης. Ένας Γερμανός επιστήμονας με το όνομα Ludwig Knorr επινόησε τον όρο αυτόν το έτος 1883 (Knorr 1883). Η μέθοδος παρασκευής πυραζόλης από ακετυλένιο και διαζομεθάνιο χρησιμοποιείται από το 1898, όταν αναπτύχθηκε από τον Γερμανό χημικό Hans von Pechmann. Οι Fischer και Knoevenagel, τον 19ο αιώνα, ανέπτυξαν μια απλή τεχνική για τη σύνθεση και τον χαρακτηρισμό των 2-πυραζολινών με την αντίδραση ακόρεστων αλδευδών και κετονών με φαινυλϋδραζίνη σε οξικό οξύ μέσω παλινδρόμησης (Varghese, et al. 2017).

Χωρίς να είναι γνωστό το πότε, η επιστημονική κοινότητα αντιλήφθηκε το ευρύ φάσμα βιολογικών λειτουργιών της. Η πυραζολίνη έχει έναν ενδοκυκλικό διπλό δεσμό και δύο άτομα αζώτου που βρίσκονται το ένα γειτονικά στο άλλο. Υπάρχουν τρεις διαφορετικοί μοριακοί τύποι πυραζολίνης, οι οποίοι παρουσιάζονται στην Εικόνα 1.1: 1-πυραζολίνη, 2-πυραζολίνη και 3-πυραζολίνη. Από αυτούς, η 2-πυραζολίνη λαμβάνει τη μεγαλύτερη προσοχή από τους ερευνητές επειδή είναι η πιο σταθερή.

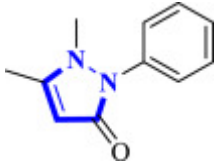
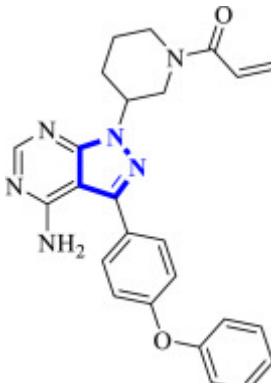
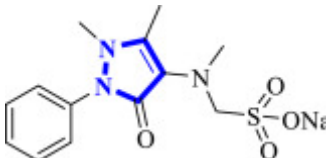
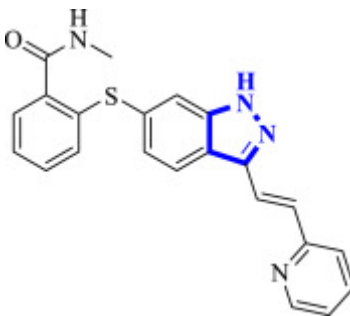
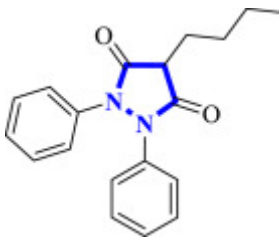
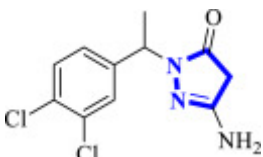


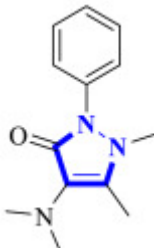
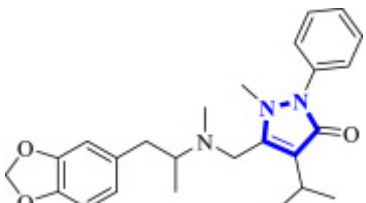
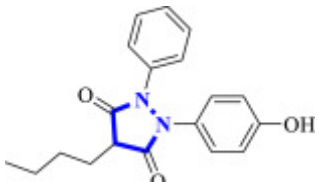
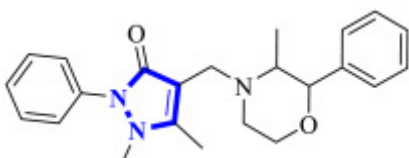
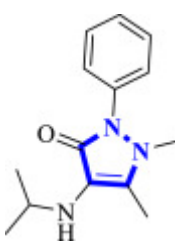
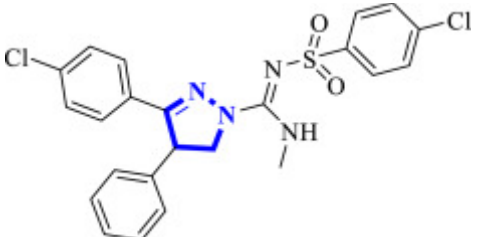
Σχήμα 1.1: Δομή των 1-, 2- και 3-πυραζολινών. (Haider, et al. 2022)

Διάφορα παράγωγα πυραζολινών έχουν αναφερθεί ότι έχουν εντυπωσιακές βιολογικές δράσεις, όπως αντιμικροβιακή (Shah, et al. 2014), αντιφλεγμονώδη (Neethu and Yusuf 2014), αναλγητική (Sridhar and RAJENDRAPRASAD 2011), αντικαταθλιπτική (Kaymakcioglu, et al. 2013), αντιφυματική (Karad, Purohit and Raval 2014), αντιαμοιβαδική (Wani, et al. 2012), αντισπασμωδική (Aboul-Enein, et al. 2012), αντιυπερτασική (Bagheri, et al. 2004), αντιδιαβητική (Emayavaramban, et al. 2013), αντικαρκινική (Bashir, et al. 2011), αντι-HIV (Farooq Rizvi, et al. 2011), αντιοξειδωτική (Kumar, et al. 2013), εκλεκτική βιολογική δράση σε υποδοχείς (Mishra and Sasmal 2013) (Tanwar, et al. 2012) (Lange, et al. 2010) και τέλος, αντι-ηπατοτοξική (Khalilullah, et al. 2011).

Πολλά φάρμακα που περιέχουν πυραζολίνες έχουν εγκριθεί για ιατρική χρήση. Η αντιπυρίνη, για παράδειγμα, είναι ένα αντιφλεγμονώδες φάρμακο με βάση τη πυραζολίνη (Nehra, et al. 2020). Ταυτόχρονα, οι πυραζολίνες παρουσιάζουν χαμηλή τοξικότητα έναντι υγιών κυτταρικών σειρών, καθιστώντας αυτές ιδανικές εναλλακτικές λύσεις σε φάρμακα που παρουσιάζουν αυξημένη τοξικότητα, όπως η σισπλατίνη (αντικαρκινικό φάρμακο) (Chem, et al. 2018), (Ozgun, et al. 2019).

Πολλά κοινά φάρμακα, όπως η φαμπροφαίνη, η διπυρόνη, η μοραζόνη, η αμινοπυρίνη, η ραμιφенаζόνη, η φαινυλοβουταζόνη και η σελεκοξίμπη, έχουν αναλγητικές, αντιπυρετικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Τα θεραπευτικά φάρμακα που περιέχουν πυραζολίνες με εγκεκριμένη κλινική χρήση παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.2 μαζί με τις δομές τους.

A/A.	Φάρμακο	Δομή	Κλινική χρήση
1.	Φαιναζόνη (αντιπυρίνη)		Η φαιναζόνη είναι μη στεροειδές αντιφλεγμονώδες φάρμακο, που χρησιμοποιείται ως αναλγητικό και αντιπυρετικό.
2.	Ιμπρουτινίμπη (Imbruvica)		Το Ιμπρουτινίμπη είναι αναστολέας της κινάσης της τυροσίνης. Χρησιμοποιείται για τη Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία και για το Λέμφωμα του μανδύα.
3.	Μεθαμπυρόνη (Analgin)		Η μεθαμπυρόνη είναι ΜΣΑΦ(Μη-Στεροειδές-Αναλγητικό-Φάρμακο), που χρησιμοποιείται ως παυσίπονο για εμπύρετες καταστάσεις.
4.	Αξιτινίμπη (Inlyta)		Η Αξιτινίμπη είναι αναστολέας της κινάσης της τυροσίνης, που χρησιμοποιείται ως αντικαρκινικό φάρμακο για τη σοβαρή απλαστική αναιμία και την ανθεκτική απλαστική αναιμία.
5.	Φαινυλβουτανόζη (Azolid)		Η φαινυλβουταζόνη είναι στεροειδές φάρμακο που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της αγκυλοποιητικής σπονδυλίτιδας και της ρευματοειδούς αρθρίτιδας.
6.	Μουζολμίνη		Η Μουζολμίνη χρησιμοποιείται ως διουρητικό.

A/A.	Φάρμακο	Δομή	Κλινική χρήση
7.	Αμινοπυρίνη (Pyramidon)		Η αμινοπυρίνη χρησιμοποιείται ως αναλγητικό, αντιφλεγμονώδες και αντιπυρετικό.
8.	Φαμπροφαζόνη		Η Φαμπροφαζόνη είναι μη στεροειδές αντιφλεγμονώδες φάρμακο που χρησιμοποιείται κατά του πυρετού.
9.	Οξυφαινβουταζόνη (Oxybutazone)		Η Οξυφαινβουταζόνη είναι αντιφλεγμονώδες φάρμακο.
10.	Μοραζόνη (Orsimon)		Η μοραζόνη είναι μη στεροειδές αντιφλεγμονώδες φάρμακο που χρησιμοποιείται ως αναλγητικό.
11.	Ramifenazone		Η ραμιφεναζόνη χρησιμοποιείται ως αναλγητικό και αντιπυρετικό.
13.	Ιμπιπιναμπάντη		Η Ιμπιπιναμπάντη χρησιμοποιείται ως ανταγωνιστής κανναβινοειδών για τη θεραπεία καρδιομεταβολικών διαταραχών που σχετίζονται με την παχυσαρκία και την κατάχρηση ουσιών.

Πίνακας 1.2: δομές φαρμάκων βασισμένα στην πυραζολίνη και οι κλινικές τους εφαρμογές (Haider, et al. 2022)

1.2 Τα μέταλλα στην Ιατρική

Για τη διατήρηση της καλής υγείας και τη λειτουργία των βιοχημικών διεργασιών του, το ανθρώπινο σώμα εξαρτάται από σημαντικά μεταλλικά στοιχεία. Μεταξύ αυτών συγκαταλέγονται μεταλλικά στοιχεία όπως ο σίδηρος, ο ψευδάργυρος, ο χαλκός, το μαγγάνιο, το μολυβδαίνιο και το σελήνιο (Maret 2016). Αν και χρειάζονται μόνο σε ελάχιστες ποσότητες, τα σημαντικά αυτά μέταλλα είναι απαραίτητα για μια μεγάλη ποικιλία μεταβολικών αντιδράσεων και κυτταρικών διεργασιών (Maret, 2016). Για παράδειγμα, το ένζυμο ριβονουκλεοτιδική αναγωγάση, το οποίο είναι απαραίτητο για το στάδιο που περιορίζει τον ρυθμό παραγωγής του DNA, δεν μπορεί να επιτελέσει τη δουλειά του χωρίς σίδηρο. Επιπλέον, ο ψευδάργυρος αποτελεί μέρος περισσότερων από 300 ενζύμων που είναι απαραίτητα για τη σωστή γονιδιακή μετάφραση (π.χ. μεταγραφικοί παράγοντες με δακτύλιο ψευδαργύρου). Τα μέταλλα είναι απαραίτητα για πολλές κυτταρικές διεργασίες πέραν της συμμετοχής τους στη δραστηριότητα των ενζύμων, συμπεριλαμβανομένης της μεταφοράς οξυγόνου στο αίμα, η οποία διεκπεραιώνεται από την αιμοσφαιρίνη, μια πρωτεΐνη που περιέχει σίδηρο (Hsia 1998).

Οι κύριες δομές της φαρμακευτικής βιομηχανίας και οι περισσότερες ουσίες που δημιουργούνται από τους ιατρικούς ερευνητές σε όλο τον κόσμο μοιράζονται ένα παρόμοιο χαρακτηριστικό: είναι όλα οργανικά μόρια. Αυτό μπορεί να είναι λογικό με μιά πρώτη ματιά, δεδομένου ότι τα μέταλλα και οι ενώσεις τους συνδέονται συνήθως με την τοξικότητα και χρησιμοποιούνται κυρίως ως υλικά ή καταλύτες. Η πρώτη επιτυχημένη θεραπεία για τη σύφιλη (Salvarsan), ο υδράργυρος στο δερματικό αντιμικροβιακό μερκουρόχρωμα ή η θειομερσάλη για την εμβολιαστική προστασία και ο χρυσός στη θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας αποτελούν παραδείγματα του σημαντικού ρόλου που έχουν διαδραματίσει στην ιατρική οι ενώσεις συντονισμού με βάση τα μέταλλα. (Lloyd, et al. 2005), (G. Gasser *Chimia*(Aarau)).

Με την εισαγωγή του χημειοθεραπευτικού φαρμάκου Cisplatin (1978) με βάση τον λευκόχρυσο, το οποίο χρησιμοποιείται ακόμη και σήμερα στο μεγαλύτερο μέρος όλων των θεραπειών για τον καρκίνο, οι μεταλλικές ενώσεις αποτέλεσαν ακρογωνιαίο λίθο της ιατρικής χημείας (Johnstone, Suntharalingam and Lippard 2016). Τις τελευταίες δύο δεκαετίες, ορισμένες ενώσεις μετάλλων έχουν προχωρήσει

σε κλινικές μελέτες σε ανθρώπους ως πιθανές θεραπείες για τον καρκίνο, την ελονοσία και τις νευρολογικές διαταραχές. Τα σύμπλοκα αυτά είναι δομημένα με βάση το τιτάνιο, το σίδηρο, το ρουθίνιο, το γάλλιο, το παλλάδιο, τον άργυρο, το χρυσό, το βισμούθιο και το χαλκό. (Biot, et al. 2011) (Monro, et al. 2019) (Reece 2019) (Zeng, et al. 2017) (Korfel and Agnieszka 1998) Ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων έδωσε το πράσινο φως σε ένα φάρμακο φωτοδυναμικής θεραπείας με βάση το παλλάδιο για τη θεραπεία του καρκίνου του προστάτη το 2019. Πολλές άλλες ουσίες βρίσκονται επί του παρόντος υπό εξέταση για πιθανές φαρμακευτικές χρήσεις. (Imberti and Sadler 2020).

1 H 1.0079																	2 He 4.0026
3 Li 6.941	4 Be 9.0122											5 B 10.81	6 C 12.011	7 N 14.007	8 O 15.999	9 F 18.998	10 Ne 20.179
11 Na 22.99	12 Mg 24.305											13 Al 26.982	14 Si 28.086	15 P 30.974	16 S 32.06	17 Cl 35.453	18 Ar 39.948
19 K 39.098	20 Ca 40.08	21 Sc 44.956	22 Ti 47.9	23 V 50.941	24 Cr 51.996	25 Mn 54.938	26 Fe 55.847	27 Co 58.933	28 Ni 58.71	29 Cu 63.546	30 Zn 65.38	31 Ga 69.72	32 Ge 72.59	33 As 74.922	34 Se 78.96	35 Br 79.904	36 Kr 83.8
37 Rb 85.468	38 Sr 87.62	39 Y 88.906	40 Zr 91.22	41 Nb 92.906	42 Mo 95.94	43 Tc (98)	44 Ru 101.07	45 Rh 102.91	46 Pd 106.4	47 Ag 107.87	48 Cd 112.41	49 In 114.82	50 Sn 118.69	51 Sb 121.75	52 Te 127.6	53 I 126.9	54 Xe 131.3
55 Cs 132.91	56 Ba 137.33	*La 138.91	57 Hf 178.49	72 Ta 180.95	73 W 183.85	74 Re 186.21	75 Os 190.2	76 Ir 192.22	77 Pt 195.09	78 Au 196.97	79 Hg 200.59	80 Tl 204.37	81 Pb 207.2	82 Bi 208.98	83 Po (209)	84 At (210)	85 Rn (222)
87 Fr (223)	88 Ra (226)	†Ac (227)	104 Rf (267)	105 Db (268)	106 Sg (271)	107 Bh (272)	108 Hs (270)	109 Mt (276)	110 Ds (281)	111 Rg (280)	112 Cn (285)	113 Nh (284)	114 Fl (289)	115 Mc (288)	116 Lv (293)	117 Ts (294)	118 Og (294)
Λανθανίδες		58 Ce 140.12	59 Pr 140.91	60 Nd 144.24	61 Pm (145)	62 Sm 150.4	63 Eu 151.96	64 Gd 157.25	65 Tb 158.93	66 Dy 162.5	67 Ho 164.93	68 Er 167.26	69 Tm 168.93	70 Yb 173.04	71 Lu 174.97		
Ακτινίδες		90 Th 232.04	91 Pa 231.04	92 U 238.03	93 Np (237)	94 Pu (244)	95 Am (243)	96 Cm (247)	97 Bk (247)	98 Cf (251)	99 Es (252)	100 Fm (257)	101 Md (258)	102 No (259)	103 Lr (262)		

Εικόνα 1.3: Περιοδικός πίνακας που επισημαίνει τα στοιχεία που ταξινομούνται ως μέταλλα (λευκό) και το υποσύνολο αυτών των στοιχείων που περιέχονται σε ενώσεις που έχουν υποβληθεί στο CO-ADD (Community for Open Antimicrobial Drug Discovery) μέχρι σήμερα (πορτοκαλί). (Frei, Zuegg, et al. 2020)

Επιπλέον, οι μεταλλικές ενώσεις μπορούν να χρησιμοποιούν ποικίλους μηχανισμούς δράσης, συμπεριλαμβανομένης της ανταλλαγής ή απελευθέρωσης προσδετών, της παραγωγής δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS), της οξειδοαναγωγικής ενεργοποίησης και της ενζυμικής παραγωγής τοξικών ειδών ή της απώλειας σημαντικών υποστρωμάτων. Η αναπαραγωγή τέτοιων διεργασιών με αποκλειστικά οργανικές ουσίες είναι, στην καλύτερη περίπτωση, πρόκληση. (Gasser and Metzler-Nolte, *The potential of organometallic complexes in medicinal chemistry* 2012) (Gianferrara, Bratsos and Alessio 2009).

Μια πολύ πρόσφατη έρευνα με επικεφαλής τον Angelo Frei (Frei, Elliott, et al. 2022) αναδεικνύει την τεράστια αντιμικροβιακή δυναμική των μορίων που περιέχουν μέταλλα. Οι ερευνητές απέδειξαν ότι τα συμπλέγματα μετάλλων είναι αποτελεσματικά αντιμυκητιασικά φάρμακα, ξεπερνώντας ένα μεγάλο σύνολο οργανικών ενώσεων όσον αφορά τα ποσοστά επιτυχίας. Παρά το γεγονός ότι έχουν κάπως υψηλότερα ποσοστά τοξικότητας, οι μεταλλικές ενώσεις εξακολουθούν να έχουν 14 φορές περισσότερες πιθανότητες να είναι δραστικότερες έναντι του *Candida albicans* ή του *Cryptococcus neoformans*. Απεδείχθη, επίσης, ότι η δράση αυτή συχνά διατηρείται όταν εφαρμόζεται σε διαφορετικά είδη και στελέχη μυκήτων, συμπεριλαμβανομένων απομονωμένων στελεχών που είναι ανθεκτικά στα φάρμακα. Τέλος, οι ερευνητές έδειξαν ότι η *Galleria Mellonella* (προνούμφη σκόρου που χρησιμοποιείται ως υποκατάστατο των μικρών θηλαστικών σε έρευνες) ανέχεται καλά τα περισσότερα από αυτά τα συμπλέγματα μετάλλων, χωρίς να εμφανίζει ενδείξεις τοξικότητας, και ανακάλυψαν μία ουσία, την Pt1, η οποία μειώνει σημαντικά το φορτίο της *C. albicans* στην *Galleria Mellonella*.

Τις δύο τελευταίες δεκαετίες, κάποιοι επιστήμονες επιχειρήσαν να συνδυάσουν τις πυραζολίνες και τα μέταλλα, με σκοπό να δημιουργήσουν υβριδικά μόρια, έχοντας στο μυαλό τους ότι ίσως να περιλαμβάνουν τις θεραπευτικές ιδιότητες τόσο της πυραζολίνης, όσο και του εκάστοτε μετάλλου. Παρότι η έρευνα είναι ακόμα στα πρώτα της βήματα, υπό την έννοια ότι οι μελέτες επί του θέματος είναι ακόμη ολιγάριθμες και περιορισμένες, κυρίως, σε συγκεκριμένα μέταλλα, όπως π.χ., τον χαλκό και τον σίδηρο, τα αποτελέσματά τους είναι ενθαρρυντικά και σε ορισμένες περιπτώσεις, εντυπωσιακά. Παρακάτω αναφέρονται οι ερευνητικές προσπάθειες κάποιων επιστημόνων με σκοπό να μελετήσουν τις βιολογικές δράσεις

των μεταλλικών συμπλόκων πυραζολίνης που δημιούργησαν. Κάποια άρθρα από την συνολική βιβλιογραφία που υπάρχει, δεν έχουν αναφερθεί, διότι είναι δημοσιευμένα σε περιοδικά με εξαιρετικά χαμηλό Δείκτη Απήχησης, και ως εκ τούτου, η εγκυρότητα τους τέθηκε υπό αμφισβήτηση.

2. Μεταλλικά σύμπλοκα Πυραζολίνης

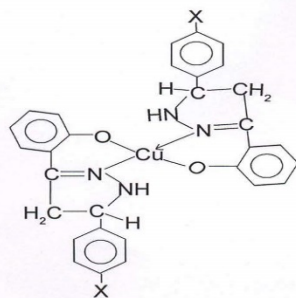
2.1 Μεταλλικά σύμπλοκα πυραζολίνης με Cu

Ο χαλκός είναι κρίσιμης σημασίας για τη ζωή, διότι απαιτείται για το μεταβολισμό των φυτικών και ζωικών κυττάρων. Με την πάροδο των ετών, ο χαλκός έχει αναγνωριστεί ως μέταλλο με αντιμικροβιακές ιδιότητες. Πρόσφατες εργαστηριακές δοκιμές και κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι οι επιφάνειες από μεταλλικό χαλκό ή κράματα αυτού, που περιέχουν τουλάχιστον 70% χαλκό, είναι ικανές να εξαλείψουν μια ποικιλία παθογόνων οργανισμών, όπως βακτήρια που συνδέονται με νοσοκομειακές λοιμώξεις, τον ιό της γρίπης, τον ιό HIV και μύκητες όπως η *Candida albicans*, μέσα σε λίγες ώρες. Χρησιμοποιώντας τα διαθέσιμα επιστημονικά δεδομένα, η Αμερικανική Υπηρεσία Προστασίας του Περιβάλλοντος (EPA) αναγνώρισε επίσημα τον χαλκό ως το πρώτο και μοναδικό μέταλλο που διαθέτει αντιμικροβιακές ιδιότητες τον Μάρτιο του 2008. (Prado, Vidal and Duran 2012) Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι μείγματα αλάτων χαλκού με κλιοκινόλη (CQ) ή διθειοκαρβαμικά (DTC) δεσμεύονται αυθόρμητα με τον κυτταρικό χαλκό ενός όγκου για να σχηματίσουν έναν αναστολέα του πρωτεοσώματος και έναν επαγωγέα της απόπτωσης. (C. Santini, M. Pellei, et al. 2013) Οι οργανομεταλλικές ενώσεις χαλκού, είναι χημειοθεραπευτικά φάρμακα για τον καρκίνο που χρησιμοποιούνται μόνα τους ή σε συνδυασμό με άλλα φάρμακα. Μια μικρή ομάδα συμπλόκων χαλκού ασκεί αποτελεσματική ανασταλτική δράση στις τοποϊσομεράσες, οι οποίες συμμετέχουν στη ρύθμιση της τοπολογίας του DNA. Τα σύμπλοκα χαλκού των αναστολέων της τοποϊσομεράσης δρουν με διάφορους μοριακούς μηχανισμούς που έχουν αντίκτυπο στα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και στους παράγοντες θανάτου του κυττάρου. Η επέκταση αυτής της οικογένειας εξαιρετικά δραστικών αντικαρκινικών φαρμάκων και η χρήση τους σε συνδυασμό με άλλες αναδυόμενες θεραπείες του καρκίνου ανοίγει νέους δρόμους για τη θεραπεία του. (Molinaro, et al. 2020)

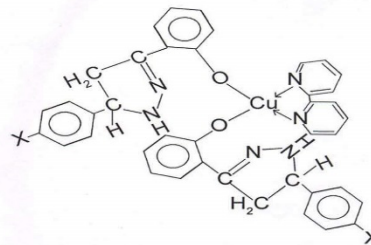
1. Μια ερευνητική ομάδα (Sharma et al. 2008) δημιούργησε έναν ορισμένο αριθμό συμπλόκων χαλκού 5(2'-υδροξυφαινυλ)-3-(4-x-φαινυλ) πυραζολίνης [x = -H, -Cl, -CH₃, -OCH₃] με σκοπό την σύνθεση, αλλά και την αντιμικροβιακή διερεύνηση αυτών των ενώσεων και των υβριδικών συμπλόκων τους με προσδέτες (στην

χημεία συντονισμού, Προσδέτης (*Ligand*) ονομάζεται ένα ιόν ή μόριο που συνδέεται με ένα κεντρικό άτομο μετάλλου για να σχηματίσει ένα σύμπλοκο συντονισμού. Ο ελληνικός και αγγλικός όρος χρησιμοποιούνται εναλλάξιμα σε αυτό το άρθρο.)

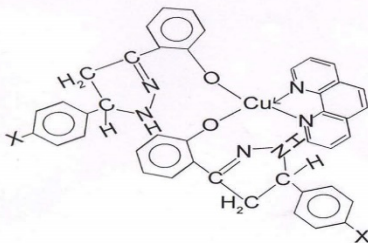
Μοριακή δομή των συμπλόκων



Cu-5(2'υδροξυφαινύλ)-3-(4-x-φαινύλ)πυραζολίνη

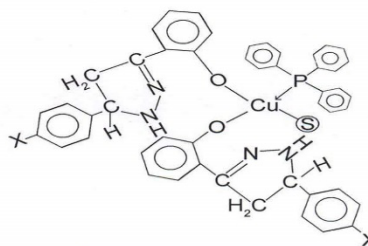


Υβρίδιο χαλκού-πυραζολίνης με 2,2'-διπυριδίνη



Υβρίδιο χαλκού-πυραζολίνης με 1,10-φαινανθρολίνη

X= -H, -Cl, -CH₃, -OCH₃
 ⊕= Solvent/Διαλύτης, Πυριδίνη



Υβρίδιο χαλκού-πυραζολίνης με τριφαινυλφωσφίνη

Πίνακας 2.1.1: Η μοριακή δομή των προσδετών και των συμπλόκων. (Κ. V. SHARMA 2008)

Οι 5(2'-υδροξυφαινύλ)-3-(4-x-φαινύλ)πυραζολινικές ενώσεις του χαλκού και τα προϊόντα πρόσμιξής τους, ελέγχθηκαν για αντιβακτηριακή δράση έναντι των

Escherichia coli, *Shigella flexneri*, *Pyogenes aeruginosa*, *Staphylococcus typhi*, *Bacillus subtilis* και *Staphylococcus aureus* και για αντιμυκητιασική δράση έναντι των *Trichophyton longifusus*, *Candida albicans*, *Aspergillus flavus*, *Miscrosporium canis*, *Fusarium solani* και *Candida glaberata*.

Τα 5(20 -υδροξυφαινύλ)-3-(4-χ-φαινυλ)πυραζολινικά σύμπλοκα του χαλκού εξετάστηκαν έναντι των *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Bacillus subtilis* και *Staphylococcus aureus*, καθώς και η αντιμυκητιακή δράση έναντι των *Candida albicans*, *Candida auris*, *Mucor circinelloides*, *Fusarium oxysporum* και *Candida glabrata*.

Η έννοια του Overtone και η θεωρία της χηλικοποίησης εξηγούν γιατί οι χαλκός 5(2'-υδροξυφαινυλ)-3(4-χ-φαινυλ)πυραζολίνες και τα σύμπλοκα τους με συνδέσμους είναι πιο δραστικά από τον ελεύθερο συνδέτη. Αναστέλλοντας την πρωτεϊνοσύνθεση και διαταράσσοντας την κυτταρική αναπνοή, τα σύμπλοκα περιορίζουν την ανάπτυξη του οργανισμού. Είναι προφανές από αυτή την έρευνα ότι οι διάφορες ενώσεις παράγουν ποικίλους βαθμούς κυτταρικής δραστηριότητας.

Αναλύθηκε, επιπλέον, η κυτταροτοξικότητα όλων των συντιθέμενων συμπλόκων, με βιοδοκιμή με γαρίδες άλμης, και τα αποτελέσματα δείχνουν ότι όλα τα σύμπλοκα έχουν εξαιρετικά τοξικές επιδράσεις στην *Artemia salina* ($LD_{50} = 7,022 \cdot 10^{-4}$ έως $9,724 \cdot 10^{-4}$), ενώ τα ίδια τα ligands ήταν σχεδόν ανενεργά.

Οι 5(2'-υδροξυφαινυλ)-3(4-χ-φαινυλ)πυραζολίνες χαλκού μελετήθηκαν επίσης για τις αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις τους και διαπιστώθηκε ότι διαφέρουν από τα συνήθη φαρμακευτικά σύμπλοκα. Οι 5(2'-υδροξυφαινυλ)-3(4-χ-φαινυλ)πυραζολίνες του Cu ήταν πιο αποτελεσματικές από το τυπικό φάρμακο, τη δικλοφενάκη, σε ισοδύναμες δόσεις, υποδηλώνοντας έναν βιοχημικό μηχανισμό που εξαρτάται από τον Cu για τη διατήρηση των ιστών.

Τα 5(2'-υδροξυφαινυλ)-3(4-χ-φαινυλ) πυραζολινικά σύμπλοκα του χαλκού εξετάστηκαν επίσης, ως προς τη δυνατότητά τους να μειώνουν τη φλεγμονή. Μεταξύ των συμπλόκων και του πρότυπου φαρμάκου παρατηρήθηκαν διαφορές. Τα σύμπλοκα του χαλκού ήταν πιο αποτελεσματικά από το κοινό φάρμακο σε ίσες δόσεις, υποδεικνύοντας την ύπαρξη μιας ειδικής μεταβολικής διαδικασίας που εξαρτάται από το Cu για τη συντήρηση των ιστών.

Παρακάτω, βλέπουμε τα αριθμητικά δεδομένα των δοκιμασιών της μελέτης:

Ενώσεις	Gram(+)			Gram(-)		
	<i>E.coli</i>	<i>S.flexenari</i>	<i>P.Aeruginosa</i>	<i>S.Typhi</i>	<i>S.Aureus</i>	<i>B.Subtilis</i>
La	00	00	00	00	08	09
Lb	00	00	00	00	07	08
Lc	00	00	00	00	07	07
Ld	00	00	00	00	06	07
Cu(La)2	15	10	17	18	20	20
Cu(Lb)2	16	11	16	19	22	21
Cu(Lc)2	17	12	17	17	23	18
Cu(Ld)2	19	09	12	18	21	22
Cu(La)2(bipy)	18	12	25	20	23	22
Cu(Lb)2(bipy)	17	15	23	22	22	21
Cu(Lc)2(bipy)	19	12	21	19	21	22
Cu(Ld)2(bipy)	21	11	16	20	23	23
Cu(La)2(phen)	19	13	24	21	24	22
Cu(Lb)2(phen)	17	12	20	23	23	21
Cu(Lc)2(phen)	18	16	23	20	20	22
Cu(Ld)2(phen)	21	12	17	21	22	23
Cu(La)2(PPh3)	17	10	25	19	23	21
Cu(Lb)2(PPh3)	18	12	21	20	20	20
Cu(Lc)2(PPh3)	19	13	22	18	23	21
Cu(Ld)2(PPh3)	21	10	14	21	21	22

Πίνακας 2.1.2: Η αντιβακτηριδιακή δράση των ελεύθερων πυραζολινών(La-Ld), 5(2'-υδροξυφαινύλ)-3-(4-χ-φαινύλ)πυραζολινικά σύμπλοκα με Χαλκό(Cu(La)2-Cu(Ld)2, και οι τα προϊόντα πρόσμιξης τους με δευτερεύοντες υποκαταστάτες (Cu(La)2(bipy)-Cu(Ld)2(PPh3).Οι τιμές αναφέρονται στη διάμετρο της ζώνης αναστολής που δημιούργησε κάθε ένωση ,μετρημένη σε mm, με ποσότητα για την κάθε ένωση, ίση με 1mg/mL. (Κ. V. SHARMA 2008)

Ενώσεις	Μικροοργανισμοί					
	<i>T. longifusus</i>	<i>C.albicans</i>	<i>A.flavus</i>	<i>M.canis</i>	<i>F.soloni</i>	<i>C.glaberata</i>
La	00	00	10	00	00	00
Lb	00	00	10	00	00	00
Lc	00	00	07	00	00	00
Ld	00	00	07	00	00	00
Cu(La)2	15	09	23	01	00	05

Cu(Lb)2	08	11	24	02	00	00
Cu(Lc)2	17	12	21	01	00	00
Cu(Ld)2	13	06	22	04	00	00
Cu(La)2(bipy)	18	10	24	03	00	00
Cu(Lb)2(bipy)	10	12	25	04	00	07
Cu(Lc)2(bipy)	20	13	22	05	00	00
Cu(Ld)2(bipy)	16	08	23	01	00	00
Cu(La)2(phen)	18	12	25	02	00	00
Cu(Lb)2(phen)	10	13	24	02	00	00
Cu(Lc)2(phen)	19	15	21	03	00	05
Cu(Ld)2(phen)	18	08	24	01	00	00
Cu(La)2(PPh3)	18	11	24	04	00	00
Cu(Lb)2(PPh3)	11	12	25	01	00	00
Cu(Lc)2(PPh3)	17	13	21	02	00	00
Cu(Ld)2(PPh3)	15	09	23	01	00	00
Φάρμακο εκλογής	A	B	C	D	E	F

Πίνακας 2.1.3: : Η αντιμυκητιασική δράση των ελεύθερων πυραζολινών(La-Ld), 5(2'-υδροξυφαινύλ)-3-(4-χ-φαινύλ)πυραζολινικών συμπλόκων με Χαλκό(Cu(La)2-Cu(Ld)2, και τα προϊόντα πρόσμιξης τους με δευτερεύοντες υποκαταστάτες (Cu(La)2(bipy)-Cu(Ld)2(PPh3). Οι τιμές αναφέρονται στη διάμετρο της ζώνης αναστολής που δημιούργησε κάθε ένωση, μετρημένη σε mm, με ποσότητα για την κάθε ένωση ίση με 200 µg/ mL.

*A: ¼ Μικοναζόλη (70 mg mL⁻¹), B: ¼ Μικοναζόλη (110.8 mg mL⁻¹), C: ¼ Αμφοτερικίνη Β (20 mg mL⁻¹), D :¼ Μικοναζόλη (98.4 mg mL⁻¹), E :¼ Μικοναζόλη (73.24 mg mL⁻¹), F :¼ Μικοναζόλη (110.8 mg mL⁻¹) (K. V. SHARMA 2008).

Ενώσεις	Αριθμός ζώων που χρησιμοποιήθηκαν	Δόση(mg* kg ⁻¹) σωμα.βάρους	Αρχικός όγκος* 0.0 ώρες	Τελικός όγκος* Μετά 3 ώρες	Όγκος οιδήματος*	% Αναστολή
Control	8	100	0.575	1.105	0.530	-
Standard drug (Diclofenac)	8	100	0.540	0.905	0.365	31.13
Cu(La)2	8	100	0.819	0.931	0.112	78.87
Cu(Lb)2	8	100	0.821	0.950	0.129	75.56
Cu(Lc)2	8	100	0.811	0.921	0.110	79.25
Cu(Ld)2	8	100	0.826	0.950	0.124	76.60
Cu(La)2(bipy)	8	100	0.809	0.911	0.102	80.75
Cu(Lb)2(bipy)	8	100	0.817	0.935	0.118	77.74
Cu(Lc)2(bipy)	8	100	0.805	0.912	0.107	79.81

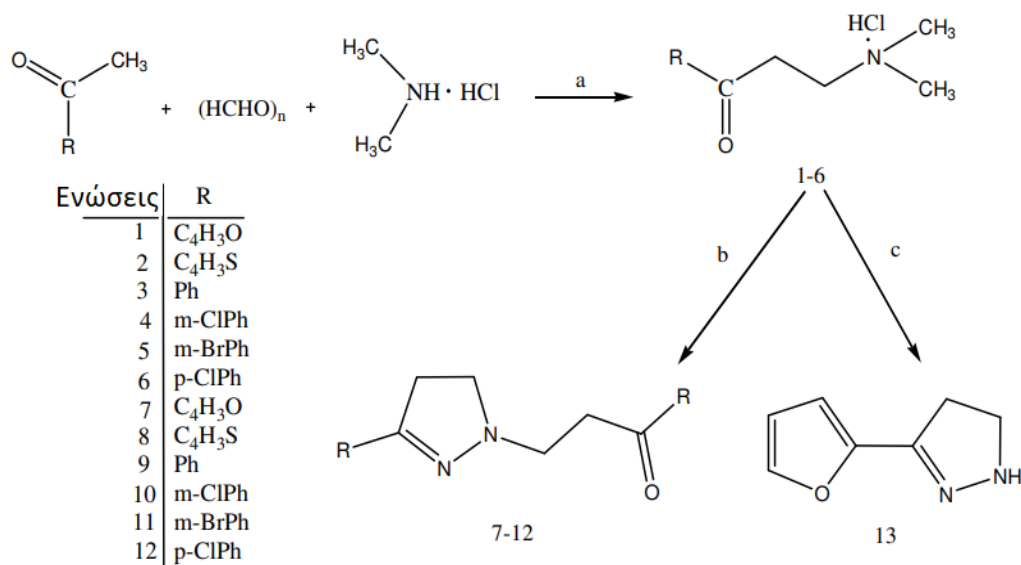
Cu(Ld)2(bipy)	8	100	0.815	0.938	0.123	76.79
Cu(La)2(phe n)	8	100	0.819	0.925	0.106	80.00
Cu(Lb)2(phe n)	8	100	0.826	0.935	0.109	79.43
Cu(Lc)2(phe n)	8	100	0.819	0.921	0.102	80.76
Cu(Ld)2(phe n)	8	100	0.831	0.950	0.119	77.55
Cu(La)2(PPh 3)	8	100	0.809	0.915	0.106	80.00
Cu(Lb)2(PPh 3)	8	100	0.815	0.938	0.123	76.79
Cu(Lc)2(PPh 3)	8	100	0.805	0.912	0.107	79.81
Cu(Ld)2(PPh 3)	8	100	0.817	0.935	0.118	77.74

Πίνακας 2.1.4: Η αντιφλεγμονώδης δράση των ελεύθερων πυραζολινών(La-Ld), 5(2'-υδροξυφαινύλ)-3-(4-χ-φαινύλ)πυραζολινικών συμπλόκων με χαλκό(Cu(La)2 -Cu(Ld)2, και τα προϊόντα πρόσμιξης τους με δευτερεύοντες υποκαταστάτες (Cu(La)2(bipy)- Cu(Ld)2(PPh3).

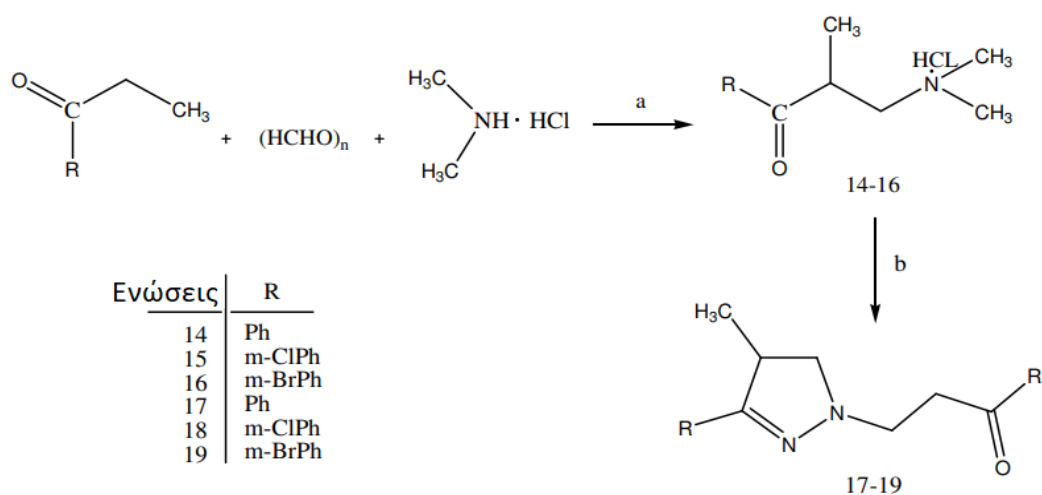
*Μέσος όρος 4 αναλύσεων. (K. V. SHARMA 2008)

2. Ο I. Irfan και οι συνεργάτες (M.Abid, et al. 2019) δημιούργησαν παράγωγα πυραζολίνης και διάφορα μεταλλικά σύμπλοκα της 3-(φουρύλ)-2-πυραζολίνης, τα οποία δοκιμάστηκαν για αντι-αμοιβαδική δράση έναντι του στελέχους *E. histolytica* HMI:IMSS.

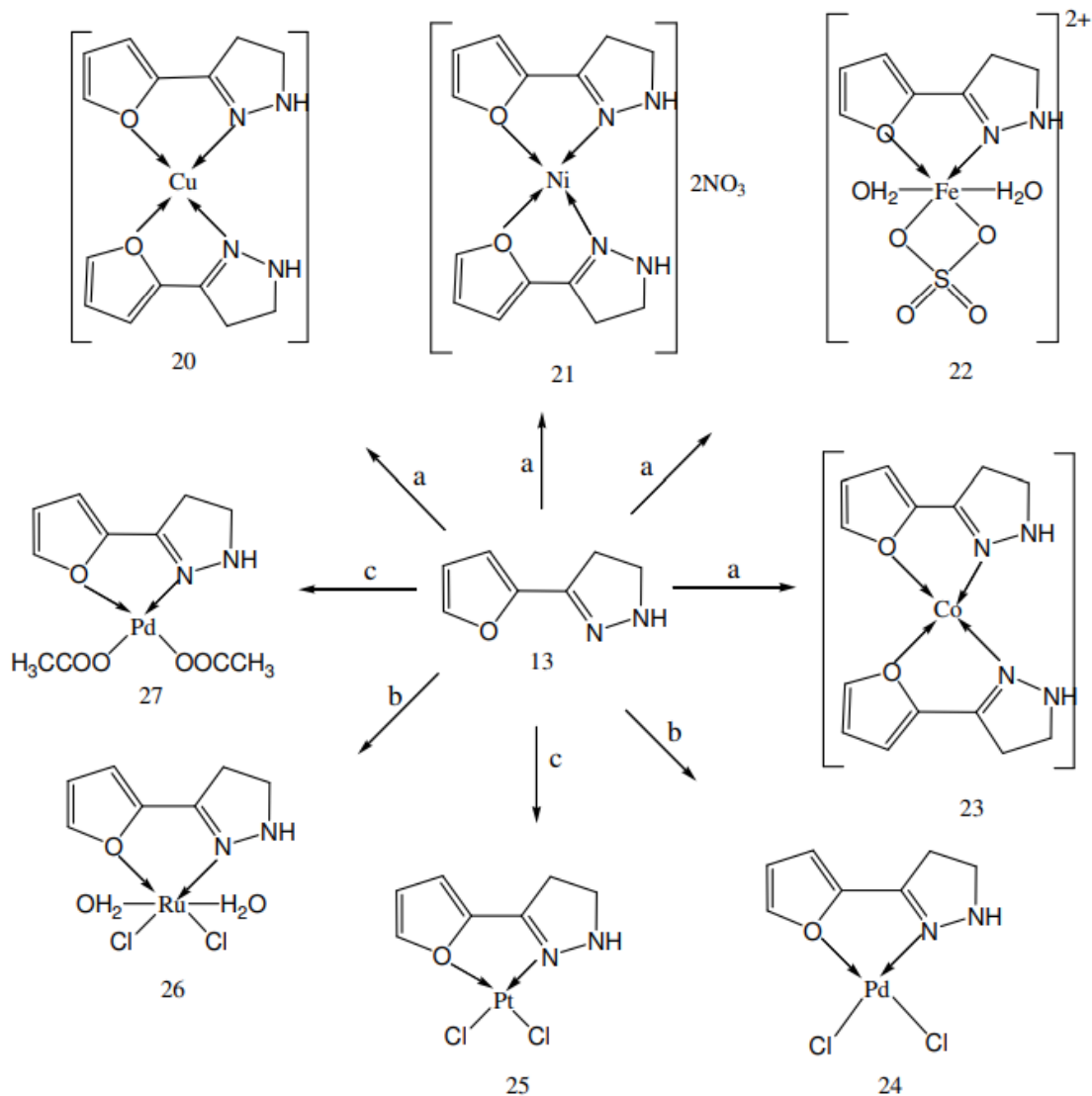
Εμείς θα αναφερθούμε μόνο στα σύμπλοκα του χαλκού, τα υπόλοιπα μεταλλικά σύμπλοκα θα αναφερθούν στην αντίστοιχη για αυτά ενότητα. Αυτή η προσέγγιση ακολουθείται για κάθε άρθρο το οποίο αναφέρεται σε σύμπλοκα που προέκυψαν από περισσότερα από ένα μέταλλα. Επίσης, στην έρευνα εξετάζονται και πρόδρομες ουσίες των πυραζολινών, κάποιες βάσεις Mannich. Και πάλι, καθώς το ενδιαφέρον της εργασίας βρίσκεται μόνον στις πυραζολίνες και στα μεταλλικά τους σύμπλοκα, δεν θα γίνει αναφορά σε αυτές, ούτε στο κείμενο, ούτε στις εικόνες/ πίνακες των αποτελεσμάτων. Όποιος/α αναγνώστης/στρια επιθυμεί να μελετήσει αυτές τις ενώσεις, μπορεί να ανατρέξει στην ίδια την αναφερθείσα εργασία.



Σχήμα 2.1.5: Η σύνθεση των παραγώγων πυραζολίνης (**7-12**) και **13**. (α) HCl, ακετόνη, παλινδρόμηση, 2 ώρες (β) Υδραζίνη, Υδρίνη, NaHCO_{3(aq)}, 45 λεπτά, (c) Υδρίνη, MeOH, 45 λεπτά. (M.Abid, et al. 2019)



Σχήμα 2.1.6: Η σύνθεση παραγώγων πυραζολίνης (**17-19**). (α) HCl, EtOH, παλινδρόμηση, 2 ώρες, (β)Υδραζίνη, Υδρίνη, aq NaHCO₃, 45 m. (M.Abid, et al. 2019)



Σχήμα 2.1.7: Σύνθεση μεταλλικών συμπλόκων πυραζολίνης (**20-27**) . (α) EtOH, παλινδρόμηση, 2h, (β) MeOH, παλινδρόμηση, 8h,, (γ) MeOH, παλινδρόμηση, 4 ώρες. (M.Abid, et al. 2019)

Η ένωση πυραζολίνης με 3-χλωρο (10, $IC_{50} = 1,5 \mu M$) κατέδειξε σαφώς καλή δράση. Όπως φαίνεται από τα δεδομένα, η τιμή IC_{50} για την πυραζολίνη (13) ήταν $1,92 \mu M$. Στις περισσότερες περιπτώσεις, τα ευρήματα από τα σύμπλοκα ήταν ανώτερα από εκείνα των προσδετών. Σε σύγκριση με τις άλλες χημικές ουσίες, το μεταλλικό σύμπλοκο χαλκού (20) παρουσίασε την υψηλότερη δραστικότητα ($IC_{50} = 0,09 \mu M$). Τα χαρακτηριστικά ADME (απορρόφηση, κατανομή, μεταβολισμός και αποβολή) μιας ένωσης καθορίζονται από το μεταβολικό της προφίλ. Εδώ, οι ερευνητές χαρακτήρισαν τα φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά των ενώσεων (1-19). Οι ενώσεις 7, 8, 11 και 13 προσδιορίστηκαν ως ιδιαίτερα τοξικές.

Ενώσεις	Αντιαιμοιβαδική δράση	
	IC ₅₀ (μM)	S.D.
7	1.06	0.03
8	3.77	0.03
9	4.01	0.02
10	1.05	0.03
11	0.18	0.01
12	0.14	0.02
13	1.92	0.02
17	2.13	0.01
18	2.24	0.04
19	5.21	0.02
Μετρονιδαζόλη	1.8	0.01

Πίνακας 2.1.8: *In vitro* αντιαιμοιβαδική δράση των πυραζολινικών προσδετών. (M.Abid, et al. 2019)

Μεταλλικό σύμπλοκο	Αντιαιμοιβαδική δράση	
	IC ₅₀ (μM)	S.D.
20	0.09	0.01
Μετρονιδαζόλη	1.8	0.01

Πίνακας 2.1.9: *In vitro* αντιαιμοιβαδική δράση του μεταλλικού συμπλόκου χαλκού(**20**). (M.Abid, et al. 2019)

Τέλος, η μελέτη πρόσδεσης (docking studies) που πραγματοποίησαν οι ερευνητές με σκοπό να ερμηνευτεί η αντιαιμοιβαδική δράση των ενώσεων αποκάλυψε ότι συνδέονται με την αναγωγάση της θειοριδοξίνης του *Entamoeba Histolytica* (EhTrR), μια πρωτοζωική πρωτεΐνη που έχει σημαντικό ρόλο την άμυνα του μικροοργανισμού.

3. Οι ερευνητές με επικεφαλής τον/την Sulekh Chandra και Amit Kumar Sharma (Chandra, et al. 2009) εξέτασαν τις αντιμυκητικές και αντιβακτηριακές δράσεις του 3,3'-θειοδιπρωπιονικού οξέος bis(4-άμινο-5-αιθυλίμινο-2,3-διμέθυλ-1-φαινύλ-3-πυραζολίνη) και των συμπλόκων του με μεταλλικά ιόντα Co, Ni και Cu. Οι αντιμυκητικές επιδράσεις των ενώσεων αξιολογήθηκαν έναντι των *Alternaria brassicae*, *Aspergillus niger* και *Fusarium oxysporum*, ενώ οι αντιβακτηριακές επιδράσεις τους αξιολογήθηκαν έναντι των *Xanthomonas compestris* και *Pseudomonas aeruginosa*. Σε σύγκριση με το μη δεσμευμένο ligand, οι ενώσεις βρέθηκαν να έχουν σημαντικά υψηλότερες λειτουργίες. Η θεωρία του Overton και η θεωρία της χηλικοποίησης μπορούν να εξηγήσουν το γεγονός ότι η συμπλοκοποίηση ενισχύει τη δραστηριότητα του ligand. Σύμφωνα με τη θεωρία, η χηλικοποίηση μειώνει την πολικότητα των ατόμων μετάλλου με το να επιτρέπει στο θετικό φορτίο του ατόμου να μοιράζεται εν μέρει με ομάδες-δότες και, ενδεχομένως, με το να επιτρέπει την αποεστίαση π-ηλεκτρονίων σε ολόκληρο τον δακτύλιο. Κατά συνέπεια, η ένωση γίνεται πιο λιπόφιλη, γεγονός που αυξάνει την πιθανότητα διέλευσής της από το λιπιδικό στρώμα της κυτταρικής μεμβράνης. Τα ένζυμα στα μικρόβια διαθέτουν θέσεις δέσμευσης μετάλλων και η ένωση αυτή εμποδίζει τη χρήση τους. Επειδή, μοιραία, παρεμβαίνει στην κυτταρική αναπνοή, σκοτώνει τα μικρόβια.

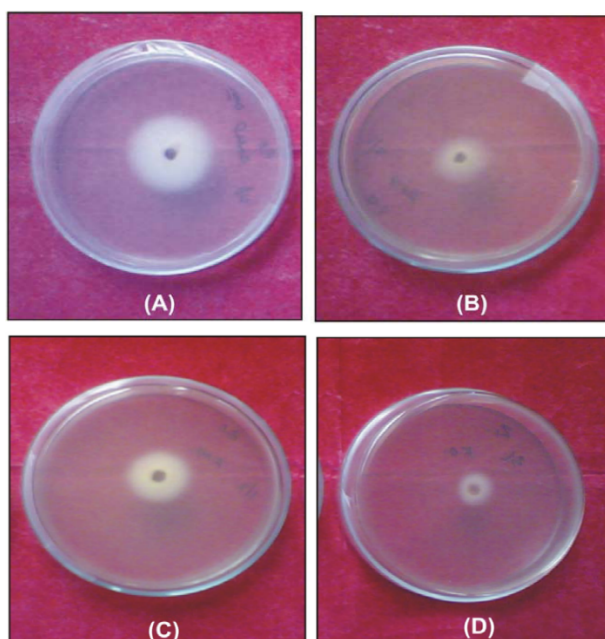
Ενώσεις	Μυκητιακή αναστολή (%) ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)								
	A. brassicae			A. niger			F. oxysporum		
	100	200	300	100	200	300	100	200	300
Ligand (L)	40	52	62	35	50	58	42	60	66
[Cu(L)NO ₃] ₂ NO ₃	60	72	80	64	75	84	60	74	90

[Cu(L)Cl]Cl	58	70	81	65	71	85	59	74	88
[Cu(L)OAc]OAc	60	71	80	65	70	82	60	72	90
[Cu(L)SO ₃]	60	72	80	65	74	85	60	72	88
Φάρμακο εκλογής (Captan)	70	80	100	75	90	100	65	75	100

Πίνακας 2.1.10: Η επί τοις εκατό αναστολή της ανάπτυξης των μυκήτων που προκαλεί κάθε ένωση, ανάλογα με την συγκέντρωση της, μετρημένη σε $\mu\text{g/ml}$. (Chandra, et al. 2009)

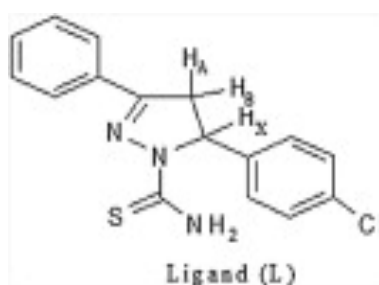
Ζώνη βακτηριακής αναστολής (mm) ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)						
Ενώσεις	Xanthomonas compestris			Pseudomonas aeruginosa		
	250	500	1000	250	500	1000
Ligand (L)	10	12	15	8	12	14
[Cu(L)NO ₃]NO ₃	16	21	26	18	22	28
[Cu(L)Cl]Cl	16	22	25	18	23	27
[Cu(L)OAc]OAc	17	22	26	17	21	27
[Cu(L)SO ₄]	17	22	25	18	22	26

Πίνακας 2.1.11: Η επί τοις εκατό αναστολή της ανάπτυξης των βακτηρίων που προκαλεί κάθε ένωση, ανάλογα με την συγκέντρωση της, μετρημένη σε $\mu\text{g/ml}$. (Chandra, et al. 2009)

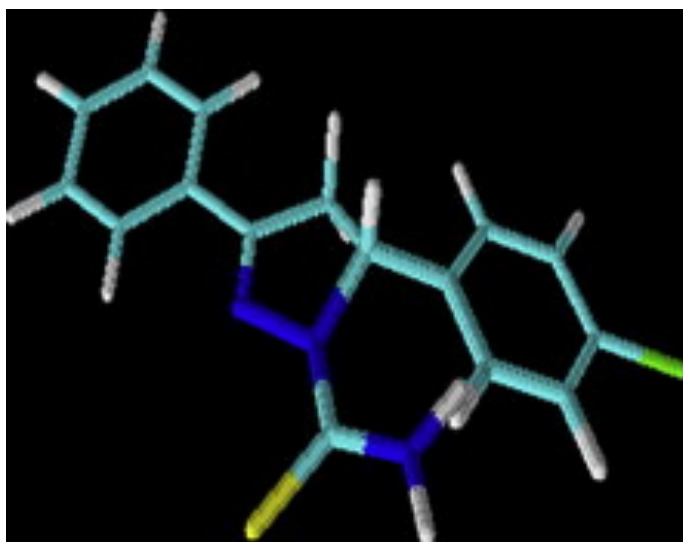


Εικόνα 2.1. του *Fusarium oxysporum* of: (A) ligand(προσδέτη), (B) $[\text{Ni}(\text{L})\text{NO}_3]\text{NO}_3$, (C) $[\text{Co}(\text{L})\text{Cl}]\text{Cl}$ and (D) $[\text{Cu}(\text{L})\text{NO}_3]\text{NO}_3$. (Chandra, et al. 2009)

4. Η ερευνητική ομάδα με πρώτο συγγραφέα τον/την Imran Ali (Ali, et al. 2012) ανέπτυξε ένα ligand με βάση την πυραζολίνη ($\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{SCL}$) και τις ενώσεις μεταλλικών ιόντων του με χαλκό $[\text{Cu}(\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{SCL})_2\text{Cl}_2]$ και νικέλιο. Οι ελάχιστες ανασταλτικές συγκεντρώσεις (MIC) και η ανασταλτική δράση σε στερεά μέσα με δοκιμή διάχυσης δίσκων αναλύθηκαν για να προσδιοριστεί η αποτελεσματικότητα του ligand και των συμπλόκων έναντι της *Candida*, της πιο κοινής μυκητιακής λοίμωξης του ανθρώπου. Τα συμβατικά αντιμυκητικά διφλουκάνη και τη αμφοτερικίνη Β, εξετάστηκαν επίσης για τις συνδυαστικές επιδράσεις τους με τις ενώσεις του προσδέτη και των μεταλλικών συμπλόκων έχοντας ως σκοπό τη εξόντωση της *Candida*.



Σχήμα 2.1.13: Η χημική δομή του Ligand. (Ali, et al. 2012)



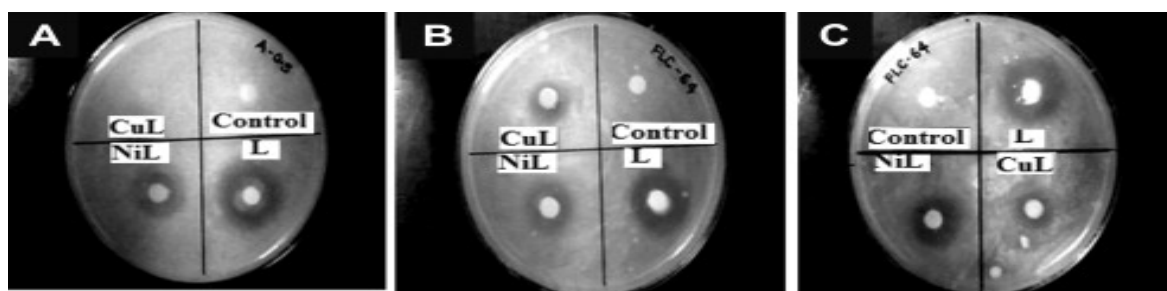
Εικόνα 2.1.14: 3D αναπαράσταση της δομής του προσδέτη (Ali, et al. 2012)



Σχήμα 2.1.15: χημική δομή του συμπλόκου πυραζολίνης-χαλκού. (Ali, et al. 2012)

Η μελέτη της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) αποκάλυψε ότι τόσο το ligand όσο και το σύμπλοκο χαλκού του ήταν δραστικά *in vitro* έναντι όλων των εξεταζόμενων στελεχών της *Candida*, με MIC που κυμαίνονταν από 100 έως 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Τόσο ο προσδέτης όσο και η ένωση του σε συνδυασμό με FLC εξετάστηκαν για τους δείκτες κλασματικής συγκέντρωσης αναστολής (FICI) έναντι στελεχών *Candida* ευαίσθητων και ανθεκτικών στην FLC. Τα ευρήματα της δοκιμής μικροτιτλοδότησης με σκακιέρα (chequerboard) για τα ευαίσθητα στην FLC και τα ανθεκτικά στην FLC στελέχη *Candida* έδειξαν σαφώς σημαντικές συνδυαστικές επιδράσεις μεταξύ του προσδέτη και της FLC. Σημαντικός συνεργισμός διαπιστώθηκε όταν οι τιμές FICI για το ligand+FLC και το σύμπλοκο χαλκού+FLC υπολογίστηκαν από

τη δοκιμή μικροτιτλοδότησης, οι οποίες κυμαίνονταν από 0,3 έως 0,4 και 0,5 έως 0,6, αντίστοιχα.



Εικόνα 2.1.16: Πίνακες που αντιπροσωπεύουν τις συνεργιστικές επιδράσεις των L, CuL και NiL έναντι της ευαίσθητης στην FLC *Candida albicans* (A) και των ανθεκτικών στην FLC *Candida krusei* (B) και *Candida glabrata* (Γ). Το A-0,5 υποδηλώνει 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (A). (Ali, et al. 2012)

Υπήρξε συνεργιστική δράση μεταξύ του ligand και της FLC και στα εννέα δοκιμασθέντα στελέχη *Candida*, ενώ συνεργιστική δράση μεταξύ του συμπλόκου χαλκού και της FLC εντοπίστηκε σε έξι από τις εννέα δοκιμασθείσες απομονώσεις και μηδενική δράση στις υπόλοιπες τρεις. Δεδομένου ότι οι ενώσεις Cu έχουν 16 δεσμούς και η FLC έχει μόνο 7, εύλογα οι ερευνητές υπέθεσαν ότι οι 8 δεσμοί του ligand(L) σχετίζονται με τα ισχυρά συνεργιστικά αποτελέσματά του με την FLC ή την AmB, μπλοκάροντας τις αντλίες εκροής MDR/CDR, αυξάνοντας έτσι την αποτελεσματικότητά τους. Έτσι, ενώ στην μεμονωμένη χρήση της κάθε ένωσης, το σύμπλοκο του χαλκού υπερτερούσε του ελεύθερου προσδέτη, όταν οι ενώσεις ελέγχθηκαν σε συνδυασμό με τα αντιμυκητικά φάρμακα, ο ελεύθερος προσδέτης επέδειξε μεγαλύτερη συνεργιστική δράση απ' ό,τι το σύμπλοκο χαλκού.

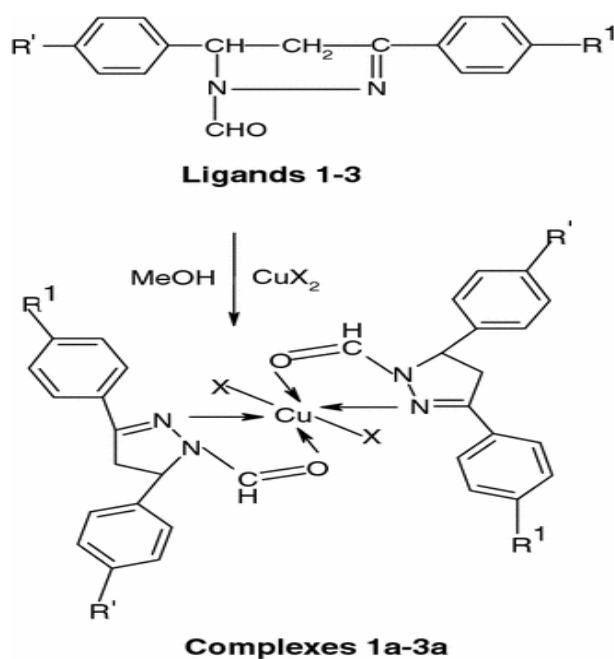
Στελέχη	MIC FLC	MIC ligand	MIC Cu complex	MIC _c ligand	MIC _c FLC	FICI-ligand + FLC	Ερμηνεία	MIC _c Cu complex	MIC _c FLC	FICI-Cu + FLC	Ερμηνεία	MIC FLC	Ερμηνεία
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	3	500	200	50	0.7	0.3	SYN	70	0.8	0.6	IND	0.8	SYN
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	5	500	100	50	1.2	0.3	SYN	25	1.2	0.5	SYN	1.3	SYN
<i>C. albicans</i> 177	5.5	500	100	40	1.3	0.3	SYN	25	1.4	0.5	SYN	1.4	SYN
<i>C. tropicalis</i> 105	5	500	100	40	1.2	0.3	SYN	25	1.2	0.5	SYN	1.3	SYN
<i>C. glabrata</i> 3249	4	500	200	50	1	0.4	SYN	70	1	0.6	IND	1	SYN
<i>C. albicans</i> 2367	6	1000	250	40	1.5	0.3	SYN	65	1.5	0.5	SYN	1.5	SYN
<i>C. krusei</i> 337	105	500	200	50	30	0.4	SYN	50	30	0.5	SYN	25	SYN
<i>C. glabrata</i> 3080	110	750	200	40	30	0.3	SYN	50	25	0.5	SYN	30	SYN
<i>C. parapsilosis</i> 2383	85	750	200	75	20	0.3	SYN	70	25	0.6	IND	30	IND

Πίνακας 2.1.16.: Λεπτομερείς ανασταλτικές δράσεις του ligand και του μεταλλικού συμπλόκου μόνα τους και σε συνδυασμό με φλουκοναζόλη (FLC). (Ali, et al. 2012)

MIC_c = MIC in combination, MICs μετρημένα σε µg/mL.

5. Η επιστημονική ομάδα με επικεφαλής τον/την Pramod Singh (Singh, Negi, et al. 2012) συνέθεσε και αξιολόγησε την αντι-αμοιβαδική δράση τεσσάρων νέων ενώσεων N1-φορμυλοπυραζολινών (**1a**, **1b**, **2a**, **3a**, τα Ligands 1-3 δεν αξιολογήθηκαν).

A



Σχήμα 2.1.17: Τα Ligands 1-3 και τα σύμπλοκα τους (complexes), (Ali, et al. 2012)

1a–3a, **1a**: $R' = R^1 = H$, $X = Cl$, **1b**: $R' = R^1 = H$, $X = NO_2$, **2a**: $R' = Cl$, $R^1 = H$, $X = Cl$, **3a**: $R' = H$, $R^1 = Cl$, $X = Cl$

Οι ερευνητές δοκίμασαν τις ενώσεις 1a-3a για την αντιαιμοιβαδική τους δράση σε DMSO έναντι του στελέχους HM1:IMSS της *Escherichia coli*. Οι υπό εξέταση ενώσεις αραιώθηκαν κατά σειρά δύο φορές σε πλάκες μικροτιτλοδότησης 96-πλακιδίων και υποβλήθηκαν σε επεξεργασία για 72 ώρες. Η μικροαραίωση χρησιμοποιήθηκε για την εύρεση της τιμής IC_{50} των ουσιών.

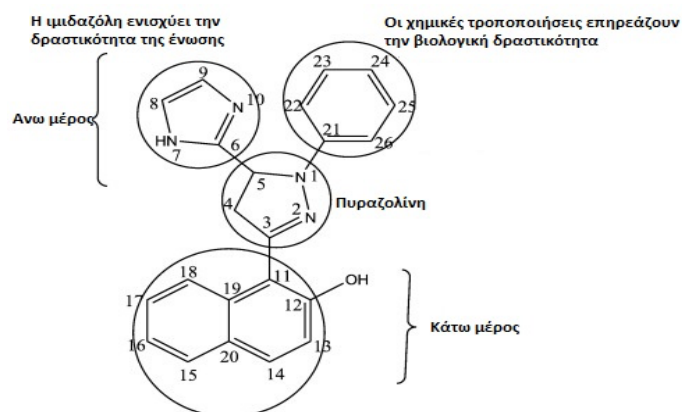
A/A	Ενώσεις	$IC_{50}/\mu M$
1	1a	0.501 ± 0.10
2	1b	0.508 ± 0.08
3	2a	0.390 ± 0.08
4	3a	0.422 ± 0.04
5	MNZ	0.226 ± 0.06

Πίνακας 2.1.18: Αντιαμοιβαδική δραστικότητα των μεταλλικών συμπλόκων των 1a-3a. (Singh, Negi, et al. 2012)

Τα ευρήματα υποδεικνύουν ανασταλτική δόση 50% ($IC_{50} = 0,266 \mu M$) συγκρίσιμη με το φάρμακο αναφοράς μετρονιδαζόλη. Όλες οι ουσίες παρουσιάζουν δραστικότητα με τιμές IC_{50} μεταξύ 0,390 και 0,508 μM . Η πιο ισχυρή ουσία είναι η **2a**, με $IC_{50} = 0,390 \mu M$. Είναι πιθανό ότι η αυξημένη διαλυτότητα του συμπλόκου χαλκού της 1-φορμυλο-2-πυραζολίνης (**1a**) ευθύνεται για την εντεκαπλάσια περίπου δραστικότητά του σε σύγκριση με το ligand **1**, [1-φορμυλο-2-πυραζολίνη (5,62 μM)]. Η χλωρομάδα της πυραζολίνης που συνδέεται με δύο διαφορετικούς φαινυλικούς δακτυλίους καθιστά το σύμπλοκο **2a** δραστικότερο από το σύμπλοκο **3a**.

6. Οι ερευνητές με πρώτο συγγραφέα τον/την M. Sirajul Muneera (Muneera and Joseph 2016) συνέθεσαν και χαρακτήρισαν ενώσεις με βάση την πυραζολίνη [φαινυλοδραζίνη (L_1), 2,3-διμεθυλοφαινυλοδραζίνη (L_2) και 3-νιτροφαινυλοδραζίνη (L_3)], καθώς και τα σύμπλοκα τους με χαλκό, νικέλιο, κοβάλτιο και ψευδάργυρο. Επίσης έλεγξαν τις αντιοξειδωτικές και αντιφυματικές δράσεις τους.

Για τη δημιουργία αποτελεσματικότερων αντιφυματικών φαρμάκων, οι ερευνητές τροποποίησαν το πάνω και το κάτω μέρος του μορίου της πυραζολίνης. Οι τροποποιήσεις αυτές περιλάμβαναν την εισαγωγή ιμιδαζολίου και ναφθυλίου. Πολλές από αυτές τις τροποποιημένες ενώσεις έχουν επιδείξει ενδιαφέρουσα βιολογική δραστηριότητα, αποδεικνύοντας ότι οι αλλαγές σε οποιαδήποτε θέση μπορούν να μεταβάλουν την αντιδραστικότητα της ένωσης.



Σχήμα 2.1.19: Δομική τροποποίηση για τη λήψη βιοδραστικών πρωτοπόρων μορίων. (Muneera and Joseph 2016)

Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες των μεταλλικών ενώσεων των παραγώγων πυραζολίνης ελέγχθηκαν με τη χρήση της δοκιμασίας απορρόφησης ριζών DPPH και της δοκιμασίας απορρόφησης υπεροξειδίου. Οι ενώσεις κοβαλτίου, νικελίου, χαλκού και ψευδαργύρου βρέθηκαν να έχουν πολλά υποσχόμενη αντιοξειδωτική δράση αφού υποβλήθηκαν σε μια ολοκληρωμένη δοκιμή DPPH και εργαστηριακή αξιολόγηση της δέσμευσης υπεροξειδίου. Το σύμπλοκο χαλκού του L2, όχι μόνο ήταν η πιο αποτελεσματική ένωση μεταξύ των συμπλόκων μετάλλων, αλλά ξεπέρασε ακόμα και το ασκορβικό οξύ. Η εκπομπή υδρογόνου από την αμινομάδα ιμιδαζολίου του ικρίωματος της πυραζολίνης αναστέλλεται από την ομάδα έλξης ηλεκτρονίων του ικρίωματος. Όταν η 3-φαινύλ-υδραζίνη της πυραζολίνης έχει αζωτομάδα, η αντιοξειδωτική της δράση μειώνεται δραστικά. Έτσι φαίνεται ότι οι αζωτοϋποκαταστάτες στα παράγωγα της πυραζολίνης δεν είναι η καλύτερη ιδέα για χρήση ως αντιοξειδωτικά.

Ενώσεις	IC ₅₀ (μmol dm ⁻³) DPPH
[CuL ² (OAc)H ₂ O]	43
Ascorbic acid	22

Πίνακας 2.1.20: Αντιοξειδωτική δράση του συμπλόκου χαλκού, (Muneera and Joseph 2016)

Τα ανιόντα υπεροξειδίου δημιουργούνται συνεχώς και έχουν πολύ σύντομο χρόνο ημιζωής. Αυτή η χρωματομετρική δοκιμή(SOD) ανίχνευσε την ενζυμική δραστηριότητα των χηλικών αυτών ενώσεων σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων παρακολουθώντας την καταστολή της αναγωγής του νιτροκυανικού τετραζολίου (NBT) σε φορμαζάνη (F) από τα αναφερόμενα σύμπλοκα μετάλλων. Όσο πιο αποτελεσματικό είναι το σύμπλοκο, τόσο χαμηλότερη είναι η συγκέντρωση που αντιστοιχεί σε 50% αναστολή της αναγωγής του NBT (IC₅₀).

A/A	Αποτελεσματικά μεταλλικά σύμπλοκα	IC ₅₀ values (μM)
1	[CuL ¹ (OAc) (H ₂ O)]	0.6
2	[CuL ² (OAc) (H ₂ O)]	0.4
3	[CuL ³ (OAc) (H ₂ O)]	0.8
4	Ερυθροκύνταρα βόειου	0.04

Πίνακας 2.1.21: Δραστηριότητα SOD των ενώσεων με τον χαλκό, (Muneera and Joseph 2016)

Οι υψηλότερες βιολογικές δραστηριότητες των συμπλόκων χαλκού μπορεί να αποδοθούν στα ευέλικτα ligands, τα οποία είναι σε θέση να προσαρμόσουν τη γεωμετρική αλλαγή από Cu(II) σε Cu(I), ειδικά τα ευμετάβλητα μόρια νερού, τα οποία θεωρείται ότι μπορούν εύκολα να αντικατασταθούν από το υπόστρωμα O₂, κατά την καταλυτική διαδικασία. Ο μηχανισμός που προτείνεται για την αποδιάταξη των ανιόντων υπεροξειδίου τόσο από την SOD όσο και από τα σύμπλοκα 2 και 3 θεωρείται ότι περιλαμβάνει οξειδοαναγωγικό κύκλο των μεταλλικών ιόντων. η μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ του χαλκού(II) και των ριζών ανιόντων υπεροξειδίου πραγματοποιείται μέσω άμεσης σύνδεσης. Ως εκ τούτου, τα σύμπλοκα χαλκού παρουσίασαν υψηλότερη δραστηριότητα SOD από τα άλλα σύμπλοκα μετάλλων.

Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο «agar well», προσδιορίστηκε η αντιβακτηριακή δράση των ενώσεων σε δόση 100 mg/ml έναντι πέντε διαφορετικών οργανισμών δοκιμής: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* και *Salmonella typhi*. Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν την τεχνική της σταδιακής αραιώσης με υγρό το DMSO για να υπολογίσουν τις τιμές MIC έναντι αυτών των παθογόνων και τις συνέκριναν με εκείνες της στρεπτομυκίνης.

Ενώσεις	MIC (μg/mL)				
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. typhi</i>	<i>P. mirabilis</i>
L ¹	88	76	66	90	94
L ²	76	68	88	60	82
L ³	82	70	76	68	88
[CuL ¹ (OAc)(H ₂ O)]	36	42	28	40	46

Ενώσεις	MIC (μg/mL)				
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. typhi</i>	<i>P. mirabilis</i>
[CuL ² (OAc)(H ₂ O)]	50	42	28	40	46
[CuL ³ (OAc)(H ₂ O)]	32	40	26	38	43
Στρεπτομυκίνη	10	18	20	16	14

Πίνακας 2.1.22: Τιμές MIC των συνδέσμων και των μεταλλικών συμπλόκων τους. (Muneera and Joseph 2016)

Στις περισσότερες περιπτώσεις, η αύξηση της λιποφιλικότητας προκύπτει από τη συμπλοκοποίηση του ligand με διμερή μεταλλικά ιόντα. Επιπλέον, δεδομένου ότι το θετικό φορτίο του μετάλλου μοιράζεται εν μέρει με τις ομάδες-δότες στις ενώσεις, η χηλική σύνδεση καθιστά τα ιόντα λιγότερο μαγνητικά. Η διαδικασία αυτή ενίσχυσε τη λιποφιλικότητα των μεταλλικών ενώσεων, επιτρέποντάς τους να διασχίσουν ευκολότερα τη λιπιδική διπλοστοιβάδα των μεμβρανών της candida. Η ενισχυμένη αντιμικροβιακή δράση μπορεί να οφείλεται εν μέρει στην οξειδοαναγωγική συμπεριφορά του ιόντος χαλκού στις ενώσεις.

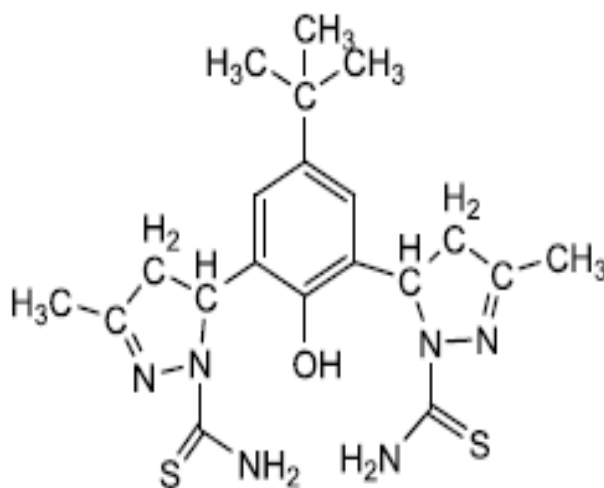
Στην μελέτη για την αντιμυκοβακτηριακή δράση των μεταλλικών ενώσεων της πυραζολίνης παρατηρήθηκαν τιμές MIC μικρότερες από 10 μg/ml. Σε σύγκριση με τη στρεπτομυκίνη (7,5 μg/ml) και την πυραζιναμίδη (10 μg/ml), το ligand L2 με υποκατάσταση ένα CH₃, το οποίο λειτουργεί ως ομάδα που δίνει ηλεκτρόνια, παρουσίασε μέτρια δράση στα 25 μg/ml. Διαπιστώθηκε ότι η δραστηριότητα και η εκλεκτικότητα των ενώσεων πυραζολίνης επηρεάζονται από τη μετατόπιση της ομάδας φαινυλϋδραζίνη. Όταν ο μη υποκατεστημένος μοριακός πυρήνας της φαινυλϋδραζίνης άλλαξε με την ηλεκτρονιοδότη 2,3-διμεθυλοφαινυλϋδραζίνη, η αποτελεσματικότητα μειώθηκε δραματικά, ενώ η δραστηριότητα αυξήθηκε με την αντικατάσταση της 3-νιτροφαινυλϋδραζίνης.

A/A	Σύμπλοκα χαλκού	MIC (μg/mL)
1	[CuL ¹ (OAc)(H ₂ O)]	14.6
2	[CuL ² (OAc)(H ₂ O)]	11.2

A/A	Σύμπλοκα χαλκού	MIC (μg/mL)
3	[CuL ³ (OAc)(H ₂ O)]	15.8
4	Στρεπτομυκίνη	7.5
5	Πυραζιναμίδη	10

Πίνακας 2.1.23: Αντιμυκοβακτηριακή δράση των συμπλόκων χαλκού, (Muneera and Joseph 2016)

7. Μια άλλη ερευνητική ομάδα (Fahad, Abid and Al Jibouri 2019) παρασκεύασε με επιτυχία ένα νέο ligand πυραζολίνης [4,4'-(5-(τερτ-βουτύλ)-2-υδροξύ-1,3-φαινυλίν)bis(βούτ-3-εν-2-όνη)] σε αλκαλικό διάλυμα θειοσεμικαρβαζιδίου. Στη συνέχεια παρασκευάστηκαν τα μεταλλικά τους σύμπλοκα από Mn, Co, Ni και Cu. Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν την τεχνική της σειριακής αραίωσης για να εξετάσουν τις αντιμικροβιακές ιδιότητες αυτών των ενώσεων έναντι μιας ποικιλίας βακτηρίων και μυκήτων, συμπεριλαμβανομένων των *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* και *Aspergillus niger* και *Candida albicans*.



Σχήμα 2.1.24: Η δομή του υποκαταστάτη, (Fahad, et al., 2019)

Η τεχνική διάχυσης χρησιμοποιείται για την τεκμηρίωση των τιμών της ανασταλτικής ζώνης (mm) που αποκτήθηκαν για το ligand πυραζολίνης και τις

ενώσεις του μετάλλου σε συγκέντρωση 20 ppm. Η αντιβακτηριακή δράση του ligand αξιολογήθηκε έναντι τεσσάρων διαφορετικών οργανισμών: δύο μύκητες, *Aspergillus niger* και *Candida albicans*, και δύο βακτήρια, *Staphylococcus aureus* και *Escherichia coli*. Όλες οι μεταλλικές ενώσεις ήταν περισσότερο δραστικές από τους προσδέτες. Με βάση τις μετρούμενες αντιδράσεις, το σύμπλοκο χαλκού ξεχωρίζει ως το πιο δραστικό από τα σύμπλοκα που μελετήθηκαν. Λόγω της ισχυρής αντιδραστικότητάς της στο DMSO, η ελεύθερη bis-πυραζολίνη δυσκολεύτηκε να διεισδύσει στο λιπιδικό στρώμα των βακτηριακών και μυκητιακών κυττάρων, με αποτέλεσμα μικρότερες ανασταλτικές ζώνες. Η δράση των διαλυμάτων των ενώσεων των 20 ppm συγκρίθηκε με εκείνη του αντιβακτηριδιακού φαρμάκου σιπροφλαξίνη.

Ενώσεις	Βακτήρια		Μύκητες	
	<i>S. Aureus</i>	<i>E. Coli</i>	<i>A. nidulence</i>	<i>C.albicans</i>
Προσδέτης(L)	12	20	10	11
[CuL]	28	30	20	22
Σιπροφλαξίνη	25	15	0	0

Πίνακας 2.1.25: Ζώνες αναστολής (mm) του Ligand και του συμπλόκου χαλκού μέσω της μεθόδου διάχυσης. (Fahad, et al., 2019)

Βλέποντας τις δυνατότητες των πυραζολινικών συμπλόκων χαλκού στην καταπολέμηση μυκήτων, μικροβίων και φλεγμονών, αξίζει να αναφερθεί ότι είναι το καλύτερο μελετημένο μεταλλικό σύμπλοκο έως τώρα στην υπάρχουσα βιβλιογραφία. Αυτό φαίνεται να σχετίζεται με την ήδη έντονη χρήση του χαλκού ως αντιμικροβιακό παράγοντα.

2.2 Μεταλλικά Σύμπλοκα Πυραζολίνης με Ag

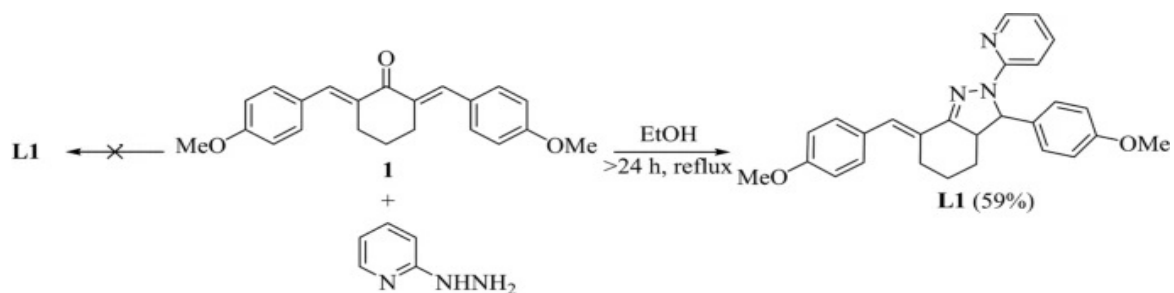
Στα έργα του, ο Ιπποκράτης καλύπτει το θέμα της χρήσης αργύρου για τη θεραπεία των πληγών. Τα ασημένια ράμματα χρησιμοποιήθηκαν συχνά από τους χειρουργούς στις αρχές του 20ού αιώνα για να μειώσουν την πιθανότητα μόλυνσης. Στις αρχές του 20ού αιώνα, οι γιατροί χρησιμοποιούσαν κολλύρια που περιείχαν άργυρο για τη θεραπεία οφθαλμικών προβλημάτων, διαφόρων λοιμώξεων και περιστασιακά εσωτερικών ασθενειών, όπως η τροπική κοιλιοκάκη, η επιληψία, η γονόρροια και το κοινό κρυολόγημα. Το φύλλο αργύρου χρησιμοποιήθηκε από τα στρατεύματα για τη θεραπεία μολυσμένων πληγών κατά τη διάρκεια του Α' Παγκοσμίου Πολέμου. Ο J. Marion Sims, ο πατέρας της γυναικολογίας, χρησιμοποίησε ασημένιο σύρμα ως επίδεσμο στη γυναικολογική χειρουργική τη δεκαετία του 1840. Σε σύγκριση με τους προκατόχους του, το μετάξι και το catgut (ίνες από έντερα ζώων), αυτό απέδωσε πολύ ευνοϊκά αποτελέσματα. Ο κολλοειδής άργυρος χρησιμοποιήθηκε ως απολυμαντικό και μικροβιοκτόνο πριν από την ανάπτυξη των σύγχρονων φαρμάκων. Αν και ο άργυρος εξακολουθεί να έχει κάποιες χρήσεις σε φαρμακευτικές ενώσεις σήμερα, η χρήση του ως αντιμικροβιακού παράγοντα μειώθηκε με την εμφάνιση των σύγχρονων αντιβιοτικών τη δεκαετία του 1940. Η σουλφαδιαζίνη αργύρου (SSD) είναι ένα μείγμα αργύρου και της αντιμικροβιακής σουλφαδιαζίνης νατρίου και χρησιμοποιείται ως αντιμικροβιακή ουσία σε περιπτώσεις εγκαυμάτων.

In vitro, ο άργυρος και η πλειονότητα των ενώσεων του αργύρου ασκούν ολιγοδύναμη επίδραση και είναι τοξικά για τα βακτήρια και τους μύκητες. Η ολιγοδυναμική επίδραση -oligodynamic effect- των μετάλλων, ιδίως των βαρέων μετάλλων, είναι μια βιοκτόνος δράση που συμβαίνει ακόμη και σε χαμηλές ποσότητες. Τα μέταλλα αντιδρούν με πρωτεϊνικές ομάδες θειόλης (-SH) ή αμίνης (-NH(1,2,3)), ένας μηχανισμός δράσης στον οποίο οι μικροοργανισμοί μπορεί να αναπτύξουν ανοχή, καθώς τα πλασμίδια των βακτηρίων μπορούν να διαδώσουν την ανθεκτικότητα αυτή (Siebert and Harke 2009). Μαζί με το φαινόμενο της χηλικοποίησης, το ολιγοδυναμικό φαινόμενο ευθύνεται για την περαιτέρω αντιμικροβιακή δράση που προσδίδουν τα διάφορα μέταλλα που αναφέρθηκαν στις πυραζολινικές ενώσεις.

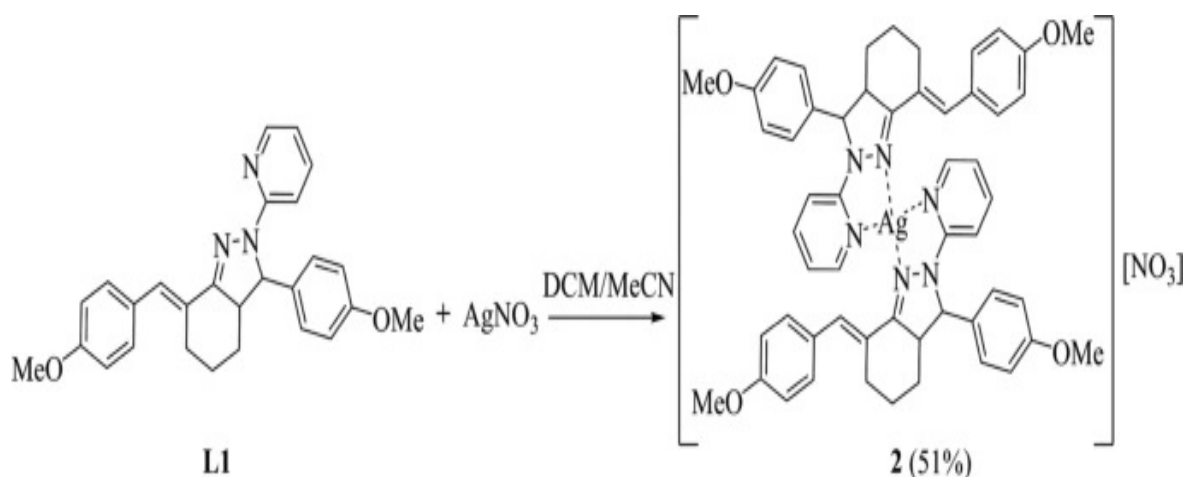
Η αντιβακτηριακή δράση του αργύρου εξαρτάται από το ιόν του. (Hipler and Elsner 2006) Η ικανότητα του βιολογικά ενεργού ιόντος αργύρου (Ag⁺) να βλάπτει μόνιμα βασικά ενζυμικά συστήματα στις κυτταρικές μεμβράνες των παθογόνων το καθιστά αποτελεσματικό ως αντισηπτικό (Hipler and Elsner 2006). Ο άργυρος απορροφάται από τα μικρόβια που καταστρέφει. Κατά συνέπεια, τα αποθανόντα βακτήρια θα μπορούσαν να αποτελέσουν πηγή αργύρου που σκοτώνει άλλα βακτήρια (Wakshlak, Pedahzur and Avnir 2015).

Παρά την μεγάλη ιστορία του αργύρου ως αντιμικροβιακός παράγοντας, υπάρχει μόνο μία ερεύνα που να πραγματεύεται τις βιολογικές δράσεις συμπλόκων αργύρου-πυραζολίνης και παράλληλα να είναι δημοσιευμένη σε ένα έγκυρο περιοδικό. Μάλιστα, το Ελληνικό στοιχείο είναι εμφανές, καθώς η πλειοψηφία των ερευνητών είναι Έλληνες.

1. Οι ερευνητές με πρώτο συγγραφέα τον Δήμητρη Ματιάδη (Matiadis, et al. 2021) αναφέρουν την ανάπτυξη ενός νέου ligand που περιέχει πυραζολίνη (L1), το οποίο δρα ως NN-δότης για το σχηματισμό ενός νέου συμπλόκου αργύρου(2). Οι ενώσεις δοκιμάστηκαν για τη δέσμευση του DNA και την αντιβακτηριακή τους δράση. Η αρχική ένωση 1, το ligand L1 και το σύμπλοκο 2 δοκιμάστηκαν έναντι πέντε σημαντικών παθογόνων ESKAPE: *baumanii*, *P. aeruginosa*, το ανθεκτικό στη μεθικιλίνη *S. aureus*, και τους μύκητες *Candida albicans* και *Candida neoformans* [Η συντομογραφία ESKAPE σημαίνει *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* και *Enterobacter spp.*, έξι εξαιρετικά μολυσματικά και ανθεκτικά στα αντιβιοτικά παθογόνα. Λόγω της αυξανόμενης πολυανθεκτικότητάς τους, αυτή η συλλογή θετικών κατά Gram και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων μπορεί να "ξεφύγει" από τα συχνά χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά (MDR)]. Τόσο το 1 όσο και το L1 δεν είχαν καμία δράση σε κανένα στέλεχος σε συγκέντρωση ενός σημείου(single-point) 32 μg/mL, ενώ το σύμπλοκο αργύρου 2 ήταν δραστικό τόσο έναντι βακτηρίων όσο και έναντι μυκήτων. Ακολούθως, διεξήχθη δοκιμή αντιμικροβιακής δράσης 8 σημείων (8-point) (0,25-32 μg/mL) για το σύμπλοκο 2 εις διπλούν για την επικύρωση της δράσης και τον προσδιορισμό της χαμηλότερης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC).



Σχήμα 2.8.1: Σύνθεση του L1. (Matiadis, et al. 2021)



Σχήμα 2.8.2: Σύνθεση του 2. (Matiadis, et al. 2021)

Η πλήρης καταστολή της ανάπτυξης έχει περιγραφεί ως 20% ανάπτυξη (ή > 80% αναστολή). Η ένωση 2 παρουσίασε ενδιάμεση έως υψηλή δραστηριότητα έναντι των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων *E. coli* (MIC = 8 μg/mL = 8,3 μM), *P. aeruginosa* (MIC = 16 g/mL = 16,6 μM) και *A. baumannii* (MIC = 4 μg/mL = 4,15 μM), καθώς και πολύ υψηλή δραστηριότητα έναντι των *Candida albicans* και *Candida neoformans* (και οι δύο MIC 0,25 μg/mL). Τέλος, η τιμή MIC που ελήφθη κατά του Gram-θετικού ανθεκτικού στη μεθικιλίνη *S. aureus* ήταν μεγαλύτερη από 32 μg/mL. Μεταξύ των οργανισμών που εξετάστηκαν, τα αρνητικά κατά Gram είδη βρέθηκαν πιο δραστικά από τα θετικά κατά Gram είδη.

Ενώσεις	Sa	Ec	Kp	Pa	Ab	Ca	Cn	CC ₅₀	HC ₅₀
1	> 32	> 32	> 32	> 32	> 32	> 32	> 32	nd	nd
L1	> 32	> 32	> 32	> 32	> 32	> 32	> 32	nd	nd
2	> 32	8	> 32	16	4	≤ 0.25	≤ 0.25	7.31	> 32
Χλωραμφενικόλη	8	8	> 32	> 32	> 32	> 32	> 32	-	> 32
Φλουκοναζόλη	> 32	> 32	> 32	> 32	> 32	0.125	8	-	> 32
AgNO ₃	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.25	-	> 32

Πίνακας 2.8.3: Αντιμικροβιακή δράση ως ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC), κυτταροτοξικότητα (CC₅₀) και αιμολυτική δράση (HC₅₀) της αρχικής ένωσης 1, του συνδέτη L1 και του συμπλόκου αργύρου(I) 2.

Sa: Methycillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Ec: *Escherichia coli*, Kp: *Klebsiella pneumoniae*, Pa: *Pseudomonas aeruginosa*, Ab: *Acinetobacter baumannii*, Ca: *Candida albicans*, Cn: *Cryptococcus neoformans*

n.d: not determined. (Matiadis, et al. 2021)

Επιπλέον, η ένωση 2 έχει εξαιρετική αντιμικροβιακή δράση. Ως αποτέλεσμα, το τμήμα 2-πυρίδυλο-πυραζολίνης λειτουργεί ως αποτελεσματικός δότης NN, επιτρέποντας στα ιόντα αργύρου να παρουσιάζουν αντιμικροβιακή και αντιμυκητιακή δράση. Το γεγονός ότι δεν παρατηρήθηκε αιμόλυση, με HC₅₀ > 32 μg/mL, ήταν μια άλλη εξαιρετικά επιθυμητή και θετική ιδιότητα του συμπλόκου 2. Προσδιορίστηκε η τιμή CC₅₀ = 7,31 μM για την κυτταροτοξικότητα σε κύτταρα HEK-293, η οποία είναι οριακά χαμηλότερη ή ισοδύναμη με τις τιμές MIC παρά τη χαμηλή αιμολυτική δραστηριότητα, η οποία αποτελεί ένδειξη χαμηλής τοξικότητας. [HEK 293, γνωστά και ως Ανθρώπινα εμβρυικά νεφρικά κύτταρα 293 (Human Embryonic Kidney cells 293), είναι μια συγκεκριμένη αθανατοποιημένη κυτταρική σειρά που λαμβάνεται από ένα έμβρυο που έχει υποστεί φυσική αποβολή ή έκτρωση ή από

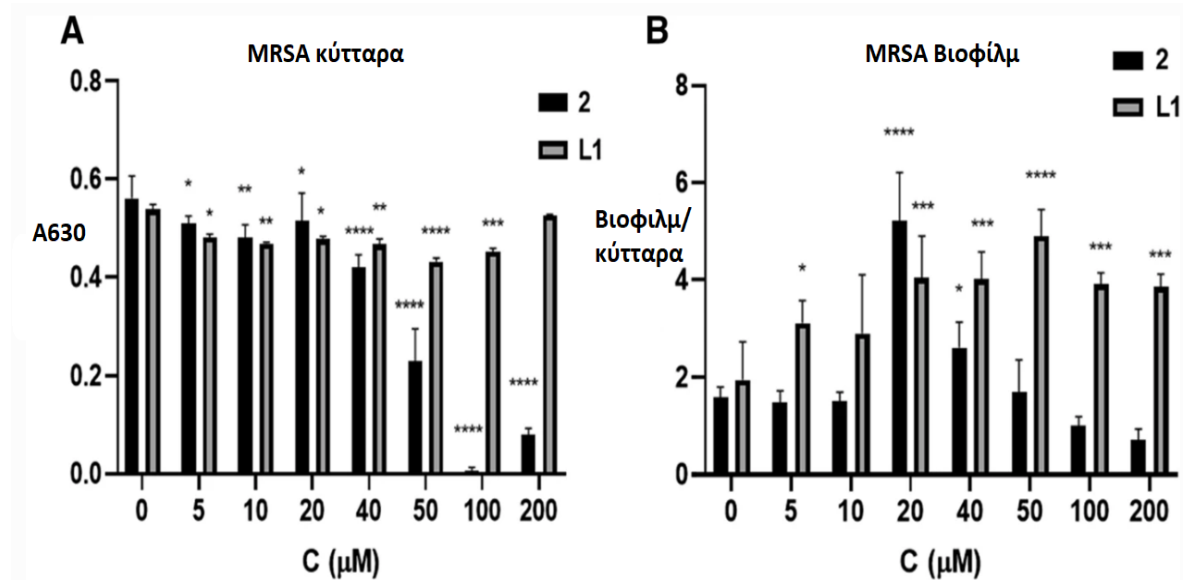
ανθρώπινα εμβρυικά νεφρικά κύτταρα που αναπτύχθηκαν σε καλλιέργεια ιστού και συλλέχθηκαν (Kavsan, Iershov and Balynska 2011). Λόγω της σταθερής ανάπτυξής τους και της προδιάθεσής τους για επιμόλυνση, χρησιμοποιούνται εκτενώς σε μελέτες κυτταρικής βιολογίας εδώ και πολλά χρόνια.

Η παρατηρηθείσα τοξικότητα στη σειρά HEK-293 δεν μπορεί, ωστόσο, να αντικρούσει την περαιτέρω βιολογική δράση του συμπλόκου 2, καθώς οι παράγοντες που περιέχουν ιόντα αργύρου βρίσκουν συνήθως εφαρμογή σε επιδέσμους τραυμάτων και τοπικές αντιμικροβιακές ή αντιμυκητιασικές κρέμες που παρουσιάζουν χαμηλή συστηματική τοξικότητα λόγω της χαμηλής απορρόφησης μέσω του δέρματος (Enna and Bylund 2008) Επιπλέον, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι πολλά αντιμυκητιασικά φάρμακα, όπως η αμφοτερικίνη Β, έχει ανακαλυφθεί ότι είναι εξαιρετικά τοξικά για τα κύτταρα των θηλαστικών (Hamil 2013).

Επιπλέον, αξιολογήθηκε η επίδραση της αύξησης των ποσοτήτων των συμπλόκων 2 και L1 στο σχηματισμό βιοφίλμ MRSA και *P. aeruginosa* και στον πολλαπλασιασμό των πλαγκτονικών κυττάρων. Ακόμη και στη μεγαλύτερη ποσότητα που μετρήθηκε, το L1 δεν είχε καμία επίδραση στον αριθμό των βακτηρίων στην πλαγκτονική φάση ανάπτυξης του MRSA.

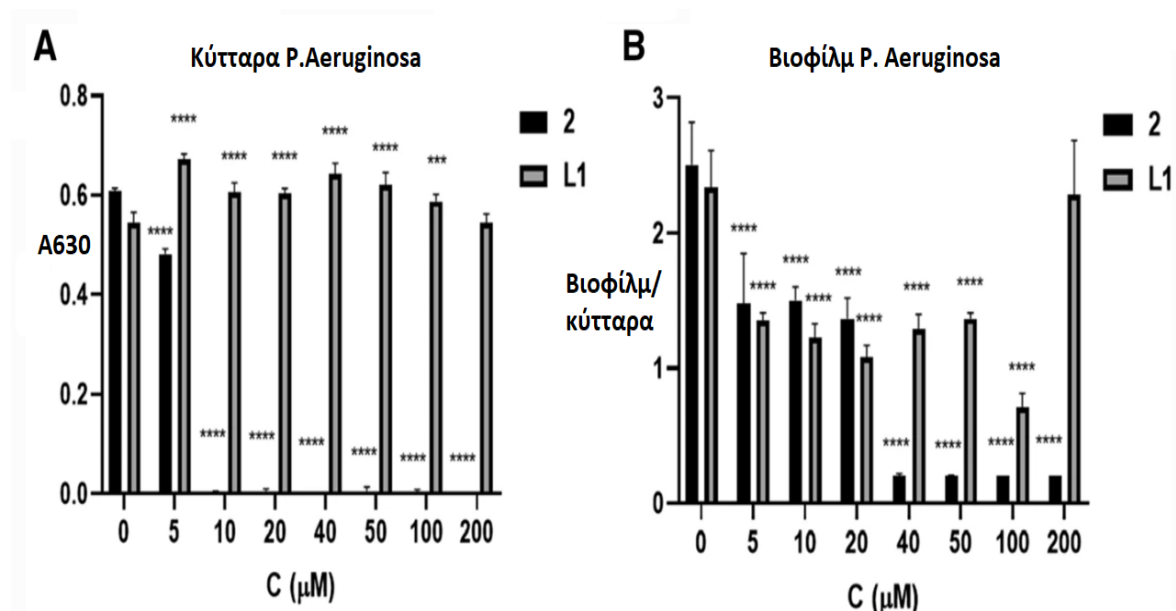
Ωστόσο, το σύμπλοκο 2 κατέστειλε την ανάπτυξη του MRSA με δοσοεξαρτώμενο τρόπο σε ποσότητες μεγαλύτερες από 20 μM . Η τιμή MIC ήταν μεγαλύτερη από 32 $\mu\text{g/mL}$ (33,4 μM), η οποία συνάδει με προηγούμενα ευρήματα των ερευνητών. Ενδιαφέροντα ευρήματα προέκυψαν επίσης όσον αφορά την επίδραση των δύο ουσιών στην ανάπτυξη βιοφίλμ. Διαπιστώθηκε ότι η παραγωγή βιοφίλμ διεγείρεται αρχικά από τον ligand L1, σχεδόν διπλασιάζεται στα 20 μM και παραμένει αυξημένη σε όλο το υπόλοιπο εύρος συγκεντρώσεων που εξετάστηκε. Ειδικότερα, παρουσία του L1, τα ελεύθερα επιπλέοντα κύτταρα συνυπάρχουν με μια αυξανόμενη κοινότητα βιοφίλμ, γεγονός που υποδηλώνει ότι, αν και το ligand δεν μειώνει αποτελεσματικά τον πλαγκτονικό πληθυσμό MRSA, εξακολουθεί να δημιουργεί ένα εξαιρετικά εχθρικό μικροπεριβάλλον που αναγκάζει τα βακτήρια να στραφούν προς το σχηματισμό βιοφίλμ ως αμυντική προσαρμογή. Ένα απρόοπτο φαινόμενο παρατηρήθηκε στην περίπτωση του συμπλόκου 2: η ανάπτυξη βιοφίλμ παρουσίασε διφασική αντίδραση στην αύξηση των ποσοτήτων. Ο σχηματισμός βιοφίλμ ήταν ελάχιστος και αμετάβλητος σε συγκεντρώσεις κάτω των 20 μM , αλλά

αυξήθηκε δραματικά σε αυτό το επίπεδο, αυξάνοντας σχεδόν στο τριπλάσιο, ακολουθούμενος από σταθερή καταστολή του βιοφίλμ σε υψηλότερα επίπεδα, επιτυγχάνοντας σχεδόν πλήρη εξάλειψη του βιοφίλμ στα 200 μM .



Σχήμα 2.8.4: Σχηματισμός βιοϋμενίου και ανάπτυξη του πλαγκτονικού MRSA ανάλογα με τη συγκέντρωση του συμπλόκου 2 ή L1.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, (Matiadis, et al. 2021)



Σχήμα 2.8.5: Ανάπτυξη των κυττάρων *P. aeruginosa* και παραγωγή βιοφίλμ παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του συμπλόκου 2 ή L1.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, (Matiadis, et al. 2021)

Παρόμοια με ό,τι παρατηρήθηκε για το L1, τα βιοφίλμ συνυπάρχουν με κύτταρα ελεύθερης μορφής. Είναι συναρπαστικό να παρατηρήσουμε ότι παρόλο που ο πλαγκτονικός πληθυσμός είναι σχεδόν πανομοιότυπος και στις δύο περιπτώσεις, κάτω από τα 20 μM υπάρχει μόνο μια μικροσκοπική και σταθερή μάζα βιοφίλμ, η οποία είναι σχεδόν η μισή του πληθυσμού που υπάρχει παρουσία του L1. Εάν το L1 και το σύμπλοκο 2 είναι εξίσου αποτελεσματικά στην παραγωγή μιας εχθρικής ατμόσφαιρας, τότε θα μπορούσε να αναμένεται μια παρόμοια αύξηση του αριθμού των βιοφίλμ. Ωστόσο, αυτό δεν συμβαίνει, γεγονός που υποδηλώνει ότι είτε το σύμπλοκο 2 δεν στρεσάρει τα ελεύθερα επιπλέοντα κύτταρα αρκετά ώστε να τα οδηγήσει προς το σχηματισμό βιοφίλμ, είτε εμφανίζει άμεση δράση κατά του βιοφίλμ, δημιουργώντας μια δυναμική ισορροπία μεταξύ της πλαγκτονικής και της βιοϋμενικής μορφής. Σε συμφωνία με τον αυξανόμενο όγκο στοιχείων που υποδηλώνουν ότι ο *S. aureus* ανταποκρίνεται σε υπό-ανασταλτικές συγκεντρώσεις αντιβιοτικού προκαλώντας το σχηματισμό βιοφίλμ και αλλάζοντας τη σύνθεση του «matrix» του βιοφίλμ, οι ερευνητές διαπιστώνουν ότι ο σχηματισμός του αυξάνεται δραματικά στην υπό-ανασταλτική συγκέντρωση των 20 μM , η οποία φαίνεται να είναι πολύ κρίσιμη. Διαπιστώθηκε μείωση της ανάπτυξης των πλαγκτονικών κυττάρων σε ποσότητες άνω της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC), όπως αναμενόταν, γεγονός που υποδεικνύει ότι η καταστολή του βιοφίλμ συνδέεται στενά με τον μειωμένο ελεύθερα επιπλέοντα πληθυσμό, πέραν της άμεσης επίδρασης κατά του ίδιου.

Είναι προφανές ότι η L1 δεν είχε καμία επίδραση στην ανάπτυξη ή την παραγωγή βιοφίλμ του πλαγκτονικού πληθυσμού της *P. aeruginosa*. Σε αντίθεση με την αντίδραση MRSA, ο πληθυσμός της *P. aeruginosa* που επιπλέει ελεύθερα εξαλείφθηκε στο σύμπλοκο 2 σε συγκεντρώσεις 10 μM . Επιπλέον, η επεξεργασία με το σύμπλοκο 2 μείωσε την ανάπτυξη βιοφίλμ με δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Λόγω αυτού του ευρήματος, οι ερευνητές συμπεραίνουν ότι το σύμπλοκο 2 είναι πιο αποτελεσματικό κατά του πλαγκτονικού πληθυσμού και δημιουργεί ένα εχθρικό περιβάλλον σε συγκεντρώσεις 5-20 μM , το οποίο τελικά οδηγεί σε κάποια σταθερή ανάπτυξη βιοφίλμ. Ωστόσο, ακόμη και σε συγκεντρώσεις μεταξύ 40 και 200 μM , μια μικρή αλλά ανθεκτική κοινότητα βιοφίλμ υφίσταται, παρόλο που δεν παρατηρούνται πλαγκτονικά κύτταρα. Τα βακτήρια σκοτώθηκαν ή εμποδίστηκαν να σχηματίσουν

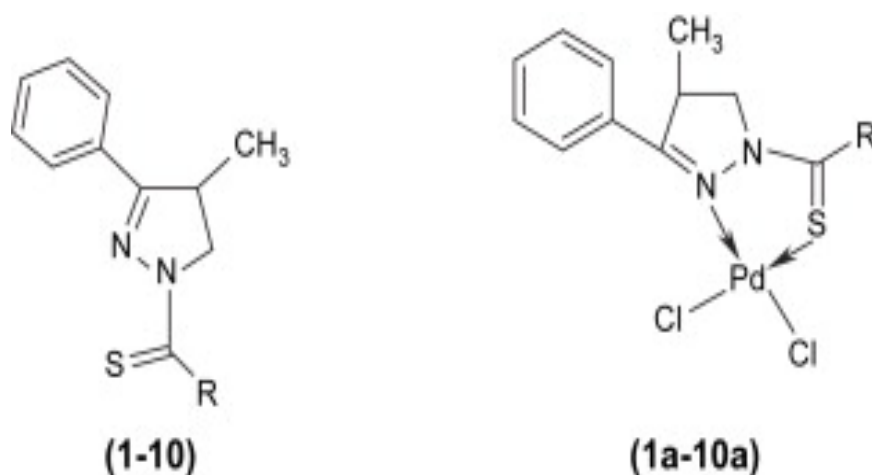
βιοφίλμ στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Η αρχική κοινότητα βιοφίλμ στην περίπτωση του L1 μειώθηκε κατά το ήμισυ περίπου σε συγκέντρωση 5-50 μΜ, αλλά τελικά επανήλθε στο αρχικό της επίπεδο.

2.3 Μεταλλικά σύμπλοκα πυραζολίνης με Pd

Λόγω της ομοιότητας του μεταλλικού του κέντρου με το Pt(II) όσον αφορά στην ηλεκτρονιακή δομή και τη χημεία συντονισμού, οι ενώσεις Pd(II) έχουν τραβήξει την προσοχή της επιστημονικής κοινότητας. Παρόλο που τα σύμπλοκα Pd(II) έχουν υψηλότερο βαθμό αστάθειας από τα αντίστοιχα του Pt(II), έχουν επιδείξει εξαιρετική κυτταροτοξική δράση. Οι ισχυροί προσδέτες συντονισμού (όπως τα διθειοκαρβαμικά και οι πολυδοντικές γραμμικές αμίνες) και οι αρκετά αδρανείς (nonlabile) αποχωρούσες ομάδες είναι απαραίτητα για την *in vivo* σταθερότητα των αντικαρκινικών συμπλόκων Pd(II). Για να αυξηθεί η αντινεοπλασματική απόκριση και η επιβίωση των ασθενών, έχουν δημιουργηθεί και περιγράφει μονο- και πολυπυρηνικά σύμπλοκα Pd (δηλαδή, που περιέχουν ένα ή περισσότερα από ένα μεταλλικά κέντρα). Σε αντίθεση με τις μονοπύρηνες ενώσεις μετάλλων, οι οποίες περιορίζονται στη δέσμευση (ομοιοπολικά) σε μία ή δύο θέσεις του στόχου τους (βάσεις DNA), ανάλογα με τη φύση των προσδετών, οι πολυπυρηνικές ενώσεις μπορούν να αλληλοεπιδράσουν με το DNA σε διάφορες θέσεις κατά μήκος της διπλής έλικας μέσω αλληλεπιδράσεων μικρής ή μεγάλης εμβέλειας, με αποτέλεσμα σοβαρότερες, έως και ανεπανόρθωτες βλάβες. Τα σύμπλοκα Pd(II) που έχουν δοκιμαστεί μέχρι σήμερα σε σχέση με την αντικαρκινική τους δράση έχουν, ως επί το πλείστο, χαρακτηριστεί ως προς τις κυτταροτοξικές και αντιπολλαπλασιαστικές τους ιδιότητες έναντι διαφόρων σειρών καρκινικών κυττάρων, καθώς και ως προς τις ικανότητές τους να δεσμεύουν DNA ή πρωτεΐνες. Οι γνώσεις σχετικά με την ικανότητα των μεταλλικών συμπλόκων και, ειδικότερα, των συμπλόκων Pd(II), να διαταράσσουν και να προκαλούν προσαρμογές στο μεταβολισμό των κυττάρων/οργανισμών είναι ακόμη ελάχιστες, παρά τη σημασία τους για την αξιολόγηση των συνολικότερων επιδράσεων αυτών των νέων αντινεοπλασματικών παραγόντων. Έχοντας αυτά υπόψη, οι παρακάτω ερευνητικές ομάδες δημιούργησαν σύμπλοκα Πυραζολίνης-Pd με σκοπό να τις μελετήσουν για τις βιολογικές τους δράσεις.

1. Μια ομάδα ερευνητών (Azam, Abid and Husain 2008) δημιούργησε μια νέα οικογένεια 1-N-υποκατεστημένων κυκλιωμένων πυραζολινικών θειοημικαρβαζονών και τις ενώσεις τους με παλλάδιο. Οι ουσίες αυτές δοκιμάστηκαν για την

αντιαμοιβαδική δράση και την τοξικότητά τους έναντι της *E. histolytica* και των κυτταρικών σειρών *KB*, αντίστοιχα.



Σχήμα 2.3.1: Οι χημικές δομές των εξεταζόμενων ενώσεων, (Azam, Abid and Husain 2008)

Η αντιαμοιβαδική δράση έναντι του στελέχους HM1:IMSS της *Escherichia coli* εξετάστηκε σε μια διαλογή όλων των 1-N-υποκατεστημένων θειοκαρβοξαμιδ-4-μεθυλ-3-φαινυλ-2-πυραζολινών με θειοημικαρβαζίδια διαφόρων τύπων και των συμπλόκων τους με Pd. Για να εξεταστεί ο αντίκτυπος της υποκατάστασης στην αντιαμοιβαδική δράση, τα υπό εξέταση μόρια έχουν αντικατασταθεί με 1-N με διάφορες αλειφατικές, αλκυκλικές και αρωματικές ομάδες. Από το διάγραμμα δόσης-απόκρισης προέκυψε η τιμή IC₅₀. Το πρότυπο φάρμακο μετρονιδαζόλη εμφάνισε IC₅₀ 1,6-1,8 μM. Οι ενδείξεις IC₅₀ για όλες τις ουσίες ήταν μεταξύ 0,37 και 15,25 μM. Η N-κυκλο-οκτυλο-αμίνη 7 σε αυτή την ομάδα είχε τη χαμηλότερη τιμή IC₅₀ για την αντι-αμοιβάδα δράση (2,3 μM) σε σύγκριση με το πρότυπο φάρμακο, τη μετρονιδαζόλη (IC₅₀ = 1,8 μM). Τα σύμπλοκα 1α-10α προέκυψαν από τη συμπλοκοποίηση των κυκλοποιημένων πυραζολινικών θειοημικαρβαζονών 1-10 με παλλάδιο(II), με τιμές IC₅₀ που κυμαίνονταν από 0,37 έως 5,65 μM. Όλες οι μεταλλικές ενώσεις βρέθηκαν να είναι πιο δραστικές από τα αντίστοιχα ligands τους, γεγονός που υποδηλώνει ότι η συμπλοκοποίηση με μέταλλο αυξάνει τη δραστηριότητα του ligand.

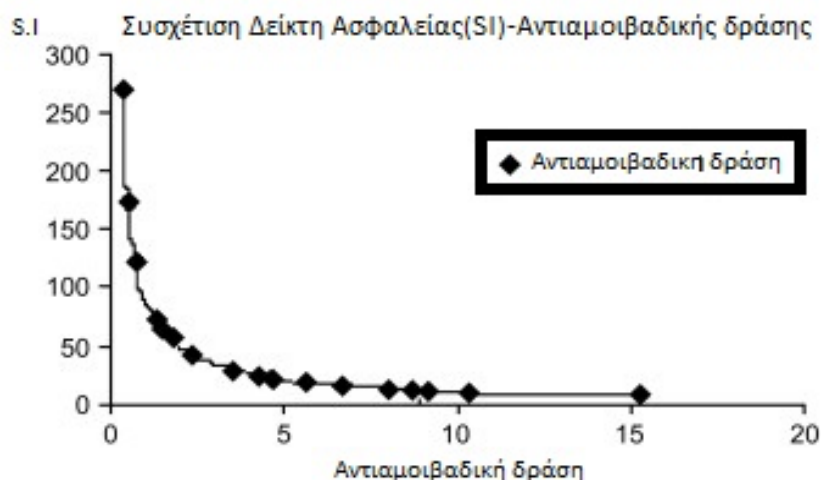
Ενώσεις	R	Αντιαιμοιβαδική δράση IC ₅₀ (μM)	Τοξικότητα IC ₅₀ (μM)	Δείκτης Ασφαλείας (Safety Index, SI)
1	-NH ₂	10.32	>100	>9.68
1a		5.65	>100	>17.69
2		15.25	>100	>6.55
2a		1.68	>100	>59.52
3	-HN-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -	4.32	>100	>23.14
3a		3.57	>100	>28.01
4		9.13	>100	>10.95
4a		1.76	>100	>56.81
5		8.75	>100	>11.42
5a		1.81	>100	>55.24
6		6.63	>100	>15.08
6a		1.49	>100	>67.11
7		2.32	>100	>43.10
7a		1.39	>100	>71.94
8		8.69	>100	>11.50
8a		0.37	>100	>270.27
9		4.57	>100	>21.88
9a		0.58	>100	>172.40
10		4.62	>100	>21.64
10a		0.82	>100	>121.95
	[Pd(DMSO) ₂ Cl ₂]	8.00	=100	>12.50
	Μετρονιδαζόλη (MNZ)	1.81	>100	>55.24

Ενώσεις R	Αντιαμοιβαδική δράση IC ₅₀ (μM)	Τοξικότητα IC ₅₀ (μM)	Δείκτης Ασφαλείας (Safety Index, SI)
-----------	---	-------------------------------------	---

Πίνακας 2.3.2: *In vitro* αντιαμοιβαδική δράση ενώσεων έναντι της *E. histolytica* και κυτταροτοξικό προφίλ, (Azam, Abid and Husain 2008)

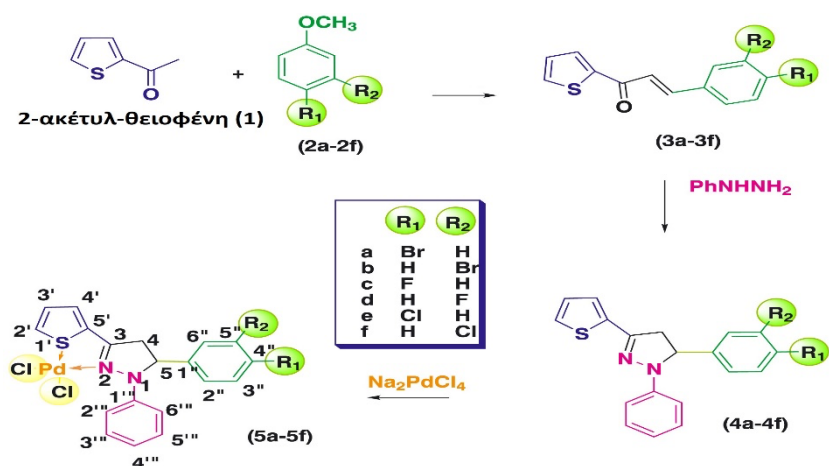
Επιπλέον, τα σύμπλοκα 2α και 4α-10α έδειξαν τις περισσότερες υποσχέσεις *in vitro* ως αμοιβαδοκτόνοι παράγοντες και ως ανταγωνιστές παρασίτων, ξεπερνώντας τη μετρονιδαζόλη. Όταν δοκιμάστηκαν μαζί με τα σύμπλοκα Pd(II) και τη μετρονιδαζόλη, τα οποία απέτυχαν να αναστείλουν την ανάπτυξη του *E. histolytica*, η πρόδρομη ουσία του συμπλόκου Pd [Pd(DMSO)₂Cl₂] βρέθηκε επίσης να έχει αντιαμοιβαδική δράση. Διαπιστώθηκε ότι η δράση βελτιώθηκε σημαντικά με την παρουσία ογκωδών ομάδων στη θέση N4 του μορίου της θειοημικαρβαζόνης. Τα στοιχεία IC₅₀ δείχνουν ότι όλες οι ενώσεις Pd καταστέλλουν σημαντικά τη δράση, ενώ τα πρωτογενή ligands έχουν πολύ χαμηλότερη.

Για να βεβαιωθούν ότι τα ligands πυραζολίνης και τα σύμπλοκα παλλαδίου δεν είναι τοξικά για τα ανθρώπινα κύτταρα, δοκιμάστηκαν σε μια ανθρώπινη κυτταρική σειρά νεφρικού επιθηλίου. Σε συγκέντρωση 100 μM, καμία από τις ουσίες δεν παρουσίασε κυτταροτοξική δράση. Ο "δείκτης ασφαλείας" (SI) υπολογίστηκε και περιεγράφηκε ως εξής: τοξικότητα IC₅₀/πρωτοζωικό IC₅₀, με την τοξικότητα IC₅₀ να είναι η συγκέντρωση της ουσίας που σκοτώνει το 50% του ανθρώπινου κυτταρικού τύπου (νεφρικό επιθήλιο) και το πρωτοζωικό IC₅₀ είναι η συγκέντρωση που σκοτώνει το 50% των πρωτόζων αμοιβάδας. Αυτό επέτρεψε στους ερευνητές να κάνουν υποθέσεις σχετικά με το ποιες χημικές ουσίες μπορεί να είναι αποτελεσματικές ή επιβλαβείς έναντι των ανθρώπινων κυττάρων ενδεχομένως και *in vivo*. Οι δείκτες κινδύνου συγκρίθηκαν στη συνέχεια με τις τιμές IC₅₀ για τα αντιαμοιβαδικά. Καμία από τις ενώσεις πυραζολίνης δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντικές τιμές SI, όπως καταδεικνύεται από τα εν λόγω ευρήματα. Κατά συνέπεια, τα σύμπλοκα 2α και 4α-10α παρουσιάζουν το πιο ενθαρρυντικό προφίλ ασφαλείας εκτός από τη μεγαλύτερη αντιαμοιβαδική δράση, ενώ το σύμπλοκο 8α έχει τη χαμηλότερη βλάβη.



Σχήμα 2.3.3: Συσχέτιση Δείκτη Ασφαλείας και Αντιμυκητοβιαδικής δράσης, (Azam, Abid and Husain 2008)

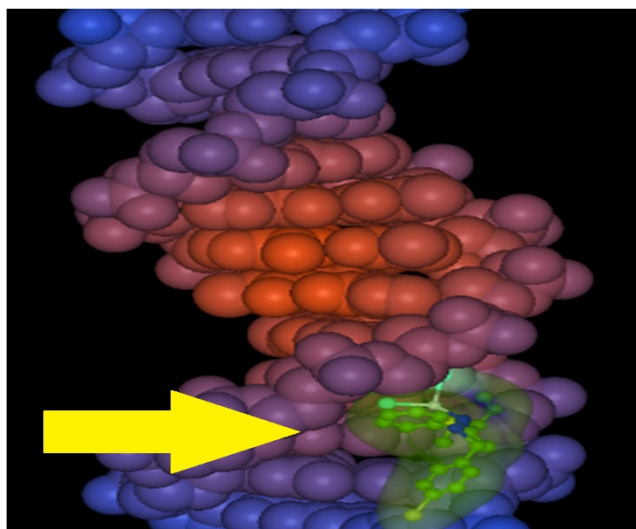
2. Προκειμένου να διερευνηθούν τη βιοχημεία του παλλαδίου, ο/η Khyati P. Thakor και οι συνάδελφοι του/της (Thakor, et al. 2018) παρήγαγαν μεταλλικά σύμπλοκα ρουθηνίου-πυραζολίνης που στην συνέχεια ελέγχθηκαν για την αντιβακτηριακή τους δράση, κυτταροτοξικότητα, δέσμευση και κατακερματισμό του DNA.



Σχήμα 2.3.4 : Συνοπτική περιγραφή της σύνθεσης των ενώσεων (5a-5f), (Thakor, et al. 2018)

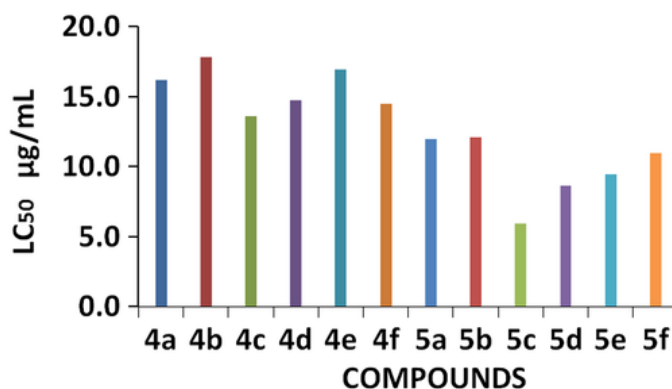
Η τιτλοδότηση με απορρόφηση και οι μετρήσεις ιξώδους υποδεικνύουν αμφότερες την παρεμβαλλόμενη σύνδεση των ενώσεων στο HS DNA. Τα σύμπλοκα έχουν υψηλότερη σταθερά σύνδεσης από την τρανσπλατίνη, αλλά συμβαδίζουν με την σισπλατίνη. Ο μηχανισμός παρεμβολής της σύνδεσης της ένωσης με το DNA υποστηρίζεται επίσης από όλες τις κινητικές μετρήσεις που πραγματοποίησαν οι

ερευνητές. Μια άλλη απόδειξη ότι οι μεταλλικές ενώσεις παρεμβάλλονται μεταξύ των ζευγών βάσεων του DNA προέρχεται από μελέτες φθορισμού. Η χηλική σύνδεση ενισχύει τη δέσμευση των προσδετών στο DNA, και όλες οι ενώσεις προσδένονται στο DNA με παρεμβαλλόμενο τρόπο. Η υδρολυτική διάσπαση εμπλέκεται σε αυτή τη διαδικασία επειδή τα σύμπλοκα μπορούν να διαρρήξουν αποτελεσματικά το πλασμιδιακό DNA ελλείψει εξωγενών παραγόντων.



Εικόνα 2.3.5: Μοριακή μοντελοποίηση του συμπλόκου 5a(επισημαίνεται με το κίτρινο βέλος) με το δίκλωνο DNA, (Thakor, et al. 2018)

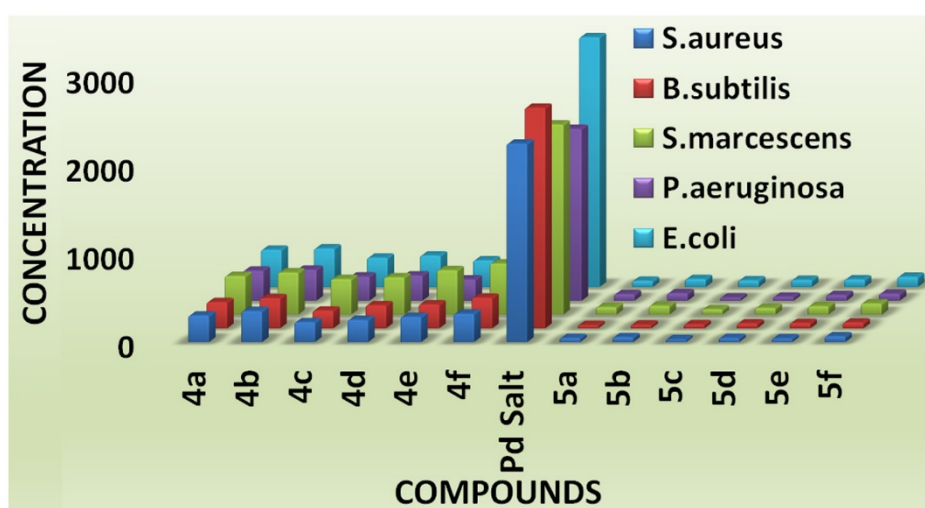
Οι ερευνητές εξέτασαν τις μεταλλικές ενώσεις για την αντιμικροβιακή τους δράση σε πέντε διαφορετικά βακτηριακά στελέχη: δύο αρνητικά κατά Gram (*Escherichia coli* και *Pseudomonas aeruginosa*) και τρία θετικά κατά Gram (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* και *Serratia marcescens*).



Σχήμα 2.3.6: Τιμές LC₅₀ σε µg mL⁻¹ όλων των ενώσεων, (Thakor, et al. 2018)

Τα συμπτώματα της λοίμωξης από *E. coli* στο έντερο περιλαμβάνουν διάρροια ποικίλης σοβαρότητας και συχνότητας, μερικές φορές με κόκκινα κόπρανα, αλλά συνήθως χωρίς πυρετό. Η λοίμωξη με *P. aeruginosa* μπορεί να εξαπλωθεί στους πνεύμονες και το κυκλοφορικό σύστημα. Η ασθένεια των τροφίμων μπορεί να προκληθεί από ορισμένους τύπους *Bacillus*. Η μηνιγγίτιδα και οι λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος είναι μόνο δύο από τις πολλές ασθένειες που προκαλεί ο *S. marcescens* στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Ο *Staphylococcus aureus* συνδέεται τόσο με το σύνδρομο τοξικού σοκ (TSS) όσο και με το σταφυλοκοκκικό σύνδρομο καμένου δέρματος (SSSS).

Οι MIC για τους προσδέτες κυμαίνονται από 200 μM έως 575 μM και εκείνες για τα σύμπλοκα μεταξύ 30 μM και 125 μM . Οι περισσότερες από τις ουσίες έχουν σημαντική αντιμικροβιακή δράση, όπως προκύπτει από τα ευρήματα. Το μόριο 5c, το οποίο περιέχει ένα ηλεκτραρνητικό F ως στοιχείο υποκατάστασης στην *πάρα*-θέση, παρουσίασε την πιο ισχυρή αντιβακτηριακή δράση, με τιμές MIC μεταξύ 30 και 75 μM έναντι όλων των εξεταζόμενων βακτηριακών ειδών. Η ένωση 5a είχε επίσης τις χαμηλότερες τιμές MIC (35 μM για το *B. subtilis* και 70 μM για το *E. coli*), υποδηλώνοντας την ισχυρή της δράση.



Σχήμα 2.3.7: Ελάχιστες τιμές ανασταλτικής συγκέντρωσης των συντιθέμενων ενώσεων, (Thakor, et al. 2018)

Οι ενώσεις δοκιμάστηκαν επίσης για την αποτελεσματικότητά τους έναντι του άκρως παθογόνου στελέχους *Mycobacterium Tuberculosis H37Rv*(*M TB0*). Υψηλότερες τιμές MIC παρατηρούνται για τις ενώσεις 5c και 5d, οι οποίες περιέχουν το πιο ηλεκτραρνητικό F ως υποκαταστάτη. Τα σύμπλοκα 5b (με μεγαλύτερο και λιγότερο ηλεκτραρνητικό Br ως βοηθητικό στοιχείο) και 5f (με MIC >250 $\mu\text{g mL}^{-1}$) είναι τα λιγότερο δραστικά από τα σύμπλοκα. Τα συνήθη φάρμακα όπως η ριφαμπικίνη και η ισονιζιδία είναι πιο αποτελεσματικά από οποιαδήποτε από αυτές τις ουσίες.

Ενώσεις	LC ₅₀ $\mu\text{g/mL}$	Αντιμυκοβακτηριακό MIC
4a	16.18	-
4b	17.81	-
4c	13.58	-
4d	14.70	-
4e	16.90	-
4f	14.45	-
5a	11.95	250
5b	12.10	250
5c	5.93	62.5
5d	8.63	62.5
5e	9.45	100
5f	10.97	100

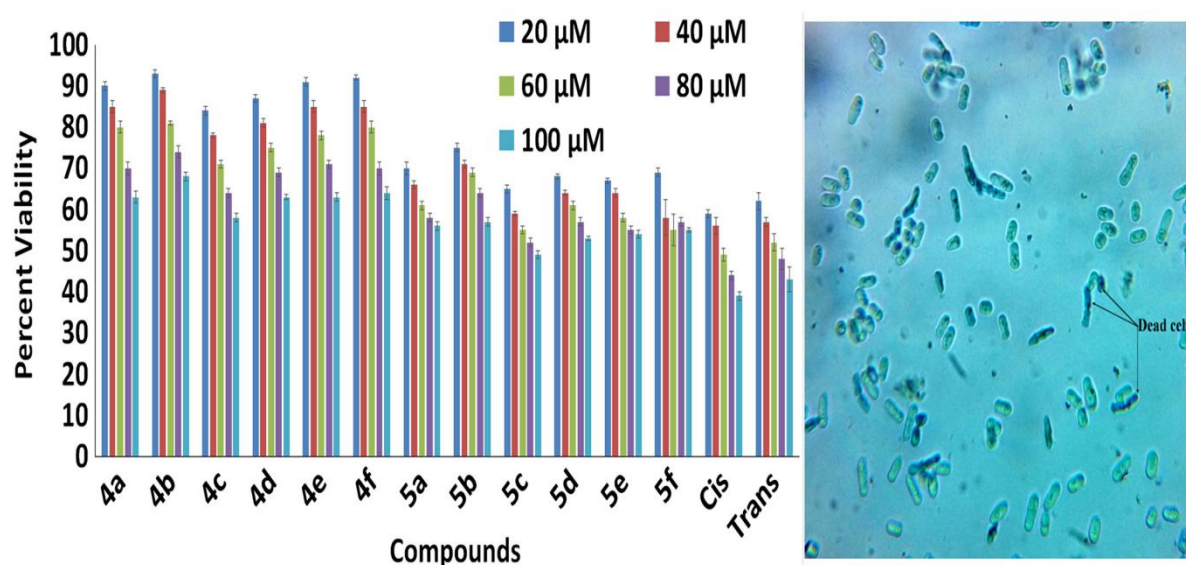
Πίνακας 2.3.8: Τιμές LC₅₀ (*in vitro* κυτταροτοξικότητα) και αντιμυκοβακτηριακή τιμή MIC των ελεύθερων προσδετών και των συντιθέμενων συμπλόκων (Thakor, et al. 2018)

	MIC(μM)				
Ενώσεις	Gram +		Gram -		
	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
4a	300	295	435	340	420
4b	350	340	475	350	435
4c	225	200	400	273	330
4d	250	260	420	285	355
4e	285	270	500	240	300
4f	320	345	575	260	360
Άλας Pd	2240	2490	2145	1940	2820
5a	45	35	85	75	70
5b	55	40	100	85	90
5c	30	45	60	35	75
5d	45	55	75	45	80
5e	40	60	95	65	85
5f	65	65	125	80	115

Πίνακας 2.3.9: IC50 των προσδετών και των συντιθέμενων συμπλόκων με όρους MIC, σε Μμ, (Thakor, et al. 2018)

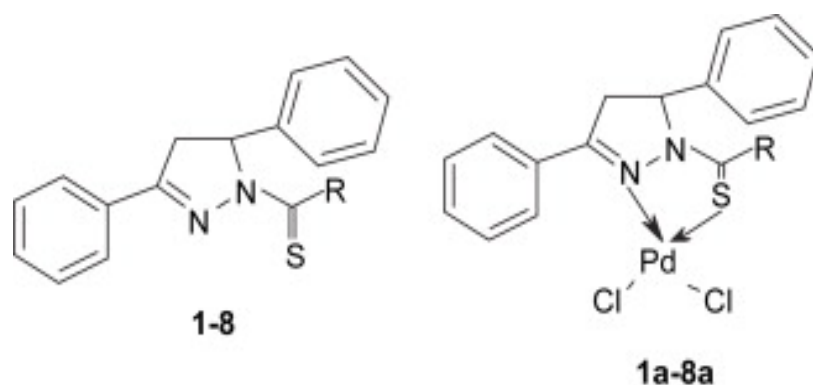
Το πείραμα θνησιμότητας σε γαρίδες άλμης είναι μια πολύτιμη μέθοδος για τη δοκιμή ουσιών για κυτταροτοξικότητα *in vitro*. Η τιμή LC50 των ουσιών προσδιορίστηκε με τη γραφική παράσταση του λογαρίθμου της ποσότητας του δείγματος έναντι του ποσοστού θανάτου. Οι ουσίες έχουν τιμές LC50 μεταξύ 5,93 και 17,81. Η θνησιμότητα των συνθετικών ουσιών αυξάνεται σε σχέση με τη συγκέντρωσή τους. Το 5c είναι το πιο ισχυρό μόριο, ακολουθούμενο από τα 5d, 5e, 5f, 5a και τέλος το 5b.

Επειδή πολλά γονίδια του *Schizosaccharomyces pombe* είναι παρόμοια με ανθρώπινα, είναι ένας χρήσιμος οργανισμός για τη διερεύνηση σε βλάβες του DNA. Ως εκ τούτου, οι επιστήμονες βασίστηκαν σε αυτό για τη διεξαγωγή δοκιμής κυτταροτοξικότητας *in vitro*. Πρότυπα φάρμακα όπως η τρανσπλατίνη και το σισπλατίνη έχουν χρησιμοποιηθεί για να ελεγχθεί η θανατηφόρα δράση συνθετικών ουσιών στα κύτταρα του *S. pombe* σε κυτταρικό επίπεδο. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η θανατηφόρα δράση των ουσιών αυξάνεται όσο αυξάνονται οι συγκεντρώσεις τους. Οι ενώσεις αυτές υπερτερούν από άποψη κυτταροτοξικότητας των προηγουμένως αναφερθέντων συμπλόκων Ru με βάση την πυραζολίνη. Η υψηλότερη κυτταροτοξικότητα παρατηρείται για τις ενώσεις 5c, 5d και 5e, ενώ η χαμηλότερη κυτταροτοξικότητα παρατηρείται για τις ενώσεις 5a, 5b και 5f. Λόγω της τοξικότητας των χημικών ουσιών, πολλά κύτταρα *S. pombe* πέθαναν μετά από 17 ώρες θεραπείας. Τα πειράματα δείχνουν, για άλλη μια φορά, ότι η χηλική σύνδεση με παλλάδιο αυξάνει τη θανατηφόρα δράση των συνδέσμων.



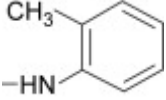

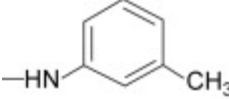

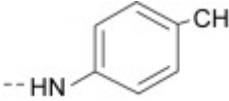

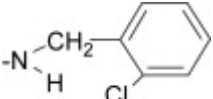
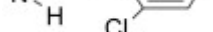
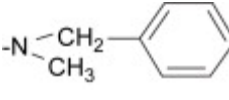

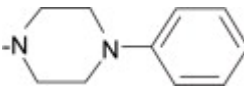

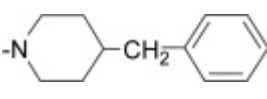



Σχήμα 2.3.10: Κυτταροτοξική επίδραση των ενώσεων στα κύτταρα *S. Pombe* σε πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις (αριστερά) και κύτταρα *S. Pombe* μετά από επεξεργασία με τις ενώσεις (δεξιά), (Thakor, et al. 2018)

3. Η ερευνητική ομάδα με επικεφαλής την\τον Asha Budakoti (Budakoti, Amir and Abid 2006) δημιούργησε σύμπλοκα παλλαδίου με βάση την πυραζολίνη και δοκίμασαν την αποτελεσματικότητά τους κατά της *E. histolytica*.



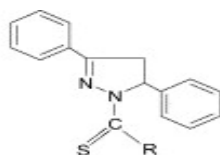
Σχήμα 2.3.11 : 1-8: Τα ελεύθερα μόρια Πυραζολίνης. 1a-8a: Τα μεταλλικά σύμπλοκα των πυραζολινών, με Pd, (Budakoti, Amir and Abid 2006)

Χρησιμοποιώντας το στέλεχος HM1:1MSS της *E. histolytica*, η *in vitro* δραστηριότητα όλων των 1-N-θειοκαρβαμοϋλ-3,5-διφαινυλ-2-πυραζολινών και των ενώσεών τους Pd(II) συγκρίθηκε με εκείνη του gold standard αντιαμοιβαδικού φαρμάκου, της μετρονιδαζόλης. Με βάση τα αποτελέσματα, η 50% περιοριστική δόση της μετρονιδαζόλης ήταν 1,82 μM . Η τιμή IC_{50} για τα μη δεσμευμένα ligands (1-8) κυμαινόταν από 0,38 έως 11,02 μM . Δοκιμάστηκαν τρεις ενώσεις, μία με μια όρθο-, μία άλλη με μια μέτα- και η τρίτη με μια μεθυλομάδα σε θέση πάρα- : η ένωση 3 με τη μεθυλομάδα σε θέση πάρα- ήταν η πιο ισχυρή ($\text{IC}_{50} = 0,38 \mu\text{M}$). Η προσθήκη παλλαδίου στο μοριακό σκελετό της χημικής ένωσης 3 αυξάνει τη δράση της ($\text{IC}_{50} = 0,05 \mu\text{M}$). Οι ερευνητές υπολόγισαν επίσης την τιμή IC_{50} για το πρόδρομο σύμπλοκο Pd, αποδεικνύοντας ότι είναι ανενεργό έναντι του *E. histolytica*

Ενώσεις	R	IC ₅₀ (μM)
1		4.79
1a		4.58
2		10.7
2a		1.82
3		0.38
3a		0.05
4		11.0
4a		1.24
5		2.80
5a		0.70
6		1.8
6a		0.76
7		1.60
7a		0.40
8		0.45
8a		1.10
[Pd(DMSO) ₂ Cl ₂]		8.15
Μετρονιδαζόλη		1.82

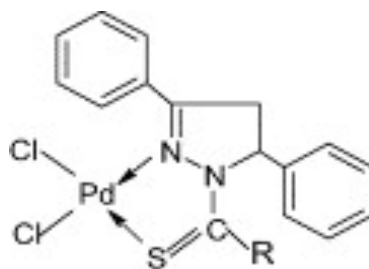
Πίνακας 2.3.12 :*In vitro* αντιαιμοιβαδικές δράσεις 1-N-υποκατεστημένων θειοκαρβαμυλ-3,5-διφαινυλοπυραζολινικών παραγώγων και των συμπλόκων τους Pd(II) έναντι στελέχους (HM1:IMSS) της *E. Histolytica*. Όπου R=υποκαταστάτης

4. Η ίδια ερευνητική ομάδα (Budakoti, Azam and Abid 2005) πραγματοποίησε ένα παρόμοιο πείραμα με το προηγούμενο, μόνο που αυτή την φορά, οι ενώσεις που συντέθηκαν δοκιμάστηκαν έναντι του μικροβίου *E.Histolytica*. Το φάρμακο αναφοράς ήταν η μετρονιδαζόλη, η οποία είχε IC_{50} 1.8 μ M. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα για τον προσδιορισμό των αντιαιμοιβαδικών δράσεων *in vitro* έναντι του στελέχους *HM1:IMSS* της *E. histolytica*.



Compound	R	Compound	R
1.		2.	
3.		4.	
5.		6.	
7.		8.	

Σχήμα 2.3.13: Δομή των 1-N-υποκατεστημένων θειοκαρβαμυλ-3,5-διφαινυλ-2-πυραζολινών (1-8), (Budakoti, Azam and Abid 2005)



Σχήμα 2.3.14: Δομή των συμπλόκων Pd(II) της 1-N-υποκατεστημένης θειοκαρβαμοϋλ-3,5-διφαινυλ-2-πυραζολίνης (1a-8a), (Budakoti, Azam and Abid 2005)

Με το στέλεχος *HM1:IMSS* της *E. histolytica*, οι ερευνητές εξέτασαν τις *in vitro* αντιαμοιβαδικές δράσεις των 1-N-υποκατεστημένων-3, 5-διφαινυλ-2-πυραζολινών 1-8 και των συμπλόκων τους 1a-8a για να προσδιορίσουν εάν τα μεταλλικά σύμπλοκα ήταν πιο αποτελεσματικά από τις ελεύθερες πυραζολίνες. Ως πρότυπο χρησιμοποιήθηκε η τιμή IC_{50} 1,8 μ M για την ουσία μετρονιδαζόλη. Τα αποτελέσματα IC_{50} για την πυραζολίνη 1-8 κυμάνθηκαν από 5,34 έως 1,1 μ M. Εκείνα με υποκαταστάσεις 1-N της αδαμαντυλοαμίνης (4, IC_{50} = 1,39 μ M) και της 4-μεθυλοπιπεριδίνης (7, IC_{50} = 1,1 μ M) ήταν τα πιο ισχυρά. Τα σύμπλοκα 1a-8a, παρουσίασαν τιμές IC_{50} στο εύρος από 0,42 έως 2,24 μ M. Όλες οι ενώσεις ήταν πιο δραστικές από τους προσδέτες τους.

Επιπλέον, οι τιμές IC_{50} για τα σύμπλοκα 2a-4a και 6a-8a ήταν χαμηλότερες από εκείνες της μετρονιδαζόλης, υποδεικνύοντας ότι ήταν πιο δραστικά. Όταν ένα ligand υφίσταται συμπλοκοποίηση, η δραστικότητά του αυξάνεται. Αυτό μπορεί να οφείλεται στη χηλική σύνδεση, η οποία, ως γνωστόν, μειώνει την πολικότητα του κεντρικού μεταλλικού στοιχείου, καθώς μοιράζεται εν μέρει το θετικό φορτίο του με το ligand.

Μπορεί να συναχθεί το συμπέρασμα ότι οι αντιαμοιβαδικές δράσεις βελτιώθηκαν σημαντικά με την παρουσία αυτών των ογκωδών ομάδων στη θέση 1-N της ομάδας θειοκαρβαμοϋλίου. Επιπλέον, το σύμπλοκο 4a έχει το υψηλότερη αντιαμοιβαδική δράση, με τιμή IC_{50} 0,42 μ M. Εκτός από τη δοκιμή των συμπλόκων Pd(II) και της μετρονιδαζόλης για την ικανότητά τους να σκοτώνουν το *E. histolytica*, η πρόδρομη ουσία του συμπλόκου Pd [Pd(DMSO)₂Cl₂] δοκιμάστηκε επίσης για τις αντιαμοιβαδικές ιδιότητές της.

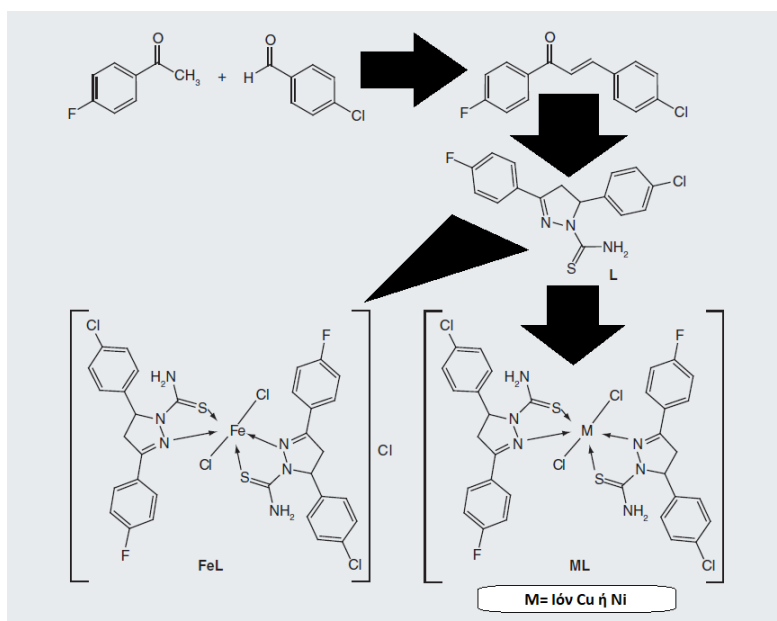
Ενώσεις	IC₅₀(μM)
1	3.90
1a	2.24
2	2.23
2a	1.44
3	2.03
3a	0.70
4	1.39
4a	0.42
5	5.34
5a	2.08
6	2.23
6a	0.77
7	1.10
7a	0.83
8	2.70
8a	0.90
Pd(DMSO)₂Cl₂	8.15
Μετρονιδαζόλη	1.8

Πίνακας 2.3.15: *In vitro* αντιαμοιβαδικές δράσεις των 1-N-υποκατεστημένων θειοκαρβαμοϋλ-3-φαινυλ-2-πυραζολινών(1-8) και των συμπλόκων Pd(II) (1a-8a) κατά του στελέχους (*HM1:IMSS*) της *E. Histolytica*, (Budakoti, Azam and Abid 2005)

2.4 Μεταλλικά σύμπλοκα Πυραζολίνης με Fe

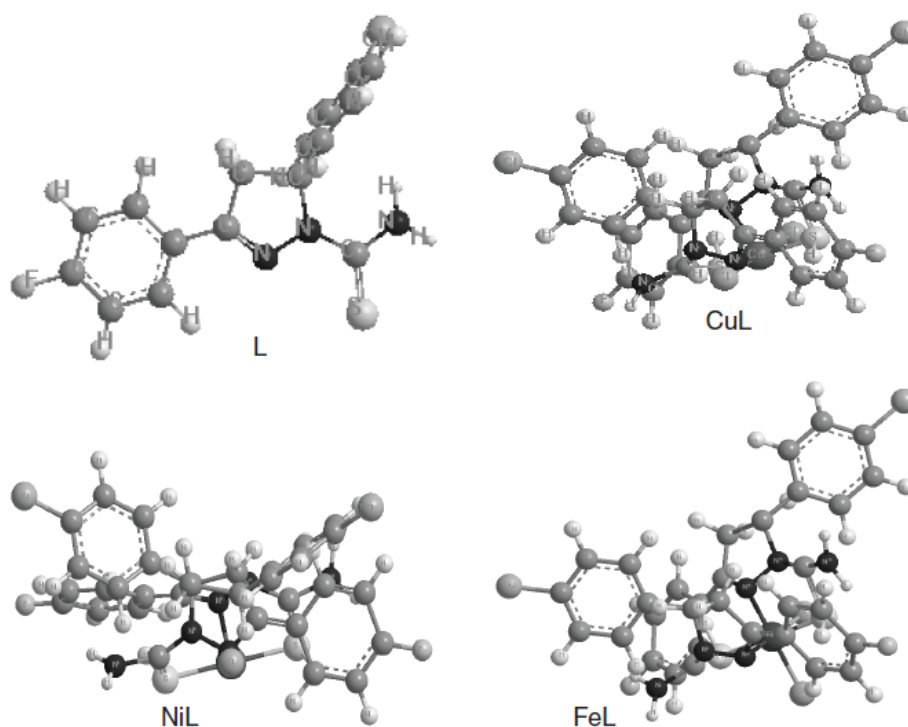
Ο σίδηρος είναι ένα απαραίτητο οξειδοαναγωγικό στοιχείο που χρησιμεύει ως συμπράγοντας σε πολυάριθμες μεταβολικές οδούς. Πολλά ένζυμα επιδιόρθωσης του DNA (ελικάσες, νουκλεάσες, γλυκοζυλάσες, απομεθυλάσες) και η αναγωγή των ριβονουκλεοτιδίων απαιτούν σίδηρο ως συμπράγοντα για τη δραστηριότητά τους. Πρόσφατα εκπληκτικά ευρήματα δείχνουν ότι η καταλυτική υπομονάδα των DNA πολυμεράσεων περιέχει επίσης μοτίβα πλούσια σε κυστεΐνη που δεσμεύουν συστάδες σιδήρου-θείου (Fe/S), οι οποίες είναι απαραίτητες για το σχηματισμό σταθερών και ενεργών συμπλόκων. Κατά συνέπεια, μιτοχονδριακές και κυτταροπλασματικές ατέλειες στη βιογένεση των συστάδων Fe/S και στην εισαγωγή τους στα πυρηνικά ένζυμα που απαιτούν σίδηρο και εμπλέκονται στη σύνθεση και την επιδιόρθωση του DNA έχουν ως αποτέλεσμα βλάβες στο DNA και γονιδιωματική αστάθεια. Επιπλέον, ένα μοντέλο μεταφοράς φορτίου DNA καταδεικνύει πως τα οξειδοαναγωγικά ενεργά κέντρα Fe/S που υπάρχουν στα συστατικά των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA είναι απαραίτητα για την ανίχνευση και την επιδιόρθωση των αναντιστοιχιών DNA κατά μήκος του γονιδιώματος μέσω μεταφοράς φορτίου μεγάλης εμβέλειας μέσω του δίκλωνου DNA. Η ομοιόσταση του σιδήρου είναι ουσιώδης για την υγεία, καθώς η διατάραξή της επηρεάζει πάντα τις λειτουργίες των πρωτεϊνών που απαιτούν σίδηρο και συνδέεται γενετικά με ασθένειες στα θηλαστικά που χαρακτηρίζονται από ελαττωματική επιδιόρθωση του DNA. Για να εξασφαλίσουν τη σταθερότητα του γονιδιώματος και την ανάπτυξη των κυττάρων, οι οργανισμοί έχουν αναπτύξει πολυεπίπεδους μηχανισμούς για τη ρύθμιση της ισορροπίας του σιδήρου. Έχοντας υπόψιν την σχέση του σιδήρου με το DNA, ας δούμε τις έρευνες που διεξήχθησαν οι οποίες μελετάνε τα σύμπλοκα πυραζολίνης-σιδήρου και τις βιολογικές τους δραστηριότητες.

1. Ο/Η Saleem και οι συνεργάτες του/της (Saleem, et al. 2013) πραγματοποίησε σύνθεση ενώσεων με βάση την πυραζολίνη με χαλκό, νικέλιο και σίδηρο.



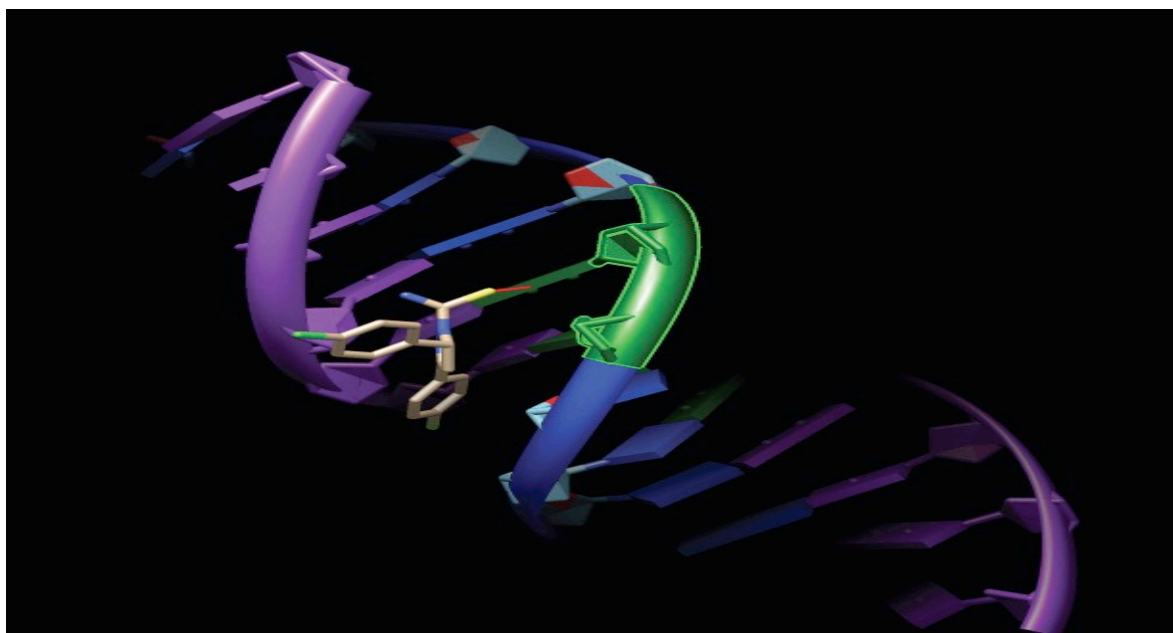
Σχήμα 2.4.1: Σύνθεση των L, CuL, NiL και FeL, (Saleem, et al. 2013)

Χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτομετρική ανάλυση για τον προσδιορισμό της σταθερότητας των ενώσεων σε κανονικό pH. Ο μηχανισμός πρόσδεσης του ligand στο DNA αναλύθηκε με προσομοιώσεις σε υπολογιστή. Χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτομετρική ανάλυση για τον προσδιορισμό των σταθερών πρόσδεσης του ligand και των ενώσεών του στο DNA. Χρησιμοποιήθηκαν RBC κουνελιών σε δοκιμές αιμόλυσης του φαρμάκου και των ενώσεών του (RBC). Τέλος, οι κυτταρικές σειρές MCF-7 υποβλήθηκαν στη δοκιμή εσωτερικού άλατος βρωμιδίου του 3-(4,5-διμεθυλοθειαζόλ-2-υλ)-2,5-διφαινυλοτετραζολίου (MTT) για τη διερεύνηση των αντικαρκινικών χαρακτηριστικών τους.

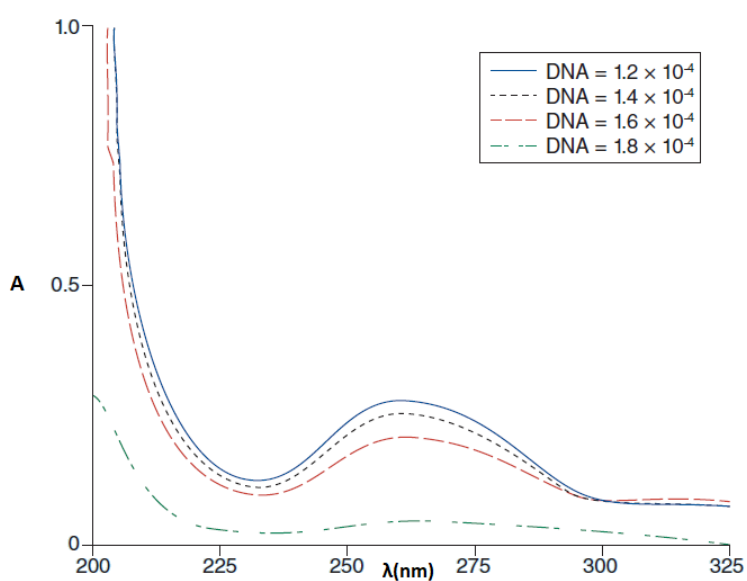


Εικόνα 2.4.2: Οι πιο σταθερές 3D-διαμορφώσεις των CuL, NiL και FeL, (Saleem, et al. 2013),

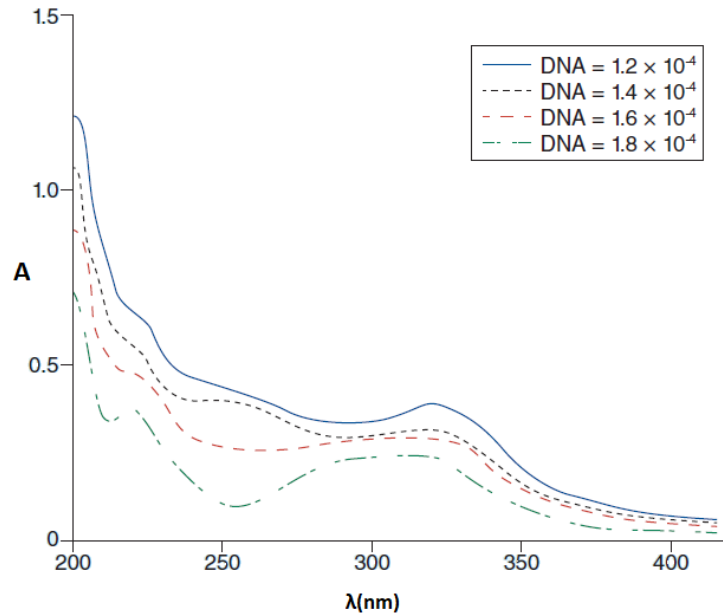
Τα σύμπλοκα συνδέονται με το DNA αρκετά ισχυρά, όπως υποδεικνύεται από τους συντελεστές σύνδεσης DNA (Kb) 1,42 10⁴, 3,16 10⁴, 5,82 10⁵ και 6,72 10⁵ mol⁻¹ για τα σύμπλοκα του ligand, του χαλκού, του νικελίου και του σιδήρου, αντίστοιχα. Λόγω της ύπαρξης επιπλέον φορτίου στο κέντρο ιόντων μετάλλου στο σύμπλοκο και της παρουσίας κενών d-τροχιακών, τα σύμπλοκα μετάλλων συνήθως προσδένονται στο DNA πιο αποτελεσματικά από τα ligands τους. Η ηλεκτροστατική έλξη μεταξύ του ιόντος μετάλλου σιδήρου στο FeL και της αρνητικά φορτισμένης φωσφορικού σκελετού του DNA είναι μεγαλύτερη από εκείνη μεταξύ των διθετικών ιόντων στα CuL και NiL και μπορεί να εξηγήσει γιατί το σύμπλοκο σιδήρου έχει μεγαλύτερη σταθερά σύνδεσης από τα σύμπλοκα χαλκού και νικελίου.



Εικόνα 2.4.3: Μοντέλο μοριακής πρόσδεσης που δείχνει το μόριο του προσδέτη να αλληλοεπιδρά με το μόριο DNA μέσω της δευτερευούσης αύλακος (Ένας από τις πιθανούς μηχανισμούς για το αντικαρκινική δράση των μεταλλοφαρμάκων) (Saleem, et al. 2013).

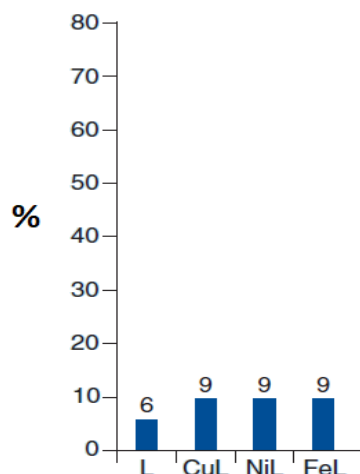


Σχήμα 2.4.4: Φασματικά ίχνη απορρόφησης του **L** ($1,6 \times 10^{-4}$ M) παρουσία αυξανόμενων ποσοτήτων DNA από θύμο μοσχαριού ($1,2-1,8 \times 10^{-4}$ M), (Saleem, et al. 2013)



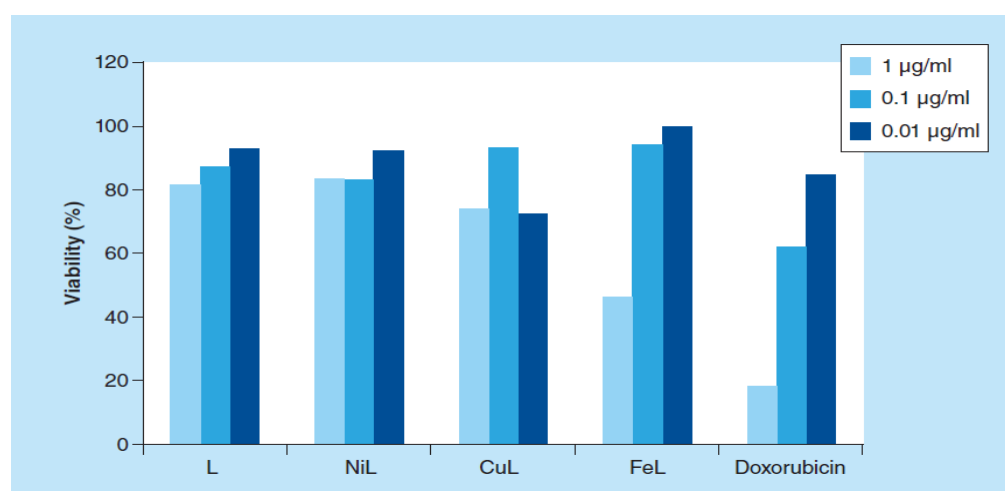
Σχήμα 2.4.5: Φασματικά ίχνη απορρόφησης του FeL ($1,6 \times 10^{-4}$ M) παρουσία αυξανόμενων ποσοτήτων DNA από θύμο μοσχαριού ($1,2-1,8 \times 10^{-4}$ M), (Saleem, et al. 2013)

Γενικά, οι ουσίες με τιμή αιμολυτικότητας μικρότερη από 2% θεωρούνται μη αιμολυτικές. Οι αιμολυτικές ενώσεις ταξινομούνται ως ήπιες, μέτριες ή σοβαρές, με τις ήπιες αιμολυτικές ενώσεις να έχουν δυναμικό αιμόλυσης 2% έως 10%, τις ενδιάμεσες αιμολυτικές ενώσεις να έχουν δυναμικό αιμόλυσης 10 έως 20% και τις σοβαρές αιμολυτικές ενώσεις να έχουν δυναμικό αιμόλυσης 20% έως 40%. Οι ουσίες με δυναμικό αιμόλυσης μεγαλύτερο από 40% ταξινομούνται ως εξαιρετικά αιμολυτικές. Στα 100 $\mu\text{g/ml}$, το ligand εμφανίζει 6% αιμόλυση, ενώ όλες οι ενώσεις εμφανίζουν 9% αιμόλυση. Αυτό καταδεικνύει ότι όλες οι ενώσεις είναι ήπια αιμολυτικές. Οι αιμολυτικές ενώσεις ταξινομούνται ως ήπιες, μέτριες ή σοβαρές, με τις ήπιες αιμολυτικές ενώσεις να έχουν δυναμικό αιμόλυσης 2% έως 10%, τις ενδιάμεσες αιμολυτικές ενώσεις να έχουν δυναμικό αιμόλυσης 10 έως 20% και τις σοβαρές αιμολυτικές ενώσεις να έχουν δυναμικό αιμόλυσης 20% έως 40%.



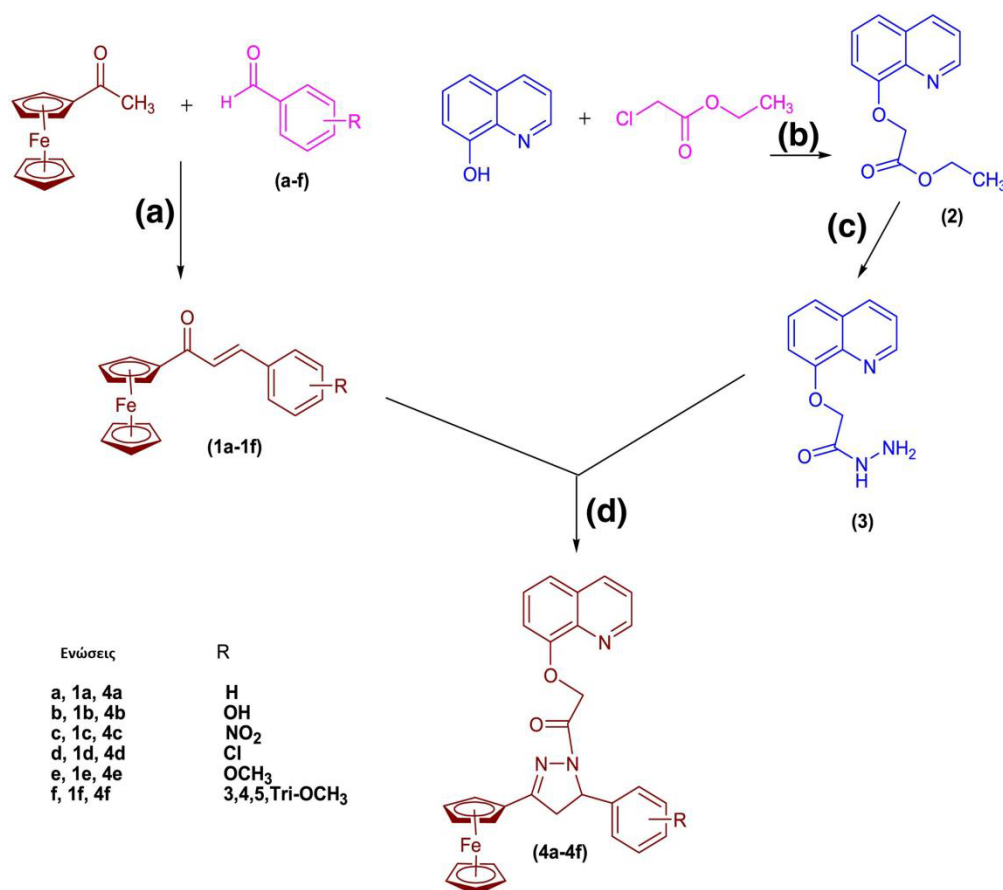
Σχήμα 2.4.6: Ποσοστό αιμόλυσης που προκαλείται από τις εξεταζόμενες ενώσεις L, CuL, NiL και FeL, σε συγκέντρωση 100 µg/ml (Saleem, et al. 2013)

Η δοκιμή βιωσιμότητας των παρασκευασμένων ουσιών χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση της αντικαρκινικής τους αποτελεσματικότητας. Η μέγιστη καταστολή όλων των συνθετικών ουσιών κατά των κυττάρων *MCF-7* παρατηρήθηκε στα 1 µg/ml (43,92%), ενώ οι L, CuL και NiL παρουσίασαν 75,60, 82,64 και 84,0% βιωσιμότητα, αντίστοιχα. Ο τύπος κυττάρων *MCF-7* εξετάστηκε επίσης παρουσία μεταλλικών ιόντων όπως Cu, Ni και Fe και διαπιστώθηκε ότι τα ιόντα αυτά δεν είχαν καμία επίδραση στην κυτταρική βιωσιμότητα.



Εικόνα 2.4.7: Ποσοστιαία βιωσιμότητα των κυττάρων *MCF-7* λόγω L, CuL, NiL και FeL σε συγκεντρώσεις 0,01, 0,1 και 1,0 µg/ml, (Saleem, et al. 2013)

2. Προκειμένου να εξετάσουν τις πιθανές φαρμακευτικές χρήσεις αυτών των ενώσεων, η Humaira Parveen και οι συνεργάτες της (Parveen, et al. 2018) δημιούργησαν έναν αριθμό οργανομεταλλικών ενώσεων με βάση την πυραζολίνη με μόρια σιδηροκένιου και κινολίνης, οι οποίες δοκιμάστηκαν σε αντιμικροβιακές μελέτες *in vitro* έναντι δεκαπέντε βακτηριακών και μυκητιακών στελεχών ATCC. Οκτώ βακτηριακές (*Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus bovis*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, ανθεκτικός στη μεθικιλίνη *Staphylococcus aureus*, και *Streptococcus mutans*) και επτά μυκητιασικούς (*Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida kefyr* και *Candida Krusei*).



Σχήμα 2.4.8: Γενική σύνθεση των ενώσεων με βάση την πυραζολίνη (4a-4f) με μονάδες σιδηροσενιού και κινολίνης, (Parveen, et al. 2018)

Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν το αντιβιοτικό αμοξικιλίνη ως πρότυπο έναντι του οποίου θα μπορούσε να μετρηθεί η αντιμικροβιακή δράση άλλων ουσιών. Οι MIC για την αμοξικιλίνη έναντι των διαφόρων μικροβιακών ειδών βρέθηκαν να κυμαίνονται μεταξύ 8 και 64 μικρογραμμάτων ανά χιλιοστόλιτρο (μg/ml). Η αντιμικροβιακή δοκιμή έδειξε ότι όλες οι ουσίες είχαν αποτελεσματικές τιμές MIC έναντι των μικροβίων που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη. Η ένωση (4d) βρέθηκε να είναι το πιο υποσχόμενο αντιμικροβιακό οργανομεταλλικό παράγωγο, με τιμές MIC μεταξύ 8 και 32 μg/ml έναντι όλων των βακτηριακών ειδών που εξετάστηκαν. Εκτός από την ένωση (4d), η οποία εμφάνισε τιμές MIC 8 και 32 μg/ml κατά του *S. bovis* και του *E. coli*, αντίστοιχα (παρόμοιες με την αμοξικιλίνη), οι τιμές MIC για τις άλλες ενώσεις που δοκιμάστηκαν κυμαίνονταν από 16 έως 64 μg/ml. Τόσο η *Pyogenes aeruginosa* όσο και η *Streptococcus mutans*, οι οποίες είναι γνωστό ότι παράγουν βιοϋμένια, αναστέλλονταν από συγκεντρώσεις αυτών των ουσιών που κυμαίνονταν από 32 έως 64 g/ml.

Comp.	<i>P.Aeruginosa</i>	<i>S.Bovis</i>	<i>E.Fecaeilis</i>	<i>K.Pneumoniae</i>	<i>E.coli</i>	<i>E.Cloacae</i>	<i>MRSA</i>	<i>S.Mutans</i>
4a	32	32	16	32	32	32	64	323
4b	32	32	32	32	16	32	32	32
4c	32	32	16	32	16	64	32	32
4d	16	8	16	32	8	16	32	16
4e	32	16	16	32	32	32	32	32
4f	64	32	32	32	32	32	64	32
Amoxicillin	64	8	8	16	8	16	16	64

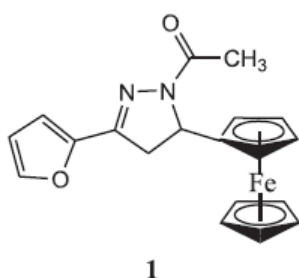
Πίνακας 2.4.9: Τιμές MIC (μg/ml) των ενώσεων (4a-4f) στα εξεταζόμενα βακτηριακά στελέχη ATCC, (Parveen, et al. 2018)

Ως πρότυπο για την αξιολόγηση της αντιμυκητιασικής αποτελεσματικότητας των υπό μελέτη ουσιών, χρησιμοποιήθηκε το ευρέως συνταγογραφούμενο φάρμακο diflucan για τη θεραπεία λοιμώξεων από *Candida*. Οι τιμές ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) για το diflucan έναντι όλων των εξεταζόμενων μυκήτων βρέθηκαν να είναι 64 µg/mL. Οι αντιμυκητιασικές δοκιμές έδειξαν ότι όλες οι εξεταζόμενες ενώσεις παρείχαν τιμή MIC που ήταν είτε συγκρίσιμη είτε μεγαλύτερη από το φάρμακο αναφοράς diflucan. Για παράδειγμα, όλες οι ενώσεις παρουσίασαν τιμή MIC 64 µg/ml κατά του *Candida dubliniensis*, η οποία είναι παρόμοια με τη φλουκοναζόλη. Αντιθέτως, οι τιμές MIC των ενώσεων (4a-4c, 4e) και (4f) κατά των *C. albicans* και *Candida parapsilosis* ήταν 32 µg/ml, καθιστώντας τις πιο αποτελεσματικές από τη διφλουκάνη. Η ένωση (4d) έδειξε την πιο πολλά υποσχόμενη δράση, με τιμή MIC 16 µg/ml έναντι των *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida parapsilosis*, *Candida kefyr* και *Candida krusei*, σημαντικά μεγαλύτερη αντιμυκητιασική δράση από το πρότυπο φάρμακο φλουκοναζόλη.

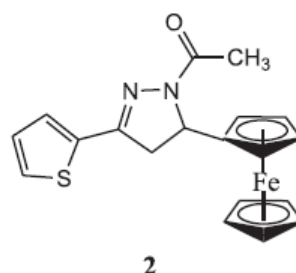
Comp.	<i>C.albicans</i>	<i>C.dubliniensis</i>	<i>C.glabrata</i>	<i>C.parapsilosis</i>	<i>C.tropicalis</i>	<i>C.kefyr</i>	<i>C.krusei</i>
4a	32	32	16	32	32	32	32
4b	32	32	32	32	16	32	32
4c	32	32	16	32	16	64	32
4d	16	8	16	32	8	16	16
4e	32	16	16	32	32	32	64
4f	64	32	32	32	32	32	64
Fluconazole	64	64	64	64	64	64	64

Πίνακας 2.4.10 : Τιμές MIC (µg/ml) των ενώσεων (4a-4f) στα εξεταζόμενα στελέχη μυκήτων ATCC, (Parveen, et al. 2018).

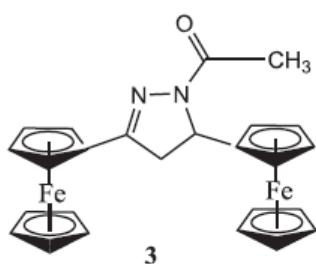
3. Κάποιοι ερευνητές (Bostancioğlu, et al. 2013) περιγράφουν ορισμένες ενώσεις με βάση την πυραζολίνη που συνέθεσαν σε προηγούμενη μελέτη και οι οποίες έχουν κυτταροτοξικές, αποπτωτικές, αντικαρκινικές και αντιαγγειογενετικές ιδιότητες.



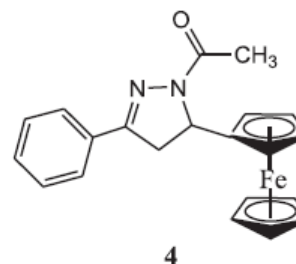
1 N-ακέτυλο-3-(2-φουρύλο)-5-φερροκένυλο-2 πυραζολίνη



2 N-ακέτυλο-3-(2-θειενύλο)-5-φερροκένυλο-2 πυραζολίνη



3 N-ακέτυλο-3,5-διφερροκένυλο-2 πυραζολίνη



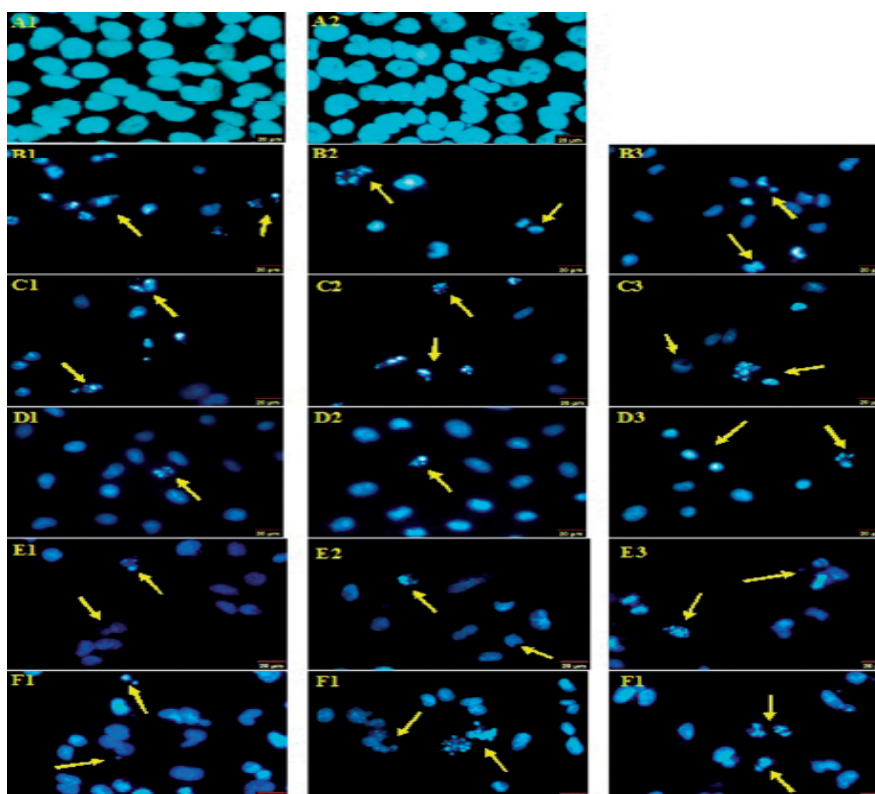
4 N-ακέτυλο-3-(2-φαινύλο)-5-φερροκενύλο-2 πυραζολίνη

Σχήμα 2.4.11: Χημικές δομές των συντιθέμενων N-ακετυλιωμένων φερροκενυλο-2-πυραζολινών (Bostancioğlu, et al. 2013).

Ο πολλαπλασιασμός τόσο των καρκινικών σειρών *A549* όσο και των *HUVECs* βρέθηκε να αναστέλλεται από τις ενώσεις και η επίδραση αυτή βρέθηκε να είναι τόσο χρόνο- όσο και δόσο-εξαρτώμενη. Η ένωση 1 βρέθηκε να είναι η πιο αποτελεσματική, με 50% αναστολή της ανάπτυξης σε ανθρώπινα κύτταρα *NSCLC* (*Non-small-cell lung cancer*) σε συγκεντρώσεις μεταξύ 100 και 400 μM . Περίπου 50% καταστολή της ανάπτυξης των κυττάρων *HUVEC* παρατηρήθηκε την 1η ημέρα σε συγκεντρώσεις της ένωσης 2 (350-400 μM), ενώ η τιμή IC_{50} βρέθηκε σε συγκεντρώσεις 100-150 μM την 2η ημέρα. Διαπιστώθηκε ότι χρειάστηκαν ποσότητες μεταξύ 300 και 400 μM της ένωσης 3 για να καταστείλει την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων κατά 50%, καθιστώντας την τη λιγότερο αποτελεσματική από τις τέσσερις ενώσεις που

δοκιμάστηκαν. Η δοκιμασία MTT έδειξε ότι μετά από 24 ώρες, η τιμή IC_{50} και των τεσσάρων ουσιών στα *HUVECs* ήταν περίπου 400 μ M και άνω.

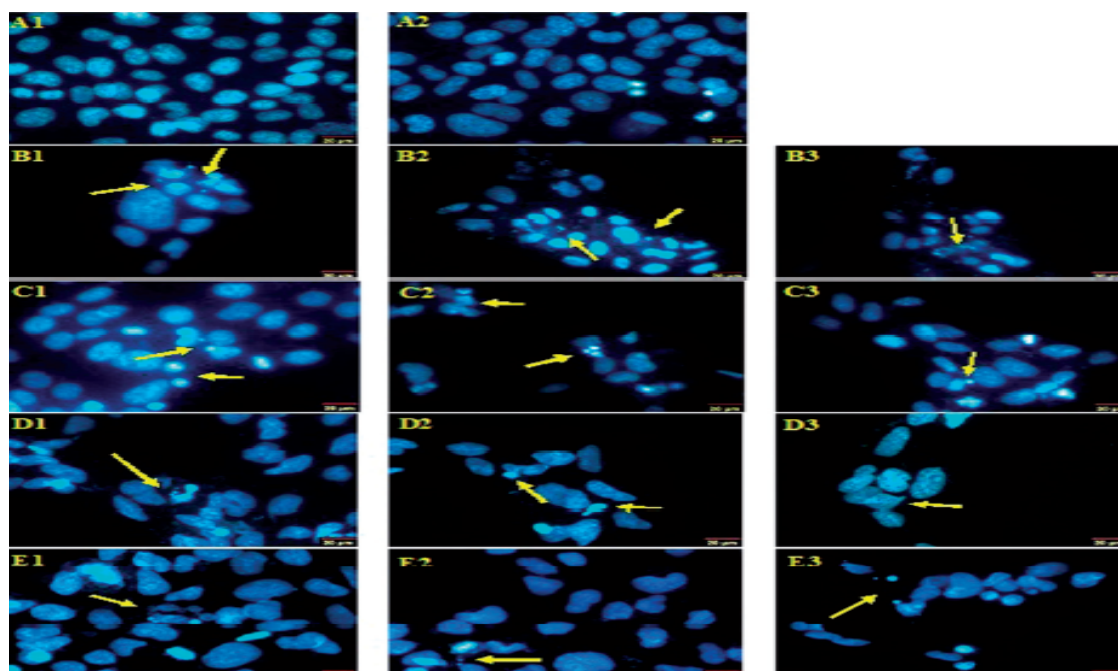
Η επισήμανση με DAPI επαλήθευσε επίσης το σχήμα απόπτωσης στις κυτταρικές δομές, συμπεριλαμβανομένης της συμπύκνωση της χρωματίνης. Για 12 ώρες, τα *HUVECs* και τα κύτταρα *A549* εκτέθηκαν σε 100, 200 και 300 μ M των χημικών ουσιών για τον προσδιορισμό του δυναμικού απόπτωσης (1-4). Το αντικαρκινικό φάρμακο σισπλατίνη χρησίμευσε ως σημείο αναφοράς για τη μελέτη. Υπήρξε δόσοεξαρτώμενη σχέση μεταξύ των δύο ουσιών δοκιμής και του κυτταρικού θανάτου απόπτωσης.



Εικόνα 2.4.12: Η επίδραση των ενώσεων, 1, 2, 3 και 4 στην ανίχνευση της απόπτωσης στα *HUVEC* αξιολογήθηκε με χρώση φθορισμού με DAPI, μια ουσία που δεσμεύει ειδικά το DNA. (A1) Κύτταρα ελέγχου και (A2) κύτταρα ελέγχου με διαλύτη DMSO. (B1) Τα *HUVECs* υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με ένωση 1/100 μ M, (B2) ένωση 1/200 μ M, (B3) ένωση 1/300 μ M, (C1) ένωση 2/100 μ M, (C2) ένωση 2/200 μ M, (C3) ένωση 2/300 μ M, (D1) ένωση 3/100 μ M, (D2) ένωση 3/200 μ M, (D3) ένωση 3/300 μ M, (E1) ένωση 4/100 μ M, (E2) ένωση 4/200 μ M και (E3) ένωση 4/300 μ M. Κλίμακα, 20 μ M, (Bostancıoğlu, et al. 2013).

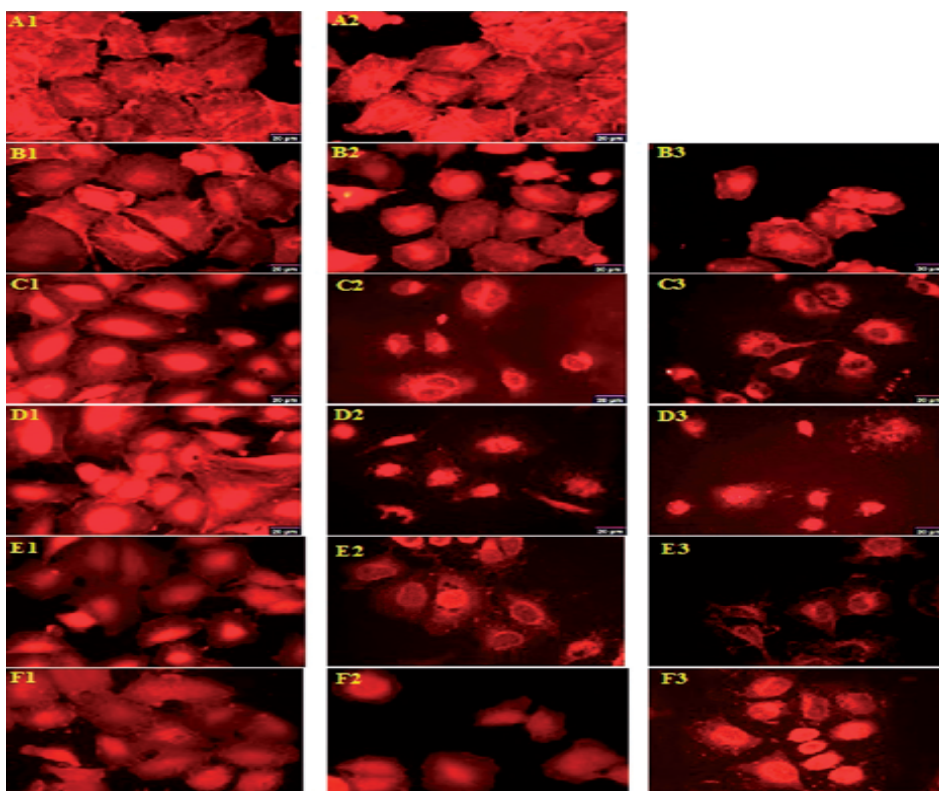
Η εμφάνιση αποπτωτικών σωμάτων έδειξε ότι η ένωση 2 προκάλεσε κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης, κυρίως σε καρκινικά κύτταρα. Τα ευρήματα από τη δοκιμή MTT ταιριάζουν με αυτά τα στατιστικά στοιχεία. Αντιθέτως, και οι δύο κυτταρικές σειρές εμφάνισαν συγκρίσιμες δομικές μεταβολές μετά από θεραπεία με τις χημικές ουσίες 1, 3 και 4.

Προσδιορίστηκε με τη θεραπεία των κυττάρων *A549* και *HUVEC* με αυξανόμενες ποσότητες των ουσιών(1-4) (100, 200 και 300 μ M) κατά πόσον ήταν σε θέση να μεταβάλουν ή όχι τη δομή των ινών τάσης της F-ακτίνης. Το αντικαρκινικό φάρμακο σισπλατίνη χρησιμοποιήθηκε ως φάρμακο αναφοράς.



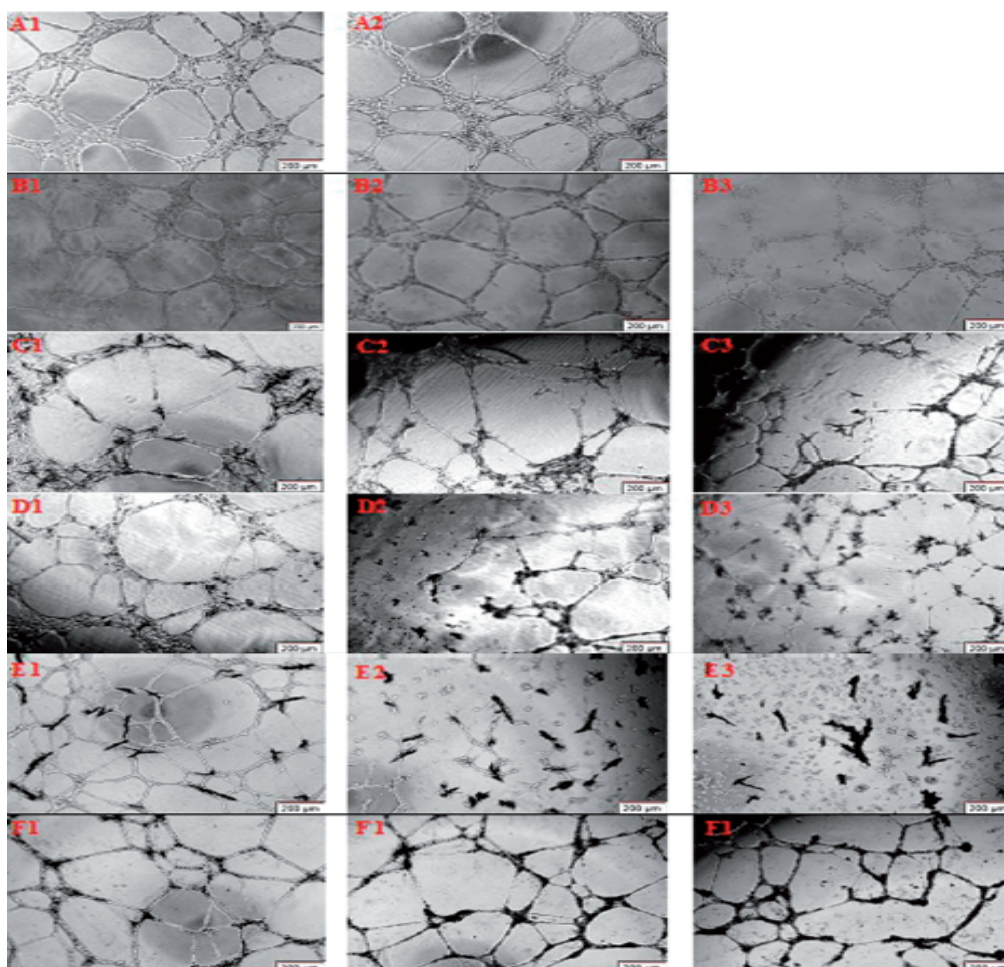
Εικόνα 2.4.13.: Η επίδραση των ενώσεων 1, 2, 3 και 4 στον πολυμερισμό των ινών τάσης ακτίνης στα κύτταρα *A549* αξιολογήθηκε με χρώση φθορισμού με TRITC φαλλοϊδίνη, μια ουσία που ανιχνεύει ειδικά την F-ακτίνη. (A1) Κύτταρα ελέγχου και (A2) κύτταρα ελέγχου με διαλύτη DMSO. (B1) Τα κύτταρα *A549* υποβλήθηκαν σε θεραπεία με σισπλατίνη 10 mM, (B2) Cisplatin 20 mM, (B3) Cisplatin 40 mM, (C1) ένωση 1/100 mM, (C2) ένωση 1/200 mM, (C3) ένωση 1/300 mM, (D1) ένωση 2/100 mM, (D2) ένωση 2/200 mM, (D3) ένωση 2/300 mM, (E1) ένωση 3/100 mM, (E2) ένωση 3/200 mM, (E3) ένωση 3/ 300 mM, (F1) ένωση 4/100 mM, (F2) ένωση 4/200 mM και (F3) ένωση 4/300 mM, (Bostancioglu, et al. 2013).

Αυτές οι νέες χημικές ουσίες ανέστειλαν τη συναρμολόγηση της μονομερούς ακτίνης, αποδεικνύοντας την ικανότητά τους να σταματούν την κυτταρική κίνηση. Μετά από 12 ώρες επαφής, τα κύτταρα έμοιαζαν διαφορετικά σε μέγεθος και μορφή από τα κύτταρα ελέγχου και είχαν χάσει τον όγκο τους και είχαν μειωθεί σε μέγεθος σε όλο το κυτταρικό σώμα. Στο κυτταρόπλασμα και των δύο κυτταρικών σειρών βρέθηκαν κοντές ίνες και ίνες στρες και τα κύτταρα είχαν μια αλλαγμένη ινώδη διάταξη νηματίων ακτίνης που ήταν ιδιαίτερα ξαφνική. Στα κύτταρα A549, ο σκελετός της ακτίνης διαταράχθηκε σαφώς από την έκθεση στις χημικές ουσίες 1, 2, 3 και 4, σε σύγκριση με τη σισπλατίνη. Και μετά από 12 ώρες θεραπείας με τις χημικές ουσίες, το σκελετικό δίκτυο των *HUVECs* είχε σχεδόν διαλυθεί.



Εικόνα 2.4.14: Η επίδραση των ενώσεων 1, 2, 3 και 4 στον πολυμερισμό ινών τάσης ακτίνης σε *HUVECs* αξιολογήθηκε με χρώση φθορισμού με TRITC φαλλοϊδίνη, μια ουσία που ανιχνεύει ειδικά την F-ακτίνη. (A1) Κύτταρα ελέγχου και (A2) κύτταρα ελέγχου με διαλύτη DMSO. (B1) Τα *HUVECs* υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με ένωση 1/100 mM, (B2) ένωση 1/200 mM, (B3) ένωση 1/300 mM, (C1) ένωση 2/100 mM, (C2) ένωση 2/200 mM, (C3) ένωση 2/300 mM, (D1) ένωση 3/100 mM, (D2) ένωση 3/200 mM, (D3)

ένωση 3/300 mM, (E1) ένωση 4/100 mM, (E2) ένωση 4/200 mM και (E3) ένωση 4/300 mM, (Bostancioglu, et al. 2013)



Εικόνα 2.4.15: Επίδραση των ενώσεων 1, 2, 3 και 4 στο σχηματισμό σωλήνων HUVEC. (A1) Κύτταρα ελέγχου και (A2) κύτταρα ελέγχου με διαλύτη DMSO. (B1) Τα HUVEC ήταν υποβλήθηκαν σε θεραπεία με θαλιδομίδη 100 mM, (B2) θαλιδομίδη 200 mM, (B3) θαλιδομίδη 400 mM, (C1) ένωση 1/100 mM, (C2) ένωση 1/200 mM, (C3) ένωση 1/300 mM, (D1) ένωση 2/100 mM, (D2) ένωση 2/200 mM, (D3) ένωση 2/300 mM, (E1) ένωση 3/100 mM, (E2) ένωση 3/200 mM, (E3) ένωση 3/300 mM, (F1) ένωση 4/100 mM, (F2) ένωση 4/200 mM και (F3) ένωση 4/300 mM, (Bostancioglu, et al. 2013)

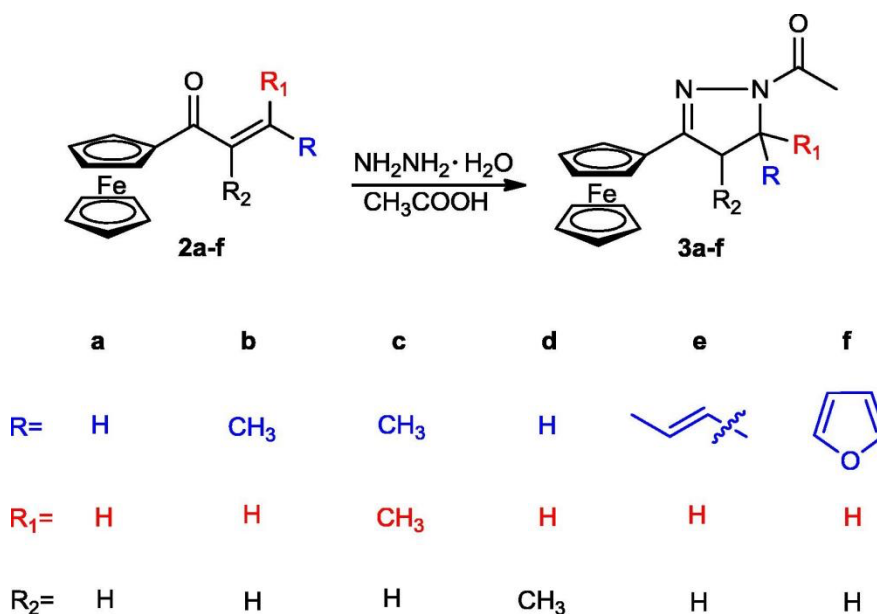
Χρησιμοποιήθηκαν επίσης δοκιμασίες σχηματισμού αποικιών σε μαλακό άγαρ για να εξεταστεί περαιτέρω εάν οι ουσίες είχαν ή όχι αντινεοπλασματικές επιδράσεις στα κύτταρα. Η ικανότητα των κυττάρων A549 να δημιουργούν αποικίες

παρεμποδίστηκε και η αναστολή αυτή διαπιστώθηκε ότι ήταν δόσοεξαρτώμενη. Τα μεγέθη και τα σχήματα των κοινοτήτων ήταν σημαντικά διαφορετικά. Παρόμοια με την ένωση 1, οι ενώσεις 2 και 3 επέφεραν σημαντικά μικρότερο αριθμό και μέγεθος αποικιών από την ένωση 1. Οι ενώσεις 2 και 3 υπερείχαν της ένωσης 1 κατά τουλάχιστον τρεις φορές όσον αφορά την ποσότητα των αποικιών που σχηματίστηκαν από τα κύτταρα A549. Με μια πρώτη ματιά, αυτό φαίνεται αντιφατικό, δεδομένου ότι πολλές αποικίες στην ομάδα των ενώσεων 2, 3 και 4 περιείχαν λιγότερα από 50 κύτταρα όταν εξετάστηκαν στο μικροσκόπιο. Με λίγα λόγια, οι χημικές ουσίες 3 και 4 παρεμπόδισαν την ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να δημιουργούν αποικίες *in vitro*.

	Αριθμός αποικιών(%Control)
DMSO 3 μg/ml	102.5227
Σισπλατίνη 10 μM	7.508
Σισπλατίνη 20 μM	2.1723
Σισπλατίνη 40 μM	1.811
Σισπλατίνη 80 μM	0
Ένωση (1) 100 μM	69.4218
Ένωση (1) 200 μM	53.1779
Ένωση (1) 300 μM	0
Ένωση (2) 100 μM	0
Ένωση (2) 200 μM	0
Ένωση (2) 300 μM	0
Ένωση (3) 100 μM	0
Ένωση (3) 200 μM	0
Ένωση (3) 300 μM	0.9469
Ένωση (4) 100 μM	0.23
Ένωση (4) 200 μM	0
Ένωση (4) 300 μM	0

Πίνακας 2.4.16: Η επίδραση των ενώσεων 1-2-3 και 4 στην ικανότητα σχηματισμού αποικιών των μη μικρών καρκινικών κυττάρων του πνεύμονα (A549) αξιολογήθηκαν με αποικία σε μαλακό άγαρ δοκιμασία σχηματισμού. Η σισπλατίνη χρησιμοποιείται ως θετικός έλεγχος, (Bostancioglu, et al. 2013)

4. Η Adrijana Burmudžija και οι συνεργάτες της (Burmudžija, et al. 2017) περιγράφουν τη σύνθεση και την αντιμικροβιακή δράση μιας σειράς νέων παραγώγων Fc (φερροκένιο-πυραζολίνης που προέρχονται από κετόνες (3a-3f).



Σχήμα 2.4.17: Οι δομές των χημικών ενώσεων 3a-3f, (Burmudžija, et al. 2017)

Δώδεκα διαφορετικά απομονωμένα μικρόβια, συμπεριλαμβανομένων παραγόντων ανθρώπινων, ζωικών και φυτικών ασθενειών, δημιουργών αφλατοξίνης και οργανισμών που σαπίζουν τρόφιμα, χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση της αντιμικροβιακής δράσης των ενώσεων 3a-στ. Επειδή οι τιμές MIC προσδιορίστηκαν με τη δοκιμή διαδοχικών διπλών αραιώσεων των χημικών ουσιών έναντι κάθε μικροβίου, σε πολλές περιπτώσεις οι τιμές MIC είναι πανομοιότυπες.

Οι ελάχιστες ανασταλτικές συγκεντρώσεις (MIC) για τις εξεταζόμενες ουσίες έναντι των μικροβίων κυμάνθηκαν από 0,039 έως 2,5 μg/mL. Τα *B. subtilis* και *B. cereus* είχαν τιμές MIC τόσο χαμηλές όσο 0,039 και 0,312 μg/mL, καθιστώντας τα πιο ευαίσθητα βακτήρια. Ο *S. aureus* ήταν μόνο μέτρια ευαίσθητος (MIC 0,078-1,25 μg/mL), ενώ ο *Proteus mirabilis* και ο *E. coli* ήταν τα πιο ανθεκτικά.

A/A	Μικροοργανισμοί											
	<i>S.aureus</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>B.cereus</i>	<i>E.coli</i>	<i>P.mirabilis</i>	<i>A.flavus</i>	<i>A.fumigatus</i>	<i>C.albicans</i>	<i>P.italicum</i>	<i>T.mentagrophytes</i>	<i>G.candidum</i>	<i>M.mucedo</i>
3a	0.312	0.156	0.078	0.625	0.312	2.5	2.5	1.25	2.5	1.25	1.25	2.5
3b	0.156	0.039	0.039	0.156	0.156	0.3	0.312	0.312	0.312	0.312	0.156	0.312
3c	0.312	0.078	0.078	0.312	0.312	2.5	0.625	0.625	1.25	0.625	0.625	0.625
3d	0.312	0.078	0.078	0.312	0.312	1.2	0.625	0.625	0.625	0.312	0.625	1.25
3e	0.078	0.039	0.039	0.156	0.156	0.3	0.312	0.312	0.312	0.156	0.312	0.156
3f	0.625	0.156	0.156	1.25	1.25	2.5	1.25	0.625	1.25	1.25	0.625	1.25
Αντιβιοτικά	0.031	0.016	0.016	0.062	0.062	0.1	0.156	0.031	0.156	0.078	0.078	0.156

Πίνακας 2.4.18: Αντιβακτηριακή και αντιμυκητιακή δράση των ενώσεων 3a-f, ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC). Οι τιμές δίνονται ως mg/ml.

Αντιβιοτικά: Στρεπτομυκίνη (για βακτήρια) και κετοконаζόλη (για μύκητες), (Burmudžija, et al. 2017)

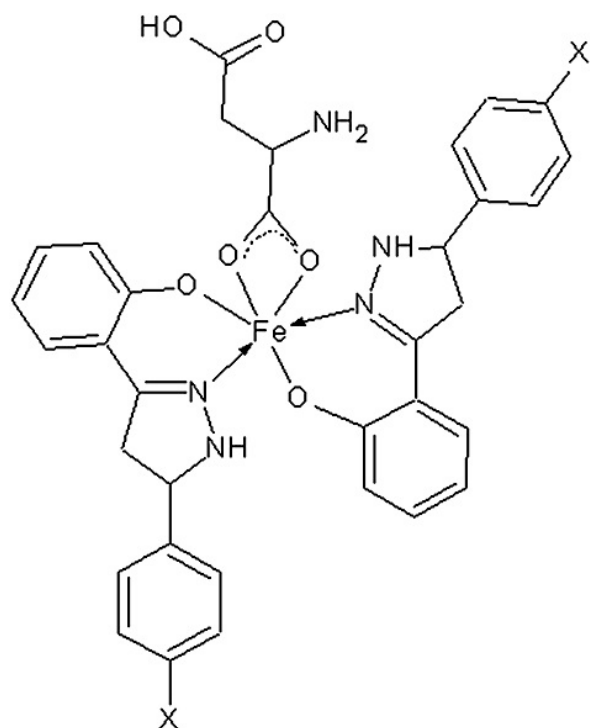
Ωστόσο, η αντιμικροβιακή αποτελεσματικότητα ήταν οριακά ισχυρότερη από την αντιμυκητιακή. Η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) για τους μύκητες που εξετάστηκαν ήταν μεταξύ 0,156 και 5 µg/mL. Οι τιμές MIC κυμάνθηκαν από 0,156 έως 1,25 µg/mL, με το *C. albicans* και το *Trichiphyton mentagrophytes* να παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη ευαισθησία. Οι υπόλοιποι μύκητες που εξετάσαμε παρουσίασαν ευαισθησία μεταξύ 0,312 και 5 µg/mL, το οποίο είναι ένα αρκετά ευρύ

φάσμα. Τα βακτήρια της ανάλυσης ήταν ανθεκτικά σε συγκέντρωση διαλύτη 5% DMSO.

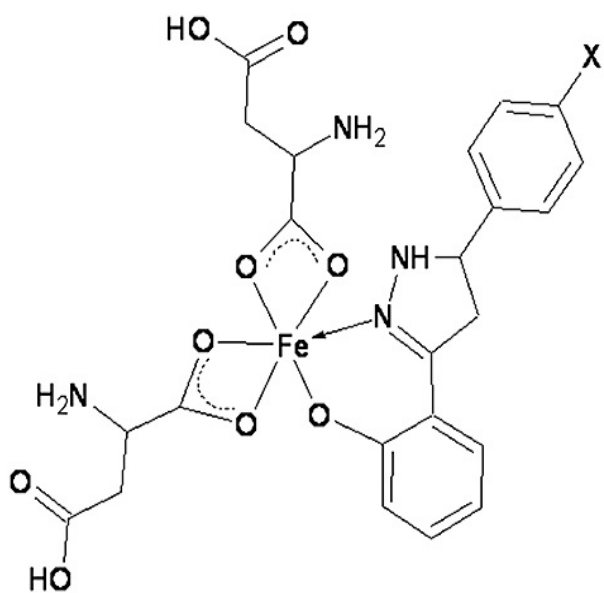
Η ανάπτυξη ορισμένων μικροβίων και μυκήτων παρεμποδίστηκε σημαντικά από το 3e, ακόμη και σε πολύ χαμηλές ποσότητες, σε σύγκριση με άλλες ουσίες που εξετάστηκαν. Δεδομένου ότι τα εν λόγω βακτήρια έδειξαν σημάδια ανάπτυξης ανοχής στα συνήθη αντιβιοτικά, η ουσία αυτή έχει τη δυνατότητα να χρησιμεύσει ως νέος, αποτελεσματικός αντιικός παράγοντας.

Το πιο εντυπωσιακό εύρημα αυτής της έρευνας ήταν ότι στις μεγαλύτερες ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν, οι ουσίες που εξετάστηκαν ήταν πιο αποτελεσματικές στην αναστολή της ανάπτυξης αρνητικών κατά Gram βακτηρίων και μυκήτων από ό,τι θετικών κατά Gram βακτηρίων. Τα ευρήματα αυτά είναι λογικά, δεδομένου ότι τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια, σε αντίθεση με τα θετικά κατά Gram βακτήρια, διαθέτουν ένα εξωτερικό στρώμα που λειτουργεί ως φράγμα διαπερατότητας, εμποδίζοντας την είσοδο βλαβερών χημικών ουσιών, όπως τα αντιβιοτικά. Οι μύκητες είναι πιο ανθεκτικοί από άλλους οργανισμούς επειδή τα κυτταρικά τους τοιχώματα, τα οποία αποτελούνται από υδατάνθρακες όπως η χιτίνη και η γλυκάνη, είναι τα λιγότερο πορώδη.

5. Ο Afshan Siddiqui και οι συνεργάτες του (Siddiqui, et al. 2012) ανέφεραν τα αντιμικροβιακά αποτελέσματα που άντλησαν για σύμπλοκα σιδήρου(III) με ασπαρτικό οξύ και 3,5-διαρυλο-υποκατεστημένες πυραζολίνες. Οι αντιμικροβιακές δράσεις του ελεύθερου ligand 3(2'-υδροξυφαινυλο)-5-(4'-υποκατεστημένη φαινυλο)πυραζολίνη και των 4 συμπλόκων του αξιολογήθηκαν έναντι δύο βακτηριακών ειδών: *Bacillus subtilis* και *Pseudomonas spp.* και δύο είδη μυκήτων: *Aspergillus flavus* και *Penicillium chrysogenum*, και συγκρίθηκαν με το αντιβιοτικό καναμυκίνη και αντιμυκητιασικό τερμπιναφίνη.



Σχήμα 2.4.19: Δομή του $[\text{Fe}(\text{C}_4\text{O}_4\text{NH}_6)(\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{OX})_2]$, όπου $\text{X}=\text{H}, \text{CH}_3, \text{OCH}_3, \text{Cl}$, (Siddiqui, et al. 2012)



Σχήμα 2.4.20: Δομή $[\text{Fe}(\text{C}_4\text{O}_4\text{NH}_6)_2(\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{OX})]$, όπου $\text{X}=\text{H}, \text{CH}_3, \text{OCH}_3, \text{Cl}$, (Siddiqui, et al. 2012)

A/A	Μύκητες		Gram +	Gram -
	<i>A. flavus</i>	<i>P. chrysogenum</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Pseudomonas spp.</i>
1	+++	++	+++	+++
2	+	+	+	+
3	++++	++++	++	+++
4	++++	+++	+++	+++
5	+++	++++	++	+++
6	++++	++++	+++	++

Πίνακας 2.4.21: Τιμές ζωνών αναστολής των εξεταζόμενων ενώσεων.

+ = 6-10 mm,

++ = 11-15 mm,

+++ = 16-20 mm,

++++ = 21-25 mm (οι τιμές περιλαμβάνουν τη διάμετρο του δίσκου, και κάθε δίσκος περιέχει 30 μ m του φαρμάκου.)

1: Τερμπιναφίνη (αντιμυκητιασικός παράγοντας) και καναμυκίνη (αντιβακτηριακός παράγοντας)

2: 3(2'-υδροξυφαίνυλο)-5-(4'-υποκατεστημένο φαίνυλο-)πυραζολίνη

3: Σύμπλοκο [Fe(C₄O₄NH₆)(C₁₅H₁₂N₂OH)₂]

4: Σύμπλοκο [Fe(C₄O₄NH₆)(C₁₅H₁₂N₂O.OCH₃)₂]

5: Σύμπλοκο [Fe(C₄O₄NH₆)₂(C₁₅H₁₂N₂OCl)]

6: Σύμπλοκο [Fe(C₄O₄NH₆)₂(C₁₅H₁₂N₂OCH₃)], (Siddiqui, et al. 2012)



Εικόνα 2.4.22 : Αντιμυκητιακή δράση έναντι του *Aspergillus flavus* του $[\text{Fe}(\text{C}_4\text{O}_4\text{NH}_6)_2$ ($\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{OH}$)].

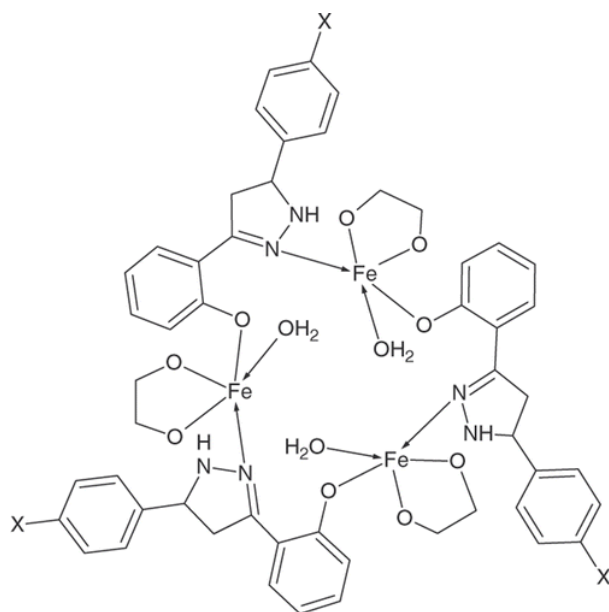
1: 3(2'-υδροξυφαινυλ)-5-(4'-υποκατεστημένο φαινύλ)πυραζολίνη,

2: τερμπιναφίνη

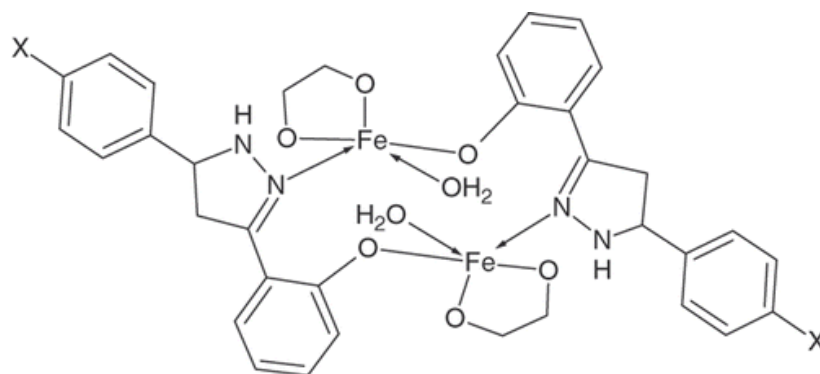
3: διαλύτης

4: σύμπλοκο., (Siddiqui, et al. 2012)

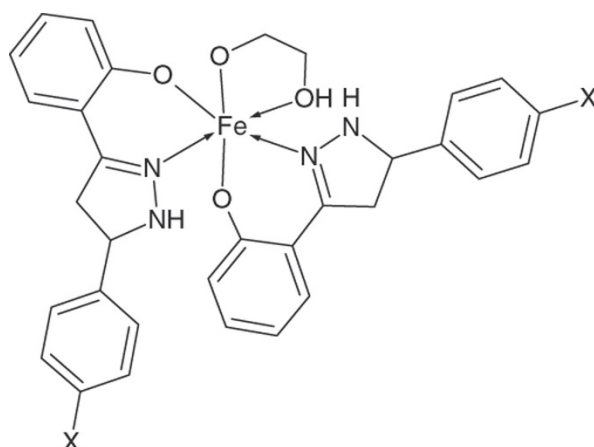
6. Οι ίδιοι ερευνητές με επικεφαλής αυτήν τη φορά την/τον U.N Tripathi (Tripathi, et al. 2010) περιγράφουν την *in vitro* αντιμικροβιακή δραστηριότητα οκτώ συμπλόκων σιδήρου με αιθυλενογλυκόλη και 3(20-υδροξυφαινύλο)-5-(40-υποκατεστημένες φαινύλο) πυραζολίνες, σε συνέχεια της προαναφερθείσας μελέτης τους.



Σχήμα 2.4.23: Μοριακή δομή του $[\text{Fe}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2)(\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{OX})]_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (όπου $X = \text{H}$), (Tripathi, et al. 2010)



Σχήμα 2.4.24: Μοριακή δομή του $[\text{Fe}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2)(\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{OX})]_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (όπου $X = \text{CH}_3, \text{OCH}_3$ και Cl), (Tripathi, et al. 2010)



Σχήμα 2.4.25: Μοριακή δομή του $[Fe(C_{15}H_{12}N_2OX)_2(C_2H_5O_2)]$ (όπου $X = H, CH_3, OCH_3$ και Cl), (Tripathi, et al. 2010)

Οι *Staphylococcus aureus*, *Bacillus licheniformis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Citrobacter freundii*, *Vibrio parahaemolyticus* και *Candida albicans* χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση των βακτηριοκτόνων και αντιμυκητιασικών ιδιοτήτων του ελεύθερου ligand και των δύο συμπλόκων, αντίστοιχα. Ορισμένα φάρμακα εξετάστηκαν επίσης ως προς την αποτελεσματικότητά τους έναντι συγκεκριμένων μικροοργανισμών.

S. No.	Fungi		Gram (+ve) bacteria		Gram (-ve) bacteria		
	<i>A. niger</i>	<i>P. notatum</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. licheniformis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. typhi</i>	<i>C. albicans</i>
Pyrazoline	+	+	+	+	+	+	-
Standard	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
1	+++	++++	+++	++	+++	++	++
5	+++	+++	++++	+++	++++	+++	++

Πίνακας 2.4.26: + = 6-10, ++ = 11-15, +++ = 16-20 και ++++ = 21-25 mm (οι τιμές περιλαμβάνουν τη διάμετρο του δίσκου). Δεν παρατηρήθηκε καμία δραστηριότητα για τα *C. freundii*, *V. parahaemolyticus*

και E. Coli. κάθε δίσκος περιέχει 30 μg του φαρμάκου, τερμπιναφίνη (αντιμυκητιασικός παράγοντας) και χλωραμφενικόλη (αντιβακτηριακός παράγοντας), (Tripathi, et al. 2010)

Τα ευρήματα σε σύγκριση με τα αντιβιοτικά όσον αφορά τις αντιμικροβιακές τους ιδιότητες είναι τα εξής:

(1) Οι ενώσεις είναι πιο αποτελεσματικές κατά των μικροβίων του *S. aureus* από ό,τι η πυραζολίνη ή η χλωραμφενικόλη από μόνες τους.

(2) Σε σύγκριση με την αδέσμευτη πυραζολίνη και τη χλωραμφενικόλη, οι ενώσεις έχουν ισχυρότερη αντιμικροβιακή επίδραση έναντι της *P. aeruginosa*.

(3) οι ενώσεις είναι εξίσου αποτελεσματικές με την ελεύθερη πυραζολίνη και τη χλωραμφενικόλη έναντι των *B. licheniformis*, *S. typhi* και *C. albicans*.

(4) οι ενώσεις είναι πιο αποτελεσματικές από την ελεύθερη πυραζολίνη και την τερμπιναφίνη έναντι των *A. niger* και *P. notatum*.

Παρά το γεγονός ότι είναι δύσκολο να συσχετιστούν οι δομές αυτών των συμπλόκων με τις αντιβακτηριακές τους δράσεις, οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι ο σίδηρος συμπλοκοποιημένος με ένα ligand πυραζολίνης έχει σημαντικά ενισχυμένη αντιμικροβιακή δράση.

7. Προκειμένου να ελέγξουν τις αντιμικροβιακές τους ιδιότητες, οι ερευνητές με πρώτο συγγραφέα τον/την K.V. Sharma (Sharma, Sharma and Tripathi, 2008) δημιούργησαν σύμπλοκα σιδήρου με 5(20-υδροξυφαίνυλο)-3-(4-X-φαίνυλο) πυραζολίνες, με γενικό τύπο: $(C_{15}H_{12}N_2OX)_3Fe$, [όπου X=-H, -Cl, -CH₃, -OCH₃].

Οι 5(2'-υδροξυφαίνυλο)-3-(4-X-φαίνυλο)πυραζολίνες του σιδήρου δοκιμάστηκαν για την αντιβακτηριακή τους δράση έναντι μιας ποικιλίας βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένων των *S. aureus*, *S. typhi*, *B. subtilis*, *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *P. notatum*, *A. flavus*, *M. flavus*.

Οι μελέτες σχετικά με τις αντιβακτηριακές επιδράσεις τους δείχνουν ότι, σε σύγκριση με τις μη δεσμευμένες πυραζολίνες, τα μεταλλικά τους σύμπλοκα είναι πιο αποτελεσματικές έναντι όλων των βακτηρίων και μυκήτων που εξετάστηκαν.

	Μύκητες	Gram+		Gram -								
		<i>P. notatum</i>	<i>M. mucedo</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhi</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>V. parahemolyticus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. albicans</i>
Ενώσεις	<i>A. flavus</i>	<i>P. notatum</i>	<i>M. mucedo</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhi</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>V. parahemolyticus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. albicans</i>
L _a	10	10	-	09	08	-	-	-	-	-	-	-
L _b	10	-	-	08	07	-	-	-	-	-	-	-
L _c	07	-	-	07	07	-	-	-	-	-	-	-
L _d	07	-	-	07	06	-	-	-	-	-	-	-
Fe(L _a) ₃	20	21	-	20	22	09	07	-	-	-	-	-
Fe(L _b) ₃	22	08	-	21	21	08	06	-	-	-	-	-
Fe(L _c) ₃	23	07	-	18	16	07	-	-	-	-	-	05
Fe(L _d) ₃	23	08	-	19	18	09	08	-	-	-	-	03

	<i>Μύκητες</i>	Gram+			Gram -							
<i>Ενώσεις</i>	<i>A. flavus</i>	<i>P. notatum</i>	<i>M. mucedo</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhim</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>V. parahemolyticus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. albicans</i>
Fe(L _a) ₃ (biopy)	21	09	–	22	22	07	–	–	–	–	–	06
Fe(L _b) ₃ (biopy)	22	07	–	20	19	08	07	–	–	–	–	04
Fe(L _c) ₃ (biopy)	16	06	–	21	17	11	06	–	–	–	–	–
Fe(L _d) ₃ (biopy)	15	08	–	19	15	08	08	–	–	–	–	03
Fe(L _a) ₃ (phen)	22	07	–	21	24	09	–	–	–	–	–	02
Fe(L _b) ₃ (phen)	21	06	–	20	21	07	06	–	–	–	–	–

	<i>Μύκητες</i>	Gram+			Gram -							
<i>Ενώσεις</i>	<i>A. flavus</i>	<i>P. notatum</i>	<i>M. mucedo</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhi</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>V. parahemolyticus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. albicans</i>
Fe(Lc) ₃ (phen)	20	09	–	18	22	10	–	–	–	–	–	–
Fe(Ld) ₃ (phen)	21	08	–	17	19	07	–	–	–	–	–	03
Fe(La) ₃ (PPh ₃)	22	10	–	23	20	06	07	–	–	–	–	02
Fe(Lb) ₃ (PPh ₃)	23	08	–	21	17	09	–	–	–	–	–	–
Fe(Lc) ₃ (PPh ₃)	24	07	–	10	15	10	08	–	–	–	–	04
Fe(Ld) ₃ (PPh ₃)	23	06	–	11	16	08	07	–	–	–	–	–

Πίνακας 2.4.27 : Αντιμικροβιακή δράση ελεύθερων συνδέσμων πυραζολίνης(διάμετρος ζώνης αναστολής μετρημένοι σε mm, 5(2'-υδροξυφαινυλο)3-(4-X-φαινυλο)πυραζολινών και των συμπλόκων τους με σίδηρο.

(-) = μη δραστική,

ποσότητα συμπλόκων: 100 mg mL⁻¹.

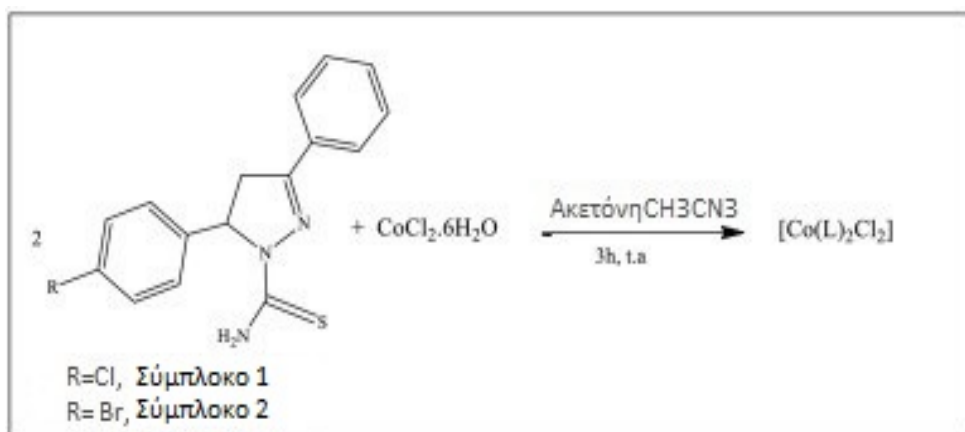
La = 5(2'-υδροξυφαινυλο)-3-φαινυλο πυραζολίνη. Lb = 5(2'-υδροξυφαινυλο)-3-(4-χλωροφαινυλο)πυραζολίνη. Lc = 5(2'-υδροξυφαινυλο)-3-(4-μεθυλοφαινυλο)πυραζολίνη. Ld = 5(2'-υδροξυφαινυλο)-3-(4-μεθοξυφαινυλο)πυραζολίνη. bipy = 2',2'-διπυριδίνη. phen = 1,10-φαινανθρολίνη. PPh3 = τριφαινυλοφωσφίνη, (Sharma, Sharma and Tripathi 2008)

2.5 Μεταλλικά Σύμπλοκα Πυραζολίνης με Co

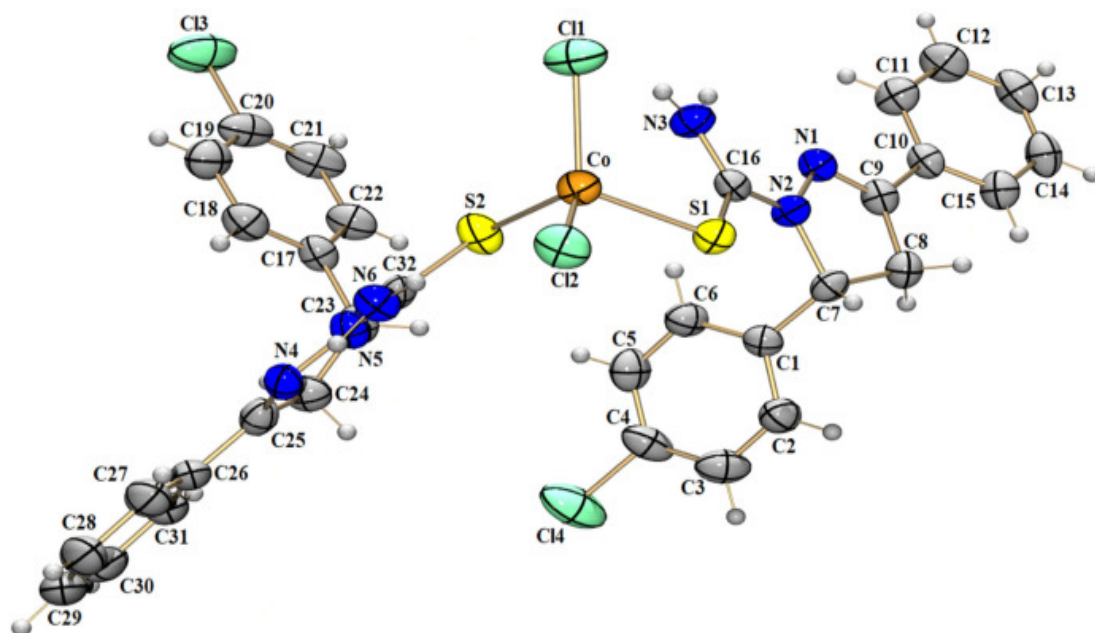
Ο μεταβολισμός κάθε ζώου εξαρτάται από το κοβάλτιο. Αποτελεί κρίσιμο συστατικό της κοβαλαμίνης, πιο γνωστής ως βιταμίνη B12, η οποία χρησιμεύει ως η κύρια αποθήκη του οργανισμού για το υπερίχνοστοιχείο κοβάλτιο (Yamada 2013). Λόγω της θανατηφόρας φύσης του όταν προσλαμβάνεται σε υπερβολική ποσότητα, η κατανάλωσή του θα πρέπει να περιορίζεται. Για τα διαλυτά άλατα κοβαλτίου, η τιμή LD50 έχει υπολογιστεί ότι κυμαίνεται μεταξύ 150 και 500 mg/kg (Donaldson and Beyersmann 2005). Ακόμη και σε δόσεις πολύ κάτω από το θανατηφόρο επίπεδο, η διαρκής πρόσληψη κοβαλτίου έχει οδηγήσει σε μείζονα προβλήματα υγείας. Στον Καναδά, χημικές ουσίες κοβαλτίου που προστέθηκαν στην μύρα το 1966 για να σταθεροποιήσουν τον αφρό της μύρας είχαν ως αποτέλεσμα έναν σπάνιο τύπο καρδιομυοπάθειας όπου έγινε γνωστή ως καρδιομυοπάθεια του πότη μύρας (Barceloux and Barceloux 1999). Οι μονογραφίες του Διεθνούς Οργανισμού Έρευνας για τον Καρκίνο (IARC) αναφέρουν επίσης ότι το μεταλλικό κοβάλτιο θεωρείται ότι είναι καρκινογόνο (πιθανώς καρκινογόνο, ομάδα 2B της IARC). Όταν εισπνέεται, προκαλεί αναπνευστικά προβλήματα (Elbagir, Van Heerden and Mackintosh 2018). Το κοβάλτιο είναι βασικός παράγοντας που συμβάλλει στη δερματίτιδα εξ επαφής, μαζί με το νικέλιο και το χρώμιο, και προκαλεί επίσης δερματικά προβλήματα όταν το χειρίζεται κανείς (Basketter, et al. 2003).

Παρά το γεγονός ότι είναι δυνητικά επικίνδυνο για τον άνθρωπο, η κυτταροτοξική και μεταλλαξιογόνος φύση του κοβαλτίου θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την καταπολέμηση των μικροβίων. Η έρευνα σχετικά με αυτή την εφαρμογή βρίσκεται ακόμη σε πρώιμο στάδιο και, ως εκ τούτου, η βιβλιογραφία για το θέμα αυτό είναι πολύ περιορισμένη. Ορισμένα άρθρα αποκλείστηκαν από την εργασία, διότι ο «δείκτης απήχησης» («Impact factor») των περιοδικών στα οποία δημοσιεύτηκαν ήταν πολύ χαμηλός, και έτσι, θεωρήθηκαν αναξιόπιστα.

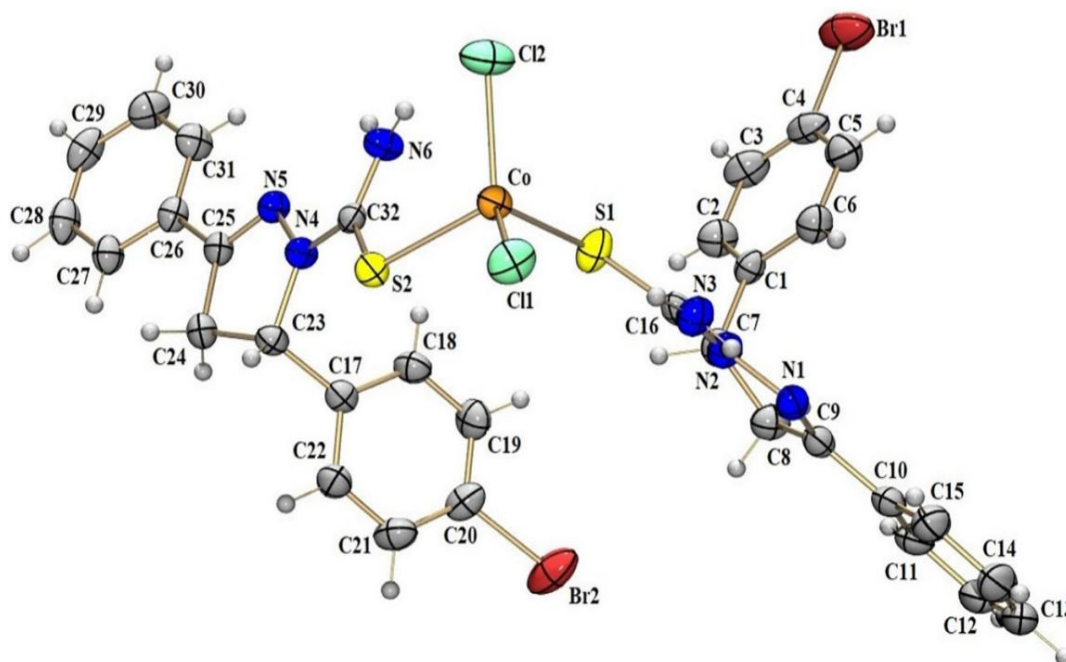
1. Η Bianca Boni Dias και οι συνάδελφοι της (Dias, et al. 2020) εξετάζουν σε αυτή την εργασία την βιολογική δραστηριότητα δύο νέων συμπλόκων Co(II) (**Σύμπλοκο 1** και **Σύμπλοκο 2**) που περιέχουν ligands θειοκαρβαμοϋλο-πυραζολίνης έναντι ανθεκτικών στελεχών της *Candida*. Εξέτασαν επίσης τις κυτταροτοξικές και μεταλλαξιογόνες ιδιότητες αυτών των ενώσεων.



Σχήμα 2.7.1: Σύνθεση για τη λήψη των συμπλόκων 1 (R=Cl) και 2 (R=Br). (Dias, et al. 2020).



Εικόνα 2.7.2: Μοριακή δομή του συμπλόκου 1. Θερμικά ελλειψοειδή (Thermal ellipsoids: ελλειψοειδούς σχήματος μόρια που χρησιμοποιούνται στην κρυσταλλογραφία για την αναπαράσταση των μεγεθών και των προσανατολισμών της θερμικής δόνησης των ατόμων στους κρυσταλλικούς σχηματισμούς.) σχεδιασμένα σε επίπεδο πιθανότητας 50%. (Dias, et al. 2020)



Εικόνα 2.7.3: Μοριακή δομή του συμπλόκου 2. Θερμικά ελλειψοειδή σχεδιασμένα σε επίπεδο πιθανότητας 50%. (Dias, et al. 2020)

Τα σύμπλοκα δοκιμάστηκαν για αντιμυκητιασική δράση έναντι πλαγκτονικών κυττάρων του είδους *Candida*. Η MIC και η MFC για τα σύμπλοκα κυμαίνονταν από 15,62 έως 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Τα σύμπλοκα ,έπειτα, αξιολογήθηκαν έναντι ανθεκτικών κλινικών στελεχών του *C. glabrata*, δεδομένου ότι είχαν τη χαμηλότερη MIC (15,62 $\mu\text{g mL}^{-1}$) έναντι αυτού του είδους. Στην περίπτωση αυτή, η MIC του συμπλόκου 1 κυμάνθηκε από 3,90 έως 15,62 $\mu\text{g mL}^{-1}$ και του συμπλόκου 2 από 7,81 έως 31,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Το άλας $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ εμφάνισε αντιμυκητιακή αποτελεσματικότητα έναντι όλων των στελεχών *Candida* σε ισομοριακές συγκεντρώσεις των συμπλόκων. Οι μελετώμενοι ζυμομύκητες, ωστόσο, δεν αναστάλθηκαν από τα ελεύθερα ligands L1 και L2.

	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC
	Σύμπλεγμα 1		Σύμπλεγμα 2		FLC
Μύκητες					
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	1000	1000	1000	1000	2**
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	1000	1000	1000	1000	2**
<i>C. glabrata</i> ATCC 2001	15.62	15.62	15.62	15.62	8**
<i>C. krusei</i> ATCC 6558	500	500	250	250	32
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	500	500	500	500	2**
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	1000	1000	1000	1000	1**
<u>Στελέχη</u>					
<i>C. glabrata</i> CG10	7.81	15.62	7.81	31.25	16**
<i>C. glabrata</i> CG25	15.62	62.5	31.25	62.5	16**
<i>C. glabrata</i> CG26	15.62	62.5	15.62	31.25	2**
<i>C. glabrata</i> CG37	7.81	15.62	15.62	31.25	16**
<i>C. glabrata</i> CG61	7.81	15.62	15.62	15.62	16**
<i>C. glabrata</i> CG66	3.90	>1000	7.81	15.62	16**

Πίνακας 2.7.4: Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση των συμπλόκων 1 και 2 ($\mu\text{g mL}^{-1}$) έναντι στελεχών ATCC του είδους *Candida* και αξιολογημένων κλινικών στελεχών που αποκτήθηκαν από ούρα. MIC: ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση ($\mu\text{g mL}^{-1}$), MFC: ελάχιστη μυκητοκτόνος συγκέντρωση ($\mu\text{g mL}^{-1}$), FLC: φλουκοναζόλη,

** : Εξαρτώμενη από τη δόση (dose-dependent), (Dias, et al. 2020)

Αξιολογήθηκε επίσης, πόσο καλά τα σύμπλοκα λειτούργησαν μαζί με το αντιμυκητιασικό φάρμακο φλουконаζόλη. Όταν συνδυάστηκε με φλουконаζόλη, το σύμπλοκο 1 είχε προσθετική επίδραση κατά του *C. glabrata* ATCC 2001 και αδιάφορη επίδραση κατά του απομονωμένου *C. glabrata* CG66. Αντίθετα, η φλουконаζόλη σε συνδυασμό με το σύμπλοκο 2 είχε ουδέτερη επίδραση στο *C. glabrata* ATCC 2001 και στο *C. glabrata* CG66.

	MIC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		FIC	FICI	Αποτέλεσμα
	Μεμονομένα	Συνδυαστικά			
ATCC 2001					
Complex 1	15.62	1.9	0.12	0.62	Προσθετική
Φλουконаζόλη	4	2	0.5		
Complex 2	15.62	3.9	0.24	1.24	Αδιάφορη
Φλουконаζόλη	4	4	1		
CG66					
Complex 1	3.9	3.9	1	2	Αδιάφορη
Φλουконаζόλη	16	16	1		
Complex 2	7.81	7.81	1.00	1.5	Αδιάφορη
Φλουконаζόλη	16	8	0,5		

Πίνακας 2.7.5: Αντιμυκητιακή δράση των συμπλόκων 1 και 2 σε συνδυασμό με φλουконаζόλη έναντι του *Candida glabrata*. MIC: ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση, FIC: κλασματική ανασταλτική συγκέντρωση, FICI: δείκτης κλασματικής ανασταλτικής συγκέντρωσης. (Dias, et al. 2020)

Για να προσδιοριστεί πώς τα σύμπλοκα επηρέαζαν τη δομή της ζύμης, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές σορβιτόλης και εργοστερόλης. Τα ευρήματα του πειράματος της σορβιτόλης δείχνουν ότι τα σύμπλοκα δεν έχουν καμία επίδραση

στην ικανότητα της *Candida glabrata* να συνθέτει τα κυτταρικά της τοιχώματα. Παρ' όλα αυτά, φάνηκε ότι η MIC και στα δύο σύμπλοκα αυξήθηκε παρουσία συγκεντρώσεων εργοστερόλης, γεγονός που υποδεικνύει ότι λειτουργούν με σκοπό να διαταράξουν τη διαπερατότητα της ιοντικής μεμβράνης.

Παράγοντες	MIC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
	Παρουσία Σορβιτόλης	Απουσία Σορβιτόλης
Σύμπλεγμα 1	62.5	62.5
Σύμπλεγμα 2	31.25	31.25
Κασποφουγγίνη	15.6	7.81

Πίνακας 2.7.6: Δραστηριότητα των συμπλόκων 1 και 2 στη βιοσύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος (σορβιτόλη) του *Candida glabrata* ATCC 2001. Οι τιμές εκφράζονται σε $\mu\text{g mL}^{-1}$. MIC: ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση. (Dias, et al. 2020)

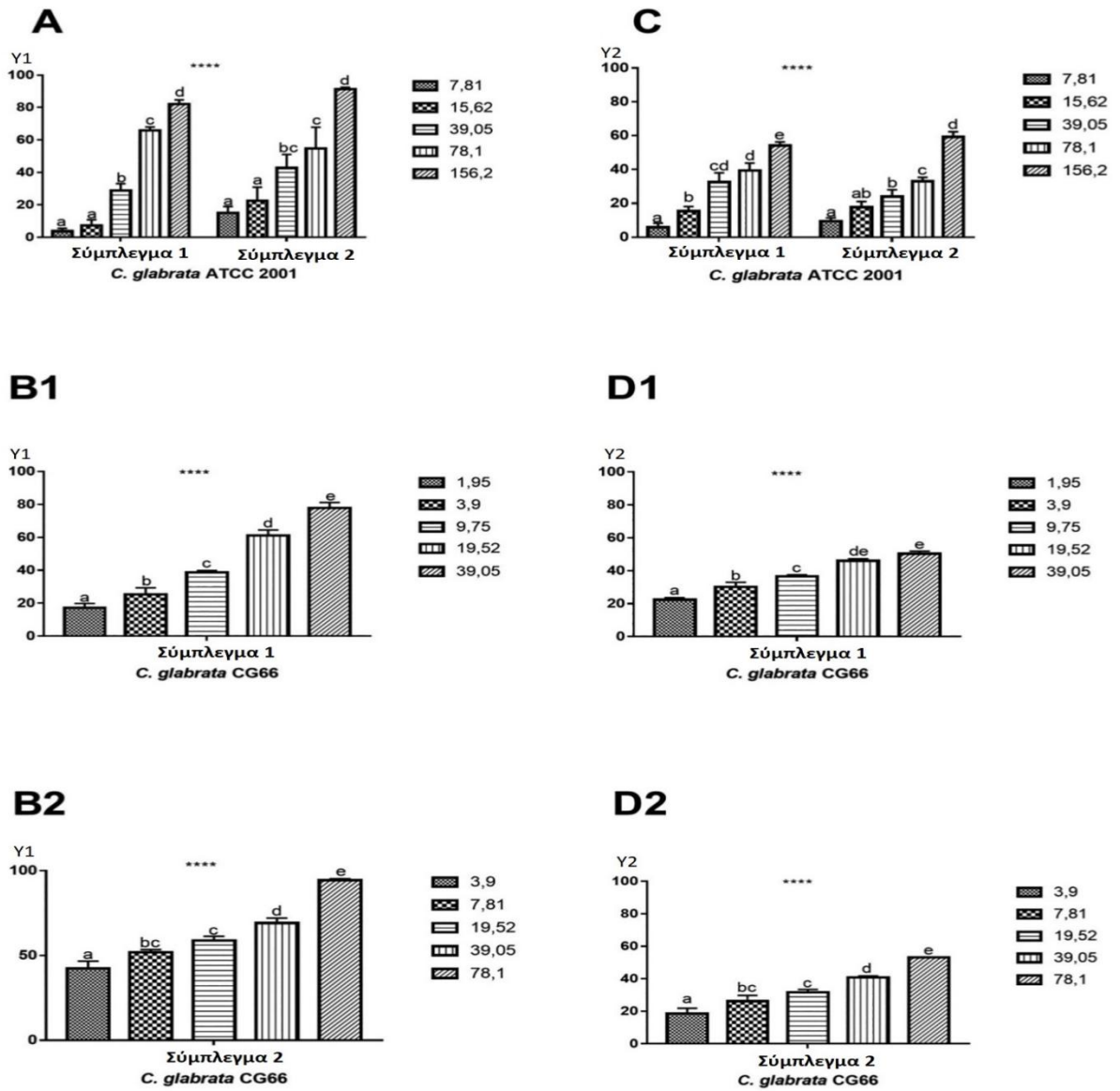
Παράγοντες	MIC απουσία Εργοστερόλης ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	MIC παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων Εργοστερόλης ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
		100	200	400
Σύμπλεγμα 1	15.62	31.25	31.25	31.25
Σύμπλεγμα 2	15.62	15.62	31.25	62.5

Παράγοντες	MIC απουσία	MIC παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων		
	Εργοστερόλης ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Εργοστερόλης ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
		100	200	400
Αμφοτερικίνη Β	31.25	62.5	62.5	62.5

Πίνακας 2.7.7: Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων εξωγενούς εργοστερόλης στην αντιμυκητιακή δράση των συμπλόκων 1 και 2 για το *Candida glabrata* ATCC 2001. MIC: ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση. (Dias, et al. 2020)

Η πιθανή αντιμυκητιακή δράση των συμπλόκων στα πλαγκτονικά κύτταρα οδήγησε τους ερευνητές να εξετάσουν αν θα μπορούσαν να εμποδίσουν την ανάπτυξη τόσο νέων όσο και υφιστάμενων βιοφίλμ. Τα σύμπλοκα μείωσαν σημαντικά την ανάπτυξη βιοφίλμ του *C. glabrata*. Τόσο στη διαδικασία καταστροφής όσο και στην πρόληψη της ανάπτυξης βιοφίλμ του *C. glabrata* ATCC 2001, το σύμπλοκο 2 υπερέιχε του συμπλόκου 1. Ενώ το σύμπλοκο 1, στην ίδια δοσολογία με το σύμπλοκο 2, απέτρεψε τον σχηματισμό κατά 80% και κατέστρεψε το 54% των προϋπαρχόντων βιοφίλμ, το σύμπλοκο 2 σε συγκέντρωση $156,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ανέστειλε τον σχηματισμό βιοφίλμ κατά 90% και κατέστρεψε το 59% των προσχηματισμένων βιοφίλμ. Επίσης, σε δοσολογία $39 \mu\text{g mL}^{-1}$, το σύμπλοκο 1 εμπόδισε τον σχηματισμό βιοφίλμ κατά 77% και κατέστρεψε το 50% των προσχηματισμένων βιοφίλμ του απομονωμένου *C. glabrata* CG66, ενώ το σύμπλοκο 2 ανέστειλε τον σχηματισμό κατά 94% και αποδόμησε το 53% σε συγκέντρωση $78,2 \mu\text{g mL}^{-1}$

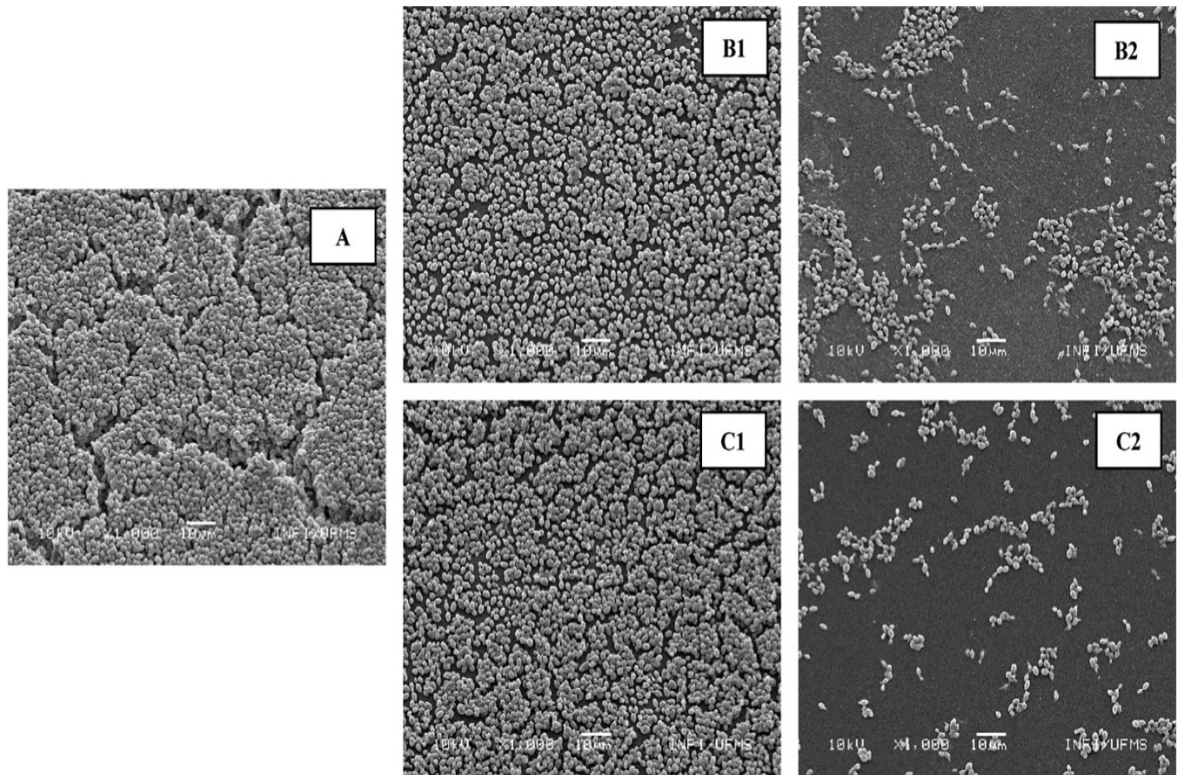
Οι εικόνες SEM που ελήφθησαν επιβεβαίωσαν ότι τα σύμπλοκα 1 και 2 ήταν δραστικά στην παρεμπόδιση του *C. glabrata* ATCC να σχηματίσει βιοφίλμ. Αντιπαραβάλλοντας τις φωτογραφίες του θετικού ελέγχου (A) με εκείνες των βιοϋμενίων που υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με τις συγκεντρώσεις sub-MIC (B1 και C1) και 10xMIC (B2 και C2), είναι σαφές ότι υπάρχει σημαντική μείωση των βιοφίλμ που υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με τα σύμπλοκα.



Σχήμα 2.7.8: Ποσοστιαία αναστολή και διασπορά των βιοφίλμ του *Candida glabrata* ATCC 2001 και *C. glabrata* CG66 που υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με τα σύμπλοκα 1 και 2. Τα A, B1 και B2 αντιπροσωπεύουν την αναστολή του σχηματισμού βιοφίλμ, τα C, D1 και D2 αντιπροσωπεύουν την % αποδόμηση του βιοφίλμ που αναλύθηκε σε συγκεντρώσεις sub-MIC, MIC, 2,5× MIC, 5× MIC και 10× MIC.

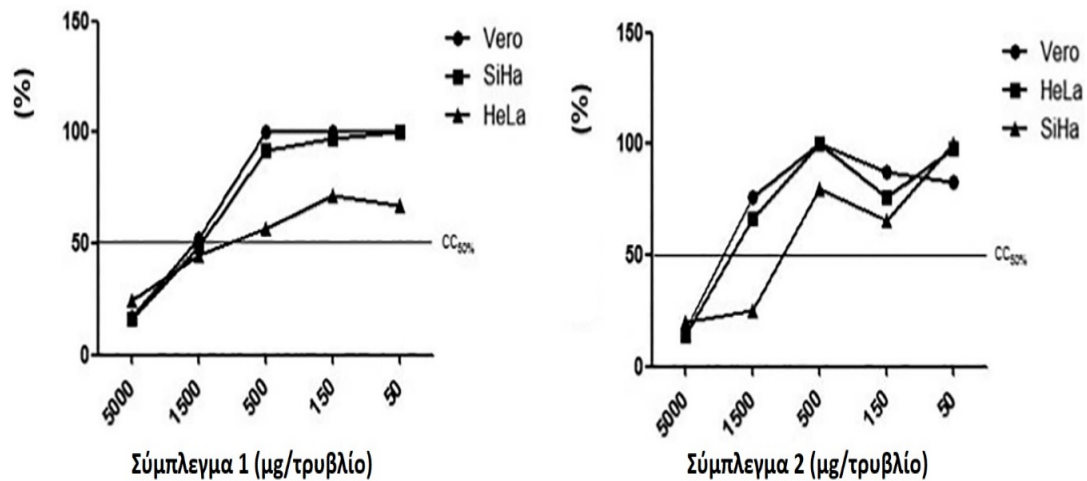
Y1: % αναστολή του σχηματισμού βιοφίλμ, Y2: % αποδόμηση υπάρχοντος βιοφίλμ

MIC: ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση. (Dias, et al. 2020)



Εικόνα 2.7.9: Μικροσκόπηση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης(SEM) των βιοφίλμ *Candida glabrata* ATCC 2001 που έχουν υποστεί επεξεργασία με τα σύμπλοκα 1 και 2. A: Μη επεξεργασμένο βιοφίλμ. Τα B1 και B2 είναι βιοφίλμ που έχουν υποστεί επεξεργασία με το σύμπλοκο 2. Τα C1 και C2 έχουν υποστεί επεξεργασία με το σύμπλοκο 1. Τα B1 και C1 sub-MIC, και τα B2 και C2 10× MIC. MIC: ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση. (Dias, et al. 2020)

Για τη διερεύνηση πιθανών τοξικών επιδράσεων, εφαρμόστηκαν ποικίλες δόσεις των συμπλόκων σε καρκινικά κύτταρα HeLa και SiHa καθώς και σε μη καρκινικά κύτταρα Vero. Τα ευρήματα έδειξαν ότι τα σύμπλοκα εμφάνισαν κυτταροτοξική δυναμική σε υψηλές συγκεντρώσεις, 1500 και 5000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, αλλά δεν εμφάνισαν κυτταροτοξικό δυναμικό σε χαμηλότερες δόσεις, 50 και 150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.



Σχήμα 2.7.10: Ποσοστό κυτταρικής βιωσιμότητας των σειρών Vero, SiHa και HeLa που υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με τα σύμπλοκα 1 και 2.

CC_{50%}(50% cytotoxicity concentration): η συγκέντρωση των εξεταζόμενων ενώσεων που απαιτείται για τη μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων κατά 50%. (Dias, et al. 2020)

Μέσω της δοκιμής Ames σε σειρές του βακτηρίου *Salmonella typhimurium*, αξιολογήθηκε επίσης η μεταλλαξογόνος δράση των συμπλόκων. Δεδομένου ότι ο δείκτης μεταλλαξιγένεσης ήταν μικρότερος από 0,7, και τα δύο σύμπλοκα είχαν κυτταροτοξική δράση σε συγκέντρωση 5000 µg mL⁻¹ παρουσία του εξωγενούς συστήματος ενεργοποίησης του μεταβολισμού. Ο δείκτης μεταλλαξιγένεσης ήταν μικρότερος από 2 και δεν παρατηρήθηκε θετική σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης μεταξύ των συγκεντρώσεων που εξετάστηκαν, δεδομένου ότι δεν υπήρξε αξιοσημείωτη αύξηση του αριθμού των αποικιών που υπέστησαν μεταλλάξεις ανά πλάκα στις άλλες συγκεντρώσεις.

μg/πλάκα	TA98		TA100		TA102	
	S9 -	S9 +	S9 -	S9 +	S9 -	S9 +
Σύμπλεγμα 1						
0 ^a	31±1	30±2	162±8	172±3	372±9	394±7
50	36±2	29±1	147±2	181±8	457±6	462±2
150	34±5	30±7	150±8	160±7	446±6	444±5
500	25±3	38±4	138±8	139±3	443±6	419±6
1500	30±2	35±8	125±4	138±6	349±1	367±9
5000	31±3	32±6	121±3	112±8	277±6	261±6
Σύμπλεγμα 2						
50	30±3	37±1	157±9	187±2	477±8	481±6
150	30±1	42±2	145±4	173±7	450±5	471±5
500	30±2	32±7	180±6	153±9	417±6	440±6
1500	32±2	35±1	150±5	131±3	351±6	369±7
5000	31±2	33±1	180±5	126±4	276±6	287±7
C+	250±4 ^b	305±4 ^c	702±2 ^d	720±8 ^c	998±6 ^e	950±4 ^c

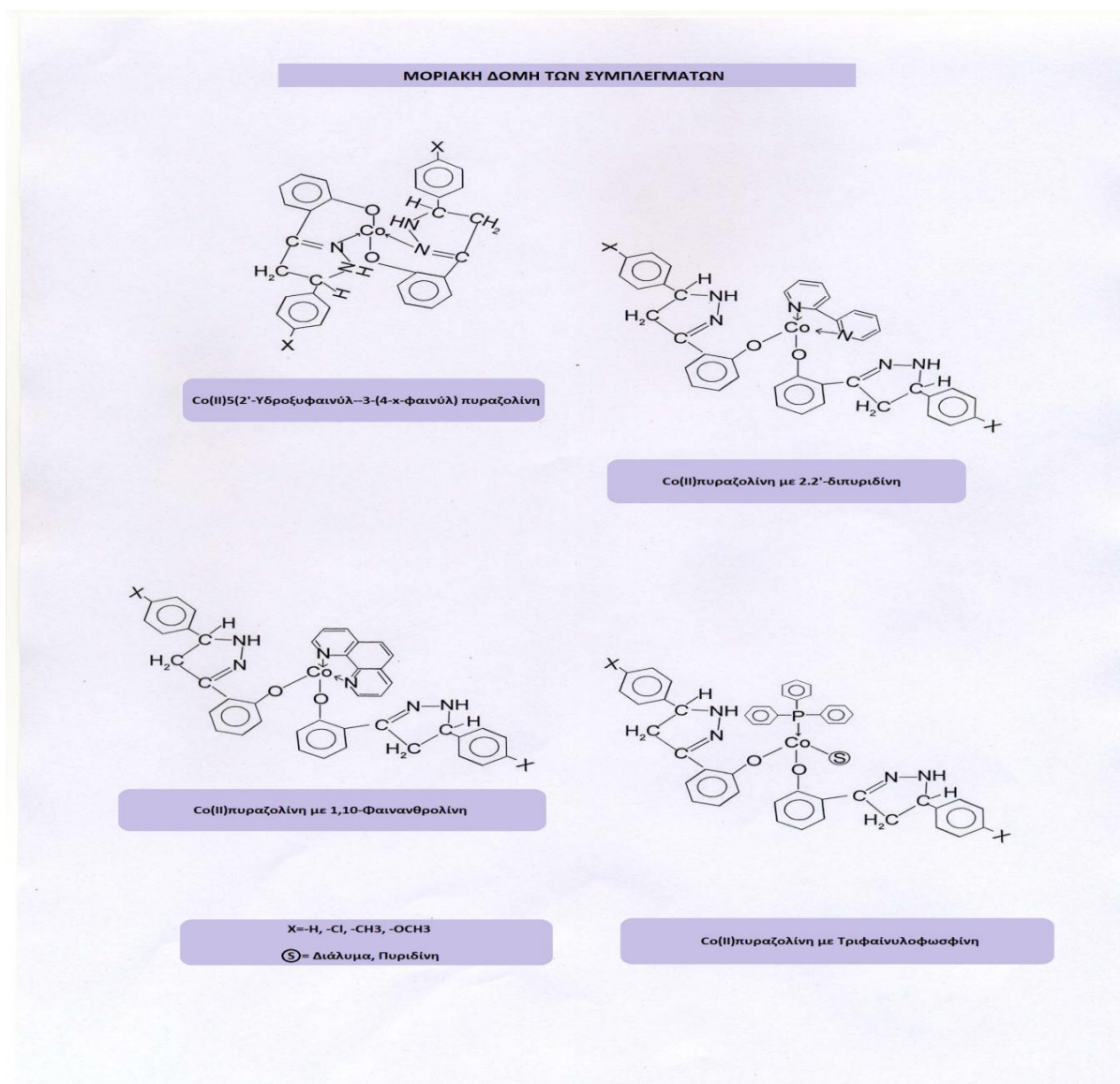
Πίνακας 2.7.11: Μεταλλαξιογόνος δράση εκφρασμένη με βάση τον μέσο αριθμό αποικιών ανά πλάκα και την τυπική απόκλιση των συμπλόκων 1 και 2 έναντι των στελεχών *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100 και TA102), παρουσία(S9+) ή απουσία(S9-) εξωγενούς συστήματος ενεργοποίησης του μεταβολισμού. (S9: Εκχύλισμα ηπατικού ενζύμου που, υπό ορισμένες συνθήκες, μπορεί να μετατρέψει ουσίες που, αυτούσιες, δεν έχουν καμία γονοτοξική δράση σε ενεργές γονοτοξικές ουσίες.)

a: Αρνητικός έλεγχος: DMSO /Θετικός έλεγχος: (C+), b :4-νιτρο-ο-φαινυλενοδιαμίνη (10 μg/πλάκα),

c :2-αμινοανθρακένιο (1,5 μg/πλάκα), d: αζίδιο του νατρίου (2,5 μg/πλάκα),

e: Μιτομυκίνη C (0,5 μg/πλάκα). (Dias, et al. 2020)

2. Η ερευνητική ομάδα με πρώτο συγγραφέα την/τον Κ. V. Sharma (Sharma, Sharma and Tripathi 2009) δημιούργησε σύμπλοκα κοβαλτίου 5(2'-υδροξυφαινυλο)-3-(4-υποκατεστημένο-φαινυλο)πυραζολίνης [υποκαταστάτες: είναι H, Cl, CH₃ και OCH₃] και τα σύμπλοκα προσθήκης με προσδέτες-δότες που έχουν N και P, (2,2'-διπυριδίνη, 1,10-φαινανθρολίνη και τριφαινυλοφωσφίνη). Εξέτασαν επίσης τις αντιβακτηριακές ιδιότητες αυτών των ενώσεων.



Σχήμα 2.7.12: Μοριακή δομή των συμπλεγμάτων, (Sharma, Sharma and Tripathi 2009)

Οι 5-(2'-υδροξυφαινυλο)-3-(4-υποκατεστημένο-φαινυλο)πυραζολινικές ενώσεις κοβαλτίου και τα υβρίδια τους δοκιμάστηκαν στα βακτήρια *E. coli*, *S. flexenari*, *P.*

aeruginosa, *S. typhi*, *B. subtilis* και *S. aureus* καθώς και σε *T. longifusus*, *C. albicans*,
A. flavus, *M. cains*

	<i>Gram(-) βακτήρια</i>				<i>Gram(+) βακτήρια</i>	
Ενώσεις	<i>E. coli</i>	<i>S. flexenari</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. typhi</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilisi</i>
L _a	00	00	00	00	08	09
L _b	00	00	00	00	07	08
L _c	00	00	00	00	07	07
L _d	00	00	00	00	06	07
Co(L _a) ₂	10	06	14	15	18	17
Co(L _b) ₂	11	08	13	16	20	18
Co(L _c) ₂	11	10	14	14	21	15
Co(L _d) ₂	16	07	11	15	19	19
Co(L _a) ₂ (bipy)	11	07	17	19	19	18
Co(L _b) ₂ (bipy)	12	09	15	18	21	18
Co(L _c) ₂ (bipy)	13	11	18	16	22	16
Co(L _d) ₂ (bipy)	17	08	13	16	20	20
Co(L _a) ₂ (phen)	12	08	16	18	20	19
Co(L _b) ₂ (phen)	13	09	17	17	22	19
Co(L _c) ₂ (phen)	13	12	16	15	20	17
Co(L _d) ₂ (phen)	18	08	14	16	19	21

	<i>Gram(-) βακτήρια</i>				<i>Gram(+) βακτήρια</i>	
Ενώσεις	<i>E. coli</i>	<i>S. flexenari</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. typhi</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilisi</i>
Co(L _a) ₂ (PPh ₃)	12	07	18	19	21	20
Co(L _b) ₂ (PPh ₃)	17	09	16	17	21	20
Co(L _c) ₂ (PPh ₃)	13	12	17	15	19	18
Co(L _d) ₂ (PPh ₃)	17	09	14	16	20	19
Std Αγωγή (Ιμιπενέμη)	30	27	27	26	30	28

Πίνακας 2.7.13: Δεδομένα από τις βιοδοκιμές για την αξιολόγηση της αντιβακτηριακής δράσης ελεύθερων συνδέσμων πυραζολίνης, 5(2'-υδροξυφαινυλ)-3-(4-υποκατεστημένου φαινύλ) πυραζολινικού κοβαλτίου και των συμπλόκων προσθήκης τους με προσδέτες-δότες N και P. (διάμετρος ζώνης αναστολής μετρημένος σε mm, χάρτινος δίσκος 5 mm, ζώνη αναστολής μετρήθηκε χωρίς τη διάμετρο του χάρτινου δίσκου, ποσότητα συμπλόκων που λήφθηκε 1 mg mL⁻¹ DMSO). (Sharma, Sharma and Tripathi 2009)

	<i>Οργανισμοί</i>					
Ενώσεις	<i>T. longifusus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. flavus</i>	<i>M. canis</i>	<i>A. niger</i>	<i>C. glaberrate</i>
L _a	00	00	10	00	06	00
L _b	00	00	10	00	07	00
L _c	00	00	07	00	05	00
L _d	00	00	07	00	05	00

	<i>Οργανισμοί</i>					
Ενώσεις	<i>T. longifusus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. flavus</i>	<i>M. canis</i>	<i>A. niger</i>	<i>C. glaberrate</i>
Co(L _a) ₂	11	07	20	01	09	05
Co(L _b) ₂	05	09	21	02	08	00
Co(L _c) ₂	12	10	18	01	06	00
Co(L _d) ₂	10	04	19	04	06	00
Co(L _a) ₂ (bipy)	12	08	21	03	08	00
Co(L _b) ₂ (bipy)	07	10	22	04	07	07
Co(L _c) ₂ (bipy)	13	12	20	05	06	00
Co(L _d) ₂ (bipy)	12	06	20	01	06	00
Co(L _a) ₂ (phen)	14	08	22	02	09	00
Co(L _b) ₂ (phen)	06	11	21	02	08	00
Co(L _c) ₂ (phen)	14	12	19	03	07	05
Co(L _d) ₂ (phen)	11	06	22	01	06	00
Co(L _a) ₂ (PPh ₃)	12	09	21	04	08	00
Co(L _b) ₂ (PPh ₃)	07	10	22	01	08	00
Co(L _c) ₂ (PPh ₃)	14	11	19	02	07	00
Co(L _d) ₂ (PPh ₃)	11	08	19	01	06	00

	<i>Οργανισμοί</i>					
Ενώσεις	<i>T. longifusus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. flavus</i>	<i>M. canis</i>	<i>A. niger</i>	<i>C. glaberate</i>
Standard drug*	A	B	C	D	E	F

Πίνακας 2.7.14: Δεδομένα της αντιμυκητιασικής βιοδοκιμής ελεύθερων προσδετών πυραζολίνης, 5(2'-υδροξυφαινυλ)-3-(4-υποκατεστημένο-φαινυλ)πυραζολινικών του κοβαλτίου και των συμπλόκων προσθήκης τους.

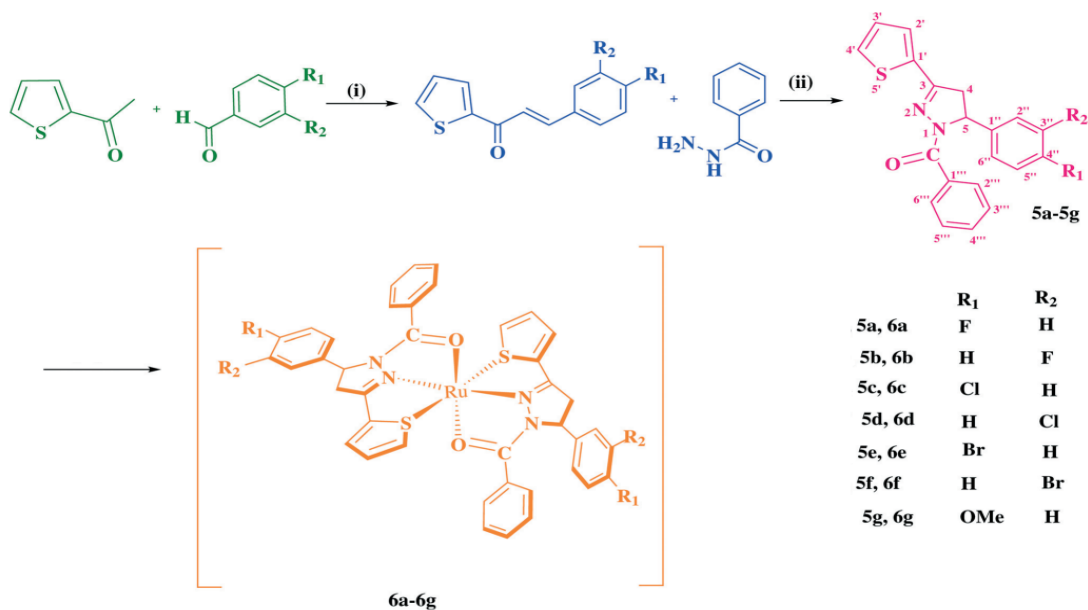
*A = Μικοναζόλη (70 $\mu\text{g mL}^{-1}$), B = Μικοναζόλη (110,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$), C = Αμφοτερικίνη B (20 $\mu\text{g mL}^{-1}$), D = Μικοναζόλη (98,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$), E = Μικοναζόλη (73,24 $\mu\text{g mL}^{-1}$), F = Μικοναζόλη (110,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$). (διάμετρος ζώνης αναστολής μετρημένη σε mm, χάρτινος δίσκος 5 mm, ζώνη αναστολής μετρήθηκε χωρίς την διάμετρο του χάρτινου δίσκου, ποσότητα συμπλόκων που ελήφθη 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$). (Sharma, Sharma and Tripathi 2009)

Όπως προβλέπεται από την θεωρία του Overtone και τη θεωρία της χηλικοποίησης, το κοβάλτιο(II) 5(2'-υδροξυφαινυλο)-3-(4-υποκατεστημένο-φαινυλο)πυραζολινικό και τα σύμπλοκα τους προσθήκης παρουσιάζουν μεγαλύτερη δραστικότητα από το ελεύθερο ligand. Σύμφωνα με βιολογικές μελέτες, η ελεύθερη πυραζολίνη είναι λιγότερο δραστική έναντι όλων των εξεταζόμενων βακτηρίων και μυκήτων από ό,τι το κοβάλτιο 5(2'-υδροξυφαινυλο)-3-(4-υποκατεστημένο-φαινυλο)πυραζολίνη και τα σύμπλοκα τους. Οι ερευνητές υπέθεσαν ότι τα σύμπλοκα απενεργοποιούν μια ποικιλία κυτταρικών ενζύμων, τα οποία είναι ζωτικής σημασίας για μια σειρά μεταβολικών οδών των μικροοργανισμών. Ωστόσο, αναφέρουν ότι είναι δύσκολο να προσδιοριστεί μια ακριβής σχέση μεταξύ της δομής αυτών των συμπλόκων και της αντιβακτηριακής τους δράσης.

2.6 Μεταλλικά σύμπλοκα πυραζολίνης με Ru

Δεν υπάρχει αμφιβολία για την αποτελεσματικότητα των πολύτιμων μετάλλων στην ιατρική. Για παράδειγμα, οι ενώσεις λευκόχρυσου χρησιμοποιούνται συχνά για τη θεραπεία του καρκίνου, οι ενώσεις αργύρου χρησιμεύουν ως αποτελεσματικοί αντιβακτηριακοί παράγοντες και οι ενώσεις χρυσού χρησιμοποιούνται συχνά για τη θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας. Τα άλλα μέταλλα της ομάδας των πλατινιδίων αναγνωρίζονται πλέον για τα θεραπευτικά τους χαρακτηριστικά, και ένα από αυτά, το ρουθίνιο, έχει πρόσφατα εισέλθει σε κλινική εφαρμογή και παρουσιάζει μια πολλά υποσχόμενη δράση ενάντια σε όγκους που συνήθως είναι ανθεκτικοί. Η δραστηριότητα των ενώσεων του ρουθηνίου, όπως και όλων των μεταλλικών φαρμάκων, επηρεάζεται τόσο από την κατάσταση οξειδώσής τους όσο και από τους υποκαταστάτες τους. Ρυθμίζοντας αυτά τα χαρακτηριστικά, παράχθηκαν αντιελονοσικά, αντιβακτηριδιακά και ανοσοκατασταλτικά φάρμακα που είναι ρουθηνιοκεντρικά. Επιπλέον, το ρουθίνιο διαθέτει ορισμένες ιδιότητες που το καθιστούν πολύ χρήσιμο στην ανάπτυξη φαρμακευτικών προϊόντων. (Allardyce and Dyson 2001) Οι παρακάτω έρευνες μελέτησαν τα σύμπλοκα Πυραζολίνης με Ru για την αντιμικροβιακή και αντικαρκινική τους δράση.

1. Στην παρούσα εργασία με πρώτο συγγραφέα τον/την Jugal V. Mehta (Mehta, Gajera and Patel 2016), κατασκευάστηκε διεξοδικά ένα σύνολο ομοληπτικών ενώσεων Ru με βάση ετεροκυκλικές τροποποιημένες πυραζολίνες. Διερευνήθηκε η βιοχημική χρησιμότητα κάθε συνθετικής ουσίας.



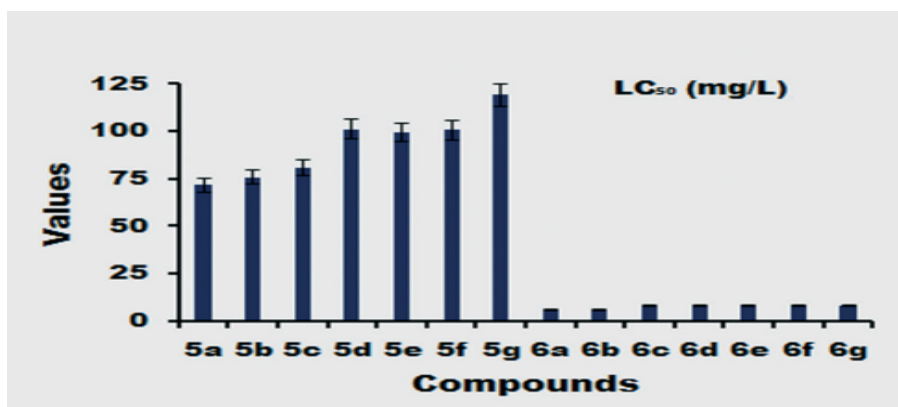
Σχήμα 2.2.1: Σύνθεση των πυραζολινών (**5a-5g**) και των συμπλόκων τους με ρουθίνιο (**6a-6g**). (Mehta, Gajera and Patel 2016)

Τα κύτταρα *Schizosaccharomyces pombe* χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της επίδρασης των μη δεσμευμένων πυραζολινών (5a-5g) και των συνθετικών ενώσεων Ru (6a-6g) στην κυτταρική επιβίωση. Τα σύμπλοκα ήταν πιο αποτελεσματικά από τους αντίστοιχους προσδέτες πυραζολίνης έναντι των κυττάρων *S. pombe*. Λόγω της κυτταρικής τους φύσης και των σχετικά μεγάλων διαστάσεων, τα κύτταρα *S. pombe* έχουν αναδειχθεί ως ένα χρήσιμο όργανο για τη μελέτη της κυτταρικής βιολογίας. Διαπιστώθηκε ότι οι τοξικότητες μεταβάλλονται ανάλογα με την παρουσία διαφόρων υποκαταστατών και τις ποσότητες των παρασκευασμένων ουσιών. Σε γενικές γραμμές, διαπιστώθηκε ότι η κυτταροτοξικότητα αυξάνεται με τη συγκέντρωση της ένωσης. Η πιο αποτελεσματική από όλες τις ουσίες που δοκιμάστηκαν ήταν το σύμπλοκο (6α).

Σύγκεντρωση ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	2	4	6	8	10
Ενώσεις	% Βιωσιμότητα				
5a	80	75	71	67	63
5b	81	78	72	69	64
5c	82	77	71	68	65
5d	83	78	73	70	67
5e	83	79	73	70	68
5f	84	79	75	72	70
5g	85	81	77	75	72
6a	60	57	53	50	45
6b	61	57	54	51	47
6c	62	58	54	51	48
6d	62	58	55	52	49
6e	64	61	56	53	50
6f	68	63	59	55	52
6g	72	67	62	60	55
DMSO	96				
Κύτταρα χωρίς αγωγή	97				

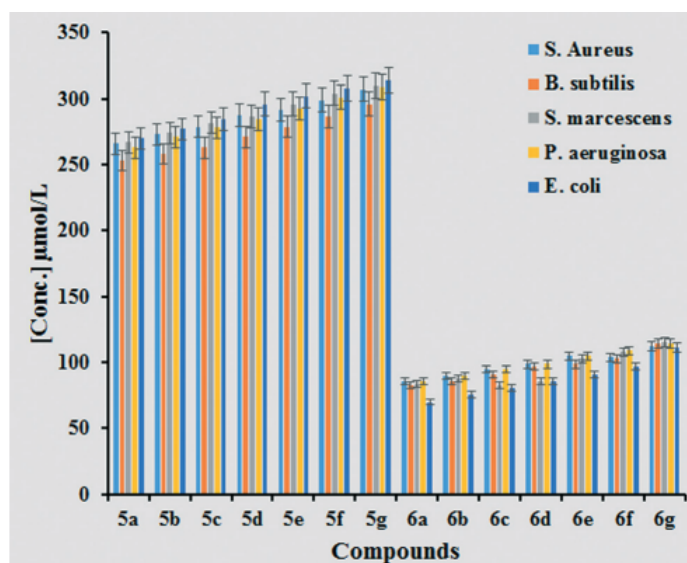
Πίνακας 2.2.2: Επίδραση των ενώσεων στη βιωσιμότητα των κυττάρων *S. Pombe* σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. (Mehta, Gajera and Patel 2016)

Κατά την εκτίμηση της δυνητικής επικινδυνότητας μιας ουσίας, η BSLB θεωρείται ευρέως ως ένα αξιόπιστο πρώτο βήμα. Η τεχνική αυτή είναι γρήγορη, φθηνή και αποτελεσματική. Έτσι, καταγράφηκε ο αριθμός των προνυμφών που πέθαναν ως αποτέλεσμα της έκθεσης τους στις εξεταζόμενες ενώσεις. Οι ερευνητές ανακάλυψαν ότι η περιεκτικότητα σε χημικές ουσίες συσχετίστηκε με το ποσοστό θανάτου των ναύπλιων της αλμυρής γαρίδας. Οι τιμές LC50 των ουσιών προσδιορίστηκαν μεταξύ 5,568 και 119,12 mg L⁻¹. Σε σύγκριση με τους αντίστοιχους προσδέτες τους, οι παρασκευαζόμενες ενώσεις ήταν αποτελεσματικοί θανατηφόροι παράγοντες. Η ένωση 6a είναι η πιο ισχυρή, ακολουθούμενη από τα 6b, 6c, 6f, 6d, 6e, 6g και τέλος από τα ligands της πυραζολίνης. Η έρευνα έδειξε ότι οι υψηλότερες συγκεντρώσεις της ουσίας αυξάνουν την τοξικότητά της.



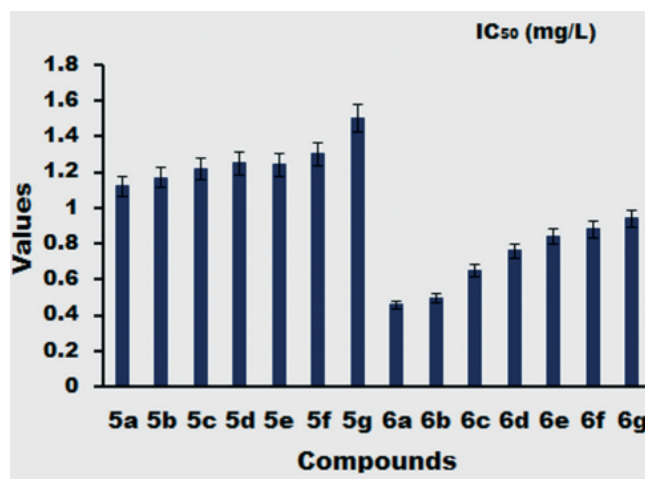
Σχήμα 2.2.3: Γραφική παράσταση των τιμών LC50 των διαφόρων ενώσεων σε mg L⁻¹ χρησιμοποιώντας γαρίδες άλμης, (Mehta, Gajera and Patel 2016)

Οι μεταλλικές ενώσεις των συνδέσμων πυραζολίνης παρουσίασαν σημαντική δράση έναντι πέντε διαφορετικών βακτηρίων σε *in vitro* αντιμικροβιακή δοκιμή. Η θεωρία του Overtone και της χηλικοποίησης μπορεί να είναι υπεύθυνη για αυτή την ενισχυμένη αντιμικροβιακή δράση. Επιπλέον, τα σύμπλοκα εμποδίζουν την παραγωγή πρωτεϊνών παρεμβαίνοντας στις διαδικασίες αναπνοής του κυττάρου, γεγονός που εμποδίζει σοβαρά την επέκταση των οργανισμών. Η ύπαρξη του φθορίου στην *πάρα-θέση* καθιστά το σύμπλοκο (6a) το πιο δραστικό από όλα τα σύμπλοκα.



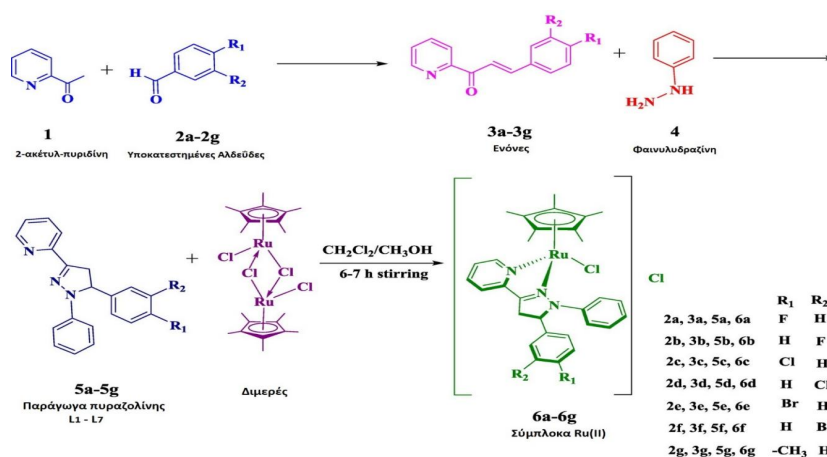
Σχήμα 2.2.4: Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων ελεύθερων συνδέσμων και συντιθέμενων συμπλόκων σε πέντε διαφορετικούς μικροοργανισμούς, (Mehta, Gajera and Patel 2016)

Επιπλέον, η αντιελονοσική δράση των πυραζολινών επιβεβαιώθηκε σε όλα τα σύμπλοκα Ru, αποδεικνύοντας το όφελος της συμπλοκοποίησης των πυραζολινών.



Σχήμα 2.2.5: Γραφική παράσταση των τιμών IC₅₀ των διαφόρων ενώσεων σε mg L⁻¹ χρησιμοποιώντας οργανισμό *Plasmodium falciparum*, (Mehta, Gajera and Patel 2016)

2. Η ίδια ερευνητική ομάδα, αλλά με πρώτο συγγραφέα με πρώτο τον/την Jugal V. Mehta (Mehta, Sanjay and Patel 2016) παρασκεύασε διάφορες ενώσεις ρουθηνίου με βάση «half-sandwich» μόρια πυραζολίνης, ώστε να διερευνηθεί η κυτταρική τους δράση.



Σχήμα 2.2.6: Σύνθεση τρι-υποκατεστημένων προσδετών πυραζολίνης (5a-5g) και συμπλοκοποίηση τους με ρουθίνιο, (Mehta, Sanjay and Patel 2016)

Προσδιορίστηκε η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) για την αντιβακτηριακή δράση των μη δεσμευμένων συνδέσμων πυραζολίνης (5a-5g) και των συντιθέμενων ενώσεων (6a-6g) έναντι πέντε διαφορετικών βακτηρίων. Σε σύγκριση με τα αντίστοιχα ligands πυραζολίνης, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι όλες οι ενώσεις ρουθηνίου είναι πιο αποτελεσματικές έναντι όλων των μικροοργανισμών. Όλες οι παραγόμενες ενώσεις έχουν τιμές MIC μεταξύ 67 και 102 μ M. Η αυξημένη λιποφιλικότητα των ενώσεων που προκύπτει από τη χηλική σύνδεση μπορεί να εξηγήσει την βλαβερή δράση τους. Οι ενώσεις αυτές μπορεί επίσης να είναι επιβλαβείς για τους μικροοργανισμούς επειδή εμποδίζουν την αναπνοή και απορυθμίζουν την οξειδωτική φωσφορυλίωση, δύο διαδικασίες που είναι απαραίτητες για την παραγωγή ενέργειας και ATP, αντίστοιχα. Φαίνεται ότι η ηλεκτρική δομή των ενώσεων και η ευκολία σύνδεσης στον πυρήνα του μετάλλου είναι δύο μεταβλητές που ρυθμίζουν την ανασταλτική τους δράση. Το σύμπλοκο (6a) έχει χαμηλότερη τιμή MIC από το σύμπλοκο (5a) πιθανώς επειδή είναι πιο λιπόφιλο και ενδεχομένως λόγω της ύπαρξης ενός ατόμου φθορίου ως υποκαταστάτη.

Ενώσεις	Gram +		Gram -		
	<i>S. Aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
5a	242 \pm 3	233 \pm 2	260 \pm 2	232 \pm 2	240 \pm 3
5b	265 \pm 2	245 \pm 2	271 \pm 2	262 \pm 2	233 \pm 2
5c	269 \pm 2	261 \pm 2	280 \pm 2	269 \pm 2	256 \pm 2
5d	277 \pm 2	266 \pm 3	282 \pm 2	278 \pm 2	262 \pm 2
5e	302 \pm 3	285 \pm 2	294 \pm 3	290 \pm 2	275 \pm 2
5f	307 \pm 3	296 \pm 3	308 \pm 2	292 \pm 3	276 \pm 2
5g	312 \pm 3	305 \pm 2	320 \pm 3	298 \pm 2	292 \pm 3
6a	67 \pm 1	72 \pm 1	74 \pm 1	69 \pm 1	68 \pm 1
6b	69 \pm 1	73 \pm 1	78 \pm 1	76 \pm 1	73 \pm 1
6c	73 \pm 1	77 \pm 1	83 \pm 1	85 \pm 1	76 \pm 1
6d	75 \pm 1	78 \pm 1	87 \pm 1	88 \pm 1	79 \pm 1
6e	82 \pm 1	85 \pm 1	88 \pm 1	95 \pm 1	85 \pm 1
6f	84 \pm 1	84 \pm 1	90 \pm 1	93 \pm 1	89 \pm 1
6g	86 \pm 1	95 \pm 1	96 \pm 2	102 \pm 2	97 \pm 1

Πίνακας 2.2.7: MIC των προσδετών και των συντιθέμενων συμπλόκων με τη μέθοδο αραίωσης σε ζυμό, σε μ M (Mehta, Sanjay and Patel 2016)

Προκειμένου να μελετήσουν την κυτταροτοξική δράση των ενώσεων, οι ερευνητές εκτέλεσαν δοκιμή BSLB. Οι αυξανόμενες συγκεντρώσεις των συμπλόκων συνδέονται με υψηλότερο ποσοστό θανάτου των γαρίδων. Προσδιορίστηκαν οι τιμές LC50 των ουσιών, οι οποίες εμπίπτουν στο εύρος 5,714-83,368 mg/μL. $6a > 6b > 6d > 6c > 6e > 6f$ ligands είναι η σειρά της δραστηριότητας των ενώσεων. Όπως ήταν αναμενόμενο, η θνησιμότητα αυξάνεται με την αύξηση των συγκεντρώσεων των ουσιών.

Οι ελεύθερες πυραζολίνες (5a-5g) και οι ενώσεις ρουθηνίου (6a-6g) αξιολογήθηκαν ως προς την κυτταροτοξικότητα τους σε πείραμα % βιωσιμότητας έναντι του *S. rombe*. Κάθε ένωση ρουθηνίου είναι πιο αποτελεσματική στη θανάτωση των κυττάρων *S. rombe* από τον αντίστοιχο υποδοχέα πυραζολίνης. Και πάλι διαπιστώθηκε ότι η κυτταροτοξικότητα αυξάνεται με την περιεκτικότητα σε χημικές ουσίες. Η πιο ισχυρή από όλες τις χημικές ουσίες είναι το σύμπλοκο (6a).

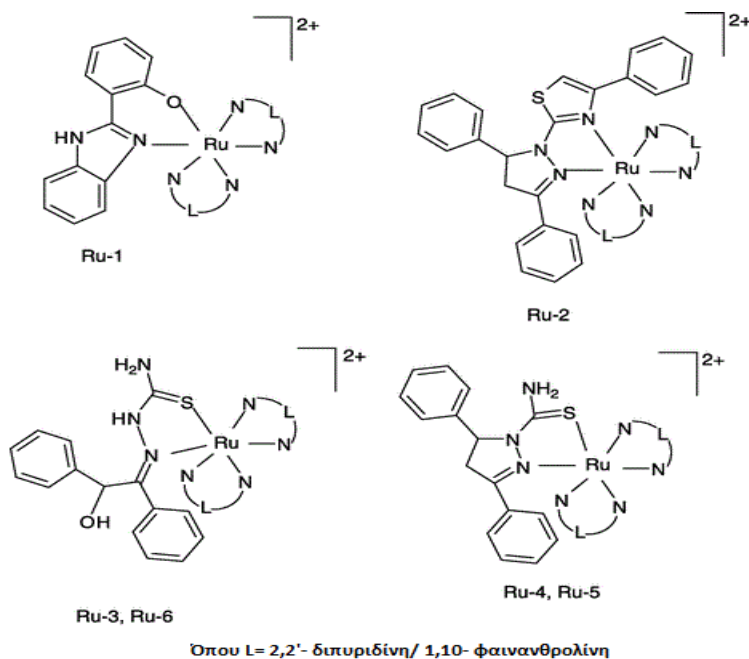
Συγκέντρωση (mg/L)	2	4	6	8	10
Ενώσεις	% Βιωσιμότητα				
5a	72 ± 2	68 ± 2	62 ± 1	59 ± 1	56 ± 1
5b	73 ± 2	69 ± 2	65 ± 1	61 ± 1	58 ± 1
5c	74 ± 2	67 ± 2	64 ± 1	61 ± 1	59 ± 1
5d	76 ± 2	69 ± 2	66 ± 1	62 ± 1	60 ± 1
5e	79 ± 2	75 ± 2	72 ± 2	68 ± 1	63 ± 1
5f	82 ± 3	77 ± 2	74 ± 2	72 ± 2	70 ± 2
5g	85 ± 3	78 ± 3	72 ± 2	70 ± 2	67 ± 2
6a	62 ± 1	58 ± 1	55 ± 1	50 ± 1	46 ± 1
6b	64 ± 1	60 ± 1	57 ± 1	54 ± 1	47 ± 1
6c	67 ± 2	61 ± 1	56 ± 1	52 ± 1	48 ± 1
6d	70 ± 2	63 ± 1	56 ± 1	51 ± 1	48 ± 1
6e	72 ± 2	66 ± 2	60 ± 1	55 ± 1	49 ± 1
6f	73 ± 2	66 ± 2	61 ± 1	56 ± 1	50 ± 1
6g	75 ± 2	70 ± 2	64 ± 1	56 ± 1	50 ± 1

Συγκέντρωση (mg/L)	2	4	6	8	10
DMSO	96 ± 4				
Κύτταρα- αρνητικοί μάρτυρες	97 ± 4				

Πίνακας 2.2.8: Επίδραση των ενώσεων στη βιωσιμότητα των κυττάρων *S. Pombe* σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, (Mehta, Sanjay and Patel 2016)

Για τις νέες ενώσεις έχει επίσης καταγραφεί υψηλή δραστικότητα έναντι μιας ανθεκτικής στη χλωροκίνη παραλλαγής του *Plasmodium falciparum*. Όλες οι ενώσεις φαίνονται δραστικότερες σε σχέση με τα υποστρώματά τους (0,54-2,15 mg/μL). Ο αριθμός IC₅₀ για το σύμπλοκο (6a) είναι 0,54 mg/μL.

3. Σκοπός της μελέτης της επιστημονικής ομάδας με επικεφαλής τον/την Suresh Rathinasamy (Rathinasamy, et al. 2008) ήταν να εξεταστούν οι επιδράσεις νέων ενώσεων ρουθηνίου σε κυτταρικές σειρές *EAC*(*Ehrlich-Lettre ascites carcinoma*) όσον αφορά την αντικαρκινική τους δράση. Ο προληπτικός χαρακτήρας των ενώσεων ρουθηνίου διερευνήθηκε επίσης μέσω της μελέτης της αιμόλυσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων που προκλήθηκε από AAPH(2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride).



Σχήμα 2.2.9: Δομή των συμπλόκων ρουθηνίου, (Rathinasamy, et al. 2008)

Δεδομένου ότι το ασκητικό υγρό αποτελεί άμεση πηγή θρεπτικών ουσιών για τα καρκινικά κύτταρα, η ταχεία αύξηση του ασκητικού υγρού παράλληλα με την ανάπτυξη του όγκου θα μπορούσε να συμβάλει στη θρέψη του αναπτυσσόμενου όγκου. Σημαντικές αυξήσεις παρατηρήθηκαν στο μέγεθος του όγκου και στον αριθμό των βιώσιμων κυττάρων, ενώ ο αριθμός των μη βιώσιμων κυττάρων ήταν σημαντικά χαμηλός, στα ζώα ελέγχου EAC. Το μέγεθος του όγκου, ο όγκος των πακεταρισμένων κυττάρων και ο αριθμός των βιώσιμων κυττάρων στα ζώα που έλαβαν θεραπεία με ρουθίνιο ήταν σημαντικά χαμηλότερος από ό,τι στα ζώα ελέγχου EAC μετά τη χορήγηση ενώσεων ρουθινίου σε δόση 2 mg/kg. Η ικανότητα των αντικαρκινικών φαρμάκων να αυξάνουν τα ποσοστά επιβίωσης στα τρωκτικά είναι ένα καθιερωμένο μέτρο για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητάς τους. Αποτέλεσμα της θεραπείας με τις ενώσεις του ρουθινίου ήταν ότι τα τρωκτικά με καρκίνο έζησαν περισσότερο. Σε σύγκριση με τη σισπλατίνη, η οποία βελτίωσε τη ζωή μόνο κατά 23 ημέρες, τα Ru1 και Ru2 σε δόση 2 mg/kg είχαν ως αποτέλεσμα μια μέση περίοδο επιβίωσης 38 και 35 ημερών, αντίστοιχα. Η αναστολή της ανάπτυξης όγκων από τις ενώσεις ρουθινίου επαληθεύτηκε από τη μείωση του μέσου σωματικού βάρους των ζώων.

Θεραπεία	Συν.Σωμ.Βάρος (g)	Μέσος χρόνος επιβίωσης (μέρες)	Μέγεθος όγκου (ml)	Ζώντα κύτταρα σε ασκητικό υγρό (%)	
Group I	21.4 ± 0.9	-	-	-	
Group II	28.0 ± 1.5	22	3.4 ± 0.3	96.5 ± 1.4	
Group III	18.5 ± 0.6	23	-	-	
Group IV	23.1 ± 0.9	38	0.8 ± 0.2	47.0 ± 1.7	
Group V	22.1 ± 1.1	35	0.8 ± 0.3	45.6 ± 3.0	
Group VI	24.4 ± 0.7	27	1.8 ± 0.3	67.5 ± 1.9	
Group VII	25.1 ± 0.9	30	1.8 ± 0.3	75.4 ± 2.6	
Group VIII	24.8 ± 0.3	31	1.5 ± 0.2	64.6 ± 1.5	
Group IX	23.6 ± 0.8	25	14	1.4 ± 0.3	64.9 ± 2.2

Πίνακας 2.2.10: Αντικαρκινική δράση συμπλόκων ρουθινίου έναντι ποντικών που φέρουν EAC, (Rathinasamy, et al. 2008)

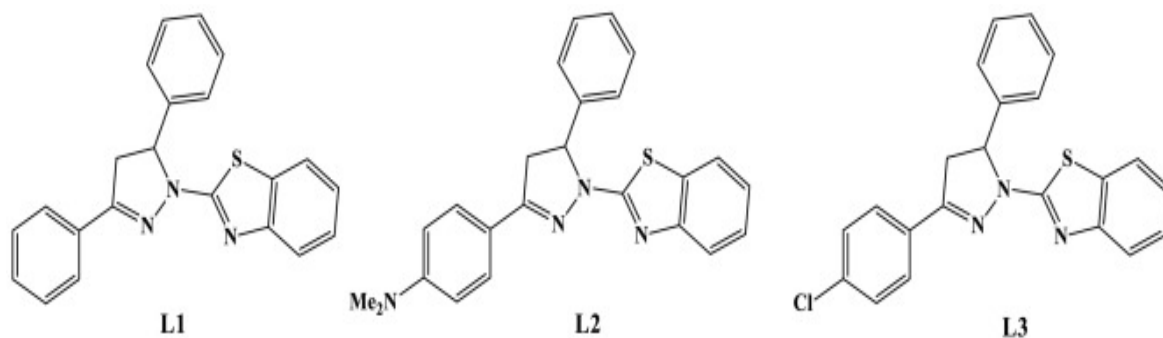
Η μυελοκαταστολή και η αναιμία είναι συχνές παρενέργειες της θεραπείας για τον καρκίνο. Την ημέρα 10, οι αιματολογικοί δείκτες ήταν σημαντικά διαφορετικά μεταξύ των τρωκτικών που έφεραν όγκο και της ομάδας ελέγχου. Η μείωση του ποσοστού αιμοσφαιρίνης των RBC συσχετίστηκε με αύξηση του συνολικού αριθμού WBC στα ποντίκια ελέγχου EAC. Ταυτόχρονα, η θεραπεία με σύμπλοκο ρουθηνίου επανέφερε σε σχεδόν φυσιολογικά επίπεδα όλους τους δείκτες αίματος που είχαν μεταβληθεί. Μειώνοντας την ποσότητα του θρεπτικού υγρού και σταματώντας την ανάπτυξη όγκων, τα σύμπλοκα ρουθηνίου πιθανότατα παρέτειναν τη ζωή των ποντικών που έφεραν EAC.

Σύμπλοκα	IC ₅₀ (μg/ml)
Σύμπλεγμα Ru - 1	76.15
Σύμπλεγμα Ru - 2	73.28
Σύμπλεγμα Ru - 3	89.62
Σύμπλεγμα Ru - 4	94.37
Σύμπλεγμα Ru - 5	85.51
Σύμπλεγμα Ru - 6	84.24

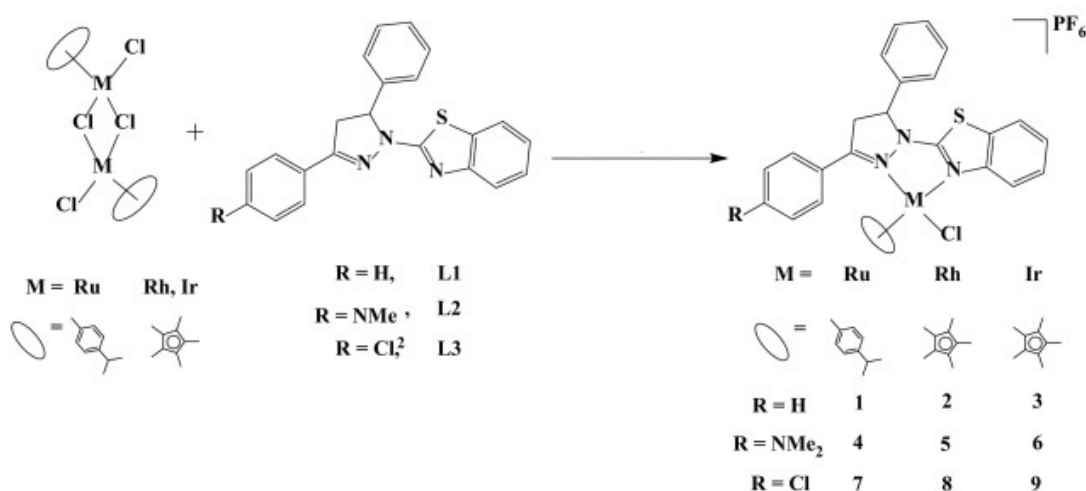
Πίνακας 2.2.11: Τιμή IC₅₀ των συντιθέμενων συμπλόκων ρουθηνίου στη δοκιμασία αντιαιμολυτικής δράσης, (Rathinasamy, et al. 2008)

Η υψηλή συγκέντρωση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων της βιομεμβράνης μπορεί να την καθιστά ιδιαίτερα ευάλωτη στην τοξικότητα που προκαλούν τα μέταλλα. Η παρούσα έρευνα έδειξε ότι οι μεμβράνες των RBC που υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με AAPH διαφυλάχθηκαν από τις ενώσεις ρουθηνίου. Όταν δοκιμάστηκαν σε συγκεντρώσεις μεταξύ 20 και 120 μg/ml, παρατηρήθηκε ανασταλτική δράση.

4. Οι ερευνητές με πρώτο συγγραφέα τον/την Carley Giffert L. Nongpuiur (C. L. Nongpuiur, et al. 2022) συνέθεσαν ορισμένα μεταλλικά σύμπλοκα που περιέχουν προσδέτες με βάση την πυραζολίνη και αξιολόγησαν τις κυτταροτοξικές και αντιβακτηριακές τους ιδιότητες.



Εικόνα 2.2.12 Χημικές δομές των συνδέσμων πυραζολίνης (L1, L2 και L3), (C. L. Nongpiur, et al. 2022),



Σχήμα 2.2.13: Σχηματική αναπαράσταση της σύνθεσης των συμπλόκων, (C. L. Nongpiur, et al. 2022)

Τέσσερα σημαντικά βακτήρια, δύο θετικά κατά Gram (*Staphylococcus aureus* και *Bacillus thuringiensis*) και δύο αρνητικά κατά Gram (*Escherichia coli* και *Pseudomonas aeruginosa*), δοκιμάστηκαν *in vitro* για να διαπιστωθεί κατά πόσον τα ligands L1-L3 με βάση την πυραζολίνη και τα μεταλλικά τους σύμπλοκα 1-9 θα μπορούσαν να αναστείλουν την ανάπτυξη αυτών των βακτηρίων. Δοκιμάστηκε επίσης η πρότυπη καναμυκίνη. Για τα σύμπλοκα 1, 2, 4, 6 και 9 παρατηρήθηκε υψηλή αντιβιοτική δράση έναντι των θετικών κατά Gram οργανισμών (*B. thuringiensis*), ενώ για τα σύμπλοκα 1 και 7 επισημάνθηκαν οι ανασταλτικές ζώνες (*S. aureus*). Οι τιμές αναστολής 24 ± 1 mm και 25 ± 1 mm έναντι του *S. aureus* και 23 ± 1 mm και 24 ± 1 mm αντίστοιχα έναντι του *B. thuringiensis* δείχνουν ότι τα σύμπλοκα 1 και 7 έχουν τη μεγαλύτερη ζώνη αναστολής έναντι των δύο υπό εξέταση βακτηριακών απομονώσεων.

Κανένας από τους συνδυασμούς δεν παρουσιάζει σημαντική αντιβιοτική δράση έναντι αρνητικών κατά Gram βακτηρίων. Επιπλέον, κανένα από τα ligands δεν

παρουσίασε αντιβακτηριακή δράση έναντι των μικροβίων που χρησιμοποιήθηκαν στην έρευνα. Το χλώριο, μια ένωση που έλκει ηλεκτρόνια, μπορεί να ευθύνεται για την ενισχυμένη αντιμικροβιακή δράση του συμπλόκου 7. Ορισμένες ουσίες με χλωρο-υποκατεστημένες πυραζολίνες έχουν βρεθεί να έχουν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση. Τα σύμπλοκα 1 και 7 παρουσιάζουν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση, η οποία θα μπορούσε να επηρεαστεί από τον πυρήνα του μετάλλου ρουθηνίου, ένα κρίσιμο συστατικό στην αντίδραση των μεταλλικών συμπλόκων.

Για τα θετικά κατά Gram μικρόβια, όπως το *S. aureus* και το *B. thuringiensis*, οι ουσίες έχουν τιμές MIC μεταξύ 2,5 και 3,0 mg/ml. Οι ενώσεις αυτές ήταν επίσης πιο αποτελεσματικές από την κανονική καναμυκίνη έναντι των μικροοργανισμών της δοκιμής.

A/A	Ενώσεις	Στελέχη			
		Gram –		Gram +	
		<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. thuringiensis</i>
	Καναμυκίνη(+ έλεγχος)	21 ± 1	21 ± 1	20 ± 1	20 ± 1
1	Ligand 1	–	–	–	–
2	Complex 1	–	–	24 ± 1	25 ± 1
3	Ligand 2	–	–	–	–
4	Complex 4	–	–	–	24 ± 1
5	Ligand 3	–	–	–	–
6	Complex 7	–	–	23 ± 1	24 ± 1

Πίνακας 2.2.14: Αντιβακτηριακή δράση (Agar well, διάμετρος ζώνης αναστολής) των εξεταζόμενων ενώσεων ρουθηνίου σε συγκέντρωση 5 mg/ml έναντι διαφόρων βακτηριακών στελεχών, (C. L. Nongpiur, et al. 2022)

Το αντιοξειδωτικό δυναμικό των ενώσεων μετρήθηκε φασματοφωτομετρικά χρησιμοποιώντας τη δοκιμή ελεύθερων ριζών DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) *in vitro*. Αυτή η σταθερή ελεύθερη ρίζα που περιέχει περιττά ηλεκτρόνια μετατρέπει τη μεθανόλη σε μωβ υγρό. Ο αποχρωματισμός του υγρού υποδεικνύει ότι έχει αναχθεί λαμβάνοντας ένα ηλεκτρόνιο ή σωματίδιο υδρογόνου από το αντιοξειδωτικό μόριο.

Σε ποσότητα 1 mg/ml, όλες οι ουσίες παρουσιάζουν πολύ χαμηλά επίπεδα αντιοξειδωτικής δράσης. Το ασκορβικό οξύ, το χρυσό πρότυπο, είχε την υψηλότερη ικανότητα απορρόφησης ριζών από όλες τις ουσίες που δοκιμάστηκαν. Όλες οι ουσίες που εξετάστηκαν είχαν αντιοξειδωτική δράση πολύ κάτω από 50%, η οποία είναι αμελητέα, και όλες δεν μπόρεσαν να μειώσουν επιτυχώς την ελεύθερη ρίζα DPPH λόγω της κακής αλληλεπίδρασης A-H.

A/A	Ενώσεις	% DRSA
1	AA	100
2	Ligand 1	6
3	Complex 1	5
4	Ligand 2	3
5	Complex 4	18
6	Ligand 3	3
7	Complex 7	7

Πίνακας 2.2.15: Δραστικότητα απορρόφησης ριζών DPPH των δοκιμαζόμενων ενώσεων, (C. L. Nongpiur, et al. 2022)

Κατά τη διάρκεια της ανακάλυψης και ανάπτυξης φαρμάκων, οι δοκιμασίες βιωσιμότητας των κυττάρων εκτελούνται συνήθως για να διαπιστωθεί εάν τα κύτταρα έχουν επιβιώσει ή όχι από τη χημική επεξεργασία. Η δοκιμασία MTT χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό του ρυθμού διάσπασης του χρωματομετρικού αντιδραστηρίου από μιτοχονδριακά ένζυμα (SDH). Προκειμένου να προσδιοριστεί πόσα βιώσιμα κύτταρα έχει κάποιος, χρησιμοποιείται η δοκιμασία MTT. Τα μιτοχονδριακά ένζυμα των βιώσιμων κυττάρων μετατρέπουν το MTT σε μια στερεή μωβ ουσία φορμαζάνης στο δείγμα εξέτασης. Μετρώντας την απορρόφηση στα 570 nm σε σαρωτή μικροπλάκας, μπορεί κανείς να λάβει μια χονδρική προσέγγιση της αναλογίας των βιώσιμων κυττάρων προς το σύνολο των κυττάρων.

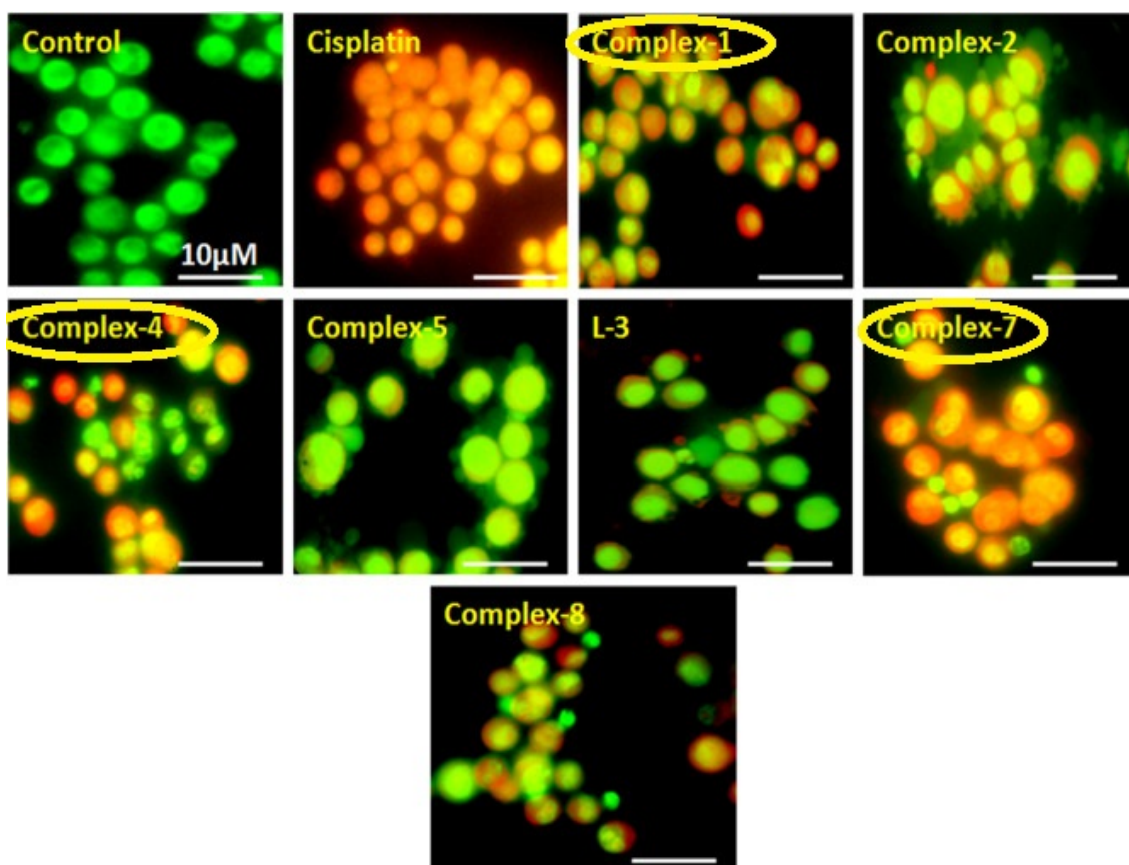
Το σύμπλοκο 7 προκάλεσε την υψηλότερη θνησιμότητα στην κυτταρική σειρά DL, ακολουθούμενο από τα σύμπλοκα 1, 2, 8, 4, το ligand L3 και το σύμπλοκο 5. Η αυξημένη κυτταροτοξικότητα του συμπλόκου 7 μπορεί να οφείλεται στην ύπαρξη του

χλωριδίου που έλκει ηλεκτρόνια ως ligand στο κέντρο πυραζολίνης, γεγονός που εξηγεί γιατί το σύμπλοκο αυτό βρέθηκε να είναι το πιο ισχυρό. Προηγούμενες έρευνες έχουν επίσης δείξει ότι η ύπαρξη υποκαταστατών που έλκουν ηλεκτρόνια στις ενώσεις πυραζολίνης ενισχύει την αντικαρκινική δράση της ένωσης. Παρόμοια με τον τρόπο με τον οποίο ο τύπος του μεταλλικού κέντρου που συνδέεται επηρεάζει την αντιμικροβιακή δράση των συμπλόκων, ο τύπος του μεταλλικού κέντρου που συνδέεται μπορεί επίσης να καθορίζει την καρκινική δράση των συμπλόκων. Τα αποτελέσματα αποκάλυψαν ότι σε σύγκριση με τις αντίστοιχες ενώσεις ρόδιου και ιριδίου, οι ενώσεις ρουθηνίου 1 και 7 είναι πιο δραστικές. Οι μελέτες έδειξαν ότι η θνησιμότητα αυξάνεται με την αύξηση των συγκεντρώσεων.

A/A	Ενώσεις	Κυττ.σειρά	Κυττ.κατάσταση	IC ₅₀	Κυττ.σειρά	Κυττ.κατάσταση	IC ₅₀
1.	Σισπλατίνη	DL	Καρκίνος	02.51	PBMC	Μη-καρκινικό	16
2.	Σύμπλεγμα 1	DL	Καρκίνος	32.87	PBMC	Μη-καρκινικό	221
4.	Σύμπλεγμα 4	DL	Καρκίνος	55.41	PBMC	Μη-καρκινικό	352
6.	L3	DL	Καρκίνος	132.74	PBMC	Μη-καρκινικό	410
7.	Σύμπλεγμα 7	DL	Καρκίνος	27.58	PBMC	Μη-καρκινικό	188

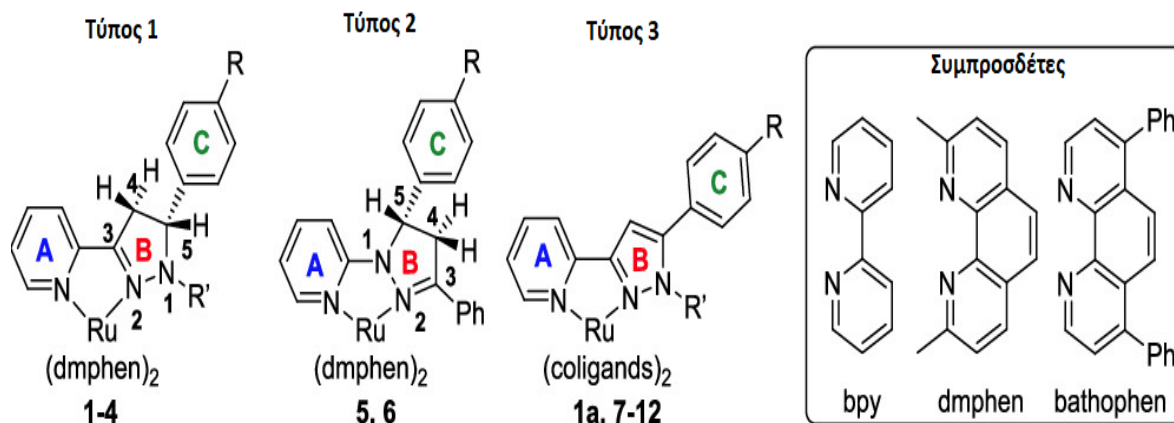
Πίνακας 2.2.16: Τιμές IC₅₀ (μM) διαφόρων ενώσεων σε DL (καρκινικές) και PBMC (μη καρκινικές) κυτταρικές σειρές μετά από 48 ώρες θεραπείας, (C. L. Nongriur, et al. 2022)

Οι συντιθέμενες ενώσεις παρουσίασαν αποπτωτική δράση, καθώς προκάλεσαν ρήξη της μεμβράνης, συμπύκνωση της χρωματίνης και θραύση των πυρήνων στα κύτταρα DL (αποπτωτικά σώματα). Η μέγιστη θνησιμότητα των κυττάρων απόπτωσης προκλήθηκε από το σύμπλοκο 7, ακολουθούμενο από το σύμπλοκο 1, το σύμπλοκο 2, το σύμπλοκο 8, το σύμπλοκο 4, το σύμπλοκο 5 και το L3-σημειωτέον, τα ευρήματα μπορούν να συνδεθούν με τη δοκιμή επιβίωσης των κυττάρων (MTT).

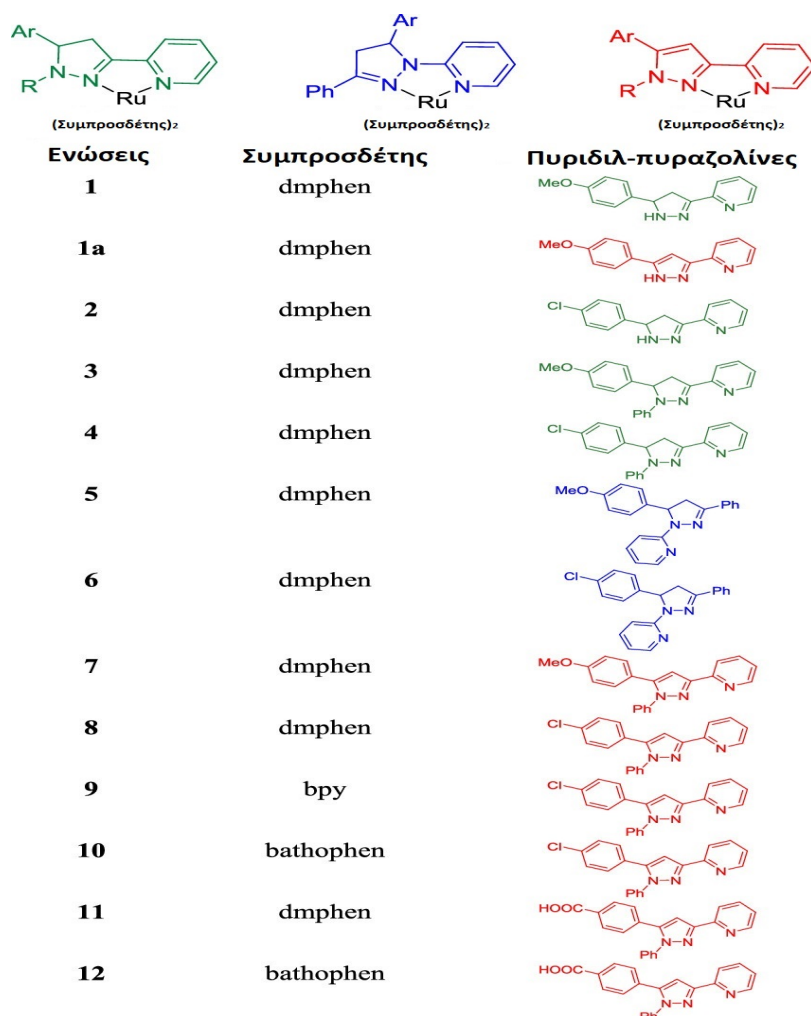


Εικόνα 2.2.17: Μορφολογικά χαρακτηριστικά των βιώσιμων (πράσινο) και των αποπτωτικών (κόκκινο) κυττάρων που παρατηρούνται με μικροσκόπιο φθορισμού. Στα επεξεργασμένα κύτταρα παρατηρήθηκε αποπτωτικός πυρήνας με διάσπαση της μεμβράνης και συμπύκνωση της χρωματίνης. Η σισπλατίνη χρησιμοποιήθηκε ως φάρμακο αναφοράς, (C. L. Nongriur, et al. 2022)

5. Στην παρούσα έρευνα με πρώτο συγγραφέα τον Dmytro Havrylyuk (Havrylyuk, et al. 2020) σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν νέα σύμπλοκα $[Ru(dmphen)_2]^{2+}$ με βάση τις κανονικές 3-(πυριδ-2-υλ)-πυραζολίνες (τύπος 1) και τις αντίστροφες 1-(πυριδ-2-υλ)-πυραζολίνες (τύπος 2), με σκοπό να περιγράψουν οι φωτοχημικές τους ιδιότητες σε υδατικά μέσα, η *in vitro* αντικαρκινική δράση και οι σχέσεις δομής-δράσης (SAR) για τις εξεταζόμενες ενώσεις.



Σχήμα 2.2.18: Σύμπλοκα Ru (1-12) με τις κανονικές πυρίδυλο-πυραζολίνες (τύπος 1), τις αντίστροφες πυρίδυλο-πυραζολίνες (τύπος 2) και τις κανονικές πυρίδυλο-πυραζόλες (τύπος 3), (Havrylyuk, et al. 2020)



Σχήμα 2.2.19: Δομές των συμπλόκων που περιλαμβάνονται στην παρούσα μελέτη, (Havrylyuk, et al. 2020)

Τα σύμπλοκα 1-12 δοκιμάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να σκοτώνουν έναν τύπο λευχαιμικού κυττάρου. Η αρχική μελέτη SAR για τα σύμπλοκα $[Ru(dmpphen)_2]^{2+}$ (1-8) με τα ligands πυρίδυλο-πυραζολίνης επικεντρώθηκε στα εξής: (α) τροποποίηση του υποκαταστάτη Ar στην 5 θέση του τμήματος πυραζολίνης, (β) εισαγωγή ενός τμήματος φαινυλίου στην 1N θέση της, (γ) κανονική και αντίστροφη ισομέρεια πυρίδυλο-πυραζολίνης και (δ) αντικατάσταση πυραζόλης-πυραζόλης.

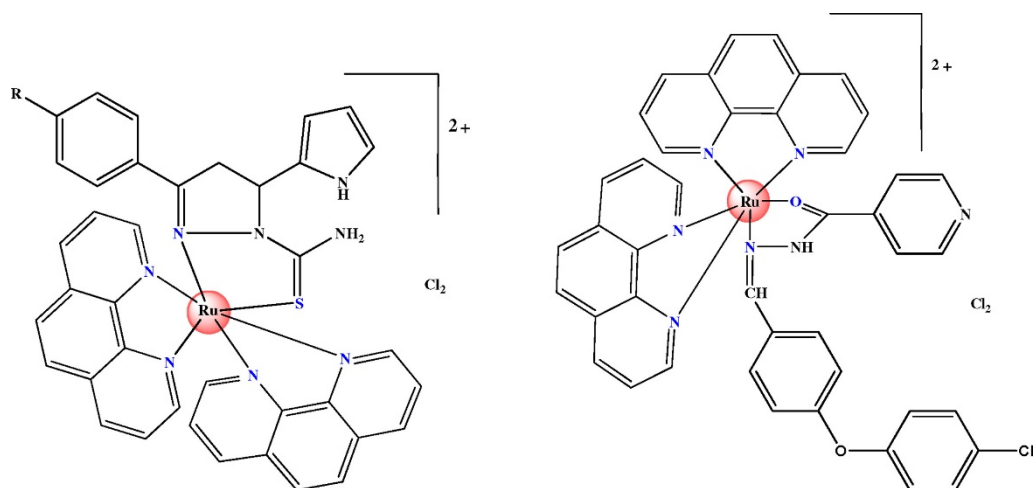
Οι τιμές κυτταροτοξικότητας IC_{50} κυμαίνονταν από 0,2 έως 7,6 μM για τις ενώσεις 1-4 με τα τυπικά ligands πυρίδυλο-πυραζολίνης, τα οποία είναι τουλάχιστον 20-80 φορές πιο ισχυρά από τα ελεύθερα ligands πυρίδυλο-πυραζολίνης. Η αλλαγή της ομάδας Ar στην 5'-θέση της πυραζολίνης, η προσθήκη ενός φαινυλικού δακτυλίου στην 1'-θέση ή η οξείδωση της είχαν όλα αξιοσημείωτες επιδράσεις στις δραστηριότητες των ενώσεων. Υπήρχε κάποια αβεβαιότητα σχετικά με τον αντίκτυπο της αντικατάστασης της μεθοξυ-ομάδας που δίνει ηλεκτρόνια με το χλώριο που αφαιρεί ηλεκτρόνια. Οι αντικαρκινικές δράσεις των συμπλόκων (2) και (4) που περιείχαν χλωρο-υποκατεστημένες πυραζολίνες ήταν διπλάσιες από εκείνες των συμπλόκων (1) και (3) που περιείχαν την ομάδα MeO. Όμως, το υποκατεστημένο με *p*-MeO-φαινυλο-πυραζόλιο ligand της ένωσης 7 ήταν πιο δραστικό από εκείνο του συμπλόκου 8. Αν και η εισαγωγή του φαινυλικού δακτυλίου στη θέση 1N (ενώσεις 3, 4) μείωσε μόνο ελαφρώς τις κυτταροτοξικές ιδιότητες, είναι αξιοσημείωτο ότι οι ενώσεις 1 και 2 (παράγωγα 1NH-πυραζολίνης) παρουσίασαν πλήρη αναστολή της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων (0% βιώσιμα κύτταρα) σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις από τα αντίστοιχα ανάλογα σύμπλοκα 3 και 4 με υποκατάσταση N-Ph. Η αντικαρκινική δράση δεν ενισχύθηκε σημαντικά από τη σύζευξη αντίστροφων συνδέσμων πυρίδυλο-πυραζολίνης (τύπος 2) στο σκελετό $[Ru(dmpphen)_2]^{2+}$ (σύμπλοκα 5 και 6), σε σύγκριση με τις ισομερείς ενώσεις 3 και 4. Ειδικότερα, η ένωση 1α παρουσίασε 15 φορές μεγαλύτερη ισχύ από τη σισπλατίνη στην αναστολή της ανάπτυξης καρκινικών όγκων της κυτταρικής σειράς HL60 ($IC_{50} = 0,2 \mu M$).

Ενώσεις	Απουσία φωτός IC ₅₀ , μM	Παρουσία IC ₅₀ , μM	φωτός Δείκτης φωτοτοξικότητας, PI
1	1.0	1.6	0.6
1a	0.2	0.2	1
2	0.6	0.5	1.2
3	2.4	1.5	1.5
4	0.8	0.5	1.6
5	0.8	1.3	0.6
6	1.0	1.4	0.7
7	0.9	0.9	1
8	7.6	1.5	5
9	44.7	1.6	28
10	8.5	0.6	14
11	116.7	0.8	146
12	29.3	0.5	59

Πίνακας 2.2.20: Τιμές μισής μέγιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (IC₅₀) κυτταροτοξικότητας (μM, κυτταρική γραμμή HL60), (Havrylyuk, et al. 2020).

Η ολική θανάτωση των κυττάρων σημειώθηκε σε ποσότητες 10 φορές χαμηλότερες από ό,τι στο σκοτάδι όταν το φως ενεργοποίησε τις 3, 4, 7 και 8, αλλά οι τιμές IC₅₀ δεν άλλαξαν σημαντικά. Αποτελεσματικότητα στο σκοτάδι έναντι της κυτταρικής σειράς HL60 έδειξαν επίσης τα σύμπλοκα 5 και 6 των ανεστραμμένων πυρίδυλο-πυραζολινικών συνδέσμων. Επιπλέον, οι εν λόγω χημικές ουσίες εμφανίζουν καθυστερημένη φωτοεκπομπή, γεγονός που μειώνει τη χρησιμότητά τους για το PACT. Οι δείκτες φωτοτοξικότητας της ένωσης 9 αυξήθηκαν από PI = 5 σε PI = 28 μετά την προσθήκη νέων συμπροσδετών στο σύμπλοκο. Οι υψηλότερες τιμές PI (146 και 59) επιτεύχθηκαν με τη συμπερίληψη ενός καρβοξυλικού οξέος στις ετερόπλευρες ενώσεις 11 και 12, η οποία οδήγησε σε δραματική μείωση της κυτταροτοξικότητας στο σκοτάδι.

6. Οι ερευνητές με επικεφαλής τον/την Sreekanth Thota (Thota, et al. 2016) αναφέρουν τη σύνθεση συμπλόκων ρουθηνίου του τύπου [Ru(phen)₂(4-CF₃-pdc)]₂+Cl₂, [Ru(phen)₂(2-F-pdc)]₂+Cl₂, [Ru(bpy)₂(2-OH-pdc)]₂+Cl₂, [Ru(bpy)₂(4-Cl-pbinh)]₂+Cl₂ (όπου pdc = 3-phenyl-5-(1H-pyrrol-2-yl)-4,5-dihydro-1H-pyrazole-1-carbothioamide, pbinh = phenoxybenzylidene isonicotinyl hydrazides) και την κυτταροτοξικότητα τους έναντι διαφόρων καρκινικών κυτταρικών σειρών.



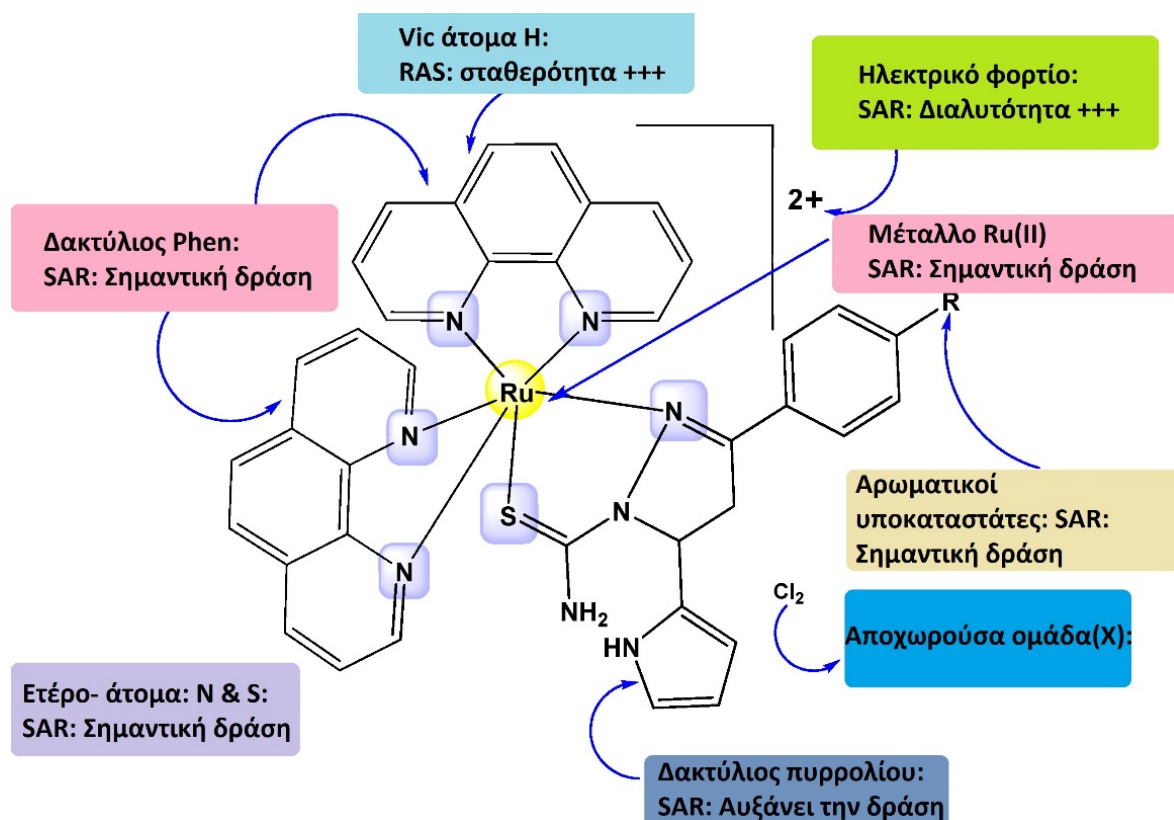
Εικόνα 2.2.21: Χημικές δομές των $[Ru(phen)_2(R-pdc)]^{2+}$ και $[Ru(phen)_2(pbinh)]^{2+}$, (Thota, et al. 2016)

Η ανάλυση της κυτταροτοξικής δραστηριότητας των συντιθέμενων ενώσεων έναντι 5 διαφορετικών καρκινικών κυτταρικών σειρών - της λευχαιμίας του *L1210*, του ανθρώπινου λεμφοκυττάρου *CEM*, του ανθρώπινου επιθηλιακού καρκινώματος του τραχήλου της μήτρας *HeLa*, του *BEL-7402* και του *Molt4/C8* - έγινε με τη χρήση της δοκιμασίας κυτταρικού πολλαπλασιασμού 3-(4,5-διμεθυλοθειαζο-2-υλ)-2,5-διφαινυλοτετραζολίου βρωμιούχου (MTT). Οι τιμές IC_{50} υπολογίστηκαν μετά από επεξεργασία των κυττάρων με ενώσεις ρουθηνίου διαφορετικών ποσοτήτων. Ως φάρμακο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η σισπλατίνη. Τα δεδομένα παρουσιάστηκαν ως ο μέσος όρος τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. Σε σύγκριση με τις ενώσεις ρουθηνίου που περιέχουν ένα ligand ισονικοτινυλοϋδραζονίου (Ru-7 έως Ru-8), τα σύμπλοκα ρουθηνίου που περιέχουν ligands pdc (Ru-1 έως Ru-6) έδειξαν ανώτερη κυτταροτοξικότητα στην ανάλυση δομής-δραστηριότητας. Όπως ήταν αναμενόμενο, τα ligands ήταν κυτταροτοξικά σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις mol/L από τα σύμπλοκα ρουθηνίου.

Ενώσεις	IC_{50} ($\mu\text{mol/L}$)				
	<i>BEL7402</i>	<i>L1210</i>	<i>HL60</i>	<i>Molt4/C8</i>	<i>CEM</i>
4-CF₃-pdc	176 ± 34	>250	152 ± 16	188 ± 12	>250
4-F-pdc	194 ± 06	222 ± 12	138 ± 08	>250	125 ± 08

Ενώσεις	IC ₅₀ (μmol/L)				
	<i>BEL7402</i>	<i>L1210</i>	<i>HL60</i>	<i>Molt4/C_s</i>	<i>CEM</i>
4-OH-pdc	138 ± 12	154 ± 18	122 ± 06	118 ± 12	198 ± 06
4-Cl-pbinh	220 ± 14	196 ± 04	174 ± 12	186 ± 02	>250
Ru-1	0.82 ± 0.4	1.2 ± 0.8	0.52 ± 0.02	0.64 ± 0.06	0.72 ± 0.4
Ru-2	0.92 ± 0.06	0.68 ± 0.2	0.54 ± 0.6	0.48 ± 0.04	0.62 ± 0.08
Ru-3	4.2 ± 0.8	8.6 ± 1.2	3.6 ± 0.08	2.8 ± 0.06	2.2 ± 0.4
Ru-4	3.8 ± 0.08	5.0 ± 0.8	7.2 ± 0.42	5.2 ± 0.6	4.8 ± 0.22
Ru-5	0.88 ± 0.6	1.2 ± 0.2	0.58 ± 0.04	0.66 ± 0.02	0.82 ± 0.4
Ru-6	0.92 ± 0.8	0.84 ± 0.04	0.68 ± 0.2	0.94 ± 0.04	0.62 ± 0.8
Ru-7	3.6 ± 0.08	7.4 ± 0.6	6.6 ± 1.2	2.5 ± 0.4	6.4 ± 0.06
Ru-8	4.2 ± 0.6	6.8 ± 0.2	3.6 ± 0.08	2.8 ± 0.6	7.4 ± 0.8
Σισπλατίνη	0.78 ± 0.04	1.2 ± 0.02	0.98 ± 0.02	0.51 ± 0.1	0.87 ± 0.06

Πίνακας 2.2.22: κυτταροτοξικές μελέτες προσδετών και συμπλόκων ρουθηνίου, (Thota, et al. 2016)



Εικόνα 2.2.23: Σχέση δομής-δραστηριότητας του $[Ru(phen)_2(R-pbinh)]^{2+}Cl_2$, (Thota, et al. 2016)

Η εξέταση της δέσμευσης των συμπλόκων ρουθηνίου στο DNA με φασματοσκοπία απορρόφησης και φθορισμού έδειξε μια παρεμβαλλόμενη αλληλεπίδραση μεταξύ των συμπλόκων και του CT-DNA με σταθερές δέσμευσης στο εύρος 103 έως 105 M⁻¹. Το pUC19 DNA μετατράπηκε σχεδόν πλήρως από την υπερσπειροειδή μορφή (μορφή I) στην εγκοπή κυκλικής μορφής από το Ru-5. Φασματοσκοπικές μετρήσεις UV-vis της σύνδεσης του συμπλόκου ρουθηνίου με το BSA έδειξαν την ύπαρξη στατικής απόσβεσης και οι σύγχρονες αναλύσεις φάσματος έδειξαν ότι τα σύμπλοκα προσδέθηκαν στο BSA στις περιοχές τυροσίνης και τρυπτοφάνης. Οι περισσότερες από αυτές τις ενώσεις ρουθηνίου διασπούν αποτελεσματικά το DNA κατά την ακτινοβολία μέσω μιας μοριακής οδού που περιλαμβάνει τη δημιουργία οξυγόνου singlet ως αντιδραστικό είδος και συνδέονται καλά με DNA από θύμο μοσχαριού.

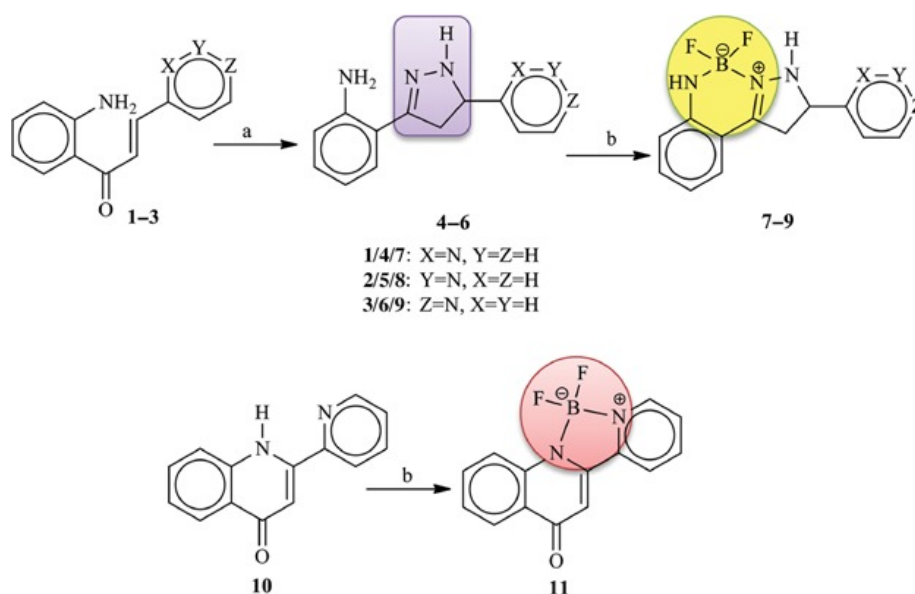
2.7 Μεταλλικά Σύμπλοκα Πυραζολίνης με Β

Το βόριο είναι ένα βιοενεργό στοιχείο που, σε διατροφικές ποσότητες, έχει θετικές επιδράσεις στην ανάπτυξη των οστών και στη λειτουργία του κεντρικού νευρικού συστήματος, μειώνει τα συμπτώματα της αρθρίτιδας, προάγει τη δράση των ορμονών και συνδέεται με χαμηλότερο κίνδυνο για ορισμένα είδη καρκίνου, σύμφωνα με μελέτες *in vitro*, σε ζώα και σε ανθρώπους. (Nielsen, Update on human health effects of boron 2014). Το βορικό οξύ, τα βορικά άλατα, το οξείδιο του βορίου και πολλές άλλες οργανοβορικές ενώσεις είναι γενικά αβλαβείς τόσο για τους ανθρώπους όσο και για τα ζώα (με τοξικότητα παρόμοια με εκείνη του επιτραπέζιου αλατιού). Για τα θηλαστικά, η LD₅₀ (δόση στην οποία πεθαίνει το 50% του πληθυσμού) είναι περίπου 6 g ανά kg σωματικού βάρους. Μια ουσία θεωρείται αβλαβής εάν η LD₅₀ της είναι μεγαλύτερη από 2 g/kg. Η κατανάλωση βορικού οξέος 4 g/ημέρα βρέθηκε ότι είναι ασφαλής, αλλά περισσότερο από αυτό είναι τοξικό. Κατανάλωση άνω των 0,5 γραμμαρίων ημερησίως για 50 ημέρες έχει ως αποτέλεσμα ήπια γαστρεντερικά προβλήματα καθώς και άλλα θέματα που μπορεί να είναι επιβλαβή (Nielsen, Boron in human and animal nutrition 1997). Η χορήγηση συμπληρώματος βορίου μπορεί να βοηθήσει στην ανάπτυξη των οστών, στην επιδιόρθωση των πληγών και στην αντιοξειδωτική δραστηριότητα (Pizzorno 2015), ενώ η έλλειψη βορίου στην τροφή μπορεί να προκαλέσει έλλειμμα. Τέλος, οι ενώσεις βορίου και οι οργανικές του ενώσεις εμπλέκονται με συστατικά βιολογικών συστημάτων, όπως οι λιπιδικές μεμβράνες και οι πρωτεΐνες, μέσω διαφόρων διαδικασιών. Κατά συνέπεια, τα παράγωγα βορίου είναι αποτελεσματικά έναντι κανονικών και πολυανθεκτικών παθογόνων στελεχών. Έχουν επίσης δράση κατά των βιοϋμενίων και είναι λιγότερο πιθανό να προκαλέσουν ανοχή στα φάρμακα (Fink and Uchman 2021).

Πάρα ταύτα, η δράση των πυραζολινικών ενώσεων βορίου δεν έχουν μελετηθεί ακόμη επαρκώς και ως εκ τούτου, μόνο μια αρθρογραφία έχει ανευρεθεί που να αναφέρεται σε αυτά τα μόρια.

1. Οι ερευνητές με πρώτο συγγραφέα την Nuran Kahriman (Kahriman, et al. 2016) επεδίωξαν να δημιουργήσουν νέες 3, 5-διϋποκατεστημένες 2-πυραζολινικές ενώσεις αντιδρώντας διάφορες χαλκόνες με ένυδρη υδραζίνη. Οι νεοσυντιθέμενες

πυραζολίνες αναμίχθηκαν στη συνέχεια με τριφθοριούχο βόριο για τη δημιουργία ενώσεων βορίου-φθορίου [(3-(2'-αμινοφαίνυλο),5-(2'-/3'-/4'-πυρλιδυλο)πυραζολίνη] (BOAPPY). Με τον ίδιο τρόπο παρασκευάστηκε η ένωση βορίου 1,2'-διαζαφλαβόνης (BODAF). Επιπλέον, η ερευνητική ομάδα παρουσιάζει τα ευρήματα της βιοχημικής ανάλυσης όλων των νέων συνθετικών ουσιών 4-9 και 11 όσον αφορά την αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή και ενζυμική ανασταλτική τους δράση.



Σχήμα 2.9.1: Σύνθεση 3,5-διυποκατεστημένων πυραζολινών και συμπλόκων βορίου-φθορίου. Αντιδραστήρια και συνθήκες: α) $N_2H_4 \cdot H_2O$, οξικό οξύ, αιθανόλη, παλινδρόμηση (reflux), 6-12 ώρες. β) i) άνυδρο CH_2Cl_2 , Et_3N , ατμόσφαιρα N_2 σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά- ii) $BF_3 \cdot Et_2O$, αρχικά σε θερμοκρασία παγόλουτρου και στη συνέχεια σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες. (Kahrman, et al. 2016)

Τα μόρια 4-9 και 11 αξιολογήθηκαν για αντιβακτηριακή δράση έναντι δύο θετικών κατά Gram βακτηρίων (*Bacillus subtilis* και *Staphylococcus epidermidis*) και τεσσάρων αρνητικών κατά Gram βακτηρίων (*Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhimurium* και *Enterobacter cloacae*). Ως θετικός έλεγχος, τα ευρήματα συγκρίθηκαν με το σύνηθες φάρμακο αμπικιλίνη για την καταστολή της βακτηριακής ανάπτυξης. Η επίδραση των συντιθέμενων χημικών ουσιών 4-9 και 11 και του αντιμικροβιακού στην ανάπτυξη των βακτηρίων μετρήθηκε στο τέλος της

περιόδου ανάπτυξης. Όλες οι παρασκευασμένες ουσίες επέδειξαν αντιμικροβιακή δράση που κυμαινόταν από εξαιρετική έως ήπια, με ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (σε DMSO) που εκτεινόταν από 4,7 έως 150 µg/mL.

Ενώσεις	Διάλυμα (mg/mL)	Μικροοργανισμοί και τιμές MIC(µg/mL)					
		Gram(+) βακτήρια		Gram(-) βακτήρια			
		<i>Bs</i>	<i>Se</i>	<i>St</i>	<i>Ec</i>	<i>Pv</i>	<i>Kp</i>
4	1000	18.75	18.75	75	75	75	75
5	1000	150	150	150	150	150	150
6	1000	75	37.5	75	75	75	75
7	1000	75	75	75	75	37.5	37.5
8	1000	9.4	18.75	75	150	150	150
9	1000	150	150	150	150	150	150
11	1000	18.75	4.7	18.75	18.75	18.75	18.75
DMSO		+	+	+	+	+	+
LB		+	+	+	+	+	+
LB ^c + amp.	100 µg/mL	-	-	-	-	-	-

Πίνακας 2.9.2: In-vitro αντιβακτηριακές δραστηριότητες των 4-9, 11.

+:ανάπτυξη -: καμία ανάπτυξη.

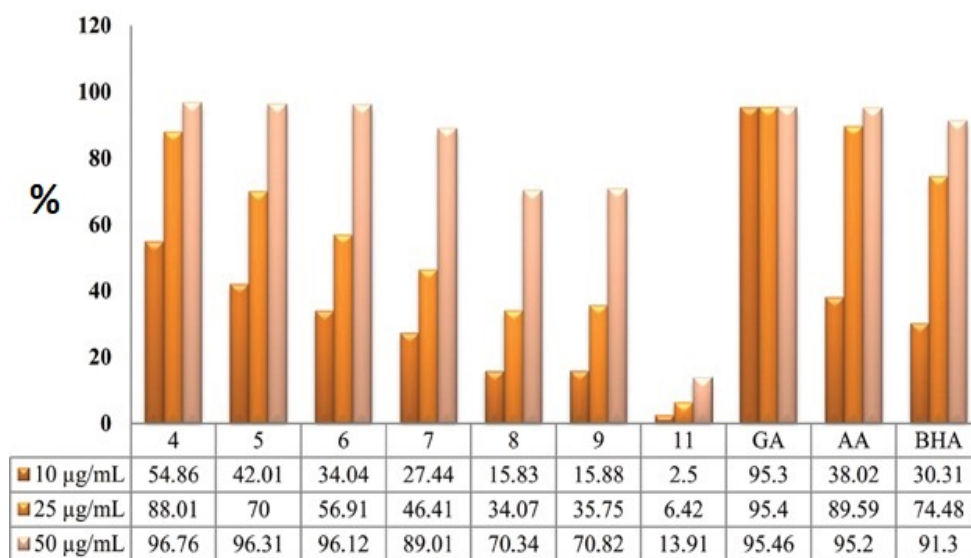
Bs: Bacillus subtilis ATCC 66333, **Se:** Staphylococcus epidermidis ATCC 14990, **Kp:** Klebsiella pneumoniae ATCC 13883, **Pv:** Proteus vulgaris ATCC 13315, **St:** Salmonella typhimurium ATCC 14028, **Ec:** Enterobacter cloacae ATCC 13047, **DMSO:** διμεθυλοσουλφοξείδιο, **LB:** ζυμός Luria Bertani χωρίς χημικό συστατικό και αντιβιοτικό, **amp:** αμπικιλίνη. (Kahriman, et al. 2016)

Τα μόρια 4 και 6 παρουσίασαν υψηλότερη δραστικότητα από τις ενώσεις βορίου-φθορίου τους (7 και 9). Η ένωση 5 ήταν, ωστόσο, λιγότερο ισχυρή από τον υβρίδιο βορίου-φθορίου της (8). Οι πυραζολίνες (4-6) και οι ενώσεις βορίου-φθορίου τους (7-9) ήταν γενικά πιο ισχυρές έναντι των μικροβίων Gram (+) από ό,τι των Gram (-). Η ένωση 8 είχε τις χαμηλότερες τιμές MIC σε βακτήρια Gram (+) που εξετάστηκαν

(Bs: 9,4 και Se: 18,75 $\mu\text{g}/\text{mL}$), ενώ η ένωση 7 είχε τις χαμηλότερες τιμές MIC σε βακτήρια Gram (-) (ειδικά στα Pn: 37,5 και Kp: 37,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Υπάρχει σαφής συσχέτιση μεταξύ της μοριακής δομής και της αντιβακτηριακής δράσης, διότι η σειρά δραστηριότητας στις ελεύθερες πυροζολίνες ήταν 4 > 6 > 5 (όρθο > πάρα > μέτα) και 7 > 8 > 9 (όρθο > μέτα > πάρα) στις συμπλοκοποιημένες μορφές (όπως αναφέρεται και στην εισαγωγική ενότητα, οι θέσεις «όρθο-», «μέτα-» και «πάρα-» αναφέρονται στην θέση που έχουν οι μη-υδρογονικοί υποκαταστάτες σε έναν υδρογονάνθρακα) . Δηλαδή, τα ορθοπαράγωγα είναι η πιο αποτελεσματική δομή. Η ένωση 11 (BODAF), από την άλλη πλευρά, ήταν ένα νέο σύμπλοκο βορίου-φθορίου που περιείχε έναν πυρήνα αζαφλαβόνης, το οποίο, σε αντίθεση με τις άλλες ενώσεις, παρουσίασε τις υψηλότερες αντιβακτηριακές δράσεις (MIC, στο εύρος 4,7-18,75 $\mu\text{g}/\text{mL}$) όχι μόνο έναντι βακτηρίων Gram (+) (*B. subtilis* και *S. epidermidis*), αλλά και των Gram (-). (*S. typhimurium*, *E. cloacae*, *P. vulgaris* και *K. pneumoniae*).

Μελετήθηκαν επίσης οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες των ενώσεων 4-9 και 11 με την βιοδοκιμή DPPH (2,2-διφαινυλο-1-πίκρυλο-υδραζύλιο) και SOD (υπεροξειδική δισμουτάση). Η DPPH είναι μια σταθερή αζωτοκεντρική ελεύθερη ρίζα που χρησιμοποιείται ευρέως σε αντιοξειδωτικές δοκιμές λόγω της γρήγορης και απλής τεχνικής της. Τα αντιοξειδωτικά σε αυτή τη δοκιμή αδρανοποιούν τη ρίζα λόγω της της προσφοράς. Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες των ουσιών συγκρίθηκαν με εκείνες του γαλλικού οξέος (GA), του ασκορβικού οξέος (AA) και της βουτυλοϋδροξυανισόλης (BHA) και βρέθηκαν υψηλότερες τιμές σε διάφορες αναλογίες, υποδεικνύοντας υψηλή αντιοξειδωτική δράση. Το βασικό διάλυμα των ενώσεων σε μεθανόλη παράχθηκε σε 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ και αξιολογήθηκε για τη δραστηριότητα του στη δέσμευση ριζών σε ποσότητες 10, 25 και 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

DPPH



Ενώσεις

Σχήμα 2.9.3: Αναστολή (%) της οξειδωτικής δράσης του DPPH από τις κανονικές και τις νέες ενώσεις (10, 25 και 50 µg/mL), AA: Ασκορβικό οξύ, GA: γαλλικό οξύ, BHA: βουτυλοϋδροξυανισόλη, (Kahriman, et al. 2016)

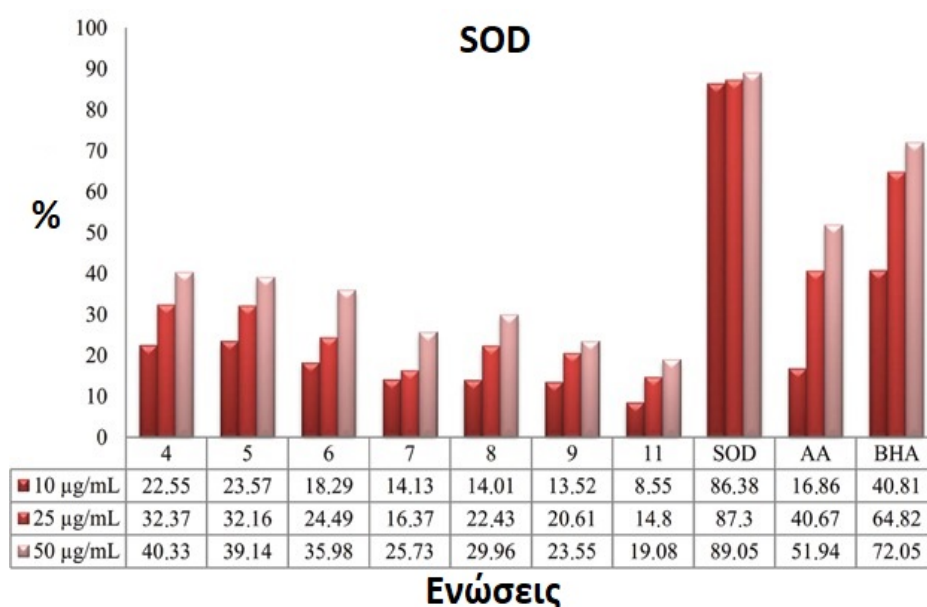
Τα αντιοξειδωτικά πορίσματα έδειξαν ότι όλες οι νέες ενώσεις πυραζολίνης (4-6) είχαν εξαιρετικές ικανότητες δέσμευσης DPPH. Η ένωση 4 είχε τη μεγαλύτερη δράση, με ποσοστά καταστολής 54,86, 88,01 και 96,76% σε δόσεις 10, 25 και 50 µg/mL, αντίστοιχα. Η ένωση 11, από την άλλη πλευρά, είχε τη χαμηλότερη δράση δέσμευσης DPPH. Στις ίδιες ποσότητες, οι προσδιοριζόμενες ανασταλτικές τιμές ήταν 2,50 και 13,91%. Κατά φθίνουσα σειρά, οι τιμές αναστολής της απορρόφησης DPPH των προτύπων και των ενώσεων 4-9 και 11 ήταν οι εξής: 4 (96,76%) > 5 (96,31 %) > 6 (96,12%) > GA (95,46%) > AA (95,20 %) > BHA (91,30 %) > 7 (89,01%) > 9 (70,82%) > 8 (70,34%) > 11 (13,91%).

Οι αντιοξειδωτική δράση των ενώσεων 4-9 και 11 αξιολογήθηκαν σε ένα πείραμα μη ενζυμικής παραγωγής ριζών υπεροξειδίου με τη χρήση μιας τροποποιημένης φασματοφωτομετρικής τεχνικής στη δοκιμασία απορρόφησης SOD.

Θετικοί έλεγχοι ήταν το AA και το BHA. Πολλά έμβια όντα βασίζονται στην οξείδωση για την παραγωγή ενέργειας για τις κυτταρικές λειτουργίες. Από την άλλη πλευρά, τα αντιδραστικά είδη οξυγόνου (ROS), όπως οι ρίζες υδροξυλίου και τα ανιόντα υπεροξειδίου, είναι πρόδρομοι ενεργών ελεύθερων ριζών που συνδυάζονται

με βιολογικά συστατικά, όπως τα λιπαρά οξέα, το DNA και οι πρωτεΐνες, προκαλώντας βλάβες στους ιστούς. Κατά συνέπεια, οι χημικές ουσίες που απομακρύνουν τις ρίζες υπεροξειδίου είναι σημαντικές ουσίες ικανές να προστατεύουν τα κύτταρα από διάφορες ασθένειες.

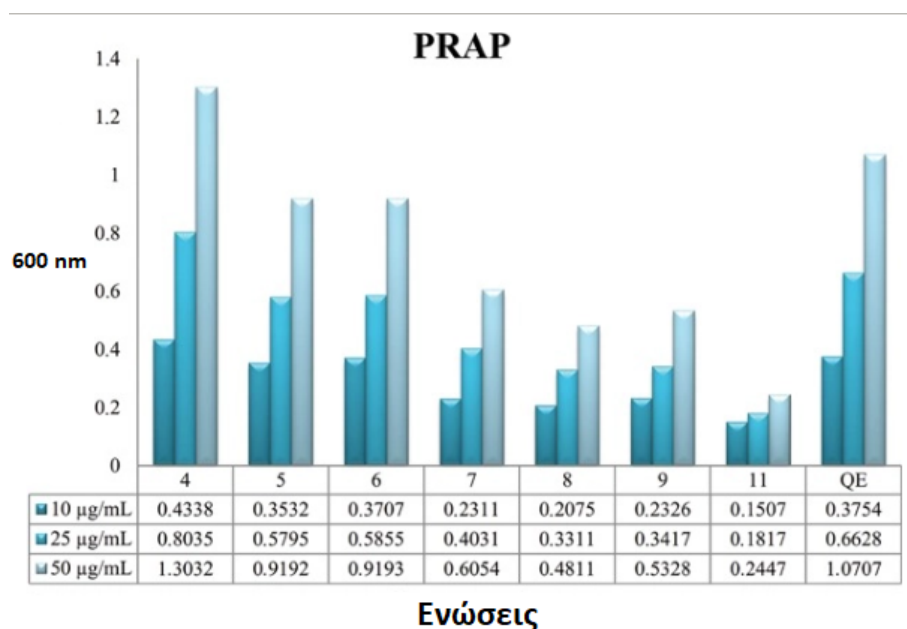
Μεταξύ των δοκιμαζόμενων νέων ενώσεων, η ένωση 4 είχε τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση υπεροξειδίου σε όλες τις ελεγχθείσες συγκεντρώσεις. Η ένωση 11 είχε τη χαμηλότερη δραστηριότητα στη δοκιμασία DPPH. Η αντιοξειδωτική ικανότητα των προτύπων και των νέων ουσιών στα 50 µg/ml ήταν με την ακόλουθη σειρά: (89,05%) > BHA (72,05%) > AA (51,94%) > 4 (40,33%) > 5 (39,14%) > 6 (35,98%) > 8 (29,96%) > 7 (25,73%) > 9 (23,55%) > 11 (19,08%). Τα ευρήματα αυτά έδειξαν ότι οι ενώσεις 4-9 και 11 έχουν εξαιρετικές ικανότητες απορρόφησης ριζών DPPH και μέτριες ικανότητες απορρόφησης ριζών υπεροξειδίου.



Σχήμα 2.9.4: Αναστολή (%) της οξειδωτικής δράσης το SOD από τις κανονικές και τις νέες ενώσεις (10, 25 και 50 µg/mL), AA: Ασκορβικό οξύ, GA: γαλλικό οξύ, BHA: βουτυλοϋδροξυανισόλη, (Kahrman, et al. 2016)

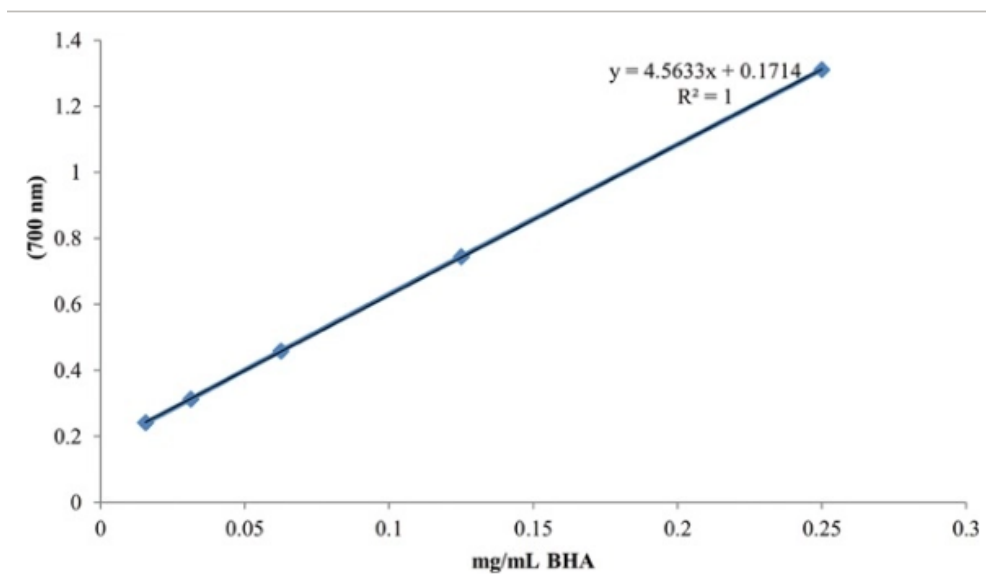
Επιπλέον, εξετάστηκαν οι δραστηριότητες αναγωγικής ισχύος των ενώσεων 4-9 και 11 με τη χρήση τόσο της αντιοξειδωτικής αναγωγικής ισχύος του φωσφομολυβδενίου (PRAP) όσο και της αναγωγικής αντιοξειδωτικής ισχύος του σιδήρου (FRAP). Μία από τις σημαντικότερες αντιοξειδωτικές διεργασίες είναι η

αναγωγική ισχύς, η οποία χρησιμοποιείται ως δείκτης της προσφοράς] ηλεκτρονίων. Η δοκιμασία PRAP βασίζεται στην αναγωγή του Mo(VI) σε Mo(V) από τις εξεταζόμενες ουσίες και στη συνακόλουθη δημιουργία πράσινου συμπλόκου φωσφορικού άλατος/Mo(V).



Σχήμα 2.9.5: Τιμές της αναγωγικής αντιοξειδωτικής ισχύος του φωσφομολυβδενίου (PRAP) των πρότυπων και των νέων ενώσεων (10, 25 και 50 µg/mL). (Kahrman, et al. 2016)

Οι ενώσεις με τις μεγαλύτερες ενδείξεις στα 600 nm είχαν υψηλότερη αναγωγική και αντιοξειδωτική ικανότητα. Οι τιμές της αναγωγικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του φωσφομολυβδενίου των νέων ενώσεων και του προτύπου έπεσαν με την ακόλουθη σειρά σε 25 µg/mL: 4 (0,8035) > QE (0. 6628) > 6 (0.5855) > 5 (0.5795) > 7 (0.4031) > 9 (0.3417) > 8 (0.3311) > 11 (0.1817). Η δοκιμή αναγωγικής αντιοξειδωτικής ισχύος του σιδήρου (FRAP) είναι μια απλή τεχνική για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας νέων ενώσεων. Το σύμπλοκο σιδηρούχου καλίου/φερρικυανιδίου ανάγεται στη σιδηρούχα μορφή του παρουσία χημικών ουσιών που δίνουν ηλεκτρόνια και στη συνέχεια αντιδρά με χλωριούχο σίδηρο για να παραχθεί ένα μπλε/πράσινο σύμπλοκο. Λαμβάνονται οι τιμές απορρόφησης της ουσίας αναφοράς (BHA) και σχεδιάζονται σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της BHA (0,015625, 0,03125, 0,0625, 0,125, 0,25 mg/ml).



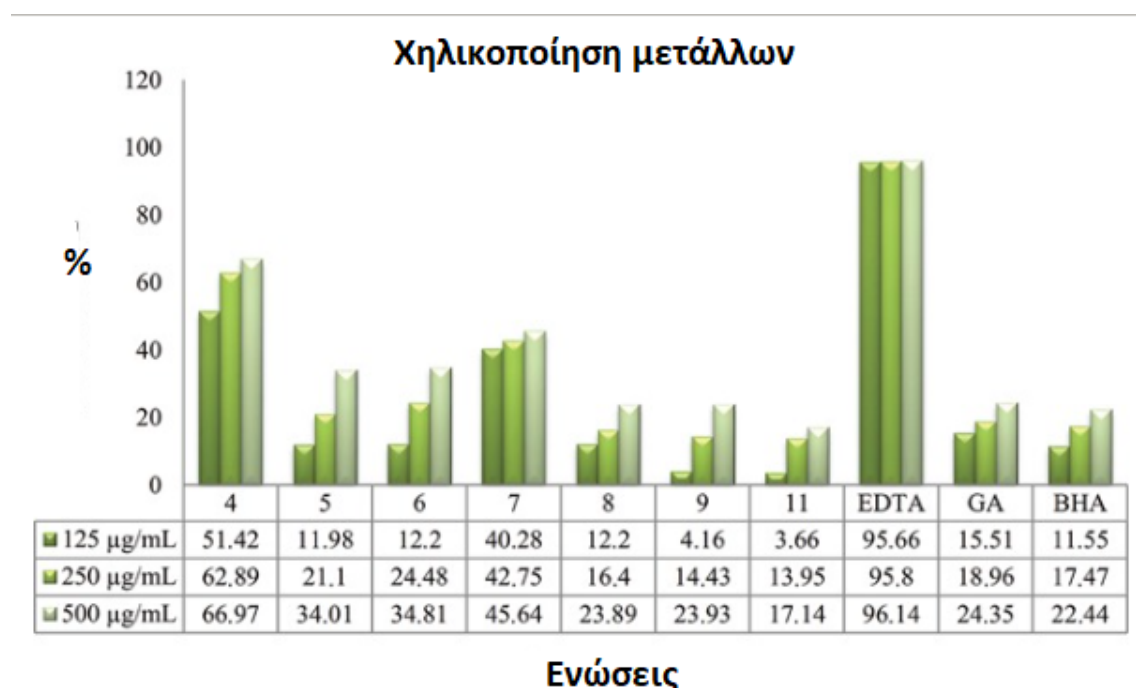
Σχήμα 2.9.6: Πρότυπο γράφημα για τη δοκιμασία FRAP για το BHA. (Kahriman, et al. 2016)

Η σιδηροαναγωγική ικανότητα των καινούριων χημικών ουσιών παρατίθεται με την ακόλουθη σειρά (mg BHA/g δείγματος): 4 (416.91) > 7 (392.89) > 6 (291.30) > 5 (279) > 9 (278.27) > 8 (273.16) > 11 (55.05). Τα ευρήματα της δοκιμής υποστηρίζουν επίσης το συμπέρασμα ότι η αντιοξειδωτική δράση αυξάνεται με τη συγκέντρωση, με την ένωση 4 να έχει τη μεγαλύτερη αναγωγική ικανότητα μεταξύ των ενώσεων δοκιμής.

Ενώσεις	FRAP (700 nm) mg BHA/g δείγματος
4	416.91 ± 3.82
5	279 ± 4.52
6	291.30 ± 0.84
7	392.89 ± 3.14
8	273.16 ± 3.12
9	278.27 ± 4.41
11	55.05 ± 2.94

Πίνακας: 2.9.7: Οι τιμές της αντιοξειδωτικής ισχύος αναγωγής του σιδήρου (FRAP) των 4-9, 11, (Kahriman, et al. 2016)

Τα μέταλλα μετάπτωσης είναι σημαντικά στον ανθρώπινο οργανισμό, επειδή παρέχουν όχι μόνο ενζυμικές δραστηριότητες αλλά και ασύζευκτα ηλεκτρόνια που συνδυάζονται γρήγορα με υπεροξείδια για τη δημιουργία ριζών αλκοξυλίου. Κατά συνέπεια, η χηλική σύνδεση των μετάλλων μετάπτωσης με αντιοξειδωτικά μπορεί να θεωρηθεί ουσιαστικός παράγοντας στη διαδικασία οξείδωσης. Στην παρούσα μελέτη διαπιστώθηκαν δραστηριότητες χηλικοποίησης μετάλλων και συγκρίθηκαν με τις ενώσεις αναφοράς, EDTA, GA και BHA.



Σχήμα 2.9.7: Αναστολή (%) των δράσεων χηλικοποίησης μετάλλων των κανονικών και των καινούργιων ενώσεων (125, 250 και 500 µg/mL). (Kahriman, et al. 2016)

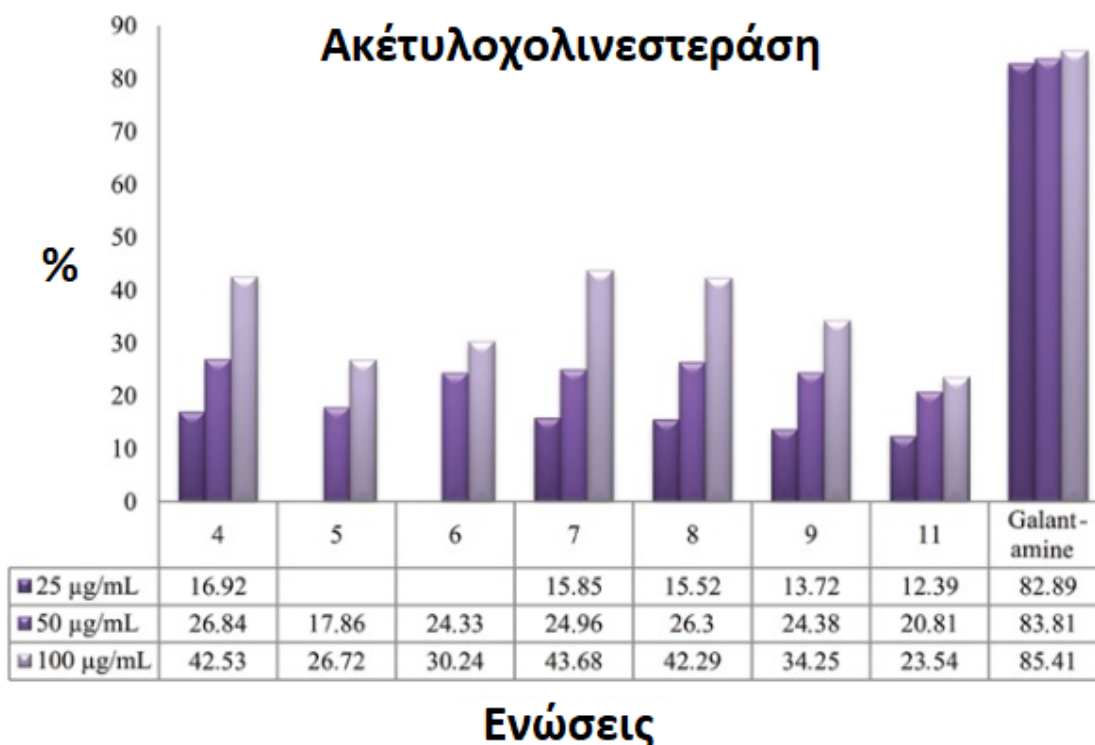
Οι χηλικοποιητικές δυνατότητες των ενώσεων 4-9 και 11 μετρήθηκαν σε ποσότητες 125, 250 και 500 µg/ml. Οι χηλική δραστηριότητα των ενώσεων 4-9 και 11 και του προτύπου αυξήθηκαν με την ακόλουθη σειρά στα 125 µg/mL: EDTA (95,66%) > 4 (51,4 %) > 7 (40,28 %) > GA (15,51%) > 6 (12,20%) = 8 (12,20%) > 5 (11,98%) > BHA (11,55%) > 9 (4,16%) > 11 (3,66%). Τα παραπάνω δεδομένα που συνδέονται με διαφορετικές αντιοξειδωτικές δράσεις έδειξαν ότι οι ενώσεις πυραζολίνης 4-6 και τα

σύμπλοκα τους βορίου-φθορίου (7-9 και 11) διέθεταν αξιοσημείωτες αντιοξειδωτικές δράσεις.

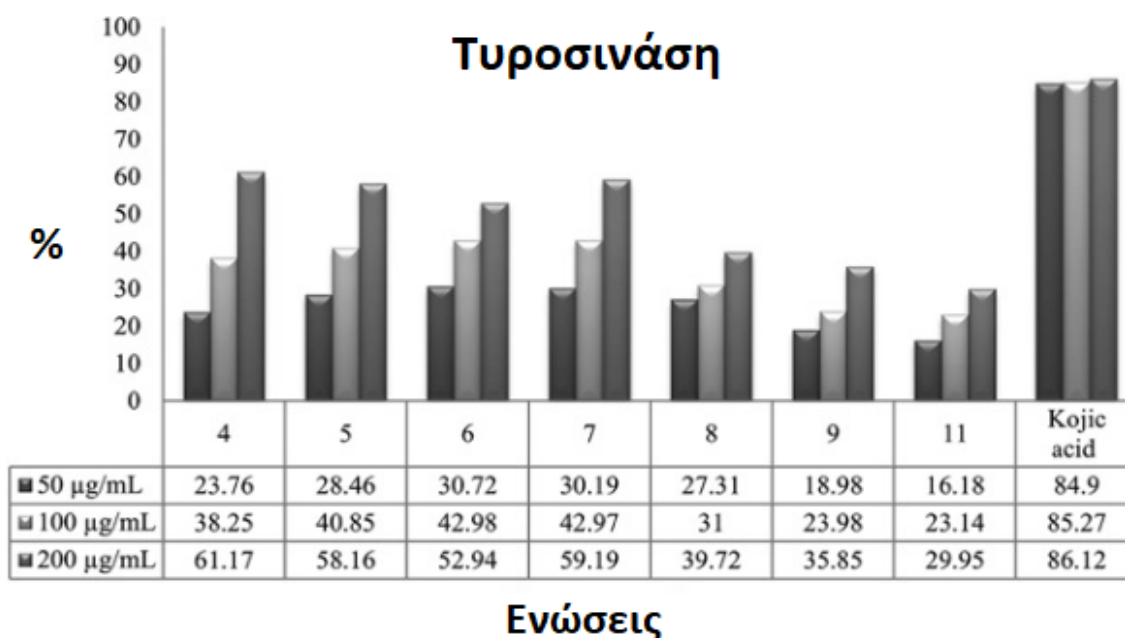
Οι ερευνητές ήλπιζαν επίσης να δουν αν οι ενώσεις θα μπορούσαν να μπλοκάρουν ένζυμα που σχετίζονται με τη νόσο Αλτσχάιμερ, ιδίως την ακετυλοχολινεστεράση (AChE) και την τυροσινάση.

Τα ποσοστά αναστολής της AChE των ενώσεων προσδιορίστηκαν σε συγκεντρώσεις 25, 50 και 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Η ένωση 7 (43,68%) είχε τη μεγαλύτερη ανασταλτική δράση στα 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ακολουθούμενη από την ένωση 4 (42,53%) και την ένωση 8 (42,29%). Οι ενώσεις 5 και 6 δεν είχαν καμία δράση στα 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ενώ η ένωση 4 είχε τη μεγαλύτερη δράση (16,92%). Σε σύγκριση με τη γαλανταμίνη, τα νέα μόρια πυραζολίνης και φλαβονών έχουν σημαντική ανασταλτική δράση κατά της AChE.

Οι λόγοι καταστολής της τυροσινάσης των ουσιών 4-9 και 11 προσδιορίστηκαν σε συγκεντρώσεις 50, 100 και 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Η αναστολή της τυροσινάσης των νέων ουσιών και του προτύπου αυξήθηκε με την ακόλουθη σειρά στα 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$: κοτζικό οξύ (86,12%) > 4 (61,17%) > 7 (59,19%) > 5 (58,16%) > 6 (52,94%) > 8 (39,72%) > 9 (35,85%) > 11 (29,95%). Τα πειράματα αναστολής αντιοξειδωτικών, ακετυλοχολινεστεράσης και τυροσινάσης δείχνουν ότι οι πυραζολίνες 4-6 και οι ενώσεις βορίου-φθορίου 7-9 έχουν σημαντική νευροπροστατευτική δράση.



Σχήμα 2.9.8: Αναστολή (%) των δράσεων ακετυλοχολινεστεράσης των κανονικών και των νέων ενώσεων (25, 50 και 100 µg/mL). (Kahriman, et al. 2016)



Σχήμα 2.9.9: Αναστολή (%) των δράσεων τυροσινάσης των κανονικών και των νέων ενώσεων (50, 100 και 200 µg/mL). (Kahriman, et al. 2016)

2.8 Μεταλλικά σύμπλοκα Πυραζολίνης με Ir

Το ιρίδιο είναι ένα μέταλλο που χρησιμοποιείται ήδη στην ιατρική: Το ραδιενεργό ισότοπο ιρίδιο-192 (Ir-192) είναι πομπός γάμμα ακτινών με χρόνο ημιζωής 74 ημερών. Το ιρίδιο-192 χρησιμοποιείται στην πυρηνική ιατρική για την καταπολέμηση των καρκινικών κυττάρων, με βάση την βραχυθεραπεία. Βραχυθεραπεία είναι η διαδικασία κατά την οποία τοποθετούμε την πηγή της ακτινοβολίας εντός του σώματος). Το ιρίδιο έχει επίσης αξιοποιηθεί για την ανάπτυξη οργανομεταλλικών ενώσεων με αντικαρκινικές ιδιότητες, με πολύ ικανοποιητικά έως τώρα αποτελέσματα (Ma, et al. 2019). Όσον αφορά στα σύμπλοκα ιριδίου-πυραζολίνης, η έρευνα βρίσκεται ακόμη σε πρώιμο στάδιο και ως εκ τούτου, τα άρθρα σχετικά με το θέμα είναι ελάχιστα.

1. Οι ερευνητές με επικεφαλής τον Sanjay B. Gajera (Gajera, Mehta and Patel 2016) περιγράφουν τη σύνθεση έξι νέων υποκατεστημένων προσδετών πυραζολίνης (**4a** έως **6b**, πυριμιδιν-2-αμίνης και τριαζολοπυριμιδίνης:

- [(5'-χλώρο-3'-μέθυλο-1',2'-διφαινύλο-5-(πυριδίν-2-υλ)-3,4-διυδρο-1'H,2H-3,4'-διπυραζόλη (bpy-Cl) **[4a]**
- 1',2,3'-τριφαινύλ-5-(πυριδίν-2-υλ)-3,4-διυδρο-1'H,2H-3,4'-διπυραζόλη (bpyph) **[4b]**
- 4-(5-χλώρο-3-μέθυλ-1-φαινύλ-1H-πυραζολ-4-υλ)-6-(πυριδίν-2-υλ)πυριμιδίν-2-αμίνη (pma-Cl) **[5a]**
- 4-(1,3-διφαινύλ-1H-πυραζόλ-4-υλ)-6-(πυριδίν-2-υλ)πυριμιδίν-2-αμίνη (pmaph) **[5b]**
- 7-(5-χλώρο-3-μέθυλ-1-φαινύλ-1H-πυραζόλ-4-υλ)-5-(πυριδίν-2-υλ)- [1,2,4] τριάζολο[1,5-a] πυριμιδίνη (tpm-Cl) **[6a]**
- 7-(1,3-διφαινύλ-1H-πυραζόλ-4-υλ)-5-(πυριδίν-2-υλ)- [1,2,4] τριάζολο [1,5-α] πυριμιδίνη (tpm-ph) **[6β]**
- [(η⁵-C5Me5) Ir(bpy-Cl) Cl] Cl **[7a]**
- [(η⁵-C5Me5) Ir(bpy-ph) Cl] Cl **[7b]**
- [(η⁵-C5Me5) Ir(pma-Cl) Cl] Cl **[8a]**
- [(η⁵-C5Me5) Ir(pma-ph) Cl] Cl **[8b]**,
- [(η⁵-C5Me5) Ir(tpm-Cl) Cl] Cl **[9a]**
- [(η⁵-C5Me5) Ir(tpm-ph) Cl] Cl **[9b]**

Το σύμβολο «η^v» σε κάποιες ενώσεις αναφέρεται στην έννοια της απτικότητας (hapticity). Ο ορισμός της βρίσκεται στο κεφάλαιο «Εισαγωγή». Αυτά τα ετεροκυκλικά μόρια συνδυάζονται με το IrIII για να σχηματίσουν νέα σύμπλοκα τύπου πιάνου IrIII (**7a έως 9b**, (η αγγλική ορολογία, και η πιο συνηθισμένη, είναι piano stool complex, ή half sandwich complex.)

Για όλες τις συντιθέμενες ενώσεις πραγματοποιήθηκαν αντιμικροβιακές μελέτες, μελέτες δέσμευσης του DNA, μοριακή πρόσδεση, διάσπαση DNA, μελέτη για αντικαρκινική δράση, δοκιμασία κυτταρικής βιωσιμότητας και κυτταροτοξικής δράσης.

Τα σύμπλοκα δεν αναμένονταν να δεσμεύονται σε βάσεις DNA επειδή, από άποψη συντονισμού, είναι κορεσμένα και δεν διαθέτουν ένα αντικαταστάσιμο μονοδοντικό ligand στη σφαίρα συντονισμού τους. Ωστόσο, τα σύμπλοκα αυτά μπορούν να συνδεθούν στις αύλακες του DNA (groove binding). Επειδή καθένα από τα έξι σύμπλοκα έχει αρωματικούς δακτυλίους στη δομή του ligand, δεν μπορεί να αποκλειστεί η σύνδεση παρεμβολής. Οι παρατηρούμενες τιμές Kb (**8a**, $0,894 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$, **8b**, $0,949 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$) είναι πολύ υψηλότερες από εκείνες του **7b** ($\text{Kb}, 0,548 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$), επιβεβαιώνοντας τον τρόπο πρόσδεσης των συμπλόκων με παρεμβολή (intercalation) στο DNA. Επιπλέον, παρατηρείται ότι τα σύμπλοκα με βάση την τριαζολοπυριμιδίνη (**tpm**) έχουν υψηλότερη συγγένεια πρόσδεσης στο DNA από τα αντίστοιχα σύμπλοκα τους με βάση την πυριμιδιν-2-αμίνη, επειδή οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις στις οποίες συμμετέχει η ομάδα της τριαζολοπυριμιδίνης έχουν μεγαλύτερη επίδραση στην πρόσδεση στο DNA σε σύγκριση με την π-π στοίβαξη των υποκατεστημένων προσδετών πυριμιδίνης και πυραζολίνης με τα ζεύγη βάσεων του DNA.

Επιπλέον, σε σύγκριση τόσο με τα ligands **bpy** (4a και 4b) όσο και με τα **pma** (5a και 5b), όλα τα ligands tpm (6a και 6b) αλληλοεπιδρούν πιο έντονα με το DNA. Οι τιμές Kb των συμπλόκων είναι χαμηλότερες από εκείνες που παρατηρούνται για έναν τυπικό παρεμβαλλόμενο μόριο, όπως το EB-DNA. Αυτό υποδηλώνει ότι τα σύμπλοκα 9a και 9b μπορούν να συνδεθούν ισχυρά στο CT-DNA μέσω παρεμβολής, και αυτό φαίνεται ότι οφείλεται στα δομικά χαρακτηριστικά τους.

Ενώσεις	Μήκος κύματος (nm)	Μετατόπιση (nm)	% Υποχρωμισμός	Σταθερά πρόσδεσης (K_b) $\times 10^5$
4a	379	3	25 \pm 2.5	0.639 \pm 0.019
4b	376	2	28 \pm 1.5	0.432 \pm 0.020
5a	265	3	22 \pm 2.3	0.380 \pm 0.009
5b	266	4	15 \pm 2.0	0.151 \pm 0.015
6a	313	2	22 \pm 3.7	0.675 \pm 0.021
6b	325	4	11 \pm 1.0	0.450 \pm 0.020
7a	375	4	43 \pm 1.6	1.446 \pm 0.059
7b	375	2	28 \pm 2.0	0.547 \pm 0.012
8a	265	3	24 \pm 1.6	0.894 \pm 0.019
8b	264	4	18 \pm 3.7	0.949 \pm 0.006
9a	399	2	40 \pm 3.2	1.053 \pm 0.010
9b	412	3	26 \pm 3.0	1.250 \pm 0.004

Πίνακας 2.6.1: Η τυπική απόκλιση για τα χαρακτηριστικά του φάσματος απορρόφησης των ligands και των συμπλόκων IrIII που συνδέονται με CT DNA ,σε τρία διαφορετικά πειράματα. (Gajera, Mehta and Patel 2016)

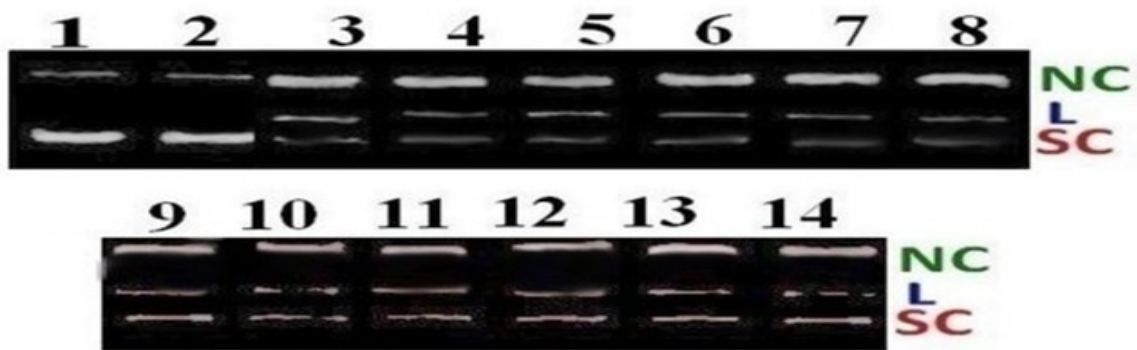
Χρησιμοποιώντας υπερελικωμένο pUC19 DNA (ένας ευρέως χρησιμοποιούμενος πλασμιδιακός φορέας κλωνοποίησης του βακτηρίου *E. coli*) σε πηκτή αγαρόζης 1%, διερευνήθηκε η δραστικότητα των συμπλόκων ως χημικές νουκλεάσες. Υπό τις ίδιες συνθήκες, η αποτελεσματικότητα των συμπλόκων συγκρίθηκε με εκείνη των ligands και των διμερών. Ο φωσφοδιεστερικός δεσμός διασπάται κατά τη διάρκεια της υδρολυτικής διαδικασίας διάσπασης του DNA, με αποτέλεσμα τη δημιουργία θραυσμάτων και τη μετατροπή της μορφής supercoil (SC) του DNA σε μορφή ανοικτού κύκλου (OC) πριν καταλήξει σε γραμμική μορφή (L), η οποία χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό του ποσοστού διάσπασης σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της νουκλεάσης. Στην οξειδωτική διάσπαση του DNA συμμετέχουν τόσο η οξείδωση των αζωτούχων βάσεων όσο και η οξείδωση του

τμήματος της πεντόζης του DNA. Το Σχήμα 2.6.2 δείχνει τα αποτελέσματα αυτών των δοκιμών. Σύμφωνα με τα στατιστικά στοιχεία, όλα τα ligands παρουσιάζουν μεγαλύτερη δραστικότητα διάσπασης από το άλας ιριδίου.

Ενώσεις	SC	L	NC
DNA control	89 ± 1.7	11 ± 1.9	-
Άλας Ir	84 ± 1.9	16 ± 1.5	-
4a	28 ± 2.0	22 ± 0.7	50 ± 2.3
4b	24 ± 1.2	15 ± 1.6	61 ± 3.6
5a	32 ± 0.8	20 ± 0.8	48 ± 1.9
5b	27 ± 0.9	22 ± 1.3	51 ± 1.7
6a	28 ± 1.2	14 ± 1.6	58 ± 2.0
6b	28 ± 1.6	16 ± 1.2	56 ± 1.6
7a	14 ± 1.3	25 ± 0.9	61 ± 2.1
7b	20 ± 0.8	17 ± 0.8	63 ± 1.5
8a	18 ± 1.6	14 ± 1.2	68 ± 2.6
8b	16 ± 0.7	17 ± 2.0	67 ± 2.9
9a	20 ± 1.5	14 ± 1.9	66 ± 3.0
9b	17 ± 1.9	17 ± 2.2	66 ± 2.0

Πίνακας 2.6.2: Δεδομένα νουκλεολυτικής διάσπασης του DNA σε %, SC: υπερελικωμένη μορφή, L: γραμμική μορφή, NC: κομμένη μορφή (Gajera, Mehta and Patel 2016)

Επιπλέον, τα ligands 6a και 6b έχουν πιο υποσχόμενη δραστικότητα διάσπασης σε σύγκριση με τα άλλα ligands, αποδεικνύοντας την αποτελεσματικότητα της τριάζολο-πυριμιδίνης στη διάσπαση του DNA. Το αρχικό DNA εξακολουθεί να υφίσταται ως υπερελικωμένο (SC) DNA. Η λεγόμενη κομμένη (NC) ή ανοικτή κυκλική (OC) μορφή του DNA παράγεται από τη διάσπαση μονής έλικας, ενώ η γραμμική μορφή του DNA παράγεται από τη διάσπαση διπλής έλικας. Τόσο το μέγεθος (ζεύγη βάσεων) όσο και η διαμόρφωση επηρεάζουν τον ρυθμό μετανάστευσης κατά την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης, με το μικρότερο ή πιο συμπυκνωμένο DNA να κινείται ταχύτερα από το μεγαλύτερο ή ξεδιπλωμένο DNA. Το SC μεταναστεύει πιο γρήγορα από ό,τι το γραμμικό DNA (το οποίο μεταναστεύει με ενδιάμεσο τρόπο) ή το DNA ανοικτού κύκλου (το οποίο μεταναστεύει αργά). Τα ευρήματα δείχνουν ότι όλα τα σύμπλοκα είναι ανώτεροι παράγοντες διάσπασης του DNA από τους προσδέτες και το άλας ιριδίου.



Σχήμα 2.6.3: Διάσπαση του DNA SC pUC19 με τη χρήση μιας ποικιλίας προσδετών και συμπλόκων (50 μM) χρησιμοποιώντας πήκτωμα αγαρόζης 1%.

N = Nicked (κομμένο), S = Supercoiled (υπερέλικωμένο), L = Linear (γραμμικό), (Gajera, Mehta and Patel 2016)

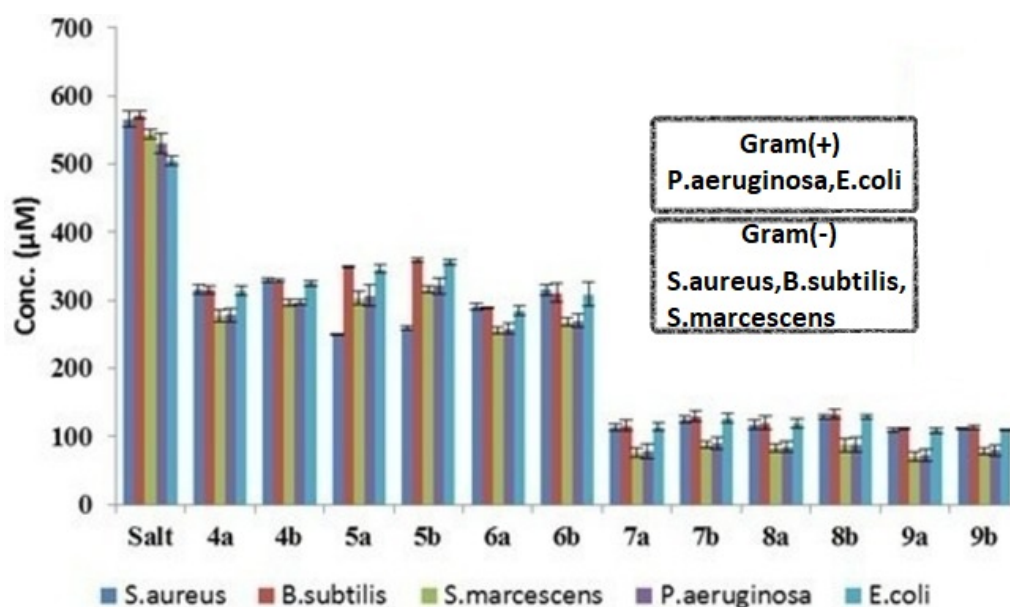
Η απειλή που συνιστούν για το ανθρώπινο είδος οι λοιμώξεις που προκαλούνται από διάφορα παθογόνα βακτήρια είναι τρομερή. Η νεογνική μηνιγγίτιδα, η γαστρεντερίτιδα και οι λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος μπορούν να προκληθούν από μολυσματικά στελέχη *E. coli*. Η λοίμωξη από τον *S. aureus* μπορεί να προκαλέσει μαστίτιδα στις αγελάδες και το σύνδρομο σταφυλοκοκκικού καμένου δέρματος (SSSS) στα μωρά. Σε άτομα με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα, η *P. aeruginosa* προκαλεί ευκαιριακή λοίμωξη. Η ιατρική βιομηχανία χρειάζεται επειγόντως νέες ενώσεις με ισχυρότερες κυτταροτοξικές/κυτταροστατικές επιδράσεις στα επιβλαβή βακτήρια, δεδομένου ότι αυτά τα βακτηριακά είδη καθίστανται ανθεκτικά στις διαθέσιμες αντιβακτηριακές θεραπείες. Υπάρχουν πολυάριθμοι αντιβακτηριακοί παράγοντες, αλλά η χρήση τους είναι περιορισμένη λόγω του στενού εύρους δράσης τους, της ισχυρής απόδοσης σε υψηλές δόσεις και της πιθανής τοξικότητας προς μη στόχους. Οι αντιβακτηριακές ιδιότητες των ενώσεων ιριδίου δεν έχουν μελετηθεί διεξοδικά, και ως εκ τούτου, οι ερευνητές επιχείρησαν να διερευνήσουν την τοξικότητα των συμπλόκων ιριδίου σε πέντε διαφορετικά βακτηριακά είδη.

Η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση των συμπλόκων για τα βακτηριακά είδη *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* και *S. marcescens* προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας διαφορετικές συγκεντρώσεις των συμπλόκων. Όλα τα ligands αποδείχθηκαν λιγότερο δραστικά έναντι αυτών των βακτηρίων. Σε σύγκριση με τις

ενώσεις 5a, 5b, 6a και 6b διαπιστώθηκε ότι οι ενώσεις 4a και 4b ήταν πιο δραστικές. Επιπλέον, οι ενώσεις με ομάδες χλωρίου εμφάνισαν τιμές MIC που ήταν χαμηλότερες από εκείνες των ενώσεων με υποκαταστάτες φαινυλίου, αποδεικνύοντας την ισχύ της αντιβακτηριακής τους δράσης. Οι πιο αποτελεσματικοί αντιβακτηριακοί παράγοντες μεταξύ όλων των συμπλόκων ήταν τα σύμπλοκα 9a και 9b. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι ενώ η πυραζολίνη και οι πυριμιδίνες δεν είναι απαραίτητα για την αντιβακτηριακή δράση, η παρουσία ενός οργανομεταλλικού ιριδικού σκελετού είναι απαραίτητη. Η θεωρία της χηλικής σύνδεσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εξήγηση της δράσης των χηλικών ενώσεων μετάλλων. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι οι χημικές ουσίες είναι πιο αποτελεσματικές κατά των αρνητικών κατά gram βακτηρίων από ό,τι κατά gram θετικών βακτηρίων. Η διαπερατότητα των μικροβιακών κυττάρων ή οι διαφοροποιήσεις των ριβοσωμάτων στο εσωτερικό τους καθορίζουν τη διακύμανση της αποτελεσματικότητας των διαφόρων συμπλόκων έναντι διαφόρων ειδών.

Ενώσεις	Gram(+) σε μM		Gram(-) σε μM		
	<i>S.aureus</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>S.marcescens</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>E.coli</i>
Αλας Ir	564 \pm 11.59	571 \pm 6.00	551 \pm 7.63	518 \pm 14.42	512 \pm 6.80
4a	316 \pm 6.00	315 \pm 5.50	277 \pm 8.38	278 \pm 8.96	314 \pm 6.92
4b	329 \pm 2.51	328 \pm 1.52	297 \pm 4.93	297 \pm 3.78	325 \pm 4.04
5a	249 \pm 1.00	349 \pm 1.52	303 \pm 9.45	307 \pm 16.28	346 \pm 5.29
5b	259 \pm 3.05	359 \pm 3.51	316 \pm 4.50	321 \pm 10.96	356 \pm 3.51
6a	291 \pm 4.35	288 \pm 1.15	256 \pm 4.93	258 \pm 7.23	285 \pm 6.65
6b	315 \pm 8.38	311 \pm 13.50	268 \pm 5.68	270 \pm 9.64	309 \pm 17.03
7a	114 \pm 4.72	116 \pm 6.92	76 \pm 7.00	78 \pm 9.86	114 \pm 5.29
7b	125 \pm 4.16	129 \pm 7.93	88 \pm 5.29	90 \pm 8.14	127 \pm 7.02
8a	117 \pm 6.42	120 \pm 9.07	83 \pm 6.65	84 \pm 7.81	119 \pm 7.57
8b	129 \pm 2.51	132 \pm 6.65	87 \pm 9.29	88 \pm 11.01	129 \pm 2.88
9a	109 \pm 3.05	111 \pm 0.57	71 \pm 6.92	72 \pm 8.08	109 \pm 4.16
9b	111 \pm 0.57	113 \pm 3.21	78 \pm 4.93	80 \pm 7.81	110 \pm 1.00

Πίνακας 2.6.4: Οι τιμές MIC των προσδετών και των συμπλόκων παρουσιάζονται σε μM με τυπική απόκλιση για τρεις επαναλήψεις. (Gajera, Mehta and Patel 2016)



Σχήμα 2.6.5: Τα αποτελέσματα της αντιμικροβιακής δράσης των ενώσεων εκφρασμένα σε μM . (Gajera, Mehta and Patel 2016)

Ο πίνακας 2.6.5 παρουσιάζει την ικανότητα των προσδετών και των συμπλόκων να αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων A549. Συγκριτικά με τα άλλα υπό μελέτη ligands, το ligand 5b (φαινυλοϋποκατεστημένη πυριμιδιν-2-αμίνη) έχει αξιοσημείωτη αντικαρκινική δράση. Όλα τα σύμπλοκα λειτουργούν καλύτερα ως αντικαρκινικοί παράγοντες από τους προσδέτες. Πιο ισχυρά από τα σύμπλοκα με υποκαταστάτη χλωρίου είναι εκείνα με υποκαταστάτη φαινυλίου. Σε σύγκριση με τα σύμπλοκα διπυραζόλης και τριαζολοπυριμιδίνης, τα σύμπλοκα πυριμιδιν-2-αμίνης, 8a και 8b, παρουσιάζουν ανώτερη δραστηριότητα. Η αντικαρκινική δράση των συμπλόκων παρατίθεται με την ακόλουθη φθίνουσα σειρά: 8b, 8a, 7b, 9b, 9a, 7a.

Προσδέτες	IC ₅₀ μM	Σύμπλοκα	IC ₅₀ μM
4a	281.74 ± 3.46	7a	198.71 ± 4.23
4b	176.32 ± 1.52	7b	088.12 ± 1.29
5a	103.22 ± 2.87	8a	076.28 ± 2.45
5b	099.43 ± 1.41	8b	063.56 ± 1.57
6a	246.94 ± 3.88	9a	122.66 ± 2.58
6b	136.39 ± 1.68	9b	093.34 ± 4.87

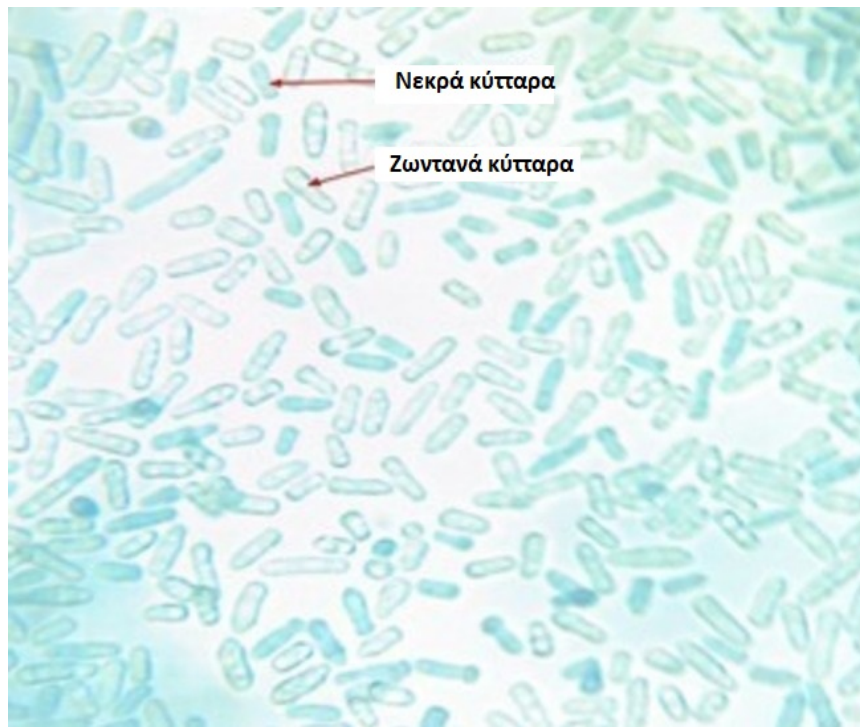
Πίνακας 2.6.6: Οι τιμές IC₅₀ παρουσιάζονται σε μM με τυπική απόκλιση τριών επαναλήψεων. (Gajera, Mehta and Patel 2016)

Για τη δοκιμή της κυτταροτοξικότητας όλων των παραγόμενων χημικών ουσιών χρησιμοποιήθηκε η βιοδοκιμή θανάτωσης γαρίδας. Ως μέτρο, χρησιμοποιήθηκε η θνησιμότητα των προνυμφών. Διαπιστώθηκε ότι η αύξηση της συγκέντρωσης των συμπλόκων ενίσχυε το ποσοστό θανάτου τους, γεγονός που υποδεικνύει ότι οι ουσίες είχαν δόσοεξαρτώμενη επίδραση.

Ενώσεις	LC₅₀ (µg/mL)
4a	16.12 ± 0.10
4b	20.31 ± 0.25
5a	24.34 ± 0.47
5b	24.42 ± 0.27
6a	12.06 ± 0.05
6b	16.17 ± 0.12
7a	8.08 ± 0.15
7b	13.81 ± 0.13
8a	11.62 ± 0.36
8b	11.6 ± 0.34
9a	4.17 ± 0.09
9b	3.87 ± 0.09

Πίνακας 2.6.7: Δεδομένα της βιοδοκιμής θνησιμότητας γαρίδας άλμης που παρουσιάζονται σε µg/M, (Gajera, Mehta and Patel 2016).

Οι κυτταροτοξικές επιδράσεις των ουσιών στα κύτταρα διερευνήθηκαν επίσης με τη χρήση κυττάρων *S. rombe*. Επειδή τα κύτταρα *S. rombe* είναι ευκαρυωτικά και κάπως μεγάλα σε μέγεθος, έχουν γίνει ένα κρίσιμο εργαλείο για τη μελέτη της κυτταρικής βιολογίας. Σύμφωνα με τη σύγκριση των τιμών κυτταροτοξικότητας σε κυτταρικό επίπεδο των ελεύθερων συνδέσμων και των συμπλόκων τους, τα μεταλλικά σύμπλοκα παρουσιάζουν μεγαλύτερη δραστηριότητα έναντι των κυττάρων *S. rombe* από ό,τι οι προσδέτες πυραζολίνης.



Εικόνα 2.6.8: Οι επιδράσεις των ενώσεων στα κύτταρα του *S. rombe*. Τα νεκρά κύτταρα εμφανίζονται σκούρα πράσινα, ενώ τα ζωντανά φαίνονται φωτεινά πράσινα. (Gajera, Mehta and Patel 2016)

Τα ευρήματα δείχνουν ότι τα 6a και 6b επέδειξαν ανώτερη κυτταροτοξικότητα από όλα τα άλλα ligands ($12,06$ και $16,17 \mu\text{g mL}^{-1}$, αντίστοιχα). Αυτό υποδηλώνει ότι η κυτταροτοξικότητα των τριαζολοπυριμιδινών είναι μεγαλύτερη από εκείνη των πυραζολινών και της πυριμιδιν-2-αμίνης. Τα σύμπλοκα κατατάσσονται με βάση τη δραστηριότητα ως εξής: $9b > 9a > 7a > 8b > 8a > 7b$. Οι συγκεντρώσεις των παραγόμενων ενώσεων, καθώς και το είδος του υποκαταστάτη, βρέθηκε ότι επηρεάζουν την τοξικότητα. Τα μεταλλικά συμπλέγματα είναι οι πιο ισχυρές χημικές ουσίες, ακολουθούμενες από τις τριαζολοπυριμιδίνες, τις πυραζολίνες και τις πυριμιδιν-2-αμίνες. Σύμφωνα με τον πίνακα 2.6.8, η κυτταροτοξική δράση των συμπλόκων IrIII ήταν μεγαλύτερη από εκείνη των αντίστοιχων ελεύθερων ligands.

Ενώσεις	% Βιωσιμότητα ανά συγκέντρωση				
	2 μM	4 μM	6 μM	8 μM	10 μM
4a	83	78	72	67	63
4b	86	81	76	71	66
5a	85	80	74	69	65
5b	88	83	78	73	68
6a	81	76	70	65	61
6b	84	79	74	69	64
7a	68	63	57	52	48
7b	71	66	61	56	51
8a	70	65	59	54	50
8b	73	68	63	57	53
9a	66	61	55	50	46
9b	69	64	59	54	49

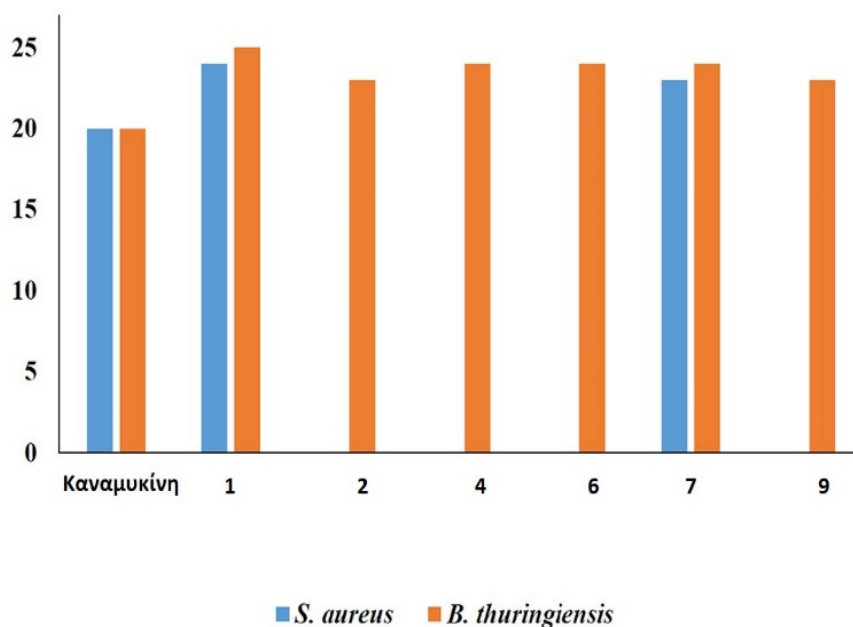
Πίνακας 2.6.9: Η ποσοστιαία Βιωσιμότητα των κυττάρων *S. Pombe*, τυπική απόκλιση για τρία ξεχωριστά πειράματα. (Gajera, Mehta and Patel 2016)

Ας θυμόμαστε ότι αυτή η δοκιμή, όπως και όλες οι προαναφερθείσες, είναι μόνο η αρχή. Απαιτείται περισσότερη έρευνα για να προσδιοριστεί ο ακριβής μηχανισμός της κυτταροτοξικότητας καθώς και οι επιπτώσεις που μπορεί να έχει σε ανώτερα ζωικά μοντέλα καθώς και σε καρκινικές κυτταρικές σειρές.

2. Οι επιστήμονες με πρώτο συγγραφέα την Carley Giffert L. Nongriur (Nongriur, Verma, et al. 2022) κατασκεύασαν ορισμένα σύμπλοκα μετάλλων με προσδέτες με βάση την πυραζολίνη και έλεγξαν την κυτταροτοξική και αντιβακτηριακή τους δράση.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι ενώσεις αυτές έχουν βιολογικές δραστηριότητες που φαίνονται πολλά υποσχόμενες. Οι ενώσεις που περιέχουν ιρίδιο είναι οι **3, 6 και 9**.

Σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα, τα ligands L1-L3 με βάση την πυραζολίνη, τα μεταλλικά σύμπλοκα τους 1-9 και η καθιερωμένη καναμυκίνη δοκιμάστηκαν για να διαπιστωθεί αν μπορούν να σταματήσουν την ανάπτυξη τεσσάρων βασικών βακτηρίων. Τα βακτήρια αυτά ήταν ο *Staphylococcus aureus*, ο *Bacillus thuringiensis*, η *Escherichia coli* και η *Pseudomonas aeruginosa*. Μια ματιά στις ζώνες αναστολής έδειξε ότι τα σύμπλοκα 1, 2, 4, 6, 7 και 9 είχαν υψηλή αντιβακτηριακή δράση έναντι των θετικών κατά Gram παθογόνων (*B. thuringiensis*) και τα σύμπλοκα 1 και 7 οδήγησαν σε υψηλή αντιβακτηριακή δράση έναντι του Gram(+) παθογόνου, *S. aureus*. Τα αποτελέσματα δείχνουν επίσης ότι τα σύμπλοκα 1 και 7 έχουν την υψηλότερη ζώνη αναστολής έναντι των δύο στελεχών βακτηρίων που μελετήθηκαν, με τιμές 24 1 mm και 25 1 mm έναντι του *S. aureus* και 23 1 mm και 24 1 mm έναντι του *B. thuringiensis*, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης, όπως φαίνεται στο Σχήμα 6, δείχνουν ότι η αντιβακτηριακή δράση των δραστικών ενώσεων (1, 2, 4, 6, 7 και 9) είναι μόνο έναντι των θετικών κατά Gram παθογόνων (*S. aureus* και *B. thuringiensis*).



Σχήμα 2.6.10: Οι ουσίες δοκιμάστηκαν σε δοσολογία 5 mg/ml για αντιβακτηριακή δράση έναντι διαφόρων βακτηριακών στελεχών. (Gajera, Mehta and Patel 2016)

Κανένα από τα σύμπλοκα δεν παρουσιάζει σημαντική αντιμικροβιακή δράση έναντι των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων. Επίσης, κανένα από τα ligands δεν λειτούργησε έναντι οποιουδήποτε από τα στελέχη των βακτηρίων που δοκιμάστηκαν. Οι τιμές MIC για τις ενώσεις κυμαίνονται από 2,5 έως 3,0 µg/ml έναντι των θετικών κατά Gram βακτηριακών στελεχών *S. aureus* και *B. thuringiensis*. Πολύ ευχάριστο ήταν επίσης το γεγονός ότι τα σύμπλοκα αυτά ήταν καλύτερα στη θανάτωση των εξεταζόμενων βακτηρίων και από την καναμυκίνη. Έτσι, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ευέλικτα δομικά στοιχεία για τη δημιουργία νέων φαρμάκων που μπορεί να λειτουργούν με έναν νέο, εναλλακτικό τρόπο.

No.	Ενώσεις	Βακτηριακά στελέχη			
		Gram (-)		Gram (+)	
		<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. thuringiensis</i>
	Καναμυκίνη (+ έλεγχος)	21 ± 1	21 ± 1	20 ± 1	20 ± 1
1	Προσδέτης 1	–	–	–	–
2	Σύμπλεγμα 1	–	–	24 ± 1	25 ± 1
3	Σύμπλεγμα 2	–	–		23 ± 1
4	Σύμπλεγμα 3	–	–	–	–
5	Προσδέτης 2	–	–	–	–
6	Σύμπλεγμα 4	–	–	–	24 ± 1
7	Σύμπλεγμα 5	–	–	–	–
8	Σύμπλεγμα 6	–	–	–	24 ± 1
9	Προσδέτης 3	–	–	–	–
10	Σύμπλεγμα 7	–	–	23 ± 1	24 ± 1
11	Σύμπλεγμα 8	–	–	–	–
12	Σύμπλεγμα 9	–	–	–	23 ± 1

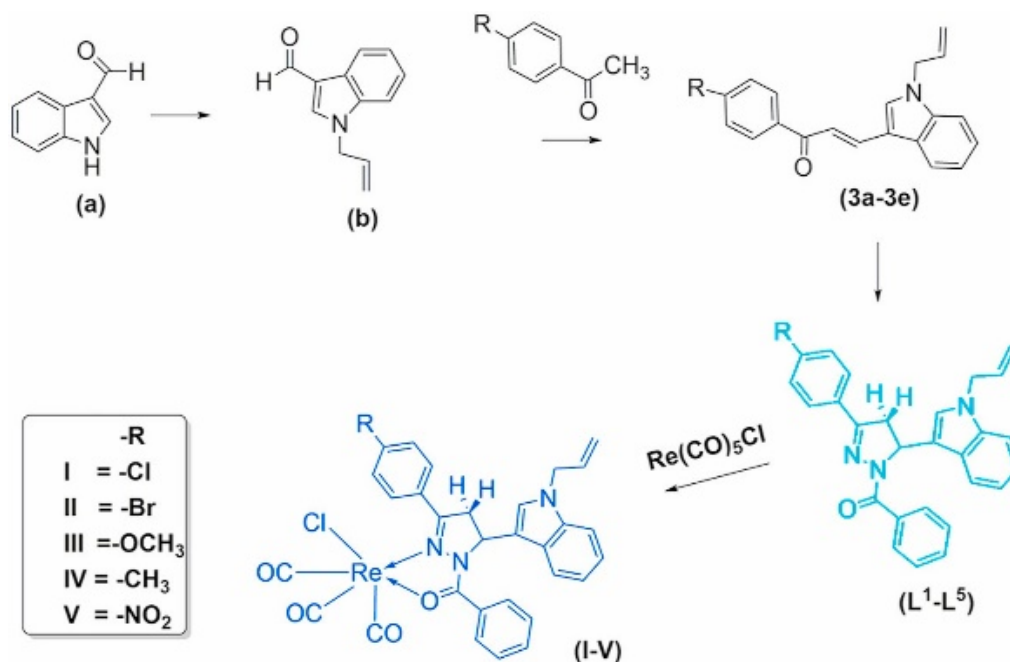
Πίνακας 2.6.11: Αντιβακτηριακή δράση των εξεταζόμενων ενώσεων έναντι διαφόρων βακτηριακών στελεχών σε συγκέντρωση 5 mg/ml. (Gajera, Mehta and Patel 2016)

Σύμφωνα με τα ευρήματα των δοκιμών για τη βιωσιμότητα των κυττάρων, το σύμπλοκο 7 προκάλεσε τη μεγαλύτερη κυτταροτοξικότητα στην κυτταρική σειρά DL, ακολουθούμενο από τα σύμπλοκα 1, 2, 8, 4, το ligand L3 και το σύμπλοκο 5. Όσον αφορά στην αποπτωτική δράση, το σύμπλοκο 7 προκάλεσε τη μεγαλύτερη ποσότητα αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου, ακολουθούμενο από τα σύμπλοκα 1, 2, 8, 5, 4 και L3. Λόγω του ότι τα σύμπλοκα που περιέχουν Ir δεν φαίνεται να παρουσιάζουν κάποια ιδιαίτερη κυτταροτοξική ή αποπτωτική δράση, δεν κρίθηκε ωφέλιμο να αναφερθούν οι τιμές των αποτελεσμάτων και τα αντίστοιχα γραφήματα για τις δράσεις αυτές.

2.9 Μεταλλικά σύμπλοκα Πυραζολίνης με Re

Το εβδομήντα τοις εκατό της παγκόσμιας παραγωγής ρηνίου χρησιμοποιείται στην αεροπλοΐα, όπου προστίθεται σε υπερκράματα υψηλής θερμοκρασίας που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή εξαρτημάτων για κινητήρες αεριωθούμενων αεροσκαφών (Naumov 2007). Μια άλλη σημαντική εφαρμογή είναι οι καταλύτες από λευκόχρυσο-ρήνιο, οι οποίοι χρησιμοποιούνται κυρίως για την παραγωγή βενζίνης χωρίς μόλυβδο, υψηλής περιεκτικότητας σε οκτάνια. Εκτός όμως από αυτές τις χρήσεις, η πυρηνική ιατρική χρησιμοποιεί επίσης το ρήνιο. Τα ραδιενεργά ισότοπα ^{186}Re και ^{188}Re χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία του καρκίνου του ήπατος. Σε μια καινοτόμο θεραπεία για τον καρκίνο του παγκρέατος, το ^{188}Re χρησιμοποιείται επίσης πειραματικά. Για τη χορήγηση του χρησιμοποιείται η *Listeria monocytogenes*. Η Re-SCT (θεραπεία του καρκίνου του δέρματος) χρησιμοποιεί επίσης το ισότοπο ^{188}Re . Για τη θεραπεία του βασικοκυτταρικού καρκινώματος και του ακανθοκυτταρικού καρκινώματος του δέρματος, χρησιμοποιείται βραχυθεραπεία για να αξιοποιηθούν οι ικανότητες του ισοτόπου ως β-πομπός (β-emitter). (Dilworth και Parrott 1998), (Eberlein, et al. 2020). Τα τελευταία χρόνια έχουν σημειωθεί πολύ ενθαρρυντικά αποτελέσματα στη μελέτη των αντιαγγειογονικών και αντιβακτηριακών δράσεων των συμπλόκων ρηνίου σε ζωικά μοντέλα. (Zobi, Schindler and Marchetti 2022) , (Gasser and Leonidova , Underestimated Potential of Organometallic Rhenium Complexes as Anticancer Agents 2014) , (Frei, Blaskovich, et al. 2019). Σε αυτή την ενότητα, θα καλυφθεί το θεραπευτικό δυναμικό των συμπλόκων πυραζολίνης με βάση το ρήνιο. Δυστυχώς, δεν υπάρχουν πολλά άρθρα σχετικά με τις επιδράσεις των υβριδίων ρηνίου-πυραζολίνης, επειδή η έρευνα σχετικά με αυτά βρίσκεται ακόμη σε αρχικό στάδιο.

1. Στην παρούσα εργασία, οι ερευνητές με πρώτους συγγραφείς τον/την Reena R.Varma Bhupesh S.Bhatt και Mohan N.Patel (Varma , Pandya, et al. 2020) προσπάθησαν να συνθέσουν και να περιγράψουν οργανομεταλλικές καρβονυλικές ενώσεις Re-πυραζολίνης, αξιοποιώντας την ικανότητα απελευθέρωσης CO των μεταλλικών καρβονυλίων και τη βιολογική σημασία των ετεροκυκλικών ενώσεων με βάση την πυραζολίνη-ινδόλιο.



Σχήμα 2.5.1: Γενικό σχήμα για τη σύνθεση των ligands (L¹-L⁵) και των συμπλόκων (I-V), (Varma, et al., 2020)

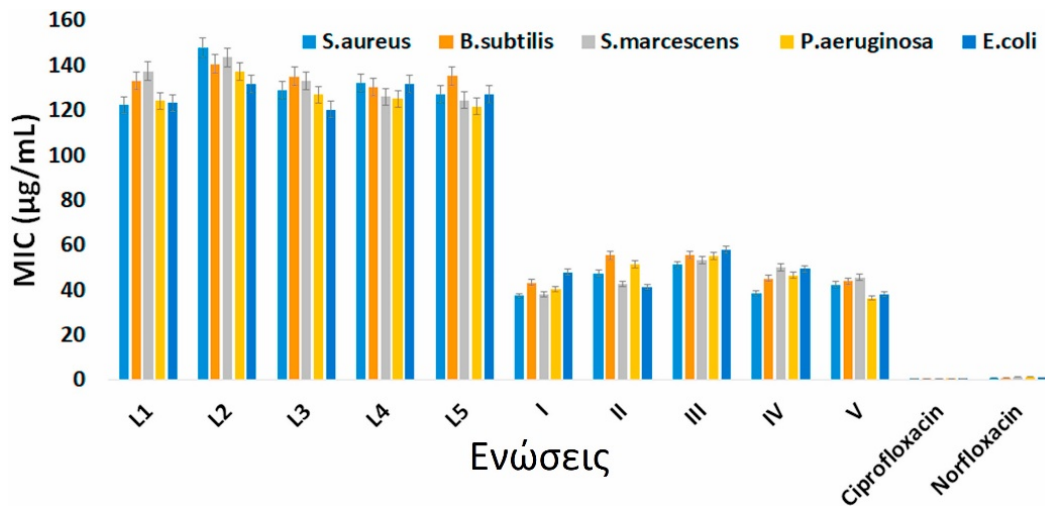
Η μέθοδος MTT χρησιμοποιήθηκε για να προσδιοριστεί εάν οι προσδέτες και οι ενώσεις ανέστειλαν ή όχι τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στα κύτταρα MCF-7, HCT 116 και A549. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η καταστολή των καρκινικών κυττάρων αυξάνονταν όσο υψηλότερες συγκεντρώσεις αποκτούσαν τα σύμπλοκα. Για τις κυτταρικές σειρές MCF-7 και A549, οι τιμές IC₅₀ αυξάνονται ως εξής: V > I > II > L2 > IV > III > L1 και L³-L⁵, ενώ για την κυτταρική σειρά HCT116, η ακολουθία είναι V > I > II > III > L² > IV > L1 και L³-L⁵. Τις οι παρασκευασμένες ενώσεις είναι εξαιρετικά αποτελεσματικές κατά των καρκινικών κυττάρων.. Τα κοινά χημειοθεραπευτικά φάρμακα έχουν IC₅₀: 4,5 μg/mL (σισπλατίνη), 65,3 μg/mL (καρμποπλατίνη) και 25,73 μg/mL (οξαλιπλατίνη). Από τις χημικές ουσίες και τα φάρμακα χρυσού προτύπου καρμποπλατίνη και οξαλιπλατίνη, τα ευρήματα δείχνουν ότι το σύμπλοκο V είναι ο πιο αποτελεσματικός αντικαρκινικός παράγοντας.

Compounds	IC ₅₀ (μg/mL)		
	MCF-7 (Human breast adenocarcinoma)	HCT 116 (Human Colorectal Carcinoma)	A549 (Human Lung Carcinoma)
L ¹	>500	> 500	>500
L ²	93.28 ± 0.99	193 ± 1.55	106.76 ± 1.63
L ³	>500	> 500	>500
L ⁴	>500	> 500	>500
L ⁵	>500	414 ± 1.57	166 ± 1.40
Complex I	63 ± 1.52	69 ± 0.59	25.03 ± 1.58
Complex II	82.5 ± 1.04	77.11 ± 0.51	74.41 ± 1.79
Complex III	497.58 ± 1.40	182.23 ± 2.00	206.48 ± 1.45
Complex IV	482 ± 1.15	495 ± 1.59	149.33 ± 0.58
Complex V	46.12 ± 1.00	54.18 ± 1.28	12.5 ± 0.33

Πίνακας 2.5.2: Τιμές IC₅₀ των συνδέσμων L1-L5 και των συμπλόκων I-V (δοκιμασία MTT), (Varma, et al., 2020)

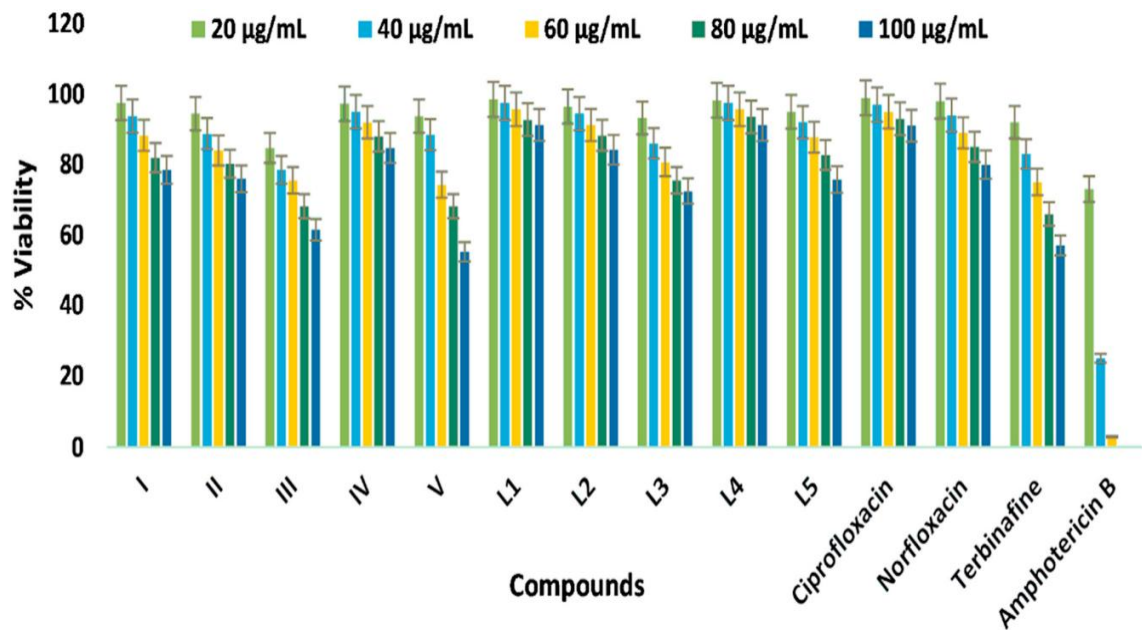
Η θνησιμότητα των εμβρύων των γαρίδων άλμης χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης κυτταροτοξικότητας. Οι τιμές LC₅₀ των ουσιών προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας γραμμικές γραφικές παραστάσεις του λογαρίθμου της συγκέντρωσης του δείγματος σε σχέση με το ποσοστό θανάτου. Το ποσοστό θνησιμότητας που προκαλούν οι συνθετικές ενώσεις είναι μεγαλύτερο από εκείνο που προκαλούν τα ligands. Η αύξουσα ακολουθία του ποσοστού θνησιμότητας των συνδέσμων και των ενώσεων είναι L² (20,4 μg/mL) < L³ (20,1 μg/mL) < L⁴ (20,0 μg/mL) = L¹ (20,0 μg/mL) < L⁵ (16. 1 μg/mL) = III (16,1 μg/mL) < IV (16,0 μg/mL) < τρανσπλατίνη (14,4 μg/mL) < I (12,1 μg/mL) = II (12,1 μg/mL) < V (12,0 μg/mL) < σισπλατίνη (3,1 μg/mL). Όσον αφορά την κυτταροτοξικότητα, το σύμπλοκο V είναι το πιο αποτελεσματικό μόριο, ενώ ο ligand L² είναι το λιγότερο αποτελεσματικό. Όσον αφορά την κυτταροτοξικότητα, οι ενώσεις I, II και V είναι ανώτερες από το πρότυπο φάρμακο, την τρανσπλατίνη. Η τοξικότητα της ένωσης αυξάνεται όσο αυξάνεται και η ποσότητά της. Οι ενώσεις έχουν ενισχυμένη κυτταροτοξικότητα σε σχέση με τους συνδέτες.

Δύο θετικά κατά Gram βακτήρια (*Staphylococcus aureus* και *Bacillus subtilis*) και τρία αρνητικά κατά Gram βακτήρια (*Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* και *Escherichia coli*) αξιολογήθηκαν με τα οργανικά ligands, τις μεταλλικές ενώσεις και τα συμβατικά φάρμακα. Τα δεδομένα δείχνουν ότι σε σύγκριση με τις ουδέτερες δισθενείς οργανικές ενώσεις και το μεταλλικό άλας, όλοι οι συνδυασμοί παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντιβακτηριακή δράση. Η δοντικότητα των συνδέσμων και η δομή του συνδέσμου είναι αμφότερες σχετικές με τις παρασκευασμένες ενώσεις. Αυτοί οι παράγοντες ενδέχεται να είναι οι σημαντικότεροι για την εξήγηση του ευρείας αντιμικροβιακής δράσης των ενώσεων, καθώς είναι υπεύθυνες για τη μεταφορά των ουσιών στα κύτταρα-στόχο τους. Ορισμένα μεταλλικά ιόντα είναι γνωστό ότι διαπερνούν τα βακτήρια και καθιστούν ανενεργά τα ένζυμά τους, ενώ άλλα μπορούν να παράγουν υπεροξείδιο του υδρογόνου, γνωστή βακτηριοκτόνο ουσία. Δεδομένου ότι μόνο τα υλικά που είναι λιποδιαλυτά μπορούν να διαπεράσουν τον κυτταρικό φραγμό, η λιποδιαλυτότητα παίζει καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της αντιμικροβιακής δράσης. Σε σύγκριση με τους μεμονωμένους προσδέτες, διαπιστώθηκε ότι όλες οι ενώσεις είχαν καλύτερες επιδόσεις έναντι ενός ευρέος φάσματος μικροβίων. Η σιπροφλοξασίνη, η νορφλοξασίνη, οι ενώσεις, τα ligands και τα μεταλλικά άλατα έχουν τιμές MIC 0,4-0,5 g/mL, 0,8-1,3 g/mL, 36-56 g/mL, 122-148 g/mL και >900 g/mL, αντίστοιχα. Τα σύμπλοκα V και IV, τα οποία έχουν ομάδες αζώτου και χλωρίου ως υποκαταστάτες στο ligand πυραζολίνης-ινδόλης, είναι οι πιο δραστικές από τις ενώσεις. Όλες οι ενώσεις είναι πιο αποτελεσματικές από τους συνδέτες, αλλά είναι λιγότερο δραστικές από τα συμβατικά φάρμακα έναντι όλων των βακτηρίων. Το $\text{Re}(\text{CO})_5\text{Cl}$ ακολουθείται από τα ligands $\text{L}^1\text{-L}^5$, τις ενώσεις I-V, τη νορφλοξασίνη και την σιπροφλοξασίνη στη σειρά μείωσης των τιμών MIC.



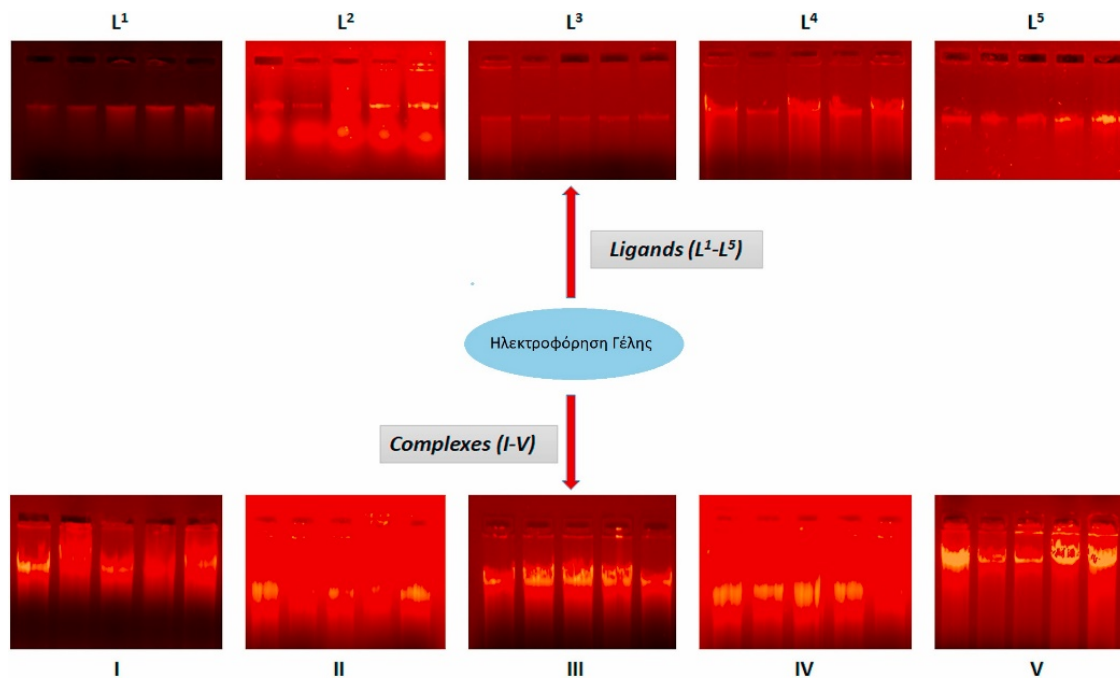
Σχήμα 2.5.3: Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων ($\mu\text{g}/\text{mL}$) μεταλλικού άλατος, ελεύθερων προσδετών και των συμπλόκων τους με ρήνιο(I) σε δύο Gram(+) και τρία Gram(-) βακτήρια, (Varma, et al., 2020)

Οι μετρήσεις του υπεροξειδίου του υδρογόνου, ενός ROS, χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της τοξικότητας των ενώσεων που ανέστειλαν την ανάπτυξη του *Saccharomyces cerevisiae* (ROS). Τα αντιβιοτικά και τα αντιμυκητιασικά φάρμακα όπως η σιπροφλοξασίνη, η νορφλοξασίνη, η τερμπιναφίνη και η αμφοτερικίνη-B χρησιμοποιήθηκαν λόγω της ικανότητάς τους να προκαλούν οξειδωτικό στρες μέσω της δημιουργίας δραστικών ειδών οξυγόνου. Εδώ, παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα που υποβλήθηκαν σε θεραπεία συσώρευαν περισσότερο υπεροξείδιο του υδρογόνου από τα αντίστοιχα κύτταρα που δεν επηρεάστηκαν. Καθώς αυξανόταν η ποσότητα του εξεταζόμενου υλικού, αυξανόταν και η ποσότητα του H_2O_2 που υπήρχε. Το διάγραμμα δείχνει τη συσσώρευση H_2O_2 από το υψηλότερο προς το χαμηλότερο, από τη στιβάδα III στη στιβάδα V στη στιβάδα L2 έως L5 και από τη στιβάδα II στη στιβάδα IV στη στιβάδα I στη στιβάδα L2 στη στιβάδα L1. Η παρατήρηση των επιδράσεων αυτών των ουσιών στην ακεραιότητα του DNA του *Saccharomyces cerevisiae* παρείχε περαιτέρω επιβεβαίωση ότι τα μεγαλύτερα επίπεδα H_2O_2 προκαλούν βλάβες στο DNA και, συνεπώς, ότι τα σύμπλοκα παρουσιάζουν σχετικά ισχυρότερη επιβλαβή επίδραση από τους προσδέτες.



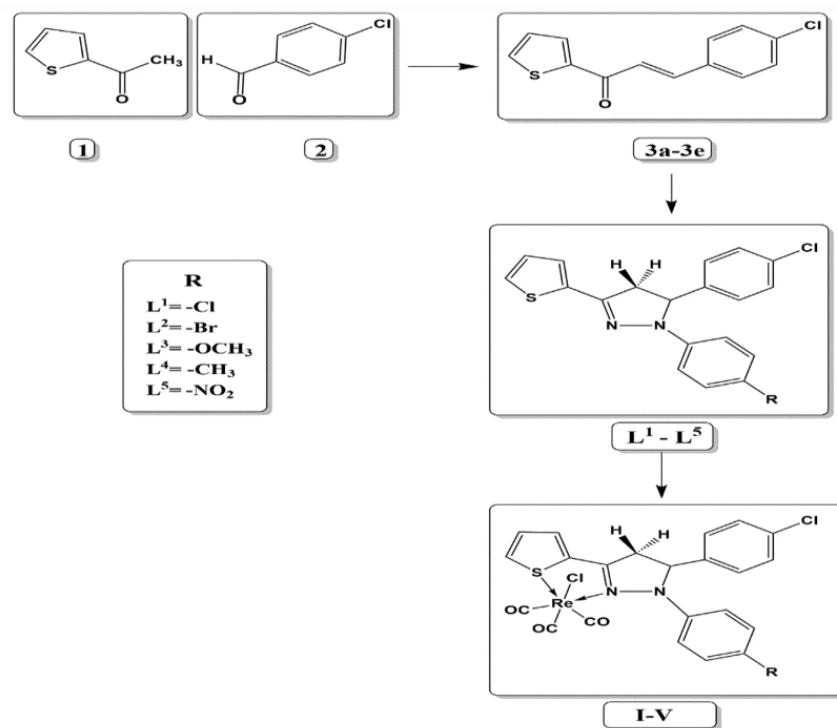
Σχήμα 2.5.4: % Βιωσιμότητα των κυττάρων *S. cerevisiae* παρουσία ενώσεων, (Varma , Pandya, et al. 2020)

Όταν τα κύτταρα ζύμης υποβλήθηκαν σε αυξανόμενες ποσότητες των ενώσεων, μια εικόνα κομητών (εξάπλωσης του DNA) έγινε διακριτή, καταδεικνύοντας την επιβλαβή για το DNA δράση των ενώσεων. Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν απερίφραστα ότι οι ενώσεις έχουν σημαντικά μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα δέσμευσης στο DNA σε σχέση με τα ligands ινδόλης-πυραζολίνης. Δεδομένου ότι τα ligands και οι ενώσεις προσδένονται στο DNA με διαφορετική συγγένεια, η αποτελεσματικότητα με την οποία διασπών το DNA ποικίλλει. Τα σύμπλοκα III, V και VI διασπών το DNA πιο αποτελεσματικά από τα σύμπλοκα I και IV, ενώ το σύμπλοκο II διασπά το DNA σε μέτριο βαθμό.



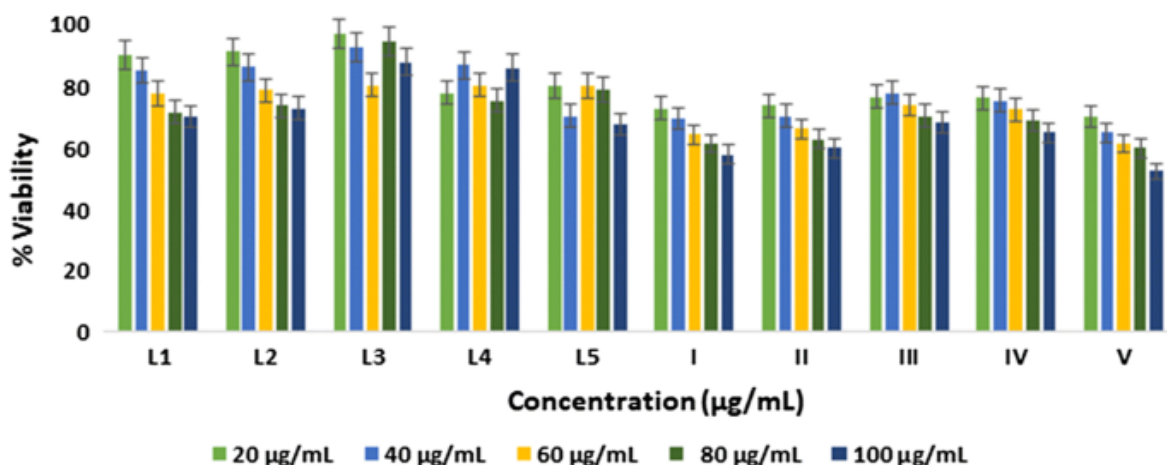
Σχήμα 2.5.5 : Φωτογενής άποψη της διάσπασης του DNA του *S. cerevisiae* με σειρά ενώσεων χρησιμοποιώντας πήκτωμα αγαρόζης 1% που περιέχει 0,5 $\mu\text{g cm}^{-3}$ EtBr για 24 ώρες στους 37 °C, (Varma , Pandya, et al. 2020)

2. Οι ερευνητές με επικεφαλής την Reena R. Varma (Varma, Patel, et al. 2020) ανέφεραν τη σύνθεση οργανομεταλλικών συμπλόκων Re(I) (I-V) με ligands (L1-L5) σε αυτή τη μελέτη, τρεις από τους οποίους συμμετείχαν και στην προαναφερθείσα μελέτη. Στη συνέχεια επιχείρησαν να εξακριβώσουν τις κυτταροτοξικές και DNA-τροποποιητικές ιδιότητες των ενώσεων.



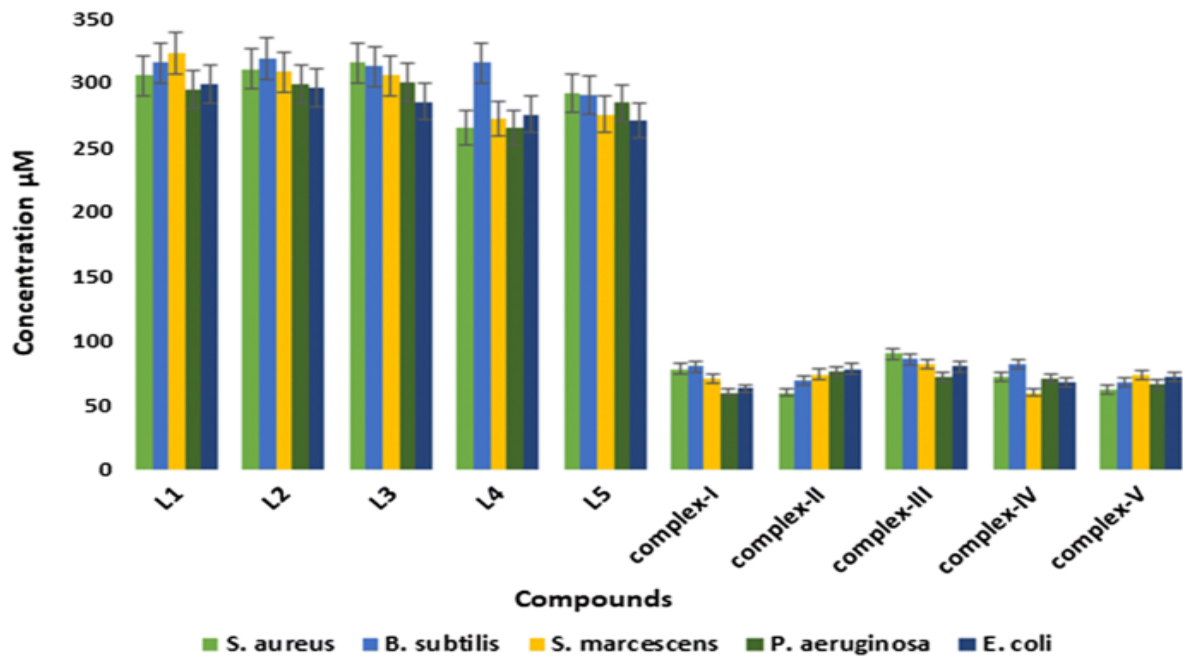
Σχήμα 2.5.6: Γενικό σχήμα αντίδρασης για τη σύνθεση συνδέσμων και συμπλόκων, (Varma, Patel, et al. 2020).

Τα κύτταρα *Saccharomyces cerevisiae* χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση της θνησιμότητας των συνδέσμων L1-L5 και των συμπλόκων (I-VI) σε κυτταρικό επίπεδο. Η τοξικότητα *in vitro* παρατηρήθηκε να μεταβάλλεται από 20 $\mu\text{g/mL}$ σε 40 $\mu\text{g/mL}$, 60 $\mu\text{g/mL}$, 80 $\mu\text{g/mL}$ και 100 $\mu\text{g/mL}$ ανάλογα με το είδος της υπάρχουσας ένωσης. Σύμφωνα με τα ευρήματα, οι επιβλαβείς ιδιότητες των ενώσεων και το ποσοστό επιβίωσης των κυττάρων μειώνονται όσο αυξάνεται η ποσότητα των ενώσεων. Τα σύμπλοκα επιδεικνύουν ανώτερη δραστηριότητα σε σύγκριση με τα ligands, παρά το γεγονός ότι το μεταλλικό άλας δεν έχει την ικανότητα να απελευθερώνει το CO. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η ύπαρξη ετεροκυκλικών μορίων ως συνδέσμων συντονισμού μπορεί να ενισχύσει την ικανότητα απελευθέρωσης CO των συμπλόκων. Το σύμπλοκο V έχει το υψηλότερο κυτταροτοξικό δυναμικό, ενώ τα σύμπλοκα I και II έχουν ενδιάμεσο κυτταροτοξική δράση και τα σύμπλοκα III και IV έχουν χαμηλή κυτταροτοξική δράση. Όσον αφορά την % επιβίωση, τα ligands και οι ενώσεις κατατάσσονται ως εξής: $L4 > L3 > L2 > L1 > L5 > IV > III > II > I > V$.



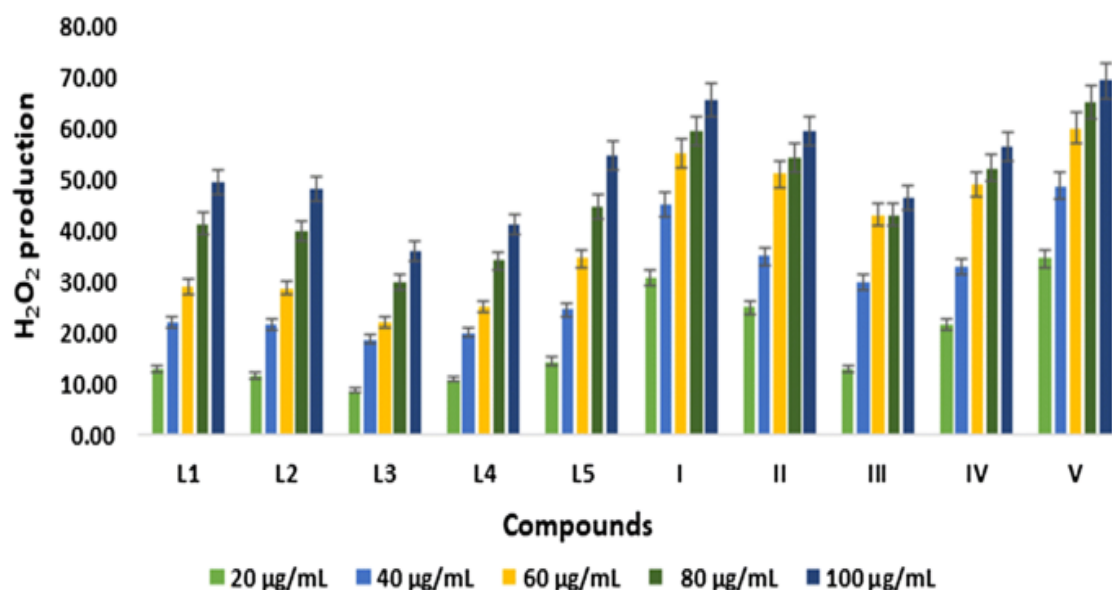
Σχήμα 2.5.7: Επίδραση των ενώσεων στα κύτταρα *Saccharomyces cerevisiae*, (Varma, Patel, et al. 2020)

Δύο θετικά κατά Gram (*S. aureus*, *B. subtilis*) και τρία αρνητικά κατά Gram (*S. marcescens*, *P. aeruginosa*, *E. coli*) μικρόβια χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση της αντιβακτηριακής δράσης των ligands και των ενώσεων. Η αντιβιοτική δράση *in vitro* συγκρίθηκε με μια έναν θετικό έλεγχο που αποτελείτο από βακτηριακές καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν σε DMSO χωρίς χημικές ουσίες. Όλες οι ενώσεις έχουν χαμηλότερες τιμές MIC σε σύγκριση με τους ουδέτερους διασθενείς προσδέτες και το πεντακαρβονυλοχλωρορήνιο, όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα. Το πεντακαρβονυλοχλωρορήνιο έχει MIC > 2500 µM, ενώ οι τιμές για τις ενώσεις και τα ligands κυμαίνονται μεταξύ 60-90 µM και 280-320 µM, αντίστοιχα. Η συμπερίληψη της νίτρο- και της χλωρομάδας στα ligands θειοφαιν-2-υλ-4,5-διυδρο-1H-πυραζολίνης καθιστά τα σύμπλοκα V και IV τα πιο δραστικά από τα σύμπλοκα. $Re(CO)_5Cl > L4 > L3 > L2 > L1 > L5 > IV > III > II > I > V$ είναι η ακολουθία των τιμών MIC.



Σχήμα 2.5.8: Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων (μM) μεταλλικού άλατος, ελεύθερων συνδέσμων και των συμπλόκων τους με ρήνιο(I) σε δύο gram(+) και τρεις gram(-) μικροοργανισμούς, (Varma, Patel, et al. 2020)

Οι μετρήσεις του υπεροξειδίου του υδρογόνου, ενός δραστικού είδους οξυγόνου, χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της τοξικότητας των ουσιών που ανέστειλαν την ανάπτυξη του *Saccharomyces cerevisiae* (ROvS). Στην περίπτωση αυτή, σε σύγκριση με τα μη μολυσμένα κύτταρα, τα επεξεργασμένα κύτταρα συσώρευαν περισσότερο υπεροξείδιο του υδρογόνου. Καθώς αυξανόταν η ποσότητα του εξεταζόμενου υλικού, αυξανόταν και η ποσότητα του H₂O₂ που υπήρχε. Η συσσώρευση του H₂O₂ ακολουθεί το μοτίβο L3 > L4 > L2 > L1 > L5 > III > IV > II > I > V.



Σχήμα 2.5.9: Παραγωγή H₂O₂ από *Saccharomyces cerevisiae* μετά από επεξεργασία με τις εξεταζόμενες ενώσεις, (Varma, Patel, et al. 2020)

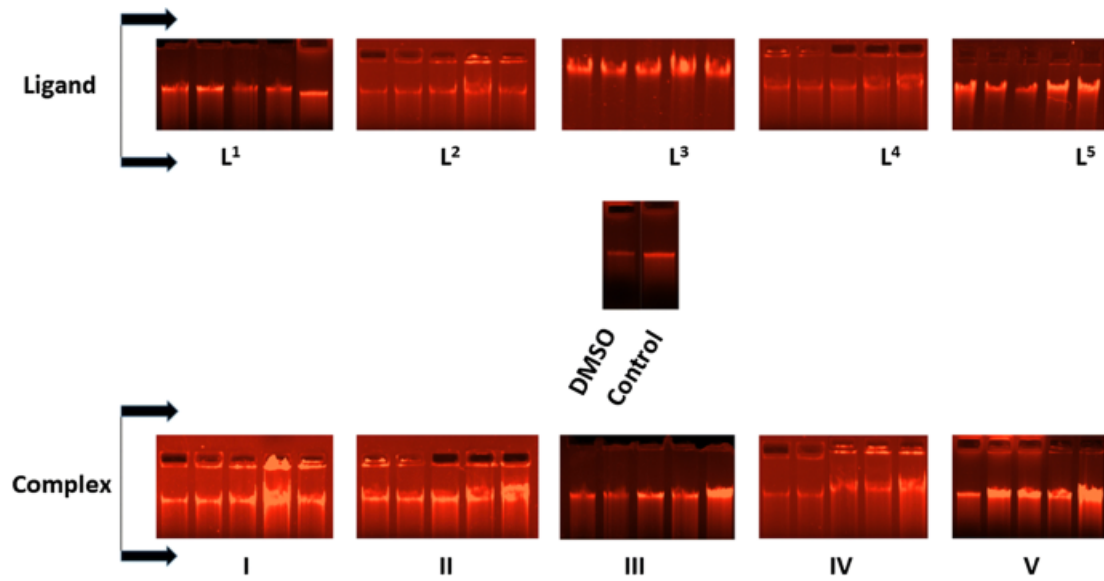
Η δοκιμή MTT χρησιμοποιήθηκε για να εξεταστούν οι αντικυτταρικές επιδράσεις των ενώσεων Re(I) έναντι διαφόρων τύπων καρκινικών και φυσιολογικών κυττάρων. Διαπιστώθηκε ότι οι ενώσεις Re(I) είναι σημαντικά πιο θανατηφόρες από τη σισπλατίνη έναντι μιας σειράς καρκινικών κυττάρων. Τα σύμπλοκα Re(I) με το υψηλότερο ποσοστό κυτταρικής ανάπτυξης είναι το V, ακολουθούμενο από το I, στη συνέχεια το II, στη συνέχεια η σισπλατίνη, η οξαλιπλατίνη, η καρμποπλατίνη, το III, στη συνέχεια το IV και τέλος το DMSO.

Σύμπλοκα	IC ₅₀ (µg/mL)
I	12.42
II	104.06
III	125.62
IV	> 500.00

Σύμπλοκα	IC ₅₀ (μg/mL)
V	< 10.00
Σισπλατίνη	15.49
Καρβοπλατίνη	> 111.37
Οξαλιπλατίνη	22.66

Πίνακας 2.5.10 : Τιμή IC₅₀ των συντιθέμενων συμπλόκων και των φαρμάκων με βάση την πλατίνα, (Varma, Patel, et al. 2020)

Παρατηρήθηκε ότι η επάλειψη του DNA (δίκην κομητών) αυξάνεται καθώς τα κύτταρα ζύμης υποβάλλονται σε μεγαλύτερες ποσότητες των χημικών ουσιών. Αποδεικνύεται απερίφραστα ότι η αναλογική αποτελεσματικότητα σύνδεσης των ενώσεων με το DNA είναι σημαντικά μεγαλύτερη από εκείνη των προσδετών πυραζολίνης. Η κηλίδωση είναι λιγότερο αισθητή στα ligands απ' ό,τι στα σύμπλοκα. Το εύρημα αυτό υποδηλώνει ότι η καταστρεπτική δράση κατά του DNA είναι μεγαλύτερη στα σύμπλοκα από ό,τι στα ligands. Η ύπαρξη ιόντων που έλκουν ηλεκτρόνια (-Br, -OCH₃ και -NO₂) στα σύμπλοκα II, III και V έχει ως αποτέλεσμα μεγαλύτερο αντίκτυπο στον κατακερματισμό του DNA σε σύγκριση με τα σύμπλοκα I και IV.



Σχήμα 2.5.11: Φωτογενής άποψη της διάσπασης του DNA του *Saccharomyces cerevisiae* με μια σειρά ενώσεων χρησιμοποιώντας πήκτωμα αγαρόζης 1% που περιέχει $0,5 \mu\text{g cm}^{-3}$ EtBr για 24 ώρες στους 37°C , (Varma, Patel, et al. 2020)

2.10 Μεταλλικά Σύμπλοκα Πυραζολίνης με Rh

Παρά τη σπανιότητά του στη φύση, το ευγενές μέταλλο της ομάδας του πλατίνας ρόδιο (Rh) και τα παράγωγά του χρησιμοποιούνται ευρέως σε ποικίλες εφαρμογές. Το Rh είναι το κεντρικό άτομο πολλών διαφορετικών ειδών βιοδραστικών συμπλόκων Rh και χρησιμοποιείται για την καταλυόμενη από το Rh ενεργοποίηση προς διάφορα βιοδραστικά οργανικά μόρια στον τομέα της φαρμακευτικής χημείας. Σε αυτό το πλαίσιο πρέπει επίσης να σημειωθούν τα ιδιαίτερα αντικαρκινικά πολυπυριδυλικά και δισδιμεθυλοσουλφοξιδικά σύμπλοκα Rh(III), καθώς και τα σύμπλοκα Rh(I) N-ετεροκυκλικών καρβενίων, εκτός από τα σύμπλοκα half-sandwich Rh(III) (που εξετάζονται στην παραπάνω εργασία, την μόνη στην οποία αναφέρονται υβρίδια πυραζολίνης-ροδίου και οι βιολογικές τους ιδιότητες και η οποία έχει αξιοποιηθεί ήδη δύο φορές στην ενότητα των συμπλόκων ρουθηνίου και ιριδίου. Για αυτόν τον λόγο θα αναφερθούμε σύντομα σε αυτήν, παρουσιάζοντας μόνο τους σχετικούς πίνακες τιμών και τα γραφήματα). Πολλαπλές μελέτες έχουν επικεντρωθεί σε ενώσεις Rh-αρενυλίου half-sandwich αλλά από τη βιβλιογραφία απουσιάζει μια σύνοψη των δομικών μορφών τους, των κατηγοριών των ligand, των κυτταρικών λειτουργιών και των μηχανισμών δράσης.

1. Οι ερευνητές με πρώτο συγγραφέα τον Carley Giffert L. Nongriur (Nongriur, Kollipara, et al. 2023) αποφάσισαν να συνθέσουν ορισμένα μεταλλικά σύμπλοκα που περιέχουν προσδέτες με βάση την πυραζολίνη και να αξιολογήσουν τα κυτταροτοξικά και αντιμικροβιακά χαρακτηριστικά αυτών των συμπλόκων. Θα εστιάσουμε κατευθείαν στις σύμπλοκα ροδίου.

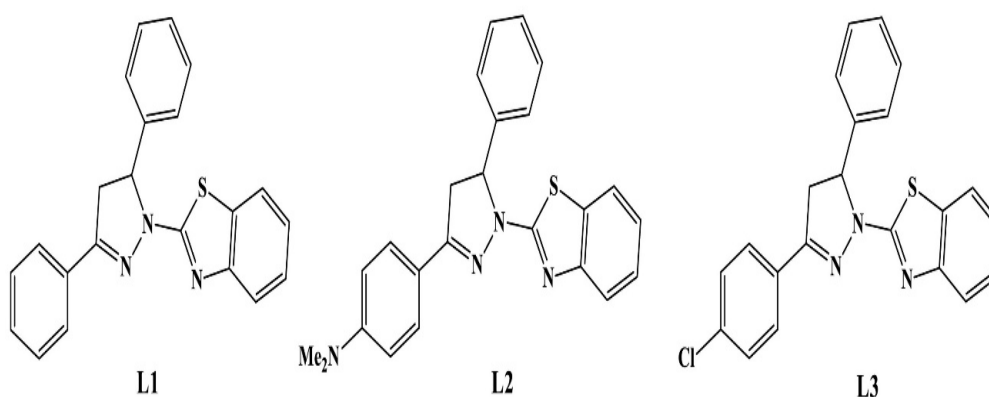


RuL_3ClPF_6 7

RuL_1ClPF_6 1

RuL_2ClPF_6 4

Πίνακας 2.10.1: τα παραχθέντα σύμπλοκα 1 έως 9. Τα σύμπλοκα ιριδίου είναι τα 3,6 και 9.



Εικόνα 2.10.2: Χημικές δομές των προσδετών πυραζολίνης (L1, L2 και L3). (Nongpriur, Kollipara, et al. 2023)

Sl. No.	Ενώσεις	Βακτηριακά στελέχη			
		Gram –		Gram +	
		<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. thuringiensis</i>
	Kanamycin (+ve control)	21 ± 1	21 ± 1	20 ± 1	20 ± 1
1	Ligand 1	–	–	–	–
2	Σύμπλοκο 1	–	–	24 ± 1	25 ± 1
3	Σύμπλοκο 2	–	–	–	23 ± 1
4	Σύμπλοκο 3	–	–	–	–

Sl. No.	Ενώσεις	Βακτηριακά στελέχη			
		Gram –		Gram +	
		<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. thuringiensis</i>
5	Ligand 2	–	–	–	–
6	Σύμπλοκο 4	–	–	–	24 ± 1
7	Σύμπλοκο 5	–	–	–	–
8	Σύμπλοκο 6	–	–	–	24 ± 1
9	Ligand 3	–	–	–	–
10	Σύμπλοκο 7	–	–	23 ± 1	24 ± 1
11	Σύμπλοκο 8	–	–	–	–
12	Σύμπλοκο 9	–	–	–	23 ± 1

Πίνακας 2.10.3: Αντιβακτηριακή δράση των εξεταζόμενων ενώσεων σε συγκέντρωση 5 mg/ml έναντι διαφόρων βακτηριακών στελεχών. (Nongriur, Kollipara, et al. 2023)

Βλέπουμε ότι από τα τρία σύμπλοκα ροδίου, κανένα δεν ήταν δραστικό έναντι των Gram αρνητικών μικροβίων. Ωστόσο, τα σύμπλοκο 2 παρουσιάζει σημαντική αντιβακτηριακή δράση κατά των Gram θετικών βακτηρίων. Μάλιστα, είναι πιο αποτελεσματικό από το φάρμακο αναφοράς Καναμυκίνη.

Όσον αφορά στις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των συμπλόκων τα σύμπλοκα ροδίου 2, 5 και 8 δεν επέδειξαν αξιόλογη δράση(3%, 6% και 5% αντιστοίχως).

Sl. No.	Ενώσεις	% DRSA
1	AA	100
2	Ligand 1	6
3	Σύμπλοκο 1	5
4	Σύμπλοκο 2	3
5	Σύμπλοκο 3	6
6	Ligand 2	3
7	Σύμπλοκο 4	18
8	Σύμπλοκο 5	6
9	Σύμπλοκο 6	6
10	Ligand 3	3
11	Σύμπλοκο 7	7
12	Σύμπλοκο 8	5
13	Σύμπλοκο 9	26

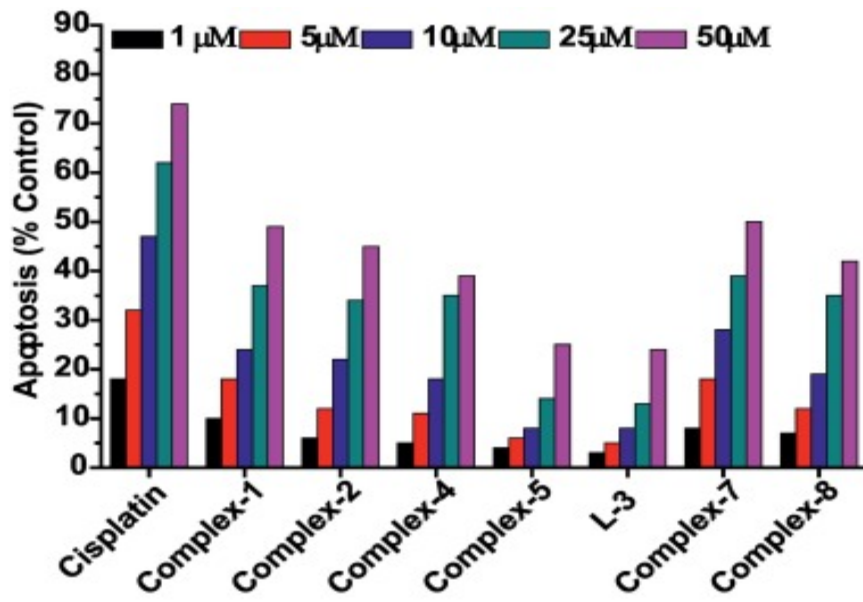
Πίνακας 2.10.4: Ιστόγραμμα της δραστικότητας απορρόφησης ριζών DPPH των προσδετών και των συμπλόκων σε σύγκριση με το ασκορβικό οξύ. (Nongriur, Kollipara, et al. 2023)

Τέλος, η βιοδοκιμή MTT, η οποία χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της κυτταροτοξικής/αντικαρκινικής δράσης των εξεταζόμενων ουσιών, έδειξε ότι τα σύμπλοκα ροδίου τις ασκούν σε σημαντικό βαθμό, ενώ παράλληλα παρουσιάζουν πολύ χαμηλή τοξικότητα για τα μη-καρκινικά κύτταρα. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρονται και για την αποπτωτική δράση των ενώσεων, με το σύμπλοκο 2 να έχει την 2^η, κατά αύξουσα σειρά, θέση, το σύμπλοκο 8 την 3^η και το σύμπλοκο 5 την προτελευταία. Η μελέτη έδειξε ότι τα εν λόγω σύμπλοκα ήταν ικανά να προσκολλώνται στην θέση δέσμησης αναστολέων των κύριων πρωτεϊνών-στόχων

BCL-2, οι οποίες έχουν συνδεθεί με την ανάπτυξη και τη μετάσταση διαφόρων μορφών καρκίνου.

A/A	Ενώσεις	Κ. σειρά	Φύση κυττάρου	IC ₅₀	Κ.σειρά	Φύση κυττάρου	IC ₅₀
1.	Σισπλατίνη (Αναφορά)	DL	Καρκινικό	02.51	PBMC	Μη-καρκινικό	16
2.	Σύμπλοκο 1	DL	Καρκινικό	32.87	PBMC	Μη-καρκινικό	221
3.	Σύμπλοκο 2	DL	Καρκινικό	41.66	PBMC	Μη-καρκινικό	270
4.	Σύμπλοκο 4	DL	Καρκινικό	55.41	PBMC	Μη-καρκινικό	352
5.	Σύμπλοκο 5	DL	Καρκινικό	169.86	PBMC	Μη-καρκινικό	480
6.	Ligand 3	DL	Καρκινικό	132.74	PBMC	Μη-καρκινικό	410
7.	Σύμπλοκο 7	DL	Καρκινικό	27.58	PBMC	Μη-καρκινικό	188
8.	Σύμπλοκο 8	DL	Καρκινικό	53.15	PBMC	Μη-καρκινικό	345

Πίνακας 2.10.5: Τιμές IC₅₀ (μM) διαφόρων ενώσεων και φαρμάκων αναφοράς σε DL (καρκινικές) και PBMC (μη καρκινικές) κυτταρικές σειρές μετά από 48 ώρες θεραπείας. (Nongriur, Kollipara, et al. 2023)



Σχήμα 2.10.6: Ποσοστό αποπτωτικών κυττάρων που προσδιορίστηκε με καταμέτρηση 1000 κυττάρων ανά ομάδα με μικροσκόπιο φθορισμού. (Nongriur, Kollipara, et al. 2023)

Προοπτικές και προτάσεις

Είναι φανερό ότι ο συνδυασμός μετάλλων ήδη γνωστών για τις ιατρικές τους εφαρμογές και των πυραζολινικών μορίων μπορούν να μας δώσουν μία πολύτιμη βοήθεια στην προσπάθεια μας να θωρακίσουμε την ανθρώπινη υγεία. Με σκοπό να βγάλουμε ένα γενικό συμπέρασμα, μπορούμε να πούμε πως τα μεταλλικά σύμπλοκα που αναφέρθηκαν έχουν κατά κύριο λόγο αντιμικροβιακή δράση, αλλά επίσης, επιδεικνύουν και μια αντικαρκινική δράση σε υψηλές, ωστόσο, συγκεντρώσεις. Κρίνεται σημαντική η περαιτέρω μελέτη των δράσεων τους, με σκοπό την μελλοντική κλινική αξιοποίηση αυτών των ενώσεων.

Σημαντική είναι επίσης η συνθήση πυραζολινικών συμπλόκων και με άλλα μέταλλα, τα οποία δεν υπάρχουν ακόμα στην βιβλιογραφία, όπως ο λευκόχρυσος, ο ψευδάργυρος, το ζirkόνιο, ο μόλυβδος και το μολυβδαίνιο, όλα εκ των οποίων, φέρουν αντισηπτικές ιδιότητες (Yasuyuki, et al. 2010). Χρήσιμη θα είναι και η μελέτη συμπλόκων πυραζολίνης με μέταλλα γνωστά για τις αντικαρκινικές τους δράσεις, όπως το πολλά υποσχόμενο όσμιο (Zhang and Huang 2018), (Hanif, Babak and Hartinger 2014).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρατήρηση ότι κάποιες από αυτές τις ενώσεις λειτουργούν ως φωτοδιακόπτες (photoswitches) , με συνέπεια να μπορεί να ρυθμιστεί η δραστηριότητα τους με την χρήση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, όπως περιγράφηκε σε ένα από τα άρθρα που αναφέρθηκαν (Havrylyuk, et al. 2020).

Σε κάθε περίπτωση, τα μεταλλικά σύμπλοκα πυραζολίνης μπορούν να αξιοποιηθούν ως λιγότερο τοξικά υποκατάστατα κάποιων συμβατικών φαρμάκων, όπως η σισπλατίνη (αντικαρκινικό), η αμφοτερικίνη Β και η χλωραμφενικόλη (αντιβακτηριακά).

3. Επίλογος

Η αύξηση της συχνότητας εμφάνισης και των ποσοστών θανάτου που προκαλούνται από τον καρκίνο καθώς και από μολυσματικές ασθένειες παραμένουν μια σημαντική παγκόσμια ανησυχία για την υγεία. Υπάρχει πάντα ανάγκη για νέα φάρμακα με μέγιστη αποτελεσματικότητα, επιλεκτικότητα και ελάχιστη βλαπτικότητα λόγω των αρνητικών επιπτώσεων και της ανοχής στα φάρμακα με τις τρέχουσες θεραπείες.

Αυτό που μπορεί να επιτευχθεί συνδυάζοντας ορισμένα μέταλλα με ένα μικροσκοπικό μόριο όπως η πυραζολίνη είναι πραγματικά εκπληκτικό. Ορισμένοι πρωτοπόροι ερευνητές έχουν περιγράψει τις μοναδικές ιδιότητες των ενώσεων αυτών, μαζί με την ευκολία σύνθεσης και τροποποίησής τους, παρέχοντας αφορμή για την έρευνα που αποσκοπεί στην εξεύρεση τρόπων αξιοποίησής τους για την αντικατάσταση ορισμένων ήδη υπαρχόντων φαρμάκων που δεν είναι τόσο αποτελεσματικά ή, ακόμη χειρότερα, είναι τοξικά για τον άνθρωπο. Ενδεχομένως, θα μπορούν να χορηγηθούν ταυτόχρονα με τα συμβατικά φάρμακα, ούτως ώστε να ενισχυθεί η δράση τους έτι περαιτέρω. Αν και τα αποτελέσματα αυτών των προσπαθειών είναι ενθαρρυντικά, πρέπει να γίνουν πολύ περισσότερα.

Το παρόν άρθρο καταβάλλει προσπάθεια να ρίξει φως στις δυνατότητες των πυραζολινικών-μεταλλικών ενώσεων. Δεδομένου ότι ίσως πρόκειται για μια μοναδική ευκαιρία να εξοπλιστούμε με κάποιες πολλά υποσχόμενες, νεοσυντιθέμενες ενώσεις για την καταπολέμηση δύο από τους πιο επικίνδυνους εχθρούς μας - τα μικρόβια και τον καρκίνο - η επιστημονική κοινότητα θα πρέπει να διερευνήσει ακόμη περισσότερο τις δυνατότητές τους.

4. Βιβλιογραφία

- Donaldson, John Dallas, και Detmar Beyersmann. «Cobalt and Cobalt Compounds.» *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 15 October 2005.
- Gasser, και Leonidova . «Underestimated Potential of Organometallic Rhenium Complexes as Anticancer Agents.» *ACS Publications*, 2014: 2180–2193.
- Zobi, Schindler, και Marchetti. «Anticancer and Antibiotic Rhenium Tri- and Dicarbonyl Complexes: Current Research and Future Perspectives.» *MDPI*, 2022: 1-25.
- Aboul-Enein, et al. «Design and synthesis of novel stiripentol analogues as potential anticonvulsants.» *European Journal of Medicinal Chemistry*, January 2012: 360-369.
- Acharya, et al. «Synthesis and antimalarial evaluation of 1, 3, 5-trisubstituted pyrazolines.» *European Journal of Medicinal Chemistry*, February 2010: 430-438.
- Aggarwal, Bansal, Rozas, Kelly, Kaushik, και Kaushik. «Synthesis, biological evaluation and molecular modeling study of 5-trifluoromethyl- Δ^2 -pyrazoline and isomeric 5/3-trifluoromethylpyrazole derivatives as anti-inflammatory agents.» *European Journal of Medicinal Chemistry*, December 2013: 350-357.
- Ali, Imran, et al. «Synthesis and synergistic antifungal activities of a pyrazoline based ligand and its copper(II) and nickel(II) complexes with conventional antifungals.» *Microbial Pathogenesis*, 2012.
- Allardyce, Claire S., και Paul J. Dyson. «Ruthenium in Medicine: Current Clinical.» *Platinum Metals Reviews*, 2001: 8.
- Alniss, Hassan. «Thermodynamics of DNA Minor Groove Binders.» *ACS Publications*, 30 July 2018: 385–402.
- Announced, Not. «Biological and Medicinal Applications of Transition Metal Coordination Complexes of Nitrogen-Based Heterocyclic Derivatives.» *Frontiers in Chemistry*, 25 May 2023.
- Awqati, Q Al -. «One hundred years of membrane permeability: does Overton still rule?» *Nature Cell Biology*, 01 December 1999: 201-2.
- Bagheri, Shekarchi, Jorjani, Ghahremani, Vosooghi, και Shafiee. «Synthesis and Antihypertensive Activity of 1-(2-Thiazolyl)-3, 5-disubstituted -2-Pyrazolines.» *Arch Pharm*, 28 Januar 2004: 25-34.
- Barceloux, και Barceloux. «Cobalt.» *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology* , 06 August 1999: 201-216.

- Bashir, et al. «Synthesis of some new 1,3,5-trisubstituted pyrazolines bearing benzene sulfonamide as anticancer and anti-inflammatory agents.» *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 15 jULY 2011: 4301-4305.
- Basketter, Angellini, Ingber, Kern, και Menne. «Nickel, chromium and cobalt in consumer products: revisiting safe levels in the new millennium.» *Contact Dermatitis*, 01 December 2003: 1-7.
- Beyene, Belete, Ayenew Mihirteu, Misganaw Ayana, και Amogne Yibeltal. «Synthesis, characterization and antibacterial activity of metalloporphyrins: Role of central metal ion.» *Results in Chemistry*, 2020.
- Biot, Nosten, Fraise, Ter-Minassian, Khalife, και Dive. «The antimalarial ferroquine: from bench to clinic.» *Parasite 2011*, 18 March 2011: 207-214.
- Bostancioglu, Demirel, Turgut Cin, και Tansu Koparal. «Novel ferrocenyl-containing N-acetyl-2-pyrazolines inhibit in vitro angiogenesis and human lung cancer growth by interfering with F-actin stress fiber polimerization.» *Drug and Chemical Toxicology*, 2013: 484-495.
- Budakoti, Asha, Azam Amir, και Mohammad Abid. «Syntheses, characterization and in vitro antiamebic activity of new Pd(II) complexes with 1-N-substituted thiocarbamoyl-3,5-diphenyl-2-pyrazoline derivatives.» *European Journal of Medicinal Chemistry*, 06 Decemebr 2006: 544-551.
- Budakoti, Azam, και Abid. «Synthesis and antiamebic activity of new 1-N-substituted thiocarbamoyl-3,5-diphenyl-2-pyrazoline derivatives and their Pd complexes.» *European Journal of Medicinal Chemistry*, 21 November 2005: 63-70.
- Burmudžija, et al. «Pyrazoline derivatives of acryloyl substituted ferrocenyl ketones: Synthesis, antimicrobial activity and structural properties.» *Inorganica Chimica Acta*, 24 February 2017: 570-576.
- Cathy, O' Neil. *Weapons of Math Destruction: How Big Data Increases Inequality and Threatens Democracy*. Chicago: Crown Random House, 2017.
- Chandra, Sulekh, Deepali Jain, Amit Kumar Sharma, και Pratibha Sharma. «Coordination Modes of a Schiff Base Pentadentate Derivative of 4-aminoantipyrine with Cobalt(II), Nickel(II) and Copper(II) Metal Ions: Synthesis, spectroscopic and Antimicrobial studies.» *Molecules*, 01 January 2009: 174-190.
- Chem Europe. *Hapticity*. 2023.
<https://www.chemurope.com/en/encyclopedia/Hapticity.html#References>
 (πρόσβαση March 06, 2023).

- Chem, Wu, Jun Li, Pei, και Zhao. «Synthesis and biological evaluation of hydrazone and pyrazoline derivatives derived from androstenedione.» *Research on Chemical Intermediates* , 31 July 2018: 7029–7046.
- Chen, Xia, και Susan Thibeault. «Effect of DMSO Concentration, Cell Density and Needle Gauge on the Viability of Cryopreserved Cells in Three Dimensional Hyaluronan Hydrogel.» *IEEE*, 2014.
- COLLINS ENGLISH DICTIONARY. *COLLINS ENGLISH DICTIONARY*. 2023.
<https://www.dictionary.com/browse/bathochromic> (πρόσβαση March 06, 2023).
- D'Abramo, Castelazzi, Orozco, και Amadei. «On the Nature of DNA Hyperchromic Effect.» *The Journal Of Physical Chemistry*, 25 June 2013: 8697–8704.
- Dias, et al. «Synthesis, structural characterization, and prospects for new cobalt (II) complexes with thiocarbamoyl-pyrazoline ligands as promising antifungal agents.» *Journal of Inorganic Biochemistry*, 06 October 2020: 1-11.
- Dilworth , και Parrott. «The biomedical chemistry of technetium and rhenium.» *Chemical Society Reviews*, 1998: 43-55.
- Eberlein, et al. «Personalized irradiation therapy for NMSC by rhenium-188 skin cancer therapy: a long-term retrospective study.» *Journal of Dermatological Treatment*, 2020: 1-7.
- Elbagir, Van Heerden, και Mackintosh. «Dirty Energy.» *CNN*, 2018: 29.
- Elledge, Zhou, και Allen. «Ribonucleotide reductase: regulation, regulation, regulation.» *Trends in biochemical sciences*, March 1992: 119-123.
- Elschenbroich, Christoph. *Organometallics*. 3rd completely rev. and enl. ed. . Chichester: Wiley-VCH, 2006.
- Emayavaramban, Santhi, Gopi, Manivannan, και Raguraman. «Synthesis, Characterization and Anti-diabetic activity of 1,3,5-triaryl-2-pyrazolines in acetic acid solution under Ultrasound Irradiation.» *International Letters of Chemistry, Physics and Astronomy*, 09 September 2013: 172-185.
- Enna, και Bylund. *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*. Elsevier, 2008.
- Fahad, Abid, και Al Jibouri. «SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF SOME TRANSITION METALS COMPLEXES DERIVED FROM BIS-PYRAZOLINE BASED LIGAND.» *Malaysian Journal Of Science*, 31 December 2019: 59-71.
- Farooq Rizvi, Latif Siddiqui, Johns, Detorio, και Schinazi. «Anti-HIV-1 and cytotoxicity studies of piperidyl-thienyl chalcones and their 2-pyrazoline derivatives.» *Medicinal Chemistry Research*, 04 December 2011: 3741–3749 .

- Fink, και Uchman. «Boron cluster compounds as new chemical leads for antimicrobial therapy.» *Coordination Chemistry Reviews*, 15 March 2021.
- Frei, Blaskovich, Amado, και Cooper. «Light-Activated Rhenium Complexes with Dual Mode of Action against Bacteria.» *Chemistry Europe*, 2019: 2852-2858.
- Frei, et al. «Metal complexes as a promising source for new antibiotics.» *Chemical Science*, November 2020: 2627-2639.
- . «Metal Complexes as Antifungals? From a Crowd-Sourced Compound Library to the First In Vivo Experiments.» *JACS Au*, 23 September 2022: 2277–2294.
- Gajera, Mehta, και Patel. «Design of Multifunctional Iridium Compounds as a Potential Therapeutic Agents from Basic Molecular Scaffolds.» *Chemistry Europe* 1, αρ. 13 (2016): 3966-3973.
- Gasser, G. «Metal Complexes and Medicine: A Successful Combination.» *himia* 2015, 8 November Chimia(Aarau): 442-446.
- Gasser, και Metzler-Nolte. «The potential of organometallic complexes in medicinal chemistry.» *Current Opinion in Chemical Biology*, April 2012: 84-91.
- Gianferrara, Bratsos, και Alessio. «A categorization of metal anticancer compounds based on their mode of action.» *Dalton Transactions*, 05 June 2009: 7588-7598.
- Guanglun, Mu Michael, Hu Yang, και Wang Yan. «Building resilience of students with disabilities in China: The role of inclusive education teachers.» *Teacher and Teaching Education*, October 2017: 125-134.
- Haider, Shafeeque, Yahya, και Shahar Yar. «A comprehensive review on pyrazoline based heterocyclic hybrids as potent anticancer agents.» *European Journal of Medicinal Chemistry Reports*, August 2022: 1-27.
- Hamil. «Amphotericin B Formulations: A Comparative Review of Efficacy and Toxicity.» *Drugs*, 01 June 2013: 919–934.
- Hanif, Babak, και Hartinger. «Development of anticancer agents: wizardry with osmium.» *Drug Discovery Today*, 19 October 2014: 1640-8.
- Havrylyuk, Dmytro, David K. Heidary, Yang Sun, Sean Parkin, και Edith C. Glazer. «Photochemical and Photobiological Properties of Pyridyl-pyrazol(in)e-Based Ruthenium(II) Complexes with Sub-micromolar Cytotoxicity for Phototherapy.» *ACS Publications*, 2020: 13.
- Helmenstine, Anne Marie. *The Definition of Ortho, Meta, and Para in Organic Chemistry*. 2021. <https://www.thoughtco.com/ortho-meta-para-in-organic-chemistry-608213#:~:text=The%20terms%20ortho%2C%20meta%2C%20and,after%2C%20and%20similar%2C%20respectively.> (πρόσβαση May 08, 2023).

- Hipler, και Elsner. «Interactions between Skin and Biofunctional Metals.» *Biofunctional Textiles and the Skin*, 2006: 17-34.
- Hsia. «Respiratory Function of Hemoglobin.» *The New England Journal Of Medicine*, 22 January 1998: 239-248.
- Husain, Kakul, Mohammad Abid, και Amir Azam. «Novel Pd(II) complexes of 1-N-substituted 3-phenyl-2-pyrazoline derivatives and evaluation of antiamebic activity.» *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2007.
- Imberti, και Sadler. «Chapter One - 150 years of the periodic table: New medicines and diagnostic agents.» *Advances in Inorganic Chemistry*, 2020: 3-5.
- IUPAC. «IUPAC Gold Book.» 1994. <https://goldbook.iupac.org/terms/view/C01012> (πρόσβαση March 29, 2023).
- Johnstone, Suntharalingam , και Lippard. «The Next Generation of Platinum Drugs: Targeted Pt(II) Agents, Nanoparticle Delivery, and Pt(IV) Prodrugs.» *Chemistry Reviews*, 9 March 2016: 3436-86.
- K. V. SHARMA. «Synthesis, spectroscopic, antimicrobial and anti-inflammatory studies of 5(2'-hydroxyphenyl)-3-(4-x-phenyl) pyrazolines of copper (II) and their addition complexes with donor ligands.» *Journal of Coordination Chemistry* , 05 March 2008: 493-505.
- Kahriman, Hasimoglu, Serdaroglu, Beris, Barut, και Yayli. «Synthesis of Novel Pyrazolines, Their Boron–Fluorine Complexes, and Investigation of Antibacterial, Antioxidant, and Enzyme Inhibition Activities.» *Arch Pharm*, 29 December 2016.
- Kaplancikli, Zitouni, Ozdemir, Can, και Chevallet. «Synthesis and antinociceptive activities of some pyrazoline derivatives.» *European Journal of Medicinal Chemistry*, June 2009: 2606-2610.
- Karad, Purohit, και Raval. «Design, synthesis and characterization of fluoro substituted novel pyrazolopyrazolines scaffold and their pharmacological screening.» *European Journal of Medicinal Chemistry*, 12 September 2014: 51-58.
- Kavsan, Iershov, και Balynska. «Immortalized cells and one oncogene in malignant transformation: old insights on new explanation.» *BMC Molecular and Cell Biology*, 23 May 2011.
- Kaymakcioglu, Bedia, Gumru, Beyhan, και Aricioglu. «Antidepressant-like Activity of 2-Pyrazoline Derivatives.» *Journal of Marmara University Institute of Health Sciences*, 2013.
- Keter, και Darkwa. «The potential of pyrazole-based compounds in medicine.» *Biometals*, 15 October 2011: 9-21.

- Khalilullah, Khan, Ahsan, και Ahmed. «Synthesis and antihepatotoxic activity of 5-(2,3-dihydro-1,4-benzodioxane-6-yl)-3-substituted-phenyl-4,5-dihydro-1H-pyrazole derivatives.» *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 15 December 2011: 7251-7254.
- Knorr, Ludwig. «Einwirkung von Acetessigester auf Phenylhydrazin.» *Chemistry Europe*, July-December 1883: 2597-2599.
- Korfel, και Agniezka. «Phase I clinical and pharmacokinetic study of titanocene dichloride in adults with advanced solid tumors.» *Clinical Cancer Research*, 11 April 1998: 1078-0432.
- Kumar, Rout, Sahoo, και Ravi Kumar. «SYNTHESIS AND BIOLOGICAL EVALUATION OF NEW 4-BROMO-3, 5-DIARYL-1-PHENYL-2-.» *International Journal of Research and Development in Pharmacy and Life Sciences*, 06 January 2013: 2278-0238.
- Lange, et al. «Two distinct classes of novel pyrazolinecarboxamides as potent cannabinoid CB1 receptor agonists.» *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 01 September 2010: 4992-4998.
- Lemire, Harrison, και Turner. «Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications.» *Nat Rev Microbiol*, 11 June 2013: 371-84.
- Lloyd, Morgan, Nicholson, και Ronimus. «The Composition of Ehrlich's Salvarsan: Resolution of a Century-Old Debate.» *Angewandte Chemie International Edition*, 2005: 941-944.
- M.Abid, A. Azam, I. Irfan, και M. Irfan. «SYNTHESIS, BIOLOGICAL EVALUATION AND IN SILICO STUDIES OF PYRAZOLINE AND ITS METAL COMPLEXES AS ANTI-AMOEBIC AGENTS.» *RASAYAN JOURNAL OF CHEMISTRY*, 2019: 15.
- Ma, Wu, Leung, και Wu. «Iridium(III) Complexes Targeting Apoptotic Cell Death in Cancer Cells.» *Molecules*, 2019: 28;24(15):2739.
- Maret. «The Metals in the Biological Periodic System of the Elements: Concepts and Conjectures.» *International Journal of Molecular Sciences*, 17 January 2016: 66.
- Marin Vincent. «Antimicrobial applications of copper.» *ELSEVIER*, 2016: 7.
- Matiadis, et al. «Synthesis and antimicrobial evaluation of a pyrazoline-pyridine silver(I) complex: DNA-interaction and anti-biofilm activity.» *Biometals*, 06 November 2021: 67-85.
- McNaught, και Wilkinson. *IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book")*. 2nd. Blackwell Scientific Publications, 2019.

- Mehta, Jugal V., Gajera B. Sanjay, και Mohan N. Patel. «Biological applications of pyrazoline-based half-sandwich ruthenium(III) coordination compounds.» *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 15 July 2016: 1599-1607.
- Mehta, Jugal V., Sanjay B. Gajera, και Mohan N. Patel. «Design, synthesis and biological evaluation of Pyrazoline nucleus based homoleptic Ru(III) compounds.» *Royal Society of Chemistry* 7 (2016): 14.
- Merriam-Webster. *Merriam-Webster*. 2023. Merriam-Webster (πρόσβαση March 06, 2023).
- Merriam-Webster. *merriam-webster.com*. 2023.
- Miller, Tadagavadi, Ramesh, και Reeves. «Mechanisms of Cisplatin Nephrotoxicity.» *MDPI*, 2010: 2490-2518.
- Mishra, και Sasmal. «Additional acetyl cholinesterase inhibitory property of diaryl pyrazoline derivatives.» *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, February 2013: 702-705.
- Molinaro, Caroline, Alain Martotiati, Lydie Pelinski, και Katia Cailliau. «Copper Complexes as Anticancer Agents Targeting Topoisomerases I and II.» *MDPI*, 2020.
- Monro, et al. «Transition Metal Complexes and Photodynamic Therapy from a Tumor-Centered Approach: Challenges, Opportunities, and Highlights from the Development of TLD1433.» *Chemical Reviews*, February 2019: 797-828.
- Morrissey, Janet. *The New York Times*. 2 August 2018.
<https://www.nytimes.com/2018/08/02/education/learning/writing-college-application-essay.html?ref=collection%2Fsectioncollection%2Feducation&action=click&contentCollection=education®ion=rank&module=package&version=highlights&contentPlacement=2&pgtype=s>.
- Mukherjee, Rabindranath. «Coordination chemistry with pyrazole-based chelating ligands: molecular structural aspects.» *Coordination Chemistry Reviews*, June 2000: 151-218.
- Muneera, και Joseph. «Design, synthesis, structural elucidation, pharmacological evaluation of metal complexes with pyrazoline derivatives.» *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, October 2016: 57-68.
- Naumov. «Rhythms of rhenium.» *Russian Journal of Non-Ferrous Metals*, 2007: 1-6.
- Neethu, και Yusuf. «In-silico Design, Synthesis, Anti-inflammatory and Anticancer Synthesis and Biological evaluation of Pyrazoline Analogues of Vanillin.» *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, 2014: 128-131.

- Nehra, Rulhania, Jaiswal, Kumar, Singh, και Monga. «Recent advancements in the development of bioactive pyrazoline derivatives.» *Eur. J. Med. Chem*, 29 July 2020: 1-34.
- Nielsen. «Update on human health effects of boron.» *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 05 July 2014: 383-387.
- . «Boron in human and animal nutrition.» *Plant and soil*, June 1997: 199–208.
- Nongpiur, Carley Giffert L., et al. «Half-sandwich ruthenium(II), rhodium(III) and iridium(III) fluorescent metal complexes containing pyrazoline based ligands: DNA binding, cytotoxicity and antibacterial activities.» *Journal of Inorganic Biochemistry*, 02 November 2022: 0162-0134.
- Nongpiur, et al. «Half-sandwich ruthenium(II), rhodium(III) and iridium(III) fluorescent metal complexes containing pyrazoline based ligands: DNA binding, cytotoxicity and antibacterial activities.» *Journal of Inorganic Biochemistry*, 02 November 2022: 0162-0134.
- «Half-sandwich ruthenium(II), rhodium(III) and iridium(III) fluorescent metal complexes containing pyrazoline based ligands: DNA binding, cytotoxicity and antibacterial activities.» *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2 November 2023: 0162-0134.
- OECD. *Introduction to (Quantitative) Structure Activity Relationships*. 2023. <https://www.oecd.org/env/ehs/risk-assessment/introductiontoquantitativestructureactivityrelationships.htm> (πρόσβαση March 06, 2023).
- Oxford Reference. *Oxford Reference*. 2023. <https://www.oxfordreference.com/view/10.1093/oi/authority.20110803095954448> (πρόσβαση 05 05, 2023).
- Ozdemir, Zitouni, Kaplancikli, Revial, και Guven. «Synthesis and antimicrobial activity of 1-(4-aryl-2-thiazolyl)-3-(2-thienyl)-5-aryl-2-pyrazoline derivatives.» *European Journal of Medicinal Chemistry*, March 2007: 403-409.
- Ozgun, et al. «Synthesis and bioactivities of pyrazoline benzensulfonamides as carbonic anhydrase and acetylcholinesterase inhibitors with low cytotoxicity.» *Bioorganic Chemistry*, March 2019: 511-517.
- Parveen, et al. «Novel Pyrazoline-based Organometallic Compounds Containing Ferrocenyl and Quinoline units: Synthesis,» *Applied organometallic Chemistry*, 16 January 2018.
- Phadte, Banerjee, Mate, και Banerjee. «Spectroscopic and viscometric determination of DNA-binding modes of some bioactive dibenzodioxins and phenazines.» *Biochemistry and Biophysics Reports*, 04 April 2019.

- Pizzorno. «Nothing Boring About Boron.» *Integr Med (Encinitas)*, 14 August 2015: 35-48.
- Prado, J V, A L Vidal, και T C Duran. «Application of copper bactericidal properties in medical practice.» *Europe PMC*, 2012.
- Prasad, Rao, Prasoon, Murali, και Kumar. «Synthesis and antidepressant activity of some 1,3,5-triphenyl-2-pyrazolines and 3-(2''-hydroxy naphthalen-1''-yl)-1,5-diphenyl-2-pyrazolines.» *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 15 November 2005: 5030-5034.
- Proekt, και Hemmings jr. «Chapter 1 - Mechanisms of Drug Action.» *Pharmacology and Physiology for Anesthesia*, 2013: 3-19.
- Rathinasamy, Suresh, et al. «Synthesis and anticancer activity of certain mononuclear Ru (II) Complexes.» *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 04 October 2008: 501-507.
- Reece. «Toward Multi-Targeted Platinum and Ruthenium Drugs-A New Paradigm in Cancer Drug Treatment Regimens?» *Chemical Reviews*, 14 January 2019: 1058–1137.
- Saleem, et al. «Synthesis, DNA binding, hemolysis assays and anticancer studies of copper, nickel and iron complexes of a pyrazoline-based ligand.» *Future Medicinal Chemistry*, 30 January 2013.
- Sambrook, Joseph, και David Russel. «Fragmentation of DNA by Sonication.» *Cold Spring Harbor Protocols*, 2001.
- Santini, Carlo, Maurela Pellei, Valentina Gardin, Marina Porchia, Francesco Tissato, και Christina Marzano. «Advances in Copper Complexes as Anticancer Agents.» *ACS Publications*, 2013.
- Santini, Carlo, et al. «Advances in Copper Complexes as Anticancer Agents.» *ACS Publications*, 2013.
- Shah, Pankaj, Patel, Prajapati, Vaghari, και Parmar. «Synthesis, Characterization and Antimicrobial Activity of Azetidin-2-One based Phenyl Sulfonyl Pyrazoline Derivatives.» *Global Journal of Science Frontier Research*, 2014: 33-38.
- Sharma, K.V, Vandana Sharma, και Tripathi. «Synthesis, spectral and biological investigations of 5(2'-hydroxyphenyl)-3-(4-substituted-phenyl) pyrazolines of cobalt(II) and their addition complexes with N, P donor ligands.» *Journal of Coordination Chemistry*, 10 December 2009: 506-518.
- Sharma, Sharma, και Tripathi. «Iron(III)5(2'-hydroxyphenyl)-3-(4-X-phenyl)pyrazolines and their addition complexes with N, P donor ligands: synthesis, spectral and antimicrobial investigations.» *Journal of Coordination Chemistry*, 13 October 2008: 3314-3328.

- Siddiqui, Tripathi, Singh, Lata Singh, Gupta, και Ahmad. «Synthesis, physicochemical characterization and biological activity of nano complexes of iron(III) of 3(2'-hydroxyphenyl)-5-(4'-substituted phenyl) pyrazolines and aspartic acid.» *Applied Organometallic Chemistry*, 11 April 2012: 203-211.
- Siebert, και Harke. «Disinfectants.» *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 15 April 2009.
- Singh, Kumar, Prasad, και Bhardwaj. «Therapeutic journey of nitrogen mustard as alkylating anticancer agents: Historic to future perspectives.» *Eur J Med Chem*, 10 May 2018: 151:401.
- Singh, Negi, Rawat, και nee Pant. «Synthesis, antiamoebic activity and thermal study of copper complexes of 1-formyl-2-pyrazolines.» *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 06 January 2012: 549–552.
- Sridhar, και RAJENDRAPRASAD. «Synthesis and Analgesic Studies of Some New 2-.» *E-Journal of Chemistry*, 20 September 2011: 1810-1815.
- Study.com. *Explain the difference between the terms ortho, meta, and para in organic chemistry.* 2023. <https://homework.study.com/explanation/explain-the-difference-between-the-terms-ortho-meta-and-para-in-organic-chemistry.html> (πρόσβαση May 08, 2023).
- Tanwar, Marella, Shrivastava, Alam, και Akhtar. «Pharmacophore model generation and 3D-QSAR analysis of N-acyl and N-aroilpyrazolines for enzymatic and cellular B-Raf kinase inhibition.» *Medicinal Chemistry Research*, 05 September 2012: 2174–2187 .
- Thakor, Khyati, Mohan Patel, Bhupesh Bhatt, και Miral Lunagariya. «Synthesis, characterization and biological applications of some substituted pyrazoline based palladium (II) compounds.» *Applied Organometallic Chemistry*, 18 August 2018.
- Thota, Sreekanth, Stujana Vallaha, Rajeshwar Yerra, Daniel Alencar Rodrigues, Nulgumnalli Mantzunathaiah Raghavendra, και Eliezer J. Barreiro. «Synthesis, characterization, DNA binding, DNA cleavage, protein binding and cytotoxic activities of Ru(II) complexes.» *International Journal of Biological Macromolecules*, January 2016: 663-670.
- Tripathi, Siddiqui, Ahmad, και Singh. «High-spin complexes of iron(III) with ethylene glycol and 3(2'-hydroxyphenyl)-5-(4'-substituted phenyl) pyrazolines.» *Journal of Coordination Chemistry*, 23 February 2010: 894-905.
- UTSCUniversity of Toronto Scarborough. *What is Reflux?* 2023. <https://www.utsc.utoronto.ca/webapps/chemistryonline/production/reflux.php> (πρόσβαση March 06, 2023).

- Varghese, Al-Busafi, Suliman, και Al-Kindy. «Unveiling a versatile heterocycle: pyrazoline – a review.» *Royal Society of Chemistry*, 05 October 2017: 46999-47016.
- Varma , Reena R., Pandya, Vaidya, Pathak, Bhatt, και Patel. «Biological activities of pyrazoline-indole based Re(I) carbonyls: DNA interaction, antibacterial, anticancer, ROS production, lipid peroxidation, in vivo and in vitro cytotoxicity studies.» *Chemico-Biological Interactions*, 25 August 2020: 0009-2797.
- Varma, Reena R., Patel, Pathak, Sharma, και Pandya. «DNA interaction, in vivo and in vitro cytotoxicity, reactive oxygen species, lipid peroxidation of –N, S donor Re(I) metal complexes.» *Molecular Diversity*, 31 January 2020: 687–699.
- Wakshlak, Pedahzur , και Avnir . «Antibacterial activity of silver-killed bacteria: the "zombies" effect.» *scientific reports*, 23 April 2015: 5.
- Wang, et al. «Synthesis, molecular docking and evaluation of thiazolyl-pyrazoline derivatives containing benzodioxole as potential anticancer agents.» *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14 November 2012: 448-455.
- Wani, Bhat, Azam, Lee, Choi, και Athar. «Synthesis and in vitro evaluation of novel tetrazole embedded 1,3,5-trisubstituted pyrazoline derivatives as Entamoeba histolytica growth inhibitors.» *European Journal of Medicinal Chemistry*, August 2012: 845-854.
- Yamada, Kazuhiro. «Ο μεταβολισμός κάθε ζώου εξαρτάται από το κοβάλτιο. Αποτελεί κρίσιμο συστατικό της κοβαλαμίνης, πιο γνωστής ως βιταμίνη B12, η οποία χρησιμεύει ως η κύρια αποθήκη του οργανισμού για το υπεριχνοστοιχείο κοβάλτιο. Λόγω της θανατηφόρας φύσης του όταν προσλαμ.» *Interrelations between Essential Metal Ions and Human Diseases*, 18 November 2013: 295–320.
- Yasuyuki, Kunihiro, Kurissery, Kanavillil, Sato, και Kikuchi. «Antibacterial properties of nine pure metals: a laboratory study using Staphylococcus aureus and Escherichia coli.» *Biofouling*, 26 October 2010: 851-8.
- Zeng, et al. «The development of anticancer ruthenium(ii) complexes: from single molecule compounds to nanomaterials.» *Chemical Society Reviews*, 27 January 2017: 5771-5804.
- Zhang, και Huang. «Future potential of osmium complexes as anticancer drug candidates, photosensitizers and organelle-targeted probes.» *Dalton Transactions*, 25 September 2018: 14841-14854.
- Zitouni, Kaplancikli, Revial, Demirci, και Iscan. «Preparation of some pyrazoline derivatives and evaluation of their antifungal activities.» *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* , 10 August 2009: 565-571 .

Azam, Amir, Mohammad Abid, και Kakul Husain. «NoNovel Pd(II) complexes of 1-N-substituted 3-phenyl-2-pyrazoline derivatives and evaluation of antiamebic activity.» *European Journal of Medicinal Chemistry*, February 2008: 393-403.

Harris, F.F, και S.D Ray. *Cancer Potency Factor*. 2014.

Menichetti, Roberto, και Tristan Bereau. «Revisiting the Meyer-Overton rule for drug-membrane permeabilities.» *Molecular Physics*, 2019.